

金黄色葡萄球菌表面蛋白 Ebh 致病性的研究进展*

景双艳¹, 王晓宁¹, 魏莲花², 李可可¹, 林赋桂³, 余甜¹, 谢越¹, 闫亚芳³ (1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000; 3. 宁夏医科大学, 银川 750000)

摘要:细菌感染一直以来都是全球医学专家共同面临的一个难题,特别是当越来越多种类的耐药致病菌的出现。金黄色葡萄球菌既是共生菌又是人类病原体,是引起人类感染性疾病的重要病原菌之一,能够引起局部化脓感染,包括肺炎、伪膜性肠炎、心包炎,甚至败血症、脓毒症等全身感染。有研究发现,在金黄色葡萄球菌表面存在着一种巨蛋白,称为 Ebh (EC-binding protein homologue)。Ebh 作用于生物膜的黏附、聚集,与其致病性密切相关。该文将对其进行综述。

关键词:金黄色葡萄球菌; Ebh 蛋白; 致病性

中图分类号: R378.11; R446.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2019)02-156-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.040

Advances in Research on Pathogenicity of *Staphylococcus Aureus* Surface Protein Ebh

JING Shuang-yan¹, WANG Xiao-ning¹, WEI Lian-hua², LI Ke-ke¹, LIN Fu-gui³, YU Tian¹, XIE Yue¹, YAN Ya-fang³ (1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, China; 3. Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, China)

Abstract: Bacterial infections have long been a problem faced by medical experts around the world, especially as more and more types of resistant pathogens emerge. *Staphylococcus aureus* is both a commensal and a human pathogen, and is one of the important pathogens causing human infectious diseases. It can cause localized purulent infections, including pneumonia, pseudomembranous colitis, pericarditis, and even systemic infections such as sepsis and sepsis. Studies have found that there is a giant protein on the surface of *Staphylococcus aureus*, called Ebh (EC-binding protein homologue). Ebh acts on the adhesion and aggregation of biofilms and is closely related to its pathogenicity. This article will review the following sections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Ebh protein; pathogenicity

金黄色葡萄球菌不仅是一种非常重要的人体病原菌,也是一种可怕的机会性病原菌。金黄色葡萄球菌引起的感染遍及各科,人体各部位,已成为血流感染、心内膜炎等医院感染的致病菌。而且金黄色葡萄球菌在形成生物膜后,包被在生物膜中的细菌可以逃避宿主免疫系统的攻击,其致病性大大增加^[1],生物膜形成不但是金黄色葡萄球菌的重要毒力因子,也是造成细菌耐药性的重要原因。其表面蛋白^[2] Ebh 与细菌生物膜的形成及致病性密切相关,该蛋白能显著增强耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)与宿主上皮细胞的黏附能力和细菌自身黏附与聚集能力,促进 MRSA 在宿主易感部位的成功定植和繁殖。推测 Ebh 蛋白可能是金黄色葡萄球菌关键性的致病因子,与金黄色葡萄球菌的致病性相关。

1 Ebh 的基本结构 Ebh 蛋白是金黄色葡萄球菌表面存在的一种细胞外基质结合蛋白^[3],为金黄色葡萄球菌染色体上 33kb 的最大开放阅读框架,占

有效基因组的 1%,是一种在葡萄球菌中发现的巨大蛋白(GSSP)^[4],为 1.1MDa^[5],该基因编码的 MDa 与链球菌(*Streptococcus defectivus*)的主要黏附蛋白同源,含有几个结构域,包括一个由 126 个氨基酸组成的 52 个不完全重复序列的大中心区域。该领域进一步分为两个模块:未表征的糖结合模块(S 模块)和 G 相关的清蛋白^[6]结合模块(A 模块)。由于两种模块都存在于一系列细菌细胞表面蛋白中,并且 Ebh 的 C 末端区域还包含 DUF1542 的第八次迭代^[7]。使用电子显微镜观察含有 10 个重复单元部分的 Ebh 蛋白的棒状结构。观察到部分 Ebh 蛋白的结构是扭曲的并且长度约为 520a,宽度约为 21a,表明 Ebh 结构域连接形成棒状结构。而且晶体结构数据显示 Ebh 蛋白的模拟结构是扭曲的,类似于弦的特征^[5]。

2. 金黄色葡萄球菌表面蛋白 Ebh 的致病性

2.1 金黄色葡萄球菌表面蛋白 Ebh 使血浆凝集 葡萄球菌属细菌是一群革兰阳性球菌^[8],常排列成

* 基金项目:甘肃省自然科学基金(17JR5RA035)。

作者简介:景双艳(1991—),女,硕士在读,从事微生物研究,E-mail:960112698@qq.com。

通讯作者:魏莲花(1965—),主任检验师,硕士生导师,E-mail:weilianhua0199@sina.com。

不规则的葡萄串状。分布于自然界、人的体表及与外界相通的腔道中,多不致病。主要致病菌为金黄色葡萄球菌,可定植于正常皮肤和鼻咽部,其中医务人员带病率可高达70%以上,是医院内交叉感染的重要来源^[7]。有研究表明金黄色葡萄球菌ArlRS通路可以调控Ebh的表达,从而调节金黄色葡萄球菌的凝集能力^[9-10],协同性的促进金黄色葡萄球菌血浆凝固酶的产生,Ebh在金黄色葡萄球菌中的携带率高达80%。推测Ebh蛋白可能是金黄色葡萄球菌关键的致病因子,与金黄色葡萄球菌的致病性有关。我们课题组实验表明,Ebh在金黄色葡萄球菌致病株中阳性率较高,特别是血流感染及肺部感染有很高的携带率,而在伤口分泌物标本中携带率较低,并且在皮肤和鼻腔正常定植株中没有检测到Ebh基因。通过对Ebh阴性野生株(12株)、USA300 Ebh基因^[11]阳性株及USA300 Ebh基因阴性突变株分别进行细菌血浆凝集实验。结果表明,USA300 Ebh阳性株凝集率随着时间的推移而不断增加;而Ebh阴性野生株凝集率远低于USA300 Ebh阳性株,而且曲线趋近USA300 Ebh阴性突变株^[12]。初步说明Ebh可以促进金黄色葡萄球菌体的凝集,增强金黄色葡萄球菌的初始黏附能力^[13],而初始黏附和聚集能力的增强是金黄色葡萄球菌形成生物膜和菌体定植的关键步骤,也是增强致病性的重要因素。

2.2 ArlRs系统调控金黄色葡萄表面蛋白Ebh

ArlRs称自溶调节因子,是一种毒力调节剂,它调节Ebh的凝集,通过负调控和抑制大面积蛋白Ebh的产生。当ArlRS无功能时,通过金黄色葡萄球菌表面大蛋白(GSSP)的作用阻止金黄色葡萄球菌凝集,这些表型在败血症和感染性心内膜炎的兔模型中得到证实。当ArlRs突变时,则Ebh蛋白过表达,参与凝集的因素(如ClfA,sortase,凝血酶)的mRNA的转录没有明显变化。为了更清楚地了解凝集过程并确定这些相互作用与生物膜群落的接近程度,测试了几种不同的金黄色葡萄球菌菌株的凝集能力,包括USA300(LAC-WT),USA400(MW2)和Newman,2h内分别为78%,82%和70%的凝集。以USA300为例,进一步证明Ebh是否在LAC△ArlRS突变体中上调,使用qPCR来评估转录物水平,在早期对数生长期,与LAC-WT相比,LAC△ArlRS中Ebh表达增加近50倍;同时在LAC-WT中构建LAC△Ebh单突变体和LAC△ArlRS△Ebh双突变体菌株,利用凝集测定法观察到,ArlRS突变体中GSSP的过表达导致LAC△ArlRS不能凝集,并且这种表型在ArlRS突变体中突然破坏GSSP表达时被消

除。为了解释这一现象,进行了光学显微镜检查,图像显示LAC△Ebh和LAC△ArlRS△Ebh突变体均形成与LAC-WT相似的紧密团块,而LAC△ArlRS突变体细胞则松散聚集在一起,表明LAC△ArlRS突变体中Ebh基因的过表达是导致凝集抑制的主要因素。最后发现ArlRS双组分调节系统通过调节编码巨型葡萄球菌表面蛋白(GSSP)的Ebh基因的表达来控制凝集^[14-15]。

2.3 金黄色葡萄球菌MgrA调控Ebh的表达

金黄色葡萄球菌是引起人类共生机会性病原体^[16],在体内感染的部位广泛。金黄色葡萄球菌的特征之一是在可溶性纤维蛋白原存在的情况下能够形成凝块,并促进对宿主组织的黏附^[17]。Ebh和SraP是金黄色葡萄球菌产生的两个最大的细胞外蛋白,细胞表面增加的Ebh和SraP会干扰细胞间的纤维蛋白交联,而纤维蛋白是凝块所必需的。之前已有证明ArlRs双组分调控系统控制凝块,在这里,又有研究发现ArlRs不是直接调控Ebh,而是ArlRs激活了调控因子MgrA的表达,从而使MgrA调控Ebh。MgrA如何控制凝块,他们使用qPCR来研究MgrA是否调控凝块的基因表达,值得注意的是Ebh的表达蛋白含量增加了28倍,而其他所有测试基因的变化<2.5倍,基因经过测试,MgrA发现似乎最有可能抑制Ebh。MgrA通过测量Ebh转录报告基因的表达来调控Ebh,其中Ebh启动子区域与GFP融合,在培养基中,野生型菌株的Ebh表达非常低,提示MgrA抑制Ebh。同样的,通过dot blot检测Ebh蛋白水平,发现与Ebh特异性相关的物质含量显著增加,而且使用5'RACE绘制Ebh启动子,假定转录起始位点,位于上游200个核苷酸GTG启动密码子,MgrA与六核苷酸序列(A/T)GTTGT^[18]结合。作为二聚体DNA结合蛋白^[19]的Mar/SlyA家族,在Ebh启动子附近至少有两个潜在的MgrA结合位点,其中一个位点位于假定转录起始位点下游的23个核苷酸中心,第二个潜在的MgrA结合位点位于假定的-35元素上游的11个核苷酸中心。他们使用跨越下游潜在MgrA结合位点的50bp DNA探针测试MgrA能够直接与Ebh启动子相互作用。而且MgrA能够与Ebh启动子探针结合,这种结合可以与一个相同的未标记的10倍多的倍数竞争,Ebh-GFP融合的表达在mgram中更高,提示MgrA抑制Ebh。综合这些结果表明MgrA通过直接与Ebh启动子相互作用抑制Ebh^[5]。

2.4 Ebh在小菌落突变株(SCV)中表达与生物膜形成中的作用 SCV^[20]是金黄色葡萄球菌在感染

过程中形成的一种特殊的变体,该菌在持续性、复发性^[21]、难治性金黄色葡萄球菌相关感染中备受关注^[22]。SCV 经常不稳定,存在于宿主细胞内的 SCV 可恢复成高毒力,使宿主细胞裂解导致复发或慢性感染^[23]。研究表明,对于许多金黄色葡萄球菌菌株,当它们转向 SCV 生活方式时,存在细胞外基质的形成。SCV 细胞外基质是 eDNA 和蛋白质,而不是多糖,这与金黄色葡萄球菌生物膜有很大的不同。细胞外基质中含有 Ebh 蛋白,它参与金黄色葡萄球菌的毒力^[11],在稳定的 SCV 细胞中,Ebh 表达大幅增加,它通过干扰肽聚糖的生物合成和稳定性来影响金黄色葡萄球菌的细胞大小^[11]。虽然表面蛋白 Ebh 的诱导在以前 SCVs 中从未见过,但可以确定它是 SCV 生活方式中的一个核心因素,他可能是与稳定的 SCV 连接的独特细胞外基质中的一个潜在因素。总之,金黄色葡萄球菌 SCV 能适应胞内生存并可以保护细菌免受抗生素药物和宿主防御系统的攻击,加之 SCV 自身对一些抗菌药物敏感性的降低^[24],使得金黄色葡萄球菌 SCV 感染的危害更为严重^[25],因此,Ebh 蛋白可以为 SCV 提供一个新的研究方向,从而为发展更为有效的 SCV 鉴定及治疗方法探索新思路、新靶点。

3 展望 总之,Ebh 蛋白作为存在于金黄色葡萄球菌表面的巨大蛋白有其独特的意义,其被预测为膜锚定并以纤维方式从细胞表面突出,该蛋白含有许多糖结合和清蛋白结合重复结构域,被认为对结合细胞外基质蛋白很重要。探明 Ebh 在金黄色葡萄球菌致病中的作用及机制,为开发针对金黄色葡萄球菌关键致病因子的药物提供潜在靶标,从而有效控制难治性金黄色葡萄球菌感染。但其是否广泛存在于各种环境、不同克隆株及不同致病性的金黄色葡萄球菌中还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LISTER J L, HORSWILL A R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4(4): 178.
- [2] GEOGHEGAN J A, FOSTER T J. Cell wall-anchored surface proteins of *Staphylococcus aureus*; many proteins, multiple functions [J]. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 2015, 409: 95-120.
- [3] KAISER M L, THOMPSON D J, MALINOSKI D, et al. Epidemiology and risk factors for hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among burn patients [J]. *Journal of Burn Care & Research*, 2011, 32(3): 429-434.
- [4] CLARKE S R, HARRIS L G, RICHARDS R G, et al. Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus* [J]. *Infection & Immunity*, 2002, 70(12): 6680.
- [5] CROSBY H A, SCHLIEVERT P M, MERRIMAN J A, et al. The *Staphylococcus aureus* global regulator mgrA modulates clumping and virulence by controlling surface protein expression [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(5): e1005604.
- [6] ETZ H, MINH D B, HENICS T, et al. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(10): 6573-6578.
- [7] SAKAMOTO S, TANAKA Y I, TANAKA I, et al. Electron microscopy and computational studies of Ebh, a giant cell-wall-associated protein from *Staphylococcus aureus* [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2008, 376(2): 261-266.
- [8] KAHL B C, HEESEMANN J. Impact of *Staphylococcus aureus* on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(8): 514-519.
- [9] WALKER J N, CROSBY H A, SPAULDING A R, et al. (2013) The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(12): e1003819.
- [10] PAHARIK A E, HORSWILL A R. The *Staphylococcal* biofilm; adhesins, regulation, and host response [J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(2): 1-48.
- [11] CHENG A G, MISSIAKAS D, SCHNEEWIND O. The giant protein Ebh is a determinant of *Staphylococcus aureus* cell size and complement resistance [J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(5): 971-981.
- [12] 李可可, 魏莲花, 陈晓青, 等. 金黄色葡萄球菌细胞外基质结合蛋白表达基因 ebh 检测及分子流行特征 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(16): 2459-2462, 2469.
LI Keke, WEI Lianhua, CHEN Xiaoqing, et al. Distribution of the extracellular matrix-binding protein encoding gene EBh and its molecular epidemic characteristics in *Staphylococcus aureus* strains [J]. *Journal of Nosocomial Infections*, 2018, 28(16): 2459-2462, 2469.
- [13] CHRISTNER M, FRANKE G C, SCHOMMER N N, 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.
- [14] TENNIFER N W, HEIDI A C, ADAM R S, et al. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(12): e1003819.
- [15] 罗东, 万腊根, 陈开森. 金黄色葡萄球菌促凝因子研究进展 [J]. *实验与检验医学*, 2017, 35(3): 293-296.
LUO Dong, WAN Lagen, CHEN Kaisen. Research progress of coagulating factors of *Staphylococcus aureus* [J]. *Experimental and Laboratory Medicine*, 2017, 35(3): 293-296.
- [16] TONG S Y, DAVIS J S, EICHENBERGER E, et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28

- (3):603-661.
- [17] JI yindu. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols[M]. New Jersey: Totowa, Humana Press Inc;2017.
- [18] MANNA A C, INGA VALE S S, MALONEY M B, et al. Identification of sarV(SA2062), a new transcriptional regulator, is repressed by sarA and mgrA(SA0641) and involved in the regulation of autolysis in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(16):5267-5280.
- [19] CHEN P R, BAE T, WILLIAMS W A, et al. An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus* [J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2(11):591-595.
- [20] 何春燕, 刘庆中. 金黄色葡萄球菌小菌落突变株研究进展及其临床意义[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(4):468-473.
- HE Chunyan, LIU Qingzhong. Research updates and the clinical implications of *Staphylococcus aureus* small colony variants[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2017, 17(4):468-473.
- [21] KIM H K, FALUGI F, MISSIAKAS D M, et al. Peptidoglycan-linked protein A promotes T cell-dependent antibody expansion during *Staphylococcus aureus* infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(20):5718-5723.
- [22] KAJL B C, BECKER K, LÖFFLER B. Clinical significance and pathogenesis of *Staphylococcal* small colony variants in persistent infections[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2016, 29(2):401-427.
- [23] MELTER O, RADOJEVIĆ B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*-review[J]. Folia Microbiologica, 2010, 55(6):548-558.
- [24] GARCIA L G, LEMAIRE S, KAHL B C, et al. Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of in vitro, animal and clinical data [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(7):1455-1464.
- [25] TAN N C, COOKSLEY C M, ROSCIOLI E, et al. Small-colony variants and phenotype switching of intracellular *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis[J]. Allergy, 2014, 69(10):1364-1371.

收稿日期:2019-01-03

修回日期:2019-01-27