

• 临床检验研究论著 •

耐药表皮葡萄球菌生物被膜形成前、后差异蛋白表达的分析^{*}

王伟佳, 张秀明

(中山大学附属中山医院/中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 探讨耐药表皮葡萄球菌生物被膜形成前、后差异蛋白的表达。方法 将耐药表皮葡萄球菌分为药物处理组(用 400 $\mu\text{g/mL}$ 鞣酸处理)和对照组(用生理盐水处理), 观察菌落生长情况, 并采用快速银染法鉴定药物作用前、后生物被膜的形成; 用 CRA 平板法检测药物作用前、后, 表皮葡萄球菌产生细胞间多糖黏附因子(PIA)的能力。用双向电泳技术对细菌总蛋白进行分离, 并对差异蛋白点进行高效液相色谱-芯片/质谱(HPLC-Chip/MS)鉴定。**结果** 与对照组比较, 药物处理组表皮葡萄球菌菌落数明显减少($P < 0.01$), PIA 生成能力减弱, 生物被膜的形成被抑制。通过电泳分离, 共得到 19 个差异表达的蛋白分子, 其中 13 个仅在药物处理组表达升高, 有 6 个仅在对照组表达升高。**结论** 生物被膜形成是表皮葡萄球菌耐药的主要途径, 差异蛋白在生物被膜的形成中可能起到关键作用。

关键词: 蛋白质组学; 葡萄球菌, 表皮; 交叉感染; 抗药性, 细菌; 生物被膜

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)23-3133-03

Analysis of differential protein expression before and after biofilm formation of drug resistance *Staphylococcus epidermidis*^{*}

Wang Weijia, Zhang Xiuming

(Center for Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital Affiliated to Sun Yat-san University/
Zhongshan People's Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: **Objective** To explore the differential protein expression before and after biofilm formation of drug resistance *Staphylococcus epidermidis*. **Methods** Drug resistance *Staphylococcus epidermidis* were divided into drug treatment group (treated with 400 $\mu\text{g/mL}$ tannic acid) and control group (treated with saline). The colony growth was observed and biofilm formation was identified by rapid silver staining before and after drug treatment. CRA plate assay was adopted to detect the capability of *Staphylococcus epidermidis* for polysaccharide intercellular adhesion (PIA) production before and after drug treatment. Two-dimensional electrophoresis technique was employed to separate total bacterial proteins and high performance liquid chromatography-Chip/mass spectrometry (HPLC-Chip/MS) was used to identify the differential protein spots. **Results** Compared with control group, colony number of *Staphylococcus epidermidis* ($P < 0.01$), capability of PIA production and biofilm formation were reduced markedly. 19 differentially expressed proteins were obtained by use of electrophoresis separation. Among them, 13 proteins were found up-expressed only in drug treatment group and 6 up-expressed only in control group. **Conclusion** Biofilm formation is the principal pathway of drug resistance of *Staphylococcus epidermidis* and the differential proteins may play a key role in biofilm formation.

Key words: proteomics; staphylococcus epidermidis; cross infection; drug resistance, bacterial; biofilm formation

10 年来, 在对医院感染常见病原菌的常规检测中, 发现临床微生物室的检出菌中表皮葡萄球菌逐年增多, 并于 2010 年跃居本院院内感染首位。由于其生物被膜的形成, 导致该菌具有抵抗药物干预的能力^[1], 其被膜形成的原因及形成前后是否存在关键蛋白的表达, 是目前耐药机制研究的热点。本研究采用生物被膜高效抑制药鞣酸作用于耐药表皮葡萄球菌, 以期表皮葡萄球菌耐药机制研究提供理论依据和实验基础。

1 资料与方法

1.1 细菌及主要材料 医院感染耐药表皮葡萄球菌菌株由本院院内感染办公室提供, 并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件保存。鞣酸购于温州市瓯海精细化工有限公司。细菌培养所需胰蛋白胨、植物蛋白胨、磷酸氢二钾购自大连宝生物生物技术有限公司。pH 3~10 固相 pH 梯度 (IPG) 非线性胶条、尿素、CHAPS 等双向电泳试剂购自美国伯乐公司; 测序级胰酶购自深圳晶美生物技

术有限公司, 串联质谱设备及配套试剂由第三军医大学西南医院烧伤研究所提供。

1.2 鞣酸作用前、后细菌的生长情况观察 取出长有成熟表皮葡萄球菌生物被膜的盖玻片, 采用消毒后预冷磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤 3 次, 再取 1 mL 无菌 PBS 洗脱生物被膜内细菌, 充分混匀后, 吸 20 μL 菌液加入 2 mL 液体培养基, 另配含有 400 $\mu\text{g/mL}$ 鞣酸的培养平板, 将上述 1 mL 含有表皮葡萄球菌的液体培养基均匀平铺培养板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 20~24 h, 计数平板上生长的菌落个数。

1.3 生物被膜模型的建立 复融 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存的表皮葡萄球菌, 接种在 2 mL 胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB) 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 500 r/min 均匀震荡过夜。然后吸取 80 μL 菌液于 3 mL TSB 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 500 r/min 震荡培养至细菌对数生长期。在无菌培养皿中, 吸取 2 mL 该菌液于 12 mL TSB 培养基中, 再将

^{*} 基金项目: 广东省医学科研基金资助 (A2009763)。 作者简介: 王伟佳 (1981~), 男, 博士, 副主任技师, 主要从事细菌耐药机制和细胞信号通路转导的工作。 [△] 通讯作者, E-mail: xuelangchichao@163.com。

无菌盖玻片置于菌液中, 37 ℃ 培养 36 h, 隔天换液, 观察细菌成膜情况^[2]。

1.4 生物被膜的快速银染法鉴定 取出药物处理后表皮葡萄球菌和长有成熟表皮葡萄球菌生物被膜的盖玻片, 用无菌预冷 PBS 漂洗 3 次, 以洗去未黏附的浮游表皮葡萄球菌。将冲洗后盖玻片放入 2.5% 戊二醛 PBS 溶液中固定 2 h, 于去离子水中漂洗 5 min, 然后将盖玻片放入饱和 CaCl_2 溶液结合 25 min, 再次用去离子水洗涤。用 6% AgNO_3 染色 7 min, 然后 1.5% 对苯二酚溶液显色 1 min, 漂洗后用 7% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液固定, 重复洗涤步骤, 待玻片干后, 置于光学显微镜下观察。

1.5 表皮葡萄球菌产生细胞间多糖黏附因子 (PIA) 能力的检测 取出生长有成熟表皮葡萄球菌生物被膜的盖玻片, 用无菌 PBS 漂洗 5 次后, 用无菌接种环刮取生物被膜内细菌接种于 CRA 平板, 37 ℃ 培养 26 h, 再于室温放置 20 h, 观察平板上菌落颜色。若菌落呈黑色, 提示该菌 PIA 阳性; 菌落呈红色, 提示该菌 PIA 阴性^[3]。

1.6 分析药物作用前、后蛋白差异的双向电泳比较 按照以上方法培养生物膜阳性的表皮葡萄球菌于盖玻片上, 无菌 PBS 洗涤数次后, 加入 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鞣酸, 作用 36 h 后收集, 将其作为药物处理组。加入生理盐水处理的表皮葡萄球菌作为对照组, 其他培养条件相同。收集细菌用去离子水洗涤, 2 000 r/min, 离心 10 min, 吸干管内剩余液体, 加入细菌蛋白裂解液 0.6 mL, 和少量溶菌酶、DNA 酶、RNA 酶和蛋白酶抑制剂混悬。冰浴超声 40 min, 室温放置 2 h, 革兰染色。镜下仅见少许革兰阳性菌时, 4 ℃ 离心 60 min (12 000 r/min), 吸上清液, 采用考马斯亮蓝染色法定量分装。以 200 μg 上样量平铺于 IPG 胶条上方, 经过等电聚焦电泳 (IEF) 和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离。蛋白分离凝胶采用银染法进行染色。采用 PD-QUEST 软件分析蛋白点的表达差异情况。

1.7 差异表达蛋白点的高效液相色谱-芯片/质谱 (HPLC-Chip/MS) 分析 酶解肽混合物采用 HPLC-Chip (Agilent 1100 Series HPLC systems) 富集、分级, Chip 包括 Zorbax 300SB-C18 分离柱 (43 mm \times 75 μm , 3.5 μm)。0.004 mL 样品进柱等度洗脱, 然后在线进行 MS 和 MS/MS 分析。富集柱等度洗脱条件: 流动相为 0.1% (v/v) 甲酸-超纯水溶液, 流速 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。分离柱梯度洗脱条件: 流动相 A 为 0.1% (v/v) 甲酸-超纯水溶液, 流动相 B 为 0.1% (v/v) 甲酸-乙腈溶液, 起始流动相为 3% (v/v) B, 保持 2 min; 17 min 时流动相 B 为 55% (v/v); 20 min 时 B 为 75% (v/v), 保持 5 min, 流速 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。Ultra XCT ion trap Mass Spectrometer 分析的毛细管电压为 2 000 V, 干燥气流速和温度分别为 0.35 L/min、333 ℃, 质量扫描范围 m/z: 300~1800 Da。以 Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Rev A. 03. 03. 078) 自动分析 MS 和 MS/MS 数据, 搜索 UniProtKB/Swiss-Port 数据库。搜索后对蛋白评分大于 10.0, 肽评分大于 7.0 的蛋白点自动进行有效性验证。

1.8 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鞣酸可抑制表皮葡萄球菌的生长 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鞣酸能够有效抑制表皮葡萄球菌的增殖, 24 h 后菌落计数为 11 个, 明

显少于对照组菌落数 (94 个, $P<0.01$)。所选药物浓度对表皮葡萄球菌的增殖没有完全抑制, 利于后续菌落蛋白提取和生物被膜观察。

2.2 表皮葡萄球菌生物被膜模型的构建 细菌培养 72 h, 培养皿中盖玻片表面可见明显表皮葡萄球菌的成膜生长, AgNO_3 染色后, 低倍镜下可见片层状、絮状黑色物质铺满玻片。而在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鞣酸作用后, 镜下表皮葡萄球菌仅呈黑点状, 偶见成片出现。CRA 平板培养没有经过鞣酸作用的表皮葡萄球菌, 可见平板细菌分布之处呈现黑色, 而鞣酸作用后的细菌之间和平板周边为淡红色。

2.3 鞣酸作用前、后表皮葡萄球菌总蛋白的双向电泳 表皮葡萄球菌是革兰阳性球菌, 针对革兰阳性菌的特性, 将双向电泳的条件进行了优化, 采用低压聚焦方式分离, 蛋白分离效果明显优于传统方法, 在分离蛋白点总数及分离重复性都大幅提高。

2.4 差异蛋白点及其功能分类的 HPLC-Chip/MS 分析 经过 PD-QUEST 软件对双向电泳图谱进行分析, 并对差异蛋白点进行计数, 药物处理组共分离蛋白点 (658.00 \pm 10.60) 个, 对照组共分离蛋白点 (571.00 \pm 10.51) 个。将图谱进行软件比对, 以双倍差异作为筛选标准, 共得到 19 个蛋白点, 其中有 13 个蛋白点仅在药物处理组表达升高, 有 6 个蛋白点仅在对照组表达升高。

3 讨 论

表皮葡萄球菌曾被认为是非致病菌或条件致病菌, 对其没有足够的认知, 而使其在当今抗菌药滥用的医疗现实中成为医院感染且普遍耐药的罪魁祸首, 严重危害了人类的健康安全。在细菌耐药机制的研究中, 人们发现生物被膜的形成可以抵挡宿主免疫细胞、免疫相关因子和抗菌药的进入而延长细菌存活期^[4]。因此, 如何减少或抑制细菌生物被膜的形成, 成为当今新药开发和耐药感染治疗的关注的焦点。鞣酸是五倍子主要药物作用单体, 可以有效抑制表皮葡萄球菌增殖和生物被膜的形成。目前认为, 鞣酸可通过抑制细菌产生不溶性胞外多糖的关键酶——葡萄糖基转移酶, 使细菌胞外基质减少^[5], 从而抑制细菌之间相互黏附, 影响细菌生物被膜的形成。但该过程涉及的差异表达蛋白仍不清楚, 而这些差异表达蛋白可能为关键蛋白, 可能成为今后抗菌药靶向治疗的要点, 定量蛋白质组学技术的应用为该项研究提供了平台。

本研究表明, 鞣酸可以有效抑制表皮葡萄球菌生物被膜的形成, 并减少生物被膜形成关键物质 PIA 的产生, 有效抑制生物被膜阳性表皮葡萄球菌的生长, 19 个表达差异的蛋白分子中, 有细菌生存代谢相关蛋白, 如 RIA1、Lig^[6-7]; 细菌蛋白合成和降解相关蛋白, 如 RplE、RpsB^[8-9] 等; 转录调节相关蛋白, 如 RPO7^[10]; 免疫增强相关蛋白 CysA2^[11]; 还有一些蛋白参与了细菌骨架形成和蛋白磷酸化、去磷酸化, 以及 DNA 末端修饰和细菌反应的生化机制^[12-15]。这些蛋白可能参与调节了细菌的生长繁殖及其生物被膜的形成, 尤其与细菌能量代谢和蛋白合成相关的差异蛋白分子占多数, 提示鞣酸可能是通过调控细菌代谢和关键蛋白的合成来阻止细菌增殖和生物被膜的形成。

在本研究的前期工作发现, 盐酸小檗碱同样可以抑制表皮葡萄球菌生物被膜的形成, 并在研究筛选中有部分蛋白共同表达差异, 因此, 这些共同表达差异的蛋白质分子可能在细菌生

物被膜的形成过程中起到非常重要的作用,后续研究中,将对这些共同表达差异的蛋白质分子进行功能验证,为细菌耐药机制研究提供理论依据和实验基础。

参考文献

[1] 龚风云,刘丽娜,邢铭友,等.表皮葡萄球菌耐药与生物膜的相关研究[J].中华医院感染学杂志,2011,21(1):20-23.

[2] Lee JY,Ko KS,Peck KR,et al. In vitro evaluation of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections caused by staphylococci[J]. J Antimicrob Chemother,2006,57(6):1110-1115.

[3] Rohde H,Frankenberger S,Zähringer U,et al. Structure,function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections[J]. Eur J Cell Biol,2010,89(1):103-111.

[4] Arciola CR,Campoccia D,Gamberini S,et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in Staphylococcus epidermidis clinical isolates genotyped for ica locus[J]. Biomaterials,2002,23(21):4233-4239.

[5] 李敏,高谦,王建平,等.表皮葡萄球菌附属基因调节子对生物膜形成的调节作用[J].中华检验医学杂志,2005,28(11):1172-1177.

[6] He SY. Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria[J]. Plant Physiol,1996,112(3):865-869.

[7] 蒲春霞.五倍子药理研究与临床应用进展[J].现代临床医学,2005,31(2):119-121.

[8] Olesen MS,Holst AG,Jabbari J,et al. Genetic loci on chromo-

somes 4q25,7p31,and 12p12 are associated with onset of lone atrial fibrillation before the age of 40 years[J]. Can J Cardiol,2012,28(2):191-195.

[9] Cerqueira GM,McBride AJ,Picardeau M,et al. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic Leptospira species and application of ligB to typing leptospiral isolates[J]. J Med Microbiol,2009,58(Pt 9):1173-1181.

[10] Ghelardini P,Paolozzi L,Liébart JC,et al. Ligase activity of lig-bacteria infected with mu bacteriophage at non-permissive temperatures[J]. C R Seances Acad Sci D,1979,288(2):259-262.

[11] Cogdell RJ,Fyfe PK,Barrett SJ,et al. The purple bacterial photosynthetic unit[J]. Photosynth Res,1996,48(1/2):55-63.

[12] Aseev LV,Levandovskaya AA,Tchufistova LS,et al. A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the rpsB-tsif expression in vivo[J]. RNA,2008,14(9):1882-1894.

[13] Madern D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family[J]. J Mol Evol,2002,54(6):825-840.

[14] Iciek M,Włodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur[J]. Pol J Pharmacol,2001,53(3):215-225.

[15] Landini P,Bandera M,Soffientini A,et al. Sensitivity of elongation factor Tu (EF-Tu) from different bacterial species to the antibiotics efrotomycin,pulvomycin and MDL 62879[J]. J Gen Microbiol,1993,139(4):769-774.

(收稿日期:2013-06-19)

(上接第 3132 页)

(12.50%) ; β 地中海贫血居于前位的分别是:CD41-42-TTCT、CD17 A \rightarrow T、IVS-II-654 C \rightarrow T、-28A \rightarrow G;与中国南方地中海贫血人群分布特点相符^[5]。广东是 β 地中海贫血高发区,与其他地区 β 地中海贫血基因突变类型有所不同,且 α 复合 β 地中海贫血的情况也时常出现^[6-7]。本研究表明 α 地中海贫血组、 β 地中海贫血组及 α 复合 β 地中海贫血组的红细胞 G6PD/6PGD 的比值明显高于健康对照组,而 α 地中海贫血组、 β 地中海贫血组及 α 复合 β 地中海贫血组的 G6PD/6PGD 则无明显差异。表明红细胞 G6PD/6PGD 升高与 α 、 β 地中海贫血基因密切相关,可以作为地中海贫血诊断的辅助指标。由于 G6PD/6PGD 测定操作简单、快速,成本较低,在大规模人群中地中海贫血筛查方面具有一定的应用价值。但推测 G6PD/6PGD 比值高低与地中海贫血基因类型无关,不能作为诊断地中海贫血类型的特异性诊断方法。目前分别利用 gap-PCR 及 RDB 对缺失型和非缺失型(点突变)地中海贫血进行分子诊断是国内主流技术,其他,如基因芯片技术、实时荧光 PCR 以及能同时检测中国人常见缺失型和非缺失型的地中海贫血突变型的 RDB 技术也具有较广阔的应用前景^[8-9]。

参考文献

[1] 王辉林,郭华,熊礼宽. α 地中海贫血研究进展[J].中国热带医学,

2011,11(9):1158-1160.

[2] Liao C,Zhou JY,Xie XM,et al. Screening for Hb constant spring in the Guangdong province,South China,using the sebia capillary electrophoresis system[J]. Hemoglobin,2011,35(1):87-90.

[3] 区丽群,蔡早育,崔金环,等. MCV,MCH,RDW 及红细胞脆性试验联合应用在地中海贫血诊断中的作用[J]. 中国优生与遗传杂志,2002,10(4):120-121.

[4] Jayaranee S,Sthaneshwar P. Serum soluble transferrin receptor in hypochromic microcytic anaemia[J]. Singapore Med J,2006,47(2):138-142.

[5] 钟萍,朱春江.桂林地区育龄妇女地中海贫血的流行病学调查研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(10):108-109.

[6] 徐葵,曾瑞萍.对 142 例 β 地中海贫血基因携带者进行缺失型 α 地中海贫血 1 基因分析[J]. 中华血液学杂志,1999,20(4):206.

[7] 张力,区小冰,余一平.广东地区 β 地中海贫血的基因分析与临床观察[J]. 临床血液学杂志,2008,21(1):5-8.

[8] Xiong F,Huang Q,Chen X,et al. A melting curve analysis-based PCR assay for one-step genotyping of β -thalassemia mutations a multicenter validation[J]. J Mol Diagn,2011,13(4):427-435.

[9] 周玉球.地中海贫血表型筛查和基因诊断的现状 & 展望[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(5):394-398.

(收稿日期:2013-06-08)