

用生物发光法对绿脓杆菌粘附因子的研究*

孙嘉艳 程松高

(首都医学院微生物学教研室,北京)

用生物发光法 (BL) 研究了绿脓杆菌 (PA) 表面介导及与聚苯乙烯管粘附的成分。结果说明,粘多糖 (slime polysaccharied, SPS) 是某些粘质 (slime) 型菌株的一个起粘附作用的重要因子。用来自 PA3 的 SPS 预先包被聚苯乙烯管可以增加经洗涤 PA3、PA4 和 PA8 的粘附量; PA3SPS 抗血清可以抑制 PA 与聚苯乙烯管的粘附; N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 具有抑制 PA3SPS 增加粘附的作用。

关键词 生物发光法;绿脓杆菌;粘附因子

绿脓杆菌 (PA) 是最常见、危害严重而又难以对付的病原菌之一,它对上皮细胞的粘附是引起感染的第一步。因此,对其粘附机制的研究近来很受重视。Woods 用口腔颊上皮细胞研究了由呼吸道感染病人分泌物中分离的 PA 菌株的粘附,证明菌毛是其粘附素^[1]。Ramphal 和 Pier 用损伤的小鼠支气管上皮细胞研究从肺囊性纤维变病人痰中分离的粘液型 (Mucoid 型) 菌株的粘附作用,指出 PA 的粘液型外分泌多糖 (Mucoid exopolysaccharide, MEP) 是其粘附素^[2]。我室用鸡胚皮肤模型研究临床感染中常见血清型 PA 菌株的粘附性,发现 SPS 可能是某些 slime 型 PA 的粘附素^[3]。本文进一步明确 SPS 的粘附作用。

株;其它菌株电镜下表面可见粘液层物质,未见菌毛,称 slime 型菌株;详见文献 [4]。所有菌株均保存于半固体培养基中。

(二) PASPS 的提取、纯化和鉴定

将 PA3 48h 肉汤培养物离心,收集沉淀,用 PBS 反复洗涤。收集洗涤上清液,加入 CaCl₂ (0.2 mol/L), 其离心沉淀物用 EDTA (0.8mol/L, pH9) 溶解,透析后即得粗粘多糖——slime; 将粗粘多糖加热,氯仿萃取,酚溶液提取和 Sephadex G100 凝胶过滤即成纯粘多糖——SPS。PA3SPS 与其抗血清进行免疫电泳呈一条沉淀带。经气相色谱分析,其单糖组分为甘露糖、葡萄糖和鼠李糖; 红外光谱结果说明, PA3SPS 含酰胺键特征峰。其核酸含量低于 3% (OD₂₆₀ 值), 蛋白含量低于 1% (Lowry 法)。

(三) PA3SPS 抗血清的制备

将 PA3SPS 加入福氏完全佐剂制成 0.5mg/ml 乳剂。首次给家兔足垫注射 0.5 mg 抗原, 2

材 料 和 方 法

(一) 菌株

本实验所用菌株 PA3、PA4、PA5、PA8、PA10 和 PA11 得自黑龙江省应用微生物学研究所,它们的血清型依次分别为 II、III、IV、VI、VII、VIII 和 I 型。菌株 S36 得自北京协和医院,菌株 ATCC 10207 得自中国药品生物制品检定所; 这二个菌株血清型为 III 型。PA9 在电镜下可见典型周身菌毛,表面无粘液层物质,称非 slime 菌

本文于 1988 年 5 月 5 日收到。

* 中国科学院基金资助课题的组成部分。

BL: bioluminescence

BSA: bovin serum albumine

EDTA: ethylenediaminetetra-acetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

GlcNAc: N-acetylglucosamine

MEP: mucoid exopolysaccharide

PA: *Pseudomonas aeruginosa*

PBS: phosphate buffered saline

周后每天静注 0.5 mg (无佐剂), 持续 7d, 二周左右试血, 免疫双扩散效价达 1:32 即放血, 分离血清。

(四) PA 对聚苯乙烯管的粘附

参照文献[4], 将 PA 24h 培养物用 PBS(0.02 mol/L, pH6.8) 调至 2.5×10^8 细菌/ml, 加 300 μ l 于聚苯乙烯管中, 37°C 保温 10 min 后倾出菌液, PBS 洗二次, 甩干后用于 BL 测定。测定方法按文献[4]进行。

粘附率 =

$$\frac{\text{粘附 PA CPM}_1 (\text{表示第一分钟发光强度积分值})}{\text{总 PA CPM}_1} \times 1000$$

结 果

(一) 理化因素处理 PA 对粘附的影响

1. PBS 洗涤的影响: 前文^[4]报道的结果说明, slime 型菌株 PA3、S36 和 ATCC 10207 对聚苯乙烯管的粘附率远远高于非 slime 型菌株 PA9。上述菌株经洗涤, 离心, 沉淀; 重复三次后即获得洗涤 PA (wPA)。比较同一浓度未洗涤 PA (nwPA) 与 wPA 的粘附率的结果(表 1) 表明, 洗涤对 PA9 的粘附率无明显作用, 但使另三株菌的粘附率显著下降 ($p < 0.01$)。

表 1 洗涤 PA 对其粘附的影响

Table 1 Effect of washing of PA with PBS on adhesion

菌株 Strain	粘附率 Adherence ratio (mean \pm SD)		P 值 p value
	未洗涤 PA Non-washing PA	洗涤 PA washing PA	
PA3	341 \pm 41	62.1 \pm 0.5	<0.01
PA9	4.3 \pm 1.2	3.8 \pm 0.9	>0.05
S36	242 \pm 14	20.8	<0.01
ATCC 10207	913 \pm 108	341 \pm 41	<0.01

2. 胰蛋白酶预处理 PA3 对粘附的影响

响: 将终浓度为 2.5% 的胰蛋白酶 (Merck) 加入 nwPA3 悬液中, 37°C 保温 2h, PBS 洗涤二次后, 与 PBS 处理的 nwPA3 (对照) 分别粘附聚苯乙烯管, 比较各自粘附 CPM₁ 值。结果表明, 胰蛋白酶预处理 nwPA3 对粘附无显著影响 ($p > 0.05$)。

(二) PA3slime 和 PA3SPS 对粘附的影响

1. PA3slime 和 PA3SPS 包被聚苯乙烯管对粘附的增加作用: 分别用 PA3slime 和 PA3SPS 包被聚苯乙烯管, 37°C 作用 3h, PBS 洗涤二次 (经 ELISA 间接法证明, PA3SPS 粘附在聚苯乙烯表面上), 用 wPA3 和 nwPA3 分别粘附上述两种包被管, 用 PBS 和 BSA 代替 PA3SPS 作对照。结果(表 2) 说明, 无论 PA3slime 还是 PA3SPS 的预先包被均能增加 wPA3 的粘附量 ($p < 0.001$), PA3SPS 的预先包被对 nwPA3 也有增强粘附作用 ($p < 0.01$)。

表 2 各包被物对粘附的作用

Table 2 Effect of different coating substance on adhesion

包被物 Coating substance	粘附 PA3 的光强度 (CPM ₁) of adhered PA3 (mean \pm SD)	
	未洗涤 PA3 Non-washing PA3	洗涤 PA3 Washing PA3
磷酸盐缓冲盐水 PBS (control)	97 \pm 24	539 \pm 98
牛血清白蛋白 BSA (1mg/ml)	103 \pm 5	
PA3 粗粘多糖 PA3 slime (5mg/ml)	391 \pm 83	
PA3 纯粘多糖 PA3 SPS (1mg/ml)	301 \pm 78	974 \pm 240
过碘酸钠处理的 PA3 纯粘多糖 PA3 SPS treated with periodate	113 \pm 26	

2. PA3SPS 作用的剂量依赖关系: 以

不同浓度 PA3SPS 包被聚苯乙烯管, 测定 wPA3 在各包被量时的第一分钟光强度积分值 (CPM₁)。结果(图 1) 说明, PA3SPS 的作用具有剂量依赖关系。

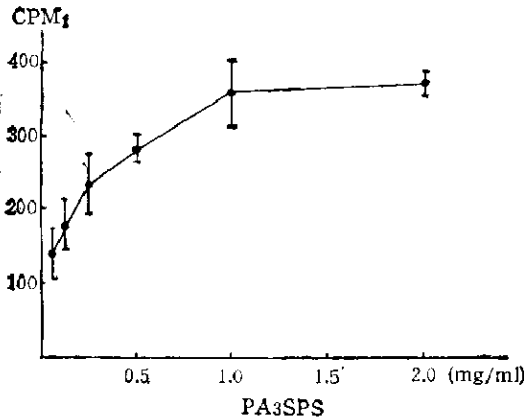


图 1 不同量 PA3SPS 包被对粘附的作用

Fig. 1 Effect of various concentration of PA3SPS-coating on adhesion

3. 过碘酸钠预处理 PA3SPS 对粘附的影响: 用 100mmol/L 过碘酸钠(北京化工厂)作用 4h (参照文献 [5]) 的 PA3SPS 和未处理 PA3SPS 包被聚苯乙烯管, 测定 wPA3 对上述包被管的粘附量。结果(表 2) wPA3 对前者的粘附量较对后者显著降低 ($p < 0.002$)。经 ELISA 间接法证明, PA3SPS 经过碘酸钠处理仍可粘附到聚苯乙烯管上。说明 PA3SPS 中的糖成分是起粘附作用的主要成分。

(三) PA3SPS 抗血清对 PA3 粘附的影响

将正常兔血清和四种不同稀释度的兔抗 PA3SPS 免疫血清与等量 nwPA3 悬液混合, 37°C 保温 20 min, 将混合物 300 μ l 移入聚苯乙烯管进行粘附。结果(表 3) 表明, PA3SPS 抗血清能明显抑制 nwPA3 粘附到聚苯乙烯表面上。

(四) 糖对 PA3 粘附 PA3SPS 包被管的影响

表 3 PA3SPS 抗血清与 nwPA3 共同孵育对粘附的影响

Table 3 Effect of incubation of PA3SPS antiserum with nwPA3 on adhesion

PA3SPS 抗血清的稀释度 Titer of PA3SPS antiserum	粘附未洗涤 PA3 的 CPM ₁ of adhered nwPA3	抑制量(对照的百分率) Inhibited amount percent of control
Control	499 \pm 65	
1:1600	332 \pm 41	33.4
1:640	236 \pm 76	52.7
1:320	15 \pm 6	96*
1:80	0	100**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

表 4 糖对 wPA3 粘附 PA3SPS 包被管的作用

Table 4 Effect of carbohydrates on adhesion of wPA3 to polystyrene tubes coated with PA3SPS

糖 类 Carbohydrate	糖类的浓度 Concentration of carbohydrate (mmol/L)	粘附未洗涤 PA3 的 CPM ₁ of adhered wPA3
磷酸盐缓冲盐水 PBS(control)		100 \pm 23
葡萄糖 Glucose	100	123 \pm 3
D-甘露糖 D-Mannose	100	133 \pm 27
L-岩藻糖 L-Fucose	100	105 \pm 14
唾液酸 Sialic acid	100	127 \pm 5
蜜二糖 D-Melibiose	100	146 \pm 48
N-乙酰葡萄糖胺 GlcNAc**	100	28 \pm 9*
	50	32 \pm 4*
	12.5	48 \pm 9*
	2.5	58 \pm 12
	0.5	65 \pm 12

* $p < 0.05 - 0.002$; ** N-acetylglucosamine

1. 四种单(双)糖、唾液酸及 GlcNAc 的作用: 分别将 100mmol/L 的 D-甘露糖、葡萄糖、GlcNAc (上海试剂二厂) 和 L-岩藻糖、蜜二糖和唾液酸 (Sigma) 与 wPA3 混合, 37°C 保温 30 min, 测该 PA3

表 5 PA3SPS 预先 包被对其它 PA 菌株粘附的作用
Table 5 Effect of PA3SPS-coating on adhesion of various PA strains

菌株 Strain	粘附洗涤 PA 的 CPM ₁ CPM ₁ of adhered wPA		用 N-乙酰葡萄糖胺预先处洗涤 PA 的 CPM ₁ CPM ₁ of adhered wPA pretreated with GlcNAc
	空 管 Void tube	包被管 Coated tube	
PA9(7)**	6.6±0.2	4.4±0.7	
PA5(4)	12.9±2.6	19.1±5	
PA10(8)	126±34	140±11	
PA11(1)	203±53	142±31	
PA4(3)	52±9.2	144±23*	24.8±1.9*
PA8(6)	142±32	319±68*	91±28*

* $p < 0.05 - 0.001$

** numbers in brackets are serotypes of various PA strains

悬液粘附 PA3SPS (1mg/ml) 包被管, 比较糖处理组和 PBS 处理组 (对照) wPA3 粘附量。结果 (表 4) 说明, 只有 GlcNAc 可抑制 wPA3 与上述包被管的粘附 ($p < 0.02$), 这种作用具有剂量依赖关系。

2. GlcNAc 作用部位的观察: 将 GlcNAc (100mmol/L) 或 PBS (对照) 加入 PA3SPS (100mmol/L) 包被管, 37°C 保温 30 min, PBS 洗三次, 加入 wPA3 悬液, 粘附后进行 BL 测定, 处理组和对照组 wPA3 粘附量无显著差异, 表明 GlcNAc 的作用部位不在 PA3SPS 上。但若将 GlcNAc (100mmol/L) 或 PBS (对照) 与 wPA3 混合, 37°C 作用 30 min, 离心洗二次后加入 PA3SPS (100mmol/L) 包被管进行粘附, 结果处理组 wPA3 粘附量显著下降 ($p < 0.002$)。同法用 GlcNAc 与 nwPA3 作用, 则不出现明显抑制, 表明 GlcNAc 可能作用于 PA3 菌体表面。

(五) PA3SPS 对其它 PA 菌株粘附的作用及 GlcNAc 对此作用的影响

选六种不同血清型的 PA 菌株制成悬液, PBS 洗三次, 测定它们对 PA3SPS (1mg/ml) 包被管和未包被管的粘附量。凡与前者粘附增加 ($p < 0.05$) 的菌株均按上述方法进行 GlcNAc 的抑制实验。结

果 (表 5) 表明, PA3SPS 预先包被可以增加 wPA4 和 wPA8 的粘附量, 此增加作用可被 GlcNAc 抑制。

讨 论

由 Woods^[1]、Ramphal 和 Pier^[2,6,7] 对 PA 粘附的研究可看出, PA 的来源不同, 引起的感染不同, 菌株特性不同, 它们起粘附作用的因子也不相同。本实验结果证明, 由烧伤等病人临床标本中分离的 PA3 中提取的 PA3SPS 是引起这些感染的 slime 型菌株一个起粘附作用的重要因子。其根据如下: (1) 用 PBS 洗掉菌体表面的 slime 可使 PA 粘附量显著降低; (2) PA3SPS 包被聚苯乙烯管对 wPA3 粘附具有增加作用; (3) PA3SPS 抗血清对 PA3 粘附起制作用等。这一结果与我室用鸡胚皮肤模型的研究结果^[3]是一致的。

在本实验中 GlcNAc 能抑制 wPA 与 PA3SPS 包被聚苯乙烯管的粘附, 我们推测这种作用可能是通过它们封闭 wPA 表面的 GlcNAc 结合部位而产生的。虽然 SPS 的分子结构尚不明, 但气相色谱分析表明, PA3SPS 中存在葡萄糖、甘露糖和鼠李糖; 红外光谱的结果显示, PA3SPS 在 1630 cm^{-1} 和 1550 cm^{-1} 处存在酰胺键特

征峰。由此可见, PA3SPS 结构中存在着 GlcNAc 或同类物。而某些型别 PA 菌体表面可能存在它的结合部位。当 PBS 洗掉 slime 从而使这些结合部位暴露时, GlcNAc 便可与其结合, 从而抑制了它与 PA3SPS 中 GlcNAc 或同类物的结合。至于本实验中 nwPA3 通过何种方式与 PA3SPS 相连尚待进一步研究。

PA3SPS 增强 wPA4 和 wPA8 的粘附, 但对其它血清型菌株则无影响。PA3SPS 对 wPA4 和 wPA8 的增强粘附作用同样可被 GlcNAc 抑制。这些现象似乎说明, PA4 和 PA8 菌体表面也存在 GlcNAc 或同类物的结合部位, 故 GlcNAc 能抑制 wPA4 和 wPA8 的粘附。而其它菌株表面则可能缺少 GlcNAc 或同类物

的结合部位, 故它们不能与 PA3SPS 结合, 出现粘附增强现象。

上述结果和讨论是对 PA3SPS 作为一种粘附因子的初步探讨, 对于它的粘附机制还有待于进一步研究, 这一研究的深化有可能为 PA 感染的预防和治疗提供新的方法。

参 考 文 献

- [1] Woods, D. E. et al.: *Reviews of Infect. Dis.*, 5: 846, 1983.
- [2] Ramphal, R. et al.: *Infect. Immun.*, 47: 1, 1985.
- [3] 曹祖华等: 首都医学院学报, 8: 175, 1987.
- [4] 孙嘉艳等: 同上, 8: 88, 1987.
- [5] Vishwanath, S. et al.: *Infect. Immun.*, 48: 331, 1985.
- [6] Ramphal, R. et al.: *ibid.*, 44: 38, 1984.
- [7] ———: *ibid.*, 41: 345, 1983.

STUDIES ON THE ADHERENT FACTORS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WITH BIOLUMINESCENCE

Sun Jiayan Cheng Songgao

(Microbiology Department of Institute of Medicine, Beijing)

A bioluminescence method was established for quantifying the adhesion of *P. aeruginosa* to polystyrene and the adherent components were investigated. The results indicated that the slime polysaccharide (SPS) is an important adherent factor of some slime strains of *P. aeruginosa*. The adhered amount of washed slime strains could be increased by

pre-coating of polystyrene with SPS obtained from PA3. The activity of PA3SPS could be inhibited by anti-PA3SPS antiserum and blocked by N-acetylglucosamine.

Key words

Bioluminescence; *Pseudomonas aeruginosa*; Adherent factor