

葡萄球菌呼吸相关双组分系统 SrrAB 研究进展

武有聪^{1,2} 许涛¹ 刘华勇¹ 韩海燕¹ 吴旻¹ 白丽² 瞿涤^{1*}

(1. 复旦大学 上海医学院医学分子病毒学教育部/卫生部重点实验室 上海 200032)

(2. 大理学院 基础医学院病原生物学综合实验室 云南 大理 671000)

摘要: 葡萄球菌呼吸相关双组分系统 SrrAB 能感应外界 O₂ 浓度, 并将信号传至胞内, 调控下游基因的转录, 以应对外界环境的变化。有研究表明, 金黄色葡萄球菌 SrrAB 在有氧条件下促进毒力因子的表达, 抑制生物膜的形成; 在厌氧条件下抑制毒力因子的表达, 促进生物膜的形成。另外, 在有氧及厌氧条件下, 金黄色葡萄球菌 SrrAB 调控生长代谢的途径也不一致。表皮葡萄球菌中也存在类似的双组分系统 SrrAB, 且与金黄色葡萄球菌 SrrAB 具有较高同源性, 但目前尚不清楚两者在生长代谢及毒力调控方面的异同。结合课题组研究工作, 简要综述葡萄球菌 SrrAB 的调控机制, 着重比较其在有氧及厌氧条件下的调控差异, 这对临床诊治葡萄球菌引起的感染具有一定的借鉴意义。

关键词: 双组分信号转导系统, SrrAB, 葡萄球菌

Advances in two-component signal transduction system SrrAB of *Staphylococcus*

WU You-Cong^{1,2} XU Tao¹ LIU Hua-Yong¹ HAN Hai-Yan¹

WU Yang¹ BAI Li² QU Di^{1*}

(1. Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministries of Education and Health,
Fudan University, Shanghai 200032, China)

(2. Integrated Laboratory of Pathogenic Biology, College of Preclinical Medicine,
Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: *Staphylococcus* employs SrrAB, a two-component signal transduction system

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02A253); 国家自然科学基金项目(No. 81101214/H1901)

*通讯作者: Tel: 86-21-54237568; 邮箱: dqu@fudan.edu.cn

收稿日期: 2012-02-29; 接受日期: 2012-06-05

(TCSTS), to sense and respond to changes in oxygen tension by regulating transcriptions of downstream genes. It has been demonstrated that under aerobic condition SrrAB upregulates the expression of virulence factors and inhibits biofilm formation in *S. aureus*, however under anaerobic condition it downregulates the expression of virulence factors, and enhances biofilm formation. In addition, SrrAB plays different roles in growth and metabolism under aerobic and anaerobic conditions in *S. aureus*. Little is known about the function of SrrAB in *S. epidermidis*, which shares considerable homology with SrrAB of *S. aureus*. In combination with previous work of our laboratory, we review the advances of current research of staphylococcal SrrAB, with the comparison of SrrAB modulation mechanism under aerobic and anaerobic conditions highlighted.

Keywords: Two-component signal transduction system, SrrAB, *Staphylococcus*

葡萄球菌属(*Staphylococcus*)为兼性厌氧菌,是引起医院内感染的主要病原菌之一^[1-3],由于其寄生部位的 O₂ 含量不一,引起感染的机制也不同。在浅表皮肤感染中,细菌能自由利用 O₂,进行呼吸代谢。然而,在深部组织感染中(如肺囊性纤维样变),可利用的 O₂ 有限,为获得生存所需要的能量,细菌必须调整代谢方式,以应对外界 O₂ 压力的改变^[4-5]。双组分信号转导系统(Two-component signal transduction system, TCSTS)好像细菌的哨兵^[6-7],能感应外界环境压力(如抗生素作用,细胞壁损伤, pH、O₂ 和 NaCl 浓度等)的变化,并将此信号传至胞内引起下游基因转录的改变,以达到适应环境和引起疾病的目的^[4,8]。葡萄球菌 TCSTS-SrrAB (Staphylococcal respiratory response)主要通过感应外界 O₂ 压力的变化而调控细菌的生长、代谢和毒力等。目前,对金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 的研究较多,取得了一定的进展,对表皮葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 的研究还在积极地进行着,结合本课题组研究内容,就近年来葡萄球菌 SrrAB 研究所取得的进展综述如下。

1 葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 生物学信息及同源性比较

长期以来枯草杆菌一直被认为是典型的需氧

菌,只能在有氧条件下生长繁殖,有研究表明^[9-11],在厌氧条件下,枯草杆菌能以硝酸盐/亚硝酸盐为终末电子受体,以发酵的方式生长繁殖,通过调控代谢活动而影响细菌的生长及毒力因子的表达,而控制启闭这一有氧呼吸到无氧代谢转换的正是 TCSTS-ResDE (Aerobic and anaerobic respiration D and E)。此外,大肠杆菌中也存在类似的 TCSTS (Aerobic respiratory control protein A and B, ArcAB),有研究表明,大肠杆菌主要通过 ArcAB、Fnr、NarLX 和 NarPQ 四大系统来调控有氧和/或厌氧条件下的呼吸代谢^[11-12]。John P. T. 等^[4]采用 ClustalV 多重序列分析软件,对金黄色葡萄球菌(*S. aureus* WCUH29, NCIMB40771)全部 TCSTS 蛋白序列进行系统分析,发现金黄色葡萄球菌 TCSTS 中也存在类似于枯草杆菌 ResDE 的双组分系统,命名为 SrrRS (Staphylococcal resDE homologues regulator and sensor),SrrR-SrrS 与 ResD-ResE 在蛋白序列上的同源性分别为 67.8%和 33.7%,并系统阐明了金黄色葡萄球菌 SrrRS 在厌氧条件下的功能。几乎同时,Jeremy M. Y.等^[8]采用类似的方法(TBLASTn program),发现在另一株金黄色葡萄球菌(*S. aureus* MN8)基因组中也存在类似的 TCSTS,并称之为 SrrAB (SrrRS 与 SrrAB 属葡萄球菌的同一

套双组分系统, 为了统一, 以后称为 SrrAB), 其中, SrrA-SrrB 与 ResD-ResE 在蛋白序列上的同源性分别为 67%和 33%, 与上述文献报道结果一致; 并用同源重组的方法敲除 *srrB* 基因来研究 SrrAB 在金黄色葡萄球菌中的功能。SrrAB 不仅存在于金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中, 也存在于炭疽芽胞杆菌(*Bacillus respiratory response A and B, BrrAB*)^[13]这一类 G⁺大杆菌中。在上述细菌的 AB 两个元件中, A 单元(反应调节蛋白)的同源性较 B 单元(感受器)高(表 1), 其中 A 单元属 OmpR 家族, 侧链上含有一个约 20 个氨基酸残基组成的“螺旋-转角-螺旋”基序(Helix-turn-helix motif, HTH 模序), 有利于与下游转录调控基因结合; B 单元属于典型的组氨酸激酶蛋白家族, 存在高度保守的组氨酸残基(如 *S. aureus*-H369), 亲水性图谱分析发现, 近 N 端存在一个约 140–160 个氨基酸残

基组成的胞外结构域, 将两个跨膜结构域分开, 序列组成较 C 端变异大, 这有利于与不同的配体及胞外刺激信号结合。在上述微生物中, 尽管生物学性状上存在明显差别, 但 A 和 B 两个单元在基因水平和蛋白质水平上存在高度的同源性, 提示它们可能感应相同的信号(O₂ 浓度), 并通过相同或相似的途径传递信息, 这对研究表皮葡萄球菌 SrrAB 的调控功能具有一定的指导意义。

本文分别选取具有代表性的 3 株表皮葡萄球菌(*S. epidermidis* 1457、RP62A 和 ATCC-12228)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*-Mu3、Col 和 Newman, 表 2), 从 PubMed 中分析呼吸相关 TCSTS 的基因和蛋白序列, 采用 Vector NTI 软件分别与枯草杆菌和炭疽芽胞杆菌的 ResDE 进行比对、分析同源性。由于 *S. epidermidis* 1457 基因组序列尚未公布, 但与 RP62A 具有较高同源

| 表 1 表皮葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 与其它同源类似物的同源性分析 Table 1 Homological analysis of staphylococcal TCSTS-SrrAB on the gene and protein sequence with other homologues | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| 菌株(编号) Strains (No.) | <i>S. epidermidis</i> 1457 | | | |
| | <i>srrA</i> identical | <i>srrB</i> identical | SrrA identical | SrrB identical |
| <i>S. epidermidis</i> RP62A (NC002976) | 100% (726 nt) | 99.9%* (1 770 nt) | 100% (241 aa) | 100% (589 aa) |
| <i>S. epidermidis</i> 12228 (NC004461) | 100% (726 nt) | 100% (1 770 nt) | 100% (241 aa) | 100% (589 aa) |
| <i>S. aureus</i> Col (NC002951) | 80.6% (726 nt) | 71.3% (1 752 nt) | 90.5% (241 aa) | 70.8% (583 aa) |
| <i>S. aureus</i> Mu3 (NC009782) | 80.4% (726 nt) | 70.8% (1 767 nt) | 90.5% (241 aa) | 70.2% (588 aa) |
| <i>S. aureus</i> Newman (NC009641) | 80.6% (726 nt) | 71.3% (1 752 nt) | 90.5% (241 aa) | 71.0% (583 aa) |
| <i>B. subtilis</i> str. 168 (NC000964) | 64.1% (<i>resD</i> , 723 nt) | 52.2% (<i>resE</i> , 1 770 nt) | 65.3% (ResD, 240 aa) | 33.4% (ResE, 589 aa) |
| <i>B. anthracis</i> str. Ames (NC007530) | 63.9% (<i>brrA</i> , 717 nt) | 52.9% (<i>brrB</i> , 1 776 nt) | 67.9% (BrrA, 238 aa) | 32.3% (BrrB, 591 aa) |

注: *: 在表皮葡萄球菌 1457 菌株中 *srrB* 基因上第 1 569 位碱基为“C”, 在表皮葡萄球菌 RP62A 中为“T”, 但其编码的氨基酸不变(均为丙氨酸, GCG/GCA)。枯草杆菌和炭疽杆菌中的反应调节蛋白分别称为 ResD 和 BrrA; 组氨酸蛋白激酶感应器分别称为 ResE 和 BrrB。

Note: *: The 1 569th base of *srrB* is “C” in *S. epidermidis* 1457, but “T” in *S. epidermidis* RP62A, the amino acid which they encoded is alanine in the same (GCG/GCA). Response regulators in *B. subtilis* and *B. anthracis* are named ResD and BrrA, respectively. Histidine kinase sensors are named ResE and BrrB, respectively.

表 2 常见金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌模式株特点
Table 2 Features of model strains of *S. aureus* and *S. epidermidis*

| 菌株 Strains | 特征 Features | 参考文献 References |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>S. epidermidis</i> 1457 | 基因组信息尚未公布，与 RP62A 具有较高同源性，常用来作表皮葡萄球菌功能研究的模式株 | [14–16] This study |
| <i>S. epidermidis</i> RP62A | 来源于一静脉导管相关的败血症患者，基因组背景清楚，具有较强粘附力，生物膜形成阳性，常用于生物膜形成相关机制的研究 | [17–19] |
| <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 | 基因组背景清楚，生物膜形成阴性，非致病菌株，常用于检测食物中抗生素残留的标准株 | [20] |
| <i>S. aureus</i> -Mu3 | 从日本某医院中分离的一株对万古霉素异质性耐药的 MRSA 菌株，故名日本异质性 VRSA (Japanese hetero-VRSA)，高度同源于 <i>S. aureus</i> -Mu50，基因组背景清楚 | [21–22] |
| <i>S. aureus</i> -Col | 分离自英国某伤口感染患者，基因组背景清楚，早期 MRSA，同时也耐其它多种抗生素如青霉素、四环素等 | [17] |
| <i>S. auerus</i> -Newman | 分离自某复发性结核性骨髓炎患者，基因组背景清楚、前噬菌体和致病岛在其毒力和进化中起关键作用，不含抗性基因，对一般的抗生素敏感，与 <i>S. aureus</i> MW2、Mu50、N315 等 MRSA 株进化距离较远 | [23–24] |

性，以 RP62A 基因组为背景设计引物，PCR 扩增 *S. epidermidis* 1457 的 *srrA* 和 *srrB* 基因后测序，重复 3 次，所得结果与其他细菌的呼吸相关 TCSTS 分别进行比对。发现 SrrA 与 SrrB 在金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌之间的同源性最高，葡萄球菌与杆菌之间的同源性与所述文献报道的相似(表 1)。进一步以各菌株 A 单元的氨基酸序列为依据做进化树分析，结果表皮葡萄球菌与金黄色葡萄球菌各自单独聚为一类，枯草杆菌和炭疽杆菌聚为第三类，同源性与所述结果一致(图 1)。

2 葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 信号转导机制

TCSTS 是一套普遍存在于原核生物中完整的信号转导系统^[25–26]，其核心包括两个组分(图 2)。一个是组氨酸蛋白激酶(Histidine kinase sensor, S)，通常是一个跨膜蛋白，由 3 个结构域组成，自 N 端到 C 端依次为配体/信号(Input)结合位点(高度可变)、组氨酸自身磷酸化位点(HAMP)和 ATP 结合位点。另一个为反应调节蛋白

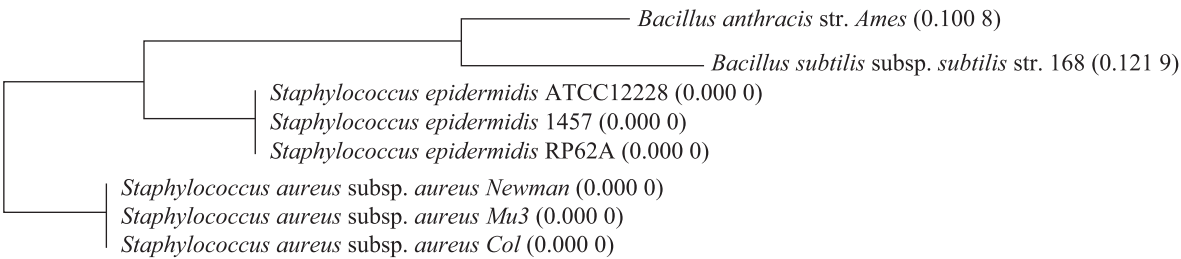


图 1 呼吸相关双组分系统反应调节子蛋白序列进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of response regulator related respiratory-response TCSTS

注：括号内数值大小代表距离远近，值越大，距离越远，菌株间亲缘性越低，反之亦然。
Note: The values in the brackets indicate homology, bigger one indicating lower homology, smaller one indicating higher homology.

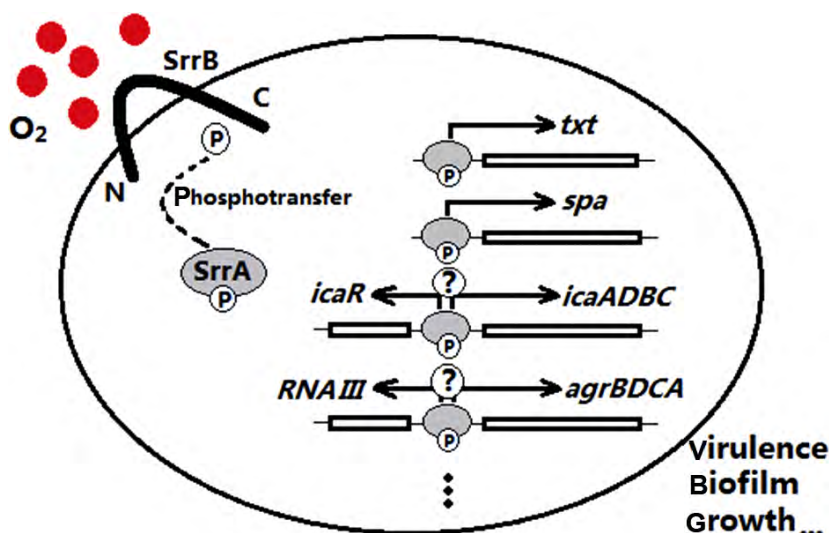


图2 金黄色葡萄球菌双组分信号转导系统 SrrAB 调控机制示意

Fig. 2 Regulation mechanism model of TCSTS-SrrAB in *S. aureus*

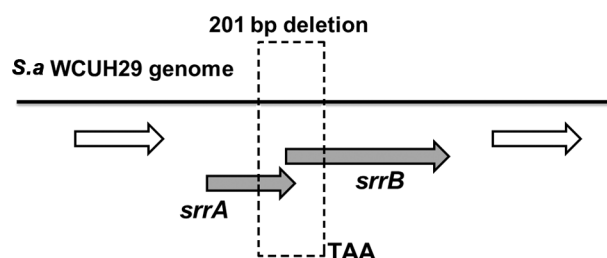
注: SrrB: 跨膜蛋白, 感应外界 O_2 变化; SrrA: 胞浆蛋白, 磷酸化后调控下游基因转录; ①: 磷酸基团; ②: 表示双向性调控, 视不同 O_2 浓度而定。箭头所指方向为转录调控方向, 有氧条件下, 磷酸化的 SrrA 与 *txt*, *spa*, *icaR* 和 *RNA III* 的启动子结合, 表现出毒力因子分泌增强, 生物膜形成能力降低的特点; 在厌氧条件下, 结果与此相反, 表现出毒力因子分泌降低, 生物膜形成能力增强的特点^[30-33]。

Note: SrrB: Transmembrane protein, upon signaling, SrrB is autophosphorylated and transfers the phosphate to SrrA, which is located in the cytoplasm; ①: Phosphoryl group; ②: Bidirectional transcriptional regulation. Phosphorylated srrA binds to the promoters of *txt*, *spa*, *ica*, and *agr*, which probably responsible for the ability of SrrAB to alter expression of TSST-1, SPA, IcaA, and agr RNAIII, following by alteration of virulence, biofilm formation and growth, et al^[30-33].

(DNA-binding response regulator, R), 分为两个结构域, N 端含有能接受磷酸基团的天冬氨酸位点(相对保守), 为调控区; C 端含 DNA 结合位点, 为效应区, 序列高度可变, 可与多个不同的靶序列结合^[27-29]。当外界刺激信号(O_2 浓度变化)与 B 蛋白胞膜外区的配体结合位点结合时, 信号传至胞内, 使 ATP 结合位点活化, 结合 ATP 并将其水解为 ADP, 进而将水解下来的磷酸基团转移到组氨酸位点(HisKA)上, 使其自身磷酸化。磷酸化的 B 蛋白能与 A 蛋白的调控区域结合, 将磷酸基团转移到 A 蛋白的天冬氨酸位点上, 磷酸化后的 A 蛋白构象发生改变, 暴露 DNA 结合位点, 与不同的 DNA 序列结合而发挥调控功能。

3 葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 与细菌的生长代谢

到目前为止, 有 4 株金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 功能被研究过^[22,34], 都表明 SrrAB 在不同的 O_2 浓度下调控细菌的生长、代谢及毒力等。有研究表明^[8], 在厌氧环境下, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus* RN4220) *srrB* 突变株较野生株生长明显变慢, 但在有氧条件下生长无差别。同样, Throup J. P. 等^[4]采用“hit & run”突变法构建了金黄色葡萄球菌(*S. aureus*-WCUH29, NCIMB40771) *srrAB* 突变株, 敲除 201 bp 片段(包括 SrrA 的部分 C 端和 SrrB 的部分 5'端, 图 3), 并在敲除位置加入终止密码子, 以确保 AB 操纵子上编码的蛋白

图3 金黄色葡萄球菌 *srrAB* 基因敲除示意^[4]Fig. 3 Physical map of *srrAB* deletion in *S. aureus*^[4]

是无完整功能的 SrrA 截短体, 并且无 *srrB* 基因的转录(在有重复序列干扰同源重组时, 这种选择性的功能结构域部分敲除法也不失为一种策略)。研究发现, 在有氧条件下 *srrAB* 突变株的菌落大小和生长率与野生株比较无明显差异, 但在厌氧条件下生长明显减慢, 提示在有氧条件下, 金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 与细菌的生长代谢关系不大, 与上述文献报道的结果一致。另外, 作者还采用二维电泳(Two-dimensional gel electrophoresis)的方法来研究 *srrAB* 突变的差异蛋白谱, Image Master Elite 软件定量分析, 差异在 2 倍以上的有意义, 并割取差异蛋白点用质谱做定性分析, 所得序列与金黄色葡萄球菌基因组数据库比对, 根据蛋白质的同源性推测相应功能。结果表明, 在有氧条件下有 10 个差异蛋白点, 其中 4 个上调, 6 个下调; 在厌氧条件下有 19 个蛋白点改变, 其中 12 个上调, 7 个下调。在厌氧条件下, 参与三羧酸循环的酶(如琥珀酰 CoA 合成酶 α/β 亚单位、延胡索酸酶和顺乌头酸酶等)在 *srrAB* 突变株中均上调; 与发酵相关的酶(如乙醇脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶)在有氧和厌氧条件下都下调, 这些蛋白都与细菌的能量代谢密切相关, 提示金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 可能通过调控这些酶的活性来影响细菌的生长及代谢。

4 葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 与毒力

1968 年美国报道了第一例耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)

感染病例, 细菌耐药性问题引起了人们的广泛关注^[35]。糖肽类抗生素(如万古霉素/Vancomycin, 替考拉宁/Teicoplanin)被认作是治疗 MRSA 感染的最后防线。然而, 1979 年首次报道了耐万古霉素的表皮葡萄球菌^[36], 1997 年日本又报道了耐万古霉素的金黄色葡萄球菌(Vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA), 这给治疗葡萄球菌感染带来了极大挑战^[22]。由于 MRSA 和 VRSA 的流行, 以及金黄色葡萄球菌能产生多种细胞毒素及侵袭性酶(如 TSST-1、SPA、PVL、 γ 溶血素、leukocidin A/B 等)的特点^[37-38], 在细菌-宿主细胞相互作用的过程中, 直接作用于人体的固有免疫细胞(尤其是中性粒细胞)及粘膜屏障, 尤其是社区相关性 MRSA (Community-associated MRSA, CA-MRSA)产生的酚溶性调节蛋白(Phenol-soluble modulins, PSM), 具有显著的溶细胞能力, 在致病性上表现出急性、主动攻击的特点, 引起的疾病谱多样而严重^[3,39-40]; 而表皮葡萄球菌产生的毒素非常有限, PSM-6 是表皮葡萄球菌产生的具有溶细胞潜能的毒素, 其作用较金黄色葡萄球菌产生的其他类型的 PSM 弱得多^[17], 也无侵袭性酶, 主要在植入性生物材料表面形成生物膜, 引起持续性感染。在与宿主细胞相互作用的过程中, 通过分泌细胞间多糖(Polysaccharide intercellular adhesion, PIA)或蛋白(如 Extracellular matrix-binding protein, Embp)来保护菌体, 逃逸吞噬细胞和体液因子(防御素)的杀伤, 表现出慢性、被动防御的致病特点^[41-43]。

目前研究表明, 调控葡萄球菌毒力的系统主要有群体感应系统(Quorum sensing systems, QS)、全局调控系统(Global regulators)及双组分系统(TCSTS)。辅助基因调节系统(Accessory gene regulator, agr)和 *luxS* 是已被发现的两个主要 QS, 在生物膜形成的不同阶段发挥作用^[44-46]; SigB 和 SarA 是两个重要的全局调控系统^[47-48]; TCSTS 中

主要有 SrrAB、ArlRS 和 SaeSR 等^[8,30,33,49-50]。Yarwood J. M. 等^[8]研究金黄色球菌 SrrAB (*S. aureus* RN4220)调控毒力时发现,在对数生长后期和稳定期, SrrAB 的表达在微氧环境中(1%–2% O₂)较有氧环境中高, SrrAB 表达量与 RNAIII 的产生呈负相关。Northern 印迹显示,在微氧环境中, *srrB* 突变株 RNAIII 表达较野生株高,互补株(*srrAB* 过表达) RNAIII 表达又回复到野生株水平。毒力因子的产生也随着 *srrAB* 表达的改变而改变,在微氧环境中, *srrB* 突变株 TSST-1 产生的量较野生株明显减少,互补株又接近野生株水平。进一步采用流式细胞仪检测 SPA 的表达量,在微氧环境中, *srrB* 突变株 SPA 表达上调,在有氧环境中表达下调,互补株 SPA 的表达接近野生株水平^[8,33],提示金黄色葡萄球菌 SrrAB 是多向性毒力调控因子,在厌氧条件下主要是抑制毒力因子的产生(图 2)。

Pragman A. A. 等^[30]首先确定了金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB (*S. aureus* RN4220)的定位,研究表明调节蛋白 SrrA 位于细胞浆中,组氨酸激酶 SrrB 位于胞膜上, SrrB 在两段跨膜结构域之间含有一个亲水性的胞膜外区结构域(图 2)。分析 *srrAB* 操纵子的转录特点时发现, *srrAB* 只有一个转录起始点,这提示要么 *srrA* 单独转录,要么 *srrAB* 共同转录,不存在 *srrB* 单独转录的情况。电泳凝胶阻滞实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)提示, SrrA 能与 *srrAB*、*tsst-1*、*spa*、*agr* P2 和 *agr* P3 启动子结合,为金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 调控毒力基因的表达提供了重要的体外分子依据。为进一步阐明体内金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 在毒力调控方面的作用,作者构建了兔心内膜感染模型(结果见文献[30])。其次,该作者^[31]还将反义 RNA (Antisense RNA)技术用于金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB (*S. aureus* MN8, TSST-1 阳性,毒性休克综合征患者临床分

离株)功能的研究,应用四环素诱导的反义载体 pYJY4 构建反义 *srrA* 重组质粒(以空载质粒作对照),以干扰金黄色葡萄球菌 *srrAB* 的转录,采用 Northern 和 Western 杂交验证诱导后 SrrA 在 mRNA 和蛋白水平的干扰效果。RT-PCR 显示,诱导后 *srrA* 和 *srrB* 的转录均下调,尤其是 *srrA* (可达 60%)。在有氧及低氧(1% O₂)条件下,四环素诱导株较未诱导株生长滞后约 2 h,诱导的质粒空载株生长未受明显影响。在 O₂ 充足的条件下, SrrAB 通过结合各自的启动子来激活 *tst*、*spa* 和 *icaR* 的转录,前两者可增强金黄色葡萄球菌的毒力,后者可抑制 *icaADBC* 的转录而影响生物膜形成;在低 O₂ 环境下, SrrAB 上调乙醇脱氢酶和乳酸脱氢酶的表达,这对细菌在厌氧条件下的代谢具有重要意义(与文献[4]一致)。在厌氧条件下, SrrAB 下调毒力因子 *tst* 和 *spa* 的表达,同时抑制 *icaR* 的表达,因此而降低了 IcaR 对 *icaADBC* 转录的抑制作用,从另一方面增强了生物膜的形成能力(图 2)。此外,该作者^[34]将分离自人皮肤、阴道和牛乳腺的 21 株金黄色葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 进行测序,做进化树分析,以确定不同来源的 SrrAB 在核酸序列和蛋白序列的保守程度,并对其中 2 株(N2 和 N19) SrrA 进行 N 端截短,结果发现人阴道分离株及牛乳腺分离株各自聚为一类,人皮肤分离株分散在各类中,核苷酸多态性少,在低氧条件下(O₂<0.3%), SrrA 蛋白 N 端截短的 2 株金黄色葡萄球菌表现出生长迟缓,异常上调某些毒力因子(如溶血素和 TSST-1)的特点,前者与上述结果一致,后者相反,可能是因为菌株来源不同所致。

5 葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 与生物膜

传统微生物学认为,细菌是以单个浮游细胞(Planktonic cell)的形式行使生命活动,事实上并不仅仅如此。1982 年有文献报道^[2],表皮葡萄球菌能产生一种粘液样物质(Slime)粘附于某些介

质表面, 这就是细菌生长的另外一种形式——生物膜(Biofilm)。1988 年 Shapiro 提出细菌是可以相互协调, 具有群体行为的多细胞群体生物, 表现出比单个浮游细胞更强大的致病力和抵抗力, 第一次提出了细菌生物膜的概念^[51]。之后的 20 多年里, 国内外很多细菌学家围绕着生物膜的形成过程、结构、生理生化特点和信号转导系统等方面展开研究, 以期待发现和解决细菌生物膜引起的耐药性及持续性感染问题。细菌 TCSTS 在调控生物膜形成过程中发挥着重要的作用, 因此, 选取 TCSTS (尤其是细菌生长繁殖所必需的 TCSTS, 如 YycFG 等^[52-53])作为治疗生物膜靶点的研究成为人类战胜耐药性细菌的新途径。

生物膜的形成和调控是一个多因素共同作用的结果, 可分为 Ica 依赖途径(通过调控 *ica* 操纵子影响 PIA 的合成而调控生物膜)和 Ica 非依赖途径(通过影响细胞间蛋白或核酸而调控生物膜的形成, 如 Aap、Embp 和 eDNA 等)。*ica* 操作子包括 4 个开放读码框架(*icaADBC*)和 1 个反方向的调节基因(*icaR*), 其编码的蛋白是 PIA (细胞间多糖粘附素)合成的关键酶(图 2)。Martina Ulrich 等^[32]采用 pBT2 构建金黄色葡萄球菌(ATCC 35556) *srrAB* 的突变株, RT-PCR 显示, 在厌氧条件下 *srrAB* 突变株 IcaA 的表达显著低于野生株, 点杂交试验(Dot blot assay)显示, *srrAB* 突变株中几乎没有 PIA 的表达, *srrAB* 回复株 *icaA* 的表达及 PIA 的合成与野生株相似, EMSA 进一步显示, 磷酸化的 SrrA 与 *icaA* 上游 100 bp 核苷酸序列优先结合, 提示在厌氧条件下 SrrAB 能够上调 *icaA* 的表达, 促进 PIA 的合成, 从而增强生物膜的形成(图 2), 但在有氧条件下无此现象。除 SrrAB 外, 其他的转录调控因子也参与 *icaA* 的调控(如 IcaR), IcaR 属于 TetR 家族, 具有抑制 *icaA* 转录的特点。有研究表明^[54], 在敲除表皮葡萄球菌(*S. epidermidis* O47) *icaR* 的突变株中, PIA 的合成

较野生株显著增强, 但在该试验中未发现 SrrA 调控 *icaR* 的数据。

6 葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 调控机制的临床意义

为评价葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 调控机制的临床意义, Throup J. P. 等^[4]选取 CD1 小鼠, 建立鼠肾盂肾炎感染模型。将金黄色葡萄球菌过夜培养物用 PBS 洗 2 次, 调 A_{600} 至 0.2, 尾静脉注射 0.2 mL 菌液, 5 d 后处死小鼠, 取双侧肾脏匀浆后做菌落计数, 比较菌株在小鼠肾脏的定殖生长能力。结果发现, *srrAB* 突变株较野生株低 3 个 Log 值(降低约 1 000 倍)。Pragman A. A. 等^[30]建立了新西兰白兔心内膜感染模型, 从左颈动脉放置动脉导管至左心室, 保持 2 h 后取出导管并缝合切口, 立即静脉注射 1 mL 菌液(金黄色葡萄球菌经 Todd-Hewitt 培养至稳定期, PBS 洗 2 次, 调 A_{600} 至 0.6), 96 h 后处死动物, 解剖后做主动脉瓣赘生物计数, 并将主动脉瓣匀浆后做菌落计数。结果显示: 在 6 个动物心脏中, 野生株中发现 1 个赘生物, 细菌载量为 40 CFU; *tst* 过表达株中发现 6 个赘生物, 平均细菌载量为 2.0×10^7 CFU/心; 在 *tst* 过表达的基础上构建 *srrAB* 的过表达株, 结果发现 3 个赘生物, 平均细菌载量为 2.0×10^5 CFU/心, 提示过表达 TSST-1 导致金黄色葡萄球菌的毒力增强, 然而, 过表达 SrrAB 反而抑制 TSST-1、SPA 和 RNAlII 的表达, 与 *tst* 过表达株相比, 毒力降低约 100 倍。Martina Ulrich 等^[32]为了评估金黄色葡萄球菌 SrrAB 调控 *ica* 转录的生物学效应, 采用人中性粒细胞做吞噬试验。结果显示, 在厌氧条件下 *srrAB* 突变株 PIA 合成量较野生株显著降低, 抵抗中性粒细胞的杀伤能力也减弱, *srrAB* 回复株抵抗力得到相应回复。在有氧条件下, *srrAB* 突变株与野生株的抗吞噬能力差异无统计学意义, 表皮葡萄球菌与金黄色葡萄球菌类似, 提示

PIA 能抵抗中性粒细胞的非氧依赖性杀伤作用(如防御素类物质),但不能抵抗氧依赖的杀伤作用(如 ROIs)。

7 表皮葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 可能的调控机制

本实验室采用温度敏感性质粒 pMAD 敲除了 *S. epidermidis* 1457 *srrA* 基因(本内容尚未发表)。结果显示, *srrA* 突变株与野生株比较,在有氧条件下生长明显滞后, PIA 合成减少,生物膜形成能力降低,对常用抗生素的敏感性无改变,激光共聚焦显微镜显示 *srrA* 突变株形成的生物膜较野生株薄, *srrA* 回复株中生长及生物膜形成能力均与野生株类似。在厌氧条件下生长滞后更为明显。采用 qRT-PCR 对影响生物膜形成的主要基因进行转录谱分析,发现 *srrA* 突变株中 *icaR* 上调、*icaA* 下调,参与呼吸代谢的多个基因均下调,此结果可以解释 *srrA* 突变株生物膜降低、生长滞后的原因,但未发现厌氧条件下 *srrA* 突变株生物膜增强的证据,提示表皮葡萄球菌 SrrAB 调控生长及生物膜形成的机制与金黄色葡萄球菌有所不同,具体差异还在进一步研究中。

8 结语与展望

在有氧及厌氧条件下,葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 调控细菌的生长代谢及毒力因子的表达,虽然金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 在基因水平和蛋白水平的同源性较高,但具体的调控机制还是有所不同,随着两者调控机制差异上的逐步揭示与完善,从分子水平解释了金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌在致病性上各自的特点,为临床上诊治及预防葡萄球菌感染奠定了一定的理论基础。尽管如此,葡萄球菌 TCSTS-SrrAB 仍存在以下有待解决的问题:(1) SrrAB 晶体结构的解析;(2) SrrA 具体磷酸化

位点的确定;(3) SrrAB 作为抗葡萄球菌生物膜靶点的实验动物研究及药物开发等。

参考文献

- [1] Gomes F, Teixeira P, Cerca N, et al. Virulence gene expression by *Staphylococcus epidermidis* biofilm cells exposed to antibiotics[J]. Microbial Drug Resistance, 2011, 17(2): 191–196.
- [2] Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces[J]. Infection and Immunity, 1982, 37(1): 318–326.
- [3] Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(1): e1000715.
- [4] Throup JP, Zappacosta F, Lunsford RD, et al. The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function[J]. Biochemistry, 2001, 40(34): 10392–10401.
- [5] Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis[J]. The Lancet, 2003, 361(9358): 681–689.
- [6] Belcheva A, Golemi KD. A close-up view of the *VraSR* two-component system: a mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(18): 12354–12364.
- [7] Belcheva A, Verma V, Golemi KD. DNA-binding activity of the vancomycin resistance associated regulator protein *VraR* and the role of phosphorylation in transcriptional regulation of the *vraSR* operon[J]. Biochemistry, 2009, 48(24): 5592–5601.
- [8] Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(4): 1113–1123.
- [9] Nakano MM, Zuber P, Glaser P, et al. Two-component regulatory proteins ResD-ResE are

- required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(13): 3796–3802.
- [10] Nakano MM, Zuber P. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*)[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1998, 52: 165–190.
- [11] Sun G, Sharkova E, Chesnut R, et al. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(5): 1374–1385.
- [12] Alexeeva S, de Kort B, Sawers G, et al. Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4934–4940.
- [13] Vetter SM, Schlievert PM. The two-component system *Bacillus* respiratory response A and B (BrrA-BrrB) is a virulence factor regulator in *Bacillus anthracis*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(25): 7343–7352.
- [14] Zhu T, Lou Q, Wu Y, et al. Impact of the *Staphylococcus epidermidis* LytSR two-component regulatory system on murein hydrolase activity, pyruvate utilization and global transcriptional profile[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10(1): 287.
- [15] Lou Q, Zhu T, Hu J, et al. Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11(1): 146.
- [16] Vuong C, Gerke C, Somerville GA, et al. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Journal of Infectious Disease*, 2003, 188(5): 706–718.
- [17] Gill SR, Fouts DE, Archer GL, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(7): 2426–2438.
- [18] He N, Hu J, Liu H, et al. Enhancement of vancomycin activity against biofilms by using ultrasound-targeted microbubble destruction[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(11): 5331–5337.
- [19] Hu J, Xu T, Zhu T, et al. Monoclonal antibodies against accumulation-associated protein affect EPS biosynthesis and enhance bacterial accumulation of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20918.
- [20] Zhang YQ, Ren SX, Li HL, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228)[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(6): 1577–1593.
- [21] 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]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(1): 45–53.
- [22] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin[J]. *The Lancet*, 1997, 350(9092): 1670–1673.
- [23] Baba T, Bae T, Schneewind O, et al. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 190(1): 300–310.
- [24] Duthie ES, Lorenz LL. Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity[J]. *Journal of General Microbiology*, 1952, 6(1/2): 95–107.
- [25] Puthiyaveetil S, Allen JF. Chloroplast two-component systems: evolution of the link between photosynthesis and gene expression[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, 276(1665): 2133–2145.
- [26] Stock A, Koshland DE, Stock J. Homologies between the *Salmonella typhimurium* Che Y protein and proteins involved in the regulation of chemotaxis, membrane protein synthesis, and sporulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985, 82(23): 7989–7993.

- [27] 秦智强, 钟扬, 张健, 等. 表皮葡萄球菌双组分调控系统的生物信息学分析[J]. 科学通报, 2004, 49(10): 948–952.
- [28] 秦智强, 瞿涤. 细菌双组分信号转导系统[J]. 国外医学(微生物学分册), 2003, 26(5): 16–17.
- [29] Mascher T, Helmann JD, Uden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006, 70(4): 910–938.
- [30] Pragman AA, Yarwood JM, Tripp TJ, et al. Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(8): 2430–2438.
- [31] 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.
- [32] Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, et al. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(5): 1276–1287.
- [33] Pragman AA, Schlievert PM. Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: the need for *in vivo* analysis of virulence factor regulation[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2004, 42(2): 147–154.
- [34] Pragman AA, Herron-Olson L, Case LC, et al. Sequence analysis of the *Staphylococcus aureus* *srrAB* loci reveals that truncation of *srrA* affects growth and virulence factor expression[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(20): 7515–7519.
- [35] Fergie J, Purcell K. The epidemic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in children: effects on the community, health systems, and physician practices[J]. Pediatric Annals, 2007, 36(7): 404–412.
- [36] Siebert WT, Moreland N, Williams TW. Synergy of vancomycin plus cefazolin or cephalothin against methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*[J]. Journal of Infectious Diseases, 1979, 139(4): 452–457.
- [37] Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, et al. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis[J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(3): 814–825.
- [38] Menestrina G, Dalla SM, Prévost G. Mode of action of β -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal α -hemolysin family[J]. Toxicon, 2001, 39(11): 1661–1672.
- [39] Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA[J]. Nature Medicine, 2007, 13(12): 1510–1514.
- [40] Kaito C, Saito Y, Nagano G, et al. Transcription and translation products of the cytolsin gene *psm-mec* on the Mobile Genetic Element SCCmec regulate *Staphylococcus aureus* virulence[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(2): e1001267.
- [41] Cheung GY, Rigby K, Wang R, et al. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(10): e1001133.
- [42] 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]. European Journal of Cell Biology, 2010, 89(1): 103–111.
- [43] Christner M, Franke GC, Schommer NN, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin[J]. Molecular Microbiology, 2010, 75(1): 187–207.
- [44] Kuehl R, Al-Bataineh S, Gordon O, et al. Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by *luxS* repression[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(10): 4159–4166.
- [45] Kies S, Vuong C, Hille M, et al. Control of

- antimicrobial peptide synthesis by the agr quorum sensing system in *Staphylococcus epidermidis*: activity of the lantibiotic epidermin is regulated at the level of precursor peptide processing[J]. Peptides, 2003, 24(3): 329–338.
- [46] Vuong C, Dürr M, Carmody AB, et al. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins[J]. Cellular Microbiology, 2004, 6(8): 753–759.
- [47] Meier S, Goerke C, Wolz C, et al. σ^B and the σ^B -dependent arlRS and yabJ-spoVG loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(9): 4562–4571.
- [48] Roberts C, Anderson KL, Murphy E, et al. Characterizing the effect of the *Staphylococcus aureus* virulence factor regulator, SarA, on log-phase mRNA half-lives[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(7): 2593–2603.
- [49] Ji Y, Yu C, Liang X. Transcriptomic analysis of ArlRS two-component signaling regulon, a global regulator, in *Staphylococcus aureus*[J]. Methods in Enzymology, 2007, 423: 502–513.
- [50] Mainiero M, Goerke C, Geiger T, et al. Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(3): 613–623.
- [51] Shapiro JA. Bacteria as multicellular organisms[J]. Scientific American, 1988, 258(6): 82–89.
- [52] Pan B, Huang RZ, Han SQ, et al. Design, synthesis, and antibiofilm activity of 2-arylimino-3-aryl-thiazolidine-4-ones[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2010, 20(8): 2461–2464.
- [53] Huang RZ, Zheng LK, Liu HY, et al. Thiazolidione derivatives targeting the histidine kinase YycG are effective against both planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus epidermidis*[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2012, 33(3): 418–425.
- [54] Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1367–1378.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。