

网络出版时间: 2021-8-19 13:48 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1124.030.html>

◇技术与方法◇

产丙酮酸棒状杆菌肽聚糖的提取和抗血流感染作用的研究

章 杨¹, 周 强¹, 陈礼文¹, 刘 周¹, 韩清珍², 史进方²

摘要 采用三氯乙酸法提取产丙酮酸棒状杆菌肽聚糖(CP-PGN), 经溶菌酶溶解试验对提取终产物的纯度进行验证, 并分析该产物的分子量、结构、氨基酸的组成。通过构建多重耐药的肺炎克雷伯菌(KPN)及白色念珠菌(CAL)的血流感染的动物模型, 评价CP-PGN抗血流感染的效果。通过溶菌酶溶解试验可得, 提取终产物为肽聚糖, 分子量为18 774 u, 傅里叶红外光谱分析显示存在肽聚糖的特征峰。采用国家标准GB/T14965-1994对其氨基酸的种类进行了检测。在动物实验中, CP-PGN能有效延长小鼠的生存时间, 提高生存率, 发挥不同程度的预防作用。所提取的CP-PGN对KPN及CAL引起的血流感染具有显著预防与抵抗作用。

关键词 产丙酮酸棒状杆菌肽聚糖; 血流感染; 多重耐药的肺炎克雷伯菌; 白色念珠菌

中图分类号 R 379.4; R 378.99+6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1665-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.031

产丙酮酸棒状杆菌(*Corynebacterium pyruviciproducens*, CP)由Tong et al^[1]在1例腹股沟脓肿中发现的一种革兰阳性棒状杆菌。另有研究^[2-3]表明CP与传统的免疫佐剂痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)相比, CP的免疫调节能力更强。肽聚糖(peptidoglycan, PGN)是细菌细胞壁的特有组成成分, 可以刺激免疫细胞, 发挥各种免疫调节作用^[4], 发挥该作用的机制与途径取决于细胞壁中PGN的含量与结构。

耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是医院血流感染的主要致病菌。通过前期实验证实, 产丙酮酸棒状杆菌肽聚糖(CP-PGN)对MRSA血流感染具有明显的防治效果^[5]。为研究CP-PGN对革兰阴性菌及真

菌是否有同样的抗血流感染作用, 该研究选取了医院感染中具有代表性的革兰阴性杆菌-多重耐药的肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KPN)及真菌-白色念珠菌(*Candida albicans*, CAL), 建立小鼠血流感染模型, 探讨CP-PGN对不同病原菌的抗血流感染能力, 为将细菌性免疫调节剂作为临床血流感染的一种辅助治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌及实验动物 产丙酮酸棒状杆菌由美国加州大学洛杉矶分校 Olive View 医学中心提供; 产丙酮酸棒状杆菌肽聚糖由苏州大学附属第一医院中心实验室提取并保存; 多重耐药的KPN、CAL均为苏州大学附属第一医院临床分离株; BABL/c小鼠6~8周龄, 体质量(25±2)g, 雌性, 15~18只, 购自扬州大学实验中心, 按照动物房的标准条件进行饲养。

1.2 主要试剂与仪器 溶菌酶购自美国 Amresco 公司。酶标仪购自美国 BioTek 公司; 超声破碎仪购自美国 SONICS 公司; S433D型氨基酸分析仪购自德国 SYKAM 公司。

1.3 方法

1.3.1 CP菌体的制备 将冻存的CP菌株进行活化培养, 无菌挑取一定量的菌落接种于含5%植物油的LB培养基中, 37℃恒温振荡箱中振荡培养48h后将培养液离心, 收集菌体, 最后用无菌生理盐水多次洗涤离心直至菌体沉淀为乳白色, 静置待水分自然蒸发后对其称重。

1.3.2 CP-PGN的提取 采用三氯乙酸法(TCA法)^[6]提取PGN。取洗涤离心得到的80g CP菌体, 提取步骤主要包括磷壁酸的去除、蛋白的去除、脂类物质的去除, 再用无水乙醇脱水并称重(干燥前), 置于70℃恒温烘箱中彻底烘干, 最终得到褐色胶状物(干燥后)。根据下列公式计算肽聚糖提取率:

肽聚糖提取率(%) = 干燥前肽聚糖重量/收集的菌体重量 × 100%

1.3.3 CP-PGN的纯度验证 采用溶菌酶溶解试

2021-07-09 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1908085QH366)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601² 苏州大学附属第一医院临床检测中心, 苏州 215006

作者简介: 章 杨, 女, 初级技师;

周 强, 男, 副教授, 主任技师, 硕士生导师, 责任作者, E-

mail: zhouqiang1973@163.com

验^[6],用0.1 mol/L pH6.2的PBS将溶菌酶配成200 μg/ml的溶液。将一定量的CP-PGN加入该溶液中配制成5 mg/ml的终溶液,立即用BioTek酶标仪在450 nm处读取第1个吸光度值,然后于37 °C恒温摇床中140 r/min振荡反应,每小时读取1个吸光度值并记录。

1.3.4 CP-PGN的结构分析 将提取的CP-PGN送至科普研发技术中心(青岛)有限公司,对其分子量、结构(傅里叶红外光谱分析)进行分析。

1.3.5 CP-PGN的氨基酸组成 将一定量的提取物与6 mol/L的盐酸溶液在110 °C的真空条件下作用20 h,经氨基酸分析仪检测该肽聚糖的氨基酸组成。

1.3.6 CP和CP-PGN的抗感染动物模型构建

1.3.6.1 热灭活的CP及CP-PGN溶液的制备 收集培养48 h后的CP菌液,离心去上清液。再用灭菌PBS离心洗涤沉淀2遍,去上清液。将该沉淀加入灭菌PBS充分混匀,置于62 °C水浴灭活3 h后,通过将溶液接种于血琼脂平板培养检测是否完全灭活。剩余的CP菌液分装保存备用。将一定量的固体状CP-PGN溶解于灭菌PBS中,通过超声破碎仪进行破碎溶解,配制成相应浓度的溶液供后续实验使用。

1.3.6.2 感染病原菌的制备 将临床分离的KPN和CAL接种于LB培养液中,培养24 h后的细菌培养液用灭菌PBS进行 10^7 、 10^8 、 10^9 一系列倍数稀释,具体操作方法为:分别吸取1 μl KPN/CAL培养液加入到含有999 μl灭菌PBS的灭菌EP管中进行 10^3 稀释;将该稀释液按照同样的方法再次进行 10^3 稀释,配制成稀释 10^6 的稀释菌液;最后将稀释 10^6 的稀释菌液分别进行10、100、1 000倍稀释后,将100 μl的该稀释菌液置于血平板中,用一次性L型无菌涂布棒采用平板涂布法使其均匀分布整个血平板,于37 °C培养箱中培养24 h后计数平板中的菌落数,根据稀释倍数将菌液稀释成最终注射浓度。

1.3.6.3 动物感染模型的构建 构建KPN/CAL血流感染的动物模型。6~8周的BALB/c小鼠随机分成对照组(Control组)、产丙酮酸棒状杆菌组(CP组)和产丙酮酸棒状杆菌肽聚糖组(CP-PGN组),每组5~6只。参考相关文献^[2-3,7]对小鼠CP/CP-PGN的最佳注射浓度进行多次摸索,注射一定浓度的CP/CP-PGN后,主要根据小鼠的精神状态、活跃程度、呼吸频率等指标确定最佳注射剂量。经小鼠尾静脉分别注射灭菌PBS、CP(500 μg/只)、

CP-PGN(100 μg/只)。24 h后3组小鼠同时尾静脉注射KPN(10×10^{10} /只)/CAL(1×10^9 /只)菌液。观察小鼠的精神状态、活动情况,记录小鼠的生存时间。获取3组小鼠的脾脏组织,对其重量和体积(长×宽×高)进行测量和分析。

1.4 统计学处理 所有数据采用GraphPad Prism 5.0分析软件进行分析,利用Kaplan-Meier法进行生存率比较,对照组与实验组进行t检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CP-PGN提取率的计算 本次实验共收集了80 g CP菌体,最终提取的肽聚糖量为0.241 4 g,则该肽聚糖提取率为0.3%。

2.2 溶菌酶溶解实验 CP-PGN与溶菌酶溶液作用后的吸光度值变化如图1所示,在最开始的2 h内吸光度值大幅度的降低,2 h之后吸光度值趋于稳定。表明提取物可以被溶菌酶降解,证实为肽聚糖。

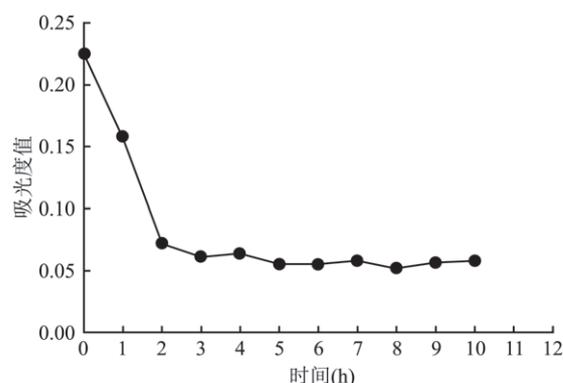


图1 肽聚糖的溶菌酶溶解实验

2.3 CP-PGN的结构分析 图2显示CP-PGN的分子量为18 774 u。图3的傅里叶红外光谱分析显示,提取的CP-PGN在 $3\ 500 \sim 3\ 200\text{ cm}^{-1}$ 、 $3\ 000 \sim 2\ 800\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 400 \sim 1\ 200\text{ cm}^{-1}$ 处存在多糖类物质的特征吸收峰; $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ 处是酰胺特征吸收峰; 862 cm^{-1} 处是β-吡喃糖苷件吸收峰; $1\ 560 \sim 1\ 540\text{ cm}^{-1}$ 处为N-H变角振动峰; $1\ 055\text{ cm}^{-1}$ 处有C-O振动吸收峰和O-H变角振动峰2个峰。

2.4 CP-PGN的氨基酸组成及含量 CP-PGN的氨基酸组成及其含量见表1所示,结果表明CP-PGN的氨基酸组成中,含量较多的依次为谷氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸。

2.5 CP-PGN能增强小鼠抗KPN/CAL引起的血流感染的能力 在小鼠感染KPN/CAL之前,提前

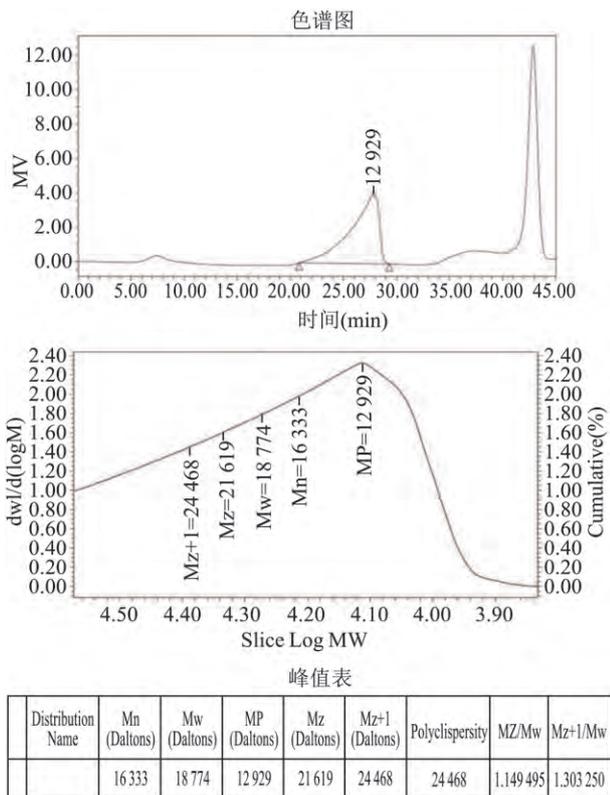


图2 肽聚糖分子量分析结果

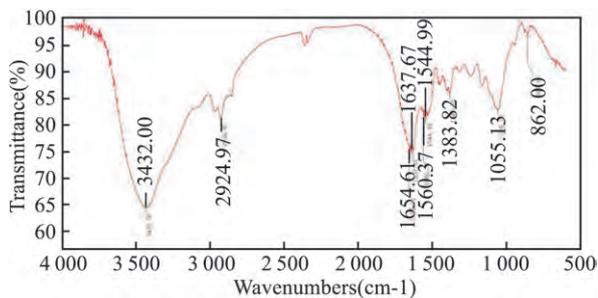
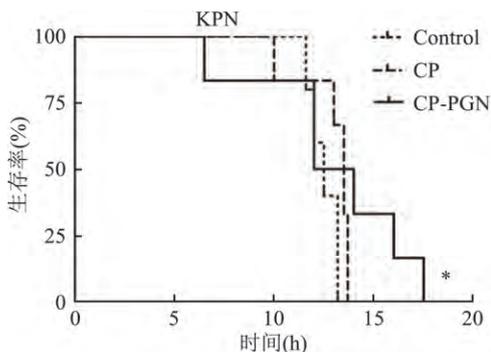


图3 肽聚糖傅里叶红外光谱分析

注射 CP/CP-PGN ,可显著增强小鼠的抵抗力。CP



和 CP-PGN 两组的小鼠精神状态、活动度等均高于 Control 组小鼠 ,CP-PGN 组作用更明显。绘制的生存曲线显示 ,CP-PGN 能有效延长 KPN/CAL 感染组小鼠的生存时间 ,提高存活率 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,如图 4 所示。脾脏是机体的一种重要免疫器官 ,它的重量和大小能够间接反映机体的免疫功能。感染 KPN 后 ,CP 组小鼠的脾脏体积和重量明显大于 Control 组 ($t = 4.824, P = 0.008$; $t = 5.266, P = 0.004$) ;而在 CAL 感染后 ,CP-PGN 组小鼠的脾脏体积和重量明显大于 Control 组 ,差异有统计学意义 ($t = 5.639, P = 0.008$; $t = 3.560, P = 0.02$) ,说明在感染 KPN/CAL 之前注射 CP 或 CP-PGN 对小鼠的免疫能力产生不同程度的影响 ,如图 5、6 所示。

表1 肽聚糖的氨基酸组成及其含量 [n(%)]

氨基酸	含量 (mg/L)	含量百分比 (%)
谷氨酸	5.138	9.6035
丙氨酸	4.633	8.6603
甲硫氨酸	3.597	6.7237
组氨酸	2.151	4.0207
亮氨酸	2.063	3.8558
天冬氨酸	1.655	3.0935
缬氨酸	1.439	2.6906
苏氨酸	1.260	2.3547
异亮氨酸	1.196	2.2352
甘氨酸	1.175	2.1957
苯丙氨酸	1.113	2.0797
精氨酸	1.046	1.9557
赖氨酸	0.848	1.5842
脯氨酸	0.717	1.3397
丝氨酸	0.704	1.3151
酪氨酸	0.364	0.6802
半胱氨酸	-	-
合计		54.3883

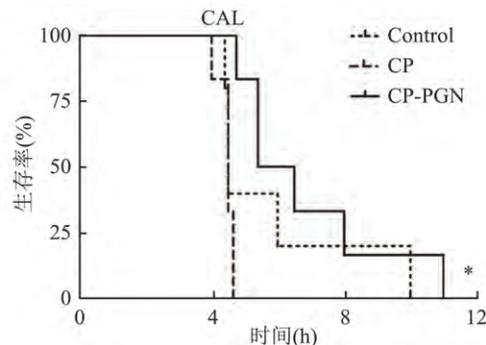


图4 KPN/CAL 血流感染模型的小鼠生存曲线

与 Control 组比较: * $P < 0.05$; CP: *C. pyruviciproducens*; CP-PGN: PGN of *C. pyruviciproducens*

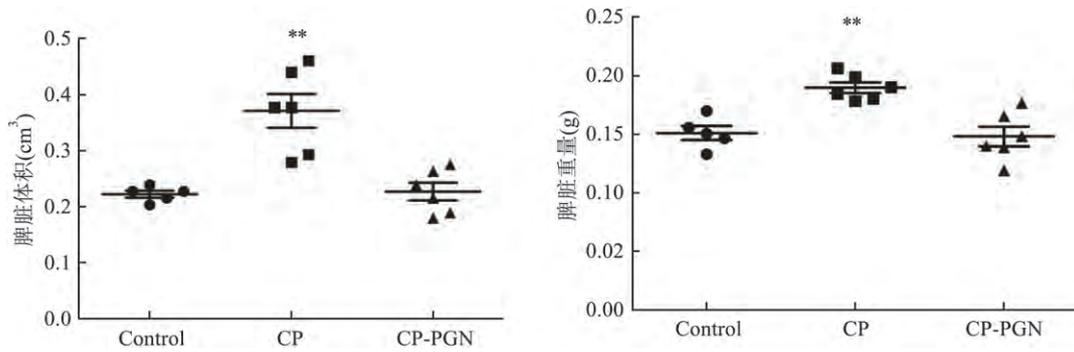


图5 KPN 血流感染模型小鼠的脾脏指标

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; CP: *C. pyruviciproducens*; CP-PGN: PGN of *C. pyruviciproducens*

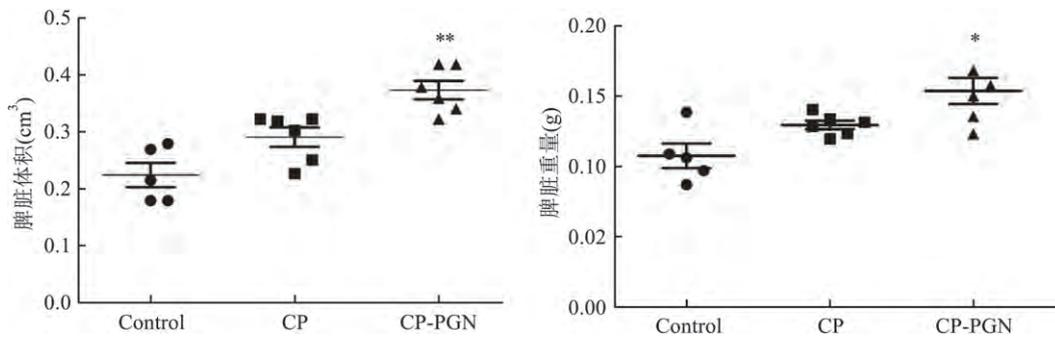


图6 CAL 血流感染模型小鼠的脾脏指标(体积与重量)

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; CP: *C. pyruviciproducens*; CP-PGN: PGN of *C. pyruviciproducens*

3 讨论

肽聚糖作为细菌细胞壁的主要成分,提取方法多样。本研究选用了用时短、操作简便的三氯乙酸法进行 CP-PGN 的提取。本次研究中 CP-PGN 的提取率为 0.3%。提取后的终产物经过相关验证、分析与检测,表明提取的褐色胶状物主要成分即为肽聚糖。不同种类的细菌,其细胞壁的厚度及肽聚糖的含量也存在差别,因此用同种方法进行肽聚糖的提取也会造成提取率的不同,这也是本研究中 CP-PGN 提取率稍低的一个重要原因。为了提高提取效率,更好地保持其结构的完整性,CP-PGN 的提取方法还有待进一步的摸索与优化。此外,不同种类的细菌肽聚糖,发挥的免疫调节作用因肽聚糖的结构与含量不同而存在差异。因此本研究有关 CP-PGN 的分子量、结构、氨基酸等方面的分析,为后续的抗血流感染作用的研究提供理论支持。

血流感染是一种严重的全身性感染疾病,是病原菌在血液循环中短暂或者持续性的存在,能够引起患者多器官衰竭,甚至死亡^[8],对患者的生命健康造成威胁^[9]。引起医院血流感染的病原菌可分为革兰阳性菌、革兰阴性菌和真菌三大类。肺炎克

雷伯菌是重要的肠杆菌科细菌,引起的医院内感染越来越广泛,发生率仅次于凝固酶阴性葡萄球菌^[10-12],位居医院血流感染的革兰阴性菌第二位^[10]。由于广谱抗生素的过度使用及更新换代,肺炎克雷伯菌的耐药性问题也越来越严重,从而加大了临床的治疗难度。念珠菌是院内血流感染位居第四的病原菌,其发病率和致死率不断升高^[13]。引起念珠菌血流感染的念珠菌种类多,最常见的念珠菌为白色念珠菌。近年来,真菌的耐药性也在逐渐的加重,从而导致该菌血流感染发病率的增加。在全球抗生素危机情况下,需要寻找新的预防感染及治疗方法来应对挑战,而免疫调节剂可以调动机体的免疫系统,增强免疫力,因此联合或者代替抗生素应用,为血流感染的预防与治疗提供一种新型的治疗方案,从而减轻抗生素的使用量。

本研究显示,在感染 KPN/CAL 之前,预先注射 CP-PGN 与未注射 CP/CP-PGN 的对照组相比,小鼠的精神及活动状态均有所改善,明显延长了小鼠的生存时间,提高了生存率,免疫器官-脾脏在体积和重量上都有不同程度的增加,免疫能力有所增强,表明 CP-PGN 对 KPN 和 CAL 引起的血流感染具有一定的预防作用,可作为一种有潜力的新的免疫调节

剂,为预防和治疗血流感染提供辅助治疗。在面临抗生素危机的情况下,将抗生素和合适的免疫调节剂组合治疗也是一种新的治疗方法^[14],从而减少对抗生素的过度依赖,一定程度上缓解全球抗生素危机。以上有关 CP-PGN 抗 KPN/CAL 血流感染的相关研究数据联合前期抗 MRSA 感染作用的数据证实,CP-PGN 在血流感染的防治上发挥着重要作用,而 CP-PGN 在对抗 MRSA/KPN/CAL 三种病原菌的感染中发挥着不同程度的防治效果,造成效果差异的具体机制还有待后续进一步研究,为 CP-PGN 作为免疫增强剂在临床上的应用提供基础理论支持。

参考文献

- [1] Tong J, Liu C X, Summanen P H, et al. *Corynebacterium pyruviciproducens* sp. nov. a pyruvic acid producer. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60(5): 1135–40.
- [2] Han Q Z, Jia T, Shengjun W, et al. *Corynebacterium pyruviciproducens* promotes the production of ovalbumin specific antibody via stimulating dendritic cell differentiation and up-regulating Th2 biased immune response [J]. *Vaccine*, 2012, 30(6): 1115–23.
- [3] Tong J, Han Q Z, Wang S J, et al. *Corynebacterium pyruviciproducens*, as an immune modulator can promote the activity of macrophages and up-regulate antibody response to particulate antigen [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237(11): 1322–30.
- [4] Suvanprakorn P, Tongyen T, Prakhongcheep O, et al. Establishment of an anti-acne vulgaris evaluation method based on TLR2 and TLR4-mediated interleukin-8 production [J]. *In Vivo*, 2019, 33(6): 1929–34.
- [5] Zhang Y, Li X X, Ma Y, et al. CP and CP-PGN protect mice against MRSA infection by inducing M1 macrophages [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16877–88.
- [6] Tian P J, Li B L, Shan Y J, et al. Extraction of peptidoglycan from *L. paracasei* subsp. *Paracasei* X12 and its preliminary mechanisms of inducing immunogenic cell death in HT-29 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 20033–49.
- [7] 洪亮, 余方流, 黄月娥. 不同乳酸杆菌肽聚糖对小鼠肠道黏膜的免疫调节作用 [J]. *皖南医学院学报*, 2019, 38(5): 419–20, 424.
- [8] 刘艳君, 陈远远, 唐艳君. 2016–2017 年成人血流感染临床特点和病原学分析 [J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(4): 507–10.
- [9] Alkhawja S, Saeed N K, Rosenthal V D, et al. Impact of international nosocomial infection control consortium's multidimensional approach on central line-associated bloodstream infection rates in Bahrain [J]. *J Vasc Access*, 2020, 21(4): 481–9.
- [10] 王军杰, 姚宗会, 马冰. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌致血流感染危险因素及预后分析 [J]. *检验医学*, 2020, 35(3): 195–9.
- [11] 宋国滨, 王刚, 黄颖. 血流感染肺炎克雷伯菌毒力基因分布及与 CRISPR-CAS 系统相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(3): 427–31.
- [12] 苏丛, 伍婷, 徐方明. 巨噬细胞 Lamt2 基因敲除小鼠对肺炎克雷伯菌易感性的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(4): 505–9.
- [13] Eschenauer G A, Carver P L, Patel T S, et al. Survival in patients with candida glabrata bloodstream infection is associated with fluconazole dose [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(6): e02566–17.
- [14] Hilliard J J, Datta V, Tkaczyk C, et al. Anti-alpha-toxin monoclonal antibody and antibiotic combination therapy improves disease outcome and accelerates healing in a *Staphylococcus aureus* dermonecrosis model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(1): 299–309.

Extraction of the peptidoglycan of *Corynebacterium pyruviciproducens* and the study on the effects of anti – bloodstream infection

Zhang Yang, Zhou Qiang, Chen Liwen, et al.

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Extraction of CP-PGN was processed according to the TCA method, the purity of the final product was verified by treating with the lysozyme. Then the molecular weight, structures and compositions of amino acids of CP-PGN were studied. The animal models of bloodstream infection were established by using carbapenemes producing *Klebsiella pneumoniae* (KPN) and *Candida albicans* (CAL) to the evaluation of the effect of CP-PGN against bloodstream infection. The lysozyme dissolution experiment verified that the extracted product was peptidoglycan and CP-PGN possessed the characteristics of peptidoglycan. The molecular weight of CP-PGN is 18 774 u, which showed the characteristic peaks of PGN by infrared spectroscopy. The GB/T14965-1994 was used to detect its compositions of amino acids. CP-PGN significantly prolonged the survival time, improved the survival rate of mice and showed different degree of prevention in the animal experiments. All these showed that the extracted product of CP-PGN had the significant preventive and resistant effects on KPN and CAL-induced bloodstream infection.

Key words *Corynebacterium pyruviciproducens* peptidoglycan; bloodstream infection; carbapenemes producing *Klebsiella pneumoniae*; *Candida albicans*