

脑膜炎大肠杆菌 K1 株 *ppk1* 基因致病机制初探

彭亮¹ 赵铁¹ 罗文英¹ 付美芹¹ 曹虹^{1*} 黄胜和²

(1. 南方医科大学 公共卫生与热带医学学院微生物学系 广东 广州 510515)

(2. 美国南加州大学 洛杉矶儿童医院 美国 洛杉矶 90027)

摘要:【目的】构建脑膜炎大肠杆菌 K1 (*Escherichia coli*, *E. coli* K1)株 E44 的聚磷酸盐激酶 1 (Polyphosphate kinase 1, PPK1)基因敲除株, 并对其生物学功能进行初步研究, 为明确 *ppk1* 基因在 *E. coli* K1 株致脑膜炎机制中的作用奠定基础。【方法】利用自杀质粒 pCVD442 及基因同源重组技术敲除 *E. coli* K1 株 E44 中的 *ppk1* 基因, 构建 *ppk1* 缺失突变株 $\Delta ppk1$; 体外比较野生株和突变株在低营养及氧化压力情况下的生存能力; 考察二者对人脑微血管内皮细胞(Human brain microvascular endothelial cells, HBMEC)的黏附能力; 通过测定乳酸脱氢酶(Lactic dehydrogenase, LDH)释放活性, 比较野生株和突变株对 HBMEC 的损伤效应。【结果】PCR 及序列分析证实, 突变株缺失全长 *ppk1* 基因。与野生株 E44 相比, *ppk1* 突变株 $\Delta ppk1$ 在低营养环境中氧化刺激条件下的生存能力明显降低。相对于 E44, $\Delta ppk1$ 对 HBMEC 的黏附能力减弱。与 HBMEC 孵育后, 突变株孵育组 HBMEC 的 LDH 释放活性明显低于野生株孵育组。【结论】*ppk1* 对 *E. coli* K1 株 E44 在低营养环境中的生存、抵抗氧化压力, 以及黏附 HBMEC 和对细胞的毒性损伤有重要作用。

关键词: 聚磷酸盐激酶 1, 大肠杆菌 K1 株, 脑膜炎, 突变株

ppk1 gene relates with the pathogenesis of meningitis infected by *E. coli* K1

PENG Liang¹ ZHAO Tie¹ LUO Wen-Ying¹ FU Mei-Qin¹ CAO Hong^{1*}
HUANG Sheng-He²

(1. Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30972637); 南方医科大学公卫学院院长基金项目(No. GW201101)

*通讯作者: Tel: 86-20-61648723; 信箱: gzhcao@fimmu.com

收稿日期: 2011-08-05; 接受日期: 2011-09-30

(2. Saban Research Institute, Childrens Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA 90027, USA)

Abstract: [Objective] To construct the polyphosphate kinase 1 gene deletion mutant of *Escherichia coli* (*E. coli*) K1 strain E44 and explore the role of *ppk1* in the pathogenesis of meningitis *E. coli* K1. **[Methods]** The *ppk1* gene was knocked out from the genome of *E. coli* K1 strain E44 by using suicide vector pCVD442 and homologous recombination, and the mutant was named $\Delta ppk1$. Then the survival abilities of E44 and $\Delta ppk1$ in poor nutrition condition and oxidative stress were examined. The ability of the mutant adhering to human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) was also compared with that of the wild type. The cytogenetic toxic effects induced by $\Delta ppk1$ and E44 were tested by using the lactic dehydrogenase testing kit. **[Results]** The *ppk1* gene of the mutant had been knocked out and was confirmed by PCR and DNA sequencing. The *ppk1* deletion mutant showed to be defective in adhesion ability to HBMEC and survival abilities under poor nutrition condition and oxidative stress. The damaging effects of HBMEC induced by $\Delta ppk1$ were significantly less than that induced by E44. **[Conclusion]** The *ppk1* gene plays an important role in *E. coli* K1 surviving in low nutrition and oxidative stress condition, adhering to HBMEC and inducing cell injury.

Keywords: Polyphosphate kinase 1, *Escherichia coli* K1, Meningitis, Mutant

细菌性脑膜炎是中枢神经系统常见的、严重的感染性疾病,尤其对于免疫系统尚不完善的新生儿来说,发病率和死亡率都比较高。引发新生儿细菌性脑膜炎的常见病原菌有大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、B族溶血性链球菌、单核增多李斯特菌、变形杆菌、流感杆菌等。其中大肠杆菌是最常见的导致新生儿脑膜炎的革兰阴性菌,且以有K1荚膜多糖的K1株占绝大多数。尽管针对脑膜炎已开展了许多研究,但其具体的致病机制仍有许多未知之处,给*E. coli* K1引发的新生儿脑膜炎的治疗或者药物开发造成许多困难。

聚磷酸盐激酶 1 (Polyphosphate kinase 1, PPK1)是*E. coli*内一种与聚磷酸盐合成有关的激酶,负责可逆性催化ATP脱磷酸残基生成ADP及聚磷酸盐,而聚磷酸盐是生物体内普遍存在的一种线性无机盐聚合物^[1-2]。PPK1由*ppk1*基因编码。研究发现,*ppk1*与一些细菌的毒力或者压力适应性相关。*E. coli* K-12株缺失*ppk1*基因后,对温度、高渗等条件刺激的抵抗力下降^[3];敲除绿

脓杆菌*ppk1*基因后会导致细菌菌膜形成能力减弱^[4];伤寒沙门氏菌的*ppk1*缺失株对肠上皮细胞侵袭能力降低^[5]。但*ppk1*在*E. coli* K1株致脑膜炎中的作用和机制并不清楚。本研究主要根据基因同源重组的原理,利用自杀质粒构建*E. coli* K1株的*ppk1*缺失株,并对其功能进行初步探索,为深入研究*E. coli* K1致脑膜炎的相关机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及细胞: RS218株(从临床新生儿脑膜炎患者脑脊液中分离的大肠杆菌K1株, E44为具有利福平抗性的RS218株^[6])、DH5 α 和SM10 λ pir及自杀质粒pCVD442由本实验室保存;T载体购自大连TaKaRa公司。人脑微血管内皮细胞(Human brain microvascular endothelial cells, HBMEC)由美国约翰霍普金斯大学医学院Kwang Sik Kim教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购于大连TaKaRa, 细菌全基因组提取试剂盒、质粒抽提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒、DNA marker、琼脂糖购于广州东盛, 其余试剂为国产分析纯。胎牛血清、培养基DMEM和胰酶购于美国Hyclone。细胞培养箱, 德国Heraeus; 酶标仪, 美国Bio-Rad; 分光光度计, 上海美谱达。

1.2 方法

1.2.1 *ppk1*基因敲除株的构建: 方法参考文献[7]。根据已测定的E44染色体上的*ppk1*基因及其两侧的DNA序列, 设计合成2对引物PKE-S1、PKE-B1及PKE-B2、PKE-X2(表1), 以E44染色体为模板, 用PCR分别扩增*ppk1*基因两端1.14 kb的A片段和1.28 kb的B片段。PCR扩增条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30个循环; 72 °C 10 min。将扩增得到的A、B片段分别连接到pGEM-T载体上。利用共同的*Bam*H I 位点将两个片段连接起来成为AB片段(2.42 kb), 然后将其亚克隆至自杀质粒pCVD442中, 构建重组质粒pCVDPK1; 将其转化到自杀质粒允许宿主菌SM10 λ pir, 并根据接合性转导的原理将自杀质粒pCVDPK1从SM10 λ pir转到E44中, 通过氨苄敏感性及PCR方法筛选出*ppk1*基因缺失株(自杀质粒上携带的缺少*ppk1*的侧翼序列连接片段AB, 会与E44染色体发生同源重组, 替换掉E44

上的同源片段, 从而使*ppk1*被剔除), *ppk1*基因缺失株命名为 $\Delta ppk1$ 。利用重组片段两端引物PKE-S1、PKE-X2以及*ppk1*上下游引物PKE5、PKE3进行敲除株的PCR鉴定, 并进行测序鉴定。

1.2.2 低营养条件下的生存能力比较: 将E44、 $\Delta ppk1$ 按1:100比例加入含有100 mg/L利福平的Luria-Bertani (LB)液体培养基中, 37 °C静置培养过夜。将培养过夜的细菌接种至低营养MOPS (Potassium morpholinopropane sulfonate, MOPS) 液体培养基^[8]。从中取出1 mL菌液10 000 r/min离心2 min, 收集细菌并用PBS重悬。用无菌PBS将细菌洗3次后稀释1倍测 OD_{600} , 调 OD_{600} 至约0.05, 并以之为始点, 每隔2 h测 OD_{600} 值并记录。实验重复3次并取均数作出生长曲线图。

1.2.3 氧化压力下的生存率比较: 将 E44、 $\Delta ppk1$ 按 1:100 比例加入含有 100 mg/L 利福平的 Luria-Bertani (LB)液体培养基中, 37 °C 静置培养过夜。将细菌 10 000 r/min 离心 2 min, 收集细菌并用 PBS 重悬。测 OD_{600} 并调至约 1.0。加入 H_2O_2 至终浓度分别为 0、10、20、30、40、50 mmol/L, 然后将样品置于 37 °C 孵育 15 min。孵育结束后取 100 μ L 样品做 10 倍梯度稀释并涂布于含利福平的 LB 平板。将平板倒置于 37 °C 培养箱培养过夜, 计数平板菌落数。实验重复 3 次并取均数作出生存率曲线图。生存率计算方法: (接受处理后生存的细菌数/处理前的细菌数) \times 100%。

表1 本章所用引物 Table 1 Oligonucleotides used in this study			
Primer	Strand	Sequence (5'→3')	Restriction site
PKE-S1	+	AGGTCGACGTGCATGCCATTGCGCAC	<i>Sal</i> I
PKE-B1	—	TCCGATCCCATTACCACTTTTACTCC	<i>Bam</i> H I
PKE-B2	+	CTGGATCCCCCTATGCCAATACACG	<i>Bam</i> H I
PKE-X2	—	GCTCTAGATCGTCGAGTTTAATCGC	<i>Xba</i> I
PKE5	+	ATGGGTCAGGAA AAGCTATAC	
PKE3	—	TTATTCAGGTTGTTTCGAGTG	

1.2.4 细菌黏附实验:黏附实验参考文献[9]。实验前48 h将HBMEC培养于24孔板内,并生长汇合至单层。细菌接种物用不含抗生素的培养基重悬。以每孔 1×10^7 的细菌量放入培养HBMEC细胞的24孔板内(使细胞感染倍数为100),在37 °C、5% CO₂培养箱中共同孵育120 min。为计算黏附细胞的细菌数,细胞用培养基洗3次,加入100 μ L 0.5% Triton X-100裂解细胞(此浓度Triton X-100在0.5 h之内不会影响细菌活性),孵育8 min后,立即加入50 μ L蒸馏水。在溶解细胞之前的孵育和清洗阶段,单层细胞都要保持完整。反复吹打后吸出样品,做梯度稀释(10^{-1} – 10^{-4})后涂羊血平板计数菌落数。黏附率=黏附细菌数/孵育细菌数 $\times 100\%$,重复3次取平均值。

1.2.5 乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)释放活性测定:大肠杆菌K1株体外诱导HBMEC的细胞毒效应可以通过测定释放到细胞培养基的LDH酶活性来表示^[10]。将待测菌静置于37 °C培养至稳定期,用无菌PBS稀释后,取约 10^7 细菌接入汇合的HBMEC单层中。37 °C孵育2、4、6 h后,取上清按乳酸脱氢酶检测试剂盒LD-L50 Kit (Sigma)说明书测HBMEC的LDH释放活性。阴性对照为不加菌各时间点LDH本底活性,总LDH活性为HBMEC全细胞裂解后释放的LDH活性。结果表示为实验组LDH活性/总LDH活性 $\times 100\%$ 。LDH释放活性的大小间接反应了细胞膜的受损程度。

1.2.6 统计学分析:实验重复3次取均值。数据表示为均值 \pm 标准差。两组间比较采用 t 检验,多重比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,数据分析采用SPSS 13.0软件。

2 结果

2.1 *ppk1* 缺失减弱了细菌在营养缺乏条件下的生长能力

由图1的生长曲线可以得知,野生株 E44 在

低营养的 MOPS 培养基中生长能力明显强于基因敲除株 $\Delta ppk1$ 。约 2–3 h 野生株进入对数生长期,14 h 后进入稳定生长期,而敲除株的生长曲线没有太大变化,一直维持在一个较低的水平。同时我们还测定了二者在营养丰富的 LB 培养基中的生长曲线。结果发现 *ppk1* 缺失并不影响 *E. coli* K1 株 E44 在营养丰富的环境中的生长能力,野生株与敲除株二者的生长曲线基本保持一致,同样约 2–3 h 进入对数生长期,14 h 后进入稳定生长期(图 2)。

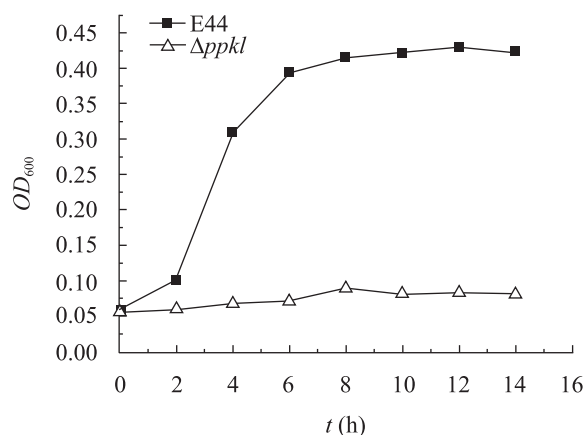


图1 野生株和敲除株在 MOPS 培养基中的生长曲线
Fig. 1 Survival curves of *E. coli* E44 and $\Delta ppk1$ in MOPS medium

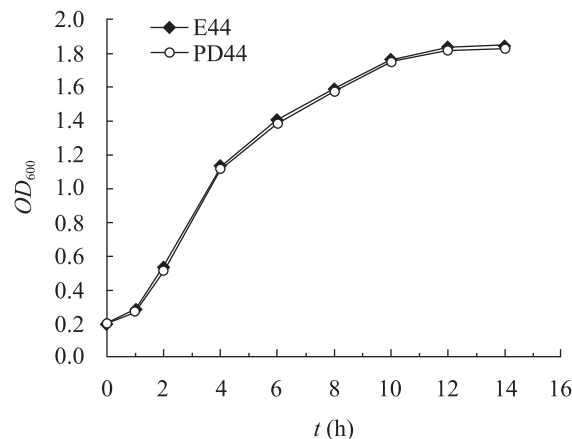


图2 野生株和敲除株在 LB 培养基中的生长曲线
Fig. 2 Survival curves of *E. coli* E44 and $\Delta ppk1$ in LB medium

2.2 *ppk1* 缺失减弱了细菌对氧化刺激的抵抗能力

由图 3 的生存率曲线可以看出, 给予 10–50 mmol/L 五个浓度 H_2O_2 的氧化刺激后, *ppk1* 敲除株在各个浓度下的生存率均比野生株要低。该结果显示 *ppk1* 基因对于 *E. coli* K1 抵抗氧化刺激有重要作用。

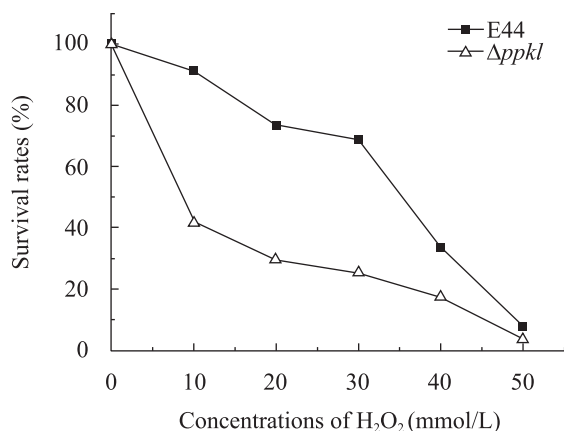


图 3 野生株和敲除株在氧化压力下的生存率比较
Fig. 3 Survival rates of *E. coli* E44 and $\Delta ppk1$ under oxidation stress

2.3 *ppk1* 缺失降低了细菌对 HBMEC 的黏附能力

根据黏附率计算公式计算出各组细菌对于 HBMEC 的黏附率, 并进行统计学分析后发现, 野生株 E44 黏附率为 $(9.80 \pm 0.95)\%$, 敲除株 $\Delta ppk1$ 为 $(3.87 \pm 0.68)\%$, 阴性对照组 DH5 α 为 $(0.08 \pm 0.03)\%$, 野生株对于 HBMEC 的黏附率明显高于敲除株组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 如图 4 所示。

2.4 *ppk1* 缺失降低了细菌对 HBMEC 的损伤效应

细菌与 HBMEC 孵育后, 野生株组 HBMEC 在 2、4、6 h 的 LDH 释放活性分别为 17.83 ± 1.61 、 22.80 ± 1.23 、 31.37 ± 1.72 , 而 $\Delta ppk1$ 孵育组则降低至 14.13 ± 1.16 、 18.55 ± 0.96 、 26.19 ± 1.70 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5)。结果提示敲除 *ppk1*

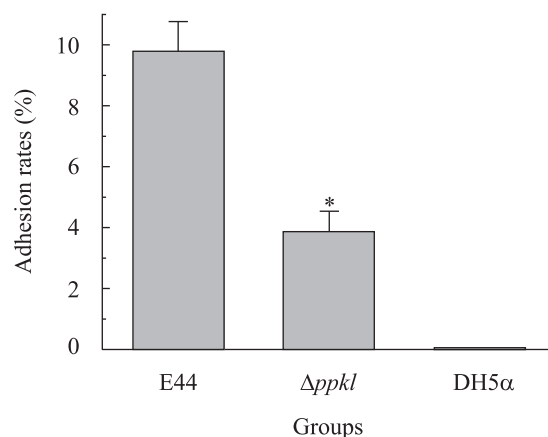


图 4 野生株和敲除株对 HBMEC 黏附率的比较
Fig. 4 Adhesion rates of *E. coli* E44 and $\Delta ppk1$
Note: *: $P < 0.05$.

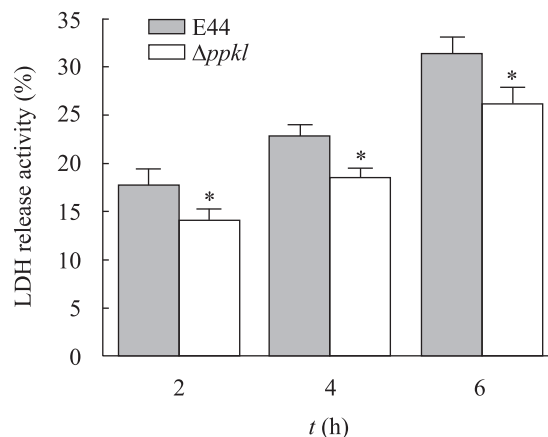


图 5 HBMEC 与野生株、敲除株孵育后的 LDH 释放活性比较

Fig. 5 The cytotoxicity effect on HBMEC induced by E44 and $\Delta ppk1$
Note: *: $P < 0.05$.

基因后, 大肠杆菌 E44 对细胞膜损伤作用减弱, 致使 HBMEC 的 LDH 释放减少。

3 讨论

ppk1 基因在多种微生物体内是一个保守的基因。由于在哺乳动物细胞内没有发现 PPK1 同源物的存在, 使其成为一个药物开发的潜在靶位^[11]。值得注意的是, 在一些细菌内不仅有 PPK1 还有 PPK2 的存在, 同样也与聚磷酸盐的合成有

关,负责可逆性催化 GTP 脱磷酸残基形成 GDP 和聚磷酸盐^[12-13]。有学者发现,聚磷酸盐可以影响某些调控基因比如 *rpos* 的表达,而这些调控基因可能参与了多个与致病菌环境压力适应性或毒力相关的基因表达调控^[14]。

E. coli K1 跨越人体血脑屏障最终引发脑膜炎有几个关键性的环节:高浓度的菌血症、细菌黏附、侵袭 HBMEC、诱导 HBMEC 的细胞骨架重排及相关信号通路的激活,最终成功穿越 HBMEC^[6]。HBMEC 是人体血脑屏障的主要组成部分,黏附于细胞表面是细菌进入 HBMEC 的第一步,然后通过 Zipper 机制进入细胞,并以空泡的形式穿越 HBMEC。本研究发现,当敲除 *ppk1* 基因后,大肠杆菌 K1 株 E44 黏附 HBMEC 的能力明显下降。而通过检测乳酸脱氢酶的释放活性我们发现, *ppk1* 基因缺失株与 HBMEC 孵育后, LDH 释放明显减少,这提示了该组细胞膜受损程度较野生株孵育组减轻,致病菌对细胞的毒性效应降低。

在临床细菌性脑膜炎患儿的脑脊液中,常可分离培养出病原菌。而致病菌突破血脑屏障后,进入蛛网膜下腔,在相对低营养的脑脊液中生长存活也与其引发脑膜炎有重要关系^[7]。另外, *E. coli* K1 其致脑膜炎过程中也有可能面临其他一些可能的营养缺乏的环境。为了检测 *ppk1* 是否与 *E. coli* K1 在低营养环境下的生长有关,我们测定了野生株 E44 及敲除株 $\Delta ppk1$ 在营养限制性的 MOPS 培养基中的生长曲线。结果发现 *ppk1* 基因缺失后, *E. coli* K1 株 E44 在低营养环境中的生长受到明显抑制。在机体产生免疫反应的过程中,吞噬细胞吞噬细菌并利用氧化作用将其杀伤是重要的防御机制。故 *E. coli* K1 株抵抗住可能存在的氧化压力是其进一步诱发脑膜炎的条件之一。通过分析比较野生株和敲除株在不同浓度氧化剂 H_2O_2 刺激下的生存率,我们还发现 *ppk1*

基因在 *E. coli* K1 株 E44 抵抗氧化压力的过程中扮演了重要角色。

本文通过构建 *E. coli* K1 *ppk1* 基因缺失株,对其在低营养培养基中的生存能力,以及体外黏附 HBMEC 能力和对 HBMEC 的毒性作用进行了考察。结果表明 *ppk1* 基因缺失后将导致 *E. coli* K1 在低营养环境以及氧化压力中的生存能力降低,对 HBMEC 的黏附能力和损伤作用也减弱。这些结果为我们下一步进行其他体内外实验,并为最终阐明 PPK1 在 *E. coli* K1 致新生儿脑膜炎中的相关机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Brown MRW, Kornberg A. The long and short of it-polyphosphate, PPK and bacterial survival[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2008, 33(6): 284-290.
- [2] Hoffman JA, Wass C, Stins MF, et al. The capsule supports survival but not traversal of *Escherichia coli* K1 across the blood-brain barrier[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(7): 3566-3570.
- [3] Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(5): 1394-1400.
- [4] Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9636-9641.
- [5] Kim KS, Rao NN, Fraley CD, et al. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(11): 7675-7680.
- [6] Zou YM, He LN, Chi F, et al. Involvement of *Escherichia coli* K1 *ibeT* in bacterial adhesion that is associated with the entry into human brain microvascular endothelial cells[J]. Medical

- Microbiology and Immunology, 2008, 197(4): 337–344.
- [7] Chi F, Wang Y, Gallaher TK, et al. Identification of IbeR as a stationary-phase regulator in meningitic *Escherichia coli* K1 that carries a loss-of-function mutation in *rpoS*[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009, 2009: 520283.
- [8] Kuroda A, Tanaka S, Ikeda T, et al. Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(25): 14264–14269.
- [9] Huang SH, He LN, Zhou YH, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses meningitic *E. coli* K1 penetration across human intestinal epithelial cells *in vitro* and protects neonatal rats against experimental hematogenous meningitis[J]. International Journal of Microbiology, 2009, 2009: 647862.
- [10] Nagai T, Abe A, Sasakawa C. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(4): 2998–3011.
- [11] Tzeng CM, Kornberg A. Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens[J]. Molecular Microbiology, 1998, 29(1): 381–382.
- [12] Ishige K, Zhang HY, Kornberg A. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(26): 16684–16688.
- [13] Gangaiah D, Liu Z, Arcos J, et al. Polyphosphate kinase 2: a novel determinant of stress responses and pathogenesis in *Campylobacter jejuni*[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12142.
- [14] Shiba T, Tsutsumi K, Yano H, et al. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(21): 11210–11215.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。