

金黄色葡萄球菌调节基因 *mgrA* 研究进展

Research progress on *Staphylococcus aureus* regulatory gene *mgrA*

王 炜(WANG Wei)¹ 综述 连建奇(LIAN Jian-qi)² 审校

(1 承德医学院基础部,河北 承德 067000;2 第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心,陕西 西安 710038)

(1 Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2 Center of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

[关键词] 金黄色葡萄球菌;*mgrA*;MgrA;抗药性;微生物;调节基因

[中图分类号] R378.1⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2009)02-0132-04

近年来,临床革兰阳性(G⁺)菌的感染呈上升趋势,其中金黄色葡萄球菌(金葡菌)感染占很大比例,而金葡菌的耐药性也越来越普遍,特别是耐甲氧西林金葡菌(MRSA)对几乎所有抗菌药物均耐药,给治疗造成很大麻烦。在近来的研究中,又发现了一种新的与金葡菌多药耐药性有关的基因 *mgrA*,它可从多个途径对耐药性进行调节。

1 *mgrA* 基因及其编码蛋白

1.1 *mgrA* 基因结构 *mgrA* 基因位于金葡菌染色体中,包含 444 bp 的碱基对,编码 147 个氨基酸的 MgrA 蛋白,其在 N315 菌株中的基因结构如图 1 所示。

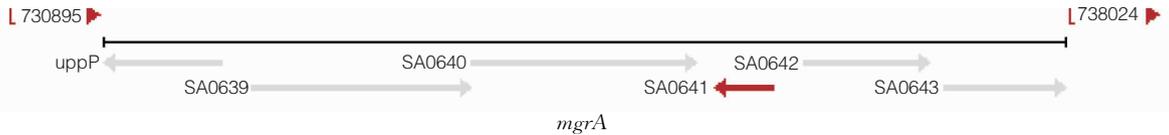


图 1 *mgrA* 基因结构

1.2 编码蛋白结构 经蛋白质结构域分析表明,MgrA(代表由 *mgrA* 编码所表达的蛋白)属于 MarR 家族(图 2),都含有螺旋-折叠-螺旋(helix-turn-helix, HTH)结构^[1-2]。由 2 个 α 螺旋间隔以一定角度的拐角构成的结构域,其中一个 α 螺旋称为识别螺旋(recognition helix),其可插入 DNA 大沟中,并负责识

别 DNA 大沟的特异碱基序列;另一个螺旋没有碱基特异性,与 DNA 磷酸戊糖链骨架接触(图 3)。其三级结构如图所示在与 DNA 特异结合时,以二聚体形式发挥作用(图 4)。进一步研究发现其对于金葡菌的耐药、毒力调节、自溶解基因的表达都具有调控作用。

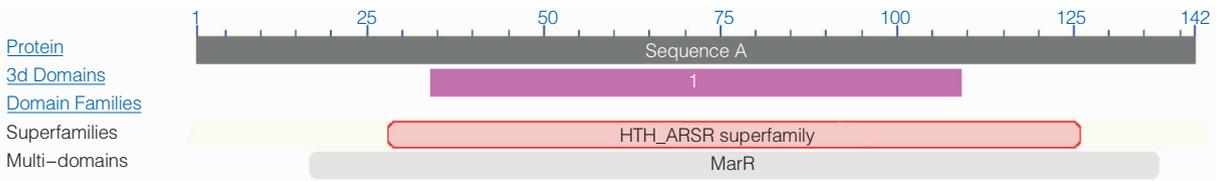


图 2 MgrA 蛋白质结构域分析

[收稿日期] 2008-09-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30570091)

[作者简介] 王炜(1980-),男(汉族),陕西省西安市人,硕士研究生,主要从事传染病学研究。

[通讯作者] 连建奇 E-mail: lianjq@fmmu.edu.cn

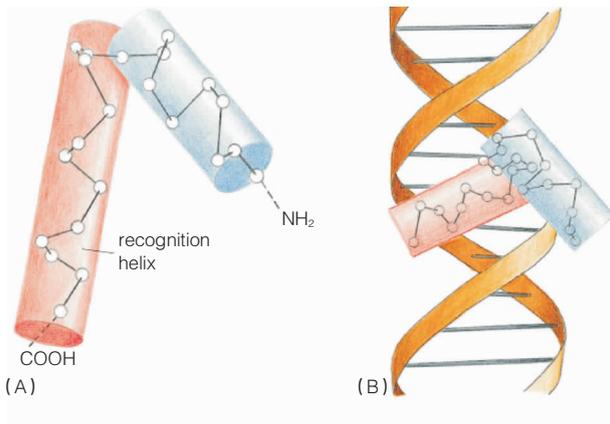


图3 MgrA的螺旋—折叠—螺旋结构

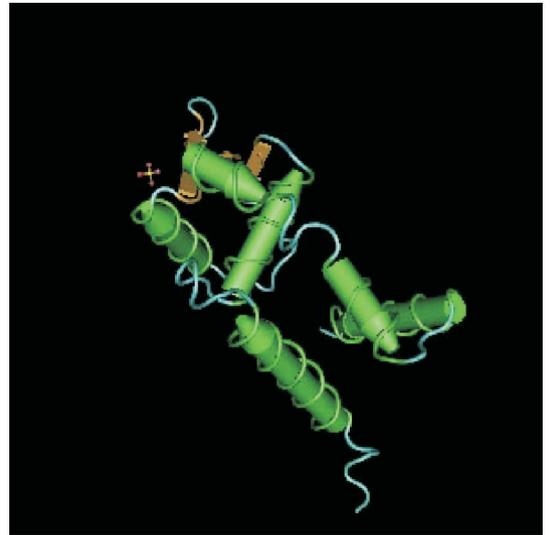


图4 MgrA的三级结构

2 *mgrA* 基因的功能

2.1 *mgrA* 与耐药 *mgrA* 是一个属于 *mgrR* 家族的调节基因,对于多种基因的表达具有影响。2003 年 5 月,Hooper 等^[3] 的研究表明 *mgrA* 的高表达株可以增加细菌对喹诺酮类抗生素的耐药性,其机制是 *mgrA* 可以调控 *norA* 的高表达,从而导致耐药。新近的研究认为^[4],*mgrA* 基因对于自溶解基因、毒力基因的表达以及细菌外排泵的功能具有影响作用。我们的研究表明,*mgrA* 基因高表达可以明显提高多个受体菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性,而对喹诺酮类抗菌药物的耐药性影响不大。在对 *mgrA* 高表达株和敲除 *mgrA* 的菌株对比中发现,高表达株对苯唑西林(MPIPC)的敏感性比受体菌 N315 降低了 16 倍,最低抑菌浓度(MIC)从 8 mg/L 增加到 128 mg/L;其对亚胺培南和萘夫西林(NFPC)的耐药性提高了 32 倍,对头孢氨苄的耐药性提高了 2 倍,而对头孢唑肟的耐药性提高了 128 倍。上述结果表明,*mgrA* 的高表达可显著增加细菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性^[5-7]。

此外,将 *mgrA* 基因分别在实验室突变菌株 LR5 - P1 和社区分离的金葡萄菌株 MW2 中进行高表达,其 MIC 结果表明,突变菌株 LR5 - P1 对苯唑西林的耐药性提高了 2 倍,细菌菌群分析亦表明 *mgrA* 基因的高表达不仅可提高 N315 对苯唑西林的耐药性,而且可增加突变菌株 LR5 - P1 对苯唑西林的耐药性;虽然社区分离菌株 MW2 对苯唑西林的 MIC 与对照菌株相同,但菌群分析和 E-test 结果表明 *mgrA* 基因的高表达仍提高了部分菌群的耐药性。通过分析 N315

和其突变菌株的细胞壁成分,发现同对照组 N315、*mgrA* 高表达株 N315 (pYT641) 和补足菌株 N315 Δ 641(pYT641)相比,基因敲除株 N315 Δ 641 的细胞壁肽聚糖的交联度降低,而 N315 和补足菌株 (pYT641)相比无明显差别,说明 *mgrA* 基因影响细胞壁的合成^[5]。与此同时,另一研究显示 *mgr* 是一种新型的调节基因,主要包括 *mgrA*,与其他细菌转录调节基因相互影响表达^[1]。2006 年 3 月,Hooper 等经实验研究认为,对于 *NorA*、*NorB*、*NorC*、*Tet38* 等外排泵基因,*mgrA* 具有全面调控作用,当其高表达时可以引起对喹诺酮的耐药。研究表明^[8-9],*mgrA* 对 *norB* 和 *tet38* 具有负向调节作用,其中 *NorC* 是染色体编码多药耐药外排泵的编码基因。利用凝胶电泳分析技术发现 MgrA 与 *norB* 和 *tet38* 启动区的结合,结果证明 MgrA 是一个间接的调节因子^[10]。Chen 等^[11]通过晶体衍射分析表明,MgrA 双聚体间有一丝氨酸残基可被氧化,丝氨酸的氧化导致 MgrA 从结合的 DNA 分子解离启动信号转导,引起细菌耐药。新近的研究认为^[12],*mgrA* 能够被 sigma B 因子调节,调控 *norA* 外排泵的表达;进一步的研究发现,PknB 激酶可影响 MgrA 的磷酸化,从而增强 MgrA 蛋白结合到 *norA* 启动子的能力。

2.2 影响毒力调节和毒力基因 Ingavale 等^[13] 研究证实,*mgrA* 基因可以提高 *agr* 基因的表达,进而影响 RNA III 表达增多,使 α 毒素表达增强;与此同时,*agr* 可以使 *sarA* 表达下降。2003 年 7 月,Luong 等^[1] 的研究认为 *mgrA* 是一个新的金葡萄菌调节基因,可以调节许多毒力基因的表达,包括囊膜蛋白基因、 α 毒素、核酸酶的表达;另有研究表明^[14] 其对于 protein A 的

表达具有显著调节作用, MgrA 可抑制 protein A 的表达, *mgrA* 基因的灭活可导致 protein A 和 α 毒素的高表达。RNA 杂交分析表明^[1], *mgrA* 基因可以影响细菌毒力调节基因 *agrA* 和 *sigB* 以及影响细菌感染有关的毒力基因 *spa*、*clfB* 的表达。Ingavale 等^[13]的研究认为, 对于细菌毒力基因的调节十分复杂, *mgrA* 系统可以直接或间接影响其他毒力基因的表达。2006 年 2 月, Manna 等^[15]的研究表明 *mgrA* 基因与 *sarX* 表达有关, MgrA 蛋白是 *sarX* 基因表达的激活物。Ingavale 等^[13]通过基因芯片技术对比, 认为 MgrA 可以和其他毒力调节基因 *agr*、*sarS*、*sarT* 相互作用共同影响毒力因子 *hla* 和 *spa* 的转录, 参与金葡菌毒力因子调节网络。*mgrA* 主要在转录水平调节 *cap*、*spa*、*nuc*、*hla* 等基因^[16]。2006 年 Cheung 等^[2]发现 *sarA* 能够调节多种毒力基因, 而其表达受到 *mgrA* 的激活调节, 证实纯化的 MgrA 蛋白与 *sarA* 的上游启动子相关联, 并且在 *sarA* 家族中 *mgrA* 能够激活其转录。综上所述, *mgrA* 可以调节多种毒力基因。

2.3 调节自溶解基因 2003 年 6 月, Ingavale 等^[17]的研究表明 *mgrA* 基因是金葡菌一个重要的自溶解基因, 敲除此基因的细菌自溶性明显增加。*mgrA* 可直接调节自溶解调节基因 *lytSR*、*IrgAB* 和 *arlRS* 的表达。2004 年 8 月, Manna 等^[18]研究表明 *mgrA* 可以抑制一个新的金葡菌转录调节基因 *sarV* 的表达, *sarV* 属于 *sarA* 家族; 并且纯化的 MgrA 蛋白可以影响 *sarV* 表达, 从而调控自溶解基因的表达, 影响细菌自溶解作用。Ingavale 等^[13]亦证实 *mgrA* 能够有效调节自溶解基因和毒力基因; 对于自溶调节基因具有正性调节作用, 而对胞质水解酶能够负性地调节。

2.4 生物被膜形成和致病性的影响 最近研究发现^[4]*mgrA* 对于生物膜的形成有影响, 研究中 *mgrA* 突变株 RN6390、SH1000 和 MW2 显示能够增强生物膜形成; 基因分析表明, 在 *mgrA* 突变株中生物膜的形成是由 *agr* RNA III 部分介导的; MgrA 抑制生物膜的形成, 主要机制是减少表面蛋白的形成。Jonsson 等^[19]在研究中发现, *mgrA* 基因的表达诱导化脓性关节炎和败血症的形成和进展; 动物实验中, 小鼠接种 *mgrA* 突变菌株可大大减少严重的关节炎及败血症的发生。此外, 与野生型菌株相比, *mgrA* 突变株显著减少细菌存在于肾脏的数量, 因此 *mgrA* 调控的毒力因子的表达, 在化脓性关节炎和败血症的建立与发展中起着十分重要的作用^[19]。

综上所述, 对 *mgrA* 基因的研究还处于起始阶段, 有很多与其他基因的影响机制尚未明了。然而,

由于它是一个多方面影响金葡菌耐药性的基因, 所以对其研究很有必要。深入研究细菌耐药基因, 明确细菌的耐药机制, 将有利于指导抗菌药物的合理应用。

[参 考 文 献]

- [1] Luong T T, Newell S W, Lee C Y. Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus* [J]. Bacteriol, 2003, 185(13): 3703 - 3710.
- [2] Cheung A L, Nishina K A, Trotonda M P, et al. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus* [J]. Biochem Cell Biol, 2008, 40(3): 355 - 361.
- [3] Truong-Bolduc Q C, Zhang X, Hooper D C. Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of norA expression in *Staphylococcus aureus* [J]. Bacteriol, 2003, 185(10): 3127 - 3138.
- [4] Trotonde MP, Tamber S, Memmi G, et al. MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Immun, 2008, 76(12): 5645 - 5654.
- [5] Lian J Q, Cui L, Kuroda M, et al. Characterization of a novel regulator gene to increase beta-lactam resistance in *S. aureus* [J]. Jpn J Bacteriol, 2003, 58(1): 194.
- [6] Cui L, Lian J Q, Neoh H M, et al. DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptides resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother [J]. 2005, 49(8): 3404 - 3413.
- [7] 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]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(7): 603 - 609.
- [8] Truong -Bolduc Q C, Strahilevitz J, Hooper D C. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(3): 1104 - 1107.
- [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]. J Bacteriol, 2007, 189(8): 2996 - 3005.
- [10] Truong-Boleuc Q C, Dunman P M, Strahilevit Z J, et al. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. [J]. J Bacteriol, 2005, 187(7): 2395 - 2405.
- [11] 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]. Nat Chem Biol, 2006, 2(11): 591 - 595.
- [12] Gao J, Stewart G C. Regulatory element of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter [J]. J Bacteriol, 2004, 3738 - 3748.
- [13] Ingavale S, Lee C Y, Cheung A L, et al. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Immun, 2005, 73(3): 1423 - 1431.
- [14] Truong-Bolduc Q C, Ding Y, Hooper D C. Posttranslational modification influences the effects of MgrA on norA expression in *Staphylococcus aureus* [J]. J Bacteriol, 2008, 190(22): 7375 - 7381.

了菌群间的制约关系,使得耐药率高的 IRPA 定植生长,最终导致患者感染^[7]。其次为烧伤部位(7.87%)感染。何梅等^[8]对烧伤创面 PA 细胞表面疏水性和黏附性的初步研究表明:细菌表面疏水性在微生物与宿主细胞之间早期非特异性结合过程中,通过疏水键的作用,介导黏附过程。高表面疏水性可增加 PA 非特异性黏附,间接促进 PA 黏附早期的局部定植能力,而黏附性代表着 PA 对宿主细胞的直接侵袭力,使烧伤创面易发生 PA 感染。另外,烧伤科使用抗菌药物的特点是起点高,用量大。而烧伤病区抗菌药物使用与 PA 耐药水平变化的关系显示,PA 对亚胺培南的耐药率分别与大环内酯类、碳青霉烯类和第 3 代头孢菌素的使用量呈正相关^[9];亚胺培南和环丙沙星用量与 PA 对这两种药物耐药率的变化呈显著正相关^[10];氟喹诺酮类抗生素可诱导 PA 主动外排,表现为蛋白过度表达,这些因素导致了烧伤创面感染从非 IRPA 到 IRPA 的转变^[11]。提示限制这些药物的使用,根据药敏结果和个体情况均衡使用各类抗假单胞菌药物,严格采取综合措施控制耐药菌株感染与扩散,有助于控制 PA 耐药^[12]。

IRPA 与非 IRPA 对常用抗菌药物的耐药率相比,除美洛西林耐药率无差异外,其余差异均有高度显著性(均 $P = 0.000$)。IRPA 对阿米卡星的耐药率最低,但也达到了 53.77%,其次为头孢哌酮/舒巴坦(56.12%),对其余抗菌药物的耐药率均 >60%;值得注意的是,其对美罗培南的耐药率更高,达到 83.33%。依据“预测药物”的耐药表型(模式)来初步推测耐药机制,说明这些菌株涉及到了 AmpC 酶、金属酶、药物的主动排出和外膜蛋白 OprD2 减少或缺失等多种耐药机制,且多数菌株为多种耐药机制并存。

(致谢:对给予全国医院感染监控网工作提供支持和帮助的所有同道表示衷心感谢)

[参考文献]

- [1] 颜英俊,糜祖煌,刘华,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(6):627-630.
- [2] 文细毛,任南,吴安华,等. 310 例嗜麦芽窄食单胞菌医院感染特征分析[J]. 中国感染控制杂志, 2002, 1(1):23-26.
- [3] 田嵩,彭少华,蔡璇,等. 湖北省部分三级医院铜绿假单胞菌耐药性变迁调查分析[J]. 医药导报, 2007, 26(11):1370-1371.
- [4] 倪语星. 2005 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(4):274-277.
- [5] 谢薇,刘原,张毅,等. 西安地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染现状及危险因素分析[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(18):1365-1368.
- [6] National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004[J]. Am J Infect Control, 2004, 32(8):470-485.
- [7] 季海生,朱德全. 重症监护病房病原菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(1):103-106.
- [8] 何梅,刘永芳,黄贤惠,等. 烧伤创面铜绿假单胞菌细胞表面疏水性和粘附性的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(16):1433-1434.
- [9] 于勇,常东,蒋伟,等. 烧伤病区抗生素使用与铜绿假单胞菌耐药水平变化的关系[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(24):92-95.
- [10] 罗燕萍,沈定霞,裴保香,等. 铜绿假单胞菌耐药性与五种抗假单胞菌抗生素使用量相关性研究[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(4):304-305.
- [11] Ozkurt Z, Ertek M, Erol S, et al. The risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the burn unit[J]. Burns, 2005, 31(7):870-873.
- [12] 谢景超. 铜绿假单胞菌对哌拉西林耐药及其多重耐药评估[J]. 中国感染控制杂志, 2006, 5(1):85-87.

(上接第 134 页)

- [15] Manna A C, Cheung A L. Expression of SarX, a negative regulator of agr and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(12):4288-4299.
- [16] Luong T T, Dunman P M, Lee C Y, et al. Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus* [J]. J Bacteriol, 2006, 188(5):1899-1910.
- [17] 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.
- [18] Manna A C, Ingavale S S, Cheung A L, 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]. J Bacteriol, 2004, 186(16):5267-5280.
- [19] Jonsson I M, Lindholm C, Luong T T. MgrA regulates staphylococcal virulence important for induction and progression of septic arthritis and sepsis [J]. Microbes and Infection, 2008, 10(12-13):1229-1235.