文章编号:1000-5404(2014)22-2259-04

论著

肺炎克雷伯菌转录调控子CRP对菌株粘附能力及细胞活性的影响

谭 斌,白群华,罗 美,杨世亚,薛 健,周锡鹏,李迎丽,邱景富 (400016 重庆,重庆医科大学公共卫生与管理学院)

[摘要] **目的** 分析肺炎克雷伯菌临床分离株WT(wild type)、回补株(c-Δcrp)和突变株(Δcrp)对人肺癌上皮细胞A549细胞的粘附能力及细胞活性的影响。**方法** 肺炎克雷伯菌WT株、c-Δcrp株和Δcrp株感染人肺癌上皮细胞A549,经裂解液裂解后平板计数计算粘附的菌量。LDH释放法检测细菌对细胞的毒性,优化感染时间和感染指数。**结果** WT株及c-Δcrp株粘附的菌量分别为$\log^{CFU}=5.145$和$\log^{CFU}=4.915$,均高于Δcrp株($\log^{CFU}=4.122$),差异有统计学意义($F=8.366$,$P=0.004$)。以MOI=1 000(细菌∶细胞=1 000)的菌量感染靶细胞,37 ℃孵育8 h,加底物液避光显色10 min,离心所得上清稀释10倍进行测定为最佳反应条件。WT株对细胞的毒性百分比(70.69%)明显高于Δcrp株(19.54%),差异有统计学意义($t=8.843$,$P=0.001$)。**结论** crp基因敲除后,突变株的细胞毒性和粘附力明显下降,肺炎克雷伯菌转录调控子CRP对菌株粘附力及细胞活性具有正向调控作用。

[关键词] 肺炎克雷伯菌;cAMP受体蛋白;A549;粘附力;细胞活性
[中图法分类号] R378.996;R394.3;R446.5 [文献标志码] A

Influence of *Klebsiella pneumoniae* CRP protein on bacterial adhesion and virulence *in vitro*

Tan Bin, Bai Qunhua, Luo Mei, Yang Shiya, Xue Jian, Zhou Xipeng, Li Yingli, Qiu Jingfu (School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To analyze the adhesion and cell virulence of *Klebsiella pneumonia* wild type (WT) strain, complemented strain c-Δcrp(cAMP receptor protein) and mutant strain Δcrp, in order to investigate crp gene on the adhesion and cell toxicity of *Klebsiella pneumonia*. Methods After infection of A549 cells by *Klebsiella pneumonia* WT strain, c-Δcrp strain and Δcrp strain, the cells were lysed and the bacteria were quantified by plating appropriate dilutions on Luria-Bertani agar plates. LDH release was detected to estimate cell activity. Infection time and MOI were optimized. Results The adhesion ability of *Klebsiella pneumonia* WT ($\log^{CFU}=5.145$) and c-Δcrp strain ($\log^{CFU}=4.915$) was higher than that of Δcrp strain ($\log^{CFU}=4.122$) ($P=0.004$). The optimal conditions to determinate the LDH release included infected cells incubation for 8 h at 37 ℃, the developing time for 10 min in dark, and 1∶10 dilution of the supernatant for test. The virulence of WT strain (70.69%) was significantly higher than that of Δcrp strain (19.54%) ($P=0.001$). Conclusion Knocking-out of crp gene causes obvious decrease of cellular toxicity and adhesion, comparing with the WT strain and c-Δcrp strain. *Klebsiella pneumonia* CRP protein positively regulates bacterial virulence and adhesion.

[**Key words**] *Klebsiella pneumonia*; cAMP receptor protein; A549 cells; adhesion; cytotoxicity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31071093, 31170129, 31200064) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5354, CSTC2010BB5103). Corresponding author: Li Yingli, E-mail: 1150563687@qq.com

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是引起医院内感染和社区获得性感染最主要的革兰阴性机会致病菌,其引起的感染以肺炎、泌尿道感染和细菌性肝脓肿较为常见[1]。近年来,肺炎克雷伯菌引起的肝脓肿病例报道在西方国家也呈现上升的趋势[2-3]。

根据其荚膜抗原(K抗原)分型,肺炎克雷伯菌共有77个血清型,其中K1和K2血清型毒力最强,近年来流行趋势日益严重,已引起国内外学者共同关注[4]。肺炎克雷伯菌具有较强的毒力和致病性,其主

[基金项目] 国家自然科学基金(31071093,31170129,31200064);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5354,CSTC2010BB5103)
[通信作者] 李迎丽, E-mail: 1150563687@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140930.1157.011.html(2014-09-30)

要的致病因素包括荚膜多糖、脂多糖、粘附素和铁摄入系统等[5-6]，而这些毒力因子是由众多毒力基因编码的。

cAMP受体蛋白(cAMP receptor protein，CRP)是细菌中普遍存在的整体调控子，其与伴侣分子cAMP结合引起构象改变而具有转录调节活性。大肠杆菌中CRP能够控制和表达约200个操作子[7]；鼠疫菌CRP至少能直接调控36个基因的转录表达，特别是能直接激活pla的表达，使其与腺鼠疫和原发性肺鼠疫的发病密切相关[8]。在肺炎克雷伯菌中，CRP也能够直接调控荚膜多糖的合成和柠檬酸发酵基因的表达和多种毒力基因的表达[9-10]。

在感染过程中，细菌通过各种粘附因子与宿主细胞膜表面的特异性受体结合，进而对宿主细胞产生毒性作用。参与粘附的因子主要有细菌外膜蛋白、鞭毛和菌毛等。在肺炎克雷伯菌中，菌毛包括Ⅰ型和Ⅲ型，两种菌毛在肺炎克雷伯菌致病中发挥着重要作用。有研究发现，转录调控子CRP有可能对大肠杆菌和沙雷氏菌菌毛有着一定的调控作用，从而控制着细菌的粘附能力和致病力[11-12]。

因此，本研究选择肺炎克雷伯菌临床分离株(WT，K1型)、回补株(c-Δcrp)和突变株(Δcrp)观察转录调控子CRP对菌株粘附能力及细胞活性的影响，探讨CRP对肺炎克雷伯菌的毒力是否存在调控作用，以期为肺炎克雷伯菌CRP基因对毒力相关基因的调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与菌株 人肺癌上皮细胞A549(ATCC CCL185)由本实验室保存，肺炎克雷伯菌野生株NTUH-K2044(wild type，WT)由台湾大学Jin-Town Wang教授馈赠，回补株(c-Δcrp)和突变株(△crp)由本实验室构建保存[13]。

1.1.2 主要仪器和试剂 低温离心机(Sigma)，紫外分光光度计(SHIMADZU)，酶标仪(BioTeK)，倒置显微镜成像系统(Olympus)。CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay试剂盒(Promega公司)，DMEM(高糖，Hyclone公司)，胎牛血清(ExCell公司)，胰蛋白胨和酵母菌(OXOID公司)，卡那霉素(50 mg/mL)、庆大霉素(100 μg/mL)(Amresco公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养及计数 从平板上转接野生株WT、回补株c-Δcrp和突变株△crp于5 mL的LB培养基中，37 ℃ 180 r/min培养10 h，将菌液稀释测得600 nm处光密度值[$D(600)$]为1.0。然后按1‰的菌量接种到15 mL的LB肉汤中，相同条件下继续培养至菌液光密度$D(600)$值=1.2~1.6。取其中的5 mL菌液，12 000 r/min 20 min离心收集菌体，5 mL PBS溶液洗菌3次，重悬在5 mL预热的DMEM培养基中。分光光度计测定菌体浓度，用DMEM调整3个菌株$D(600)$值为1.0。通过倍比稀释，取10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}稀释度的菌液0.1 mL重复均匀涂布LB平板，每个稀释度重复5份，37 ℃下培养10 h左右进行菌落计数。

1.2.2 细菌粘附及侵袭 取2.5×10^5个靶细胞至24孔细胞培养板中，待细胞充分贴壁后用PBS洗3次，饥饿21 h后加入10^8个细菌/孔，250×g离心5 min，感染5 h后，PBS洗4次，加500 μL 0.5% Triton X-100室温裂解5 min，倍比稀释用LB涂板计活细菌数。感染细胞用PBS洗后，加含有庆大霉素(100 μg/mL)的新鲜DMEM继续培养2 h以杀死细胞外的细菌，PBS洗3次，同样的方法裂解，LB平板上计数，粘附及侵袭的菌量用$\log^{CFU}$表示。

1.2.3 最佳显色时间的确定 根据CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay试剂盒说明书操作步骤，取1 μL试剂盒中的LDH阳性对照(牛心乳酸脱氢酶)稀释至5 mL PBS+1% BSA溶液中，取50 μL稀释液至96孔酶标板中，每孔加入50 μL底物工作液，混匀后避光反应5、10、15、25、30 min，再加50 μL终止液终止反应，测定490 nm处光密度值[$D(490)$]。

1.2.4 最佳感染时间的确定 取100 μL 2×10^5个/mL靶细胞悬液加入96孔酶标板中使其细胞融合度达90%左右，37 ℃，5% CO_2条件下培养6 h。用PBS洗3次，为了使细胞同步化分裂，避免细胞所处的状态不同造成实验的误差，加入预热的无血清DMEM饥饿17 h。为了使感染同步，加入2×10^7个细菌/孔，96孔酶标板250×g离心5 min，在细胞培养箱里继续孵育4、8、11 h后，12 000 r/min常温离心10 min，取5 μL上清液至新的96孔酶标板里，再加入45 μL预热的无酚红DMEM和50 μL底物缓冲液避光显色10 min，最后加入50 μL终止液测定$D(490)$值。

1.2.5 最佳感染指数(multiplicity of infection，MOI)的确定 MOI指感染时细菌和细胞的比值，取2×10^4的靶细胞悬液加入96孔酶标板中，分别加入相应的细菌，使得MOI分别为250、500、1 000和2 000，同时感染8 h。用1.2.4中方法测定$D(490)$值。

1.2.6 细胞病变形态学观察 根据以上优化后的条件，选取最适的感染指数，感染一定时间后，用PBS洗3次，对照组分别加入预热的DMEM和10×裂解液，实验组加入预热的DMEM。倒置显微镜下观察细胞形态学改变。

1.2.7 数据处理 将所得的各光密度值根据以下公式计算细菌对细胞毒性百分比。

$$\text{细胞毒性百分比}=\frac{(\text{实验组}-\text{菌液平均自发释放量})-(\text{靶细胞平均自发释放量}-\text{培养基背景对照平均值})}{(\text{靶细胞平均最大释放量}-\text{体积校正对照平均值})-(\text{靶细胞自发释放量}-\text{培养基背景对照平均值})}\times100\%$$

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件,细菌对细胞的毒性百分比用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较进行 t 检验,各组间细菌对细胞的粘附量的差异比较采用方差分析。

2 结果

2.1 菌液浓度的计算

通过对 LB 平板上的菌落进行计数可知,当菌液吸光度 $D(600)$ 值 =1.0 在 10^{-6} 稀释度时,WT、c-Δcrp 和△crp 的菌落数分别为(105 ±3)、(111 ±8)、(98 ±5)个。

2.2 细菌粘附及侵袭

野生株 WT 对细胞粘附的量为 $\log^{CFU}$ =5.145,回补株 c-Δcrp对细胞粘附的量为 $\log^{CFU}$ =4.915,均多于突变株△crp ($\log^{CFU}$ =4.122),且有统计学差异(F =8.366,P =0.004)。但侵袭实验 LB 涂板计数显示野生株、回补株和突变株都没有侵袭到细胞内。

2.3 野生株和突变株感染细胞的 LDH 测定

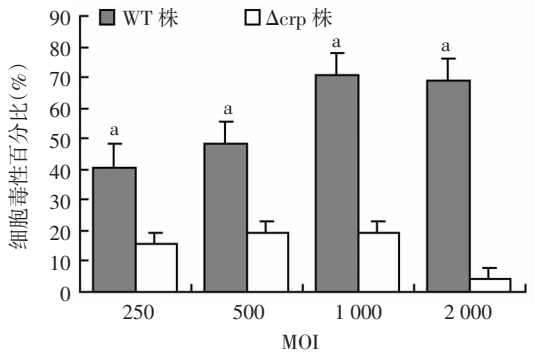
2.3.1 最佳显色时间的确定 将稀释后的 LDH 阳性对照避光显色 5、10、15、25、30 min,当显色时间为 10 min 时,测得 LDH 阳性对照的 $D(490)$ 值在 1.0 左右(表 1),因此最佳显色时间为 10 min。

表 1 不同显色时间的 $D(490)$ 值 ($\bar{x} \pm s$)

显色时间 (min)	$D(490)$ 值
5	0.553 ±0.007
10	0.963 ±0.010
15	1.297 ±0.066
25	1.831 ±0.025
30	2.120 ±0.014

2.3.2 最佳感染时间的确定 当感染 5 h 时,WT 株对细胞的毒性百分比(3.81%)和△crp 株(3.39%)相差不大,差异无统计学意义(t =1.711,P =0.162)。随着感染时间的增加,感染8 h WT 株对细胞的毒性百分比(39.97%)明显高于△crp 株(9.20%),差异有统计学意义(t =14.326,P <0.01)。当感染 11 h 时,△crp 株实验组低于靶细胞吸光值,无法代入公式计算,故确定最佳感染时间为 8 h。

2.3.3 最佳 MOI 的确定 随着 MOI 的增加(250 ~1 000),细菌对 A549 细胞的毒性也随之增加,WT 株对细胞的毒性百分比从 40.57% 增加到 70.69%,△crp 株从 15.49% 增加到 19.54%,二者间差异有统计学意义(P <0.05, 图 1)。当 MOI = 2 000 时,培养基中的 LDH 含量却呈下降趋势。因此,最佳的 MOI 为 1 000 时,野生株和突变株之间的细胞毒性百分比差异最理想。



a: P <0.05,与△crp 株比较

图 1 不同感染指数的细胞毒性百分比

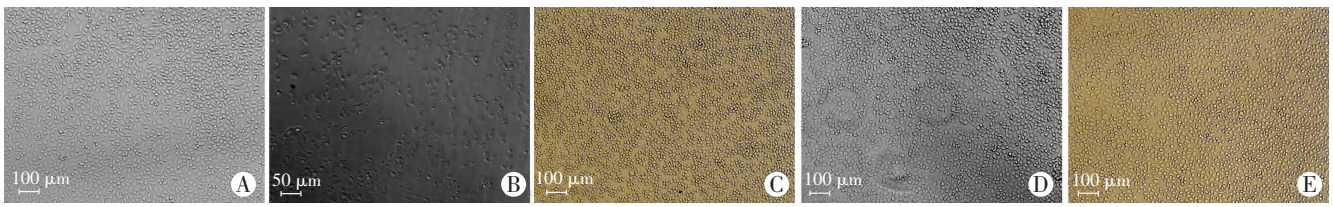
2.4 细胞毒性形态学观察

肺腺癌上皮细胞 A549 正常为贴壁生长细胞,形态为三角形或长梭形,经裂解液处理后,细胞明显变小,皱缩,呈圆形。感染 WT 株和 c-△crp 8 h 后,绝大多数细胞呈圆形,细胞间距增大,而感染△crp 株后,细胞形态较正常靶细胞基本没发生改变(图 2),说明 crp 基因敲除后,肺炎克雷伯菌对细胞的毒力明显下降。

3 讨论

肺炎克雷伯菌广泛存在于自然界中,常在免疫力低下的个体中导致尿路感染和肺部感染,并且其可通过血液引起严重的败血症。荚膜多糖、脂多糖、粘附素、菌毛和铁摄入系统等都为肺炎克雷伯菌的致病因素,而转录调控子 CRP 对这些毒力因素的基因调控机制目前尚不是很明确。

细菌要在呼吸道或泌尿道增殖,首先细菌和宿主细胞必须接触,由此克服宿主呼吸道上皮细胞纤毛运动的机械清除,或者尿流的冲刷。因此,粘附是细菌感染的第一步。介导粘附作用的因素主要是菌毛,菌毛的种类不同,以及粘附的宿主部位的不同,都会使感染的症状及相应疾病的严重程度有所不同[14-15]。有研究显示,转录调控子 CRP 对大肠杆菌和沙雷氏菌菌毛有一定的调控作用。本实验发现△crp 株对细胞的粘附能力低于 WT 株和 c-Δcrp 株,表明调控子 CRP 对肺炎克雷伯菌菌毛也起正向调控作用。肺炎克雷伯菌粘附细胞后继而进入到上皮细胞,在某些细胞内可以短时间生长,比如在膀胱上皮细胞 T24。但本实验表明野生株、回补株和突变株都未侵入 A549 细胞内,这有可能与细胞会逐渐清除(杀灭)细菌有关[16-17]。



A:正常靶细胞;B:加入裂解液后的靶细胞;C:感染 WT 株的靶细胞;D:感染 Δcrp 株的靶细胞;E:感染 c-Δcrp 株的靶细胞

图 2 倒置显微镜下观察肺腺癌 A549 细胞的形态变化 (MOI =1 000,感染 8 h)

肺炎克雷伯菌的细胞毒性试验是通过体外细胞培养技术,检测细胞受感染后发生的生长抑制、溶解死亡等毒性反应来间接反映细菌的毒力情况,也为动物实验的进行与否提供先决条件。本研究中定性实验表明突变株毒力明显低于野生株和回补株,感染 A549 细胞后细胞形态几乎没改变,而受野生株和回补株感染的细胞绝大多数变圆;定量实验采用测定 LDH 释放法,通过摸索不同的感染时间和感染指数组合,得出了最佳的感染条件,并在优化的条件下测得细胞 LDH 释放量,显示突变株感染的细胞释放出的 LDH 量明显小于野生株,从而进一步证明了转录调控子 CRP 在肺炎克雷伯菌的毒力调控中起着重要的调控作用。

粘附实验和细胞形态学变化显示回补株对细胞的粘附能力和毒力与野生株相似,回补株的毒力可以部分回补恢复到野生株的水平,表明突变株△crp 的表型和 crp 基因的缺失是一一对应的关系,排除了极性效应的可能。但细胞活性定量试验显示回补株的毒力与突变株接近,未能部分回复到野生株的状态。推测可能是回补株中蛋白表达水平低或蛋白活性不够高,细胞活性的测定方法未能测到回补株和突变株之间具有统计意义的差异。在下一步的工作中,考虑用更换表达载体或优化表达条件等方法,解决回补株中蛋白表达水平低的问题。

另外,在实际操作中,培养液中的 LDH 含量本身有一个半衰期,当感染时间达到 11 h 时,实验组的 LDH 含量反而小于靶细胞自发释放量。同理,当感染指数达到 2 000 时,LDH 含量也呈现下降的趋势,这有可能与细菌产生了能降解 LDH 酶活性的产物有关。提示我们在用 LDH 释放量的方法测定细胞活性时,摸索合适的感染时间和感染指数很重要,会直接影响最后的测定结果。

本研究完成了肺炎克雷伯菌细胞毒力模型的建立,并在细胞水平上证明了调控子 CRP 对肺炎克雷伯菌毒力和粘附力有着正向调控的作用,为以后肺炎克雷伯菌 crp 基因的分子水平研究奠定了基础,也为体内试验提供了依据。

参考文献:

[1] Ko W C, Paterson D L, Sagnimeni A J, *et al*. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(2): 160 - 166.

[2] Han S H. Review of hepatic abscess from *Klebsiella pneumoniae*. An association with diabetes mellitus and septic endophthalmitis [J]. West J Med, 1995, 162(3): 220 - 224.

[3] Lederman E R, Crum N F. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(2): 322 - 331.

[4] Fung C P, Hu B S, Chang F Y, *et al*. A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy [J]. J Infect Dis, 2000, 181(6): 2075 - 2079.

[5] Lawlor M S, O'Connor C, Miller V L. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection [J]. Infect Immun, 2007, 75(3): 1463 - 1472.

[6] Ma L C, Fang C T, Lee C Z, *et al*. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection [J]. J Infect Dis, 2005, 192(1): 117 - 128.

[7] Gosset G, Zhang Z, Nayyar S, *et al*. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 2004, 186(11): 3516 - 3524.

[8] Zhan L, Han Y, Yang L, *et al*. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is required for both virulence and expression of the minimal CRP regulon in Yersinia pestis biovar microtus[J]. Infect Immun, 2008, 76(11): 5028 - 5037.

[9] Lin C T, Chen Y C, Jinn T R, *et al*. Role of the cAMP-dependent carbon catabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in Klebsiella pneumoniae [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e54430.

[10] Meyer M, Dimroth P, Bott M. Catabolite repression of the citrate fermentation genes in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein[J]. J Bacteriol, 2001, 183(18): 5248 - 5256.

[11] Kalivoda E J, Stella N A, O'Dee D M, *et al*. The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of Serratia marcescens mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae [J]. Appl Environ Microbio, 2008, 74(11): 3461 - 3470.

[12] Muller C M, Aberg A, Straseviciene J, *et al*. Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(2): e1000303.

[13] 高钰双, 冯甜, 邱景富, 等. 肺炎克雷伯菌基因无痕敲除方法的建立[J]. 军事医学, 2013, 37(6): 431 - 433.

[14] Duncan M J, Mann E L, Cohen M S, *et al*. The distinct binding Specificities exhibited by enteorbacterial type1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts [J]. J Biol Chem, 2005, 280(45): 37707 - 37716.

[15] Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(4): 589 - 603.

[16] Scharger H M, Rheinwald J G, Wessels M R. Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes invasive skin infection [J]. J Clin Invest, 1996, 98(9): 1954 - 1958.

[17] Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger T A, *et al*. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella Pneumoniae* [J]. Inefet Immun, 2000, 68(12): 6744 - 6749.

(**收稿**:2014-06-11;**修回**:2014-09-15)

(编辑 邓强庭)