

- AML[J]. Br J Cancer, 2010, 103(2):275-284.
- [20] Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, et al. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia[J]. Blood, 2009, 114(18):3872-3879.
- [21] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis[J]. Oncogene, 2007, 26(42): 6133-6140.
- [22] Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al. The colorectal microRNAome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(10):3687-3692.
- [23] Cortez MA, Nicoloso MS, Shimizu M, et al. miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma

- [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2010, 49(11):981-990.
- [24] Wang H, Garzon R, Sun H, et al. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma[J]. Cancer Cell, 2008, 14(5):369-381.
- [25] Santanam U, Zanesi N, Efanov A, et al. Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(27):12210-12215.
- [26] Philippidou D, Schmitt M, Moser D, et al. Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma [J]. Cancer Res, 2010, 70(10):4163-4173.

(收稿日期:2013-10-05)

## · 综述 ·

## 万古霉素中介金黄色葡萄球菌及其相关二元调控系统

丁丁<sup>1</sup>综述,马筱玲<sup>2△</sup>,鲁怀伟<sup>2</sup>审校

(1. 蚌埠医学院,安徽蚌埠 233000;2. 安徽省立医院检验科,合肥 230001)

**关键词:**金黄色葡萄球菌; 二元调控系统; 耐药性; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.030**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)04-0452-03

金黄色葡萄球菌是一种在环境中普遍存在的革兰阳性球菌,致病力强,可引起局部化脓、肺炎、关节炎、心包炎,甚至败血症、脓毒症等严重感染。近年来,金黄色葡萄球菌的耐药性逐年增加,其中最严重的是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。临床治疗MRSA感染以万古霉素为首选,然而随着万古霉素用量的增加,敏感性逐渐降低。金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药主要分为三个类型:万古霉素耐药金黄色葡萄球菌(VRSA)、万古霉素中介金黄色葡萄球菌(VISA)和异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(hVISA)。其中VRSA耐药机制主要与VanA基因有关,而VISA并没有明确的基因改变,它的耐药机制主要包括细胞壁增厚、肽聚糖交联的改变、青霉素结合蛋白的改变、自溶系统的抑制以及代谢的改变等。已有的研究发现,VISA中二元调控系统参与调节万古霉素耐药性的形成机制。

二元调控系统是存在于细菌和真菌中的一种信号转导机制,其中又以细菌中最为广泛。典型的二元调控系统由组氨酸激酶和反应调控蛋白两个部分组成,每个部分包括两个结构域,其中组氨酸激酶包括传感器结构域和传递器结构域,反应调控蛋白包括接收器结构域和效应器结构域<sup>[1]</sup>。当组氨酸激酶的传感器结构域感应到外界或内部环境发生变化时,催化ATP依赖的特定的组氨酸残基自身磷酸化,然后反应调控蛋白将磷酸基团转移到其同源的接收器结构域的天冬氨酸残基上。这改变了一种DNA结合的效应器结构域的活性,从而产生了一系列生物学效应。大量研究证实,某些二元调控系统的变异或过度表达是参与万古霉素敏感性下降最重要的调控<sup>[2]</sup>。本文将对与VISA相关的二元调控系统的结构及其调节万古霉素的耐药机制进行综述。

### 1 万古霉素耐药相关的调节系统

万古霉素耐药相关的调节系统(VraSR)是磷酸转移酶介导的二元调控系统,由组氨酸激酶VraS和反应调控蛋白VraR两个部分组成。VraSR在保持细胞壁肽聚糖完整性上

起重要作用,能迅速感应细胞壁的损害并做出相应的反应。在金黄色葡萄球菌中,VraSR二元调控系统的基因突变或表达增加在对万古霉素的耐药上起到了重要的作用。VISA中的VraSR有明显地表达上调,该调节系统可正向调节细胞壁肽聚糖的合成,造成细菌细胞壁增厚<sup>[2]</sup>。VraSR系统还调节许多与细胞壁合成有关的基因,如编码pbp2的基因pbpB高表达在VISA中也发挥着重要的作用<sup>[3]</sup>,pbp2与万古霉素竞争结合肽聚糖前体上的活性靶位,阻碍了万古霉素与靶位结合,导致耐药的产生。近来有报道对42株VISA菌株的遗传分析证实了与糖肽类抗菌药物耐药密切关联的氨基酸替换主要发生在VraS,其中第5位的亮氨酸突变为天冬氨酸,第329位的丝氨酸突变为亮氨酸是万古霉素的常见突变点。这些点突变在VraSR二元调控系统的过度表达是导致万古霉素耐药性增加的关键因素<sup>[4-5]</sup>。Doddangoudar等<sup>[6-7]</sup>在体外诱导临床菌株试验中还发现万古霉素对金黄色葡萄球菌敏感性降低与VraSR基因中第1位氨基酸的突变有关。

### 2 糖肽类耐药相关调节系统

参与磷酸转移酶介导信号转导通路的糖肽类耐药相关调节系统(GraSR)的二元调控基因由组氨酸激酶GraS和反应调控蛋白GraR组成。GraSR二元调控系统在维持细胞壁肽聚糖的完整性和协调金黄色葡萄球菌响应细胞壁损坏中起核心作用。GraSR二元调控系统的表达使得金葡萄对万古霉素的MIC值升高到VISA水平。有研究发现GraSR基因在VISA中呈过表达趋势。过度表达的GraSR基因造成细菌细胞壁显著增厚以及其自溶系统的抑制<sup>[2]</sup>,自溶活动的下降可以增加细胞壁肽聚糖的集聚,减少万古霉素的渗透率,从而导致耐药性的产生。Highlander等<sup>[8]</sup>通过对VISA菌株的研究发现GraR氨基酸序列中第1197位的天冬酰胺突变为丝氨酸与万古霉素的耐药性有关。还有报道指出GraR蛋白构象变化导致GraSR基因的突变可能会激活没有信号输入的信号转换器GraS的反应调节功能<sup>[9]</sup>,造成万古霉素敏感性的下降。研究

发现, GraSR 二元调控系统正向调节位于金黄色葡萄球菌染色体中的 MrgA 基因。MrgA 基因的过度表达增加了万古霉素的 MIC 值<sup>[10]</sup>, 导致 VISA 表型的产生。另外, Doddangoudar 等<sup>[7]</sup>发现在 GraR 中第 148 位氨基酸的突变与金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药性形成有关。

### 3 细胞壁相关调控系统

金黄色葡萄球菌的细胞壁相关调控系统(WalKR)的二元调控基因含有 5 个操纵子, 分别为 WalK、WalR、YycH、YycI 和 YycJ。其中前两个操纵子分别编码典型的组氨酸激酶 WalK 和反应调控蛋白 WalR, 共同参与细菌耐药机制的表达调控。对万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌临床菌株进行双向等位基因交换实验发现, WalK 或 WalR 基因中单核苷酸突变可以控制细胞的新陈代谢以及造成细菌细胞壁增厚<sup>[11]</sup>, 从而增强对万古霉素的耐药性。WalKR 二元调控系统可以控制肽聚糖的生物合成并且通过横桥降解肽聚糖间交联<sup>[12]</sup>。肽聚糖的合成增多可以导致细胞壁增厚, 交联的减少导致 D-丙氨酰-D-丙氨酸侧链的增加, 万古霉素大量结合在这些侧链上而被阻隔在细胞膜外, 使得其无法通过细胞壁进而发挥耐药作用。还有研究发现, WalKR 二元调控系统调节 9 种参与细胞壁代谢相关的基因(AtLA、LytM、IsaA、SceD、SsaA、Sle1、SAOUHSC\_00671、SAOUHSC\_02576、SAOUHSC\_02883), 其中 AtLA 和 LytM 基因编码金黄色葡萄球菌自溶酶, IsaA 和 SceD 基因编码溶菌性转糖基酶<sup>[13-14]</sup>。WalKR 二元调控系统的低表达导致 AtLA/LytM 自溶酶基因下调<sup>[8]</sup>, 在 VISA 的耐药机制中起着关键性作用。

### 4 附属基因调节系统

在金黄色葡萄球菌中作为群体感应系统的附属基因调节因子(Agr)对分泌外毒素和细胞表面蛋白的基因进行调节, 是最早发现的调控位点。金黄色葡萄球菌 Agr 的同源性不高, 至少存在 4 种不同的多态性, 分别为 Agr I ~ IV, 大多数研究发现 VISA 主要与 Agr II 型有关。长期服用万古霉素可引起 Agr 二元调控基因的下调<sup>[15]</sup>, Agr 位点功能的缺陷减少了 VISA 胞外蛋白酶的生成<sup>[16]</sup>并增加了纤维蛋白原、纤维结合素与血管内皮细胞的黏附性, 从而促进生物被膜的合成。生物被膜内有多层细菌生长, 可以阻碍抗菌药物万古霉素进入并避免细菌被宿主的免疫防御系统清除, 导致了金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药性增强。近年来有研究发现存在于 VISA 菌株 Agr 位点的由 P3 启动子引导的反向转录单元 RNA III 能够在翻译水平影响多种基因的表达<sup>[17]</sup>, 例如无法产生 δ-溶血素<sup>[10]</sup>, 而 δ-溶血素的合成与生物被膜的形成呈负相关, 这种变化可能是导致万古霉素敏感性降低的重要因素之一。

### 5 其他一些二元调控系统

在 VISA 相关文献中还报道一些与万古霉素耐药有关的二元调控系统。其中葡萄球菌附属原件系统(SaeSR)是通过转座子 Tn551 的插入突变发现的。SaeSR 是一个整体调节子, 可以下调 Agr 的表达, 并且控制表面结合蛋白(FnBPs)和一个假定的纤维蛋白原结合蛋白(SA1000 蛋白)的转录, 有助于细菌黏附、上皮细胞的入侵以及生物膜的形成<sup>[18]</sup>, 与耐药性的产生有关。

从基因组文库中被筛选出的自溶相关区域系统(ArlSR)二元调控系统具有调控多种药物转运蛋白 norA<sup>[19]</sup>表达的功能, 金黄色葡萄球菌 ArlSR 基因缺失突变可以增加聚-N-乙酰葡糖胺的累积, 并且增强细菌表面生物膜的形成能力<sup>[20]</sup>, 这与万古霉素治疗过程中细菌耐药性的产生有关。Memmi 等<sup>[21]</sup>

研究发现, ArlS 基因突变可以在一定程度上降低 RNA III 的转录, 抑制细菌自溶。自溶性下降能够增加金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖间集聚, 并且降低万古霉素的渗透率, 造成万古霉素耐药。

2001 年, 在金黄色葡萄球菌中发现了一个能够感应氧压环境的二元调控系统: 葡萄球菌呼吸反应系统(SrrAB), SrrAB 是需氧和厌氧呼吸反应元件调节系统, 可以在缺氧环境中过度表达<sup>[22]</sup>。研究发现, 在厌氧条件下 SrrAB 能够上调 icaADBC 启动子的转录表达<sup>[23]</sup>, 促进细胞间多糖黏附素(PIA)的合成, 从而增强生物膜的形成, 但在有氧条件下并无此现象。所以, SrrAB 系统能够在厌氧条件下参与金黄色葡萄球菌耐药性表达的调控。

还有研究发现, LytSR 也是一种与自溶有关二元调控系统。LytSR 系统可以正向调控位于 LytS 和 LytR 基因下游的两个开放阅读框架 LrgA 和 LrgB<sup>[24]</sup>, 然而 LrgA 和 LrgB 蛋白可以抑制胞壁质水解酶的活性, 降低自溶素的表达, 这可能与细菌耐药性的产生有关。

综上所述, 金黄色葡萄球菌对万古霉素中介耐药是一个复杂的多因素参与的过程, 二元调控系统通过调控某些基因的高表达或低表达来参与多种耐药机制(如细胞壁增厚、生物膜增多、自溶系统受到抑制等等)的调节, 未来可以研究是否通过基因敲除技术可以减低耐药性的产生。VISA 的出现给金黄色葡萄球菌引起的院内感染造成极大威胁, 因此, 研究三元调控系统调节 VISA 对万古霉素的耐药机制, 对于发展新型抗菌药物, 延缓该类耐药性的发生和发展具有一定的临床意义。

### 参考文献

- Wuichet K, Cantwell BJ, Zhulin IB. Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems [J]. Curr Opin Microbiol, 2010, 13(2): 219-225.
- Cui L, Neoh HM, Shoji M, et al. Contribution of vraSR and graSR point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(3): 1231-1234.
- Yin S, Daum RS, Boyle-Vavra S. VraSR two-component regulatory system and its role in induction of pbp2 and vraSR expression by cell wall antimicrobials in Staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(1): 336-343.
- Gardete S, Kim C, Hartmann BM, et al. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain of clonal type USA300 [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(2): e1002505.
- Kato Y, Suzuki T, Ida T, et al. Genetic changes associated with glycopeptide resistance in Staphylococcus aureus: predominance of amino acid substitutions in YvqF/VraSR [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(1): 37-45.
- Doddangoudar VC, Boost MV, Tsang DN, et al. Tracking changes in the vraSR and graSR two component regulatory systems during the development and loss of vancomycin non-susceptibility in a clinical isolate [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(8): 1268-1272.
- Doddangoudar VC, O'Donoghue MM, Chong EY, et al. Role of stop codons in development and loss of vancomycin non-susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(9): 2101-2106.
- Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, et al. Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall

- turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29573.
- [9] Neoh HM, Cui L, Yuzawa H, et al. Mutated response regulator graR is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(1): 45-53.
- [10] Howden BP, Davies JK, Johnson PD, et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 99-139.
- [11] Howden BP, McEvoy CR, Allen DL, et al. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(11): e1002359.
- [12] Delaune A, Poupel O, Mallet A, et al. Peptidoglycan crosslinking relaxation plays an important role in *Staphylococcus aureus* WalKR-dependent cell viability [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17054.
- [13] Dubrac S, Boneca IG, Poupel O, et al. New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(22): 8257-8269.
- [14] Falord M, Mäder U, Hiron A, et al. Investigation of the *staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21323.
- [15] Tsuji BT, Rybak MJ, Lau KL, et al. Evaluation of accessory gene regulator (agr) group and function in the proclivity towards vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(3): 1089-1091.
- [16] Beenken KE, Mrak LN, Griffin LM, et al. Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10790.
- [17] Park C, Shin NY, Byun JH, et al. Downregulation of RNA III in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains regardless of the presence of agr mutation [J]. J Med Microbiol, 2012, 61(Pt 3): 345-352.
- [18] Mrak LN, Zielinska AK, Beenken KE, et al. saeRS and sarA act synergistically to repress protease production and promote biofilm formation in *staphylococcus aureus* [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38453.
- [19] Deng X, Sun F, Ji Q, et al. Expression of multidrug resistance efflux pump gene norA is Iron responsive in *Staphylococcus aureus* [J]. J Bacteriol, 2012, 194(7): 1753-1762.
- [20] Wu Y, Wang J, Xu T, et al. The two-component signal transduction system ArlRS regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation in an ica-dependent manner [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40041.
- [21] Memmi G, Nair DR, Cheung A. Role of ArlRS in autolysis in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains [J]. J Bacteriol, 2012, 194(4): 759-767.
- [22] Pragman AA, Ji Y, Schlievert PM. Repression of *staphylococcus aureus* SrrAB using inducible antisense srrA alters growth and virulence factor transcript levels [J]. Biochemistry, 2007, 46(1): 314-321.
- [23] Somerville GA, Proctor RA. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci* [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2009, 73(2): 233-248.
- [24] Patton TG, Yang SJ, Bayles KW. The role of proton motive force in expression of the *Staphylococcus aureus* Cid and lrg operons [J]. Mol Microbiol, 2006, 59(5): 1395-1404.

(收稿日期:2013-09-24)

## · 综述 ·

# 新型肿瘤标志物:人附睾蛋白 4

陈小燕 综述, 韩光辉 审校

(临沂市妇幼保健院, 山东临沂 276000)

**关键词:**肿瘤标志物; 人附睾蛋白 4; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.031**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)04-0454-04

人附睾蛋白 4(HE4)是近年来发现的一个肿瘤标志物。在卵巢癌、子宫内膜癌、肺癌、前列腺癌、泌尿系统移行细胞癌等的诊断与治疗方面对其有较多研究,尤其是它在卵巢癌的诊断中日益受到重视<sup>[1]</sup>。现对 HE4 的结构、表达、功能,以及在癌症诊断、监测等方面的研究进展作一综述。

### 1 HE4 的生物学特性和在组织中的表达

HE4 基因最早在附睾远端上皮细胞中发现,该基因位于染色体 20q12~13.1 上,全长约 11 780 kb,包含 4 个内含子和 5 个外显子,其编码的蛋白由 124 个氨基酸组成。它在精子的成熟过程中起关键作用。HE4 蛋白是由 WFDC2 基因编码的蛋白,由两个乳清酸性蛋白域和一个“4,2-二硫化中心”组成,是具有保护性免疫作用的蛋白酶抑制剂家族中的一员。该蛋

白是一个相对分子质量较小的、酸性的、半胱氨酸含量丰富的分泌型蛋白。它以三聚体的方式分泌,是一种跨界的蛋白酶抑制剂,能抑制丝氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶等。作为蛋白酶抑制剂,其二硫化核心起着关键作用。HE4 是一个糖基化的蛋白,能在较大的 pH 和温度范围内保持结构和活性的稳定。

HE4 蛋白可表达于正常组织,并非肿瘤特异性蛋白。通过基因芯片分析,在正常组织中,呼吸道和唾液腺的上皮细胞中 HE4 呈现高表达;表达量相对少一些的组织有肺、前列腺、垂体、甲状腺和肾。在成人肿瘤组织中,以卵巢浆液性癌组织中 HE4 表达最高。此外,在肺腺癌、乳腺腺癌、移行细胞癌、胰腺癌的组织中也有中度或高度的阳性表达<sup>[2]</sup>。有学者通过