

不同表型表皮葡萄球菌之间的相互作用及 LuxS 基因对生物膜形成的影响

王贤聪¹, 刘 宝¹, 周树生¹, 曹晓光¹, 戴媛媛²

摘要 目的 探讨不同表型的表皮葡萄球菌(SE)之间的相互作用机制以及 luxS 基因在 SE 形成生物膜过程中所起的作用。方法 分别应用 TSB 培养液、ATCC12228 上清液以及 ATCC35984 上清液培养产生生物膜的 SE 标准菌株 ATCC35984 和不产生生物膜的 ATCC12228 菌株,并采用半定量法检测细菌间多糖黏附素(PIA)以及半定量 PCR 法检测 LuxS 基因在该菌株中的表达。结果 在 TSB 培养液中,ATCC35984 菌株能形成致密完整的生物膜,而 ATCC12228 菌株不能产生生物膜。在 ATCC35984 上清液中,ATCC12228 菌株形成生物膜的能力增强,LuxS 基因表达降低。在 ATCC12228 菌株上清液中,ATCC35984 产生生物膜能力下降,LuxS 基因表达增强,两者比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 LuxS 基因在 SE 形成生物膜的过程中起一定作用,并且不同表型的 SE 之间存在相互影响的现象。

关键词 QS 系统;LuxS 基因;半定量 PCR;表皮葡萄球菌

中图分类号 R 378.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)05-0610-04

群体感应信号(quorum sensing, QS)系统是细菌间通过分泌和探测化学信号分子-自体诱导分子(auto inducers, AIs)来监测群体密度,协调细菌生物功能的信息交流机制^[1]。QS 系统由 AIs、感应分子及下游调控蛋白构成,根据细菌合成的信号分子和感应机制不同, QS 系统分为革兰阴性菌的酰基高丝氨酸内酯(acylated homoserine lactones, AHL)系统、革兰阳性菌中寡肽介导的双组分感应系统以及种内及种间依赖 LuxS/AI-2 的 QS 系统调节。当信号分子达到一定阈值浓度时,该信号分子与细菌表面的相关受体结合,激活下游相关靶基因调节细菌生物学性状,如生物膜形成、毒力的产生及生物发光等^[2]。研究^[3]显示,在同一菌种内及不同菌种间存在共同的信号分子-AI-2 来介导细菌之间的信息

交流,该信号是由 LuxS 基因编码的 LuxS 蛋白酶催化产生,并通过下调生物膜胞外多糖来降低细菌之间的黏附。现对不同表型表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, SE)中 LuxS/AI-2 群体感应信号系统进行研究,探讨 LuxS 基因在 SE 形成生物膜过程中的作用,以及不同 SE 菌种之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 SE 标准菌株 ATCC35984 [多糖黏附素(polysaccharide intercellular adhesin, PIA)表型阳性,生物膜表型阳性]和 SE 标准菌株 ATCC12228 (PIA 表型阴性,生物膜表型阴性)均购于美国 ATCC 公司。

1.1.2 试剂与仪器 TSB 培养液购于英国 Oxoid 公司;PCR 引物购于上海捷瑞生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒购于美国 Promega 公司;逆转录试剂盒及 PCR 试剂盒购于大连 TaKaRa 公司;溶菌酶、葡萄球菌溶素购于美国 Sigma 公司;PCR 仪购于德国 Tgradient Biometra 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌上清液提取及分组 将血平板上 SE 单个菌落接种到 5 ml TSB 培养液中,摇菌培养(37 °C, 100 r/min)8 h, 4 000 r/min 离心 30 min,取上清液,并将上清液进行涂片,革兰染色后镜检,无细菌为合格上清液,-80 °C 冰箱冻存备用。该研究分别命名 SE ATCC35984 上清液为上清液 1, SE ATCC12228 上清液为上清液 2。将提取的上清液相互交叉加样,共分为 3 组,分别为:A 组 SE ATCC35984 菌株组(对照组 A1:用 TSB 培养;实验组 A2:用上清液 2 培养)、B 组 SE ATCC12228 菌株组(对照组 B1:用 TSB 培养;实验组 B2:用上清液 1 培养)及 C 组空白对照组(对照组 C1:TSB 液;对照组 C2:上清液 1;对照组 C3:上清液 2)。

1.2.2 刚果红琼脂法 PIA 定性检测 将心脑浸液肉汤 18.5 g、蔗糖 25 g、琼脂 5 g 及刚果红 0.4 g 溶于蒸馏水 500 ml,121 °C 高压灭菌 20 min 制备刚果

2013-11-25 接收

基金项目:安徽省教育厅课题基金资助项目(编号:KJ2009B001Z)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ICU、²细菌室,合肥 230001

作者简介:王贤聪,男,硕士研究生;

刘 宝,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:linux306@126.com

红平板。分别将对照菌株及实验菌株摇菌培养(37 °C, 100 r/min)过夜,转种至刚果红平板中,37 °C 培养 24 h,观察结果。

1.2.3 半定量法检测细菌生物膜 参照文献^[4]方法,将血平板中单个菌落接种于 5 ml TSB 培养液中,调成 0.5 麦氏度,摇菌培养(37 °C, 100 r/min)过夜。分别将 A1 和 A2 组菌液用 TSB 培养液作 1:100 稀释,实验组 A2 使用上清液 2 液按 1:100 稀释,实验组 B2 菌液使用上清液 1 作 1:100 稀释后,加入 96 孔培养板中,每株细菌接种 6 个平行孔,每孔 200 μ l。在该培养板中分别接种 TSB 培养液、上清液 1、上清液 2 各 200 μ l 作为对照。将 96 孔培养板 37 °C 培养 24 h 后,蒸馏水洗板 3 次,晾干,每孔 0.1% 结晶紫 200 μ l 染色 5 min,蒸馏水洗板 3 次,晾干,用酶标仪在 570 nm 波长比色,计算每株细菌的平均吸光度(optical density, OD)值。

1.2.4 RT-PCR 法检测 LuxS 基因表达 分别将对照菌株及实验菌株振摇培养(37 °C, 100 r/min) 12 h,加入 5 μ l 溶葡萄球菌酶,继续振摇培养 6 h,离心收集细菌,按 RNA 提取试剂盒说明书提取细菌总 RNA。取 5 μ l 总 RNA 按照逆转录试剂盒说明,进行逆转录合成 cDNA, -20 °C 冻存备用。取 4 μ l cDNA 作为模板用于 PCR 扩增(总反应体系 50 μ l)。引物序列及长度: LuxS 上游引物: 5'-CAATAAG-GAGGATGTCGACATGACATGACTAAAATGAATG-3', 下游引物: 5'-TTAGTTGTATTGTCTGCAGTTTACCT-TCTCCGTAG-3', 582 bp; 内参基因 β -actin 上游引物: 5'-CGTGCTACAATGGACAATACAAA-3', 下游引物: 5'-ATCTACGATTACTAGCGATTCCA-3', 185 bp。PCR 反应条件: 94 °C 4 min, 94 °C 30 s, 57.2 °C 30 s, 72 °C 1 min 循环 33 次, 72 °C 5 min。将 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,拍照记录结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同表型的 SE 菌落在刚果红平板上的生长情况 在对照组 A1 中, SE ATCC35984 菌株菌落在刚果红平板上呈黑色、光亮、干燥菌落,提示为高产 PIA 菌株,而在实验组 A2 中,该菌株菌落为底黑酒红色,说明该菌株产生生物膜能力下降。在对照组 B1 中,菌株菌落在刚果红平板上呈红色光滑菌落,

而实验组 B2 菌株在刚果红平板上呈底黑酒红色,见图 1。

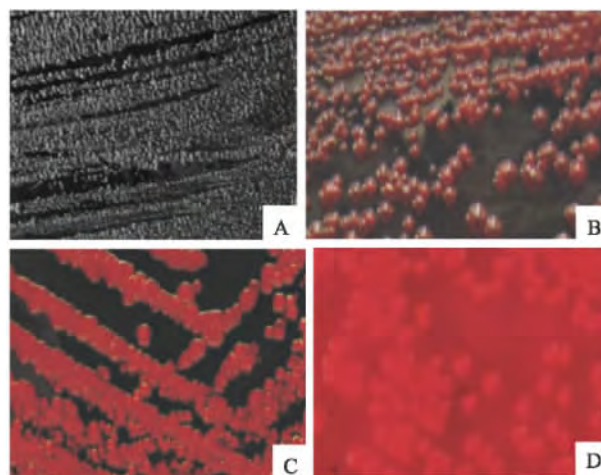


图 1 不同表型 SE 菌株在刚果红培养基上生长情况

A: 对照组 A1; B: 实验组 A2; C: 实验组 B2; D: 对照组 B1

2.2 不同表型的 SE 经不同培养基培养后在 96 孔板中产生生物膜情况 对照组 A1 中菌株形成较厚且致密的生物膜,而实验组 A2 中菌株形成的生物膜较薄,比较稀疏。两组菌株 OD 值之间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组 B1 中菌株不能形成生物膜,而经上清液 1 培养的实验组 B2 菌株能形成明显的生物膜,两组菌株 OD 值之间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。另其他 C 组空白对照组中 TSB 培养液、SE ATCC35984 上清液、SE ATCC12228 上清液均不能形成生物膜,见图 2、表 1。

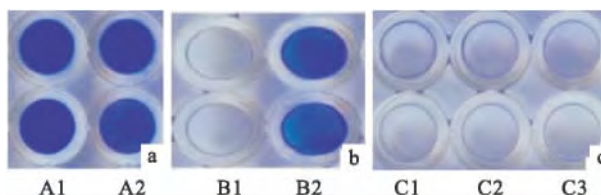


图 2 不同表型 SE 菌株在 96 孔板中形成生物膜情况

a: A 组(SE ATCC35984 菌株组); b: B 组(SE ATCC12228 菌株组); c: C 组(空白对照组)

表 1 不同表型 SE 在 96 孔板中形成生物膜的 OD 值($\bar{x} \pm s$)

菌株(SE)	组别	OD 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
ATCC35984	对照组 A1	1.578 \pm 0.129	14.066	0.00
	实验组 A2	2.652 \pm 0.136		
ATCC12228	对照组 B1	0.106 \pm 0.007	10.929	0.00
	实验组 B2	0.977 \pm 0.195		

2.3 RT-PCR 法检测目的基因 在 4 组菌株中

LuxS 均有表达,在 582 bp 处可见一组亮色条带。但在对照组(A1 和 B1)中,SE ATCC12228 菌株条带比 SE ATCC35984 菌株条带亮度明显增加,其吸光度比值比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组 A2 SE ATCC35984 菌株条带亮度较对照组 A1 有所增加,其吸光度比值比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组 B2 SE ATCC12228 菌株条带亮度较对照组 B1 减弱,其吸光度比值比较差异有统计学意义($P < 0.05$) (见图 3)。

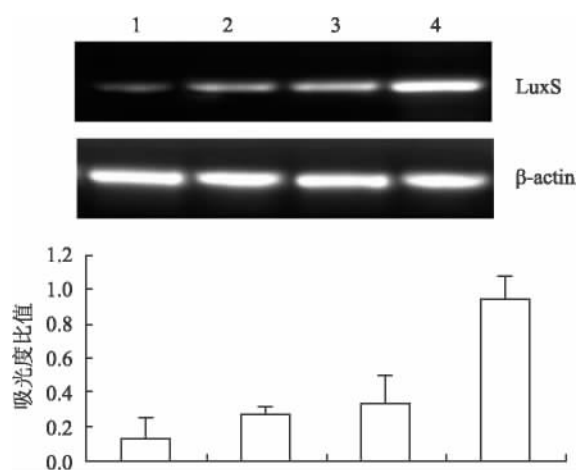


图3 RT-PCR 法检测 LuxS 基因在不同表型 SE 中表达水平
1: 对照组 A1; 2: 实验组 A2; 3: 实验组 B2; 4: 对照组 B1

3 讨论

LuxS/AI-2 密度感应系统是在研究一种海洋微生物哈氏弧菌首次被发现的,哈氏弧菌不仅能感应 AI-1 类信号分子,还能通过感应 AI-2 类信号分子来调节生物发光。McNab et al^[5] 发现在两种口腔微生物联合起来形成混种生物膜入侵牙周组织的过程中,LuxS/AI-2 密度感应系统种间调节起关键作用。在实验组 A2 中,经 SE ATCC12228 上清液培养的 SE ATCC35984 菌株形成生物膜的能力大大下降,反之,在实验组 B2 中不能形成生物膜的 SE ATCC12228 菌株通过高产生生物膜 SE ATCC35984 上清液培养后,具有了形成生物膜的能力。由此推测,该现象产生的原因可能是由于加入的上清液中存在 AI-2 信号系统,从而使原菌株的生物学行为发生趋向性的转变。Karim et al^[6] 发现,通过加入纯化的外源性 AI-2 信号,一种致牙周病的细菌同源菌株的突变株能够形成致密的生物膜。

Xu et al^[7] 构建了 SE LuxS 基因同源突变株,与

野生株相比,LuxS 突变株更容易形成更厚更致密的生物膜,并且容易导致动物模型中导管相关性感染。LuxS 基因可能通过调控 *ica* 基因位点转录影响 PIA 产生,从而影响生物膜的产生。本研究表明在高产 PIA 的 SE 菌株其 LuxS 基因表达降低,反之在低 PIA 菌株其 LuxS 基因表达增高。在实验组 A2 中的 SE ATCC35984 菌株形成生物膜的能力有所下降,但是没有完全失去形成生物膜的能力,而实验组 B2 中 SE ATCC1222 菌株形成的生物膜的厚度远远小于对照组 A1。由此推测,在培养的早期,由于培养液中存在 AI-2 信号,菌株上相应的受体与 AI-2 信号分子结合,调节一系列的生物学效应,但随着细菌不断繁殖,原有的 AI-2 信号不断消耗,无法达到一定的阈值,而不能进一步调控细菌生物膜的产生。但 LuxS/AI-2 密度感应系统是如何调控细菌生物膜的机制仍不清楚,需要进一步研究证实。

综上所述,LuxS/AI-2 密度感应系统在表皮葡萄球菌形成生物膜过程中起重要调节作用。目前由于多重耐药菌的产生,迫切需要一种新的替代方法来控制致病菌。大多数细菌均通过 QS 系统来调节细菌生物学行为,因此通过干扰细菌的该系统有望成为一种新型有效的抗菌手段。

参考文献

- [1] Reading N C, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett* 2009, 254(1): 1-11.
- [2] Novick R P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of *staphylococcal* virulence [J]. *Mol Microbiol* 2010, 48(6): 1429-49.
- [3] McNab R, Lamont R J. Microbial dinner-party conversations: the role of LuxS in interspecies communication [J]. *J Med Microbiol*, 2010, 52(7): 541-5.
- [4] Bemado D H, Fortino S S, Blanca L M, et al. Production of *icaAD-BC*-encoded polysaccharide intercellular adhesion and therapeutic failure in pediatric patients with *staphylococcal* device-related infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10(68): 1-6.
- [5] McNab R, Ford S K, El-Sabaeny A, et al. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas* [J]. *Bacteriol*, 2003, 18(5): 274-84.
- [6] Karim M M, Hisamoto T, Matsunaga T, et al. LuxS affects biofilm maturation and detachment of the periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* [J]. *J Biosci Bioeng* 2013, 116(3): 313-8.
- [7] Xu L, Li H, Vuong C, et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Infect Immun* 2006, 74(6): 488-96.

MAPK 通路抑制剂对不同 PTEN 状态子宫内膜癌细胞作用及机制

肖 兰,龙腾飞,何 婵,周家德

摘要 目的 探讨 PTEN 缺失和表达下 p38MAPK 通路抑制剂(SB203580)对子宫内膜癌细胞 Ishikawa 及 HEC-1A 的作用及其机制。方法 PTEN 小分子干扰 RNA 及 PTEN 基因转染后,激光共聚焦显微镜检测 PTEN 蛋白表达;SB203580 干预 48 h,流式细胞术、MTT 法及 Western blot 法分别检测细胞干预后子宫内膜癌细胞早期凋亡、细胞增殖活性、p38MAPK 通路的磷酸化水平及其下游底物 4E-BP1 蛋白的磷酸化情况。结果 PTEN 小分子干扰 RNA 封闭与 PTEN 稳定转染使两株子宫内膜癌细胞(Ishikawa, HEC-1A) PTEN 表达水平改变。SB203580 干预使 PTEN 缺失 Ishikawa 及 HEC-1A 细胞生长显著抑制,细胞发生早期凋亡;p38MAPK 通路磷酸化水平和磷酸化 4E-BP1 蛋白表达均显著下降;与 PTEN 表达两种细胞比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 内外源性 PTEN 缺失使两株子宫内膜癌细胞中

p38MAPK 通路活化,对 SB203580 敏感性增加,其机制可能与 PTEN 缺失导致 PTEN 对 p38MAPK 信号通路负性调控功能丧失,引发 p38MAPK 信号通路下游底物 4E-BP1 激活导致 p38MAPK 通路活化有关。

关键词 子宫内膜癌;PTEN;p38MAPK 通路抑制剂;敏感性
中图分类号 R 342.3; R 349.2; R 977

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0613-06

PTEN 作为一个抑癌基因,在细胞生长、凋亡中具有重要生物学功能。研究^[1]显示 PTEN 基因对整合多条上下游信号通路有重要作用。许多前期研究^[2]显示,相关信号通路仅在 PTEN 缺失情况下对相关信号通路抑制剂敏感,而 PTEN 基因是目前人子宫内膜癌中突变率最高的基因。因此,该研究主要探讨 MAPK 家族中 p38MAPK 通路特异性抑制剂 SB203580 对不同 PTEN 表达人子宫内膜癌细胞的作用,为选择以相关信号通路为靶点的子宫内膜癌治疗人群提高临床疗效提供一定依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2014-02-17 接收

基金项目:广东省自然科学基金(编号:7001568)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

作者简介:肖 兰,女,博士,副研究员,主治医师;

周家德,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-

mail:zhoujiade@sina.com

The interaction of different phenotype *Staphylococcus epidermidis* and the influence of LuxS gene on biofilm formation

Wang Xiancong, Liu Bao, Zhou Shusheng, et al

(Dept of ICU, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the interaction mechanisms between the different phenotype of *Staphylococcus epidermidis* and the role of LuxS in the process of biofilm formation. **Methods** SE ATCC35984 with the ability of biofilm formation and SE ATCC12228 without this ability was cultured respectively with TSB medium, SE ATCC12228 supernatant and SE ATCC35984 supernatant. After 18h, polysaccharide intercellular adhesion and the expression of LuxS in the strain were detected by semi-quantitative method and semi-quantitative PCR method. **Results** The strain of SE ATCC35984 cultured by TSB formed dense and compact biofilm, while the strain of SE ATCC12228 was unable to produce biological membrane. Cultured by SE ATCC35984 supernatant, the ability of SE ATCC12228 biofilm formation was increased, and the expression of LuxS in the strain was reduced. Similarly, the biofilm formation ability was reduced and the expression of LuxS was increased in the strain of SE ATCC35984 cultured by ATCC12228 supernatant. The differences among these groups were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** LuxS plays a key role in the process of biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, and the different phenotype of *Staphylococcus epidermidis* interact with each other.

Key words QS system; LuxS; semi-quantitative PCR; *Staphylococcus epidermidis*