

金黄色葡萄球菌调节基因研究进展

Recent progress on regulator gene in *Staphylococcus aureus*

连建奇(LIAN Jian-qi) 综述 白雪帆(BAI Xue-fan) 审校

(第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, 陕西 西安 710038)

(The Chinese PLA Centre of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 调节基因; *mgrA*; 抗药性; 微生物[中图分类号] R378.1⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2009)06-0442-03

金黄色葡萄球菌(金葡菌)感染开始多在皮肤或伤口,随后入血并侵犯组织。一旦金葡菌存在于组织内,便产生大量细菌成分和分泌物,其中包括细菌表面相关蛋白黏附素、酶、外毒素和囊膜多糖等基因表达产物,引起在组织内的侵袭、破坏和免疫反应,而上述众多细菌产物基因表达受金葡菌调节基因的调控表达。随着 2001 年金葡菌基因组测序工作的完成,通过对基因组的分析,共鉴定了 124 个转录调节基因,其中包括 89 个新的转录调节基因^[1]。金葡菌所具有的多个调节基因,说明其具有复杂基因调控和表达网络,这些调节基因调控许多涉及毒力、自

溶解基因和细菌耐药等基因表达。调节基因以及调节基因相互作用影响它们所调控结构基因的表达,从而导致细菌感染,引起组织破坏。

金葡菌的致病性依赖于许多毒力基因的表达,如黏附素、胞外酶和毒素等,而这些毒力基因受许多调节基因的调节。金葡菌的调节基因包括两元件调节系统、全面调节因子和转录调节基因(表 1)。这些调节基因的激活、抑制以及它们之间的相互作用精细调节它们所调控基因的表达,从而不断适应环境变化,引起定植和感染。因此,研究金葡菌调节基因的功能对于明确其致病性有重要意义。

表 1 金葡菌调节基因

基因	基因功能	举例
全面调节基因	参与细菌毒力、自溶解、耐药和某些结构基因的表达	<i>agrA</i> , <i>sarA</i> , <i>sigB</i> , <i>mgrA</i> 等
两元件调节系统	参与细菌毒力、自溶解和耐药基因的表达	<i>lytSR</i> , <i>srrA-srrB</i> , <i>saeS-saeR</i> 等
细菌毒力调节基因	参与细菌毒力基因的表达	<i>rot</i> , <i>sarT</i> , <i>sarU</i> 等
自溶解调节基因	参与细菌自溶解基因的表达	<i>sarV</i> , <i>cidR</i> 等
细菌耐药调节基因	参与细菌耐药基因的表达	<i>mecI</i> , <i>graR</i> 等
转录调节基因	参与某些基因的转录	<i>norG</i> , <i>sarS</i> , <i>vicR</i> , <i>gltC</i> 等

1 自溶解有关的调节基因

在细菌的生长过程中,其产生许多水解酶以维持细胞壁合成和降解的动态平衡,这些水解酶包括 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰氨酶、N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、N-乙酰胞壁酸酶、肽链内切酶和转糖基酶。虽然这些酶的生理功能尚不完全清楚,但它们在细胞壁的合成、降解及细胞分裂、胞壁肽再循环、抗生素诱导细菌的溶解和细菌致病性等方面起着重要的

作用。如果胞壁质的水解不受严格调控,那么细胞壁将失去完整性,从而导致细菌无法生长。研究表明,一些水解酶在转录水平受调节基因的影响。Brunskill 等^[2]发现 *LytSR* 两元件调节系统可负性调节胞壁质水解酶的表达,其机制主要是调控下游基因 *lrgA* 和 *lrgB* 的表达,*lrgA* 的产物可抑制水解酶穿过细胞膜的转运过程^[3]。另一两元件调节系统 *ArlRS* 也参与细菌自溶解的调节。*ArlRS* 的突变株自溶解现象明显增强,同时 *ArlRS* 影响肽聚糖水解酶的活性并修饰细胞外丝氨酸蛋白酶的活性^[4]。

[收稿日期] 2009-03-31

[作者简介] 连建奇(1965-),男(汉族),陕西省西安市人,副教授,主要从事病毒性肝炎和细菌耐药研究。

[通讯作者] 连建奇 E-mail: lianjq@fmmu.edu.cn

Ingavale 等^[5]的研究发现, *MgrA* (*RAT*) 不仅增强 *LytSR* 和 *ArlRS* 的表达, 而且影响肽链内切酶 *LytM* 和胞壁质酶 *LytN* 的表达, 从而负性调节细菌的自溶解作用。我们基因芯片的结果亦表明 *MgrA* 可影响 *LytSR*、*lrgA* 和 *lrgB* 的表达。此外, 参与毒力调节的 *SarA* 可通过抑制 *SarV* 的表达, 影响自溶解素基因 *atl* 和与降低肽聚糖交联并增加自溶解有关基因 *scdA* 的表达, 负调控自溶解作用。新近 Dubrac 等^[6]报道了 *WalKR* 具有正调节自溶解活性的作用, 其机制主要是通过直接激活自溶解素基因 *atl* 和肽链内切酶基因 *lytM* 的表达, 这是首次报道有关调节基因直接对自溶解素合成有正调节作用。此外, 尚有文献报道 *agr* 和 *cidR* 对自溶解有正调节作用。综上所述, 尽管目前发现了一些影响自溶解作用的调节基因, 但调控细胞壁基质水解活性的分子机制还远未搞清楚, 值得深入研究和探讨。

2 细菌耐药性有关的调节基因

金葡菌对抗菌药物耐药除了与 *mecI-mecR-mecA*、*fem* 基因表达相关外, 还受许多调节基因的影响。2001 年 Kuroda 等^[7]利用基因芯片发现了一个新的调节基因 *VraSR*, 其与细菌对抗菌药物的早期应答有关; *VraSR* 可调节与细菌壁合成相关基因 *pbp2* 和 *sgtB* 的表达, 敲除此基因可明显降低细菌的耐药性。我们的研究和他人的研究发现 *mgrA* 的高表达可影响 β -内酰胺类和喹诺酮类抗生素的药物耐性^[8-9]。*mgrA* 基因的高表达可显著增加细菌对 β -内酰胺类抗生素的耐性, 受体菌 N315 对苯唑西林的耐性最低抑菌浓度 (MIC) 由 8 mg/L 增高到了 128 mg/L。*mgrA* 基因敲除株 N315 Δ 641 对苯唑西林的耐性 MIC 由 8 mg/L 降至 4 mg/L, 而重新将 *mgrA* 导入敲除株, MIC 又增高到了 128 mg/L, 说明此基因的确与细菌耐药性有关^[8]。*mgrA* 基因的高表达还可影响多药耐药流出泵 *NorA*、*NorB*、*NorC* 和 *AbcA* 的表达, 参与影响 β -内酰胺类和喹诺酮类抗菌药物的药物耐性^[9]。此外, 两元件调节系统 *ArlRS* 和转录调节子 *NorG* 也可影响 *NorA*、*NorB* 的表达, 导致细菌对喹诺酮类抗菌药物产生耐药性。新近的研究发现, 调节基因 *graR* 的突变可使金葡菌对万古霉素的耐药性从异质性中介耐药转换为中介耐药, 进一步的研究发现其突变株可增加达托霉素的耐药性而降低苯唑西林的耐药性^[10]。除上述调节基因影响药物耐性外, 细菌毒力有关的

调节基因, 如 *agr*、*sarA* 和 *sigB* 同样对细菌耐药性有影响。Rose 等^[11]的研究认为, *agr* 基因的多态性与万古霉素有关, 但机制尚需进一步研究。*sarA* 基因调节金葡菌 100 多个基因的合成, 可通过调节药物的蓄积影响金葡菌的固有耐药性^[12]。Singh 等^[13]的研究结果表明, *sigB* 基因的突变株降低了细菌对万古霉素和苯唑西林的耐药性, *sigB* 基因可能影响一些基因的合成, 导致细菌对影响细胞壁合成的抗生素产生耐药性。综上所述, 细菌的耐药性受许多调节基因的影响, 金葡菌拥有复杂的调节基因表达网络, 一些新的具有调节功能的基因尚未被鉴定, 因此需要不断地进行研究, 以期发现新的影响细菌耐药的调节基因和靶基因, 从而找出新的靶点, 为合成新的抗生素奠定理论基础。

3 细菌毒力有关的调节基因

许多调节基因调控毒力基因的表达, 其中最为重要的是 *agr* 基因座和 *sar* 基因家族。*agr* 基因座由 2 个不同方向的转录体 RNA II 和 RNA III 组成, 编码 *agrB*、*agrD*、*agrC*、*agrA* 和 *hld* 5 个基因。*agr* 基因座是一个复杂的群体感应两元件调节系统, 当 *agrD* 编码的自调节肽在培养基中达到一定浓度时, 激活两元件调节系统 *agrC* 和 *agrA*, 导致 RNA II 和 RNA III 的转录; RNA III 作为 *agr* 的效应分子, 至少调节 15 个毒力基因的表达^[14]。*sar* 基因座包含一个大的读码框, *sarA* 基因由 3 个不同的启动子转录出 3 个转录产物, *sarA* 基因座上上调细胞壁蛋白和胞外蛋白的表达。蛋白与 DNA 相互作用的研究表明, *SarA* 蛋白可结合到许多靶基因的启动子上调节靶基因的表达, 如 *agr*、*hla* 和 *spa*; 进一步的亲和层析和基因组分析研究表明, 几个与 *SarA* 类似的蛋白参与基因的调节^[15]。在细菌生长对数后期, *SarR* 可结合到 *sarA* 基因的启动子区抑制 *SarA* 的表达^[16]。*SarS* 可激活 *spa* 的表达, 并在一定程度上下调溶血素基因 *hla* 的表达, 而 *agr* 则抑制 *SarS* 的表达。Rot 下调溶血素基因 *hla* 和 *hlb*、脂肪酶基因 *geh*、丝氨酸蛋白酶基因 *sspB* 和 *splA* 的表达, 而对细胞表面蛋白, 如凝集因子 *ClfB*、蛋白 A、细胞表面黏附素 *SdrC* 具有正调节作用^[17]。*SarT* 抑制溶血素基因 *hla* 和 RNA III 的转录, 而 *SarT* 受 *SarU* 的负性调控; *SarU* 可激活 RNA III 的转录, 并在 *agr* 的影响下调节毒力基因的表达^[18]。

除 *agr* 和 *sar* 基因及其类似基因外, *sigB* 是一

个很重要的毒力调节基因。*sigB* 参与细菌化学和物理的应激反应,并影响 *agr* 和 *sar* 的表达,从而影响毒力基因的表达^[19]。*mgrA* 也是一个很重要的毒力调节基因,可影响脂多糖基因 *cap 5* 和 *cap 8*、溶血素基因 *hla*、蛋白 A、脂肪酶、蛋白酶和凝固酶等的表达^[20]。此外,尚有 *srrA-srrB*、*saeS-saeR* 和 *arlS-arlR* 两元件调节系统等可调节金葡菌毒力基因的表达。

综上所述,金葡菌是引起人类感染性疾病的主要致病菌之一。轻到皮肤感染,重到心内膜炎及中毒性休克综合征,均可由金葡菌所致,同时金葡菌也是医院感染和社区感染的主要病原菌。随着广谱抗菌药物的广泛应用,医院内耐药性细菌已严重威胁人类的健康,特别是耐甲氧西林和耐万古霉素的金葡菌往往导致现有抗生素治疗的失败;社区获得性金葡菌感染率和耐药率逐年增加,引起各国政府和感染控制学家的高度重视。因此,迫切需要明确金葡菌的致病机制和过程,从金葡菌调节基因入手,研究调节基因的功能,以期发现新的分子靶点,从而开发有效的治疗药物。

[参 考 文 献]

- [1] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, *et al.* Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Lancet*, 2001,357(9264):1225-1240.
- [2] Brunskill E W, Bayles K W. Identification of *LytSR*-regulated genes from *Staphylococcus aureus* [J]. *Bacteriol*, 1996, 178(19):5810-5820.
- [3] Groicher K H, Firek B A, Fujimoto D F. The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance [J]. *Bacteriol*, 2000,182(7):1794-1801.
- [4] Fournier B, Hooper D C. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus* [J]. *Bacteriol*,2000, 182(14):3955-3964.
- [5] Ingavale S S, Van Wamel W, Cheung A L. Characterization of RAT, an autolysis regulator in *Staphylococcus aureus* [J]. *Mol Microbiol*,2003,48(6):1451-1466.
- [6] Dubrac S, Boneca I G, Poupel O. New insights into the *WalK/WalR* (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* [J]. *Bacteriol*,2007, 189(22):8257-8269. Epub 2007 Sep 7.
- [7] Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, *et al.* Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus* [J]. *Mol Microbiol*,2003,49(3):807-821.
- [8] 连建奇,崔龙洙,平松启一.金黄色葡萄球菌调节基因 *mgrA* 高表达对苯唑西林耐药性的影响[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2006,26(7):603-609.
- [9] Truong-Bolduc Q C, Hooper D C. The transcriptional regulators *NorG* and *MgrA* modulate resistance to both quinolones and beta-lactams in *Staphylococcus aureus* [J]. *Bacteriol*, 2007,189(8):2996-3005.
- [10] Neoh H M, Cui L, Yuzawa H, *et al.* Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2008,52(1):45-53.
- [11] Rose W E, Rybak M J, Tsuji B T, *et al.* Correlation of vancomycin and daptomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* in reference to accessory gene regulator (*agr*) polymorphism and function [J]. *Antimicrob Chemother*,2007,59(6):1190-1193.
- [12] O'Leary J O, Langevin M J, Price C T, *et al.* Effects of *sarA* inactivation on the intrinsic multidrug resistance mechanism of *Staphylococcus aureus* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 15; 237(2):297-302.
- [13] Singh V K, Schmidt J L, Jayaswal R K, *et al.* Impact of *sigB* mutation on *Staphylococcus aureus* oxacillin and vancomycin resistance varies with parental background and method of assessment [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 21(3):256-261.
- [14] Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, *et al.* Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of NAIII-activating protein (TRAP) [J]. *Biol Chem*, 2001,26;276(4):2658-2667.
- [15] Chien Y, Manna A C, Projan S J, *et al.* *SarA*, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation [J]. *Biol Chem*,1999,24;274(52):37169-37176.
- [16] Manna A, Cheung A L. Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus* [J]. *Infect Immun*, 2001,69(2):885-896.
- [17] Hsieh H Y, Tseng C W, Stewart G C. Regulation of *Rot* expression in *Staphylococcus aureus* [J]. *Bacteriol*, 2008, 190(2):546-554.
- [18] Manna A C, Ingavale S S, Maloney M, *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]. *Bacteriol*, 2004, 186(16):5267-5280.
- [19] Shaw L N, Aish J, Davenport J E, *et al.* Investigations into *sigmaB*-modulated regulatory pathways governing extracellular virulence determinant production in *Staphylococcus aureus* [J]. *Bacteriol*,2006,188(17):6070-6080.
- [20] Lian J Q, Cui L, Kuroda M, *et al.* Characterization of a novel regulator gene to increase beta-lactam resistance in *S. aureus*. *Jpn J Bactriol*,2003,58(1):194.