

黏液型与非黏液型铜绿假单胞菌 Cif 基因表达研究*

邱晓明, 林锦骝, 黄 尔, 杨 滨 (福建医科大学附属第一医院检验科, 福州 350005)

摘要:目的 比较黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌囊性纤维化跨膜传导调节体抑制因子(Cif)基因表达差异,并结合临床资料比较对应患者白细胞(WBC)及C反应蛋白(CRP)等炎症指标的不同。方法 采用逆转录PCR和实时荧光定量PCR检测两种型别铜绿假单胞菌Cif基因的表达量。收集相应患者临床数据比较WBC数和CRP水平及其与Cif基因表达的相关性。结果 黏液型铜绿假单胞菌Cif基因表达量显著高于非黏液型铜绿假单胞菌,差异有统计学意义($t=2.09$, $P<0.05$),黏液型铜绿假单胞菌组和非黏液型铜绿假单胞菌组的患者其WBC数和CRP水平差异无统计学意义($t=0.65$, 0.60 , $P>0.05$);Cif基因表达与CRP水平相关性极弱($a=-0.061$, $R^2=0.04$),与WBC数相关性也极弱($a=0.095$, $R^2=0.029$)。结论 Cif基因表达可能与黏液型铜绿假单胞菌生物被膜的形成有关,可能为铜绿假单胞菌新的毒力因子。

关键词:铜绿假单胞菌;生物被膜;黏液型;CFTR抑制因子

中图分类号:R378.991;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)03-019-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.006

Investigation of Cif Gene Expression between Mucoid and Non-mucoid *Pseudomonas Aeruginosa*

QIU Xiao-ming, LIN Jin-piao, HUANG Er, YANG Bin (Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

Abstract: Objective To compare the difference of the Cif gene expression and the inflammation markers (such as WBC and CRP et al) between mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, combining with the clinical data. Methods Real-time RT-PCR was used to determine the expression level of Cif in *Pseudomonas aeruginosa* and clinical data were collected to discuss the relationship among the number of WBC, the level of CRP and the Cif gene expression. Results The expression level of Cif gene in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* had a significantly higher than the non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, which was statistically significant ($t=2.09$, $P<0.05$). Specimen data collected from patients with the infection of mucoid or non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* showed that the number of WBC and the level of CRP were not significantly different ($t=0.65$, 0.60 , $P>0.05$). The data also showed that the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibitory factor (Cif) gene expression level had little correlation with the number of WBC ($a=0.095$, $R^2=0.029$). Conclusion

The expression of Cif gene may works for the biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, which maybe a new virulence factor to *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; mucoid; Cif

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)为条件致病菌,是医院内感染的主要病原菌之一,也是引起菌血症、泌尿系感染及多种慢性呼吸道疾病的重要病原菌,根据是否产生大量藻酸盐及不同菌落形态,可将其分为黏液型和非黏液型两个型别^[1]。铜绿假单胞菌可携带多种毒力因子,已被发现的有外毒素A(toxA)、一氧化氮还原酶(norA)、胞外酶Y(exoY)、胞外酶S(exoS)、脓菌素(PYP)、胞外酶U(exoU)、胞外酶T(exoT)和弹力蛋白酶(lasB),体外药敏试验显示黏液型铜绿假单胞菌体外耐药性较弱,而体内用药耐药率却较高,其可能是因为黏液型PA可在菌落周围形成一种由多种糖蛋白组成的生物膜,从而有着较强的存活能力和抵抗抗生素杀菌作用^[2],增加了临床治疗的难度。

囊性纤维化跨膜传导调节体(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是位于上皮细胞顶膜的氯离子通道,CFTR广泛分布于人体组织,如胆管上皮、呼吸道、消化道、生殖道及泌尿道等组织,对与跨上皮细胞的盐类运输、液体流动及离子浓度调节等具有重要的作用^[3]。CFTR基因突变引起CFTR蛋白缺失或异常可导致囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)。Alicia等^[4]研究发现,铜绿假单胞菌能分泌一种环氧化物水解酶类毒力因子,其可抑制CFTR的表达,称之为CFTR抑制因子(CFTR inhibitory factor, Cif),Cif基因是否为铜绿假单胞菌新的毒力因子尚未见报道,Cif基因的表达可能与铜绿假单胞菌的毒力及生物被膜的形成有关。本文通过检测临床呼吸道标本分

* 作者简介:邱晓明(1986-),男,本科,初级技师,主要从事临床检验工作,E-mail:qxm19868814@163.com。

通讯作者:杨 滨,Tel:13950392166,E-mail:yangbin2864@163.com。

离的黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌 Cif 基因表达量,结合临床资料比较其差异性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2014年6月~12月期间我院收治的患者40例,其中男性24例,女性16例,年龄20~85岁。所有患者呼吸道标本均分离出铜绿假单胞菌,为铜绿假单胞菌感染或定植。其中黏液型铜绿假单胞菌20株(黏液型PA组),非黏液型铜绿假单胞菌20株(非黏液型PA组)。

1.2 Real-time PCR 检测 Cif 表达 采用ABI公司提供的软件Prism3.0设计引物,序列见表1。分离菌株经肉汤37℃摇床过夜增菌,取1ml菌液离心分离菌体,TRIzol提取RNA,经随机引物逆转录为cDNA,实时定量PCR检测Cif的表达。所采用的反应条件为:50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 60 s,共40个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算每个样本Cif基因相对表达量。

1.3 统计学分析 采用IBM SPSS Version 21.0进行统计分析。实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 real-time PCR 检测基因及引物序列

基因	序列(5'-3')
Rplu	Forward GGTGGCAAGCAGCACAAGTCACCG
	Reverse GCGGACCTTGTGTCGACGGCCGTGG
Cif(PA2934)	Forward CTCCTGGCCGGCATCGCCCTGACCTTCTCC
	Reverse CCATTGCTACCAAGTCTGGCCGAAGCCGTGC

2 结果

2.1 一般临床资料比较 根据血平板上细菌的菌落形态,我们将临床病例分为黏液型PA组和非黏液型PA组。在不同疾病病例中,黏液型铜绿假单胞菌在支气管扩张的病人检出率最高达到65%,其病例中肺部阴影占10%,有机磷中毒、哮喘、咳血、肺气肿、肺部感染等各占5%。统计比较各组C反应蛋白(CRP)、白细胞计数(WBC)、中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比以及单核细胞百分比等指标均值,差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表2。

2.2 黏液型铜绿假单胞菌 Cif 基因表达显著升高

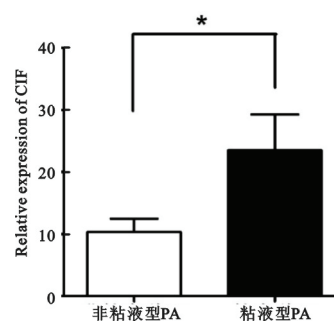
黏液型与非黏液型铜绿假单胞菌 Cif 基因相对表达量分别为 23.50 ± 24.54 和 10.33 ± 8.81 。与非黏液型铜绿假单胞菌相比,黏液型铜绿假单胞菌 Cif 基因表达明显升高,差异有统计学意义($t = 2.09, P < 0.05$,见图1)。同时我们还比较了黏液型铜绿假单胞菌和非黏液型铜绿假单胞菌对应宿主外周血 WBC 水平和血清 CRP 浓度,Cif 与 CRP

表现为弱相关($a = -0.061, R^2 = 0.04$,见图2);Cif 与 WBC 也表现为弱相关($a = 0.095, R^2 = 0.029$,见图3)。

表2 组间均值比较($n = 20, \bar{x} \pm s$)

项目	黏液型PA组	非黏液型PA组	t	P
CRP	44.5 ± 54.7	33.1 ± 20.9	0.655	0.091
WBC	8.39 ± 2.65	7.81 ± 3.27	0.552	0.430
中性粒细胞%	70.914 ± 11.24	71.282 ± 11.42	-0.100	0.976
淋巴细胞%	20.486 ± 9.20	17.253 ± 9.14	1.080	0.852
单核细胞%	5.81 ± 2.66	6.84 ± 2.53	-1.208	0.779

注: $P < 0.05$ 差异有统计学意义。



* $P < 0.05$

图1 黏液型PA与非黏液型PA Cif基因表达量

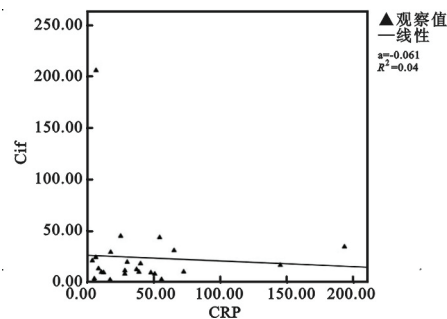


图2 CRP与Cif基因表达相关性

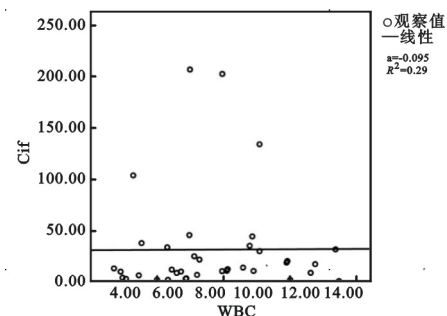


图3 WBC与Cif基因表达相关性

3 讨论 铜绿假单胞菌是院内感染常见的条件致病菌,尤其多见于老年患者,易导致慢性难治性感染,其难治性与生物被膜形成相关。现有研究表明,铜绿假单胞菌携带有:外毒素A(toxA)、一氧

化氮还原酶(norA)、胞外酶 Y(exoY)、胞外酶 S(exoS)、脓菌素(PYP)、胞外酶 U(exoU)、胞外酶 T(exoT)和弹力蛋白酶(lasB)等多种毒力因子,其可通过阻碍宿主细胞蛋白质合成等作用来增强自身毒力,以及介导部分抗生素耐药。然而其并不能完全解释铜绿假单胞菌的耐药机制,与浮游细菌相比,生物被膜细菌对抗菌药物的抗性可提高10~1000倍,现有药物难以清除生物被膜,生物被膜细菌高度耐药的机制尚未阐明^[5]。Cif基因在囊性纤维化研究中被发现,其可在铜绿假单胞菌中表达,但Cif基因在黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌中的表达差异却未见报道,本次研究主要对两种不同类型的铜绿假单胞菌Cif基因表达差异作比较。Cif可以使肺泡上皮细胞氯离子转运通道数量减少,从而减少肺泡表面黏液的分泌,降低了气管纤毛排除黏液的作用^[6],这也可能是黏液型铜绿假单胞菌感染不易清除反复发作的原因。本次研究显示,黏液型铜绿假单胞菌和非黏液型铜绿假单胞菌对应宿主CRP, WBC等炎症指标差异无统计学意义,其与Cif基因表达量相关性不明显,可能是因为本次研究分离铜绿假单胞菌为呼吸道分离菌株,其可为感染菌或定植菌,故不与宿主炎症程度相关,而此炎症因子与PA感染也无特异性;研究还提示黏液型PA检出率与支气管扩张相关,其检出率为65%,可能黏液型PA在支气管扩张病人中较其它菌更利于生存定植。Saue等^[7]研究发现黏液型PA和非黏液型PA在流动介质中可形成不同类型的生物被膜,黏液型PA为塔状或蘑菇状,非黏液型PA则为薄膜状。逆转录PCR结果显示,黏液型铜绿假单胞菌Cif基因表达量显著高于非黏液型铜绿假单胞菌($t=2.09$, $P<0.05$),提示Cif基因表达量可能与黏液型菌落及不同类型生物被膜的形成有关,可能为PA新的毒力因子,但均需

要进一步研究证实。随着人工关节等医疗器械的使用,生物被膜的研究显得越来越重要,传统研究认为铜绿假单胞菌生物被膜的形成与藻酸盐的合成有关,本次研究结果为铜绿假单胞菌生物被膜研究提供了新的方向,这对于阐明铜绿假单胞菌生物被膜的形成机制及耐药性研究均有重大意义。

参考文献:

- [1] Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2008, 35(5):124-134.
- [2] Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix[J]. Mol Microbiol, 2010, 75(4):827-842.
- [3] Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride[J]. Physiol Rev, 1999, 79: s23-s45.
- [4] Alicia E, Christopher D, Emily L, et al. Epoxide-mediated CifR repression of cif gene expression utilizes two binding sites in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(19):5315-5324.
- [5] 田德英,倪明,余冰,等.黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌生物被膜形成及藻酸盐基因的表达差异[J].中华传染病杂志,2006,24(3):155-158.
Tian DY, Ni M, Yu B, et al. The investigation of biofilm formation, alginate biosynthetic genes expression and sequence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2006, 24(3):155-158.
- [6] Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy[J]. Annu Rev Med, 2007(58):157-170.
- [7] Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm[J]. Bacteriol, 2002, 184(4):1140-1154.
- [8] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines [J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2000, 31(4):1005-1013.
- [9] Murtaugh PA, Dickson ER, Van Dam GM, et al. Primary biliary cirrhosis: prediction of short-term survival based on repeated patient visits[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 1994, 20(1 Pt 1):126-134.
- [10] Griffiths L, Jones DE. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis and its fatigue[J]. Digestive Diseases (Basel, Switzerland), 2014, 32(5):615-625.
- [11] Griffiths L, Dyson JK, Jones DE. The new epidemiology of primary biliary cirrhosis[J]. Seminars in Liver Disease, 2014, 34(3):318-328.
- [12] 王洪泓,周晔,胡志德,等.原发性胆汁性肝硬化患者外周血TNFSF9的表达及其疾病关联性[J].现代检验医学杂志,2010,25(2):25-30.
Wang QH, Zhou Y, Hu ZD, et al. Expression of TNFSF9 in the peripheral blood mononuclear cells of primary biliary cirrhosis patients and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(2):25-30.
- [13] Pan HF, Leng RX, Li XP, et al. Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24(6):515-522.

收稿日期:2015-04-05

修回日期:2015-12-23

收稿日期:2015-12-09

修回日期:2016-01-04