

# 表皮葡萄球菌生物膜形成分子机制的研究进展

张 青 雷呈祥 赵 旭

( 复旦大学生命科学学院微生物学系 上海 200433 )

## Progress on Molecular Mechanism of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm

Zhang Qing Lei Chengxiang Zhao Xu

( Department of Microbiology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China )

关键词 表皮葡萄球菌, 生物膜, *ica*A<sub>DB</sub>C, *SigB*, *IcaR*, *RsbU*

中图分类号 :Q73 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)05-0681-05

细菌感染性疾病已成为了各临床科室关注的重要问题。其中条件致病感染菌具有耐药性,难以治疗,尤为棘手。表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)是重要的条件致病菌。近来,随多种插管、透析技术、人工心瓣膜、人工关节和人工晶体等医疗材料的广泛应用,人口老年化及免疫低下人群的出现等,生物膜感染上升为医院细菌感染的前4位,并且感染后果日趋严重。表皮葡萄球菌作为存在于健康人皮肤表面的正常菌群并不致病,但可伴随异物(高分子材料如塑料等)进入人体,并通过粘附形成生物膜(Biofilm),入侵血循环而致败血症等。在生物膜中的细菌不仅耐抗生素还可耐抗体的杀菌作用,危害性严重。因此,近年来有关细菌生物膜的基础研究和临床研究受到人们极大的关注。本文对表皮葡萄球菌生物膜的特点、形成过程、形成生物膜所需相关因子及生物膜形成的基因调控机制作了综述。

## 1 生物膜的特点

Bayston 和 Penny(1972 年)首先认识到表皮葡萄球菌生物膜形成与其在多聚物表面定植有关。后来,通过扫描电镜发现表皮葡萄球菌在导管表面定植,多层细菌嵌于多糖-蛋白复合物(Glycocalyx)中形成生物膜<sup>[1,2]</sup>。生物膜中水份含量可高达 97%,除了水和细菌外,生物膜还可含有细菌分泌的大分子多聚物、吸附的营养物质和代谢产物及细菌裂解产物等。因此,生物膜中存在各种主要的生物大分子如蛋白质、多糖、DNA、RNA、肽聚糖、脂和磷脂等物质。生物膜多细胞结构的形成是一个动态过程,包括细菌初始附着、生物膜发展和成熟等阶段,生物膜细菌在各阶段具有不同的生理生化特性。

## 2 生物膜形成过程及相关因子

表皮葡萄球菌生物膜形成分为两个阶段:首先是由细菌表面疏水性蛋白或多糖粘附素对生物材料的初始附着,随后细菌主要通过多糖胞间粘附素(Polysaccharide intercellular adhesin, PIA)介导,相互聚集,形成生物膜。

### 2.1 表皮葡萄球菌初始附着(Primary attachment)

细菌初始附着(Primary attachment)即细菌直接与宿主体内的基质蛋白等因子作用间接附着在生物

基金项目 国家自然科学基金(30270018)

作者简介 张 青(1966-)男,江苏淮阴人,博士,主要从事微生物遗传学及病毒分子生物学研究工作。Tel:86-21-65642808 E-mail: qz981@yahoo.com

收稿日期:2002-11-18,修回日期:2003-05-26

材料表面的过程。生物材料植入机体后,很快被各种吸附蛋白覆盖,形成一层蛋白吸附层,使进入机体的细菌附着在材料表面。通常这种附着没有特异性,随血流的冲击、机体的吞噬作用和抗生素的应用而被迫迁徙或被杀灭。但是若细菌配体一旦遇到能与之结合的生物材料或吸附在材料表面上蛋白质中的受体上,则牢固地粘附在生物材料表面,完成粘附过程中受体与配体的结合。表皮葡萄球菌初始附着阶段,需要很多因子参与,如表皮葡萄球菌荚膜多糖粘附素( Capsular polysaccharide adhesin, PS/A ), 自溶素 AtlE (Autolysin AtlE), 纤维蛋白原结合蛋白( Fibrinogen binding protein, Fbe )和葡萄球菌表面蛋白( Staphylococcal surface protein, Ssp1 )等<sup>[3]</sup>。其中 *atlE* 基因编码 1335 个氨基酸的 AtlE 蛋白,分子量约为 148kD, *AtlE* 表达于细胞表面,包含 60kD 和 52kD 两个结构域,分别具有酰胺酶( Amidase )和氨基葡萄糖苷酶( Glucosaminidase )功能,60kD 蛋白在粘附过程中可能具有重要作用。另一重要基因为 *fbe*, 编码纤维原结合蛋白,分子量约为 119kD,为纤维蛋白原配体<sup>[3]</sup>。我们最近研究的初步结果表明,从临床感染病人中分离的表皮葡萄球菌 *fbe* 基因检出率达 85%, 正常人群中分离的表皮葡萄球菌 *fbe* 基因分布研究正在进行中。如正常人群中分离的表皮葡萄球菌 *fbe* 基因检出率较低,则提示 *fbe* 基因可能与表皮葡萄球菌致病性相关。AtlE、Fbe 蛋白在细菌初始附着过程中的确切功能,需要用 *atlE*、*fbe* 基因剔除及基因敲入实验加以证实。

细菌粘附于材料表面可免于被流体带到不利于其生长的环境。在细菌初始粘附阶段,由于缺乏成熟的生物膜结构保护,细菌的抗性不强,因此,抗菌药物的疗效相对较好。如细菌在生物材料表面聚集成生物膜,则可逃避机体吞噬细胞和大剂量抗生素的杀灭<sup>[4]</sup>。

材料表面吸附的血浆蛋白(主要是纤维蛋白原、球蛋白、纤维结合蛋白和白蛋白)影响表皮葡萄球菌在材料表面吸附,这些蛋白也是决定生物膜成份的重要因素。若吸附的是纤维蛋白原和纤维连结蛋白,则有利于细菌粘附及与血小板形成复合体,导致在材料表面形成含细菌的血栓。吸附白蛋白时,就极少与血小板形成复合体,不利于细菌粘附。

## 2.2 生物膜形成的聚集阶段( Biofilm accumulation )

细菌在生物材料表面初始附着后,细胞增殖、细胞间相互粘附形成多层的细胞团块,外层有粘液包被,形成生物膜的过程即为聚集( Biofilm accumulation )。细菌粘附到表面后,即调整其基因表达,在生长繁殖的同时分泌大量胞外多糖( Exopolysacchride, EPS )。EPS 可粘结单个细菌而形成细菌团块,即微菌落( Microcolony )。大量微菌落使生物膜加厚,因此 EPS 分子的产生对生物膜结构的发展十分重要<sup>[5,6]</sup>。在表皮葡萄球菌聚集阶段,除观察到 EPS 合成的增加外,也经常观察到细菌对抗生素抗性的提高。成熟的生物膜形成高度有组织性的结构,它是由微菌落组成的,在这些微菌落之间围绕着输水通道,可以运送养料、酶、代谢产物和排出废物等<sup>[7]</sup>。当细菌在增殖时可因菌种、营养、附着的表面和环境条件不同,形成疏松或致密以及厚薄不等的生物膜结构。成熟的生物膜在内在的调节机制或在外部冲刷力等作用下可部分脱落,脱落的细菌又转变成浮游生长状态,可再粘附到合适的表面形成新的生物膜。生物膜的形成是一个动态过程,结构上存在不均质性,不均质性是细菌生物膜的另一个重要特性,也与细菌的抗性有关。

在聚集阶段,表皮葡萄球菌相互连接,形成生物膜。需要多糖胞间粘附素( Polysaccharide intercellular adhesin, PIA ), 血凝素( Hemagglutinin )和聚集相关蛋白( Accumulation associated protein, AAP )等因子参与<sup>[3]</sup>。其中 PIA 是生物膜形成必需的。通过 Q-sepharose 柱层析可将 PIA 分为两个组份,PIA I 和 PIA II。PIA I 主要由  $\beta$ (1-6)-2-脱氧-2-氨基-D-吡喃葡萄糖残基组成( > 80% ),其中 15% ~ 20% D-葡萄糖胺残基是非乙酰化的,带正电荷,PIA II 结构与 PIA I 相关,但 D-葡萄糖胺残基乙酰化程度较高,另外含有磷酸及琥珀酸,带负电荷( < 20% )<sup>[3,8,9]</sup>。

## 3 生物膜形成的基因调控

### 3.1 *ica*ADBC 基因座位控制 PIA 形成

通过转座子插入失活分析发现 *ica*ADBC 基因座位( Intercellular adhesion operon, *ica* )控制 PIA 形成。

*ica*ADBC 组成一个操纵子, *ica*ADBC 转录为一个多顺反子 mRNA, *ica*A、*ica*D、*ica*B、*ica*C 分别编码 IcaA、IcaD、IcaB、IcaC 蛋白。IcaA 为 412 个氨基酸组成的跨膜蛋白, IcaC 为 355 个氨基酸组成的疏水膜蛋白, IcaB 为 298 个氨基酸组成, 可能为分泌蛋白。 *Staphylococcus carnosus* 体外 PIA 合成实验表明, IcaA 单独呈现低的 N-乙酰葡糖胺转移酶活性, *ica*A 和 *ica*D 共表达, 可使酶活性大大提高, 可合成最大链长达 20 个残基的寡聚物。 只有当 *ica*A、*ica*D 和 *ica*C 协同表达, 合成的多聚物才能与 PIA 特异性抗血清反应, 还不清楚该多聚物是否为全长 PIA 链还是 PIA 合成的中间体。 此 3 个基因中任何一个发生突变, 生物膜都不能形成。 IcaB 似乎不直接参与 PIA 合成, 因为在 *S. carnosus* 中, 重组 *ica*ADC 就能使细胞聚集, 说明只此 3 个基因就可以合成有功能的 PIA 分子<sup>[3]</sup>。

### 3.2 IcaR 阻遏 *ica*ADBC 基因表达

*ica*R 基因位于 *ica*ADBC 操纵子上游, 生物信息学分析显示其可能为转录调节因子 *tet*R 家族成员之一, 转录方向与 *ica*ADBC 相反。 Conlon 等(2002 年)研究能形成生物膜的野生型表皮葡萄球菌 CSF41498 及其 *erm*B 基因插入突变株 ICAR1、ICAR2、ICAR $\chi$  (*ica*R::Em<sup>r</sup>), 发现 *ica*R 启动子基因转录在野生型及突变株相差无几。 突变株 *erm*B 基因插入 *ica*R, 不影响 *ica*R 从启动子转录, 表明 IcaR 蛋白不参与自身转录调节。 但 *ica*R 基因插入突变使 *ica*ADBC 操纵子转录增加 5.8 倍以上, 互补实验也证明 *ica*R 基因编码 *ica*ADBC 操纵子阻遏蛋白, 调节 *ica*ADBC 转录。 进一步研究表明 IcaR 需与其它因子协同才能完全阻遏 *ica*ADBC 转录<sup>[10]</sup>。

### 3.3 SigB 激活 *ica*ADBC 基因表达

在原核细胞中, 几个  $\sigma$  因子 (Sigma factor) 共存于一个细胞中, 进化上与大肠杆菌  $\sigma^{70}$  相关的转录因子可分为两组。 第一组是基本  $\sigma$  因子 (Primary  $\sigma$  factor), 激活持家基因 (Housekeeping gene) 表达, 持家基因表达产物是对数期细胞生长所必需的, 第二组是可替换  $\sigma$  因子 (Alternate  $\sigma$  factor), 其水平及活性, 随环境压力而调节。 核心 RNA 聚合酶 (Core RNA polymerase, RNAP) 与特殊  $\sigma$  因子结合启动具有保守序列模式的一系列特殊启动子的转录。 枯草杆菌的  $\sigma^B$  是在原核中被报道的第一个可替换  $\sigma$  因子<sup>[11]</sup>。

最近研究发现表皮葡萄球菌生物膜形成需要 SigB 因子 (Sigma factor B, SigB or  $\sigma^B$ )<sup>[12,13]</sup>。 *sig*B 操纵子由 *rsb*U-*rsb*V-*rsb*W-*sig*B 基因簇组成。 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中  $\sigma^A$ 、SigB 已被鉴定, SigB 为 39kD DNA 结合蛋白, 能调节 SigB 依赖的启动子, 如 *sar* 座位 *sar*C 启动子、碱休克蛋白 Asp23 启动子转录及涉及 NADH 产生和膜运输机制等蛋白编码基因的转录<sup>[14,15]</sup>。 *sig*B 突变株中 *ica*ADBC 不能表达, 导致生物膜不能形成, 将带 *sig*B 基因的质粒电转化 *sig*B 突变株, *ica*ADBC 基因正常表达, 又可形成生物膜。 进一步研究表明 SigB 调节 *ica*ADBC 基因表达需要其它因子介导, 因为序列分析显示 *ica*ADBC 启动子上游不存在 SigB 结合保守序列, 另外 SigB 正常表达, *ica*ADBC 基因也未突变菌中其它未知基因突变同样导致生物膜不能形成, 说明即使 SigB 正常表达, 如若介导因子不存在, SigB 同样不能调节 *ica*ADBC 基因表达。 SigB 对 *ica*ADBC 基因表达调节机制目前还不清楚<sup>[16,17]</sup>。

### 3.4 RsbU 通过 SigB 调节生物膜形成

表皮葡萄球菌 *sig*B 操纵子序列与金黄色葡萄球菌及枯草杆菌 *sig*B 操纵子同源性很高, 由 4 个 ORFs (ORF2 ~ ORF5) 组成, 排列为 *rsb*U-*rsb*V-*rsb*W-*sig*B。 Knobloch 等(2001 年)利用转座子 Tn917 插入表皮葡萄球菌 1457 染色体, 获得两突变株 M15 和 M19, 序列分析表明两突变株皆为 *rsb*U 插入突变, Tn917 插入位点位于 *rsb*U 翻译起始密码子 (GTG) 下游 19bp 处。 Tn917 插入 *rsb*U 导致 PIA 不能合成及不能形成生物膜<sup>[18]</sup>。 RsbU (Regulator of sigma-B, RsbU) 为 SigB 因子的正调节因子, 其通过 SigB 调节生物膜形成的模式 (图 1)。 RsbW 与 SigB 结合阻断了 SigB 与核心 RNA 聚合酶 (RNAP) 结合, 不能启动转录; 如果 RsbW 与 RsbV 形成复合体, 则 SigB 便处于自由状态, 即可与 RNAP 结合, 启动转录。 RsbW 与 SigB 结合受能量水平及环境因子改变调节。 RsbW 同时具有的激酶活性, 能使 RsbV 转变为无活性的 RsbV-P 形式, RsbV-P 不能与 RsbW 形成复合体。 低水平 ATP (如营养耗尽、饥饿) 能限制 RsbW 激酶活性, 促进 RsbV 与 RsbW 结合, 激活 SigB。 在高水平 ATP 情况下环境压力 (如 NaCl 高渗) 启动另一条受 RsbU 调节的途径激活

SigB。RsbU 为 RsbV 专一性磷酸酯酶,RsbU 能降解 RsbV-P 为 RsbV 活性形式,促进 RsbV 与 RsbW 形成复合体,则释放 SigB,SigB 即可与 RNAP 结合启动转录<sup>[19,20]</sup>。

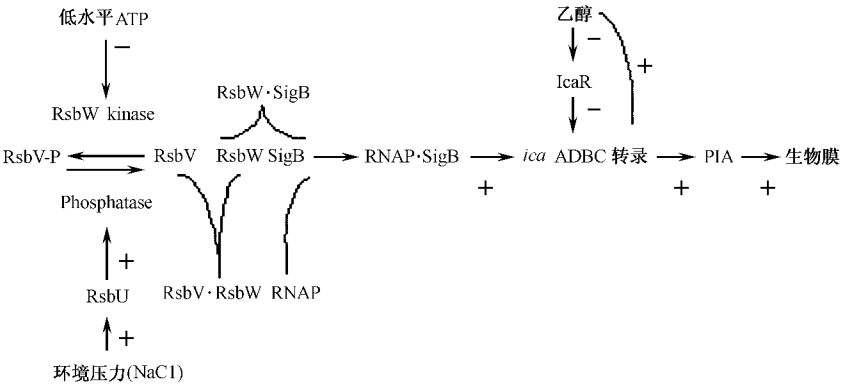


图 1 表皮葡萄球菌生物膜形成的可能途径

3.5 环境因子( NaCl ,乙醇 )通过不同通路调节生物膜形成

表皮葡萄球菌生物膜形成受环境因子调节。最近研究结果表明环境压力,如高渗( NaCl )或乙醇能增加 icaADBC 操纵子的表达,促进表皮葡萄球菌生物膜形成。但 NaCl、乙醇调节生物膜形成的路径是不同的(图 1)。乙醇是通过调节 icaR 转录影响生物膜形成。IcaR 为 icaADBC 的阻遏蛋白,乙醇直接或间接抑制 icaR 转录,导致 icaADBC 转录增加,促进生物膜形成。相反,NaCl 不影响 icaR 转录,但也能诱导 icaADBC 表达。NaCl 诱导生物膜形成需要 RsbU 蛋白参与,rsbU 转座突变株即使有 NaCl 存在也不形成生物膜。NaCl 是通过 RsbU 激活 SigB,SigB 进而激活 icaADBC 转录而促进生物膜形成<sup>[18]</sup>。

4 存在的问题和展望

生物膜的形成是细菌为适应自然环境而采取的一种生存策略,生物膜保护细菌、对抗抗生素和机体免疫吞噬作用的特性是医用植入材料相关感染性疾病的重要原因之一。目前生物膜研究主要集中在对粘附现象的观察,生物材料表面改性抗粘附研究,表皮葡萄球菌药敏实验,生物膜形成阶段、组成及生物膜导致的相关疾病的研究上,在生物膜形成的基因调控方面研究明显不足。除了 SigB、IcaR、RsbU 之外,还有哪些基因调节 icaADBC 表达,调节 icaADBC 表达机制如何,环境因子信号如何传导,环境因子通过哪些环节调节生物膜形成,表皮葡萄球菌耐药分子机制等。加强对这些问题的研究在理论上对搞清生物膜形成的基因调节机制具有重要意义,同时可能为将来防止生物膜形成提供有效的药物靶点,今后应加强这些领域的研究。

参 考 文 献

[ 1 ] Bayston R , Penny S R . Excessive production of mucoid substance in *staphylococcus* SIIA : a possible factor in colonisation of Holter shunts . *Dev Med Child Neurol Suppl* , 1972 , 27 : 25 ~ 28 .  
[ 2 ] Franson T R , Sheth N K , Rose H D , et al . Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters . *J Clin Microbiol* , 1984 , 20 ( 3 ) : 500 ~ 505 .  
[ 3 ] Mack D . Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation . *Journal of Hospital Infection* , 1999 , 43 ( supplement ) : S113 ~ S125 .  
[ 4 ] Gristina A G , Costerton J W . Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection . *Orthop Clin North Am* , 1984 , 15 : 517 ~ 520 .  
[ 5 ] Costerton J W , Lewandowski Z , Caldwell D E , et al . Microbial biofilms . *Annu Rev Microbiol* , 1995 , 49 : 711 ~ 745 .  
[ 6 ] Sutherland I W . The biofilm matrix——an immobilized but dynamic microbial environment . *Trends Microbiol* , 2001 , 9 : 222 ~ 227 .  
[ 7 ] Wimpenny J , Manz W , Szewzyk U . Heterogeneity in biofilms . *FEMS Microbiol Rev* , 2000 , 24 : 661 ~ 671 .  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 8 ] Mack D , Fischer W , Krokotsch A , *et al.* The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan : purification and structural analysis. *J Bacteriol* , 1996 , **178** ( 1 ) :175 ~ 183.
- [ 9 ] Ziebuhr W , Lossner I , Rachid S , *et al.* Modulation of the polysaccharide intercellular adhesin ( PIA ) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* . Analysis of genetic mechanisms. *Adv Exp Med Biol* , 2000 , **485** :151 ~ 157.
- [ 10 ] Conlon K M , Humphreys H , O 'Gara J P. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* . *Journal of Bacteriology* , 2002 , **184** ( 16 ) :4400 ~ 4408.
- [ 11 ] Deora R , Tseng T , Misra T K. Alternative transcription factor sigmaSB of *Staphylococcus aureus* : characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sar* . *J Bacteriol* , 1997 , **179** :6355 ~ 6359.
- [ 12 ] Rachid S , Cho S , Ohlsen K , *et al.* Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors : the possible involvement of the alternative transcription factor SigB. *Adv Exp Med Biol* , 2000 , **485** :159 ~ 166.
- [ 13 ] Rachid S , Ohlsen K , Wallner U , *et al.* Alternative transcription factor sigma( B ) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* , 2000 , **182** ( 23 ) :6824 ~ 6826.
- [ 14 ] Gertz S , Engelmann S , Schmid R , *et al.* Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Gen Genet* , 1999 , **261** ( 3 ) :558 ~ 566.
- [ 15 ] Gertz S , Engelmann S , Schmid R , *et al.* Characterization of the sigma( B ) regulon in *Staphylococcus aureus* . *J Bacteriol* , 2000 , **182** ( 24 ) :6983 ~ 6991.
- [ 16 ] Lyon G J , Mayville P , Muir T W , *et al.* Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus* , based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase , AgrC. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , **97** ( 24 ) :13330 ~ 13335.
- [ 17 ] Chien Y , Manna A C , Projan S J , *et al.* SarA , a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* , binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J Biol Chem* , 1999 , **274** ( 52 ) :37169 ~ 37176.
- [ 18 ] Knobloch J K , Bartscht K , Sabottke A , *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU , an activator of the *sigB* operon : differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* , 2001 , **183** ( 8 ) :2624 ~ 2633.
- [ 19 ] Palma M , Cheung A L. Sigma( B ) activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor( s ) during bacterial growth. *Infection and Immunity* , 2001 , **69** ( 12 ) :7858 ~ 7865.
- [ 20 ] Giachino P , Engelmann S , Bischoff M. Sigma( B ) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus* . *Journal of Bacteriology* , 2001 , **183** ( 6 ) :1843 ~ 1852.

## 微 生 物 学 报

( 双月刊 ,1953 年创刊 )

第 43 卷 第 5 期 2003 年 10 月

## ACTA MICROBIOLOGICA SINICA

( Bimonthly ,Started in 1953 )

Vol.43 No.5 October 2003

编 辑 《微生物学报》编辑委员会  
( 北京海淀中关村中国科学院微生物  
研究所内,邮编 100080 )  
电 话 :010-62630422  
E-mail : actamicro@sun. im. ac. cn

主 编 李 季 伦  
主 办 中 国 微 生 物 学 会  
中国科学院微生物研究所

出 版 ( 北京东黄城根北街 16 号 ,100717 )

印刷装订 北京中科印刷有限公司  
总发行处 北京报刊发行局  
订购处 全国各邮电局  
国外总发行 中国国际图书贸易总公司  
( 北京 399 信箱 邮政编码 100044 )

广告经营许可证 京东工商广字第 0034 号

Edited by Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica  
( In the Institute of Microbiology , Chinese Academy  
of Sciences , Zhongguancun , Beijing 100080 , China )  
Tel 86-10-62630422  
Http ://www. im. ac. cn/journals

Editor-in-Chief : Li Jilun

Sponsored by Chinese Society for Microbiology ;  
Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences

Published by Science Press ( 16 Donghuangchenggen  
North Street , Beijing 100717 , China )

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company

Distributed by Beijing Bureau for Distribution of  
Newspapers and Journals

Domestic Subscription : All Local Post Offices in China

Foreign Distribution : China International Book  
Trading Corporation  
( P. O. Box. 399 , Beijing 100044 , China )