

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.14.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200526.1800.012.html\(2020-05-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200526.1800.012.html(2020-05-27))

## 肺炎克雷伯菌 KP1\_0324 基因突变株构建及其对生物膜形成的影响\*

赵航宇,何 嵩,刘 品,袁灵月,邱景富,李迎丽<sup>△</sup>

(重庆医科大学公共卫生与管理学院 400016)

**[摘要]** **目的** 探究肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 中 KP1\_0324 基因对菌株生物膜形成的影响。**方法** 构建肺炎克雷伯菌 KP1\_0324 基因缺失的突变株。先分别扩增 KP1\_0324 基因的上下游同源臂,通过融合 PCR 得到缺失此目的基因的融合片段,将该片段克隆到自杀质粒 pKO3-Km 上得到重组质粒,再将重组质粒转入肺炎克雷伯菌野生株中,利用同源重组的原理,筛选得到目的基因缺失的突变株 Kp- $\Delta$ 0324。构建回补株,利用 PCR 扩增得到 KP1\_0324 基因片段,并克隆到表达载体 pBAD33 上,再将得到的重组质粒转入突变株 Kp- $\Delta$ 0324 中,得到回补株 Kpc- $\Delta$ 0324。利用生物膜结晶紫染色实验和扫描电镜观察野生株、突变株和回补株的生物膜相对形成量及生物膜的表面结构。**结果** 成功构建突变株 Kp- $\Delta$ 0324 和回补株 Kpc- $\Delta$ 0324;与野生株相比,突变株 Kp- $\Delta$ 0324 的生物膜形成量明显降低( $P < 0.01$ )。**结论** 肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 中 KP1\_0324 基因与细菌生物膜的形成有关。

**[关键词]** 肺炎克雷伯菌;KP1\_0324;突变;生物膜**[中图法分类号]** R378.996**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)14-2245-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Construction of KP1\_0324 mutant strain of *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilm formation\*

ZHAO Hangyu, HE Qiang, LIU Pin, YUAN Lingyue, QIU Jingfu, LI Yingli<sup>△</sup>

(School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of KP1\_0324 gene on the biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **Methods** Firstly, the mutant strains of *Klebsiella pneumoniae* with deletions of KP1\_0324 gene were constructed. The upstream and downstream flanking DNA fragments of KP1\_0324 gene were amplified by PCR, and then cloned into plasmid pKO3-Km. The recombinant plasmid was transformed into wild-type *Klebsiella pneumoniae* strain. The mutant strains with deletions of KP1\_0324 gene were screened by PCR after homologous recombination. Secondly, the complemented strains were constructed. The KP1\_0324 gene fragment was amplified and cloned into the vector pBAD33, then the recombinant plasmid was transformed into mutant strains with deletions of KP1\_0324 gene to get the complemented strains. The biofilm formation of wild-type strain, mutant and complemented strain were tested by using crystal violet staining and scanning electron microscopy. **Results** The mutant Kp- $\Delta$ 0324 and the complemented Kpc- $\Delta$ 0324 strains were successfully constructed. The quantity of biofilm formed by the mutant Kp- $\Delta$ 0324 strain was significantly lower than that formed by the wild-type strain. **Conclusion** The KP1\_0324 gene might be related to the formation of bacterial biofilm in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.

**[Key words]** *Klebsiella pneumoniae*; KP1\_0324; mutation; biofilm

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)属肠杆菌科,常存在于健康人体的口腔、鼻咽、肠道和皮肤中。在机体免疫力降低或长期大量使用抗菌药物的

情况下,其可成为一种重要的机会性致病菌,主要引起尿路感染、败血症、肺炎、化脓性肝脓肿和脑膜炎等疾病<sup>[1-3]</sup>。生物膜是细菌分泌的胞外基质将自身包裹

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(31200064,31071093,31170129)。 作者简介:赵航宇(1995—),在读硕士研究生,主要从事微生物的转录调控和基因功能研究。

而形成的膜状复合物<sup>[4]</sup>,能使细菌不易被宿主免疫系统清除,同时能增强细菌细胞之间的交流及细菌的耐药性<sup>[5]</sup>。肺炎克雷伯菌的致病性和耐药性与其极易形成生物膜这一特性有着密切联系<sup>[6-7]</sup>。肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 是来自台湾 1 例肝脓肿患者的分离株,属于 K1 血清型<sup>[8]</sup>。KP1\_0324 基因是该菌株的假设蛋白编码基因,与肺炎克雷伯菌 CG43(K2 血清型)的 yjcC 基因有较高的同源性。YjcC 蛋白具有磷酸二酯酶(PDE)活性,通过环二鸟苷酸(c-di-GMP)途径影响肺炎克雷伯菌生物膜形成<sup>[9-10]</sup>。目前对于 NTUH-K2044 菌株中 KP1\_0324 基因的功能尚少有报道,作者推测该基因可能参与细菌生物膜形成过程。因此,本研究通过构建 KP1\_0324 基因的突变株和回补株,并比较野生株、突变株和回补株三者生物膜形成量,从而分析 KP1\_0324 对生物膜形成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及质粒

本实验所用肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 和质粒 pKO3-Km(卡那霉素抗性,Kmr)来自中国台湾大学,大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (*E. coli* DH5 $\alpha$ )和质粒 pBAD33(氯霉素抗性,Cmr)为重庆医科大学实验室保存菌株。

#### 1.1.2 引物

本实验所用引物均委托生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 实验所用引物

引物	序列(5'-3')
KP1_0324-A	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCGCAGGGT</u> GATACCGAGCA
KP1_0324-B	GAGCATTTGGCTAACCACTTTACGCTTACATCCATGC
KP1_0324-C	GCATGGATGTAAGCGTAAAGTGGTTAGCCAATGCTC
KP1_0324-D	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCGTTTTT</u> GCCACTTCTCCAG
KP1_0324-HB-F	CGGGGTACCAGGAGGAATTCACCATGGGTGACAGT-GCG
KP1_0324-HB-R	ACGCGTCGACTCAGATCTCCGCGTGACG

下划线部分:限制性酶切位点。

#### 1.1.3 主要试剂

dNTPs(2.5 mmol/L)、Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)、DNA 标记物和 PCR 产物(胶)回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;Pfu DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu$ L)、二甲亚砜(DMSO)购自生工生物工程(上海)有限公司;限制性内切酶 Not I(10 U/ $\mu$ L)、Kpn I(20 U/ $\mu$ L)、Sal I(20 U/ $\mu$ L)、小牛肠碱性磷酸酶(CIP,10 U/ $\mu$ L)及 T4 DNA 连接酶(40 U/ $\mu$ L)为 New England Biolabs 产品,质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,其他生化试剂为国产分析纯。

#### 1.1.4 培养基及抗菌药物

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,蒸馏水定容至 1 000 mL。氯霉素(35 mg/

mL):氯霉素粉末 0.35 g,无水乙醇定容至 10 mL。卡那霉素(50 mg/mL):卡那霉素粉末 0.5 g,蒸馏水定容至 10 mL。

## 1.2 方法

### 1.2.1 构建突变株 Kp- $\Delta$ 0324

根据肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 中 KP1\_0324 基因序列,在 KP1\_0324 基因的两侧设计两对引物 KP1\_0324-A/B 和 KP1\_0324-C/D(表 1)。以野生株基因组 DNA 为模板,分别用两对引物,扩增 KP1\_0324 基因的上下游同源臂片段。以上下游同源臂片段的 PCR 产物为模板,用 KP1\_0324-A/D 作为引物对,进行融合 PCR 反应,得到缺失 KP1\_0324 基因的同源臂融合片段。利用限制性内切酶 Not I 对回收纯化后的同源臂融合片段及 pKO3-Km 质粒分别进行酶切,再用 T4 DNA 连接酶对酶切后的融合片段和质粒进行连接。将连接产物化学转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,涂布于 LB 平板上(含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素),30  $^{\circ}$ C 培养至长出单菌落。PCR 方法筛选阳性转化子 pKO3-Km-p0324。再将重组质粒 pKO3-Km-p0324 电转化入 NTUH-K2044 感受态细胞中,经过同源重组,PCR 筛选得到 KP1\_0324 基因缺失的突变株 Kp- $\Delta$ 0324<sup>[11]</sup>。

### 1.2.2 构建回补株 Kpc- $\Delta$ 0324

根据 KP1\_0324 基因序列,设计回补引物 KP1\_0324-HB-F/R(表 1)。以野生株基因组 DNA 为模板,用回补引物扩增得到 KP1\_0324 基因片段;利用限制性内切酶 Kpn I 和 Sal I 分别对 KP1\_0324 片段和 pBAD33 质粒进行双酶切;然后用 T4 DNA 连接酶对酶切后的基因片段和载体进行连接,将连接产物化学转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,涂布于 LB 平板上(含 35 mg/mL 氯霉素),37  $^{\circ}$ C 培养至长出单菌落。PCR 方法筛选出阳性转化子 pBAD33-p0324。将鉴定正确的阳性重组子电转化到突变株 Kp- $\Delta$ 0324 中,PCR 筛选得到回补了 KP1\_0324 基因的回补株 Kpc- $\Delta$ 0324。

### 1.2.3 生物膜结晶紫染色实验

将野生株 NTUH-K2044、突变株 Kp- $\Delta$ 0324 及回补株 Kpc- $\Delta$ 0324 分别接种到 LB 肉汤中,其中回补株添加 35 mg/mL 氯霉素,突变株添加 50 mg/mL 卡那霉素,37  $^{\circ}$ C 振荡培养至 600 nm 处吸光度( $A_{600}$ )值为 1.0。用 LB 肉汤 100 倍稀释菌液,取 200  $\mu$ L 稀释后的菌液到 96 孔板内,37  $^{\circ}$ C 静置培养 24 h 后,测定每孔细菌的  $A_{600}$  值,吸去菌液,用去离子水轻轻清洗 3 次以去除浮游细菌。用 300  $\mu$ L 0.1%(w/v)结晶紫溶液染色生物膜 30 min,吸去染液,并用去离子水清洗游离结晶紫溶液至无色澄清。每孔加入 200  $\mu$ L DM-SO 溶解结合染料,待彻底溶解后,测定溶液 570 nm 处吸光度( $A_{570}$ )值。按照生物膜相对形成量 =  $1\ 000 \times A_{570} / (A_{600} \times V_1 \times V_2)$  来计算每株菌的生物膜相对形成量。其中, $V_1$  为初始菌液体积, $V_2$  为 DM-

SO 体积<sup>[12]</sup>。每株菌设置 3 个重复,实验重复 3 次。

### 1.2.4 生物膜扫描电镜

野生株、突变株及回补株培养方法同结晶紫染色实验,将 15  $\mu$ L 稀释后的菌液及 2 mL 新鲜 LB 肉汤添加到 24 孔板内,每孔预先加入一块玻片,37  $^{\circ}$ C 静置培养 24 h。取出玻片,用去离子水洗去游离细菌,将玻片置于 2.5% 戊二醛电镜固定液中保存。扫描电镜实验委托上海辰麦检测生物技术有限公司完成,电镜所用仪器为日立 SU8010。

### 1.3 统计学处理

采用 Prism 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 构建 KP1\_0324 基因突变株

用基因外部引物对 KP1\_0324-A/D,以野生株 K2044 的基因组 DNA 为模板作为阳性对照进行 PCR,得到约 2 756 bp 大小的片段(图 1 第 2 泳道)(目的条带下方,700 bp 左右为一条非特异性扩增条带);以突变株 Kp- $\Delta$ 0324 的基因组 DNA 为模板扩增得到约 1 181 bp 大小的片段(图 1 第 4 泳道),缺失了 1 575 bp 大小的 KP1\_0324 基因片段,与理论值大小相符,突变株 Kp- $\Delta$ 0324 构建成功。

### 2.2 构建 KP1\_0324 基因回补株

PCR 对回补株进行鉴定。利用 KP1\_0324-HB-F 和 KP1\_0324-HB-R 引物对,以回补株基因组 DNA 作为模板,PCR 后得到大小约为 1 605 bp 的片段(图 1 第 5 泳道),该片段大小与以野生株基因组 DNA 作为模板时扩增得到的片段大小一致(图 1 第 7 泳道),回补株 Kpc- $\Delta$ 0324 构建成功。

### 2.3 生物膜结晶紫染色

肺炎克雷伯菌野生株、突变株及回补株分别接种到 LB 培养液中,在 96 孔板静置培养 24 h 后,对形成的生物膜进行结晶紫染色,半定量测定生物膜的相对形成量,实验重复 3 次,结果显示,突变株的生物膜形成量明显低于野生株( $P < 0.01$ ),回补株的生物膜形

成量略高于突变株,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。

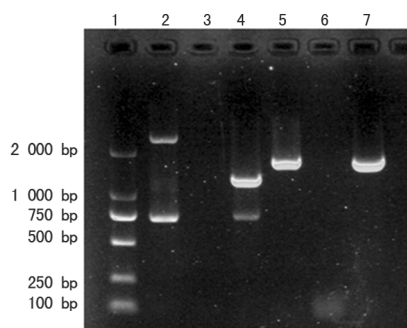
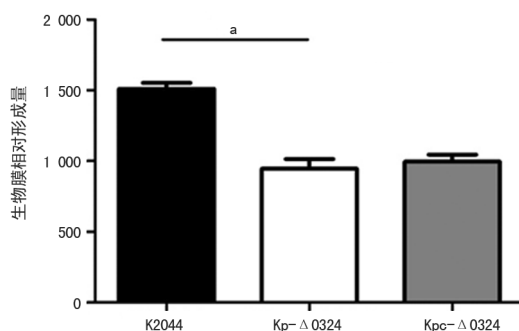


图 1 KP- $\Delta$ 0324 和 Kpc- $\Delta$ 0324 的 PCR 鉴定结果电泳图  
1: DNA Marker DL2000; 2: 以 NTUH-K2044 为模板, KP1\_0324-A/D 为引物的 PCR 产物; 3: 阴性对照; 4: 以突变株 Kp- $\Delta$ 0324 为模板, KP1\_0324-A/D 为引物的 PCR 产物; 5: 以 NTUH-K2044 为模板, KP1\_0324-HB-F/R 为引物的 PCR 产物; 6: 阴性对照; 7: 以回补株 Kpc- $\Delta$ 0324 为模板, KP1\_0324-HB-F/R 为引物的 PCR 产物。

图 1 KP- $\Delta$ 0324 和 Kpc- $\Delta$ 0324 的 PCR 鉴定结果电泳图

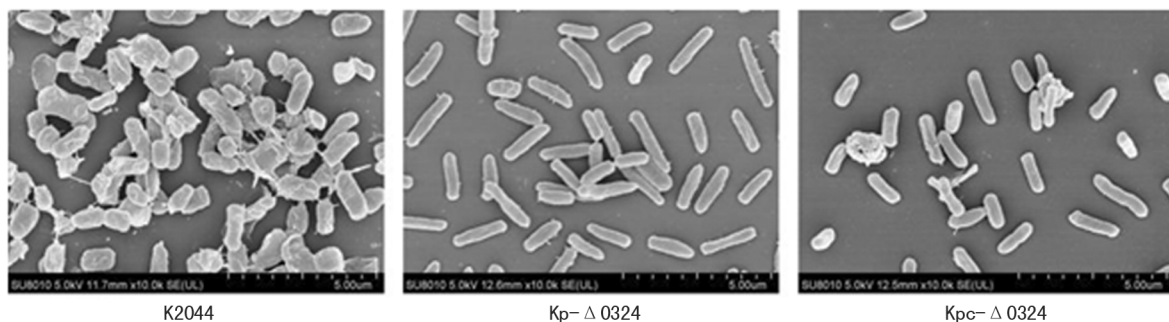


<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ 。

图 2 结晶紫染色测定生物膜相对形成量

### 2.4 扫描电镜观察生物膜形成

将肺炎克雷伯菌野生株、KP1\_0324 基因突变及回补株接种到 LB 培养基,在 24 孔板上静置培养 24 h,生物膜形成于提前放入 24 孔板内的无菌玻片上。通过扫描电镜分析,观察 3 株菌在玻片上的生物膜形成情况,见图 3。与野生株相比,突变株的细菌未聚集成团,生物膜结构不明显。回补株介于野生株和突变株之间。进一步表明 KP1\_0324 基因的缺失改变了细菌生物膜的形成能力。



比例尺: 5  $\mu$ m。

图 3 生物膜扫描电镜( $\times 10\ 000$ )

## 3 讨 论

生物膜是由细菌分泌的胞外聚合物将自身包裹

在内形成的三维结构,主要包括多糖、脂类、蛋白及核酸等<sup>[13-14]</sup>。在遇到不利生存因素时,细菌能够通过调

节生物膜的结构抵御外界不利因素的作用,提高自身存活能力及细菌对抗生素的耐性,这是细菌耐药性产生的重要原因之一<sup>[15]</sup>。肺炎克雷伯菌极易形成生物膜,从而定植于生物或者非生物表面。生物膜的形成有众多基因的参与,受到细菌内多种细胞因子与信号通路的调控作用,是一个复杂的动态过程。

环二鸟苷酸(c-di-GMP)是细菌内广泛存在的重要的第二信使<sup>[16]</sup>,能调控生物膜形成相关的影响因素从而调控生物膜。有研究报道,c-di-GMP 依耐性转录调控蛋白 MrkHIJ 能通过调控 III 型菌毛的表达来影响生物膜形成<sup>[17]</sup>。有研究发现,肺炎克雷伯菌 CG43 中的 yjcC 基因所编码的磷酸二酯酶蛋白 YjcC 能够通过调控细菌内 c-di-GMP 水平来减少生物膜的形成<sup>[9-10]</sup>。目前对于 NTUH-K2044 菌株中 KP1\_0324 基因,尚少有相关研究报告。通过生物信息学方法分析发现,KP1\_0324 基因作为 NTUH-K2044 的假设蛋白编码基因,与肺炎克雷伯菌 CG43 中的 yjcC 基因有较高同源性。因此作者猜测它们编码的蛋白具有相似功能,即 KP1\_0324 基因可能对生物膜形成有影响。本文对基因 KP1\_0324 的功能进行了初步探究,证实了作者的猜测,即 KP1\_0324 基因与肺炎克雷伯菌的生物膜形成有关,为进一步研究该基因在生物膜形成中的功能奠定了基础,为更好地揭示生物膜的形成机制提供了数据。

本次实验在验证假设的同时初步显示 KP1\_0324 基因缺失使生物膜形成减少,这与 YjcC 缺失使细菌生物膜形成增加的结果并不一致。YjcC 对生物膜形成的影响不是直接的,而是通过调节细菌的第二信使 c-di-GMP 水平来参与生物膜的形成过程<sup>[9]</sup>;即使 KP1\_0324 基因与 yjcC 基因有较高同源性,在生物膜形成的大家庭中可能扮演着不同的角色,KP1\_0324 基因对肺炎克雷伯菌生物膜的影响是否通过 c-di-GMP 途径参与,是否还受到其他调控子的作用,还需要更深入的研究。

回补株 Kpc-Δ0324 的生物膜形成量未回复到野生株的水平,作者推测可能重组质粒中 KP1\_0324 基因表达的蛋白发生折叠或者定位错误,从而影响了蛋白质功能。综上所述,本次研究成功构建了肺炎克雷伯菌 KP1\_0324 基因的突变株 Kp-Δ0324 和回补株 Kpc-Δ0324,证实了肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 中 KP1\_0324 基因与细菌生物膜的形成有关。

## 参考文献

[1] LIN W H, KAO C Y, YANG D C, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(9): 1533-1539.

[2] BIALEK-DAVENE S, CRISCUOLO A, AILLOUD F, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(11): 1812-1820.

[3] 唐敏, 杨佳, 丁银环, 等. 侵袭性感染高黏液性肺炎克雷伯菌毒力因子及分子特征研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(5): 641-645.

[4] 景双艳, 王晓宁, 魏莲花, 等. 金黄色葡萄球菌表面蛋白 Ebh 致病性的研究进展[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(2): 156-159.

[5] LIU Y, YANG J. Advances in research on resistance mechanisms of bacterial biofilms[J]. *Agricultural Biotech*, 2019, 8(1): 190-193.

[6] YANG F, SHEN C, ZHENG X B, et al. Plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou, China[J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 385-389.

[7] GALANI I, SOULI M, NAFPLIOTI K, et al. In vitro activity of imipenem-relebactam against non-MBL carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Greek hospitals in 2015-2016[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(6): 1143-1150.

[8] HUN J, JUNG H M, JUNG M Y, et al. Effects of gltA and arcA mutations on biomass and 1, 3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2019, 24: 95-102.

[9] HUANG C J, WANG Z C, HUANG H Y, et al. YjcC, a c-di-GMP phosphodiesterase protein, regulates the oxidative stress response and virulence of *Klebsiella pneumoniae* CG43 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e66740.

[10] 全旭, 王鹤龄, 张慧彦, 等. c-di-GMP 及其对细菌生物膜调控作用的研究进展[J]. *现代口腔医学杂志*, 2018, 32(6): 352-356.

[11] 王丽, 多丽波. 基因敲除技术在肺炎克雷伯菌基因功能研究中的应用进展[J]. *临床检验杂志*, 2015, 33(5): 376-377.

[12] WANG L, LING Y, JIANG H, et al. AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 160(3): 245-251.

[13] GUPTA P, SARKAR S, DAS B, et al. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review[J]. *Arch Microbiol*, 2016, 198(1): 1-15.

- 695(1/3):7-12.
- [16] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315-317.
- [17] CONSENTIUS C, MIRENSKA A, JURISCH A, et al. In situ detection of CD73+CD90+CD105+ lineage: Mesenchymal stromal cells in human placenta and bone marrow specimens by chipcytometry[J]. *Cytometry A*, 2018, 93(9):889-893.
- [18] DE CESARIS V, GROLLI S, BRESCIANI C, et al. Isolation, proliferation and characterization of endometrial canine stem cells [J]. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(2):235-242.
- [19] VASANDAN A B, SHANKAR S R, PRASAD P A, et al. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(2):344-354.
- [20] SILVA J, SMITH A. Capturing pluripotency[J]. *Cell*, 2008, 132(4):532-536.
- [21] NIWA H. How is pluripotency determined and maintained? [J]. *Development*, 2007, 134(4):635-646.
- [22] CHAMBERS I, SILVA J, COLBY D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development[J]. *Nature*, 2007, 450(7173):1230-1234.
- [23] SILVA J, NICHOLS J, THEUNISSEN T W, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state[J]. *Cell*, 2009, 138(4):722-737.
- [24] KOPP J L, ORMSBEE B D, DESLER M, et al. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4):903-911.
- [25] STREBINGER D, DELUZ C, FRIMAN E T, et al. Endogenous fluctuations of OCT4 and SOX2 bias pluripotent cell fate decisions[J]. *Mol Syst Biol*, 2019, 15(9):e9002.
- [26] LEWIS L M, EDWARDS M C, MEYERS Z R, et al. Replication study: transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc[J]. *Elife*, 2018, 7:e30274.
- [27] GRECO S J, LIU K, RAMESHWAR P. Functional similarities among genes regulated by Oct4 in human mesenchymal and embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(12):3143-3154.
- [28] MASUI S, NAKATAKE Y, TOYOOKA Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):625-635.
- [29] BOTQUIN V, HESS H, FUHRMANN G, et al. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(13):2073-2090.
- [30] WEI F, QU C, SONG T, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9):3216-3224.
- [31] 陈俊, 杨自金. 鼠神经生长因子体外诱导脐血间充质干细胞向类神经元分化[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(13):2027-2032.
- [32] LIN X, DONG R, DIAO S, et al. SFRP2 enhanced the adipogenic and neuronal differentiation potentials of stem cells from apical papilla [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(5):534-543.

(收稿日期:2019-12-18 修回日期:2020-02-02)

(上接第 2248 页)

- [14] POST S J, SHAPIRO J A, WUEST W M. Connecting iron acquisition and biofilm formation in the ESKAPE pathogens as a strategy for combatting antibiotic resistance[J]. *Medchemcomm*, 2019, 10(4):505-512.
- [15] 唐伟, 程锦楠, 余玥, 等. 细菌生物被膜对大肠埃希菌多药耐药的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(3):326-329.
- [16] 胡继宏, 朱翠明. 环二鸟苷酸调控细菌生物膜形成的研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(3):318-320.
- [17] TAN J W H, WILKSCH J J, HOCKING D M, et al. Positive autoregulation of mrkHI by the cyclic di-GMP-dependent MrkH protein in the biofilm regulatory circuit of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(9):1659-1667.

(收稿日期:2019-12-28 修回日期:2020-03-02)