

- 中医证型的关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3): 338-341.
- [7] 沈自尹. 从肾本质研究到证本质研究的思考与实践[J]. 上海中医药杂志, 2000, 10(4): 44-71.
- [8] 尚晓泓, 李琦. 中医肾虚证研究检验医学的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(8): 720-721.
- [9] 蒋卫民, 唐蜀华, 赖仁胜, 等. 载脂蛋白 E 多态性与原发性高脂血症中医辨证的相关性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(1): 38-41.
- [10] 冯小平, 王临光, 经先振, 等. 应用心功能指数与血浆 BNP 水平变化评价充血性心力衰竭中医辨证分型[J]. 中国微循环杂志, 2005, 9(6): 430-432.
- [11] 张蓓蓓, 彭宇竹. 冠心病中医辨证分型与脂联素和抵抗素水平的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(1): 93-94.
- [12] 孙伟正, 王春梅, 庞爱明, 等. 慢性再生障碍性贫血中医辨证与 HLA 基因相关性研究[J]. 中国医药学报, 2002, 17(3): 167-169.
- [13] 崔丽安, 翁天煥, 王辉武, 等. 慢性肝炎患者中医分型与外周血 T 淋巴细胞亚群及可溶性白细胞介素 II 复合物的关系[J]. 中医杂志, 1998, 39(8): 488.
- [14] 熊新贵, 陈疆, 梁清华. 中医肝阳化风证本质蛋白质组学研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(7): 913-919.
- [15] 李莉. 97 例脑出血患者血液流变学分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 10(10): 939-940.
- [16] Panteghini M. Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology[J]. European Hear Journal, 2004, 2(5): 1187-1189.
- [17] Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive[J]. J Emerg Med, 1999, 17(10): 19-25.
- [18] 杨为斌. 对不同类型突发性耳聋患者其血液流变学检测的探讨
- 综 述 •
- [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 460-461.
- [19] 张昱, 李琦, 娄锡恩. 护肾愈消汤治疗早期糖尿病肾病 38 例的临床观察[J]. 世界中医药, 2008, 3(1): 21-22.
- [20] 张昱, 李琦. 中药灌肠对慢性肾衰竭患者肾功能及血 TGF- $\beta_1$  的影响[J]. 中国现代医生, 2008, 46(31): 4-5.
- [21] 李略, 王良兴, 董央庆. 川芎嗪对慢性肺心病患者趋化因子 fractalkine 及肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(4): 373-374.
- [22] 张震家, 石丽霞, 裴颖, 等. 尿毒康煎剂治疗慢性肾功能衰竭的疗效观察[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(2): 181-183.
- [23] 李乃荣, 李晓清, 宋会霞, 等. 梅花针治疗女性围绝经期失眠及其对内分泌激素的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(3): 274-275.
- [24] 葛明晓, 张金玉, 赵彦鹏. 益气血补肝肾中药对体外受精-胚胎移植周期中卵泡液转化生长因子- $\beta_1$  和性激素水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3): 327-330.
- [25] 孙学刚, 范钦, 王启瑞. 大承气汤对内毒素血症小鼠肺与大肠 TLR4 及 TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 244-248.
- [26] 刘丽芳, 文秀英, 许明旺. 贞清方与地龙对 2 型糖尿病大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$  及 PAI-1 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(7): 967-972.
- [27] 礼海, 张艳, 马金. 益气活血复方联合运动疗法对慢性心力衰竭大鼠心肌组织 MMP-1 及 III 型胶原表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(7): 955-960.

(收稿日期: 2011-12-10)

## 粪肠球菌生物被膜相关因子的研究进展

卜倩倩 综述, 伍 勇<sup>△</sup> 审校

(中南大学湘雅第三医院检验科, 长沙 410013)

**关键词:** 肠球菌, 粪; 生物被膜; 基因调控

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 08. 027

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2012)08-0947-05

肠球菌(Enterococcus)是革兰阳性菌, 在过去的 25 年间, 肠球菌感染率特别是院内感染急剧增长, 在需氧革兰阳性球菌中, 肠球菌院内感染致病率仅次于葡萄球菌, 其中粪肠球菌分离率占到临床分离肠球菌的 80%~90%<sup>[1-2]</sup>。细菌生物被膜是指细菌黏附于接触表面, 分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等, 将其自身包裹其中而形成的大量细菌聚集膜样物。国内外学者对生物被膜进行了大量的基础研究, 现对粪肠球菌生物被膜形成的相关因子及基因调控进行综述。

### 1 粪肠球菌生物被膜形成的相关因子

**1.1 初始黏附阶段有关因子** 初始黏附是指细菌与黏附载体表面间一种相互的物理和化学作用, 通过溶液中的有机物聚集在载体表面附近, 随后借助非特异性静电引力、范德华张力和疏水作用力等相互黏附。细菌的纤毛(fimbriae)发挥重要作用,

通过非特异性电引力或疏水作用与基底层无机物相结合。在粪肠球菌表面存在特定的黏附素与受体发生相互作用, 促进细菌黏附。细菌最终能否黏附于表面取决于细菌与黏附表面接触面积足够大, 两接触面之间所产生的吸附力大于排斥力, 所以此阶段是可逆的。

**1.1.1 肠球菌表面蛋白(Enterococcus surface protein, Esp)** 肠球菌表面蛋白是粪肠球菌细胞壁上相对分子质量较大的一种表面蛋白(1 873 个氨基酸), 其被编码的基因在命名为致病岛(pathogenicity island, PAI)的基因簇里。Esp 包含 2 个基因序列: C 末端的分选基序和 N 末端的信号肽。分选信号包括一个短的五肽保守基序(Y/F)LPXTG(X 是指任意的氨基酸), 随后是一个疏水区及一带正电荷的尾部, C 端的分选信号被认为是负责细胞壁的锚定。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: wuyong\_xy@yahoo. com. cn.

Esp 在感染源性的粪肠球菌的分离率很高。有研究发现 Esp 蛋白与金黄色葡萄球菌生物膜相关蛋白(Bap 蛋白)结构相似,同样具有生物膜形成功能,但 Esp 同时需要其他粪肠球菌特异因子共同作用才能发挥该功能<sup>[3-4]</sup>。由于其具有介导细菌黏附的作用,在粪肠球菌生物被膜的研究中逐渐受到重视。Kristich 和 Li<sup>[5]</sup>认为生物膜形成与 Esp 无关,而是取决于肠球菌生存环境的营养条件、渗透压等。Toledo-Arana 和 Valle<sup>[3]</sup>则认为生物膜的形成仅限于携带 Esp 的粪肠球菌。国内有关研究人员研究表明 Esp 在肠球菌生物膜的形成过程中发挥一定作用,可能有利于肠球菌黏附于物体表面,但并非生物膜形成的唯一原因。

**1.1.2 菌毛(Pili)** 菌毛被认为参与人类各种细胞的黏附和生物被膜的形成,这也是导致感染性疾病的关键病理步骤<sup>[6]</sup>。粪肠球菌和屎肠球菌存在菌毛基因簇(pilin gene clusters, PGCs),它包括编码类似存在 LPXTG 基序的表面蛋白和转肽酶(sortases)的一些基因。粪肠球菌有两类 PGCs:心内膜炎与生物被膜相关性菌毛(endocarditis and biofilm associated pili, Ebp Locus)和肠球菌生物被膜增强因子(biofilm enhancer in Enterococc, Bee Locus)<sup>[6-7]</sup>。

5%的粪肠球菌临床分离菌可以检测到 Bee 菌毛,但几乎所有的粪肠球菌临床分离菌都能检测到 Ebp 菌毛<sup>[8]</sup>。Ebp 菌毛可能参与初始黏附和生物被膜的形成,其参与生物被膜相关的心内膜炎和尿路感染发病机制,并且在心内膜炎患者体内检测到了 Ebp 菌毛抗原<sup>[6,9-10]</sup>。Bee 菌毛则分布在连接质粒上,Bee Locus 由 3 个编码细胞壁锚定蛋白的结构基因 bee-1、bee-2 和 bee-3 和另外 2 个编码类似分选酶(srt-1 和 srt-2 基因)组成。Bee-1、Bee-2 和 Bee-3 氨基酸测序发现存在 LPXTG 基序,位于序列的 C 末端;Srt-1 和 Srt-2 氨基酸测序发现了酷似分选酶的一组序列<sup>[11]</sup>。分选酶可将含有 LPXTG 序列的细菌表面蛋白锚定到细胞壁上发挥表面蛋白的锚定作用,其机制是裂解苏氨酸和甘氨酸之间肽键,释放出的 C 末端的苏氨酸共价锚定于细胞壁的肽聚糖。所以推测 Bee 基因簇通过转肽作用锚定于细胞壁上,完成细菌与物体表面及细菌间的黏附。

sortase 家族包括 150 多种蛋白质序列,广泛存在于革兰阳性细菌,是细菌黏附和毒性作用的关键因子。有研究者根据催化结构域位置的不同将其分为 srt-1 和 srt-2;也有学者根据 sortase 识别表面蛋白序列的不同,将其描述为 A、B、C、D 等多种。目前,发现 srtA 和 srtC 影响粪肠球菌生物被膜的形成和毒性作用<sup>[9]</sup>。Pascale 等<sup>[12]</sup>建立粪肠球菌 OG1RF srtA 突变株,发现突变株在生物被膜形成早期的黏附能力明显下降,培育 4 h 时观察较野生株少了 40%的细菌附着在盖玻片上,培育 6 h 观察粪肠球菌 OG1RF srtA 补体致活菌发现细菌黏附量同野生菌产生量相当,以上提示 srtA 以及 srtA 作用的底物有效地推动粪肠球菌生物被膜形成的初始黏附。但 Kemp 等<sup>[9]</sup>建立小鼠泌尿系感染模型,srtC 在此更名为 bps(biofilm and pilus-associated sortase),粪肠球菌 srtA 缺失株对生物被膜的形成影响微小,其生物被膜的生成量明显高于 bps 缺失株粪肠球菌,而 srtA 和 bps 双重缺失株粪肠球菌生物被膜生成量和致病力显著降低,比 bps 缺失株生物被膜生成量少了 44%。

**1.1.3 自溶素(autolysin)** 自溶素是细菌自身分泌的一种可以降解细胞壁的蛋白水解酶,也可以称肽聚糖水解酶。目前在

粪肠球菌能分离鉴定的是 AtlA,类似于变异链球菌的 AtlA,参与粪肠球菌生物被膜形成的细胞黏附和聚集阶段已经得到证实<sup>[13]</sup>。在表皮葡萄球菌,其主要自溶素是 AtlE,被发现与其生物被膜的形成密切相关<sup>[14]</sup>。AtlA 由 979 个氨基酸序列构成,分子结构分成 3 个区域:单信号序列、两个重复序列和 C 末端的水解酶结构域。AtlA 发挥功能依赖于 C 末端的水解酶结构域。Mohamed 等<sup>[15]</sup>报道称溶菌酶 2 是参与生物被膜形成的主要自溶素,在生物被膜形成的初始黏附发挥重要作用。由 AtlA 介导裂解细胞释放的胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA)是参与组成粪肠球菌生物被膜基质的重要成分,提示自溶过程不仅有利于细菌的初始黏附还有利于随后生物被膜的发展成熟<sup>[16]</sup>。

**1.1.4 粪肠球菌胶原蛋白黏附素(adhesion of collagen of E. faecalis, Ace)** 粪肠球菌胶原蛋白黏附素也称为胶原结合蛋白,是粪肠球菌分泌于表面的黏附素,属于识别黏附基质分子的微生物表面成分(microbial surface components recognizeing adhesive matrix molecules, MSCRAMMs)的一类<sup>[13]</sup>,Ace 的相对分子质量约为  $71 \times 10^3$ ,含有 LPXTG 细胞壁结合模序,其 N 端包含高度保守的 A 结构域,与金黄色葡萄球菌胶原蛋白黏附素(adhesion of collagen of staphylococcus aureus, Can)同源,然后是可变的 B 结构域,由部分有重复的 20 个氨基酸序列与 2~5 个串联重复序列组成,形成了粪肠球菌特异性基因 ace 的 4 种不同形式,Ace 能黏附胶原蛋白 I、II,还有层黏连蛋白和牙本质,因此与根管治疗后粪肠球菌生物被膜形成关系密切<sup>[17]</sup>。

**1.2 聚集阶段有关因子** 聚集阶段是增强细菌与黏附表面及细菌间牢固结合的过程。粪肠球菌黏附到表面后,低密度连接的细菌合成分泌大量细胞外多糖,其将黏附表面的基质与细菌表面的菌毛鞭毛等结构上发生特异性受体配体结合反应,加强两者连接。胞外多糖还可黏连单个游离菌形成细菌团块,即微菌落,大量微菌落使粪肠球菌生物被膜增厚,趋于成熟。一旦细菌与黏附表面稳固结合,黏附便不可逆。

**1.2.1 聚集物质(aggregation substance, AS)** 聚集物质是粪肠球菌由质粒编码的一种表面蛋白,属于黏附素。聚集物质的 N 端信号序列可与受体细胞上的补体受体连接物质(EBS)结合。而聚集物质 C 端含有 LPXTG 细胞壁锚定基序可结合供体细胞,从而介导供体菌与受体细胞和细菌与宿主之间的紧密黏附,引起菌体的聚集或凝集。在根管中 AS 明显增加粪肠球菌与接触面的疏水性,促进胞间聚集和黏附,导致生物被膜的形成。AS 还推动供体菌和受体菌发生聚集,使聚集物质基因和耐药基因在粪肠球菌间发生高效结合转移,促进细菌耐药性的转移,增加细菌毒性作用。

**1.2.2 明胶酶(gelatinase, GelE)和丝氨酸蛋白酶(serine protease, SprE)** GelE 和 SprE 两者都是存在于粪肠球菌表面的蛋白释放酶,前者是一种相对分子质量为  $(28 \sim 32) \times 10^3$  的含锌分泌型基质金属蛋白酶,与铜绿假单胞菌明胶酶金属蛋白酶基因高度同源,SprE 相对分子质量为  $26 \times 10^3$ 。明胶酶基因 gelE 位于肠球菌染色体上,约有 1 530 个碱基,可以编码前肽原,其上游是粪肠球菌调节因子基因 fsr 和 3 个启动子,在转录水平上调控明胶酶基因的表达;gelE 下游是丝氨酸蛋白基因 sprE,由 855 个碱基组成<sup>[18]</sup>。

许多独立研究观察发现, GelE 在生物被膜形成中起到关键作用<sup>[9,14]</sup>。Thomas 等<sup>[19]</sup>研究发现,在激光共聚焦显微镜 (CLSM) 下观察粪肠球菌 GelE 缺失株生物被膜计数,相对于亲代菌株明显减少,同时 SprE 突变株却加速了生物被膜的形成。有关学者提出自溶素 (autolysin) 是 GelE 在胞内的靶标。GelE 被认为可催化细菌亚群裂解并释放胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA), eDNA 是生物被膜基质的重要成分。GelE 介导自溶素促使细胞裂解, SprE 能保护粪肠球菌落避免发生自杀性行为<sup>[16]</sup>。GelE 和 SprE 是如何协调在保证自身细胞不被自溶却又促成生物被膜的形成, Vinai 等<sup>[16]</sup>推测是在 *fsr* 基因簇即发挥生物被膜内部传感效应 (quorum sensing, Qs) 的一组因子的调节下,两者竞争与自溶素的结合,谁占优势谁便发挥其生物学作用。但 GelE 和 SprE 是如何增加对自溶素的亲和力,目前尚不得而知。GelE 还能切断细菌表面与疏水基团的连接键,使疏水基团外露,从而增强细菌的黏附能力。不过也有研究认为, gelE 缺失株和野生株在粪肠球菌生物被膜的生物量和厚度等方面没有显著性差异, GelE 与生物被膜的形成能力无关<sup>[20]</sup>。

**1.2.3 胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA)** 胞外 DNA 是一种环状常染色体或者可能是一种噬菌体 DNA。已经证实在很多细菌的生物被膜胞外基质中被发现。细菌所形成的生物被膜中超过 90% 的成分为胞外多聚物基质 (extracellular polymeric substance, EPS), 胞外多聚物基质主要由一些胞外多糖、蛋白质、DNA 以及一些其他的大分子组成。很多学者关于铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌等 eDNA 的体外研究表明, eDNA 是其生物被膜基质组成的重要成分<sup>[14,21-22]</sup>。很多细菌能够释放 eDNA, 但 eDNA 的释放机制各不相同, 可以通过细胞溶解释放。Thomas 等<sup>[19]</sup>将粪肠球菌生物膜胞外 DNA 与细菌染色体 DNA 扩增并且经琼脂糖电泳发现, 两者具有一致性。推测粪肠球菌生物被膜菌是通过细胞自溶的途径完成释放, 同时也需要群体感应系统调控。Thomas 等<sup>[19]</sup>以粪肠球菌生物被膜菌为研究对象, 在体外对正在形成生物被膜的菌落在第 6 小时和第 12 小时各介入 DNase I 干扰, 结果发现相对于经热失活的 DNase I 处理, 生物被膜的聚集明显减少; 同时只在第 24 小时添加 DNase I, 发现只在生物被膜聚集的边缘有减少, 此结果提示, 生物被膜形成的后期基质成分可能发生改变, 早期应用 DNase I 阻碍生物被膜形成的效果会更好。eDNA 不仅参与生物被膜的形成, eDNA 还能通过螯合阳离子增加生物膜的耐药性<sup>[23]</sup>。

**1.2.4 肠球菌多糖抗原 (enterococcal polysaccharide antigen, epa)** 肠球菌多糖抗原定植在肠球菌细胞壁上, 疑似可从肠球菌感染患者的血清中分离得到<sup>[24]</sup>。初步资料表明 epa 有可能存在于细胞壁内<sup>[25]</sup>。有学者体外实验观察到中断 epa 基因发挥其表型功能可导致生物被膜量减少, 但还没有依据证实 epa 在生物被膜形成的黏附和聚集阶段的主导作用<sup>[15]</sup>。

**1.2.5 生物被膜相关性糖脂合成物 A (biofilm-associated glycolipid synthesis A, bgsA)** 生物被膜相关性糖脂合成物 A 是一种被假定的葡萄糖基转移酶。在很多革兰阳性菌中, 膜糖脂被认为与生物被膜形成有关。Theilacker 等<sup>[25]</sup>在研究过程中建立了粪肠球菌 12030 的 bgsA 缺失株和过表达株, 核磁共振光谱仪分析提纯的糖脂发现, 突变株细胞膜上缺乏双葡萄

糖-二酰甘油 (diglucosyl-diacylglycerol, DGlcDAG), 而单葡萄糖-二酰甘油比例过高。粪肠球菌 12030 bgsA 缺失株较野生株比较, 细胞壁上的膜磷壁酸分子增长, 疏水性也减弱, 生物被膜的疏水性有利于抵抗抗生素和冲洗液的渗透及避免机体对细菌的免疫清除; bgsA 在粪肠球菌 12030 和 V583 的失活促使其在塑料表面形成生物被膜的能力几乎完全被减弱, 相反 bgsA 的过表达则促进生物被膜的生长; 即使初始黏附没有受到干扰, bgsA 缺失株不能完成细菌之间的聚集, 还会影响细菌对 Caco-2 细胞的附着; 建立小鼠菌血症模型发现, 较粪肠球菌野生菌, bgsA 缺失株更容易被血流清除。

**1.2.5 葡萄糖 (glucose)** 很多研究人员在粪肠球菌培养基中增添葡萄糖, 发现能影响菌株形成生物被膜的能力。Preeti 等<sup>[26]</sup>通过结晶紫定量分析在粪肠球菌临床分离株 E99 培养基中分别加入 0.5%、0.75% 和 1% 的葡萄糖发现, 比加入浓度为 0.25% 的葡萄糖所生成的生物被膜量明显增多, 再一次证实了葡萄糖增强生物被膜的形成。

**1.3 生物被膜成熟的影响因素** 一旦细菌牢固附着于物体表面, 实现不可逆的黏附, 细菌之间及细菌与基底层之间继续活跃生长、分裂并分泌大量的胞外多糖基质包裹细菌, 并从邻近环境里吸收有机物和无机物, 生物被膜的体积和密度不断增长, 趋于成熟。

生物被膜是否能顺利生长主要依赖于周围环境中营养浓度及其在生物被膜中的扩散能力, 还有代谢物清除的能力, 所形成的水通道是其新陈代谢的重要渠道。随着生物被膜的成长, 细菌内部基因的表达也在不断调整, 以适应生存。细菌密度感应系统通过特定基因表达不同的信号分子来调节细菌内环境的平衡。生物被膜成熟后, 被膜内部细菌的代谢效率、生长方式和理化协调都会发生变化。还有被膜内部的 pH 值、氧浓度、碳源和渗透压也是影响生物被膜成熟的因素。

## 2 生物被膜形成的基因调控

**2.1 群体感应系统 (quorum sensing, Qs)** 群体感应系统是指细菌根据感知种群密度变化自发产生、释放一些特定的信号分子, 进行胞内和胞间的信息交流以调节微生物的群体行为并调控基因表达的行为。有研究者发现细菌细胞间存在信息交流, 随后研究发现信息传递的载体是可溶性的小分子信号分子。在细菌密度较低时, 细菌内的信号分子合成酶, 低水平合成信号分子满足胞间信息交流, 随着细菌密度的增高, 信号分子浓度也增高, 待达到其阈值后渗入胞浆内与转录调节蛋白结合, 形成转录调节蛋白-信号分子聚合物, 随之插入到染色体特定的 DNA 上, 使其得以表达并产生更多的信号分子。由此可见信号分子是细菌群体感应系统的关键。目前所知在革兰阳性菌 Qs 的信号分子一般是寡肽和氨基酸。

目前在粪肠球菌 Qs 系统中研究最多的是 *fsr* 系统, 很多方面类似于金黄色葡萄球菌的 Agr 系统<sup>[27]</sup>。有学者发现 *fsr* 突变体和 *geIE* 突变体均能减少生物被膜产生。*fsr* 操纵子含 A、B、C、D 4 种基因, *fsrD* 表达一种名为 GelE 合成激活蛋白质 (gelatinase biosynthesis-activating pheromone, GBAP) 的自诱导肽是含 11 个氨基酸残基的内酯环肽<sup>[28]</sup>。*geIE* 基因与 *sprE* 基因位于 *fsr* 同一个操纵子, 反馈移位寄存器 *fsrC-fsrA* 二元组分密度感应系统, 调控两者的表达<sup>[27]</sup>。当 GBAP 信号肽积累到一定量时, *fsr* 操纵子下游调控基因 *gelE-sprE* 被激活, 分别

表达 GelE 和 SprE 蛋白; *fsrB* 基因编码的产物具有蛋白水解作用,能解开 *fsrD* 编码的肽内酯;*fsrA* 和 *fsrC* 可编码 *gelE* 和 *sprE* 的反应调节器,*fsrC* 能感受细胞外组氨酸激酶的密度,从而激活 *fsrA* 基因的表达。*fsr* 操纵子中任何一个基因突变都会导致粪肠球菌生物膜的形成受阻,所以说粪肠球菌生物膜的形成受到 Qs-*fsr* 的调控。

**2.2 AtlA 操纵子** AtlA 操纵子的结构域由 4 个基因构成: *atlA*、*smu0631*、*pepT* 和 *thmA*。*atlA* 编码一种命名为自溶素的物质,*atlA* 缺失自溶素活性下降明显,细菌排成长链。*smu0631* 和 *pepT* 分别编码某种脂蛋白和某种肽酶,对生物被膜的形成没有明显作用。*thmA* 编码孔道形成蛋白,Ahn 和 Burne 等<sup>[29]</sup>建立 *thmA* 缺失株,发现其生长平台期对抗细菌自溶,形成长链,菌落呈团块状,生长速率下降,与 *atlA* 突变株的生物学行为十分相像;但是 *thmA* 突变株在心脏浸液琼脂平板上形成了黏液状生物被膜,再添加全长的 *atlA* 也不能使生物被膜恢复正常。

### 3 小 结

综上所述,生物被膜菌相对浮游菌有着更复杂的结构,广泛的信息交流和精密的调控机制参与,粪肠球菌生物被膜的形成需要很多因子的参与和基因之间的共同调控,进一步研究细菌生物被膜形成的遗传基础,维持机制以及和细菌耐药性之间的关系,以便临床治疗粪肠球菌感染引起的慢性感染及反复感染提供理论帮助,相信通过人类探索的不断深入,一定能找到治疗细菌生物被膜菌有关的感染疾病的有效途径。

### 参考文献

- [1] Roberta C, Monica I, Lucia B, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources [J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53(1): 13-20.
- [2] Seema S, Meenakshi M, Das BK, et al. Enterococcal infections and antimicrobial resistance [J]. *Indian J Med Res*, 2008, 128(8): 111-121.
- [3] Toledo-Arana A, Valle J. The Enterococcal surface protein, Esp involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4538-4545.
- [4] Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. The N terminal domain of enterococcal surface protein Esp is sufficient for esp mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis* [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(17): 6213-6222.
- [5] Kristich CJ, Li YH. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis* [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(1): 154-163.
- [6] Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, et al. Endocarditis and biofilm associated pili of *Enterococcus faecalis* [J]. *J Clin Invest* 2006, 116(56): 2799-2807.
- [7] Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(6): 2063-2072.
- [8] Cobo MA, Abriouel H, Omar NB, et al. Detection of *ebp* (endocarditis and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non clinical origin [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126(17): 123-126.
- [9] Kemp KD, Singh KV, Nallapareddy SR, et al. Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, *srtA* and *ebp*s (*srtC*), to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(11): 5399-5404.
- [10] Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. Importance of the *ebp* (endocarditis and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection [J]. *J Infect Dis*, 2007, 195(11): 1671-1677.
- [11] Mazmanian SK, Hung IT, Schneewind O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus* [J]. *Mol Microbiol*, 2001, 40(5): 1049-1057.
- [12] Pascale SG, Chia SH, Kimberly AK, et al. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development [J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(9): 3626-3638.
- [13] Sava G, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(6): 533-540.
- [14] Qin Z, Ou Y, Yang L, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Microbiology*, 2007, 153(21): 2083-2092.
- [15] Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, et al. Influence of origin of isolates especially endocarditis isolates and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(6): 3658-3663.
- [16] Vinai CT, Yasuaki H, Nathan H, et al. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis* [J]. *Mol Microbiol*, 2009, 72(4): 1022-1036.
- [17] Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, et al. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin [J]. *J Endod*, 2006, 32(14): 634-637.
- [18] Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(17): 5629-5639.
- [19] Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, et al. Regulation of autolysin-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(16): 5690-5698.
- [20] Baldassarri L, Creti R, Recchia S, et al. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices [J]. *Int J Artif Organs*, 2006, 29(4): 402-406.
- [21] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 59(4): 1114-1128.
- [22] Rice KC, Mann EE, Endres JL, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(19): 8113-8118.
- [23] Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(11): 1213-1218.
- [24] Teng F, Singh KV, Bourgogne A, et al. Further characterization of the *epa* gene cluster and Epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis* [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(9): 3759-3766.
- [25] Theilacker C, Sanchez-Carballo P, Toma I, et al. Glycolipids are

involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*[J]. Mol Microbiol, 2009, 71(4):1055-1069.

[26] Preeti MT, Arto SB, Nathan S. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to enterococcus faecalis[J]. J Bacteriol, 2006, 188(6):2063-2072.

[27] Nakayama J, Chen S, Oyama N, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* fsr quorum-sensing system: the small open reading frame fsrD encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD[J]. J Bac-

teriol, 2006, 188(23):8321-8326.

[28] Nishiguchi K, Nagata K, Tanokura M, et al. Structure activity relationship of gelatinase biosynthesis activating pheromone of *Enterococcus faecalis*[J]. J Bacteriol, 2009, 91(2):641-650.

[29] Ahn SJ, Burne RA. The *atIA* operon of *Streptococcus mutans*: role in autolysin maturation and cell surface biogenesis[J]. J Bacteriol, 2006, 188(19):6877-6888.

(收稿日期:2012-02-15)

• 综 述 •

## DNA 修复基因甲基化修饰与肿瘤研究进展

周俊峰 综述, 杨 劲 审核

(第三军医大学基础部细胞生物教研室, 重庆 400038)

关键词: DNA 修复; DNA 甲基化; 肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)08-0951-03

真核生物 DNA 修复的主要途径包括错配修复 (mismatch repair, MMR)、碱基切除修复 (base excision repair, BER)、核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER)、直接修复及重组修复等, 共同构成维持遗传信息稳定的保护机制。DNA 修复相关基因的表达缺陷可能导致遗传物质损伤积累, 在多种疾病, 特别是肿瘤的发生中具有重要作用。

甲基化是哺乳动物基因组 DNA 常见的修饰方式, 甲基化修饰大多存在于磷酸胞苷酰 (CpG) 二核苷酸中。基因组中转录调控区中富含 CpG 二核苷酸的 CpG 岛的甲基化状态, 与基因组编码基因表达水平密切相关。CpG 岛的甲基化可阻碍蛋白与 DNA 的相互作用, 从而影响基因转录过程中模板与 RNA 聚合酶的结合, 降低其转录活性。因此甲基化是基因表达调控的重要机制之一。

基因组 DNA 甲基化修饰与肿瘤的发生、侵袭、转移、耐药等生物学行为的关系密切, 其主要机制可能与 DNA 修复基因、抑癌基因、细胞周期调控基因、肿瘤侵袭相关基因等多种基因的甲基化修饰导致其表达异常有关<sup>[1]</sup>。其中 DNA 修复基因异常甲基化可导致基因突变频率增加, 可能是肿瘤发生过程中的一个早期事件。而另一方面, DNA 修复基因直接影响细胞对 DNA 损伤物质的敏感性, 因此其甲基化修饰还影响肿瘤对于放、化疗的敏感性与耐药性<sup>[2]</sup>。

### 1 BER 途径基因甲基化修饰

BER 途径能识别 DNA 中异常或错配的碱基, 并通过糖苷酶将其切除, 是最普遍的 DNA 修复方式。X 射线交叉互补修复基因 1 (X-ray repair cross-complementing gene1, XRCC1) 广泛参与因电离辐射和氧化损伤引起的 DNA 损伤的碱基切除修复和单链断裂修复<sup>[3]</sup>。Wang 等<sup>[4]</sup>发现在胃癌组织中 XRCC1 基因启动子区域 (-959~-714) 的甲基化水平显著高于癌旁正常组织 (76.4% 和 20.5%,  $P < 0.05$ ), 且与胃癌组织中 XRCC1 在 mRNA 及蛋白水平的表达缺失相一致, 证实 XRCC1 是一个甲基化敏感的肿瘤相关基因。由于 XRCC1 的甲基化修饰仅存在于癌变组织中, 故推测该基因的甲基化修饰可能直接参与了肿瘤的发生过程。然而其小样本的研究并未

就 XRCC1 甲基化修饰与胃癌的关联性得出确切结论, 该基因是否可作为胃癌的一个表观遗传学标志还需要大样本的研究证实。

片状核酸内切酶 1 (Flap endonuclease 1, FEN1) 参与了长补丁碱基的切除修复, 在 DNA 氧化损伤的 BER 修复中具有重要的作用。研究表明在乳腺癌、食管鳞状细胞癌、子宫内膜癌等多种肿瘤组织中存在 FEN1 的异常高表达, 且其表达水平随肿瘤的进展而逐渐增加<sup>[5]</sup>。而在乳腺癌细胞中, FEN1 启动子核心区域 CpG 岛的异常去甲基化可能是其表达增高的原因之一。通常认为, DNA 修复基因表达下降或表达缺失是肿瘤发生的原因之一, 而 FEN1 在肿瘤组织中高表达似乎与其 DNA 修复功能不相符。但 FEN1 基因还参与了 DNA 复制过程, 因此 FEN1 在肿瘤细胞中的高表达可能还与肿瘤细胞增殖率增加有关<sup>[6]</sup>。由于 FEN1 作用的广泛性, 其在肿瘤发生中的具体作用机制尚待进一步研究阐明。

### 2 NER 途径基因甲基化修饰

NER 途径主要修复由嘧啶二聚体、DNA 加合物或 DNA 链间交联所导致的 DNA 双螺旋结构的改变。此外, 电离辐射和铂类药物导致的 DNA 损伤也主要通过 NER 途径修复。因此 NER 途径相关基因的表达异常对于多种肿瘤的发生, 以及肿瘤对放、化疗的敏感性均有重要影响。

着色性干皮病基因组 C (xeroderma pigmentosum group C, XPC) 是 NER 途径中负责识别 DNA 双链异常变形的重要分子。XPC 基因的突变、表达异常与肿瘤的发生关系密切<sup>[7]</sup>。在膀胱癌、肺癌组织中, XPC 基因上游转录调节区域 (-175~-186) CpG 岛甲基化水平显著升高, 并导致 XPC 基因在癌组织中表达缺失<sup>[8-9]</sup>。XPC 甲基化及表达缺失可引起肿瘤组织中 p53 等原癌基因的突变频率增加, 且与膀胱癌的恶性程度关系密切<sup>[10]</sup>。提示 XPC 基因的甲基化修饰可能是肿瘤发生及演变过程中的一个重要因素。

切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementing1, ERCC1) 参与了 NER 途径中 DNA 解旋及损伤单链的切除, 是 NER 途径中的关键分子之一。研究证实 ERCC1