

细胞壁锚定蛋白SasX调控RNAIII参与金黄色葡萄球菌ST239克隆生物膜形成及致病性相关研究

张利^{1,2} 张阳³ 马菁菁³ 喻哲昊³ 葛亮^{1,2} 孙林春³

【摘要】目的 探讨金黄色葡萄球菌(SA)细胞壁锚定蛋白SasX对RNAIII转录表达的调控,揭示其对SA的生物膜(BF)形成和致病过程的作用。**方法** 收集2022年4~6月南京医科大学附属儿童医院住院患儿临床样本中分离的SA ST239克隆,采用基因敲除和回补技术建立突变株 Δ SasX和回补株 Δ SasX(pRB473-SasX),经RNAIII抑制肽(RIP)处理,再采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测SasX基因对RNAIII转录水平的影响,绘制增殖曲线观察菌株生长速度,镜下观察菌株聚集能力,半定量实验观察BF形成,并采用qPCR验证BF形成相关基因表达。**结果** Δ SasX株的RNA III水平显著低于野生株($t = 4.273$ 、 $P = 0.037$)。 Δ SasX株BF形成能力较野生株显著减弱($t = 4.619$ 、 $P = 0.032$)。 Δ SasX(pRB473-SasX)+RIP株BF形成能力显著低于 Δ SasX(pRB473-SasX)株($t = 7.874$ 、 $P = 0.011$)。 Δ SasX株icaA($t = 5.324$ 、 $P = 0.027$)、sarA($t = 6.250$ 、 $P = 0.016$)和fnbA($t = 4.833$ 、 $P = 0.031$) mRNA水平显著低于野生株; Δ SasX(pRB473-SasX)+RIP株icaA($t = 4.386$ 、 $P = 0.034$)和sarA($t = 5.531$ 、 $P = 0.023$) mRNA水平较 Δ SasX(pRB473-SasX)株显著降低。镜下可见野生株有大片聚集成团, Δ SasX株多为单个散在分布或小范围聚集, Δ SasX株的聚集能力较野生株显著减弱; Δ SasX(pRB473-SasX)株的聚集能力和野生株相当, Δ SasX(pRB473-SasX)+RIP株的聚集能力较 Δ SasX(pRB473-SasX)株减弱。**结论** SA SasX通过调控RNAIII的转录表达,促进细菌的聚集和BF形成能力,从而参与其致病过程。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 细胞壁锚定蛋白; 群体感应系统; 生物膜

Surface-anchored protein SasX involves in the biofilm formation and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* ST239 clone by regulating RNAIII Zhang Li^{1,2}, Zhang Yang³, Ma Jingjing³, Yu Zhehao³, Ge Liang^{1,2}, Sun Linchun³. ¹Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210009, China; ²Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210009, China; ³Clinical Laboratory, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: Sun Linchun, Email: 451377086@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the regulation of RNAIII transcription by *Staphylococcus aureus* (SA) surface-anchored protein SasX and its effect on bacterial aggregation and biofilm (BF) formation, which will reveal the effect of SasX on the pathogenicity of SA ST239 clones via RNAIII. **Methods** SA ST239 HS770 isolated from clinical specimens of hospitalized children of Children's Hospital of Nanjing Medical University from April to June in 2022 was used to establish mutant strains Δ SasX and complementary strains Δ SasX(pRB473-SasX) by gene knockout and complementation technology, and further treated with RNAIII inhibitory peptide (RIP). The effect of SasX gene on RNAIII transcription level was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the growth rate of the strains was observed by proliferation curve. The

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2023.04.006

项目基金: 南京市卫生科技发展专项资金项目(No. YKK20125); 南京医科大学科技发展基金项目(No. NMUB20210074)

作者单位: 210009 南京市, 南京中医药大学附属中西医结合医院检验科¹; 210009 南京市, 江苏省中医药研究院²; 210008 南京市, 南京医科大学附属儿童医院检验科³

通信作者: 孙林春, Email: 451377086@qq.com

aggregation ability was analyzed by microscopic examination and the BF formation was observed by semi-quantitative BF formation experiments. **Results** The RNAIII of Δ SasX was significantly lower than that of wild strain ($t = 4.273$, $P = 0.037$). The BF formation ability of the Δ SasX was significantly weaker than that of the wild strain ($t = 4.619$, $P = 0.032$). The BF-forming ability of the Δ SasX (pRB473-SasX) + RIP strain was significantly lower than that of the Δ SasX (pRB473-SasX) ($t = 7.874$, $P = 0.011$). The mRNA levels of *icaA* ($t = 5.324$, $P = 0.027$), *sarA* ($t = 6.250$, $P = 0.016$) and *fnbA* ($t = 4.833$, $P = 0.031$) in the Δ SasX were significantly lower than those in the wild strain. The levels of *icaA* ($t = 4.386$, $P = 0.034$) and *sarA* ($t = 5.531$, $P = 0.023$) mRNA in the Δ SasX (pRB473-SasX) + RIP strain were significantly lower than those in the Δ SasX (pRB473-SasX). Under the microscope, it can be seen that the wild strains had large aggregates and clusters, and the Δ SasX were mostly scattered alone or aggregated in a small area. The aggregation ability of the Δ SasX was obviously weaker than that of the wild strain, the aggregation ability of the Δ SasX (pRB473-SasX) + RIP strain was weaker than that of the Δ SasX (pRB473-SasX). **Conclusions** SA SasX promotes the aggregation and enhances the ability of BF formation of SA by regulating the transcriptional expression of RNAIII, and thus participates in its pathogenic processes.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; Surface-anchored protein; Quorum sensing system; Biofilm

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 为院内新生儿定植和感染最主要的病原菌, 可引起疖、脓疱病^[1], 甚至肺炎^[2]、骨髓炎^[3]以及毒素休克综合征^[4]等侵袭性感染。随着抗菌药物的过度、不恰当使用, 导致耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的出现使临床用药面临严峻挑战。我国新生儿及儿童的MRSA感染率逐年上升^[5-7], ST239是目前我国医疗机构环境中MRSA流行的最主要优势克隆之一^[8-10], 具有耐药程度高和传播速度快的特点。

SA能表达各类表面蛋白, 这些表面蛋白通常以共价形式锚定在细胞壁肽聚糖上, 故被称为细胞壁锚定蛋白。研究证明, 细胞壁锚定蛋白对SA定植、生物膜形成、免疫逃避和毒力形成都有影响, 在SA致病过程中有重要作用。不同SA菌株表达的表面蛋白数量和种类不同, 根据已公布的全基因组测序结果, MRSA ST239克隆株较其他18株已测序的克隆株基因组表达一种全新的细胞壁锚定蛋白SasX^[11]。近来有研究^[12]发现, SasX与MRSA感染相关, 但机制尚不明确。

病原菌通过产生和分泌一些低分子量的自诱导肽 (autoinducing peptides, AIPs), 当AIPs达到一定浓度时启动群体感受 (quorum sensing, QS) 系统^[13]。细菌通过QS感受群体密度, 调控细菌生长、黏附、定植、生物膜形成和侵袭等过程, 在感染过程中发挥重要作用^[14]。RNAIII作为一类具有复杂二级结构的调节性RNA, 进化上高度保守, 是SA QS系统重要的下游胞内效应分子^[15]。关于

RNAIII与病原菌的结构功能分析发现, RNAIII可能作为反义分子调节胞外蛋白和多功能调节因子的转录。Bronesky等^[16]报道, 金黄色葡萄球菌的RNAIII与群体感应、应激反应、代谢适应和毒力基因表达调控均有关。为探讨RNAIII与SasX间的联系, 以及其对MRSA致病性的作用, 本研究选取ST239克隆株为研究对象, 构建SasX基因缺失突变株, 通过功能互补实验明确SasX蛋白对RNAIII生成的调控, 旨在揭示SasX和RNAIII在SAST239克隆致病性中所起的重要作用, 为抗SA感染的精准用药或疫苗研发提供有价值的生物靶点, 现报道如下。

资料与方法

一、实验材料

收集SA ST239克隆株HS770分离自2022年4~6月南京医科大学附属儿童医院住院患儿的临床样本, SA RN4220、质粒pKORI和pBR473均为实验室保存, 可接受革兰阴性菌来源的质粒。大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. Coli*) DH5 α 购自日本TaKaRa公司。

二、主要试剂

限制性内切酶 (美国NEB公司), 细菌基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]、PCR扩增及纯化试剂盒 (日本TaKaRa公司)、SYBR Green I 荧光定量PCR酶[宝生物(大连)工程有限公司]、RNAIII抑制肽 (RNAIII-inhibiting peptide, RIP) (上海生工生物工程有限

公司)、Gateway®BPCLonase™IIEnzyme Mix试剂盒(美国Invitrogen公司)、质粒抽提试剂盒(碧云天生物技术有限公司)、QuantiTect逆转录试剂盒(美国Qiagen公司),引物由上海吉玛公司合成,基因测序由华大基因科技有限公司完成。

三、实验设计

SA HS770野生株、 Δ SasX株、 Δ SasX(pRB473-SasX)株和 Δ SasX(pRB473-SasX)+RIP株和 Δ SasX(pRB473)株。野生株为临床标本分离的SAST239克隆株HS770,不做任何处理; Δ SasX株为利用pKOR1系统将SasX基因从细菌基因组上敲除的突变株; Δ SasX(pRB473-SasX)株为将SasX重组质粒再次转入 Δ SasX株后建立的SasX基因互补表达株; Δ SasX(pRB473-SasX)+RIP株为在 Δ SasX(pRB473-SasX)株细菌的培养基中加入最终浓度为250 μ g/ml的RIP处理。

四、HS770 Δ SasX株和回补表达菌株构建

1. Δ SasX株构建:用pKOR1系统建立 Δ SasX突变株,以HS770染色体基因组为模板,扩增SasX系统上游片段(表1中引物SasX-att1和SasX-rev1),在两端加上BamH I与EcoR I酶切位点;扩增SasX系统下游片段(表2中引物SasX-rev2和SasX-att2),在两端加上Hind III以及EcoR I酶切位点,连接到pET28a载体,使SasX基因的上下游同源臂连在一起。以pET28a- Δ SasX质粒作为模板,在SasX基因上下游同源臂上设计引物(表中引物SasX-att1和SasX-att2)进行PCR反应,扩增出上下游片段相连的序列,经测序无误后,建立反应体系,转化,涂板;第2天挑取菌落,摇菌,用质粒抽提试剂盒提取质粒pKOR1- Δ SasX,转入SARN4220;培养16 h,挑取单个菌落接种于含有氯霉素(10 μ g/ml)的TSB培养基,抽提重组质粒后,经PCR鉴定序列正确,将质粒转入HS770菌株

中,经氯霉素和脱水四环素筛选,PCR对SasX进行检测鉴定基因是否从基因组上敲除成功。

2. SasX回补表达菌株构建:以HS770染色体基因组为模板,并在基因上下游添加Pst I和EcoR I酶切位点,通过PCR扩增含酶切位点的SasX基因全长片段,连入穿梭质粒pRB473获得重组质粒pRBSasX,抽提重组质粒,电转(电压2 kV,电容25 μ F,电阻100 Ω)金黄色葡萄球菌RN4220;抽提重组质粒后,以相同条件转入SasX基因敲除的ST239克隆株HS770,建立SasX回补表达株。实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测SasX mRNA的水平,确定SasX转入敲除菌株并顺利表达。

五、qRT-PCR检测 Δ SasX株和回补表达株的RNAIII基因表达

将各组菌株用新鲜的TSB培养基稀释至 $A_{600\text{ nm}} = 0.1$,再在摇床上以37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min增菌16 h,收集细菌沉淀并提取总RNA,反转录为cDNA后,以gyrB为内参。用ABI 7500定量PCR仪进行定量PCR,每组设3个独立样本重复,每个样本设3个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法,将各组内参基因的相对表达水平归一为1,计算各组RNAIII mRNA的相对表达。RNAIII上游引物:5'-ATAGCACTGAGTCCAAGGAACTAACT-3',下游引物:5'-GCCATCCCACTTAATAACCA TGT-3'。

六、SA生物膜形成能力的检测

SA生物膜(biofilm, BF)形成能力的检测:将各组菌株用TSA平板培养24 h,挑取单菌落用TSB培养液,置于37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min摇床连续培养24 h,用生理盐水将菌液调整为0.5%麦氏浓度,取5 μ l菌液接种至24孔板,用胰酪大豆培养肉汤培养24 h,弃培养液,用无菌PBS洗涤24孔板3次后,用1%结晶紫染色15 min,流水冲洗,室温干燥,每

表1 Δ SasX株和回补表达菌株构建相关的基因PCR引物序列

| 基因名称 | 引物序列(5'→3') |
|-------------|--|
| SasX-att1 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTAGGCTTGCACTTGATCAATATACCAACCATG |
| SasX-rev1 | TTTATAAGTATCATATCCATAAAACACA |
| SasX-rev2 | GTTTTATGGATATGATACTTATAAATTTTATTT |
| SasX-att2 | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGATGAAT |
| CSasX-Pst I | TGGGAGGAACTGCAGATGAAAAAATCTAAAG |
| CSasX-EcoR | GATATGATACTGAATTCTTATTAGAAATTAG |
| SasX-F | AGAATTAGAAGTACGTCTAAATGC |
| SasX-R | GCTGATTATGTAAATGACTCAAATG |

孔加入33%冰醋酸30 min后, 590 nm波长检测各孔A值。

七、qRT-PCR测定BF形成相关基因表达水平

将各组菌株用TSA平板培养24 h, qRT-PCR检测各组BF形成相关基因 $icaA$ 、 $sarA$ 和 $fnbA$ 的mRNA水平, 同方法五, 以 $gyrB$ 为内参。qRT-PCR引物见表2。

八、SA生长检测

将各组菌株用新鲜的TSB稀释至 $A_{600\text{ nm}} = 0.1$, 置于37℃, 200 r/min摇床连续培养4 h、8 h、12 h和24 h, 分别测定菌落形成单位(colony forming units, CFU), 绘制生长曲线, 观察各SA株的生长速度。

九、SA聚集能力的检测

挑取各组菌株的单个克隆, 接种到新鲜无菌的TSB培养液中, 置于摇床上37℃、200 r/min过夜。取10 μl菌液于载玻片上, 干燥后革兰染色, 镜下观察菌株的聚集能力。

十、统计学处理

采用SPSS 19.0软件对结果进行分析处理, 符合正态分布的计量资料(RNAIII水平、mRNA水平和A值)以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用独立样本t检验, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、 Δ SasX株和回补表达株的构建

以SasX-att1和SasX-att2为上下游引物, 以SA HS770野生株和构建的 Δ SasX株基因组DNA为模板的PCR结果见图1A, 野生株PCR产物为3 110 bp, SasX未敲除的克隆PCR产物与野生株大小一致, Δ SasX的PCR产物为2 495 bp。PCR产物经测

序并比对, 证实 Δ SasX株构建成功。

以SasX-F和SasX-F-R为上下游引物, 以抗性平板上长出的单克隆菌落基因组DNA为模板的PCR鉴定见图1B, 回补株 Δ SasX(pRB473-SasX)的PCR产物为615 bp, 经测序并比对, 证实回补株 Δ SasX(pRB473-SasX)构建成功。

二、SasX基因敲除对RNAIII转录水平的影响

Δ SasX株RNAIII水平低于野生株[(1.73 ± 0.21) vs. (3.02 ± 0.34): $t = 4.273$ 、 $P = 0.037$], Δ SasX(pRB473)株RNAIII水平低于野生株[(2.08 ± 0.32) vs. (3.02 ± 0.34): $t = 5.168$ 、 $P = 0.030$], Δ SasX(pRB473-SasX)株RNAIII水平与野生株差异无统计学意义[(2.97 ± 0.18) vs. (3.02 ± 0.34): $t = 1.135$ 、 $P = 0.089$]。见图2。

三、SasX基因敲除对SA生物学特性的影响

1. SasX基因敲除对SA BF形成的影响: 野生株、 Δ SasX株、 Δ SasX(pRB473-SasX)株、 Δ SasX(pRB473-SasX) + RIP株和 Δ SasX(pRB473)株的A值分别为(0.5236 ± 0.0625)、(0.3764 ± 0.0537)、(0.4863 ± 0.0351)、(0.2723 ± 0.0276)和(0.3247 ± 0.0423), Δ SasX株和 Δ SasX(pRB473)株的BF形成能力较野生株减弱(Δ SasX株: $t = 4.619$ 、 $P = 0.032$; Δ SasX(pRB473)株: $t = 6.175$ 、 $P = 0.018$), Δ SasX(pRB473-SasX)株BF形成能力与野生株差异无统计学意义($t = 2.168$ 、 $P = 0.069$), 表明SasX能促进金SA的BF形成。 Δ SasX(pRB473-SasX) + RIP株的A值为(0.2723 ± 0.0276), 较 Δ SasX(pRB473-SasX)株显著降低($t = 7.874$ 、 $P = 0.011$), 提示抑制RNAIII会影响BF的形成。见图3。

培养24 h后 Δ SasX株 $icaA$ ($t = 5.324$ 、 $P = 0.027$)、 $sarA$ ($t = 6.250$ 、 $P = 0.016$)、 $fnbA$ ($t = 4.833$ 、 $P = 0.031$) mRNA水平低于野生株; Δ SasX(pRB473-SasX)株 $icaA$ ($t = 1.365$ 、 $P = 0.082$)、 $sarA$ ($t = 2.234$ 、 $P = 0.059$)和 $fnbA$ ($t = 1.689$ 、 $P = 0.073$) mRNA水平与野生株差异无统计学意义; Δ SasX(pRB473-SasX) + RIP株 $icaA$ ($t = 4.386$ 、 $P = 0.034$)、 $sarA$ ($t = 5.531$ 、 $P = 0.023$) mRNA水平较 Δ SasX(pRB473-SasX)株降低, $fnbA$ mRNA与野生株差异无统计学意义($t = 2.322$ 、 $P = 0.053$)。见图4。

2. SasX基因敲除对SA生长的影响: 野生株、

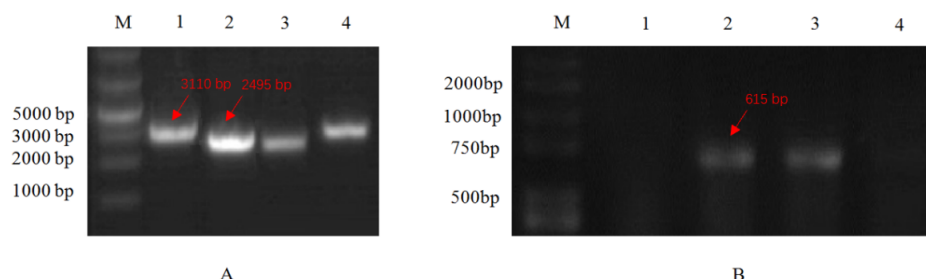
表2 生物膜形成相关基因的 qRT-PCR 引物序列

| 基因名称 | 引物序列 (5'→3') |
|-----------|---------------------------|
| $icaA$ -F | GTCAGACACTTGCTGGCGCAG |
| $icaA$ -R | GAGCCCATCTCACGCGTTGC |
| $sarA$ -F | AGCAGCAAGCTAAACCTCAAATTCC |
| $sarA$ -R | AAGATTTTACGTTTTTCCCAAACGC |
| $fnbA$ -F | TGGTGTCTGGTGCGGTTGGTG |
| $fnbA$ -R | GCGAAGCAGGTCACGTTGGAG |
| $gyrB$ -F | ACATTACAGCAGCGTATTAG |
| $gyrB$ -R | CTCATAGTGATAGGAGTCTTCT |

Δ SasX株、 Δ SasX (pRB473-SasX) 株、 Δ SasX (pRB473-SasX) + RIP株和 Δ SasX (pRB473) 株SA增殖曲线变化趋势一致, 各时间点的生长速度差异无统计学意义, 见图5。表明SasX和RNAIII不影响SA的生长速度,

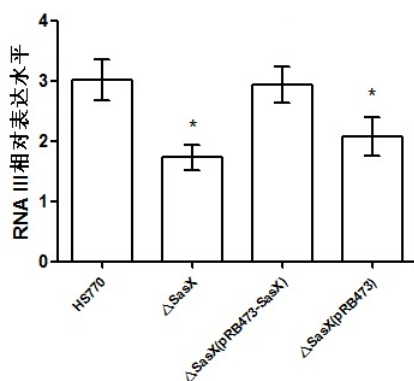
3. SasX基因敲除对SA聚集能力的影响: 镜下可见野生株有多处大片聚集成团, 而 Δ SasX株多为单个散在分布, 或小范围聚集, Δ SasX株的

聚集能力明显较野生株减弱; Δ SasX (pRB473-SasX) 株的聚集能力和野生株相当, Δ SasX (pRB473) 株的聚集能力与 Δ SasX株相当 (图6)。以上表明, SasX能促进SA的聚集, SasX敲除会导致细菌聚集能力减弱。而 Δ SasX (pRB473-SasX) + RIP株的聚集能力较 Δ SasX (pRB473-SasX) 株减弱, 与 Δ SasX株相当, 提示抑制RNAIII能导致SA的聚集减弱。



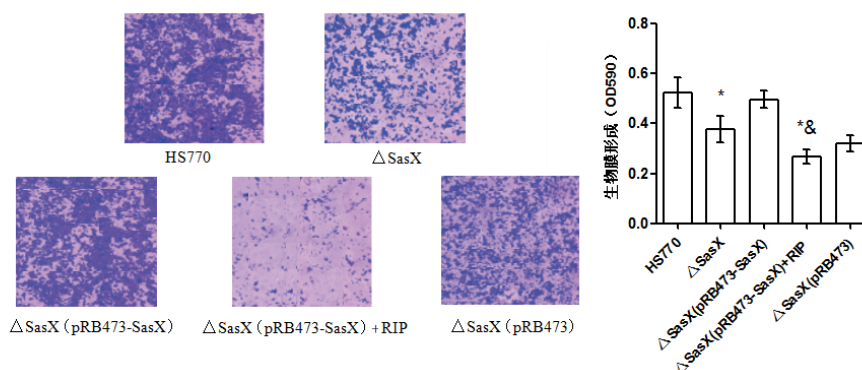
注: A: PCR筛选突变株 Δ SasX, M为marker, 1号泳道: 以金黄色葡萄球菌HS770基因组DNA为模板的扩增结果; 2~4号泳道: 以不能在含氯霉素平板生长、只能在无抗菌药物平板生长的单一克隆DNA为模板的扩增结果, 初步鉴定2号和3号泳道为SasX基因敲除成功的克隆。B: PCR筛选回补株 Δ SasX (pRB473-SasX), M为marker, 1~3号泳道为以在抗性平板上长出的单克隆菌落增菌后的扩增结果, 1号泳道无PCR产物, 2号和3号泳道产物大小符合SasX片段大小, 初步鉴定为回补株

图1 PCR筛选突变株 Δ SasX和回补株 Δ SasX (pRB473-SasX)



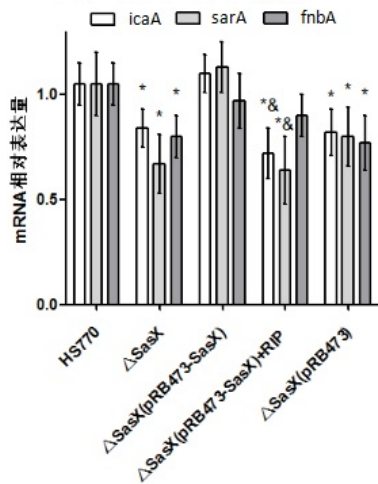
注: *与野生株相比: $P < 0.05$, &与突变株相比: $P < 0.05$ ($n = 3$)

图2 SasX对RNAIII表达的影响



注: *: 与野生株相比: $P < 0.05$, &: 与 Δ SasX (pRB473-SasX) 株相比: $P < 0.01$

图3 SA的BF形成



注：*：与野生株相比： $P < 0.05$ ，&：与 Δ SasX (pRB473-SasX) 株相比： $P < 0.05$

图4 金黄色葡萄球菌BF形成相关基因表达

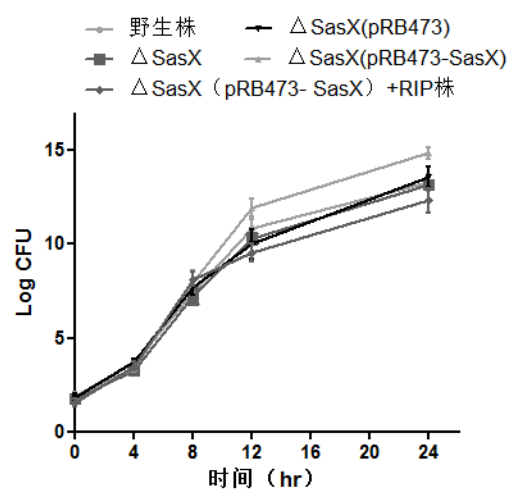
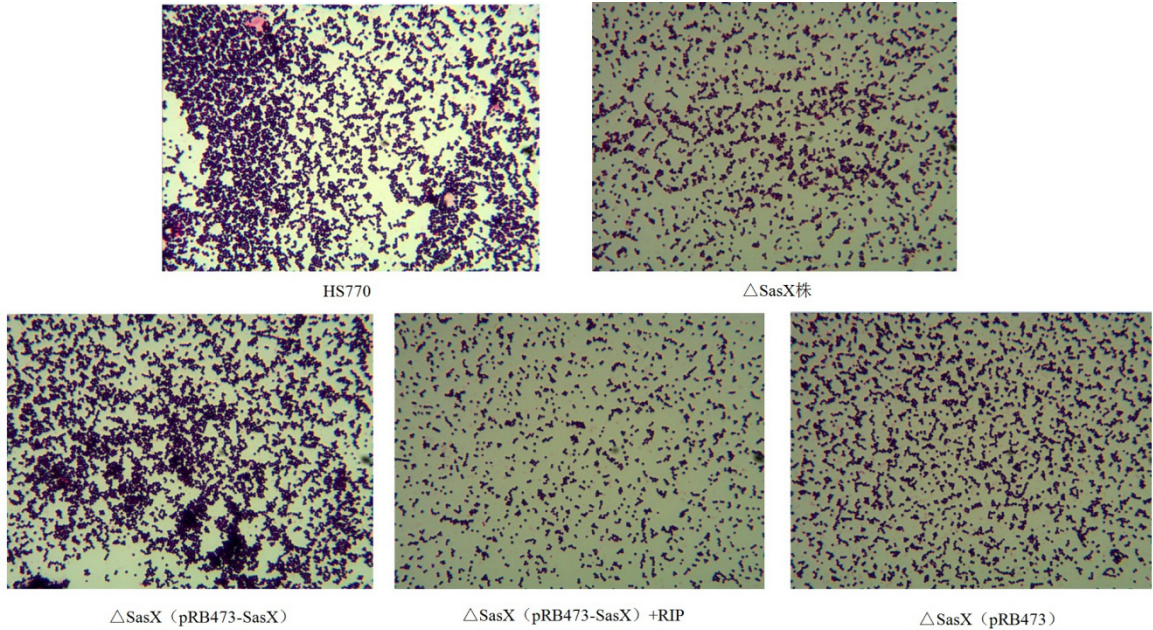


图5 SA的生长曲线



注：革兰染色，100 ×

图6 SA的聚集能力

讨 论

SA能表达各种表面蛋白，以共价键连接到细胞壁肽聚糖上，被称为细胞壁锚定蛋白。2010年，Holden对在英国暴发流行的MRSA ST239克隆进行全基因组测序，发现了1种之前尚未报道的细胞壁锚定蛋白同源序列，命名为SasX^[17]。SasX与表皮葡萄球菌的毒力因子SesI有较高的同源性（氨基酸序列95.1%同源性），SesI蛋白与表皮葡萄球菌的致病性关系密切^[18]，提示SasX可能具有与SesI相似

的生物学功能，是SA重要的致病因子。

BF是细菌分泌的一种细胞外基质，是细菌抵抗外界不良环境和宿主免疫清除的重要方式，也是细菌的致病因素^[19]。医院环境中抗菌药物和杀菌剂的应用较多，对SA的生长不利。有研究显示，健康人鼻腔分离的SA SasX携带率不足1%，院内致病性SA SasX携带率为17%~39%，ST239克隆的SasX携带率可高达83.8%。院内致病性SA有较高的SasX基因阳性率提示，SasX可能对细菌的BF形成有作用。

本研究采用基因敲除和回补技术获得细菌的SasX突变株和回补株,对筛选出的克隆经两轮压力筛选,超过70%均成功敲除了SasX基因。QS是细菌BF形成调控的研究热点,SA通过QS检测菌群数量和密度来感知周围环境,进而调控自身特定基因的表达,影响菌群的行为^[20]。RNAIII是QS系统重要的下游胞内效应分子。细菌持续分泌RNAIII激活肽,当RNAIII激活肽浓度升高到一定程度时,会导致其受体蛋白磷酸化,促进细菌胞外多糖、蛋白等BF基质的形成,增强细菌BF形成能力^[21],可见RNAIII与细菌的BF形成有关。本研究利用qRT-PCR检测发现,敲除SasX基因后,SA的RNAIII水平降低;而回补SasX基因后,RNAIII水平回复至野生株水平。结果表明,SasX基因对RNAIII的表达有调控作用。

本课题组对SasX基因敲除后SA的BF形成检测发现,将野生株的SasX基因敲除后,细菌BF形成能力减弱,回补SasX能恢复BF形成能力,结果表明SasX蛋白能影响SA的BF形成,可能是其引起医院内持续感染和MRSA的重要毒力因子。用RIP处理 Δ SasX(pRB473-SasX)株后,细菌的BF形成能力较 Δ SasX(pRB473-SasX)株减弱,提示抑制RNAIII会削弱SA的BF形成,结合SasX基因能调控RNAIII转录水平的研究发现,本课题组推测SasX对SA BF形成的调控可能与促进RNAIII转录表达有关。细菌BF形成受到特定基因表达的调控。细菌BF中含大量大分子多聚物,以多糖胞间黏附素(polysaccharide intercellular adhesion, PIA)的含量最多。研究发现,ica基因控制PIA的合成^[22]。fmbA基因编码的纤连蛋白结合蛋白FnBA是一种多阈结构的蛋白,能结合在细菌表面,是SA BF在黏附阶段的重要调节因子^[23]。sarA是一种附属基因调节基因,编码的SarA蛋白能增强icaA和fmbA的基因转录,进而调控BF形成过程的细菌黏附定植。SarA还能激活其他BF相关基因的表达,促进BF形成^[24-25]。qRT-PCR结果显示,突变株 Δ SasX的ica、fmbA和sarA表达水平均低于野生株,而回补株 Δ SasX(pRB473-SasX)株的icaA、sarA、fmbA mRNA水平与野生株相当;结合BF形成实验结果,提示SasX上调icaA、sarA、fmbA基因的表达,促进SA的BF形成。RIP处理 Δ SasX(pRB473-SasX)株后,icaA和sarA mRNA水平较 Δ SasX(pRB473-SasX)株降低,与 Δ SasX株差异无统计

学意义;fmbA mRNA水平虽然与 Δ SasX(pRB473-SasX)株差异无统计学意义,但表现出降低的趋势,提示抑制RNAIII对SA的早期BF形成有抑制作用,虽然具体机制尚未明确,但也从侧面印证了SasX可能参与RNAIII对SA BF形成的调控。

细菌定植到宿主易感部位是引起感染的前提,而黏附是细菌定植的第一步,有研究表明^[26],BF形成与细菌的黏附关系密切。本研究发现,野生型的SA HS770株镜下表现出小片聚集,或数个细菌相连或成串分布,表现出一定的聚集能力;敲除SasX基因后,细菌在镜下呈散在分布,少数细菌相连或成串,聚集能力明显减弱; Δ SasX(pRB473-SasX)株的镜下聚集情况与野生株相仿,提示SasX能促进SA的聚集,回复 Δ SasX株中的SasX水平能使细菌的聚集能力得到恢复。细菌的黏附聚集能力也与BF形成有关,是细菌定植和感染的重要因素^[27]。RIP处理后 Δ SasX(pRB473-SasX)株镜下也以散在分布为主,聚集能力较 Δ SasX(pRB473-SasX)株减弱甚至消失,表明抑制RNAIII会削弱SasX对SA聚集的促进作用。菌株增殖的检测结果表明,敲除、回补SasX或抑制RNAIII均不会对SA HS770株24 h内的增殖有显著影响,提示SasX和(或)RNAIII可能不是通过调控SA的增殖,影响其致病性。

综上,结合 Δ SasX株的RNAIII水平较野生株下调,根据 Δ SasX(pRB473-SasX)株的RNAIII恢复到野生株水平的实验结果推断,SasX能对RNAIII转录表达起正调控,SasX通过诱导RNAIII的生成,促进SA之间聚集,增强BF形成能力,进而参与其致病过程。

参 考 文 献

- [1] Jayakumar J, Kumar VA, Biswas L, et al. Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus*[J]. J Appl Microbiol, 2021,131(3):1072-1082.
- [2] 李涛,刘晓芹.利奈唑胺与万古霉素治疗儿童肺部金黄色葡萄球菌感染临床疗效及安全性的比较[J].临床合理用药杂志,2022,15(27):165-167.
- [3] 巴爽,只倩,梁帆,等.儿童金黄色葡萄球菌感染致急性骨髓炎合并脓毒性肺栓塞伴深静脉血栓形成一例临床分析[J].中国小儿急救医学,2021,28(9):823-827.
- [4] 黄春华,赵新闻,王梦娟.T大颗粒淋巴细胞白血病合并金黄色葡萄球菌感染致脓毒性休克[J].实用休克杂志(中英文),2020,4(1):54-56.
- [5] Lin J, Wu CA, Yan C, et al. A prospective cohort study of *staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *staphylococcus aureus* carriage in neonates: the role of maternal carriage and phenotypic and

- molecular characteristics[J]. Infect Drug Resist,2018,24(11):555-565.
- [6] Zheng XY, Choy BNK, Zhou MM, et al. Antibiotic resistance pattern of *staphylococcus aureus* isolated from pediatrics with ocular infections: a 6-year hospital-based study in China[J]. Front Pediatr,2021,19(9):728634.
- [7] 耿文静,董世霄,靳绯等. 新生儿金黄色葡萄球菌临床分离株分子分型及毒力基因研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2020,40(6):429-436.
- [8] Ying H, Mahmudiono T, Alghazali T, et al. Molecular characterization, virulence determinants, and antimicrobial resistance profile of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in the north of iran; a high prevalence of st239-sccmec III/t037 Clone[J]. Chemotherapy,2022,67(1):37-46.
- [9] Dai YX, Liu JL, Guo W, et al. Decreasing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections is attributable to the disappearance of predominant MRSA ST239 clones, Shanghai, 2008-2017[J]. Emerg Microbes Infect,2019,8(1):471-478.
- [10] Bakthavatchalam YD, Dwarakanathan HT, Munusamy E, et al. A Distinct geographic variant of sasX in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239 and ST368 lineage from South India[J]. Microb Drug Resist,2019,25(3):413-420.
- [11] 陈健,杜昕,宋燕,等. 新的细胞壁锚定蛋白SasX促进金黄色葡萄球菌黏附聚集和定植能力[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2012,32(6):519-524.
- [12] Ismadi YKM, Chan YY. Distribution of sasX, qacA/B and mupA genes and determination of genetic relatedness of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* among clinical isolates and nasal swab samples from the same patients in a hospital in Malaysia[J]. Singapore Med J,2022,63(6):335-341.
- [13] Jin Y, Li M, Shang Y, et al. Sub-inhibitory concentrations of mupirocin strongly inhibit alpha-toxin production in high-level mupirocin-resistant MRSA by down-regulating agr, sacRS, and sarA[J]. Front Microbiol,2018,9:993.
- [14] Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP, et al. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. Nature,2017,551(7680):313-320.
- [15] Minich A, Lišková V, Kormanová L, et al. Role of RNAIII in resistance to antibiotics and antimicrobial agents in *staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. Int J Mol Sci,2022,23(19):11094.
- [16] Bronesky D, Wu Z, Marzi S, et al. *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression[J]. Annu Rev Microbiol,2016,8(70):299-316.
- [17] Holden MT, Lindsay JA, Corton C, et al. Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW)[J]. J Bacteriol,2010,192(3):888-892.
- [18] Backer SD, Xavier BB, Vanjari L, et al. Remarkable geographical variations between india and europe in carriage of the staphylococcal surface protein-encoding sasX/sesI and in the population structure of methicillin-resistant staphylococcus aureus belonging to clonal complex 8[J]. Clin Microbiol Infect,2018,25(5):628. e1-e7.
- [19] 陈瑶,刘张玲,汤荣睿. 金黄色葡萄球菌生物膜预防和治疗的研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2021,46(1):20-26.
- [20] Salam AM, Quave CL. Targeting virulence in staphylococcus aureus by chemical inhibition of the accessory gene regulator system in vivo[J]. mSphere,2018,3(1):e00500-17.
- [21] Ciulla M, Stefano AD, Marinelli L, et al. RNAIII inhibiting peptide (RIP) and derivatives as potential tools for the treatment of *S. aureus* biofilm infections[J]. Curr Top Med Chem,2018,18(24):2068-2079.
- [22] 邢铭友,刘莉娜,宋世会,等. 表皮葡萄球菌ica操纵子与细胞间多糖粘附素及生物膜表型的相关性[J]. 华中科技大学学报:医学版,2008,37(4):449-452.
- [23] Lei MG, Cue D, Roux CM, et al. Rsp inhibits attachment and biofilm formation by repressing fnbA in staphylococcus aureus MW2[J]. J Bacteriol,2011,193(19):5231-5241.
- [24] Selvaraj A, Valliammai A, Muthuramalingam P, et al. Carvacrol targets sara and crtm of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* to mitigate biofilm formation and staphyloxanthin synthesis: an in vitro and in vivo approach[J]. ACS Omega,2020,5(48):31100-31114.
- [25] Yu J, Jiang F, Zhang F, et al. Virtual screening for novel sara inhibitors to prevent biofilm formation of *staphylococcus aureus* in prosthetic joint infections[J]. Front Microbiol,2020,11:587175.
- [26] 覃金球,李萌,覃媛媛,等. 临床分离金黄色葡萄球菌生物膜动态观察及药物敏感性研究[J]. 中华检验医学杂志,2019,42(2):140-145.
- [27] Httna B, Thn A, Mo A. The staphylococcal exopolysaccharide pia-biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection[J]. Comput Struct Biotech,2020,4(18):3324-3334.

(收稿日期: 2023-01-16)

(本文编辑: 孙荣华)

张利,张阳,马菁菁,等. 细胞壁锚定蛋白 SasX 调控 RNA III 参与金黄色葡萄球菌 ST239 克隆生物膜形成及致病性相关研究 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2023,17(4):252-259.