



## 专论与综述

## SrrAB 在葡萄球菌生长代谢及存活中的作用研究进展

孟媛媛<sup>1</sup> 乾莲<sup>1</sup> 郭姝蓉<sup>1</sup> 武有聪<sup>\*1,2</sup> 瞿涤<sup>3</sup>

1 大理大学基础医学院病原生物学综合实验室 云南 大理 671000

2 大理大学基础医学院医学微生物学及免疫学教研室 云南 大理 671000

3 复旦大学教育部/卫健委医学分子病毒学重点实验室 上海 200032

**摘要:** 双组分信号转导系统 SrrAB 能够感应外界环境中氧浓度的变化, 通过磷酸化水平的改变来调控靶基因的转录, 进而影响葡萄球菌的多种生物学特性。研究发现 SrrAB 与葡萄球菌的毒力、生物膜的形成密切相关, 而且有氧及厌氧条件下的调控机制不尽相同。然而, SrrAB 与葡萄球菌的生长、代谢及其在病原体-宿主互作中的机制尚不清楚。结合课题组研究, 本文就近年来 SrrAB 在葡萄球菌生长、代谢及其在葡萄球菌与宿主固有免疫细胞相互作用中的研究进展进行综述, 为控制葡萄球菌引起的感染提供理论依据。

**关键词:** 双组分信号转导系统, SrrAB, 生长代谢, 葡萄球菌

Role of SrrAB in the growth, metabolism and viability of *Staphylococcus*: a reviewMENG Yuanyuan<sup>1</sup> QIAN Lian<sup>1</sup> GUO Shurong<sup>1</sup> WU Youcong<sup>\*1,2</sup> QU Di<sup>3</sup>

1 Integrated Laboratory of Pathogenic Biology, College of Preclinical Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

2 Department of Medical Microbiology and Immunology, College of Preclinical Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

3 Key Laboratory of Medical Molecular Virology of MOE/MOH, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract:** The two-component signal transduction system SrrAB can sense the change of oxygen concentration in the external environment, affect the transcription of target genes through the change of phosphorylation level, and thus regulate a variety of biological characteristics of *Staphylococcus*. Studies have found that SrrAB is closely related to the virulence and biofilm formation of *Staphylococcus*, and the regulatory mechanisms under aerobic and anaerobic conditions are different. However, the role of SrrAB in staphylococcal growth and metabolism, and its mechanism in pathogen-host interaction remain unclear.

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81660346, 82060380); Dali University Innovation Team of Clinical Molecular Immunology (ZKLX2019105); Open Research Projects of Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Fudan University (FDMV-2019006)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-872-2257101; E-mail: youcongwu@163.com

**Received:** 19-03-2020; **Accepted:** 18-05-2020; **Published online:** 07-08-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(81660346, 82060380); 大理大学临床分子免疫学创新团队项目(ZKLX2019105); 复旦大学分子病毒学重点实验室开放课题(FDMV-2019006)

**\*通信作者:** Tel: 0872-2257101; E-mail: youcongwu@163.com

**收稿日期:** 2020-03-19; **接受日期:** 2020-05-18; **网络首发日期:** 2020-08-07

Combined with the previous research of our laboratory, we reviewed the recent studies of SrrAB on the growth and metabolism in recent years, meanwhile, illuminated the interaction between SrrAB and innate immune cells so as to provide theoretical basis for the control of *Staphylococcus* infection.

**Keywords:** two-component signal transduction system, SrrAB, growth and metabolism, *Staphylococcus*

从病原菌与宿主相互作用的角度来看,细菌突破宿主防御机能侵入体内时,其所处的环境基本全部发生了改变,因此细菌为了生存必然需要一套可以监控外界环境变化并对变化作出相应调节的系统,以便更快地适应环境,进而引起感染,这个系统称为双组分信号转导系统(Two-Component Signal Transduction System, TCS)。TCS 广泛存在于原核细胞型微生物中,其核心是由反应调节蛋白(Response Regulator, RR)和组氨酸蛋白激酶(Histidine Kinase, HK)两个基本组分组成, HK 一般为跨膜蛋白(感受器, Sensor),通过自身磷酸化的形式将外界信号变化传递至胞内,使反应调节蛋白 RR 磷酸化,进而构象发生改变,暴露出 DNA 结合位点,以调控下游靶基因的转录,参与调控细菌的多种生物学功能,如生长代谢、细胞壁合成、毒力、耐药及生物膜形成等<sup>[1]</sup>。

葡萄球菌属(*Staphylococcus*)是引起医院感染的主要病原菌之一。由于其寄生部位的氧气浓度不同,引起的感染机制也不同。为了生存,葡萄球菌要调整代谢方式来应对外界 O<sub>2</sub> 浓度的变化,这时需要葡萄球菌呼吸相关双组分系统 SrrAB (Staphylococcal Respiratory Response)的调控。在 SrrAB 中, SrrB (HK)位于细胞膜上,感受的压力因子是生长环境中的 O<sub>2</sub> 浓度变化; SrrA (RR)位于胞浆中,磷酸化后调控靶基因的转录。金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌 SrrA/SrrB 在氨基酸序列的相似性约为 90%/70%,提示 SrrAB 在上述 2 种菌中的作用不同;金黄色葡萄球菌主要通过产生多种外毒素及侵袭性酶而致病。研究表明<sup>[2-3]</sup>,敲除金黄色葡萄球菌 *srrAB* 后在厌氧条件下突变株生长较野生株滞后,但有氧条件下突变株与野生株生长无差异;另外,有氧条件下,磷酸化的 SrrA 与金黄色葡萄球菌 *txt*、*spa*、*icaR* 和 *RNAlII* 等基因的启

动子区结合,促进毒力基因的转录,表现出毒力因子分泌增强,生物膜形成能力降低的特点;厌氧/低氧(1%-2%)条件下, SrrAB 抑制毒力基因的转录,表现出毒力因子分泌减少,生物膜形成能力增强(*icaR* 为 *icaADBC* 的抑制子)的特点;表皮葡萄球菌一般很少产生毒素,主要在生物材料表面形成生物膜而引起持续性感染。前期研究发现<sup>[4]</sup>,厌氧/低氧条件下 *srrAB* 转录水平较有氧条件显著增高,敲除表皮葡萄球菌(*S. epidermidis* 1457, 生物膜形成阳性) *srrAB* 后,在有氧和厌氧/低氧条件下, *srrAB* 突变株(与呼吸及能量代谢相关的多种基因转录水平发生改变)的生长均明显滞后于野生株,并发现 SrrAB 通过 *ica* 途径调控表皮葡萄球菌生物膜形成,影响生物膜内细菌的存活,而且厌氧条件下 *srrAB* 调控作用强于有氧条件。

氧是细胞活动微环境的基本成分,健康人体不同组织中的氧浓度不同(氧百分比范围为 1.5%-19.7%, 1%=1.013 kPa),组织细胞由生理至病理的变化过程中氧浓度也随之变化,在某些感染或坏死组织中氧百分比小于 1% (低氧或厌氧)<sup>[5]</sup>。葡萄球菌能利用氧、硝酸盐或亚硝酸盐作为电子传递链中的电子受体,在有氧或厌氧(低氧)条件下均能生长,这与 SrrAB 的作用关系密切<sup>[6]</sup>。不仅如此,葡萄球菌 SrrAB 通过多种机制降解吞噬细胞呼吸暴发产生的反应性氧中间产物(Reactive Oxygen Species, ROS)和反应性氮中间产物(Reactive Nitrogen Species, RNS),以逃逸宿主固有免疫系统的攻击,这在葡萄球菌的致病性中发挥重要作用。然而,有关 SrrAB 在葡萄球菌-宿主互作中的机制尚不清楚,结合课题组研究工作,本文就近年来 SrrAB 在葡萄球菌生长代谢、细胞存活及其在葡萄球菌与宿主固有免疫细胞相互作用中的研究进展进行综述。

## 1 TCS-SrrAB 在葡萄球菌生长及代谢中的作用

葡萄球菌 SrrAB 通过调控有氧呼吸及厌氧代谢相关蛋白的基因转录而影响细菌的生长、代谢及毒力因子的表达。Wu 等<sup>[4]</sup>利用同源重组技术构建了表皮葡萄球菌 *srrAB/srrA* 基因敲除突变株,发现无论在有氧和厌氧条件下, *srrAB/srrA* 突变株的生长明显落后于野生株;基因芯片结果(并经 qRT-PCR 验证)提示,表皮葡萄球菌 *srrAB* 突变株中与生长代谢相关的基因转录水平下调,其中有氧条件下 *ctaAB* (Cytochrome Oxidase Assembly Protein) 和 *qoxABCD* (Quinol Oxidasesubunit)转录水平为野生株的 1/10, 厌氧条件下, *serp0257* (Alcohol Dehydrogenase)、*serp2257* (Acetoin Reductase)、*nrdDG* (Reductase)、*pflBA* (Pyruvate Formate Lyase Activating Enzyme)转录水平为野生株的 1/10;电泳凝胶阻滞试验(Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)显示,磷酸化的 SrrA 蛋白能与 *srrAB*、*qoxB*、*pflBA* 基因的启动子区结合。以上结果提示,表皮葡萄球菌 SrrAB 存在自我调节机制,有氧条件下主要通过 *qoxBACD* 影响细菌的生长,厌氧条件下主要通过 *nrdDG*、*pflBA* 影响细菌的生长。

然而,敲除 SrrAB 导致金黄色葡萄球菌在厌氧条件下生长明显滞后于野生株,但在有氧条件下 *srrAB* 突变株与野生株生长无明显差异<sup>[7]</sup>。在有氧及厌氧条件下,金黄色葡萄球菌 *srrAB* 突变株中发酵的关键酶(乙醇脱氢酶和乳酸脱氢酶)均显著下调<sup>[8]</sup>,这提示 SrrAB 调控金黄色葡萄球菌的生长及代谢不同于表皮葡萄球菌,这可能与两者的基因背景不同有关。

生物大分子(碳水化合物、脂类和蛋白质等)的多种酶促反应为细菌的生长代谢及复制提供了重要的能量保障,这些生物大分子主要由 EMP 途径、磷酸戊糖途径(Pentose Phosphate Pathway)和三羧酸循环(Tricarboxylic Acid Cycle, TCA Cycle)途径来源的中间产物合成<sup>[8]</sup>。葡萄球菌具有上述 3 个完

整的代谢途径,但不同生长环境条件下其获取能量的代谢途径不同。碳水化合物主要通过 EMP 途径和磷酸戊糖途径分解代谢产生,细菌在营养丰富的条件下对生物合成中间体的需求是外源的,即在这种条件下三羧酸循环的活性会受到抑制;但当营养物质受限时,细菌将首先增加三羧酸循环活性,并非先分解已有的碳源;EMP 途径中,每消耗一分子葡萄糖就会产生两分子丙酮酸,并在此过程中使两分子 NAD 还原为 NADH,丙酮酸的分解代谢由生长条件(氧气)决定;在厌氧条件下,丙酮酸还原生成乳酸;有氧条件下,丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶 A (CoA),之后进入三羧酸循环被进一步氧化<sup>[9]</sup>。有研究表明<sup>[10]</sup>,有氧条件下葡萄球菌 SrrAB 促进 *icaADBC* 转录,增强细胞间多糖黏附素(Polysaccharide Intercellular Adhesion, PIA)合成,抑制三羧酸循环中顺乌头酸酶(Aconitase)、琥珀酸脱氢酶(Succinate Dehydrogenase)、延胡索酸酶(Fumarase)、NADH 脱氢酶(NADH Dehydrogenase)的活性;厌氧条件下 SrrAB 部分抑制 PIA 的合成,增加了三羧酸循环中顺乌头酸酶、琥珀酸脱氢酶和 NADH 脱氢酶的表达。Somerville 等<sup>[11]</sup>研究发现,在三羧酸循环活性被抑制时细菌合成 PIA 的量增加,进一步提示 SrrAB 对 PIA 的生物合成是双重的, SrrAB 直接调控 *icaADBC* 的转录,间接调控三羧酸循环来影响细菌的生物学活性(图 1)。

另外,代谢也直接影响细菌的毒力因子表达及耐药性。代谢调控蛋白 A (Catabolite Control Protein A, CcpA)是金黄色葡萄球菌的一类重要调控蛋白,直接调控细菌毒素的表达,进而影响细菌的致病性<sup>[12]</sup>。研究表明<sup>[13]</sup>,氧化-还原反应依赖的转录抑制因子 Rex (Redox-Dependent Transcriptional Repressor, DNA Binding Protein)能够感应胞内 NADH/NAD<sup>+</sup>比例变化,与 NADH 或者 NAD<sup>+</sup>直接结合,以达到监测有氧及厌氧条件下细胞内的氧化还原状态;Rex 通过调节呼吸和代谢相关基因的转录水平来降低胞内 NADH 浓度,以维持胞内合适的氧化还原状态;Rex 是金黄色葡萄球菌 SrrAB

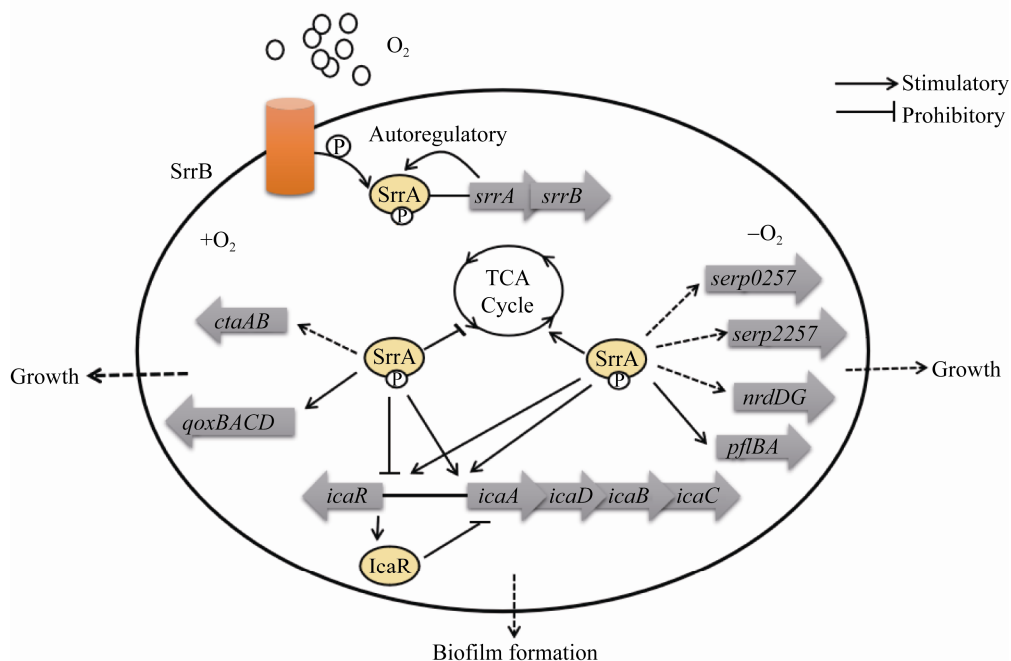


图1 TCS-SrrAB 在葡萄球菌生长及生物膜形成中的作用<sup>[4]</sup>

Figure 1 The role of TCS-SrrAB in the growth and metabolism of *Staphylococcus*<sup>[4]</sup>

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;  $\textcircled{P}$ : 磷酸基团; 无色空心圆示氧气; 实线示直接作用, 虚线示间接作用。+ $O_2$ : 在有氧条件下; - $O_2$ : 在厌氧条件下

Note: SrrB: Transmembrane protein, sensing and responding upon the signaling, SrrB is autophosphorylated and transfers the phosphoryl group ( $\textcircled{P}$ ) to SrrA, which is located in the cytoplasm; colorless hollow circle shows oxygen; Solid lines indicate direct effect, and dotted lines indicate indirect effect. + $O_2$ : Under oxic conditions; - $O_2$ : Under microaerobic conditions

的抑制因子, 在厌氧条件下, Rex 通过抑制 *srrAB* 的转录, 导致金黄色葡萄球菌毒力因子的表达下调或缺失。

## 2 TCS-SrrAB 在葡萄球菌抵抗宿主固有免疫中的作用

固有免疫(Innate Immunity)是哺乳动物出生就具有的天然免疫防御功能, 由皮肤/黏膜屏障、固有免疫细胞和分子组成, 主要在宿主抗感染免疫的早期发挥作用。细菌在生长过程中均会遇到各种形式存在的氧, 有些形式的氧对细菌的生长有益, 如  $O_2$  和  $H_2O$ ; 有些形式的氧对细菌有害, 如超氧阴离子( $O_2^-$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )、单态氧( $^1O_2$ )、羟基自由基( $OH\cdot$ )、一氧化氮(NO)等; 在有氧的条件下, 吞噬细胞通过氧依赖的杀伤机制产生活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)和活性氮(Reactive

Nitrogen Species, RNS)生物活性介质, 破坏电子传递链、损伤 DNA、硫铁簇(Iron-Sulfur Protein)、蛋白质和脂类等而发挥杀菌作用; 另一方面, 病原菌不仅对内源性(细菌产生的)代谢产生的 ROS/RNS 进行反应调节, 还必须对宿主细胞产生的外源性 ROS/RNS 进行反应调节, 最大限度降解各种自由基对细菌的损伤作用, 对抗或逃逸免疫细胞/免疫分子的攻击, 最终与宿主共生共存或进一步引起感染; 葡萄球菌 SrrAB 是感应及调节 ROS/RNS 代谢的重要的氧化应激反应调节子<sup>[14]</sup>。

### 2.1 葡萄球菌 TCS-SrrAB 调节 ROS 的作用

葡萄球菌被吞噬细胞摄取前可通过产生荚膜、葡萄球菌 A 蛋白、纤维素结合蛋白、葡萄球菌激酶(Staphylokinase)等物质抵抗调理素介导的吞噬作用, 当被摄取后葡萄球菌可以通过产生类胡萝卜

色素、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等,或者调节锰离子稳态来抵抗宿主细胞来源的 ROS 攻击。

金黄色葡萄球菌可通过多种方式抵抗 ROS 作用,如产生过氧化氢酶(Catalase, KatA)和烷基过氧化氢还原酶(Alkyl Hydroperoxide Reductase, AhpC)分解  $H_2O_2$  后生成水和氧气;通过氧化损伤保护蛋白(DNA-Binding Ferritin-Like Protein, Dps)来抑制芬顿反应(Fenton Chemistry),减少羟基自由基( $OH\cdot$ )形成;利用超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SodA/SodM)清除氧自由基,利用硫铁簇修复蛋白(Iron-Sulfur Cluster Repair Protein, ScdA)帮助修复  $H_2O_2$  损伤的硫铁簇蛋白(Fe-S),增强细菌对  $H_2O_2$  的抵抗力等<sup>[14]</sup>。葡萄球菌 SrrAB 通过调控上述酶的表达以抵抗宿主的免疫攻击。

Mashruwala 等<sup>[15]</sup>研究发现, SrrAB 在有氧条件下正调节 ROS 作用相关基因(*kat*、*ahpC*、*dps*、*scdA*),敲除金黄色葡萄球菌(*S. aureus* USA300-LAC) *srrAB* 后上述基因转录水平均显著下调,而在低氧或厌氧条件下(TCA 活性降低时), SrrAB 负调节 ROS 作用相关基因的转录; EMSA 显示磷酸化的 SrrA 能与 *dps* 启动子区结合,未发现 SrrA 蛋白与其他基因启动子区结合,提示 SrrAB 直接通过 *dps* 调控金黄色葡萄球菌对  $H_2O_2$  的抵抗力,推测 SrrAB 可能还通过其他途径间接影响 *katA*、*ahpC* 和 *scdA* 的转录水平,此结果与 Oogai 等<sup>[16]</sup>研究结果基本一致,敲除金黄色葡萄球菌(*S. aureus* MW2) *srrAB* 后发现, *srrAB* 突变株在  $H_2O_2$  压力下 *katA*、*dps* 和 *ahpC* 基因转录水平明显较野生株升高,对 ROS 的抗性显著增强。

除 SrrAB 外,黄素血红蛋白(Flavoheмоprotein, Hmp)和过氧化物调节抑制子(Peroxide Regulon Repressor, PerR)也参与金黄色葡萄球菌  $H_2O_2$  的调节。金黄色葡萄球菌 Hmp 的表达量依赖 SrrAB,在 NO 存在条件下, Hmp 利用 FAD (Flavin Adenine Dinucleotide)还原产生的电子将 NO 转化为硝酸盐( $NO_3^-$ );在 NO 缺乏的条件下, Hmp 将  $O_2$  氧化为

超氧阴离子( $O_2^-$ )或通过芬顿反应将  $H_2O_2$  转化为羟基自由基( $OH\cdot$ );灭活 *hmp* 基因将抑制金黄色葡萄球菌胞内 RNS 产生, *hmp* 突变株对  $H_2O_2$  的敏感性较野生株显著降低;另外,灭活 *perR* 基因将导致金黄色葡萄球菌抗氧化因子(*katA*、*dps*、*ahpC*)转录水平显著升高,对  $H_2O_2$  敏感性显著降低,而且 *perR* 突变株对  $H_2O_2$  的敏感性明显低于 *srrAB* 突变株,但未发现 SrrAB 与 PerR 之间有直接关系,提示 SrrAB 与 PerR 是相互独立的,都是通过调控 *katA*、*dps* 和 *ahpC* 转录水平来发挥抗氧化作用<sup>[14]</sup>。

在金黄色葡萄球菌感染的动物模型中,中性粒细胞和 NADPH 氧化酶介导的机制在保护宿主感染中起重要作用。Köhler 等<sup>[17]</sup>构建了经鼻感染金黄色葡萄球菌的小鼠肺炎模型,发现中性粒细胞的抗金黄色葡萄球菌感染的作用强于巨噬细胞,其主要通过 NADPH 氧化酶依赖的方式杀伤金黄色葡萄球菌,缺乏 NADPH 氧化酶的小鼠(C57BL/6J gp91phox<sup>-/-</sup>)更容易受葡萄球菌的感染。此外, Ulrich 等<sup>[18]</sup>研究发现,厌氧条件下 SrrAB 活化金黄色葡萄球菌 *icaA* 的转录, PIA 合成增加, PIA 能保护金黄色葡萄球菌抵抗中性粒细胞非 ROS 的杀伤作用,但在有氧条件下, PIA 的保护作用有限,被吞噬的葡萄球菌容易被中性粒细胞 ROS 杀灭。

## 2.2 葡萄球菌 TCS-SrrAB 调节 RNS 的作用

一氧化氮(NO)是机体固有免疫应答的重要组成部分之一,具有抗菌活性和免疫调节作用,是一种能透过细胞膜的自由基,处于 NO 压力下的病原菌将出现代谢障碍、转录调控功能紊乱、诱导压力调节子的表达等应激反应,细菌通过增强对固有免疫的抵抗力来提高其毒力及致病性。Mashruwala 等<sup>[15]</sup>用转座子插入突变的方式发现金黄色葡萄球菌有 5 个与 NO 抗性有关的压力调节子,分别是 SrrAB、Fur (Ferric Uptake Regulator)、SarA、CodY 和 Rot,其中有些调节子也参与葡萄球菌的毒力因子调节。金黄色葡萄球菌通过这些调节子增强了其应对 RNS 压力的转录调控能力,以更好地适应寄

生环境, 条件适宜时再引起感染。

黄素血红蛋白 Hmp 能将 NO 氧化为硝酸盐, 在体内及体外抵抗硝化压力(Nitrosative Stress)中发挥作用, 已测序的所有金黄色葡萄球菌均具有 *hmp* 基因, 37%的菌株具有一氧化氮还原酶基因(*saNOR*), Hmp 和 SaNOR 蛋白是金黄色葡萄球菌解毒 RNS 的重要调节子, 而 Hmp 和 SaNOR 的表达依赖 SrrAB, 且低氧条件下(如生物膜内部的细胞) *hmp* 和 *saNOR* 表达量高于有氧及厌氧条件, Hmp 对一氧化氮的解毒作用(胞内 90%的 NO 是通过 Hmp 蛋白解毒的)强于 SaNOR。敲除 *srrAB*、*hmp* 或 *nor* 基因的金黄色葡萄球菌对 NO 的敏感性均显著增高, 并且 *srrAB* 突变株对 NO 敏感性强于 *hmp* 突变株或 *nor* 突变株<sup>[10,19]</sup>。由此提示: SrrAB 通过调节 *hmp* 和 *saNOR* 的表达水平来实现对 RNS 的解毒作用, 进而增强其对 NO 的耐受性。

Richardson 等<sup>[20]</sup>研究发现, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus* Newman) *Hmp* 和 *srrAB* 突变株感染小鼠(C57BL/6)的存活率显著高于野生株感染的小鼠, 进一步将菌株感染一氧化氮合酶基因(*NOS2*)突变的小鼠(C57BL/6 *iNOS*<sup>-/-</sup>, 不能产生高浓度一氧化氮), 发现金黄色葡萄球菌野生株与 *hmp* 突变株感染小鼠后 5 d 和 8 d 的存活率相似(WT/*hmp* 分别为 30%/40%, 0%/0%), 而 *srrAB* 突变株感染小鼠的存活率明显较前两者高(5 d 和 8 d 存活率分别为 100%和 90%), 提示 Hmp 仅依赖宿主通过 *iNOS* 产生 NO 来发挥毒力因子作用, 而 *srrAB* 突变株在体外对 NO 的敏感性显著增强, 体内试验又表现出毒力明显减弱, 说明 SrrAB 主要通过调控其他更强的毒力因子来发挥作用, 在致病性中调节 NO 的作用不是主要的。此结果与 Köhler 等<sup>[17]</sup>研究结果一致, 在该 *iNOS*<sup>-/-</sup>小鼠肺炎感染模型中, NO 介导的机制在保护宿主抵抗金黄色葡萄球菌的感染作用有限。表皮葡萄球菌中也有 *hmp* 和 *nor* 基因, 但尚不清楚其在表皮葡萄球菌硝化压力和致病性中的作用。

### 3 TCS-SrrAB 在葡萄球菌生物膜形成中的作用

生物膜是细菌及其细胞外基质(碳水化合物、蛋白或胞外 DNA 等)附着在物体表面形成的膜状细菌群体<sup>[21]</sup>。生物膜细菌的生理、生化特点及致病性与浮游菌不同<sup>[22]</sup>。葡萄球菌通过形成生物膜抵抗宿主细胞因子(如 TNF、IL-17A、IL-1 $\beta$ 、IL-10 和干扰素  $\gamma$  等)的抑炎作用及吞噬细胞的吞噬作用, 这与生物膜细胞间基质(如 PIA、蛋白等)关系密切<sup>[23-25]</sup>。葡萄球菌生物膜形成的机制较复杂, SrrAB 在金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌生物膜形成中的作用机制也不同。Pragman 等<sup>[26]</sup>研究发现, 金黄色葡萄球菌(*S. aureus* MN8) SrrAB 有氧条件下通过激活 *icaR* (*icaA* 的抑制子<sup>[27]</sup>)转录, 进而抑制 *icaADBC* 的转录而减少生物膜形成; 厌氧条件下, SrrAB 抑制 *icaR* 转录, 减弱了 IcaR 对 *icaADBC* 转录的抑制作用, 增加生物膜的形成能力。Ulrich 等<sup>[18]</sup>采用 pBT2 构建金黄色葡萄球菌(ATCC35556) *srrAB* 的突变株, RT-PCR 结果显示, 在厌氧条件下 *srrAB* 突变株 *IcaA* 的表达量显著低于野生株; EMSA 结果显示, 磷酸化 SrrA 能与 *icaA* 启动子区(100 bp)结合, 提示在厌氧条件下 SrrAB 正调节 *icaA* 表达、促进 PIA 的合成进而增强生物膜形成。除 PIA 外, 胞外 DNA (Extracellular DNA, eDNA)是金黄色葡萄球菌生物膜形成的重要细胞间基质及组成成分, 来源于葡萄球菌死亡裂解或自溶释放的基因组 DNA, eDNA 主要在生物膜形成的起始阶段发挥重要作用; 近年来发现 SrrAB 通过调节 *cidABC* 表达来调控细菌 PCD, 敲除 *srrAB* 后金黄色葡萄球菌生物膜厚度明显变薄且死菌数增多, eDNA 释放增加, 有利于细菌牢固黏附在一起, 或在其他表面黏附形成新的生物膜感染灶<sup>[5]</sup>。

表皮葡萄球菌 SrrAB 调控生物膜形成的机制不同于金黄色葡萄球菌。Wu 等<sup>[4]</sup>研究表明, 表皮葡萄球菌 SrrAB 以 *ica* 依赖的方式调节生物膜的形成: 有氧条件下 SrrAB 通过上调 *icaA* 转录, 促进

表皮葡萄球菌生物膜的形成;厌氧条件下表皮葡萄球菌通过上调 *icaR* 的转录,部分抑制了 *icaA* 的转录,导致生物膜形成量较有氧条件下明显减少;另外,激光共聚焦显微镜下显示,表皮葡萄球菌 *srrAB* 突变株生物膜内的死细菌数明显多于野生株,丙酮酸甲酸裂解酶基因(Pyruvate Formate Lyase, *pflA*) 转录水平明显降低,并且磷酸化的 SrrA 能与 *pflA* 的启动子区结合,提示 SrrAB 正调节 *pflA* 的表达;敲除 *srrAB* 后表皮葡萄球菌生物膜内(低氧条件下)细胞的能量供应降低,导致生物膜内死细菌数增加。尚不清楚表皮葡萄球菌 SrrAB 与细菌 PCD 的关系。

#### 4 TCS-SrrAB 在葡萄球菌细胞 PCD 中的作用

有关细菌程序性死亡(Programmed Cell Death, PCD)的分子机制目前尚不清楚,近来发现操纵子 *cid/lrg* 是调节葡萄球菌细胞死亡和裂解的分子控制原件,其编码蛋白的分子结构类似于噬菌体 S 蛋白<sup>[28]</sup>。CidA 蛋白(含半胱氨酸)的寡聚化作用在细胞膜上形成大面积的蛋白聚合体(死亡之筏, Death Raft)<sup>[29]</sup>,多个死亡之筏形成跨膜孔道(Holin),引起膜去极化并激活胞壁质水解酶(Murein Hydrolase),进而溶解细胞壁中的肽聚糖,导致细菌裂解死亡<sup>[30]</sup>。与 CidA 作用相反, LrgA 通过干扰 CidA 的去极化作用来对抗 CidA 的活性(Antiholin)<sup>[31]</sup>。因此, CidA/LrgA 系统(Holin-Antiholin System)被认为是细菌 PCD 的机制之一。研究发现<sup>[31-32]</sup>,金黄色葡萄球菌(*S. aureus* RN6390) *cidA* 敲除突变株胞壁质水解酶活性较野生株显著降低,死细菌数减少,对抗生素的敏感性降低,而敲除 *lrgAB* 得到相反的结果,蛋白 CidA 与 LrgA 的比例决定了葡萄球菌细胞的存亡。此外, CidB 正调节金黄色葡萄球菌 ROS 的产生,增强细菌对 ROS 的敏感性(死菌数增加); CidC (Pyruvate Oxidase) 将丙酮酸氧化为乙酸,在细菌 PCD 的起始阶段发挥作用<sup>[33]</sup>。

CidA/LrgA 系统在细菌 PCD 中的作用受多种因素的影响,如细菌生长环境中过量的葡萄糖(35 mmol/L)、低氧或厌氧条件及调节子 CidR、LytSR、SrrAB 等的作用。Windham 等<sup>[33]</sup>研究发现,金黄色葡萄球菌(*S. aureus* UAMS-1) *srrAB* 敲除突变株( $\Delta$ *srrAB*)死细菌数明显增多,内源性 ROS 累积量增多,对 ROS 的敏感性增加,并且死细菌数比例及 ROS 累积量依赖于 *cidABC* 的表达量;在  $\Delta$ *srrAB* 突变株基础上进一步敲除 *cidABC* ( $\Delta$ *srrAB* $\Delta$ *cidABC* 突变株)后死细菌数明显减少,ROS 产生量降低,并且  $\Delta$ *srrAB* $\Delta$ *cidABC* 突变株与  $\Delta$ *cidABC* 突变株在生长稳定期的细胞活性相似;由有氧条件转移至厌氧条件培养(避免 ROS 产生)能显著提高  $\Delta$ *srrAB* 突变株的活菌数,提示 SrrAB 是金黄色葡萄球菌 *cidABC* 转录的抑制子,通过下调 *cid* 操纵子中 3 个基因的转录来调控细菌 PCD: (1) SrrAB 抑制金黄色葡萄球菌 CidA 表达,影响 CidA/LrgA 比例,进而抑制 CidA 寡聚化及后续裂菌作用; (2) SrrAB 抑制 CidB 表达,通过 CidC 非依赖的方式降低 ROS 产生量,增强对 ROS 耐受性,减少死菌数; (3) *cidC* 编码的丙酮酸氧化酶通过产生乙酸,降低培养基 pH 值,然而  $\Delta$ *srrAB* 突变株中死细菌数增多并非由于乙酸堆积和培养基 pH 降低直接引起,而是低 pH 值环境下乙酸内流、胞内 pH 值下降,降低了呼吸链功能,并催化还原氧气生成 ROS,细菌在酸性环境中对 ROS 敏感性增强而死菌数增多,与 Thomas 等<sup>[34]</sup>研究结果一致。

为验证 *cidABC* 转录受 SrrAB 直接调控, Windham 等<sup>[33]</sup>构建了含 *cidABC* 启动子的报告质粒(pIHW10lac),通过检测半乳糖苷酶活性来评价调节蛋白 SrrA 对 *cidABC* 操作子的启动子活性,发现金黄色葡萄球菌  $\Delta$ *srrAB* 突变株中 *cid* 启动子下的表达量是野生株的 4 倍,将 *srrAB* 互补至  $\Delta$ *srrAB* 突变株后 *cidABC* 操作子的启动子活性恢复至野生株水平,这与 Kinkel 等<sup>[35]</sup>结果一致,而且 EMSA 结果显示磷酸化 SrrA 能与 *cidABC* 启动子区(60 bp)



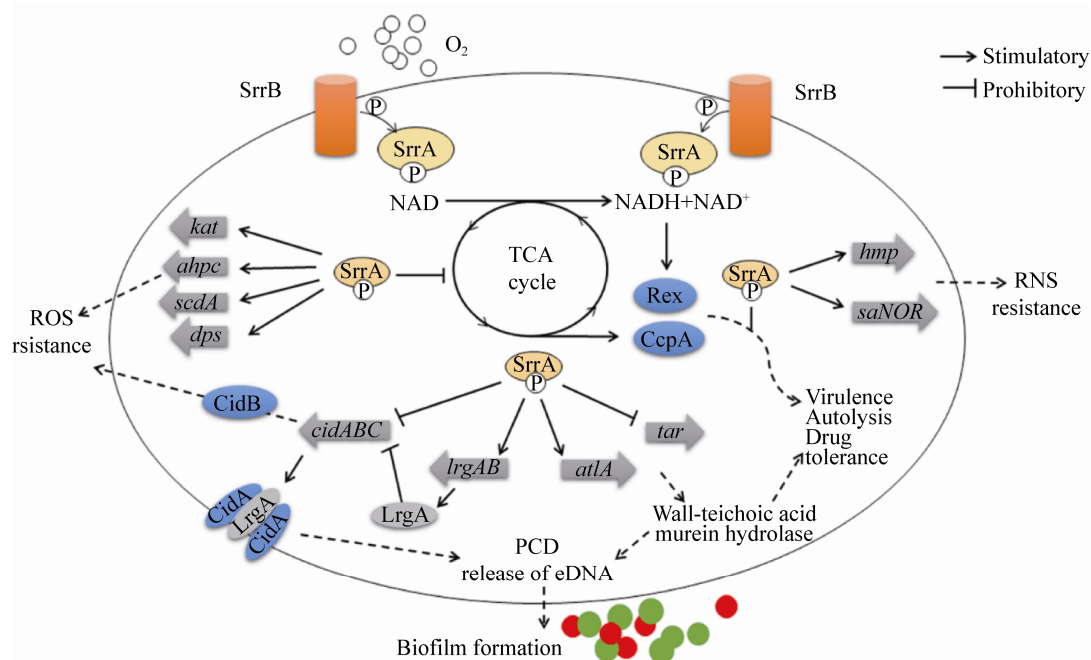


图2 TCS-SrrAB 在葡萄球菌固有免疫及 PCD 中的作用

Figure 2 The role of TCS-SrrAB in the innate immunity and PCD of *Staphylococcus*

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; ②: 磷酸基团; 红色实心圆示死菌, 绿色实心圆示活菌, 无色空心圆示氧气; 实线示直接作用, 虚线示间接作用

Note: SrrB: Transmembrane protein, sensing and responding upon the signaling, SrrB is autophosphorylated and transfers the phosphoryl group (②) to SrrA, which is located in the cytoplasm; Red solid circle shows dead bacteria, green solid circle shows living bacteria, colorless hollow circle shows oxygen; Solid lines indicate direct effect, and dotted lines indicate indirect effect

特异性区结合。上述结果提示: 在酸性环境下, SrrAB 通过负调节 *cidABC* 表达来调控金黄色葡萄球菌 PCD。

## 5 结语与展望

葡萄球菌是引起医院内感染的重要病原菌之一, 由于环境压力和生长方式(浮游菌或生物膜)的改变导致细菌的耐药现象越来越普遍, 受限于理想药物靶点的发现, 新型药物研发举步维艰。虽然 SrrAB 不是葡萄球菌生长所必需的基因, 却调控葡萄球菌多种重要的生物学功能(图2), 如细菌的生长、代谢、氧化应激、PCD 和生物膜形成等过程, 敲除 *srrAB* 后能显著增强葡萄球菌对抗生素的敏感性, 提示在抑制 SrrAB 表达的基础上辅以药物治疗是应对耐药株感染的新思路。而且, 随着 SrrA 蛋白晶体结构的解析、SrrA 与疑似靶

基因结合位点核酸序列特点的揭示, 葡萄球菌引起的持续性感染及新的药物靶点研究一定能取得更大进展。

## REFERENCES

- [1] Haag AF, Bagnoli F. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation[A]//*Staphylococcus aureus*. Current Topics in Microbiology and Immunology[M]. New York: Springer, 2015: 145-198
- [2] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin[J]. The Lancet, 1997, 350(9092): 1670-1673
- [3] Pragman AA, Herron-Olson L, Case LC, Vetter SM, Henke EE, Kapur V, Schlievert PM. 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
- [4] Wu YC, Wu Y, Zhu T, Han HY, Liu HY, Xu T, Francois P,



- Fischer A, Bai L, Götz F, et al. *Staphylococcus epidermidis* *srrAB* regulates bacterial growth and biofilm formation differently under oxic and microaerobic conditions[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(3): 459-476
- [5] Mashruwala AA, Van De Guchte A, Boyd JM. Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*[J]. Elife, 2017, 6: e23845
- [6] Wilde AD, Snyder DJ, Putnam NE, Valentino MD, Hammer ND, Lonergan ZR, Hinger SA, Aysanoa EE, Blanchard C, Dunman PM, et al. Bacterial hypoxic responses revealed as critical determinants of the host-pathogen outcome by TnSeq analysis of *Staphylococcus aureus* invasive infection[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(12): e1005341
- [7] Wu YC, Xu T, Liu HY, Han HY, Wu Y, Bai L, Qu D. Advances in two-component signal transduction system SrrAB of *Staphylococcus*[J]. Microbiology China, 2012, 39(12): 1796-1807 (in Chinese)  
武有聪, 许涛, 刘华勇, 韩海燕, 吴旻, 白丽, 瞿涤. 葡萄球菌呼吸相关双组分系统 SrrAB 研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(12): 1796-1807
- [8] Somerville GA, Proctor RA. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 2009, 73(2): 233-248
- [9] Collins FM, Lascelles J. The effect of growth conditions on oxidative and dehydrogenase activity in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of General Microbiology, 1962, 29(3): 531-535
- [10] Grosser MR, Weiss A, Shaw LN, Richardson AR, Schneewind O. Regulatory requirements for *Staphylococcus aureus* nitric oxide resistance[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(15): 2043-2055
- [11] Somerville GA, Cockayne A, Dürr M, Peschel A, Otto M, Musser JM. Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus*  $\delta$ -toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(22): 6686-6694
- [12] Zhang GF, Liu LB, Li C. Effects of *ccpA* gene deficiency in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* under aerobic conditions as assessed by proteomic analysis[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 9
- [13] Coenen A, Oetermann S, Steinbüchel A. Identification of LcpRB<sub>A3(2)</sub>, a novel regulator of *lcp* expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2019, 103(14): 5715-5726
- [14] Mashruwala AA, Boyd JM. The *Staphylococcus aureus* SrrAB regulatory system modulates hydrogen peroxide resistance factors, which imparts protection to aconitase during aerobic growth[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170283
- [15] Mashruwala AA, Eilers BJ, Fuchs AL, Norambuena J, Earle CA, Van De Guchte A, Tripet BP, Copié V, Boyd JM. The ClpCP complex modulates respiratory metabolism in *Staphylococcus aureus* and is regulated in a SrrAB-dependent manner[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(15): e00188-19
- [16] Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Komatsuzawa H. *Staphylococcus aureus* SrrAB affects susceptibility to hydrogen peroxide and co-existence with *Streptococcus sanguinis*[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159768
- [17] Köhler J, Breitbach K, Renner C, Heitsch AK, Bast A, Van Rooijen N, Vogelgesang S, Steinmetz I. NADPH-oxidase but not inducible nitric oxide synthase contributes to resistance in a murine *Staphylococcus aureus* Newman pneumonia model[J]. Microbes & Infection, 2011, 13(11): 914-922
- [18] Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, Memmi G, Wolz C, Schlievert PM, Cheung A, 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
- [19] Urbano R, Karlinsey JE, Libby SJ, Doulias PT, Ischiropoulos H, Warheit-Niemi HI, Liggitt DH, Horswill AR, Fang FC. Host nitric oxide disrupts microbial cell-to-cell communication to inhibit staphylococcal virulence[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 23(5): 594-606
- [20] Richardson AR, Dunman PM, Fang FC. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity[J]. Molecular Microbiology, 2006, 61(4): 927-939
- [21] Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(3): MB-0011-2014
- [22] Sabirova JS, Hernalsteens JP, De Backer S, Xavier BB, Moons P, Turlej-Rogacka A, De Greve H, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Fatty acid kinase A is an important determinant of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* USA300[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 861
- [23] Cantero D, Cooksley C, Bassiouni A, Tran HB, Roscioli E, Wormald PJ, Vreugde S. *Staphylococcus aureus* biofilms induce apoptosis and expression of interferon- $\gamma$ , interleukin-10, and interleukin-17A on human sinonasal explants[J]. American Journal of Rhinology & Allergy, 2015, 29(1): 23-28
- [24] Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1[J]. Infection & Immunity, 2011, 79(6): 2267-2076
- [25] Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci[J]. Frontiers in Cellular & Infection Microbiology, 2012, 2: 38

- [26] Pragman AA, Ji YD, 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
- [27] Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1367-1378
- [28] Patel K, Golemi-Kotra D. Signaling mechanism by the *Staphylococcus aureus* two-component system LytSR: role of acetyl phosphate in bypassing the cell membrane electrical potential sensor LytS[J]. F1000Research, 2015, 4: 79
- [29] Shi YB, Sun JH. Current advance in the topological structure and function of holin encoded by bacteriophage Lambda: A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(2): 141-145 (in Chinese)  
史一博, 孙建和.  $\lambda$  噬菌体穿孔素(holin)蛋白触发裂菌的分子机制[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 141-145
- [30] Dhar S, Kumari H, Balasubramanian D, Mathee K. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* – their role in the development of resistance[J]. Journal of Medical Microbiology, 2018, 67(1): 1-21
- [31] Rice KC, Firek BA, Nelson JB, Yang SJ, Patton TG, Bayles KW. The *Staphylococcus aureus* *cidAB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(8): 2635-2643
- [32] Groicher KH, Firek BA, Fujimoto DF, Bayles KW. The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(7): 1794-1801
- [33] Windham IH, Chaudhari SS, Bose JL, Thomas VC, Bayles KW. *SrrAB* modulates *Staphylococcus aureus* cell death through regulation of *cidABC* transcription[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(7): 1114-1122
- [34] Thomas VC, Sadykov MR, Chaudhari SS, Jones J, Endres JL, Widhelm TJ, Ahn JS, Jawa RS, Zimmerman MC, Bayles KW. A central role for carbon-overflow pathways in the modulation of bacterial cell death[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(6): e1004205
- [35] Kinkel TL, Roux CM, Dunman PM, Fang FC. The *Staphylococcus aureus* *SrrAB* two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia[J]. mBio, 2013, 4(6): e00696-13