

双组分信号转导系统 *saeRS* 对表皮葡萄球菌生存能力的影响

娄强¹, 王耀辉¹, 瞿滢², 马远方^{1△}

1. 河南大学医学院 河南省医学与分子免疫学实验室 抗体药物河南省工程实验室(开封 475004);

2. 复旦大学上海医学院 教育部/卫生部医学分子病毒学重点实验室(上海 200032)

【摘要】 目的 研究不同浓度的葡萄糖对表皮葡萄球菌野生株、*saeRS* 基因删除突变株及回复株生存能力的影响及机制。**方法** 在 BM 培养基中添加不同浓度(7.0 mmol/L、14 mmol/L、28 mmol/L、56 mmol/L)的葡萄糖,分析 3 种表皮葡萄球菌的生存能力、生物膜形成能力、培养基的酸度及抵抗抗生素生存的能力。**结果** 与表皮葡萄球菌野生株相比,葡萄糖能明显促进 *saeRS* 删除突变株的生存能力和生物膜形成能力,但能够明显降低其对抗生素(比如青霉素、苯唑西林、庆大霉素、环丙沙星和丁胺卡那霉素)的抵抗能力;*saeRS* 删除突变株和回复株在 14 mmol/L 浓度时生存能力最强,在 28 mmol/L 浓度时生物膜形成能力最强,而葡萄糖浓度对于野生株的生存能力及生物膜形成能力无显著影响。在添加 14 mmol/L 葡萄糖时,*saeRS* 删除突变株培养基(pH=8.07)的酸度比野生株(pH=7.0)明显降低。**结论** *SaeRS* 可能通过介导葡萄糖的利用影响了表皮葡萄球菌的生存能力;双组分信号转导系统 *saeRS* 影响抗生素如青霉素、苯唑西林、庆大霉素、环丙沙星和丁胺卡那霉素对表皮葡萄球菌的杀菌作用。

【关键词】 葡萄糖代谢 双组分信号转导系统 *saeRS* 生物膜形成 表皮葡萄球菌

Regulatory Effect of Two Component Signal Transduction System *saeRS* on the Survival of *Staphylococcus Epidermidis*
LOU Qiang¹, WANG Yao-hui¹, QU Di², MA Yuan-fang^{1△}. 1. Antibody Medicine of Henan Engineering Laboratory, Medical and Molecular Immunology Laboratory of Henan Province, Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Key Laboratory of Medical Molecular Virology, Ministry of Education and Health Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China

△ Corresponding author, E-mail: mayf@henu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the survival ability of *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) wildtype (WT), *saeRS* mutant (SAE) and *saeRS* complementary (SAEC) strains under different concentrations of glucose. **Methods** We measured the survival ability, biofilm forming ability, medium acidity and antimicrobial susceptibility of *S. epidermidis* in medium containing different concentrations of glucose. **Results** Compared with WT, the survival ability, biofilm forming ability and resistance to antibiotics (such as penicillin, oxacillin, gentamicin, ciprofloxacin and amikacin) of *saeRS* mutant increased significantly in response to glucose. SAE and SAEC showed the strongest survival ability and biofilm forming ability when grown in medium containing 14 mmol/L glucose and 28 mmol/L, respectively. WT showed no significant different survival and biofilm forming abilities when cultured with various concentrations of glucose. The medium acidity of *saeRS* mutant (pH=8.07) was lower than the WT (pH=7.0) in the presence of 14 mmol/L glucose. **Conclusion** *SaeRS* may influence the survival ability of *S. epidermidis* by affecting glucose utilization.

【Key words】 Glucose metabolism Two component signal transduction system *saeRS* Biofilm formation *Staphylococcus epidermidis*

双组分信号转导系统(two component signal transduction systems, TCSs)存在于各种原核生物中,它能感应所处微环境变化的信号,调控菌体内相关基因表达,与细菌的毒力和致病性关系密切^[1]。在金黄色葡萄球菌中,双组分信号转导系统金黄色葡萄球菌胞外蛋白表达(*Staphylococcus aureus* exoprotein expression, *sae*)^[2]影响生物膜的形成和毒力因子(例如蛋白 A、溶血素 α 和 β 、凝固酶)的表达。在表皮葡萄球菌中,*saeRS* 参与调节细菌自溶和生物膜形成及厌氧代谢的调控,并且参与细菌抵抗中性粒细胞的杀伤作用。本实验室前期研究发现

saeRS 对表皮葡萄球菌的葡萄糖代谢过程有明显的调节作用^[3, 4]。表皮葡萄球菌在 BHI 葡萄糖培养基中代谢产生的弱酸压力可以显著降低细菌的自溶率^[5]。已有研究发现培养基中添加 11.1 mmol/L 浓度的葡萄糖能明显促进细菌生物膜形成^[6]。但葡萄糖在促进生物膜形成过程中作用的机制仍不明确,故本研究在已成功构建表皮葡萄球菌 *saeRS* 基因删除突变株及回复突变株的基础上,对双组分信号转导系统 *saeRS* 调控表皮葡萄球菌在不同葡萄糖浓度影响下的生存能力及机制进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 表皮葡萄球菌 1457 野生型(WT)、表皮葡萄球菌 *saeRS* 基因删除突变株(SAE)、表皮葡萄球菌 *saeRS* 基因回复突变株(SAEC)、生物膜形成阴性菌株表皮葡萄球菌 ATCC12228 均来自上海复旦大学分子病毒学实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器 青霉素、苯唑西林、庆大霉素、环丙沙星和丁胺卡那霉素及对应的药敏试片购自杭州天和微生物试剂公司;ATP 检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;其他试剂皆为国产分析纯。Mueller-Hinton(MH)培养基(购自上海前尘生物科技有限公司,货号 225230);牛肉粉 2 g/L、可溶性淀粉 1.5 g/L、酸水解酪蛋白 17.5 g/L;BM 培养基(本实验室配制):1 L 去离子水中溶解 10 g 胰蛋白胍粉剂、5 g 酵母提取物粉剂、5 g NaCl、1 g 磷酸氢二钠,并添加不同浓度葡萄糖(7.0 mmol/L、14 mmol/L、28 mmol/L、56 mmol/L),于 121 °C 高压(1.034×10^5 Pa)灭菌 20 min,4 °C 保存。

1.2 不同浓度葡萄糖培养基中表皮葡萄球菌生存能力分析

将过夜培养的表皮葡萄球菌(WT、SAE、SAEC)1:200 接种于已添加不同浓度(7、14、28、56 mmol/L)葡萄糖的 BM 培养基和未添加葡萄糖的 BM 培养基中,置于摇床中 37 °C、220 r/min 培养 12 h,倍比稀释后涂布于 BSA 平板(每种细菌涂布 3 个平板),计数克隆形成单位(colony forming unit, CFU)。

1.3 不同浓度葡萄糖培养基中表皮葡萄球菌生物膜形成能力分析

将 3 种表皮葡萄球菌经 37 °C、220 r/min 过夜培养后 1:200 稀释于含有不同浓度(7、14、28、56 mmol/L)葡萄糖的 BM 培养基,加入 96 孔板中(200 μ L/孔),每种细菌接种 3 复孔,并且采用生物膜形成阴性表皮葡萄球菌 ATCC12228 作为阴性对照。37 °C 温箱中静置培养过夜,首先用多功能酶标仪(美国 Beckman Coulter 公司)测菌液 595 nm 处光密度(OD)值,用于计算同样数量的细菌形成生物膜的能力;然后弃菌液,加入 PBS 200 μ L 洗去游离的细菌,重复洗涤 3 次;采用 99%甲醇固定 15 min,弃甲醇,室温干燥,然后加入 2%结晶紫染色 8 min,洗净结晶紫染液。96 孔板干燥后,测定 570 nm 处紫外吸光度 A_{570} 值,实验重复 3 次,将 3 次 A_{570} 值取平均值。

1.4 甲基红实验

为了进一步探索葡萄糖对表皮葡萄球菌生存能

力的影响是否通过改变培养基的酸度,我们将过夜培养的 3 种表皮葡萄球菌 1:200 稀释于含有不同浓度(7、14、28、56 mmol/L)葡萄糖的 BM 培养基中,37 °C 培养 24 h 后离心(8 000 r/min),取上清。加入 5 滴甲基红指示剂,轻轻晃动使其分散于整个上清中,观察培养基的颜色,如果变红,即表明细菌能够利用葡萄糖;同时采用 pH 计(上海梅特勒-托利多实验仪器有限公司,型号 FE20)测量培养基 pH 值。

1.5 药敏实验

首先挑取单菌落:即用接种环蘸取少量表皮葡萄球菌在固体培养基 TSA 表面并分区划线,过夜孵育后,挑取单个菌落。将挑取的单个菌落接种在 MH 培养基中,37 °C 培养至对数生长中期后进行麦氏比浊,调节菌液浊度为 0.5 麦氏比浊标准,相当于 5×10^9 CFU/mL。然后再用 MH 培养基稀释,调整细菌的终浓度约为 10^5 CFU/mL。挑选 1.2 中观察到的对细菌 SAE 生存能力影响最大的葡萄糖浓度(14 mmol/L)加入 MH 培养基,观察 WT、SAE、SAEC 和 ATCC12228 对抗生素的敏感性。在添加了 14 mmol/L 葡萄糖的 MH 琼脂培养基上涂布菌液 100 μ L。最后将药敏纸片贴在培养基表面,每个培养板等距离放置 5 个药物纸片(青霉素、苯唑西林、庆大霉素、环丙沙星和丁胺卡那霉素)。然后倒置于 37 °C 培养箱中静置培养 24 h 后,用游标卡尺测量抑菌圈的直径。

1.6 统计学方法

两组数据比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 葡萄糖对各表皮葡萄球菌株生存能力的影响

SAE 和 SAEC 均在 14 mmol/L 葡萄糖浓度时生存能力最强($CFU = 4.27 \times 10^{10}/mL$, $2 \times 10^{10}/mL$),但当葡萄糖浓度进一步增加时,其生存能力反而下降(图 1);葡萄糖对 WT 的生长没有明显的促进作用。在葡萄糖浓度为 7 mmol/L 时,葡萄糖诱导 SAE 的生存能力高于 WT($P = 0.049$),在葡萄糖浓度为 14 mmol/L 时,葡萄糖诱导 SAE 的生存能力高于 WT 和 SAEC(P 值分别为 0.004, 0.044);在葡萄糖浓度为 28 mmol/L 时,葡萄糖诱导 SAE、SAEC 的生存能力高于 WT($P < 0.05$);其余组间差异没有统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 葡萄糖对各表皮葡萄球菌株生物膜形成能力

的影响

从图 2 可见,葡萄糖能促进 SAE 的生物膜形成,当葡萄糖浓度达到 28 mmol/L 时生物膜形成能力最强($A_{570}=0.304\pm0.034$),WT 与 SAE 的生物膜形成能力差异有统计学意义($P=0.007$),其它组间差异没有统计学意义;葡萄糖对 WT 和 SAE 的生物膜形成能力影响较小,同菌株内各浓度间差异无统计学意义。

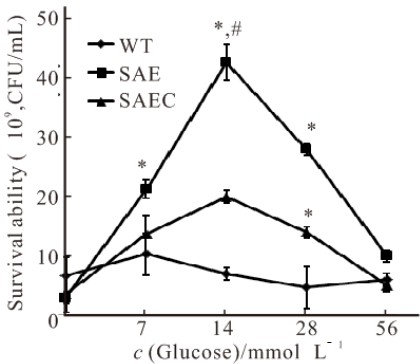


图 1 不同浓度的葡萄糖对表皮葡萄球菌生存能力的影响
Fig 1 Effect of different concentrations of glucose on *S. epidermidis* survival ability

* $P<0.05$, vs. WT group; # $P<0.05$, vs. SAEC group

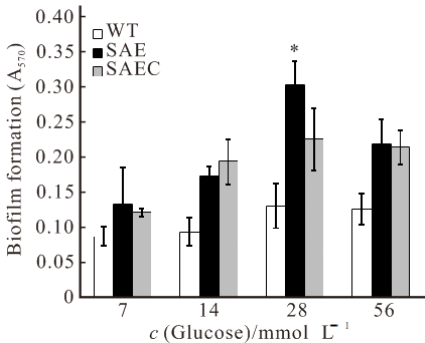


图 2 葡萄糖对表皮葡萄球菌的生物膜形成能力影响
Fig 2 Effect of different concentrations of glucose on *S. epidermidis* biofilm-forming ability

* $P<0.05$, vs. WT group

2.3 葡萄糖对表皮葡萄球菌株培养基酸度的影响

由图 3 可见,在 14 mmol/L 葡萄糖浓度作用下,WT 与 SAEC 的 pH 值分别为 7(<7.4)和 7.5,而 SAE 培养基 pH 值为 8.07(>7.4),高于 WT 和 SAEC(P 均 <0.05),提示在此浓度下,SAE 的葡萄糖利用能力下降,培养基的酸度降低从而增加了细菌的生存能力。其它浓度葡萄糖作用下,3 种菌株的培养基酸度差异无统计学意义。

2.4 葡萄糖对各表皮葡萄球菌株抗生素敏感性的影响

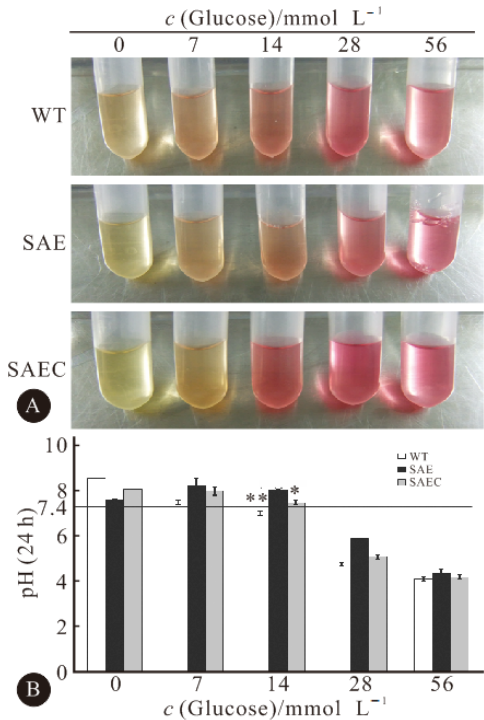


图 3 不同浓度葡萄糖对表皮葡萄球菌培养基酸度的影响
Fig 3 Effect of different concentrations of glucose on *S. epidermidis* medium acidity (A: Methyl red test; B: The pH of the supernatant was determined using a pH meter)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. SAE group

在 14 mmol/L 葡萄糖浓度下 WT、SAE、SAEC、ATCC12228 对 5 种常见抗生素的敏感情况见图 4。结果如附表所示,抑菌效果最好的药物是青霉素(SAE 菌株抑菌圈直径为 2 cm,比 WT 菌株

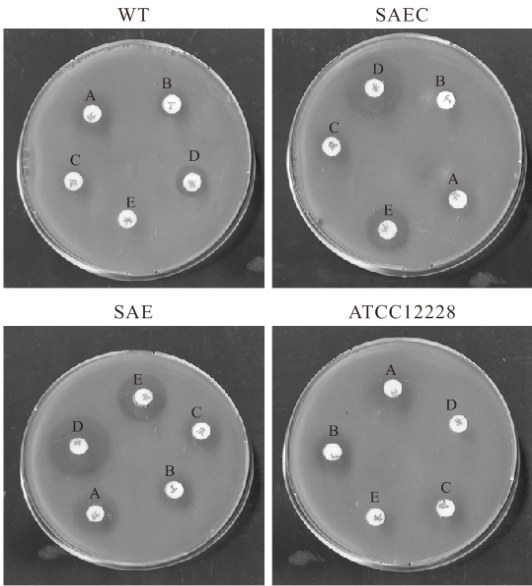


图 4 14 mmol/L 葡萄糖浓度下抗生素对表皮葡萄球菌抑菌效果
Fig 4 Antimicrobial effect of antibiotics [ciprofloxacin (A), amikacin (B), gentamicin (C), penicillin (D), oxacillin (E)] on *S. epidermidis* in the presence of 14 mmol/L glucose

附表 14 mmol/L 葡萄糖浓度下抗生素对表皮葡萄球菌的抑菌环直径(cm, $\bar{x}\pm s$)

Table Antibacterial cycle diameter of antibiotics on *S. epidermidis* in the presence of 14 mmol/L glucose (cm, $\bar{x}\pm s$)

	Penicillin	Oxacillin	Gentamicin	Ciprofloxain	Amikacin
WT	0.98±0.08	0.65±0.05	0.70±0.10	1.17±0.08	0.85±0.05
SAE	1.90±0.05	1.52±0.08	1.20±0.10	1.35±0.05	0.93±0.10
SAEC	1.70±0.05	1.32±0.06	0.82±0.08	1.17±0.06	0.60±0.05
ATCC12228	—	0.55±0.05	0.83±0.15	1.00±0.20	0.98±0.10

增加 1 cm)、苯唑西林(SAE 菌株抑菌圈直径为 1.5 cm,比 WT 菌株增加 1.3 cm),其次是庆大霉素、环丙沙星和丁胺卡那霉素。

3 讨论

表皮葡萄球菌感染在临床上具有持续性和反复性的特点,这与其在植入材料上黏附并形成生物膜,抵抗宿主免疫系统和抗生素的杀菌作用有关^[7]。糖尿病患者合并感染表皮葡萄球菌尤为常见,一方面可能由于此类患者留置导管比较常见,形成生物膜利于表皮葡萄球菌的寄居;另一方面可能由于高葡萄糖等环境因素刺激生物膜形成^[8]。本研究结合临床实际,采用临床上诊断糖尿病的临床值即血糖浓度高于 7 mmol/L,研究不同浓度的葡萄糖浓度对生物材料表面感染表皮葡萄球菌的影响具有极大的实用价值。适量浓度的葡萄糖能增加持留菌对抗生素的敏感性。双组分信号转导系统 *saeRS* 主要影响抗生素如青霉素、苯唑西林对表皮葡萄球菌的杀菌作用,显示了 *saeRS* 可能通过影响细菌的细胞壁合成,从而对作用于细菌细胞壁合成的抗生素比较敏感,提示 *saeRS* 可能成为新的药物靶标。

在前期研究中,我们发现 *saeRS* 调控葡萄糖代谢途径,通过比较 *saeRS* 删除株与野生株蛋白质二维电泳图谱,发现 *saeRS* 基因删除后表皮葡萄球菌糖酵解和三羧酸循环过程中的有关酶类的表达降低^[3]。在本研究中,分别将不同浓度的葡萄糖添加到表皮葡萄球菌培养基中,发现野生株在培养基中含有 7 mmol/L 葡萄糖时生存能力最强,而突变株在 14 mmol/L 葡萄糖浓度时生存能力最强,这可能是因为突变株利用葡萄糖的能力低于野生株,造成培养基的酸度比较低,从而诱导细菌自溶。进一步比较培养基的酸度发现,培养基中含有葡萄糖时突变株 pH 值比野生株高,提示 *saeRS* 正向调控葡萄糖代谢过程。

表皮葡萄球菌生物膜的形成受外界环境因素的变化影响,例如高渗透压、高葡萄糖浓度、胞外黏附介质。我们研究发现高浓度葡萄糖对生物膜的诱导

作用反而下降,这与徐玉善等^[6]报道的结果一致,提示葡萄糖对生物膜的诱导可能还与其他机制有关比如影响细菌培养基的酸度。在测量细菌生物膜形成能力实验中,WT、SAE 和 SAEC 在培养 12 h 后,各培养基具有相似的 A_{570} 值,故而可以排除细菌数量对生物膜形成能力的影响。另外,细菌的多糖合成和生物被膜的形成密切相关,然而我们的前期研究发现,在 *saeRS* 基因删除突变株与野生株的 PIA 产量没有明显差异^[9],这提示葡萄糖代谢影响生物膜形成可能不通过 PIA 的合成增加,而通过葡萄糖代谢产生的能量或者引起培养基酸碱度的改变。对于不同浓度葡萄糖对表皮葡萄球菌生物膜的影响具体机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Joshi HM, Tabita FR. A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1996;93(25):14515-14520.
- 2 Benson MA, Lilo S, Nygaard T, *et al*. Rot and SaeRS cooperate to activate expression of the staphylococcal superantigen-like exoproteins. *J Bacteriol*,2012;194(16):4355-4365.
- 3 娄强,王艳歌,瞿涤. 表皮葡萄球菌双组分信号转导系统 *saeRS* 对相关蛋白调控的研究. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012;33(6):680-684.
- 4 Lou Q, Qi Y, Ma Y, *et al*. Two-component signal transduction system *saeRS* positively regulates *staphylococcus epidermidis* glucose metabolism. *Scientific World J*, 2014 Jan 23; 2014: 908121. doi: 10.1155/2014/908121. eCollection 2014.
- 5 Cerca F, Franca A, Guimaraes R, *et al*. Modulation of poly-N-acetylglucosamine accumulation within mature *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown in excess glucose. *Microbiol Immunol*,2011;55(10):673-682.
- 6 徐玉善,叶联华,黄云超等. 高浓度葡萄糖对表皮葡萄球菌生物膜在生物材料表面形成的影响. *中国组织工程研究与临床康复*,2010;14(51):9609-9612.
- 7 Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*,2002;43(6):1367-1378.
- 8 靳嘉巍,张力,查锡良等. 葡萄糖对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响及调节机制的研究. *微生物学报*,2005;45(3):431-436.
- 9 Lou Q, Zhu T, Hu J, *et al*. Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation. *BMC Microbiol*,2011 Jun 24;11:146. doi: 10.1186/1471-2180-11-146.

(2014-05-12 收稿,2014-09-10 修回)
编辑 汤洁