

单核细胞增生李斯特菌 SigmaB、PrfA 因子对生物被膜形成影响的研究

张 强 冯飞飞 王 莉 冯莹颖 罗 勤

摘 要 **目的** 探讨单核细胞增生李斯特菌(*listeria monocytogenes*, LM) *sigmaB*、*prfA* 基因与生物被膜(biofilm, BF)形成的关系。**方法** 利用微孔板技术,体外建立 LM 野生菌株 EGD、 $\Delta sigmaB$ 、 $\Delta prfA$ 及无害李斯特菌(*listeria innocua*)生物被膜模型,经 1% 结晶紫溶液染色,间接反映生物被膜的形成情况,并用倒置显微镜直接观察 4 种菌株生物被膜的形成情况。**结果** ①利用结晶紫染色与倒置显微镜观察相结合的方法,实现了对上述 4 种菌株生物被膜形成差异的比较;②结晶紫染色结果显示:在 595nm 波长下,EGD 光吸收值最高, $\Delta sigmaB$ 与 $\Delta prfA$ 菌株次之,无害李斯特菌最低。统计学分析结果显示,EGD 与 $\Delta sigmaB$ 、 $\Delta prfA$ 菌株差异不显著($P > 0.05$),EGD 与无害李斯特菌之间存在显著差异($P < 0.01$);③倒置显微镜观察结果显示:EGD 能形成致密的链网状膜结构,交联度较高; $\Delta sigmaB$ 、 $\Delta prfA$ 形成的链网状膜结构相对比较疏松,交联度稍低;无害李斯特菌几乎没有成型的链网状膜结构形成。**结论** 实验结果表明 LM 生物被膜的形成与调控因子 sigma B (σ^B)、*prfA* 的作用有关,并且 LM 与无害李斯特菌之间生物被膜的形成差异暗示着生物被膜的形成可能与 LM 的致病性有关。

关键词 单核细胞增生李斯特菌 生物被膜 SigmaB(σ^B) PrfA 无害李斯特菌

Effect of SigmaB, PrfA on Biofilm Formation in *Listeria Monocytogenes*. Zhang Qiang, Feng Feifei, Wang Li, Feng Yingying, Luo Qin. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Central China Normal University, Hubei 430079, China

Abstract **Objective** To investigate the relationship between SigmaB, PrfA and biofilm formation. **Methods** Biofilm model of *Listeria monocytogenes* in vitro was established by microtiter plate, and its biofilm development was indirectly reflected by staining with crystal violet. The stained biofilms were also observed under inverted microscope. **Results** ①We achieved the differences among the above-mentioned four kinds in comparison of BF by using the combination of the crystal violet staining and the inverted microscope method. ②Crystal violet staining results showed that in the 595nm wavelength, EGD had the maximum value of optical absorption, and followed by $\Delta sigmaB$, $\Delta prfA$ and *L. innocua*. Statistical analysis showed that EGD, $\Delta sigmaB$ and $\Delta prfA$ strains had no significant difference ($P > 0.05$), but there were significant differences between EGD and *L. innocua* ($P < 0.01$). ③The results obtained by inverted microscope showed that EGD could form a network of knitted chains with high degree of cross-linking. $\Delta sigmaB$, $\Delta prfA$ also formed a network of knitted chains, but the structure had lower degree of cross-linking. *L. innocua* barely formed a network of knitted chains structure. **Conclusion** PrfA and SigmaB were associated with biofilm formation. The formation of biofilms may be related to the pathogenicity.

Key words *Listeria monocytogenes*; Biofilm; SigmaB; PrfA; *Listeria innocua*

单核细胞增生李斯特菌(*listeria monocytogenes*, LM)是一种典型无芽胞的细胞内寄生革兰阳性食源性致病菌。它能在广泛的自然条件下生存,并能通过污染的食物进入人和动物体内,引起脑膜炎、败血症、流产和单核细胞增多等症状,被世界卫生组织列为仅

次于大肠杆菌 O157、沙门菌、志贺菌后的第 4 大重要的食源性致病菌^[1]。近年来,由 LM 引起的食品安全事件越来越受到人们的重视。Mafu 等^[2]的研究结果表明,此菌能在多数固体表面形成生物被膜,膜状态的 LM 有更强的耐受性,这就使常规的杀菌方法不能有效地灭菌,从而导致食品污染^[3]。同时,LM 生物被膜还有可能是其他致病菌及腐败微生物的藏身之所,细菌间的群落互感效应使得多种细菌能够协同共生,从而增强了食品加工环境以及食品本身污染或再污染的风险,甚至引起食物中毒。因此,研究 LM 生物被膜形成机制,对防止和控制食品腐败和食物中毒

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30970111);湖北省杰出青年基金(2009CDA124);华中师范大学科研项目(CCNU09Y01001);华中师范大学研究生自主科研项目(2009028)

作者单位:430079 武汉,华中师范大学生命科学学院遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室

通讯作者:罗勤,电子信箱:qinluo@mail.ccnu.edu.cn

具有重要意义。

细菌生物被膜是细菌的一种生物学特性。在细菌生长过程中,为适应生存环境而吸附于惰性或活性材料表面形成的一种与浮游细胞相对应的生长方式。它由细菌和自身分泌的多糖,蛋白等胞外基质组成,是一个三维立体空间结构的生态系,呈现广泛的空间不均一性^[4]。这种复杂结构便于整个生物被膜营养的吸收、代谢废物的排除和微生态环境的建立。李斯特菌属都有形成生物被膜的能力,但不同的菌株之间存在一定的差异^[5,6]。近些年的一些研究已经对压力调控因子 σ^B , LuxS, DegU, 以及 Agr 系统在 LM 黏附及形成生物被膜的过程中所起的作用进行了阐述^[7-10]。本实验主要对野生型 LM EGD 与它的两个重要的基因缺失菌株 $\Delta\sigma B$, $\Delta prfA$ 以及 EGD 与无害李斯特菌生物被膜形成能力进行比较。研究发现调控因子 σ^B 与 PrfA 对生物被膜的形成具有一定的影响,同时 EGD 形成生物被膜的能力强于无害李斯特菌,暗示 LM 的致病性可能与其形成生物被膜的能力有关。

材料与方法

1. 菌株:EGD 菌株, σB 缺失菌株 $\Delta\sigma B$, $prfA$ 缺失菌株 $\Delta prfA$ 以及无害李斯特菌均为本实验室保存。

2. 微孔板分析 BF 形成:挑取上述 4 种菌株单菌落接种 BHI 液体培养基中, 37℃, 180r/min 振荡培养过夜, 然后以 1:100 的比例接种到新鲜的 BHI 液体培养基, 等其达到对数期早期 (OD_{600nm} 为 0.2 左右), 分别取 0.1ml 菌液加入到新鲜的 BHI 液体培养基中, 充分混匀后, 取 200μl 菌液加入到微孔板的每个孔中 (每一竖排为同一菌株 8 个平行样)。然后盖上盖子, 并用封口膜封口, 防止水分蒸发。37℃, 静置培养 24h。培养 24h 后, 首先用酶标仪测定其生长情况 (OD_{600nm}), 然后弃去孔中的培养基, 用无菌蒸馏水洗涤微孔板孔 5 次, 以除去尚未形成 BF 的游离菌体。空气中干燥 45min 后, 向每个微孔加入 150μl 浓度为 1% 结晶紫溶液, 室温染色 45min。染色后再用无菌蒸馏水将各微孔洗涤 5 次。空气中干燥后, 再向每个微孔中加入 200μl 95% 乙醇溶液, 脱色 45min, 使结晶紫染料脱色充分。最后从每个孔中取 100μl 的洗脱液, 加入到一个相对应的新的微孔板中, 用酶标仪测其光吸收值 (OD_{595nm})^[10]。不同菌株之间的光吸收数据采用 Origin5.0 统计软件分析, 通过 SNK 法进行均数间的多重比较及双样本 *t* 检验来确定是否存在显著差异。

3. 倒置显微镜观察 BF 的形成:将经 95% 的乙醇溶液脱色的微孔板直接放在倒置显微镜下观察, 选取最佳视野, 并拍照。

结 果

1. 结晶紫染色间接测定生物被膜的形成:经结晶

紫染色后分析不同菌株的光吸收值发现:EGD, $\Delta\sigma B$, $\Delta prfA$ 以及无害李斯特菌生物被膜的形成能力具有一定的差异, EGD 的光吸收值最高, 两种缺失菌株光吸收值相当, 而无害李斯特菌光吸收值最低 (图 1)。光吸收数据采用 Origin5.0 统计软件分析得出:EGD 与 $\Delta\sigma B$, $\Delta prfA$ 菌株差异不显著 ($P > 0.05$), 而 EGD 与无害李斯特菌之间存在显著差异 ($P < 0.01$)。结果暗示 σ^B 与 PrfA 对生物被膜的形成具有一定的影响, 但影响不是很大, 但 EGD 形成生物被膜的能力明显强于无害李斯特菌, 暗示 LM 的致病性可能与其形成生物被膜的能力有关。

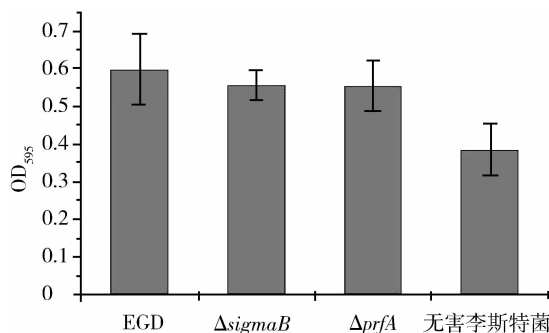


图 1 4 种菌株结晶紫染色间接检测生物被膜的生成量

2. 倒置显微镜观察 BF 的形态:显微镜观测结果如图 2 所示:LM 野生株 EGD 能形成结构较为紧密的链网状生物被膜结构, 而无害李斯特菌几乎观测不到的有链网状生物被膜结构, 只有零星分散的一些小群落, 表明致病菌与无害李斯特菌在生物被膜形成能力上有巨大差异, 暗示细菌的生物被膜形成可能与致病力有关; $\Delta\sigma B$ 和 $\Delta prfA$ 的生物被膜结构有些疏散, 形成链网状结构的孔隙较大, 但网状结构完整, 表明 σ^B 与 $prfA$ 在生物被膜的形成有关, 实验结果与微孔板分析的结论相同。

讨 论

病原微生物生物被膜形成能力的研究对于揭示其致病原理, 具有重要的意义。LM 是一种常见的食源性污染源, 它既具有侵染性, 又具有生物被膜形成能力, 是研究微生物的致病性与生物被膜形成之间关系的理想材料。 σ^B 因子在 LM 的压力应答和毒力调控中起着重要的作用。研究发现 LM 的致病力与耐受环境条件的胁迫息息相关。在压力存在的情况下能启动一些基因的表达, 以增强细菌对环境的耐受性, 这些基因包括与耐受渗透压、酸碱环境、氧化、极端温度和宿主体内胆碱等环境压力相关的基

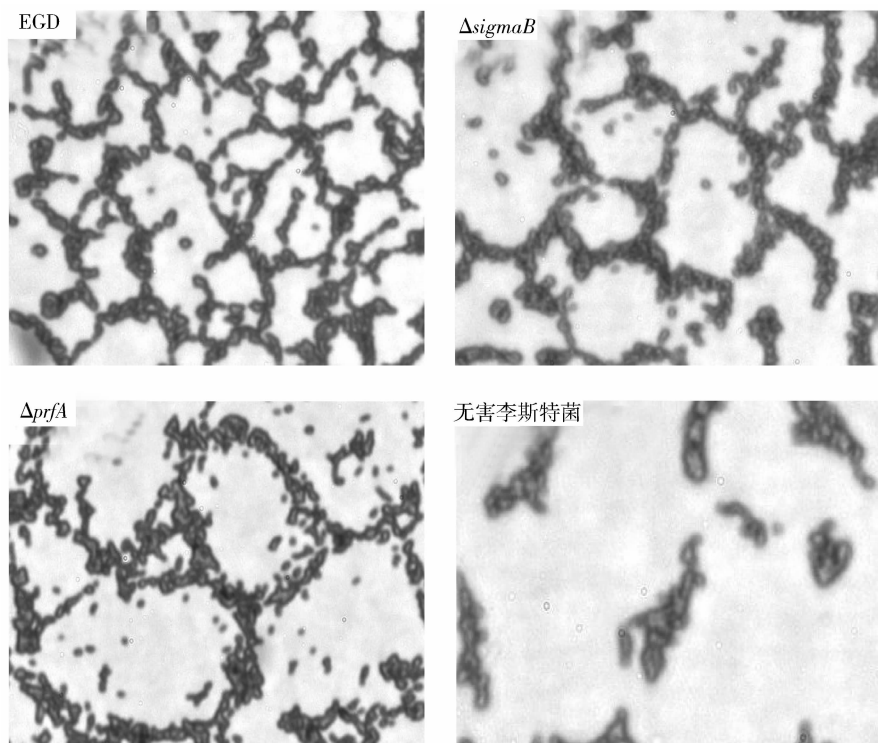


图 2 倒置显微镜下 4 种菌形成的生物被膜 (×1000)

因^[11,12]。在研究中本实验所用的是 BHI 培养基,营养成分丰富,没有加入任何外在刺激,可能导致 EGD 与 $\Delta\sigma B$ 在生物被膜形成能力上没有显著性差异。PrfA 是 LM 中迄今为止发现的唯一一个调控绝大多数毒力基因转录表达的蛋白因子。在 LM 侵染宿主的整个过程中,PrfA 蛋白强烈或部分调控着胞内感染生活周期有关的毒力基因。组成毒力岛 I 的 6 个基因的编码产物对于 LM 有效侵染宿主细胞起到至关重要的作用,缺失该基因簇将导致 LM 致病力完全丧失,该基因簇的转录表达依赖于 PrfA 蛋白的调控^[13]。其中 ActA 和 PlcB 是与细胞间信息传递密切相关的蛋白,Internalin 家族中的部分成员均已共价键的形式与细胞表面肽聚糖结合^[14]。PrfA 的缺失可能导致这些毒力蛋白的表达量减少,使得细胞之间的互感效应下降,进而使链网状结构疏散。LM 中基因的表达调控机制非常复杂,PrfA 只是众多调控因子中的一个,虽对菌体有些基因的表达有所影响,但在生物被膜的形成能力方面没有引起显著性差异。无害李斯特菌与 LM 相比,基因组存在部分差异。如与细胞表面以共价键连接的 N 末端含有大量亮氨酸重复的蛋白家族,已鉴定功能的 19 种蛋白中,无害李斯特菌就缺少此家族中的 11 种蛋白^[15]。在 LM 中,还存在有大量未知功能的蛋白,而这些蛋白据推测,大多

具有水解酶的作用,他们是否在形成生物被膜的过程中发挥作用还不是很清楚,但无害李斯特菌缺失其中的大部分蛋白。无害李斯特菌也缺少 LM 所具有的毒力基因簇,包括 PrfA,这是它不具有致病性的原因。暗示生物被膜的形成可能与李斯特菌属的致病力存在一定的联系。

目前研究确定的与细菌菌膜形成相关的基因主要有编码胞外多糖、细胞运动能力相关蛋白等基因及其调控因子,如表皮葡萄球菌的 *ica* 操纵子,肠球菌表面蛋白 *esp* 基因^[16,17];编码细胞间群体感应信号分子的基因,如变形链球菌 *com* 基因(群体感应信号系统)、*vicRK* 基因(*vicRK* 信号传导系统)、依赖于酰基丝氨酸内酯或缩氨酸的菌种内群体感应的 *luxS* 基因等^[18,19]。迄今为止,国内外关于 LM 生物被膜方面的研究尚集中在环境因素对其形成的影响上,例如,报道低温、高胆汁酸盐等可以促进 LM 生物被膜的形成等,或者通过定点突变验证一些已知功能基因在其生物被膜形成中的作用,如 *luxS* 基因和 *agrBDCA* 操纵子,但生物被膜形成的详细分子机制以及高通量鉴定和分析相关基因的功能还未见报道^[7, 8, 10]。如哪些基因参与了 LM 生物被膜的形成,其表达受到哪些因子调控,生物被膜的形成与 LM 的致病性是否相关等,这些将是我们后期研究工作重点。

参考文献

- 1 罗勤, 张晓莉, 李兵, 等. 单核细胞增生李斯特菌 PrfA 蛋白转录调控毒力基因表达的分子机制. 微生物学通报, 2008, 35(2): 275 - 280
- 2 Whitchurch CB, Tolker - Nielsen T, Ragas PC, *et al.* Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 2002, 295(5559): 1487
- 3 Jeong DK, Frank JF. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with micro - organisms isolated from meat and dairy processing environments. *Food protection*, 1994, 57: 415 - 424
- 4 Branda SS, Vik A, Friedman L, *et al.* Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(1): 20 - 26
- 5 Djordjevic D, Wiedmann M, Mclelland LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(6): 2950 - 2958
- 6 Borucki MK, Peppin JD, White D, *et al.* Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7336 - 7342
- 7 Rieu A, Weidmann S, Garmyn D, *et al.* Agr system of *Listeria monocytogenes* EGDe: role in adherence and differential expression pattern. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(12): 6125 - 6133
- 8 Sela S, Frank S, Belasov E, *et al.* Mutation in the LuxS gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(12): 5653 - 5658
- 9 Gueriri I, Cyneynatus C, Dubrac S, *et al.* The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. *Microbiology*, 2008, 154(8): 2251 - 2264
- 10 Begley M, Kerr C, Hill C. Exposure to bile influences biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Gut Pathogens*, 2009, 1: 11 - 14
- 11 Hain T, Hossain H, Chatterjee SS, *et al.* Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD - e sigmaB regulon. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 20
- 12 Begley M, Sleator RD, Gahan CG, *et al.* Contribution of three bile - associated loci, bsh, pva, and btlB, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 2005, 73(2): 894 - 904
- 13 Kreft J, Vazquez - Boland JA. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *IntJ Med Microbiol*, 2001, 291(2): 145 - 157
- 14 Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram - positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology*, 1999, 63(1): 174 - 229
- 15 Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, *et al.* Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science*, 2001, 294(5543): 849 - 852
- 16 Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, *et al.* Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical microbiology and infections*, 2004, 10(12): 1081 - 1088
- 17 Toledo - Arana A, Valle J. The Enterococcal surface protein Esp is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4538 - 4545
- 18 Li YH, Hanna MN, Svendsaeter G, *et al.* Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *Journal of bacteriology*, 2001, 183(23): 6875 - 6884
- 19 Senadheera MD, Guggenheim B, Huang YC, *et al.* A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development. *Journal of bacteriology*, 2005, 187(12): 4064 - 4076

(收稿: 2010 - 05 - 04)

北京地区哮喘儿童 ORMDL3 基因表达水平、生活方式与室内空气质量的相关性研究

金 哲 蔡 欣 王 强 李 红 徐春雨 王 秦 方建龙 高 洁 付文亮 徐东群 徐东刚

摘 要 目的 研究北京地区儿童 ORMDL3 基因表达水平、生活方式、室内空气质量与哮喘发生的相关性。方法 采用病例 - 对照方法进行实验设计。使用 RT - PCR 法检测儿童 ORMDL3 基因表达水平;通过《国际儿童哮喘及过敏研究 (ISSAC) 问卷》收集儿童生活方式信息;并根据《室内空气质量标准 (GB/T18883 - 2002)》中规定的检验方法对室内空气中 PM_{2.5}、VOCs、甲醛浓度及空气温湿度进行监测。使用 *t* 检验、卡方检验分析病例组与对照组儿童 ORMDL3 基因表达水平,生活方式与室内空气质量差异;使用 *Logistic* 逐步回归来分析 ORMDL3 基因表达水平,生活方式与室内空气质量对与哮喘之间相关性。**结果**

基金项目:国家科技支撑计划项目课题 (2006BAI9B05 - 3)

作者单位:100850 北京,中国人民解放军军事医学科学院基础医学所 (金哲、蔡欣、高洁、付文亮、徐东刚);中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所 (王强、李红、徐春雨、王秦、方建龙、徐东群) (注:金哲、蔡欣为共同第一作者)

通讯作者:徐东刚,电子信箱:xudg@nic.bmi.ac.cn;徐东群,电子信箱:dongqunxu@126.com