DOI:10.16016/j.2097-0927.202308044

β-毒素促进金黄色葡萄球菌破坏血脑屏障的实验研究

王哲芬[1,2],尹 靓[1,2],陈 韬[1,2],吴静琳[1,2],郑 颖[1,2] 650032 昆明,昆明医科大学第一附属医院神经内科[1];650032 昆明,云南省神经系统疾病临床医学研究中心[2]

[**摘要**] **目的** 探讨 β-毒素(Hlb)在金黄色葡萄球菌通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)中的作用。**方法** 通过血琼脂平板划线筛选金葡菌 MW2 的 Hlb 高产菌株,验证其对 hCMEC/D3 模拟 BBB 细胞模型通透性的影响。采用生物信息学分析筛选 *hlb* 基因完整的金葡菌菌株,利用同源重组的方法构建 *hlb* 敲除株,血琼脂平板法检测溶血活性改变。利用 BBB 细胞模型比较不同菌株对其通透性的影响,再将野生株与 *hlb* 敲除株经尾静脉注射构建小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型并比较感染 72 h 脑组织中菌载量。**结果** 金葡菌 MW2 的 Hlb 高产菌株对 BBB 细胞模型破坏导致 BBB 细胞模型通透性增加的能力较野生株明显增强。NCTC8325-4、COL 和 RN4220 菌株 *hlb* 基因无噬菌体插入。成功构建 NCTC8325-4Δ*hlb* 株,血平板证实敲除株的 β-溶血缺失。NCTC8325-4Δ*hlb* 株对 BBB 模型细胞破坏导致 BBB 细胞模型通透性增加的作用较野生株下降,在小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型脑组织中菌载量也较野生株明显降低。**结论** β-毒素具有促进金葡菌破坏 BBB 的作用。

[**关键词**] 金黄色葡萄球菌;β-毒素;血脑屏障;血源性脑膜炎/脑微脓肿模型;血脑屏障细胞模型
[**中图法分类号**] R322.81; R363.21; R378.11 [**文献标志码**] A

Experimental Research on β-toxin of *Staphylococcus aureus* promotes breaking the blood-brain barrier in mice

WANG Zhefen[1,2], YIN Jing[1,2], CHEN Tao[1,2], WU Jinglin[1,2], ZHENG Ying[1,2] [1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan Province, 650032; [2]Yunnan Provincial Clinical Research Center for Neurological Diseases, Kunming, Yunnan Province, 650032, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of β-toxin (Hlb) in the penetration of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) through blood-brain barrier (BBB). **Methods** The high Hlb-producing strain of *S. aureus* MW2 was screened by streaking on blood agar plate, and its effect on the permeability of hCMEC/D3 simulated BBB cell model was verified. Bioinformatics analysis was used to screen the strains with complete *hlb* gene, and then the *hlb* knockout strain was constructed with homologous recombination. The hemolytic activities of strains of interest were verified by streaking on blood agar plate. The permeability of different strains of *S. aureus* was compared in BBB cell model. A hematogenous meningitis/brain microabscess model was generated by injection of the wild-type or the *hlb*-deletion strain individually into CD1 mice through tail vain, and the bacterial load in the brain tissue was determined in 72 h after infection. **Results** The Hlb high-producing strain of MW2 (Hyper-β) led to increased permeability of the BBB model cells than the wild-type strain. The NCTC8325-4, COL, and RN4220 strains had intact *hlb* gene without phage insertion. The NCTC8325-4Δ*hlb* strain was successfully constructed, and the lack of β-hemolysis of the mutant was verified by blood agar plate. A reduced permeability of NCTC8325-4Δ*hlb* on the BBB cell model was observed in

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(82002196);云南省科技厅基础研究计划昆医联合专项-面上项目(202101AY070001-105);云南省神经系统疾病诊疗中心应用基础研究专项基金(ZX2019-03-05);云南省重大科技专项计划(202102AA100061)
[**通信作者**] 郑颖,E-mail: zhengym@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

comparison to that of the wild-type strain. The bacterial load of NCTC8325-4Δ*hlb* strain in the brain tissue of the mouse hematogenous meningitis/brain microabscess model was obviously lower than that of the wild-type strain. **Conclusion** β-toxin from *S. aureus* promotes the bacteria destroying BBB.

[**Key words**] *Staphylococcus aureus*; β-toxin; blood-brain barrier; hematogenous meningitis/brain microabscess model; blood-brain barrier cell model

This work was supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82002196), the General Project of Joint Special Foundation of Basic Research Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology-Kunming Medical University (202101AY070001-105), the Special Fund of Applied Basic Research of Yunnan Provincial Clinical Research Center for Neurological Diseases (ZX2019-03-05) and the Major Project of Science and Technology Plan of Yunnan Province (202102AA100061). Corresponding author: ZHENG Ying, E-mail: zhengym@126.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 简称金葡菌)是一种重要的机会致病性细菌,约20%~30%正常人群皮肤和鼻咽腔中存在金葡菌定植,增加了宿主发生侵袭性感染的风险[1,2]。金葡菌可产生多种毒力因子,能够侵袭多个器官系统,引发皮肤感染、肺炎、败血症、深部脓肿,甚至导致中枢神经系统(central nervous sys term,CNS)的致命感染性疾病,如脑膜炎和脑脓肿[3]。最近的一项荟萃分析显示,在脑脊液和脓液培养呈阳性的脑脓肿病例中,金葡菌占比达18%(1,076/5,894)[4]。

金葡菌分泌多种溶素(如α-, β-, γ-, δ-毒素等),通过破坏宿主细胞,增强细菌的侵袭能力[5]。我们前期研究发现金葡菌在脑脓肿致病过程中β-毒素(β-hemolysin)编码基因*hlb*在小鼠脑脓肿中表达明显上调,为该菌致脑脓肿的关键毒力因子[6]。金葡菌β-毒素是一种可分泌的细胞溶素,通过分解细胞膜上的鞘磷脂,导致宿主细胞死亡[7]。研究表明,*hlb*基因位于金葡菌基因组上,临床分离金葡菌的*hlb*基因常常被φSa3噬菌体插入而失活;当噬菌体基因组切离后*hlb*基因可被激活而发生致病作用[8-9]。因此,金葡菌β-毒素的致病作用常常被低估[10]。为了深入研究β-毒素的功能,本研究中我们通过*hlb*基因比对的方法,筛选到无φSa3噬菌体插入的NCTC8325-4金葡菌株用于构建敲除*hlb*基因的菌株(NCTC8325-4Δ*hlb*),发现敲除株血脑屏障细胞模型通透性增加的能力以及引起小鼠脑膜炎/脑微脓肿的能力均较野生株显著下降。结果表明,β-毒素在金葡菌感染CNS中发挥重要作用,其功能的发挥有利于金葡菌破坏并通过血脑屏障,实现金葡菌中枢神经系统感染。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、细胞及动物 金葡菌MW2、NCTC8323-4和RN4220菌株(陆军军医大学微生物学教研室保存);大肠埃希菌DH5α感受态细菌购自北京天根生物,大肠埃希菌-金葡菌温敏穿梭质粒pBT2[氨苄青霉素(Amp^r)及氯霉素(Cm^r)抗性]由中国科学技术大学孙宝林教授惠赠。人脑微血管内皮细胞hCMEC/D3购自重庆巴尔思公司,CD1小鼠购自陆军军医大学实验动物中心。

1.1.2 仪器与试剂 PCR仪(美国Bio-Rad);倒置显微镜(美国Olympus);多功能酶标仪(美国美谷分子);10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS),DMEM高糖培养基(美国HyClone);分子量40 kDa的异硫氰酸荧光素-葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran 40 kDa,FD40,美国Sigma);细菌基因组提取试剂盒(北京天根生物);溶葡菌素(美国Sigma);PrimeSTAR © 高保真DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、限制性内切酶(美国Thermo Fisher);2×*Taq*酶混合液(康为世纪);高保真DNA聚合酶(大连宝生生物);PCR产物回收试剂盒、细菌质粒提取试剂盒(美国Promega);PBS粉(无锡傲锐东源);琼脂糖(美国Invitrogen);氨苄青霉素、氯霉素(上海生工);金葡菌BHI(Brain Heart Infusion)培养基、TSB(Tryptone Soya Broth)培养基,大肠埃希菌LB胰蛋白胨(Tryptone)培养基及酵母提取物(Yeast Extract)(英国Oxoid);血琼脂平板(重庆庞通);Transwell©细胞培养小室、聚苯乙烯96孔板(美国Corning)。

1.2 实验方法

1.2.1 金葡菌MW2的Hlb高产菌株筛选 自TSB琼脂平板上挑取MW2菌株[为社区相关耐甲氧西林金葡菌(methicillin-susceptible *S. aureus*,MSSA)代表性菌株)]单菌落,接种于2 mL TSB液体培养基中,37 ℃摇床,200 转/min培养过夜。将细菌培养液以三区划线法接种于血琼脂平板上,37 ℃培养箱培养至单菌落可见。肉眼观察,筛选到菌落周围呈现宽大β-溶血环的Hlb高产菌株Hyper-β株[10]。分别挑取野生株与Hyper-β株单菌落,接种于TSB液体培养基,37 ℃摇床,200 r/min培养过夜,三区划线法接种于血琼脂平板后培养观察菌落的溶血现象。

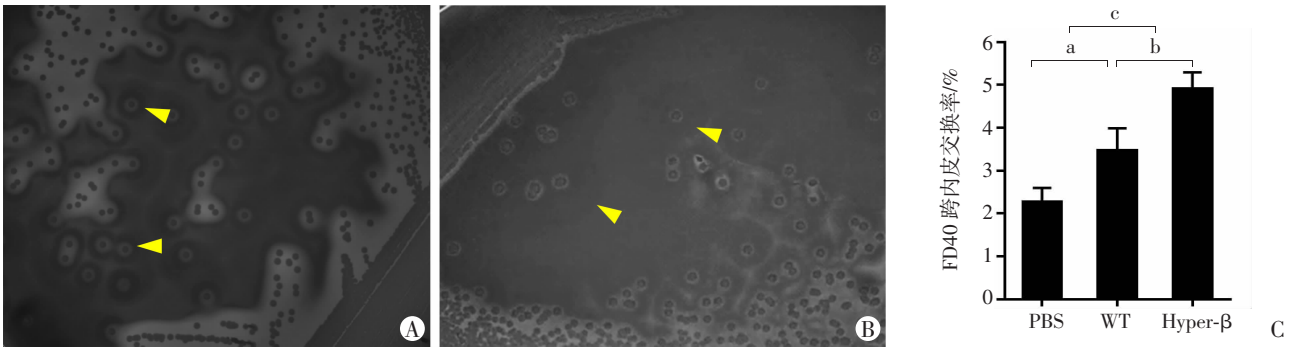
1.2.2 金葡菌 MW2 菌株及 Hyper-β 株对 hCMEC/D3 细胞模拟血脑屏障模型通透性的影响 hCMEC/D3 细胞系源自癫痫手术切除的人脑组织分离的颞叶微血管,常用于构建血脑屏障细胞模型。采用 10% FBS+DMEM 高糖培养基在 Transwell© 细胞培养小室(6 孔,孔径为 0.4 μm,过滤器直径为 24 mm)培养 hCMEC/D3 细胞模拟血脑屏障模型[11]。在悬挂插入培养膜上接种细胞(5×10^5 个/孔),细胞培养箱中培养,倒置显微镜下观察见细胞融合。更换新鲜培养基,上室 2 mL,下室 4 mL。将金葡菌 MW2 野生株、Hyper-β 株(30 MOI),或 NCTC8325-4 野生型、NCTC8325-4Δ*hlb* 敲除株(30 MOI)分别接种于上室中,PBS 为对照,同时将 FD40 添加到上腔室(工作浓度为 250 μg/mL)。作用 1 h 后,从下室收集培养基样品(28 μL)以完全培养基稀释至 400 μL,置入 96 孔板中,多功能酶标仪检测 FD40 荧光强度,激发和发射波长分别为 490 nm 和 520 nm。血脑屏障通透性表示为 FD40 的跨内皮交换百分比(% transendothelial exchange of FD- 40, %TEE FD40)。

1.2.3 金葡菌 *hlb* 基因无噬菌体插入菌株的筛选 构建 *hlb* 基因敲除株,有利于进一步研究该基因的功能。然而,金葡菌 MW2 菌株 *hlb* 基因被 φSa3 噬菌体插入,无法构建 *hlb* 基因敲除株。因此,我们通过 Pubmed 中 GenBank 功能查找实验室常用 NCTC8325、NCTC8325-4、COL、Mu3、MW2、N315、Newman、RN4220、TW20 和 USA300 共 10 个不同金葡菌株基因组序列,采用 CLC Genomics Workbench 软件进行 *hlb* 基因生物信息学比对,筛选出含有完整 *hlb* 基因的菌株。

1.2.4 金葡菌 NCTC8325-4 菌株的 *hlb* 基因敲除株构建及鉴定 根据同源重组替换的原理,利用大肠埃希菌-金葡菌温度敏感穿梭质粒 pBT2,在金葡菌 NCTC8325-4 菌株中实施 *hlb* 基因的无痕敲除[12],具体步骤如下所述:①构建同源重组质粒 pBT2-Δ*hlb*:查询 NCTC8325-4 菌株基因组为模板,在 *hlb* 基因序列上、下游分别设计左、右臂引物(见表 1),并在引物上加入适当的限制性内切酶酶切位点。PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶扩增上述同源臂序列,各扩增约 1 000 bp(含限制性酶切位点及保护性碱基)。限制性内切酶分别双酶切左、右臂及 pBT2 质粒后,PCR 产物回收试剂盒回收备用。以 T4 DNA 连接酶连接左臂片段及 pBT2 质粒后,化学转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞,涂布 LB Amp^r 琼脂平板(Amp 浓度为 100 μg/mL),37 ℃孵箱培养过夜。次日挑取单菌落,提取质粒,经双酶切鉴定片段大小正确。以相同的方法将右臂片段连接入上述含有左臂片段的 pBT2 质粒中,转化 DH5α 后提取质粒、酶切筛选出左、右臂正确连接的敲除质粒 pBT2-Δ*hlb*。②制备 RN4220 菌株感受态细胞:将 RN4220 单菌落,接种于 TSB 液体培养基,37 ℃,200 r/min 培养过夜。再将菌悬液以 1∶100 比例接种至 BHI 液体培养基,37 ℃,200 r/min 培养 2 h 至 *OD*600≈0.5。菌液冰浴 30 min,随后 4 ℃,5 000 *g*×10 min 离心,弃去上清培养基。加入 0.5M 蔗糖溶液(冰浴灭菌)重悬菌体,冰浴 10 min。重复上述离心、蔗糖溶液重悬步骤 3 次。最后,加入 1 mL 0.5 M 蔗糖溶液重悬全部菌体,即获得 RN4220 菌株感受态细胞,置于-80 ℃保存。③敲除质粒 pBT2-Δ*hlb* 电穿孔转化金葡菌 RN4220 进行限制性修饰:将 pBT2-*hlb* 敲除质粒加入 RN4220 感受态细胞中,电穿孔仪转化条件为电压 2.5 KV,电阻 200 Ω,电容 50 μF。结束后将感受态细胞涂布至含 5 μg/mL Cm 的 BHI 琼脂平板上,30 ℃培养至单菌落肉眼可见。挑取单菌落接种于含 Cm^r 的 TSB 液体培养基质,提取质粒进行 PCR 及双酶切鉴定正确。④经 RN4220 限制修饰后的敲除质粒 pBT2-Δ*hlb* 转化 NCTC8325-4 菌株:按照步骤③条件,将质粒 pBT2-Δ*hlb* 电转化至 NCTC8325-4 菌株感受态细胞,提取质粒,经 PCR 及双酶切鉴定正确。⑤金葡菌 NCTC8325-4-Δ*hlb* 敲除株的筛选与鉴定:利用 pBT2 质粒,42 ℃诱导整合入金葡菌基因组,25 ℃诱导自基因组切离的温度敏感特点,不同温度条件诱导,对 NCTC8325-4 株 *hlb* 基因实施无痕敲除。将含有 pBT2-Δ*hlb* 敲除质粒的 NCTC8325-4 菌株接种到含 Cm^r TSB 液体培养基,42 ℃,200 r/min 培养 16 h,划三线法接种于 TSB Cm^r 琼脂平板。42 ℃培养,挑取约 10 个单菌落分别接种到 TSB Cm^r 液体培养基,振荡培养过夜。提取细菌基因组,利用下述两对引物分别进行 PCR 扩增:*hlb* 基因上游外侧-F 及 pBT2 多克隆区外侧-R,pBT2 多克隆区外侧-F 及 *hlb* 基因下游外侧-R(见表 1),筛选出发生左臂或右臂重组的单克隆,分别接种到 TSB 液体培养基,25 ℃,200 r/min 培养 16 h。划三线法接种于 TSB 琼脂平板,37 ℃培养后,将单克隆菌液同时接种至 TSB Cm^r 平板和 TSB 平板上,37 ℃培养。在 TSB Cm^r 平板不生长,而在 TSB 平板生长的菌株,筛选出可能的 *hlb* 敲除株。提取待鉴定敲除株基因组,*hlb* 外侧、内侧引物分别 PCR 扩增。与 NCTC8325-4 野生株相比较,*hlb* 外侧引物 PCR 产物缺失 *hlb* 片段,并且内侧引物 PCR 无扩增的即为 *hlb* 基因敲除株。取 *hlb* 外侧引物 PCR 产物测序,仅残存左、右侧同源臂处的酶切位点序列,进一步确认目的基因敲除,即 NCTC8325-4-Δ*hlb* 敲除株构建成功。

表 1　NCTC8325-4 菌株 *hlb* 基因敲除株构建 PCR 引物表

名称	引物序列(5′→3′)	片段长度
Up-*hlb*(BamHI)-F	CAAGGATCCAATCGATAACTTTCTTCGTTCCA	969 bp
Up-*hlb*(SalI)- R	GGCGTCGACGATGCTGTAAATATAATCGACAAATC	
Down-*hlb*(SalI)-F	GCTGTCGACGCTCAACTAACTAATAACTTGCTTCG	993 bp
Down-*hlb*(PstI)-R	TTGCTGCAGGGTACAATTGGTAGTGGTTTGAGA	
Out-*hlb*-F	CGCATGAACTAAGTTTGCTGTGT	1498 bp
Out-*hlb*-R	CACGTACAGCTACAACAAGTGATAGTC	
In-*hlb*-F	GGTGGGACAAAACTGAAGGTAGC	133 bp
In-*hlb*-R	TGCTATCATTATCGAATCCACAACC	



A:MW2 野生株菌落周围见黑色窄带 β-溶血环(黄色箭头所示);B:Hyper-β 株菌落周围见宽大 β-溶血环(黄色箭头所示);C:BBB 细胞模型 FD40 跨膜交换通透性比较　a: $P<0.01$, b: $P<0.01$, c: $P<0.000\ 1$

图 1　金葡菌 MW2 和 Hyper-β 株的 β-溶血现象及其对血脑屏障通透性的影响

1.2.5　金葡菌 NCTC8325-4 野生株及其 Δ*hlb* 株、RN4220 菌株溶血活性鉴定　　将 RN4220 菌株垂直划线于血琼脂平板,NCTC8325-4 野生株、Δ*hlb* 株分别划线于左侧和右侧,与中间的 RN4220 菌株垂直交叉。37 ℃培养过夜,观察溶血现象差异[13]。

1.2.6　金葡菌感染小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型构建及鉴定　　取对数生长期金葡菌 NCTC8325-4 野生株菌悬液,离心弃去培养基,随后加入灭菌的 PBS 溶液,清洗、离心共 2 次,再加入 PBS 制备菌悬液备用。将 100 μL 含 NCTC8325-4 菌株 1×10^7 CFU 的菌悬液经尾静脉注射至 6~8 周龄雄性 CD1 小鼠,SPF 级动物房饲养[14]。注射 72 h 后将小鼠安乐死,采集脑组织,经病理切片 H&E 染色,显微镜下观察病理改变。

1.2.7　金葡菌 NCTC8325-4 野生株与 NCTC8325-4Δ*hlb* 株感染小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型菌载量比较　　将 NCTC8325-4 野生株与 NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株按照前述方法(见 1.2.6),分别构建小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型。饲养 72 h 后安乐死,将脑组织加入灭菌 0.5% Triton-X-100 的 PBS 溶液制成匀浆,梯度稀释、铺板计数,比较小鼠脑组织的细菌载量。

1.2.8　统计学方法　　GraphPad Prism 9 软件对实验结果进行统计学分析,两组间比较采用 Students' *t* 检验,脑组织细菌载量各组间采用曼-惠特尼检验(Mann-Whitney test)。$P<0.05$ 为具有统计学差异。

2　结果

2.1　Hlb 高产菌株 Hyper-β 导致血脑屏障通透性增加的能力增强

整合至 *hlb* 基因中的噬菌体可以随机切离[9, 15]。通过血平板培养金葡菌 MW2,筛选到 β-溶血现象能力明显增强的 Hyper-β 株(图 1A,B)。Transwell 培养 hCMEC/D3 细胞以模拟血脑屏障,经金葡菌 MW2、Hyper-β 株(30 MOI)及 PBS 处理 1 h,荧光染料透过实验表明 Hyper-β 株所致 FD40 的跨内皮交换百分比显著高于野生株及 PBS 对照组(图 1C),提示 β-毒素可能具有增加血脑屏障通透性的作用。

2.2　金葡菌 NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株的构建与鉴定

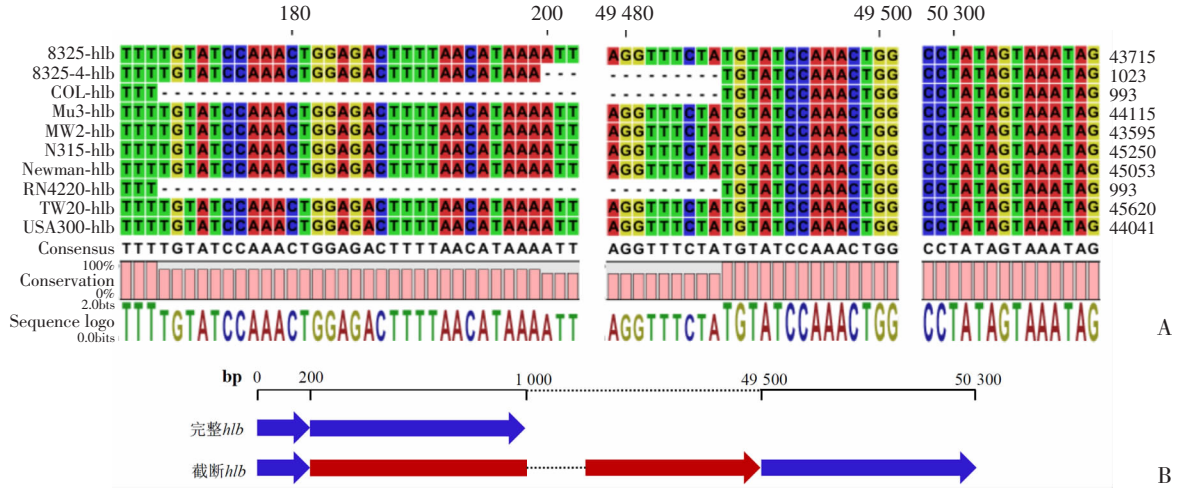
选择 10 个不同类型金葡菌菌株:MSSA 菌株 NCTC8325 及其衍生株 NCTC8325-4 和 RN4220,Newman;耐甲氧西林金葡菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)菌株 COL、MW2、N315、TW20 和 USA300;万古霉素中介耐药(vancomycin-intermediate resistance *S.*

aureus, VISA)菌株 Mu3,筛选 *hlb* 基因完整的菌株作为亲本株。在 GenBank 数据库中下载上述菌株基因组序列,比较分析其 *hlb* 基因,发现 NCTC8325-4、COL 和 RN4220 菌株具有完整 *hlb* 基因,无噬菌体插入(图 2),可稳定产生 Hlb。

我们选择 RN4220 的亲本菌株 NCTC8325-4 进行 *hlb* 基因敲除[16]。通过同源重组的方法,筛选到 NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株,用 *hlb* 基因的外侧引物和内侧引物进行 PCR 鉴定,结果如图 3A 所示。NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株用 *hlb* 基因外侧引物得到的 PCR 产物与野生株相比,片段减少 1 023 bp,相当于 *hlb* 基因长度;内侧引物 PCR 扩增时,野生株 *hlb* 基因正常扩增,片段约 133 bp,而 NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株无扩增产物。PCR 产物进一步经测序鉴定,发现仅在基因组上留下相应的酶切位点(图 3B),表明 NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株构建成功。

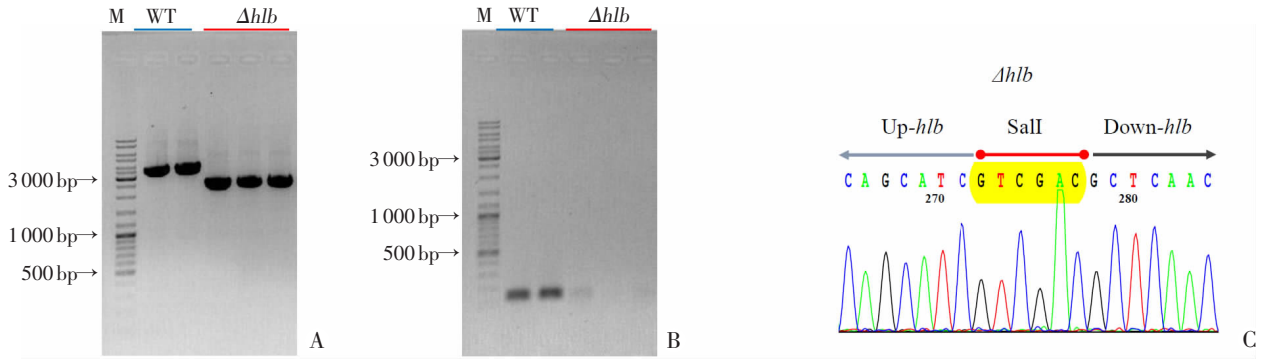
2.3 敲除 *hlb* 对金葡菌 NCTC8325-4 溶血活性的影响

金葡菌 RN4220 仅产生 β-溶血素,在血平板上呈现典型略浑浊的 β 溶血现象(图 4 黄色箭头所示)。NCTC8325-4 野生株为 α-,β-及 δ-溶血共存,由于 Hlb 对 α-溶血具有抑制作用,故表现为浑浊的不完全溶血现象(图 4 蓝色箭头所示);而 β-溶血素还与 δ-溶血素相互作用,产生围绕细菌划线条纹的狭窄清晰溶血区域(图 4 绿色箭头所示)。NCTC8325-4Δ*hlb* 株 β-溶血缺如,对 α-溶血抑制及与 δ-溶血素的相互作用均消失,仅表现为典型的透明 α-溶血现象(图 3C 红色箭头所示)[13]。



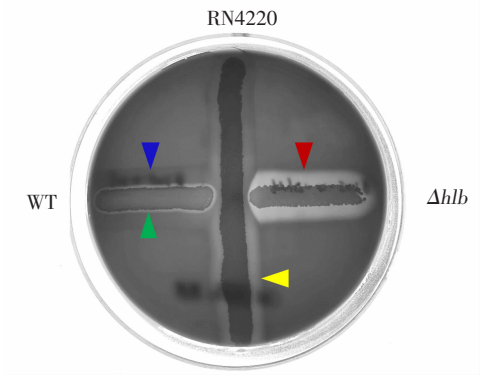
A:10 个金葡菌株的 *hlb* 基因序列比对,8325-4、COL 和 RN4220 的 *hlb* 基因完整,无噬菌体插入,其余菌株在距离起始密码子约 170 bp 或 200 bp 处被噬菌体插入;B:蓝色箭头表示 *hlb* 基因,红色箭头表示前噬菌体基因组。蓝色箭头之间有红色箭头者为噬菌体插入的截断 *hlb* 示意图

图 2 不同金葡菌株 *hlb* 基因中前噬菌体插入的比较分析



A:NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株 *hlb* 基因外侧引物 PCR 扩增产物电泳图,敲除菌株 PCR 产物与野生株相比,片段减少 1 023 bp(左);用内侧引物扩增时,野生株 *hlb* 基因正常扩增,片段 133 bp,NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株无扩增产物;B:NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株的测序鉴定,外侧引物 PCR 产物测序表明基因组上仅留下相应的酶切位点

图 3 金葡菌 NCTC8325-4Δ*hlb* 菌株的构建及鉴定

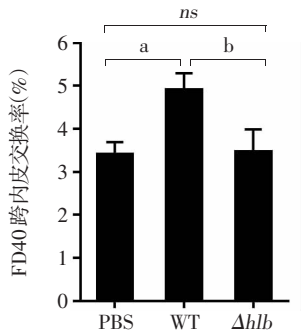


左侧野生株 α-及 β-溶血共存,呈现不完全溶血区(蓝色箭头所示),β-与 δ-溶血素相互作用,产生狭窄清晰溶血区(绿色箭头所示);右侧 *Δhlb* 株 β-溶血缺如,表现为清晰的 α-溶血(红色箭头所示);中间为 RN4220,表现为浑浊的 β-溶血(黄色箭头所示)

图 4 NCTC8325-4 野生株与 NCTC8325-4*Δhlb* 株溶血活性比较

2.4 敲除 *hlb* 影响金葡菌 NCTC8325-4 穿透血脑屏障

采用 30 MOI 的金葡菌 NCTC8325-4 野生株与 NCTC8325-4*Δhlb* 株分别处理 Transwell 培养的 hCMEC/D3 血脑屏障模型细胞,以 PBS 处理组为对照,作用 1 h 后,观察到野生株所致血脑屏障对 FD40 通透性增加程度显著高于敲除株及 PBS 对照组(图 5),表明 *hlb* 敲除后金葡菌导致血脑屏障通透性增加的能力降低。



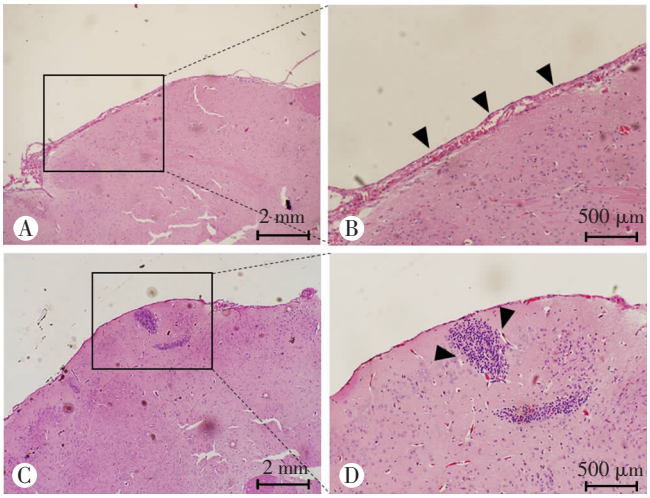
以 PBS 为对照,比较 NCTC8325-4 野生株及 *Δhlb* 株对 BBB 细胞模型 FD40 跨膜交换通透性 a: $P<0.001$, b: $P<0.05$, *ns*:无统计学差异

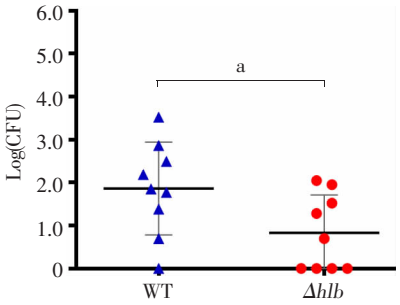
图 5 金葡菌 NCTC8325-4 和 NCTC8325-4*Δhlb* 株对 hCMEC/D3 细胞模型 BBB 通透性的检测

2.5 敲除 *hlb* 影响金葡菌 NCTC8325-4 在脑组织中定植量

用 1×10^7 CFU 的 NCTC8325-4 野生株经尾静脉注射至雄性 CD1 小鼠构建金葡菌感染血源性脑膜炎/脑微脓肿模型,72 h 后处死小鼠,将脑组织送检病理切片,经 H&E 染色,观察到软脑膜增厚,大脑皮质及髓质交界部见脑微脓肿形成(图 6A-D),提示模型构建成功。

分别用 1×10^7 CFU 的 NCTC8325-4 野生株和 NCTC8325-4*Δhlb* 株经尾静脉注射构建小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型,72 h 后取脑组织计数菌载量。与野生株相比,NCTC8325-4*Δhlb* 株感染后在脑组织中的菌载量明显下降(图 6E),提示敲除 *hlb* 后葡菌 NCTC8325-4 感染脑组织能力显著降低。





A,B:H&E 染色,可见小鼠大脑表面软脑膜增厚,充血性炎症(黑色箭头指示),A 为 40×, B 为 100×; C,D:H&E 染色,可见小鼠大脑皮质与髓质交界处炎症细胞聚集,脑微脓肿形成,边界清楚(黑色箭头指示),并可见软脑膜增厚,C 为 40×, D 为 100×; E:NCTC8325-4 野生株及 NCTC8325-4*Δhlb* 株构建小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型脑组织菌载量比较 $n=9$, a: $P<0.001$

图 6 金葡菌感染小鼠构建血源性脑膜炎/脑微脓肿模型病理改变及 *hlb* 敲除对 NCTC8325-4 在脑组织中定植量的影响

3 讨论

金葡菌是人类常驻菌群,定植于宿主皮肤、鼻咽部和消化道[17]。在一定条件下,转变为致病菌,引发皮肤、肺炎,并可经血流播散导致败血症,从而引发致命性脑膜炎和脑脓肿[1,3]。然而,金葡菌如何从定植状态转变为致病状态,通过血流播散入侵中枢的机制仍不清。

金葡菌产生大量毒力因子,如毒素、黏附素和免疫逃逸因子等。毒理因子间相互配合以适应宿主体内不同环境,发挥定植、感染等功能[5]。我们前期研究发现,金葡菌感染脑脓肿致病过程中 *hlb* 基因在小鼠脑脓肿模型中表达明显上调,为脑脓肿的关键毒力因子[6]。然而,研究采用的 Newman 株 *hlb* 基因被 φSa3 噬菌体插入而失活[18]。因此,Hlb 的致病功能研究较少。β-毒素由 *hlb* 基因编码,该基因位于金葡菌基因组上,约 77%临床分离株和 96%的人鼻腔金葡菌分离株携带 φSa3 噬菌体[9,15]。本研究选择 10 个金葡菌菌株进行生物信息学比对,其中 7 个菌株均存在噬菌体插入,与文献报道相一致。然而,噬菌体溶原是一个可逆过程,侵入性金葡菌分离株往往会丢失噬菌体,φSa3 噬菌体发挥"分子开关"作用,调控金葡菌的定植与侵袭状态,调控感染过程[15,19]。噬菌体等可移动遗传元件与金葡菌在不同宿主内生存,发挥致病作用密切相关,前噬菌体的插入和切除可能赋予细菌这种适应性进化优势[9]。我们筛选到金葡菌 MW2 的 Hyper-β 株,证实了 φSa3 噬菌体主动溶原现象的存在,并发现其破坏血脑屏障能力较野生株增强。

中枢神经系统受 BBB 保护,通常情况下毒素、微生物等不能进入。在一定条件下,金葡菌自血液播散穿透 BBB 入侵中枢。小鼠金葡菌脑脓肿模型证实金葡菌中枢感染伴随血脑屏障的持续破坏和炎症因子持续升高[20]。其致病作用的发挥可分为以下四个步骤:血流存活、黏附和侵袭、免疫逃逸及细胞内存活[17,21]。金葡菌穿透血脑屏障感染中枢相关的机制研究报道较少。*ypfp* 基因敲除后导致脂磷壁酸(lipoteichoic acid,LTA)膜锚定缺陷,表现出侵入 hBMEC 模拟 BBB 细胞模型的能力下降,并与体内发生脑膜炎的风险降低相关[14]。葡萄球菌 A 蛋白(SpA)能够增加人脑微血管内皮细胞(hBMVEC)通透性,同时伴随金葡菌导致的紧密连接蛋白 VE-Cadherin、Claudin-5 和 ZO-1 表达减少,促炎细胞因子产生、氧化应激反应和 NF-κB 通路激活[11]。上述研究均聚焦在金葡菌入侵 BBB 的黏附和免疫调节环节。而 β-毒素则可能是作用于细菌侵袭过程。

β-毒素分子量 35 kDa,属成孔毒素,并具有 Mg^{2+} 依赖的中性鞘磷脂酶(neutral sphingomyelinase,nSMase)活性,分解细胞膜的鞘磷脂,造成宿主细胞死亡,是特定感染条件下的重要毒力因子[9]。既往研究报道,金葡菌 β-毒素在肺损伤、兔感染性脑膜炎动物模型中发挥致病作用[22-23]。对人单核巨噬细胞、兔纤毛鼻上皮细胞、牛乳腺上皮细胞具有破坏作用,促进鼠巨噬细胞凋亡,而对人粒细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、红细胞,大剂量仍无明显毒性[24-27]。因此,β-毒素的致病作用具有宿主和组织特异性[6,17],而对血脑屏障细胞是否具有致病作用尚未见报道。

为进一步研究 β-毒素的生物学功能,构建了 NCTC8325-4 的 *hlb* 敲除株 NCTC8325-4Δ*hlb* 株。NCTC8325-4 野生株可产生 α、β、γ 和 δ-溶血素。四种溶血素之间存在相互作用,在血琼脂平板上呈现不同的溶血现象。由于 Hlb 对 α-溶血具有抑制作用,在血平板上表现为宽大浑浊的不完全溶血环;δ-溶血素与 Hlb 相互作用,产生一个围绕菌条纹的狭窄清晰溶血区。NCTC8325-4Δ*hlb* 株呈现透明的 α-溶血环,与 δ-溶血环融合,是 Hlb 对 α-溶血抑制作用消失出现的。因此,证实敲除株确实不能产生 β-溶血素。

构建 hCMEC/D3 血脑屏障细胞模型,验证 Hlb 在金葡菌感染中枢神经系统中的作用,比较发现 NCTC8325-4 野生株所致血脑屏障通透性增加程度显著高于 NCTC8325-4Δ*hlb* 株及 PBS 对照组。再构建金葡菌感染小鼠血源性脑膜炎/脑微脓肿模型,观察到小鼠脑组织 NCTC8325-4Δ*hlb* 株脑组织菌载量较野生株明显减少,进一步证明 *hlb* 基因敲除后金葡菌穿透 BBB 进入小鼠的能力减弱。β-溶血素为成孔毒素,可在细胞膜上打孔,直接裂解宿主细胞;具有 nSMase 活性,分解细胞膜的鞘磷脂,导致宿主细胞损伤[28]。鞘磷脂是细胞膜磷脂双分子层的重要结构和信号成分。鞘磷脂生物合成的破坏与炎症、感染、神经退行性疾病、糖尿病和癌症等人类疾病有关。许多病原微生物利用和操纵鞘磷脂途径入侵宿主细胞,并存活和增殖[29-30]。我们推测金葡菌 Hlb 破坏血脑屏障,促进细菌感染中枢神经系统的作用可能是通过上述机制发挥的,该假设有待进一步研究验证。

综上所述,金葡菌 β-毒素编码基因 *hlb* 常被噬菌体插入失活,导致致病作用被低估。噬菌体发挥"分子开关"作用,切离后 *hlb* 基因被激活而发挥致病作用。本研究通过生物信息学比对,筛选到无 φSa3 噬菌体插入的金葡菌菌株,构建 *hlb* 基因敲除株,发现敲除株引起 BBB 细胞模型透性增加的能力和导致小鼠脑膜炎/脑微脓肿的能力均较野生株显著下降。首次证

明β-毒素在金葡菌感染CNS中发挥重要作用,其功能的发挥有助于金葡菌破坏并通过血脑屏障。

参考文献:

[1] RYU S, SONG P I, SEO C H, *et al*. Colonization and infection of the skin by S. aureus: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5): 8753-8772. DOI: 10.3390/ijms15058753.

[2] SAKR A, BRÉGEON F, ROLAIN J M, *et al*. *Staphylococcus aureus* nasal decolonization strategies: a review[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2019, 17(5): 327-340. DOI: 10.1080/14787210.2019.1604220.

[3] ZHANG F, LEDUE O, JUN M, *et al*. Protection against *Staphylococcus aureus* colonization and infection by B- and T-cell-mediated mechanisms[J]. mBio, 2018, 9(5): e01949-e01918. DOI: 10.1128/mBio.01949-18.

[4] BROUWER M C, COUTINHO J M, VAN DE BEEK D. Clinical characteristics and outcome of brain abscess: systematic review and meta-analysis[J]. Neurology, 2014, 82(9): 806-813. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000172.

[5] CHEUNG G Y C, BAE J S, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*[J]. Virulence, 2021, 12(1): 547-569. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.

[6] ZHENG Y, SHANG W L, PENG H G, *et al*. Virulence determinants are required for brain abscess formation through *Staphylococcus aureus* infection and are potential targets of antivirulence factor therapy[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 682. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00682.

[7] HUSEBY M, SHI K, BROWN C K, *et al*. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 2007, 189(23): 8719-8726. DOI: 10.1128/JB.00741-07.

[8] TRAN P M, FEISS M, KINNEY K J, *et al*. ϕSa3mw prophage as a molecular regulatory switch of *Staphylococcus aureus* β-toxin production[J]. J Bacteriol, 2019, 201(14): e00766-e00718. DOI: 10.1128/JB.00766-18.

[9] ROHMER C, DOBRITZ R, TUNCBILEK-DERE D, *et al*. Influence of *Staphylococcus aureus* strain background on Sa3int phage life cycle switches[J]. Viruses, 2022, 14(11): 2471. DOI: 10.3390/v14112471.

[10] SALGADO-PABÓN W, HERRERA A, VU B G, *et al*. *Staphylococcus aureus* β-toxin production is common in strains with the β-toxin gene inactivated by bacteriophage[J]. J Infect Dis, 2014, 210(5): 784-792. DOI: 10.1093/infdis/jiu146.

[11] MCLOUGHLIN A, ROCHFORT K D, MCDONNELL C J, *et al*. *Staphylococcus aureus*-mediated blood-brain barrier injury: an *in vitro* human brain microvascular endothelial cell model[J]. Cell Microbiol, 2017, 19(3): 1-11. DOI: 10.1111/cmi.12664.

[12] 袁吉振, 杨杰, 袁文常, 等. 金黄色葡萄球菌agr基因敲除及其对膜泡毒力影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(4): 331-335. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.04.003.
YUAN J Z, YANG J, YUAN W C, *et al*. Gene knockout of *Staphylococcus aureus* agr and its effect on virulence of bacterial membrane vesicles[J]. J Third Mil Med Univ, 2014, 36(4): 331-335. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.04.003.

[13] ADHIKARI R P, ARVIDSON S, NOVICK R P. A nonsense mutation in AgrA accounts for the defect in agr expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 traP: Kan[J]. Infect Immun, 2007, 75(9): 4534-4540. DOI: 10.1128/IAI.00679-07.

[14] SHEEN T R, EBRAHIMI C M, HIEMSTRA I H, *et al*. Penetration of the blood-brain barrier by *Staphylococcus aureus*: contribution of membrane-anchored lipoteichoic acid[J]. J Mol Med, 2010, 88(6): 633-639. DOI: 10.1007/s00109-010-0630-5.

[15] ROHMER C, WOLZ C. The role of *hlb*-converting bacteriophages in *Staphylococcus aureus* host adaption[J]. Microb Physiol, 2021, 31(2): 109-122. DOI: 10.1159/000516645.

[16] BERSCHEID A, SASS P, WEBER-LASSALLE K, *et al*. Revisiting the genomes of the *Staphylococcus aureus* strains NCTC 8325 and RN4220[J]. Int J Med Microbiol, 2012, 302(2): 84-87. DOI: 10.1016/j.ijmm.2012.01.002.

[17] BALASUBRAMANIAN D, HARPER L, SHOPSIN B, *et al*. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments[J]. Pathog Dis, 2017, 75(1): ftx005. DOI: 10.1093/femspd/ftx005.

[18] BAE T, BABA T, HIRAMATSU K, *et al*. Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence[J]. Mol Microbiol, 2006, 62(4): 1035-1047. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05441.x.

[19] GOERKE C, WIRTZ C, FLÜCKIGER U, *et al*. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection[J]. Mol Microbiol, 2006, 61(6): 1673-1685. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05354.x.

[20] BALDWIN A C, KIELIAN T. Persistent immune activation associated with a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced experimental brain abscess[J]. J Neuroimmunol, 2004, 151(1/2): 24-32. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.02.002.

[21] THOMER L, SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections

[J]. Annu Rev Pathol, 2016, 11: 343-364. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012615-044351.

[22] HERRERA A, VU B G, STACH C S, *et al*. *Staphylococcus aureus* β-toxin mutants are defective in biofilm ligase and sphingomyelinase activity, and causation of infective endocarditis and sepsis[J]. Biochemistry, 2016, 55(17): 2510-2517. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00083.

[23] HAYASHIDA A, BARTLETT A H, FOSTER T J, *et al*. *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1[J]. Am J Pathol, 2009, 174(2): 509-518. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080394.

[24] ULETT G C, BOHNSACK J F, ARMSTRONG J, *et al*. Beta-hemolysin-independent induction of apoptosis of macrophages infected with serotype III group B streptococcus [J]. J Infect Dis, 2003, 188(7): 1049-1053. DOI: 10.1086/378202.

[25] CIFRIAN E, GUIDRY A J, BRAMLEY A J, *et al*. Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells[J]. Vet Microbiol, 1996, 48(3/4): 187-198. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00159-x.

[26] KIM C S, JEON S Y, MIN Y G, *et al*. Effects of beta-toxin of *Staphylococcus aureus* on ciliary activity of nasal epithelial cells[J]. Laryngoscope, 2000, 110(12): 2085-2088. DOI: 10.1097/00005537-200012000-00021.

[27] WALEV I, WELLER U, STRAUCH S, *et al*. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Immun, 1996, 64(8): 2974-2979. DOI: 10.1128/iai.64.8.2974-2979.1996.

[28] PENG H M, LI C, KADOW S, *et al*. Acid sphingomyelinase inhibition protects mice from lung edema and lethal *Staphylococcus aureus* sepsis[J]. J Mol Med, 2015, 93(6): 675-689. DOI: 10.1007/s00109-014-1246-y.

[29] MONTURIOL-GROSS L, VILLALTA-ROMERO F, FLORES-DÍAZ M, *et al*. Bacterial phospholipases C with dual activity: phosphatidylcholinesterase and sphingomyelinase[J]. FEBS Open Bio, 2021, 11(12): 3262-3275. DOI: 10.1002/2211-5463.13320.

[30] MCQUISTON T J, HALLER C, DEL POETA M. Sphingolipids as targets for microbial infections[J]. Mini Rev Med Chem, 2006, 6(6): 671-680. DOI: 10.2174/138955706777435634.

(收稿:2023-08-12;修回:2024-01-15)

(编辑 邓强庭)