

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.07.003

· 论 著 ·

医院获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中 *PSM- α* 基因检测及相关研究

于 淼^{1,2}, 赵白云², 刘成玉¹, 牟晓峰²

(1 青岛大学医学院, 山东 青岛 266021; 2 青岛大学医学院第二附属医院, 山东 青岛 266021)

[摘要] 目的 了解某地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)中 α 型-酚溶调制蛋白(*PSM- α*)基因携带情况及对人外周血中性粒细胞的影响,为指导临床治疗及明确该地区 MRSA 致病机制提供理论依据。**方法** 收集临床标本中分离并经 *SCCmec* 分型的 MRSA 90 株,采用聚合酶链反应(PCR)方法扩增 *PSM- α* 基因,并通过细胞形态学方法研究 *PSM- α* 对人外周血中性粒细胞的影响。**结果** 86 株医院获得性 MRSA(HA-MRSA)中,*PSM- α* 基因阳性者 78 株,*PSM- α* 阳性率为 90.70%; 4 株社区获得性 MRSA(CA-MRSA)中,2 株为 *PSM- α* 基因阳性,阳性率为 50.00%; *PSM- α* 阳性组中性粒细胞死亡率与生理盐水组、*PSM- α* 阴性组和 ATCC 25923 组间比较,差异有统计学意义。*PSM- α* 阳性组死亡率高于其他 3 组,而 *PSM- α* 阴性组和 ATCC 25923 组差异无统计学意义。**结论** 该地区 HA-MRSA 携带 *PSM- α* 基因,且 *PSM- α* 基因阳性的 MRSA 菌株分泌的 *PSM- α* 具有促进中性粒细胞溶解的活性。

[关键词] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 金黄色葡萄球菌; α 型-酚溶调制蛋白; 中性粒细胞; *SCCmec* 分型

[中图分类号] R378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)07-0443-04

Detection and related study of *PSM- α* gene in hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

YU Miao^{1,2}, ZHAO Zi-yun², LIU Cheng-yu¹, MU Xiao-feng² (1 Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2 The Second Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the carriage of phenol soluble modulins (*PSM- α*) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and influence in human peripheral blood neutrophils, so as to provide theoretical basis for guiding clinical treatment and identifying pathogenesis of MRSA. **Methods** Ninety MRSA isolates which were isolated from clinical specimens and performed *SCCmec* genotyping were collected, *PSM- α* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the effects of *PSM- α* gene on human peripheral blood neutrophils was studied by cell morphology analysis. **Results** Of 86 hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) isolates, 78 were positive for *PSM- α* gene, the positive rate was 90.70%; Of 4 community-acquired MRSA (CA-MRSA), 2 were positive for *PSM- α* gene, the positive rate was 50.00%; neutrophil death rate in *PSM- α* positive group was significantly higher than normal saline group, *PSM- α* negative group and ATCC 25923 group, but there was no significant difference between *PSM- α* negative group and ATCC 25923 group. **Conclusion** HA-MRSA detected in this region carry *PSM- α* gene, and *PSM- α* secreted by *PSM- α* positive MRSA has the activity of promoting the lysis of neutrophils.

[Key words] methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus*; phenol soluble modulins; neutrophil; *SCCmec* typing

[Chin Infect Control, 2015, 14(7): 443-446]

[收稿日期] 2014-12-25

[作者简介] 于淼(1988-),女(汉族),山东省威海市人,硕士研究生,主要从事细菌分子耐药机制研究。

[通信作者] 牟晓峰 E-mail: muxiaofeng2005@126.com

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是临床上引起鼻腔、口腔黏膜、皮肤和上皮组织的感染, 并导致炎症化脓的重要病原菌之一。目前, MRSA 按来源分为社区获得性 MRSA (community-acquired MRSA, CA-MRSA) 和医院获得性 MRSA (hospital-acquired MRSA, HA-MRSA)。近年来, 国内外学者致力于 MRSA 毒力因子的研究, 发现一种称为酚溶调制肽 (phenol soluble modulins, PSM) 的新型毒力因子。PSM 最初由 Mehlin 等人从表皮葡萄球菌 UW-3 株的培养液上清中分离, 包括由染色体基因组编码的 PSM- α 、PSM- β 、PSM- γ , 以及由位于可移动遗传元件 SCCmec 上的 *psm-mec* 基因编码的 PSM-mec^[1]。研究^[2-3]表明, CA-MRSA 菌株可以分泌 PSM- α 、PSM- β 和 PSM- γ , 而 HA-MRSA 菌株只能分泌 PSM- β 和 PSM- γ , PSM- α 和 PSM- γ 能够溶解中性粒细胞和红细胞等, 而 PSM- β 则缺乏这一活性。本研究采用聚合酶链反应 (PCR) 方法检测本地区 CA-MRSA 和 HA-MRSA 菌株中 PSM- α 基因的分布, 并通过细胞形态学方法来观察 PSM- α 对入外周血中性粒细胞的溶解作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 90 株不重复 MRSA 菌株分离自青岛大学医学院第二附属医院及周边医院住院和社区患者的各种标本, 包括痰、血、脓液、粪便、伤口分泌物、口腔分泌物、导管、胸腔积液等。本实验室采用多重 PCR 方法对菌株 SCCmec 型别进行了鉴定, 其中型别为 SCCmec III 80 株 (88.89%), SCCmec II 6 株 (6.67%), SCCmec V 2 株 (2.22%), SCCmec III、SCCmec V 混合型 2 株 (2.22%)。根据 SCCmec I、SCCmec II、SCCmec III 型主要分布于 HA-MRSA 菌株中, SCCmec IV、SCCmec V 型主要分布于 CA-MRSA 菌株中的标准进行分类^[4-6], 90 株 MRSA 菌株中 HA-MRSA 86 株, CA-MRSA 4 株, 质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923。

1.1.2 主要仪器与试剂 超速低温离心机购自德国 Eppendorf 公司, BIO-RAD 梯度 PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司, BYCP-31PN 电泳仪购自北京六一仪器厂, GeIX1850 型凝胶成像分析系统购自上海欧祥科学仪器有限公司, 数显恒温水浴箱购自上海荣计达实验仪器有限公司, 普通光学显微镜购自日

本 Olympus 公司, BIOWEST AGAROSE G-10 购自西班牙。4% 台盼蓝染液由本实验室配制, DNA 提取液、TixTap 酶及 PCR 反应相关试剂、DL1000 DNA Marker、上样缓冲液等试剂, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 人或各种动物外周血中性粒细胞分离液试剂盒购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 公布的基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计合成引物, PSM- α 基因上游引物序列为: ATGGGTATCATCGCTG-GCATCATTAAGTT, 下游引物序列: TTTT-GCGAAAATGTCGATAATTGCTTTGAT, 产物大小为 406 bp, 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组 DNA 提取 将冷冻菌株转种于哥伦比亚血琼脂培养基上, 于 37℃ 培养箱中过夜培养。取 50 μ L DNA 提取液于灭菌的 EP 管中, 用灭菌吸头挑取单菌落, 置于 EP 管中混匀, 80℃ 热变性 15 min 后, 100℃ 水浴 20 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 裂解后的上清液作为 PCR 反应的模板。

1.2.2 扩增 PSM- α 基因 PCR 反应体系为 25 μ L, 其中 10 \times Buffer 缓冲液 2.5 μ L、dNTP 2 μ L、TixTap 酶 0.15 μ L、MgCl₂ 2 μ L、上下游引物各 1 μ L、DNA 模板 2 μ L、加灭菌去离子水补足 25 μ L。反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 35 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物检测 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 以 DL1000 DNA Marker 为相对分子质量标准, 用凝胶成像分析系统观察电泳结果。

1.2.4 DNA 测序 PCR 扩增阳性产物送宝生物工程 (大连) 有限公司进行序列测定, 结果与 GenBank 序列数据库标准序列进行比对分析。

1.2.5 中性粒细胞死亡率检测 按照试剂盒操作说明分离健康成人外周静脉血 (EDTA-K2 抗凝) 中性粒细胞, 重悬培养液中。取 4 份体积均为 100 μ L 的中性粒细胞悬液, 分别加入 30 μ L 的 0.5 麦氏单位的 PSM- α 阳性 MRSA 菌液、0.5 麦氏单位的 PSM- α 阴性 MRSA 菌液、0.5 麦氏单位的 ATCC 25923 菌液、生理盐水, 充分混匀, 放入培养箱孵育 3 h 后, 用台盼蓝染液染色并在显微镜下计数中性粒细胞死亡率。计算公式: 死亡率 (%) = 染色细胞数 / (未染色细胞数 + 染色细胞数) \times 100%。

1.3 统计分析 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,将数据进行反正弦转换后进行单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MRSA 菌株 $PSM\alpha$ 携带情况 86 株 HA-MRSA 中 $PSM\alpha$ 基因阳性 78 株,阳性率为 90.70%; 4 株 CA-MRSA 中,2 株 $PSM\alpha$ 基因阳性,阳性率为 50.00%。PCR 产物电泳结果见图 1。

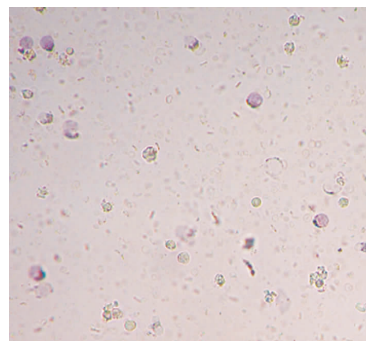


图 2 MRSA $PSM\alpha$ 基因阳性组细胞毒性结果

Figure 2 Results of cytotoxicity in $PSM\alpha$ gene positive MRSA group

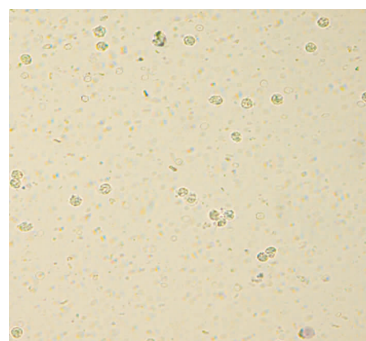
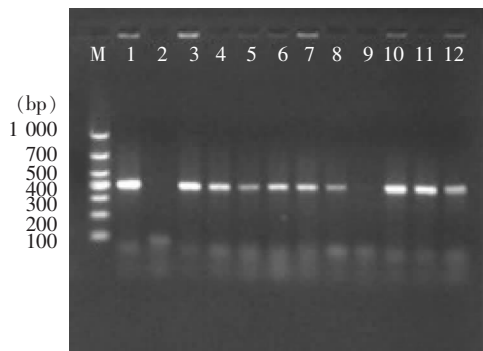


图 3 MRSA $PSM\alpha$ 基因阴性组细胞毒性结果

Figure 3 Results of cytotoxicity in $PSM\alpha$ gene negative MRSA group



M: DL1000; 1, 3 - 8, 10 - 12: $PSM\alpha$ positive strains; 2, 9: $PSM\alpha$ negative strains

图 1 $PSM\alpha$ 基因的 PCR 产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR product of $PSM\alpha$ gene

2.2 基因测序结果 测序结果与 GenBank 序列数据库标准序列(JQ 066321.1)比对,结果完全一致。

2.3 中性粒细胞死亡率 MRSA $PSM\alpha$ 阳性组中性粒细胞死亡率与生理盐水组、 $PSM\alpha$ 阴性组、ATCC 25923 组间比较,差异有统计学意义($P = 0.001$), $PSM\alpha$ 阳性组死亡率高于其他 3 组,而 $PSM\alpha$ 阴性组和 ATCC 25923 组差异,无统计学意义($P = 0.886$),见表 1。 $PSM\alpha$ 阳性组与 $PSM\alpha$ 阴性组对细胞的毒性结果见图 2~3。

表 1 MRSA $PSM\alpha$ 使中性粒细胞死亡情况的比较($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 Comparison of neutrophil death induced by MRSA $PSM\alpha$ ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Specimen	Death rate
$PSM\alpha$ positive	50	68 ± 12
$PSM\alpha$ negative	50	56 ± 10*
ATCC 25923	50	56 ± 11* #
Normal saline	50	40 ± 10*

Note: * Compared with $PSM\alpha$ positive group, $P = 0.001$;

: Compared with $PSM\alpha$ negative group, $P = 0.886$

3 讨论

自 2000 年美国报道 CA-MRSA 以来,越来越多的研究者致力于其高致病力机制的研究^[7]。研究^[2-3]发现,在鼠脓肿和菌血症模型中 $PSM\alpha$ 基因缺失菌株的毒力弱于野生型菌株,并证实了 $PSM\alpha$ 能够刺激并溶解人的中性粒细胞,最终破坏人体应对金黄色葡萄球菌感染的细胞免疫防御系统,认为 CA-MRSA 菌株的高毒力是由于其可以分泌具有溶解中性粒细胞活性的 $PSM\alpha$,而 HA-MRSA 则不能分泌 $PSM\alpha$ 。本研究中,86 株 HA-MRSA 中 $PSM\alpha$ 基因阳性 78 株,阳性率为 90.70%,这与国外研究^[2-3,8]的结果不同,可能因为国内临床治疗中抗菌药物的滥用,导致 HA-MRSA 菌株毒力增强,但具体原因有待进一步研究。本研究检测到的 CA-MRSA 菌株过少,无法进行 HA-MRSA 和 CA-MRSA 菌株中 $PSM\alpha$ 阳性率差异的统计学分析。

中性粒细胞是机体免疫防御系统的第一道防线,

通过吞噬作用识别并摄取病原体,随后产生活性氧或脱颗粒作用杀伤病原体,起到局部控制感染的作用^[9]。分泌 PSM- α 的 MRSA 菌株被中性粒细胞吞噬后,PSM- α 可以促进中性粒细胞的胞内溶解,延缓细胞凋亡,使病原菌大量存活,最终逃脱中性粒细胞的杀伤作用,导致疾病的发生^[10-11],但 PSM- β 不能在这一过程中发挥作用^[12]。

为进一步了解本地区分离的 HA-MRSA 所分泌的 PSM- α 是否也具有促进中性粒细胞溶解的活性,本研究比较 PSM- α 基因阳性菌株和阴性菌株对中性粒细胞的影响,结果表明分泌 PSM- α 的 MRSA 对中性粒细胞的溶解作用高于不分泌 PSM- α 的 MRSA,而不分泌 PSM- α 的 MRSA 与 ATCC 25923 的溶解作用无差异。

综上所述,本研究有助于我们进一步了解 MRSA 菌株能够逃脱中性粒细胞杀伤作用的机制,为临床寻找治疗 MRSA 感染的新途径及金黄色葡萄球菌疫苗的制备提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Queck SY, Khan BA, Wang R, et al. Mobile genetic element-encoded cytolyisin connects virulence to methicillin resistance in MRSA[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(7): e1000533.
- [2] Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA [J]. Nature Med, 2007, 13(12): 1510-1514.
- [3] Cheung GY, Duong AC, Otto M. Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus* phenol-soluble modulins;

implications for diagnosis and pathogenesis[J]. Microbes Infect, 2012, 14(4): 380-386.

- [4] 杨延成,程航,饶贤才,等. SCCmec 遗传元件及其在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子分型中的应用[J]. 遗传, 2015, 37(5): 442-451.
- [5] 潘军,刘文恩,张运丽,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型及 PVL 基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010,20(17): 2541-2544.
- [6] 李囡,范红,陈慧莉,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(15): 2122-2126.
- [7] Kennedy AD, Otto M, Braughton KR, et al. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(4): 1327-1332.
- [8] Li M, Diep BA, Villaruz AE, et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(14): 5883-5888.
- [9] Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, et al. Neutrophils in the innate immune response [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005,53(6):505-517.
- [10] Rigby KM, DeLeo FR. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections[J]. Semin Immunopathol, 2012,34(2):237-259.
- [11] Surewaard BG, de Haas CJ, Vervoort F, et al. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis[J]. Cell Microbiol, 2013,15(8):1427-1437.
- [12] Grosz M, Kolter J, Paprotka K, et al. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulin- α [J]. Cell Microbiol, 2014, 16(4): 451-465.

(本文编辑:豆清娅)