

葡萄糖类似物甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响及调节机制的研究

靳嘉巍¹ 查锡良^{1*} 李华林² 瞿 涤²

(复旦大学上海医学院¹ 生物化学与分子生物学系卫生部糖复合物重点实验室

² 教育部医学分子病毒学重点实验室 上海 200032)

摘 要 生物被膜(Biofilm)是条件致病菌表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)的主要致病因素,生物被膜的形成依赖多糖 PIA 的合成,PIA 合成与细菌糖代谢相关。通过研究葡萄糖类似物甲基葡萄糖(Methyl-D-glucoside, MG)对生物被膜的形成及相关基因表达的影响,考察生物被膜形成的调控机制并寻找抑制生物被膜形成的方法。甲基葡萄糖能抑制 97-337 株生物被膜的形成,而且不同浓度的甲基葡萄糖对生物膜作用不同。甲基葡萄糖对 97-337 株生物被膜形成的早期的粘附有较强的抑制作用;不同浓度的甲基葡萄糖处理后对 *ica* 和 *AtlE* 基因的 mRNA 表达水平影响不大,但能诱导 *agr* 基因的表达,这与甲基葡萄糖处理不同时间后的结果一致;而且甲基葡萄糖处理后 97-337 的表面相关蛋白的组成明显改变。甲基葡萄糖对生物膜的抑制并不直接由于它对生长的抑制,它对细菌生长和生物被膜形成的抑制与其在细菌糖代谢中的竞争性相关;甲基葡萄糖能通过调控 *agr* 基因的表达改变细菌表面从而抑制 97-337 的早期粘附和生物被膜的形成,但没有通过调控 *icaADBC*、*icaR* 的表达抑制生物膜的形成,可能与其对合成 PIA 相关糖基转移酶的竞争性抑制相关。

关键词 表皮葡萄球菌,生物被膜,多聚 β -1,6-2 脱氧-2-氨基-D-吡喃葡萄糖(PIA),2-脱氧葡萄糖,甲基葡萄糖, *ica*, *AtlE*

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)06-0930-07

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)是血浆凝固酶阴性的葡萄球菌(CNS),一般附着在皮肤和粘膜表面,是常见条件致病菌。近十年来表皮葡萄球菌的感染率不断上升,现已成为医院重要的感染病原菌之一^[1,2]。导致表皮葡萄球菌感染的主要原因在于它粘附在临床上常用的多聚材料上,并形成生物被膜,生物被膜使表皮葡萄球菌感染呈现慢性、持续性和反复性的特点。生物被膜的主要成份为多糖,还包括一些相关的蛋白质,形成生物被膜的多糖主要为线性 β -1,6-2 脱氧-2-氨基-D-吡喃葡萄糖的多聚物(Polysaccharide intercellular adhesion, PIA)^[3]。*ica* 基因是编码多糖合成的糖基转移酶,生物被膜的形成依赖 *ica* 基因的表达和 PIA 的合成。表皮葡萄球菌生物被膜的形成与外界环境密切相关,环境因素通过调节生物被膜形成相关基因而影响生物被膜形成的表型^[2]。PIA 合成的底物 UDP-GlcNAc 由细菌糖酵解途径中的 6-磷酸果糖通过代谢支路转变而来,可知细菌的糖代谢与生物被膜的形成密切

相关,而且以前的结果证实葡萄糖能明显诱导生物被膜形成,推测葡萄糖类似物可以通代谢途径成为糖基转移酶的底物,可竞争性地抑制的酶催化活性而抑制多糖的合成。本文中选取 2-脱氧葡萄糖(2-Deoxy-D-glucose, 2DG)和甲基葡萄糖(Methyl-D-glucoside, MG)两种葡萄糖的类似物,其中 2-脱氧葡萄糖的能抑制细菌葡萄糖能量代谢,因为 2 位羟基对葡萄糖的代谢活性影响很大,2-脱氧葡萄糖能与葡萄糖代谢的酶结合但是不能完成正常的代谢反应,抑制酶的活性从而抑制细菌的代谢,同样影响生物被膜的形成;类似物甲基葡萄糖是 1 位甲基化的葡萄糖,其代谢活性降低,而且对 PIA 合成来说其 1 位的甲基化阻断了 1,6 糖苷键的连接从而抑制了 PIA 的合成。本研究通过研究葡萄糖类似物对生物被膜形成及相关基因表达的作用,试图揭示葡萄糖对生物被膜调控的分子机制,从而寻找有效抑制表皮葡萄球菌生物被膜形成和感染的方法。

基金项目: 国家“863 计划”(2001AA223011)

* 通讯作者。Tel: 86-21-54237696; E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

作者简介: 靳嘉巍(1977 -)男,云南人,硕士研究生,从事分子生物学研究。E-mail: jwj@shmu.edu.cn

收稿日期: 2005-05-08,修回日期: 2005-07-27

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 :实验中采用两株表皮葡萄球菌 :97-337 株。97-337 株从表皮葡萄球菌引起的败血症死亡的病人血中分离得到 ,鉴定为高生物被膜形成的表皮葡萄球菌。

1.1.2 培养条件 :细菌培养基为 TSB without glucose ;TSB ,LB(添加不同浓度的葡萄糖 ,分析纯) ;LBA^[4]。除特别说明外所有细菌培养均在 37℃ 有氧条件下进行。

1.1.3 主要试剂 :TSB、TSB(without glucose)、溶菌酶、2-脱氧葡萄糖和甲基葡萄糖均购自 Sigma 公司 ;Yeast Extract ,Tryptone 购自 OXOID 公司 ;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司 ;逆转录酶 AMV 和随机引物购自 Promega 公司。

1.2 生物被膜形成测定

37℃ 过夜振摇培养的表皮葡萄球菌 1 :200 接种于 96 孔板中 ,37℃ 无振摇培养 24h 后 ,按文献 5 测定生物被膜。

1.3 表皮葡萄球菌早期粘附的测定

表皮葡萄球菌过夜振摇活化后 ,接种于含有 1% 甲基葡萄糖的 LB 培养基中振摇培养 30min 和 12h ,并以无甲基葡萄糖的 LB 培养作为参照。通过 600nm 比色测定密度并根据此密度以 1 :200 用 PBS 稀释 ,并在塑料培养皿中培养 2h 后用 PBS 洗 20 次 ,将没有粘附到培养皿上的表皮葡萄球菌洗掉 ,用显微镜观察并拍照^[5]。

1.4 表皮葡萄球菌表面相关蛋白的提取

表皮葡萄球菌过夜振摇活化后 ,接种于含有 0.125%、1%、3% 甲基葡萄糖的 LB 培养基中摇培养 24h ,并以无甲基葡萄糖的 LB 培养基作为参照。离心收集细菌 ,加入 SDS 裂解液 ,放置 5min 后沸水中煮 5min ,19000 × g 离心 10min ,收集上清用于 10% SDS-PAGE 蛋白质电泳并用考马斯亮蓝染色^[7]。

1.5 总 RNA 抽提

离心收集不同条件下培养的表皮葡萄球菌后 ,用 TRIzol 重悬菌体 ,加入专用的研磨剂后高速振摇 ,以后的 RNA 提取按 Invitrogen 提供的关于 TRIzol 试剂的使用方法操作^[10]。为分析甲基葡萄糖作用不同时间对生物被膜相关基因的影响 ,在不同的时间点加入甲基葡萄糖 ,24h 后收集培养皿中的细菌用于抽提 RNA 和 RT-PCR^[10]。

1.6 基因 mRNA 水平测定

应用 RT-PCR 方法检测 *ica* 基因 mRNA 水平。用逆转录酶 AMV 和随机引物并按照公司提供的操作手册将表皮葡萄球菌的 RNA 逆转录为 cDNA ,以 PCR 检测相关基因 ,所用引物为 :

icaAB-F :5'-TTATCAATGCCGCAGTTGTC-3' ,

icaAB-R :5'-TTTGCTTCTGTGATACGGTTG-3' ;

icaR-F :5'-CTCGAATTTGTTACATACTAG-3' ,

icaR-R :5'-TTGGATAGAAAAGTAAAAAG-3' ;

AtlE-F :5'-CAACTGCTCAACCGAGAACA-3' ,

AtlE-R :5'-TTTGTAGATGTTGTGCCCA-3' ;

16S rRNA-F :5'-ACTCAAAGGAATTGACGGGG-3' ,

16S rRNA-R :5'-AGACCCGGGAACGTATTAC-3' ;

agr-F :5'-CAACAACGAAACATGGTGCT-3' ,

agr-R :5'-TGTCATCGAAAATGGTTACTTTG-3'。

PCR 的条件 :94℃ 5min 94℃ 1min ,55℃ 1min ,72℃ 1min ,20 个循环 ;72℃ 10min^[9]。并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物。

2 结果

2.1 葡萄糖类似物对生物被膜形成和生长的影响

2.1.1 葡萄糖类似物对生物被膜形成的影响 :研究添加不同浓度的葡萄糖及其类似物甲基葡萄糖、2-

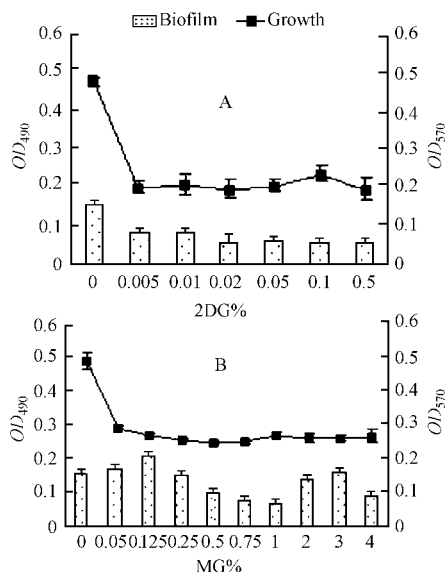


图1 不同浓度的2-脱氧葡萄糖(A)和甲基葡萄糖(B)对97-337生物膜形成和生长的影响

Fig. 1 Biofilm formation and growth of *S. epidermidis* 97-337

A : Biofilm formation and growth of *S. epidermidis* 97-337 cultured for 24h in LB media with different Methyl-D-glucoside(MD) concentration ;
B : Biofilm formation and growth of *S. epidermidis* 97-337 cultured for 24h in LB media with different 2-Deoxy-D-glucose(2DG) concentration
(n = 5 exp)

脱氧葡萄糖的培养条件对 97-337 株表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响。无振摇的粘附性培养 24h 后测定生物被膜的形成, 2-脱氧葡萄糖对表皮葡萄球菌的毒性很大, 在很低浓度(0.005%)下就能对细菌生长有很强的抑制作用, 通过比较细菌生长抑制的比率(2.5 倍)和生物被膜抑制的比率(3 倍), 说明 2-脱氧葡萄糖对生物被膜的形成有一定抑制作用。甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌生长有抑制但没有 2-脱氧葡萄糖作用强烈, 而且在加入 0.05% 甲基葡萄糖后对生长的抑制效应并不随甲基葡萄糖的浓度增加而增加, 但生物被膜的形成则呈现不同的趋势, 低浓度的甲基葡萄糖(0.125%)能微弱诱导生物被膜的形成, 甲基葡萄糖对生物被膜形成的抑制表现在较高浓度, 1% 对生物被膜的抑制最明显(图 1)。

2.1.2 甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌生长规律的影响 甲基葡萄糖对生物被膜的影响与细菌在有甲基葡萄糖条件下的生长有密切关系, 进一步研究了表皮葡萄球菌 97-337 在含有甲基葡萄糖的培养基中振荡生长的生长趋势。甲基葡萄糖在低浓度(0.125%)

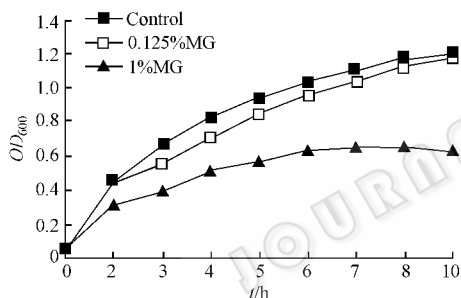


图 2 不同浓度甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌生长的影响

Fig. 2 Growth of *S. epidermidis* 97-337 in LB media with and without 1% and 0.125% Methyl-D-glucoside (n = 5 experiments)

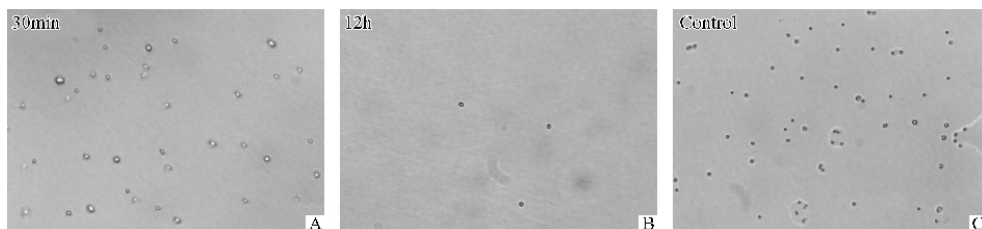


图 3 用含有 1% 甲基葡萄糖的 LB 培养基处理 30min 和 12h 后表皮葡萄球菌 97-337 株的早期粘附(800×)

Fig. 3 The initial adhesion of *S. epidermidis* 97-337 cultivated in the LB media with 1% Methyl-D-glucoside for 30min and 12h(800×)
A : 30min ; B : 12h ; C : Control (n = 3 experiments).

2.3 不同浓度甲基葡萄糖对生物被膜形成相关基因的影响

以上的结果可知甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌的作用与代谢相关, 进一步通过 RT-PCR 检测在不同的甲基葡萄糖浓度作用下 *ica*, *AtlE*, *agr* 基因的表

对表皮葡萄球菌的生长有微弱的抑制, 在高浓度(1%)对表皮葡萄球菌的生长抑制作用明显, 但从曲线上可见达到对数生长期的时间并没有很长时间的延迟, 曲线的形状与参照相同(图 2)。

2.1.3 甲基葡萄糖对葡萄糖诱导生物被膜形成的影响 为进一步观察甲基葡萄糖对生物被膜的作用是否与葡萄糖的作用的机制相关, 本文研究了甲基葡萄糖对抗葡萄糖对生物被膜形成的诱导作用。测定表皮葡萄球菌 97-337 在添加不同浓度甲基葡萄糖(按照 2.1.1 中甲基葡萄糖的浓度)含有 0.25% 葡萄糖的 LB 培养基中培养 24h 后的生物被膜形成, 并以 LB 做对照。低浓度的甲基葡萄糖就能对抗葡萄糖对表皮葡萄球菌生物被膜形成的诱导作用, 不同浓度甲基葡萄糖对粘附的作用同时也被 0.25% 葡萄糖的诱导作用所抵消, 但甲基葡萄糖没有抑制葡萄糖对表皮葡萄球菌生长的诱导作用。

2.2 甲基葡萄糖对 97-337 第一步粘附的影响

生物被膜的形成分为早期向多聚塑料材料的粘附和后期细菌之间的相互粘附形成成熟的生物被膜, 第一步的粘附对生物被膜的形成起着决定性的作用, 所以本文研究了甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌早期粘附的影响。选取产生最大抑制效应时甲基葡萄糖的浓度(1%), 分别检测甲基葡萄糖短期(30min)和长时(12h)对表皮葡萄球菌早期粘附的影响。从粘附的细菌数量来看, 甲基葡萄糖作用 30min 对表皮葡萄球菌第一步的粘附无明显影响与对照相同, 粘附到塑料皿上的细菌数量无明显减少; 而作用 12h 后有较强的抑制细菌向塑料培养皿粘附的作用(图 3)。

达并比较了与表型的相关性。甲基葡萄糖对 PIA 合成的关键酶 *icaA* 基因的表达没有明显影响, 但在低浓度有轻度诱导作用, 甲基葡萄糖对 *icaR* 的影响最大, 在低浓度能明显诱导它的表达, 甲基葡萄糖还能明显诱导对生物被膜有抑制作用的 *agr* 基因的表

达 对参与生物被膜形成初期的 *AtlE* 基因的表达并无很显作用(图 4)。

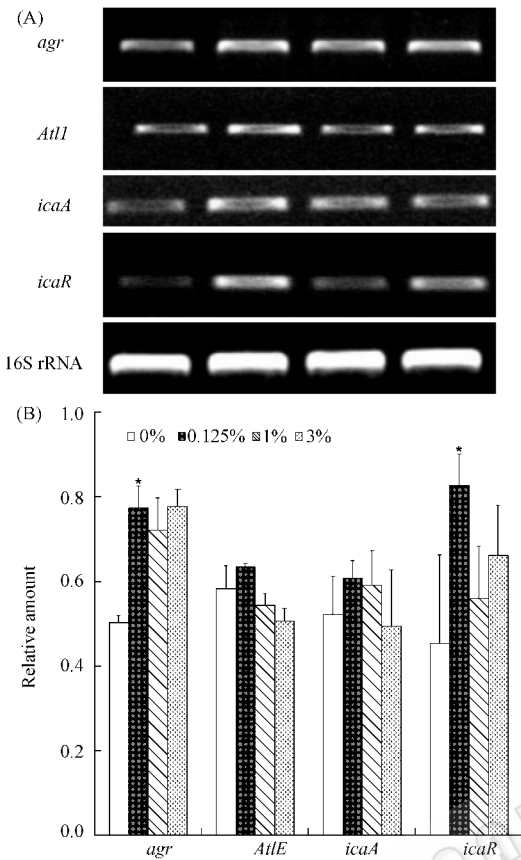


图 4 不同浓度甲基葡萄糖作用 8h 对表皮葡萄球菌 97-337 *icaAB*、*icaR*、*AtlE*、*agr* 基因表达的影响

Fig.4 the transcription levels of *icaAB* , *icaR* , *AtlE* , and *agr* in *S. epidermidis* 97-337 cultured for 8 hours in the media with different Methyl-D-glucoside concentration

A RT-PCR result for transcription levels of *icaAB* , *icaR* , *AtlE* B Ratio of densitometric value of the gene band to that of 16S rRNA (n = 3 experiments , * P < 0.01) .

2.4 1% 甲基葡萄糖处理不同时间对表皮葡萄球菌 97-337 株生物被膜形成及生物被膜形成相关基因表达的影响

1% 的甲基葡萄糖对生物被膜的抑制作用在 20h 后才有明显的效果(图 5-A) ,甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌生物被膜的抑制需要持续作用 ,当处理 20h 后葡萄糖等原底物消耗后才观察到甲基葡萄糖的抑制作用 ,当加入葡萄糖后抑制作用消失(结果见 2.1.3)。1% 甲基葡萄糖作用不同时间对生物被膜形成相关基因 mRNA 水平的影响不同。作用不同时间后 *icaA* 基因的变化不大 ,对 *AtlE* 基因的表达只有在作用 20h 后才有抑制作用但变化不大 ;负性调控基因 *icaR* 随着作用时间表达增加 ;在甲基葡萄糖的短时处理 2h *agr* 基因表达有很明显的降低 ,当长时

间处理后 *agr* 的表达增加(图 5-B)。

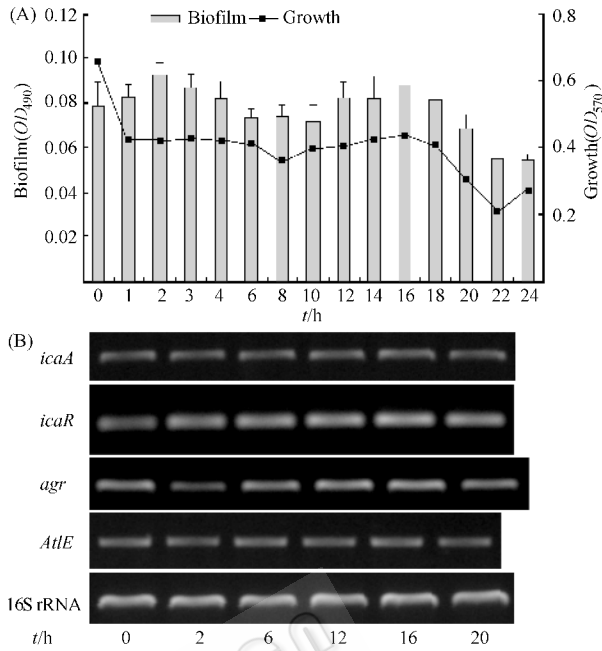


图 5 (A) 1% 甲基葡萄糖处理不同时间对 97-337 株生物膜形成的影响 (B) 1% 甲基葡萄糖处理不同时间后 97-337 株生物膜相关基因 mRNA 表达水平的变化

Fig. 5 (A) Biofilm of *S. epidermidis* 97-337 cultured for 24h in TSB with 1% Methyl-D-glucoside added into the media in different time after inoculating ; (B) Expression of genes concerning biofilm in *S. epidermidis* 97-337 cultured in TSB with 1% Methyl-D-glucoside added into the media in different time after inoculating (n = 3 experiments)

2.5 不同浓度的甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌表面菌蛋白表达的影响

由于在 mRNA 水平不能很直观解释甲基葡萄糖对生物被膜形成的分子机制 ,进一步在蛋白质水平探索了甲基葡萄糖影响表皮葡萄球菌生物被膜形成的机制。不同浓度甲基葡萄糖处理的细菌用 SDS 处理后从细胞膜上释放一些非共价粘附蛋白质^[14] ,

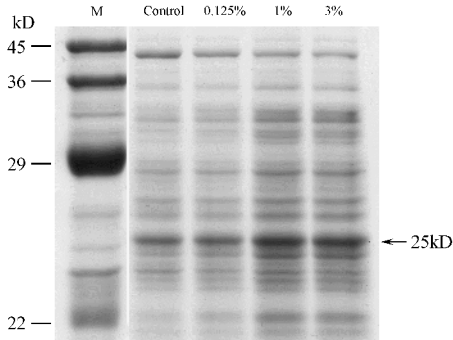


图 6 用 SDS-PAGE 检测用不同浓度甲基葡萄糖处理后表皮葡萄球菌蛋白质的表达

Fig.6 Protein profiles of the *S. epidermidis* cultivated in the media with different MG concentration on SDS-polyacrylamide (10% , wt/vol) gels
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

包括很多的自溶素蛋白,蛋白 A 和 fbe 蛋白。在 1% 甲基葡萄糖处理的表皮葡萄球菌中一些细菌表面相关蛋白表达量明显降低,在分子量为 45kD 的蛋白质在处理的 97-337 株中表达量明显低于对照;另外一些分子量较小的蛋白增加,其中的一些为细菌表面蛋白质的降解产物,25kD 的蛋白质高于对照组,甲基葡萄糖处理后在低分子量的部分多了很多降解的条带。0.5% 的甲基葡萄糖对蛋白质表达的影响不大,而 1% 甲基葡萄糖对蛋白表达影响很大,与高浓度 3% 基本相同(图 6)。

3 讨论

表皮葡萄球菌粘附在临床上常用的多聚材料上并形成生物被膜是其感染的必需过程。生物被膜的形成与细菌糖代谢有关,推测葡萄糖类似物可干扰细菌的糖代谢和影响生物被膜形成。甲基葡萄糖对生物被膜形成的抑制作用呈现复杂表型,在高浓度时才表现出抑制作用,而在低浓度时还能诱导生物被膜的形成。另一葡萄糖类似物 2-脱氧葡萄糖对生物被膜形成的抑制作用主要通过其影响细菌能量代谢而抑制细菌的生长,这与甲基葡萄糖不同。通过比较两种类似物的作用,推测甲基葡萄糖不仅通过影响细菌糖代谢和能量代谢抑制细菌生长从而抑制生物被膜形成,还能通过其他机制来调控细菌生物被膜形成。这在甲基葡萄糖对 97-337 生长规律的结果中得到证实;虽然甲基葡萄糖抑制 97-337 株生长,但没有影响表皮葡萄球菌生长的周期,说明甲基葡萄糖的作用是竞争性的抑制作用,提示甲基葡萄糖对生物被膜的作用可能是通过竞争性抑制了糖代谢、多糖合成底物及多糖合成有关酶的活性,从而影响其他生物被膜相关基因的表达来实现的。在葡萄糖存在下甲基葡萄糖对粘附的抑制作用没有呈现出单独作用时的高低波动变化,进一步提示其抑制作用与竞争代谢和葡萄糖对生物被膜的作用机制有关系。

甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌早期粘附影响的实验结果证实(图 3)甲基葡萄糖对表皮葡萄球菌生物被膜形成的第一步粘附有较强的抑制作用。甲基葡萄糖抑制 97-337 株早期向多聚材料上粘附可能是其改变了细菌表面。这种抑制作用在 12h 后才表现出,说明这种作用不是通过直接作用于细菌表面,而是细菌摄取的甲基葡萄糖参与细菌代谢后影响细菌生物被膜的形成。影响早期的粘附必然要改变表皮葡萄球菌表面蛋白和多糖的组成,所以甲基葡萄糖

对早期粘附的影响是其对生物被膜形成以及代谢相关基因表达调控的结果。

不同浓度的甲基葡萄糖和作用不同时间对 PIA 合成的关键酶 *icaA* 基因表达没有很明显的作用,甲基葡萄糖对 *icaA* 表达的影响与生物被膜形成的表型并不一致,甲基葡萄糖对生物被膜的抑制作用并不通过下调 *ica* 基因的表达来实现。甲基葡萄糖对 *icaR* 的影响与其对生物被膜形成的负调节作用不一致,而且与 *icaA* 基因表达不呈相反的关系,说明甲基葡萄糖对生物被膜的抑制作用并不通过抑制负调控基因 *icaR* 基因的表达来实现,即上调 *icaR* 的表达来抑制 *icaADBC* 的表达。在葡萄糖的诱导机制研究中,糖基转移酶的表达和 PIA 合成并不需要 *ica* 基因的持续表达,推测还与其他因子和多糖的合成密切相关,甲基葡萄糖可能调节这些因子的表达从而抑制生物被膜的形成。甲基葡萄糖类似物也可能通过竞争性抑制糖基转移酶的活性抑制生物被膜形成,而不需要下调酶的表达,因为甲基葡萄糖的 1 位甲基化能抑制多糖链的合成。甲基葡萄糖对生物被膜的抑制也可能是由于缺少合成生物被膜多糖的底物 UDP-N 乙酰氨基葡萄糖,此底物可用于合成细胞壁等的多糖成份,甲基葡萄糖的掺入干扰正常的糖代谢使 UDP-N 乙酰氨基葡萄糖减少。1% 甲基葡萄糖于只有作用 22h 后才表现出对生物被膜的抑制进一步证实了甲基葡萄糖对 97-337 株生物被膜形成的作用与其竞争抑制细菌的糖代谢相关。低浓度甲基葡萄糖诱导生物被膜的形成和基因的表达,这与细菌对甲基葡萄糖竞争性抑制酶活性和干扰底物生成的反馈机制有关。

在能抑制生物被膜形成的 1% 甲基葡萄糖的条件下,没有发现 *AtlE* mRNA 水平的强烈抑制,但对 *AtlE* 表达的影响和对生物被膜形成初期的表型的影响一致;从不同浓度甲基葡萄糖以及作用不同时间的结果可知甲基葡萄糖对早期粘附的抑制主要不是通过抑制 *AtlE* 基因的表达,也可能是其对 *AtlE* 基因表达进行了蛋白水平的调控所致。

文献报道 *agr* 对生物被膜有抑制作用,*agr* 作为密度依赖系统中的因子能抑制细菌表面蛋白的表达和促进细菌毒素的合成;*agr* 基因中编码的毒素能象去垢剂那样抑制表皮葡萄球菌的粘附。甲基葡萄糖能明显诱导 *agr* 基因的表达,而且 *agr* 基因随着甲基葡萄糖处理时间增加的表达增加。甲基葡萄糖对生物被膜的抑制作用与 *agr* 对整体细菌的调控有关,通过 *agr* 抑制细胞膜表面其他蛋白的合成从

而抑制生物被膜的形成。在细菌表面相关蛋白的蛋白电泳试验结果证实细菌表面蛋白有明显变化,说明甲基葡萄糖对早期粘附的作用是由于抑制了细菌表面粘附相关蛋白合成,从而改变了细菌表面蛋白的组成,抑制这些表面蛋白通过非共价与多聚材料和材料上包裹的宿主蛋白结合。*agr* 表达上调虽然没有明显降低 *AtlE* 的表达,但是可以改变其他表面蛋白的合成从而抑制表皮葡萄球菌早期向多聚物的粘附;当甲基葡萄糖处理 20h 后细菌葡萄糖等其他糖类都消耗很多,葡萄糖和类似物之间竞争的平衡倾向对细菌生长的强烈抑制致使 *agr* 基因反馈性的降低。

甲基葡萄糖对生物被膜形成的影响是一个复杂的过程,并不仅仅与几个直接相关基因表达的改变相关,而是细菌整体对外界刺激的反应,是一个多基因参与的过程。甲基葡萄糖能通过调控 *agr* 而改变菌表面组成从而抑制表皮葡萄球菌向多聚物上粘附;甲基葡萄糖没有通过改变 *ica* 基因的表达来抑制生物被膜形成,这与其竞争性抑制相关。甲基葡萄糖可以竞争性地抑制酶的活性而不改变 *ica* 的表达和糖基转移酶的合成。

参 考 文 献

- [1] Stefaan J, Willy E P, Rita M, *et al.* Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, **188**: 730 – 737.
- [2] Christof v, Georg P, Christine H. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *Staphylococci*. *Lancet Infect Dis*, 2002, **2**: 677 – 685.
- [3] 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.

- [4] Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, *et al.* Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun*, 1996, **64**(1): 277 – 282.
- [5] Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, *et al.* Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun*, 1997, **65**(3): 890 – 896.
- [6] Cramton S E, Ulrich M, Gotz F, *et al.* Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 2001, **69**(6): 4079 – 4085.
- [7] Cuong V, Friedrich G, Michael O. Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*, 2000, **68**(3): 1048 – 1053.
- [8] Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, *et al.* Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun*, 1994, **62**(8): 3244 – 3253.
- [9] Frebourg N B, Lefebvre S, Baert S, *et al.* PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(2): 877 – 880.
- [10] Dobinsky S, Mack D. Efficient RNA isolation method for analysis of transcription in sessile *Staphylococcus epidermidis* biofilm cultures. *Methods Enzymol*, 2001, **336**: 255 – 262.
- [11] Christiane G, Angelika K, Roderich S. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem*, 1998, **273**(29): 18586 – 18593.
- [12] Mack D, Rohde H, Dobinsky S, *et al.* Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun*, 2000, **68**(7): 3799 – 3807.
- [13] Gunter Harth, Paul C, Tang J Y. Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate-glutamine cell wall structure and bacterial replication. *PNAS*, 2000, **97**(1): 1418 – 1423.

Effect of glucose analogs on biofilm and expressions of related genes in *Staphylococcus epidermidis*

JIN Jia-wei¹ ZHA Xi-liang^{1*} LI Hua-lin² QU Di²

(¹ Key Laboratory of Glycoconjugate Research, Ministry of Public Health, Department of Biochemistry and Molecular Biology,

² Key Laboratory of Medical Molecular Virology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: *Staphylococcus epidermidis*, an opportunistic human pathogen, has become the most important cause of nosocomial infections in recent years. Its infection is mainly due to the ability to form biofilm on indwelling medical devices. To investigate the response mechanism of *S. epidermidis* to environment in biofilm formation and find efficient

anti-biofilm methods, we investigated effects of two glucose analogs, 2-Deoxy-D-glucose (2DG) and Methyl-D-glucoside (MG), on biofilm formation, expression of related gene and changes of surface protein in *S. epidermidis* 97-337 with high biofilm formation capability and pathogenicity. The effect of MG on biofilm formation was more complex than that of 2-DG which is a strong inhibitor in *S. epidermidis* 97-337 growth. MG can induce biofilm formation of *S. epidermidis* 97-337 in low concentration and exhibited strong inhibition only in high concentration, and distinctly inhibited the primary attachment to poly-material. In *S. epidermidis* 97-337 cultured in media with MG, expressions of *ica* and *AtlE* were not be changed obviously in mRNA level, but mRNA expression of *agr* gene increased distinctly, and MG disturbed component of surface proteins of *S. epidermidis* 97-337. Glucose analogies MG can inhibit *S. epidermidis* 97-337 biofilm formation, and MG inhibition in initiating attachment dramatically contributes to it. MG inhibition effects result not from regulating the expression of *ica* and *AtlE* genes but from changing the protein components on surface by regulating *agr* gene expression, and it can be presumed that MG's competitive character in bacteria glycolysis metabolism is crucial factor for these effects.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*, Biofilm, PIA (Polysaccharide intercellular adhesion), *AtlE*, *ica*, *agr*, 2-Deoxy-D-glucose (2DG), Methyl-D-glucoside (MG)

Foundation item: Chinese National Programs for high Technology Research and Development (2001AA223011)

* Corresponding author. Tel 86-21-54237696; E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

Received date 05-08-2005