

• 基础实验研究论著 •

临床分离表皮葡萄球菌相关基因与生物膜表型的关系

徐金莲¹, 孙自镛^{2△}, 简翠², 李丽²

(1. 荆门市第一人民医院检验科, 湖北荆门 448000; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 湖北武汉 430030)

摘要:目的 分析临床分离表皮葡萄球菌 *icaA*、*aap*、*atlE*、*sarA* 基因与生物膜表型的关系。方法 收集临床分离的表皮葡萄球菌 78 株, 采用 PCR 法扩增 *icaA*、*aap*、*atlE*、*sarA* 基因, 组织细胞培养板黏附法检测生物膜表型, χ^2 检验分析上述基因与生物膜表型的关系, Wilcoxon 符号秩检验分别分析 *icaA*⁺ 菌及 *icaA*⁻ 菌在胰酶大豆肉汤 (TSB) 与 TSB+3% 氯化钠中生物膜表型光密度 (OD) 值的差异。结果 78 株表皮葡萄球菌 *icaA*、*aap*、*atlE*、*sarA* 基因阳性率分别为 24.4% (19/78)、79.5% (62/78)、73.8% (57/78)、82.1% (64/78)。产生物膜株阳性率为 51.3% (40/78), 其中高产生物膜 16 株, 均携带 *icaA* 基因; 弱产生物膜 24 株。经统计学分析, 上述基因与生物膜表型之间有相关性, *icaA* 基因与高产生物膜表型有相关性。*icaA*⁺ 菌及 *icaA*⁻ 菌在 TSB 与 TSB+3% 氯化钠中生物膜 OD 值的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 表皮葡萄球菌生物膜表型涉及多种因子参与, 而 *icaA* 基因有助于高产生物膜表型形成。环境因素也可影响表皮葡萄球菌生物膜表型。

关键词: 表皮葡萄球菌; *icaA* 基因; 生物膜表型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)11-1387-03

Correlation between associated genes and biofilm phenotype in *Staphylococcus epidermidis*

Xu Jinlian¹, Sun Ziyong^{2△}, Jian Cui², Li Li²

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital, Jingmen, Hubei 448000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of *icaA*, *aap*, *atlE*, *sarA* gene with biofilm phenotype in *Staphylococcus epidermidis*. **Methods** Tissue culture plates assays were used to assess biofilm-forming ability of 78 *Staphylococcus epidermidis* strains. The presence of *icaA*, *atlE*, *aap*, *sarA* gene was amplified with PCR method, the relationship between these genes and biofilm phenotype was evaluated by χ^2 test and the difference of the biofilm OD's value in TSB and TSB+3% NaCl by *icaA*⁺ strains and *icaA*⁻ strains was evaluated by Wilcoxon sign test, respectively. **Results** The positive rates of *icaA*, *atlE*, *aap*, *sarA* gene were 24.4% (19/78), 79.5% (62/78), 73.8% (57/78), 82.1% (64/78), respectively. 40 biofilm-positive strains were detected (51.3%), among which 16 strains carried *icaA* gene, 24 strains showed weak biofilm-forming ability. Those genes above with biofilm formation were statistically correlated. Moreover, there was a relation between the *icaA* gene and the high biofilm-producing phenotype. There was a significant difference between the biofilm OD values in TSB and TSB+3% NaCl by *icaA*⁺ strains and *icaA*⁻ strains, respectively. **Conclusion** Multiple genes are involved in *Staphylococcus epidermidis* biofilm-positive phenotype, but the *icaA* gene contributes to the high biofilm-forming phenotype. Biofilm phenotype is also influenced by environmental factors.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*; *icaA* gene; biofilm phenotype

由于各种侵入性诊疗措施的广泛应用, 表皮葡萄球菌已成为医院感染的重要病原菌, 其主要致病机制是在留置体内的生物材料表面形成生物膜, 不仅干预机体的免疫应答, 亦使细菌对抗菌药物的耐药性增强, 导致生物膜中的细菌难以根除, 使得临床治疗较为困难。表皮葡萄球菌生物膜形成包括其黏附到生物材料表面至形成成熟生物膜。目前实验室研究中涉及初期重要的黏附基因为自溶素 (*atlE*) 基因。细菌初始附着于生物材料表面后, 生物膜的形成与介导细菌聚集的特异分子密切相关。细胞间多糖黏附素 (PIA) 是介导细菌聚集的主要物质, 由 *ica* 操纵子编码的 PIA 合成酶合成。此外, 由 *aap* 基因编码的聚集相关蛋白 (Aap) 参与细菌聚集, 调节基因 *sarA* 表达及环境因素也可影响生物膜形成。了解这些基因在临床分离表皮葡萄球菌中分布, 分析其与生物膜表型的关系, 为预防、治疗表皮葡萄球菌生物材料相关感染的研究提供帮助。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集华中科技大学同济医学院附属同济医院 78 株非重复分离的表皮葡萄球菌, 均采用 Vitek2 全自动微生物鉴定仪鉴定。

1.2 仪器与试剂 酶标仪、PCR 扩增仪、凝胶成像系统为美国 BioRad 公司产品, 电泳仪为上海康达公司产品, 紫外分析仪为上海天能科技公司产品。胰酶大豆肉汤 (TSB) 购自英国 Oxoid 公司, 96 孔平底细胞培养板购自德国 Greiner 公司, 细菌 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, PCR 试剂购自上海生工生物工程有限公司, GelRed 核酸染料购自美国 Biotium 公司。

1.3 生物膜黏附法 参考文献 [1-2] 的方法略作修改。挑取血平皿中新鲜菌落于 5 mL TSB 中 37 °C 温箱过夜培养, 将菌液按 1:100 加至新鲜的 TSB、TSB+3% 氯化钠中混匀, 分别

吸取 200 μ L 稀释菌液加入 96 孔平底细胞培养板中,平行做 4 孔。温箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 18 h,弃去孔内菌液,pH7.2 的 PBS 洗涤 4 次。置烤箱 60 $^{\circ}$ C 干燥 1 h 后,0.4%结晶紫溶液染色 5 min,自来水洗去过量染液,置温箱 37 $^{\circ}$ C 干燥 30 min。酶标仪 570 nm 波长处检测各孔光密度(OD)值。ATCC12228 为生物膜阴性对照株,未加菌液的 TSB 作空白对照。检测结果划分标准为:取 4 个重复孔平均 OD<0.3 为生物膜阴性株,0.3 \leq OD<1.0 为弱产生生物膜株,OD \geq 1.0 为高产生生物膜株^[2]。

1.4 DNA 提取及目的基因 PCR 扩增 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书抽提 DNA。用提取的 DNA 作为模板,扩增 *icaA*、*aap*、*atlE* 和 *sarA*。每个基因重复扩增 3 次。PCR 所用引物及扩增片断长度见表 1。引物序列由北京奥科生物技术有限公司合成。20 μ L PCR 反应体系:dNTP Mix 0.3 μ L,10 \times buffer 2 μ L, MgCl₂ 1.2 μ L,引物各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μ L,模板 DNA 2 μ L, ddH₂O 12.2 μ L。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 变性 150 s, *icaA* 及 *gyrB* 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s; *aap* 和 *atlE* 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s; *sarA* 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。5 μ L PCR 产物与 1 μ L 上样缓冲液混匀后加到 1.5% 琼脂糖凝胶中,100 V 电压电泳 40 min,紫外灯下观察结果,凝胶成像系统上拍照保存。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。各组总体生物膜 OD 值采用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示。目的基因在生物膜表型各组的分布比较采用 χ^2 检验, *icaA*⁺ 菌及 *icaA*⁻ 菌的 TSB 与 TSB+3%氯化钠中生物膜表型 OD 值的差异比较采用 Wilcoxon 符号秩检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 目的基因 PCR 及生物膜表型检测结果 78 株表皮葡萄

表 2 78 株表皮葡萄球菌目的基因及生物膜表型检测结果(n)

组别	n	<i>icaA</i>		<i>atlE</i>		<i>aap</i>		<i>sarA</i>		<i>atlE/aap/sarA</i>	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
生物膜阳性组	40	19	0	37	3	40	0	39	1	37	3
高产生生物膜组	16	16	0	16	0	16	0	16	0	16	0
弱产生生物膜组	24	3 ^Δ	21	21	3	24	0	23	1	21	3
生物膜阴性组	38	0	38	20*	19	22 [#]	16	25 [▲]	13	12 [▼]	26

^Δ: $\chi^2=29.474, P<0.05$, 与高产生生物膜组比较; * : $\chi^2=16.697, P=0.000$; [#] : $\chi^2=21.188, P=0.000$; [▲] : $\chi^2=14.797, P=0.000$; [▼] : $\chi^2=30.966, P=0.000$, 与生物膜阳性组比较。

2.3 40 株生物膜表型阳性菌在 TSB 与 TSB+3%氯化钠中检测结果 将 40 株生物膜阳性株分为 *icaA*⁺ 组与 *icaA*⁻ 组,分别对其在 TSB 与 TSB+3%氯化钠这 2 种培养基中测得的生物膜 OD 值进行 Wilcoxon 符号秩检验,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3。结果表明,3% 氯化钠可诱导或增强 *icaA*⁺ 菌生物膜形成,而减弱 *icaA*⁻ 菌生物膜形成能力。

表 3 40 株生物膜阳性菌在 2 种培养基中 OD 值检测结果 $[M(P_{25} \sim P_{75})]$

细菌	n	TSB	TSB+3%氯化钠
<i>icaA</i> ⁺ 菌	19	0.942(0.334~1.574)	2.114(1.685~2.772)
<i>icaA</i> ⁻ 菌	21	0.361(0.311~0.423)	0.255(0.154~0.334)

球菌各基因扩增结果: *icaA*⁺ 菌 19 株(24.4%), *atlE*⁺ 菌 57 株(71.8%), *aap*⁺ 菌 62 株(79.5%), *sarA*⁺ 菌 64 株(82.1%)。黏附法检出生物膜阳性 40 株,阳性率 51.3%(40/78)。其中高产生生物膜 16 株,弱产生生物膜 24 株,详见表 2。

表 1 PCR 引物序列及扩增片断长度

目的基因	引物	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> -F	GAC CTC GAA GTC AAT AGA GGT	814
	<i>icaA</i> -R	CCC AGT ATA ACG TTG GAT ACC	
<i>atlE</i>	<i>atlE</i> -F	CAA CTG CTC AAC CGA GAA CA	682
	<i>atlE</i> -R	TTT GTA GAT GTT GTG CCC CA	
<i>aap</i>	<i>aap</i> -F	ATA CAA CTG GTG CAG ATG GTT G	300
	<i>aap</i> -R	ATA GCC GTC CAA GTT TTA CCA G	
<i>sarA</i>	<i>sarA</i> -F	AAA AGA TGG GTT TTA AGA TTT ATG GA	313
	<i>sarA</i> -R	CTG TCA GCA TAA GTG ACC ATA GC	

2.2 目的基因分布与生物膜表型关系 19 株 *icaA*⁺ 菌株中,3 株为弱产生生物膜表型,16 株为高产生生物膜表型。59 株 *icaA*⁻ 菌株中,21 株为弱产生生物膜表型,未检出高产生生物膜株。对高产生生物膜组与弱产生生物膜组 *icaA* 基因分布进行检验,差异有统计学意义 ($\chi^2=29.474, P<0.05$),表明 *icaA* 基因与高产生生物膜表型有相关性,弱产生生物膜组生物膜表型由 *icaA* 以外其他基因介导。*atlE*、*aap*、*sarA* 基因与 *atlE/aap/sarA* 同为阳性在生物膜阳性组与生物膜阴性组之间分布差异均有统计学意义 ($P=0.000$),见表 2。

3 讨 论

现代医学的发展与各种生物医疗器械的临床广泛应用联系紧密。全世界每年有数百万患者因植入医疗装置而引起生物膜相关感染。表皮葡萄球菌由于在植入设备表面能形成生物膜,成为引起此类感染比较常见的细菌。

表皮葡萄球菌生物膜的形成一般分为 2 个阶段:黏附和聚集。生物膜形成过程中,细菌对生物材料的初始黏附性降低可导致其无法形成生物膜。*atlE* 有利于表皮葡萄球菌生物膜形成,可通过释放胞外 DNA 介导生物膜形成的初始黏附。本研究中 *atlE* 检出率为 71.8%,表明其在临床分离表皮葡萄球菌中分布很广泛。国内外文献报道的检出率不等(58%~100%)^[3-5],这种差异可能与引物设计、DNA 提取质量及表皮葡萄球菌的鉴定相关。本实验结果显示, *atlE* 基因与表皮葡

萄球菌生物膜表型具有相关性,与国内的韩乾国等^[3]、李燕等^[4]的报道不一致,可能与研究中使用的黏附材料及 *atlE* 基因表达受环境因素影响有关。实验中 40 株生物膜阳性株除了 3 株 *atlE*⁻ 外,其余均携带此基因。有 2 株 *icaA*⁺ 菌株在 TSB 和 TSB+3%氯化钠中均未形成强产生生物膜株,1 株 *atlE*⁻, 1 株 *atlE* 和 *sarA* 都为阴性,一方面 *atlE* 阴性,可能导致细菌初始黏附性降低而致生物膜形成能力下降,另一方面可能与 *icaA* 低水平转录有关。

PIA 是表皮葡萄球菌生物膜的主要基质组分,与其致病性相关。PIA 为 β -1,6 连接-2-脱氧-2-氨基-D-吡喃型葡萄糖聚合物,由 *icaADBC* 合成,主要介导生物膜中细菌聚集。*icaA* 的检出率为 24.4%,低于多数报道(27.4%~90%)^[1-5],可能与标本取材有关。本研究中大多数菌株来自血液标本,并非导管,有污染可能,因而检出率低。实验结果表明 *icaA* 是介导表皮葡萄球菌高产生生物膜表型的主要基因,与 Rohde 等^[6] 研究结果一致。

Aap 蛋白有利于表皮葡萄球菌生物膜形成,不仅促进细菌黏附至皮肤表面,也介导细菌聚集^[7-8]。Aap 蛋白的相对分子质量为 220×10^3 ,当被葡萄球菌或宿主的蛋白酶水解为 140×10^3 蛋白质后,可促进生物膜形成;Aap 蛋白缺失的表皮葡萄球菌聚集受到影响,不能形成生物膜。Aap 蛋白与 PIA 共同介导生物膜聚集,也可不依赖于 PIA 介导细菌聚集和生物膜形成^[9],其高水平转录及表达是非 PIA 介导的生物膜表型的主要原因。本研究结果也提示,临床分离表皮葡萄球菌 *aap* 基因分布与表皮葡萄球菌生物膜形成有相关性。特别是 21 株 *icaA*⁻/*aap*⁺ 菌在 TSB 中培养表现为弱产生生物膜株,其生物膜形成中细菌聚集可能与 Aap 蛋白表达有关,但这种聚集能力在无 PIA 合成时表现较弱。

sarA 是葡萄球菌的重要调控基因,其表达的蛋白 *sarA* 调控 PIA 及其他毒力因子的表达。凝胶迁移率变动实验表明, *sarA* 与 *icaA* 的启动子区域具有高度亲和力,能直接激活 *icaA* 表达从而促进生物膜形成。*sarA* 与表皮葡萄球菌生物膜表型的相关性在本实验结果中也得到体现。表皮葡萄球菌生物膜形成也受许多环境因素影响。数据显示,添加 3%氯化钠的 TSB 可诱导或增强 *icaA*⁺ 菌生物膜形成,却可减弱 *icaA*⁻ 菌生物膜形成能力,提示环境因素对 PIA 及非 PIA 介导生物膜形成皆有影响,可能通过 *sarA* 等调控基因表达影响生物膜形成^[10]。尽管 19 株 *icaA*⁺ 菌和 21 株 *icaA*⁻ 菌在 TSB 及 TSB+3%氯化钠中生物膜形成能力有差异,由于仅采用 3%氯化钠作为诱导,而糖、乙醇、亚抑制浓度抗菌药物等^[2,11-12] 也可影响生物膜形成,其对 *icaA*⁺ 菌和 *icaA*⁻ 菌作用的不同效果的机制有待深入研究。

表皮葡萄球菌生物膜表型涉及多种因子参与,形成过程复杂,影响因素众多。本实验结果显示 *icaA*、*atlE*、*aap* 和 *sarA* 基因与表皮葡萄球菌生物膜表型具有相关性,但非一一对应,一方面可能与这些基因的表达水平相关,本实验菌株在不同环境中的生物膜表型差异可说明这一点;另一方面有些基因可能是生物膜形成的影响因子之一,而非决定基因。除 *icaA* 基因介导高产生生物膜表型外,亦有其他基因介导的弱产生生物膜表

型。就表皮葡萄球菌致病性而言,生物膜检测意义可能较 *ica* 基因检测更重要,虽然 *icaA*⁺ 菌的生物膜形成能力更强,但也受环境因素诱导,可能使得临床治疗更加棘手。

参考文献

- [1] Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, et al. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods[J]. J Biomed Mater Res A, 2006, 76(2): 425-430.
- [2] Los R, Sawicki R, Juda M, et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 310(2): 97-103.
- [3] 韩乾国, 余汝佳, 高燕渝, 等. 临床分离表皮葡萄球菌生物膜相关遗传背景与表现型关系研究[J]. 四川医学, 2006, 27(5): 453-455.
- [4] 李燕, 李冬冬, 陶传敏, 等. 表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测及评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(4): 473-476.
- [5] Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5614-5619.
- [6] Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections[J]. Biomaterials, 2007, 28(9): 1711-1720.
- [7] Macintosh RL, Brittan JL, Bhattacharya R, et al. The terminal A domain of the fibrillar accumulation-associated protein (Aap) of *Staphylococcus epidermidis* mediates adhesion to human corneocytes[J]. J Bacteriol, 2009, 191(22): 7007-7016.
- [8] Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases[J]. Mol Microbiol, 2005, 55(6): 1883-1895.
- [9] Hennig S, Wai SN, Zibuhr W. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate[J]. Int J Med Microbiol, 2007, 297(2): 117-122.
- [10] Christner M, Heinze C, Busch M, et al. *sarA* negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA[J]. Mol Microbiol, 2012, 86(2): 394-410.
- [11] Stevens NT, Greene CM, O'Gara JP, et al. Biofilm characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with device-related meningitis[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 7): 855-862.
- [12] Wang Q, Sun FJ, Liu Y, et al. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and-negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2707-2711.

(收稿日期: 2014-01-10)