

· 感染与免疫 ·

多聚 β -1-6-N-乙酰氨基葡萄糖胺对鲍氏不动杆菌生物膜形成及耐药的影响

郭海娜 向军

Influence of poly- β -1-6-N-acetylglucosamine on biofilm formation and drug resistance of *Acinetobacter baumannii*

Guo Haina, Xiang Jun. Department of Burns and Plastic Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Corresponding author: Xiang Jun, Email: 13801789791@163.com

【Abstract】 *Acinetobacter baumannii* has emerged as one of the leading bacteria for nosocomial infections, especially in burn wards and ICUs. The bacteria can easily form biofilm and readily attach to abiotic and biotic surfaces, resulting in persistent biofilm-mediated infections. Being surrounded by self-produced extracellular polymeric substance (EPS), the microorganisms in biofilm can acquire protective property against detrimental environment and their tolerance toward antibiotics is increased. Poly- β -1-6-N-acetylglucosamine (PNAG), the common constituent of EPS in *Acinetobacter baumannii*, acts as the key virulence factor and plays a crucial role in biofilm formation process. This review describes the properties and functions of the PNAG and its influence on biofilm formation and drug resistance of *Acinetobacter baumannii*.

【Key words】 Infection; *Acinetobacter baumannii*; Biofilms; Drug resistance; Poly- β -1-6-N-acetylglucosamine

【关键词】 感染; 鲍氏不动杆菌; 生物膜; 抗药性; 多聚 β -1-6-N-乙酰氨基葡萄糖胺

鲍氏不动杆菌是综合性医院内引起院内感染的重要致病菌之一^[1],其诱发的严重感染常发生在烧伤病房和 ICU,临床分离菌株多表现为多药耐药、泛耐药^[2]。鲍氏不动杆菌易在侵入性医疗器材表面及导尿管腔内形成生物膜,造成迁延不愈的感染^[3-4]。细胞外聚合物(EPS)是生物膜的主要成分,形成生物膜的骨架。多聚 β -1-6-N-乙酰氨基葡萄糖胺(PNAG)是鲍氏不动杆菌中 EPS 的重要成分之一。本文就鲍氏不动杆菌 PNAG 的结构特点,及其对该菌生物膜形成和耐药的影响作一阐述。

1 细菌生物膜及其 EPS

生物膜是细菌通过黏附于接触物表面并分泌 EPS,将细菌自身包裹其中而形成的膜样结构,其形成是细菌的一种保护性生长模式^[5]。在生物膜的构成中,细菌所占比例不足 10%,而 EPS 的比例高达 90%。EPS 主要由多糖、蛋白质、

核苷酸及脂质组成,其组成部分及含量因细菌种类不同而差异大。

EPS 构成生物膜的三维结构,维持生物膜的稳定,参与菌株间及细菌与物体表面之间的黏附、菌株间的信号传导、逃逸宿主免疫攻击和阻止抗生素渗透,是细菌耐药的原因之一和主要的毒力因子。同时, EPS 作为循环回收中心及营养供应源,维持细菌的代谢^[6]。

细胞外多糖是 EPS 的主要组成部分,在电镜下可见其黏附于细胞表面,形成复杂的网状结构。大多数细胞外多糖属于杂多糖,由中性和带电荷的糖残基混合而成,其所含的取代基影响着自身物理及生物学特性。细胞外多糖具有菌属多样性^[7],有报道称 PNAG 存在于多种病原菌中^[8],是常见的细胞外多糖之一。PNAG 最初在表皮葡萄球菌中被检测到,后来又在金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鲍氏不动杆菌、放线菌等中被检测到。

2 鲍氏不动杆菌 PNAG 特性及其在生物膜形成中的作用

PNAG 属于多聚阳离子多糖,含有乙酰化糖基及去乙酰化糖基,以乙酰化糖基为主。PNAG 中 β -1-6 糖苷键可被 PNAG 特异性裂解酶 DispersinB 特异性水解^[7]。PNAG 可能是细菌生物膜最重要且结构高度保守的组成部分之一。PNAG 可以作为细菌的表面抗原,它的天然抗体主要结合 PNAG 中高度乙酰化的糖基,但天然抗体不具有抗感染作用^[9]。由 PNAG 中去乙酰化糖基作为抗原产生的特异性抗体可以同时结合 PNAG 中的乙酰化糖基及去乙酰化糖基,介导补体依赖的免疫调节与杀伤作用,抵御病原菌的感染。鲍氏不动杆菌的 PNAG 去乙酰化程度明显高于其他病原菌。

细菌生物膜的形成是一个动态的过程。细菌聚集、黏附是生物膜形成的初始阶段^[10],受到多种因素的调节。细菌在非生物体和生物体表面的黏附机制有很大差异^[11]。目前关于 PNAG 在生物膜形成初始阶段中的作用尚存争议,大多认为 PNAG 的分泌有利于细菌的聚集、黏附。有学者通过荧光染色联合激光扫描共聚焦显微镜观察到,PNAG 缺陷菌株尽管可以黏附于物体表面并形成微菌落,但是无法合成成熟的生物膜^[6]。Choi 等^[12]研究表明,能够合成 PNAG 的鲍氏不动杆菌菌株在体外培养 16 h 后可以形成多层具有三维结构的生物膜,而 PNAG 缺陷菌株只能形成少量的单层细胞;48 h 后 PNAG 缺陷菌株可以形成大量平坦的单层细胞,而所形成的菌膜不具有生物膜的三维结构特点。临床上置入患者体内的深静脉导管管腔内存在血流湍流产生的切变力,鲍氏不动杆菌只有形成成熟的生物膜才能与管壁稳定黏附。笔者单位采用摇菌培养方法模拟体内环境,研究显示在不断摇晃且具有液体切变力的情况下,与鲍氏不动杆菌标准菌株 ATCC 19606 相比,来源于烧伤科的鲍氏不动杆菌临床分离



DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2015.01.011

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形科

通信作者:向军,Email:13801789791@163.com

株 PNAG 合成能力更强且更易与试管壁紧密黏附^[13]。此现象说明, PNAG 有利于维持细菌与物体表面黏附以及形成成熟的生物膜结构。

3 鲍氏不动杆菌 PNAG 形成对细菌耐药的影响

细菌生物膜具有黏滞性,其 EPS 本身可以作为防御屏障阻止抗生素渗透,细菌形成生物膜后对抗生素的抗性提高 10~1 000 倍^[14]。作为生物膜的骨架结构,PNAG 在阻碍外界物质包括抗生素的渗透中起着重要作用。有研究表明,PNAG 可以抑制液体的对流和溶质转运,阻遏氯化十六烷吡啶渗透生物膜,而加入 DispersinB 后上述情况得到明显改善^[15]。目前国内外尚无关于 PNAG 对鲍氏不动杆菌耐药影响的直接报道,通常将 PNAG 对细菌耐药的影响纳入生物膜导致细菌耐药的范畴。笔者单位研究显示,烧伤临床来源的鲍氏不动杆菌耐药株合成 PNAG 的能力明显高于敏感株^[16]。Henry 等^[17]曾报道,脂质 A 缺陷型抗多黏菌素鲍氏不动杆菌高度表达与合成、转运表面多糖 PNAG 密切相关的基因,从而使 PNAG 的合成增加。此外,PNAG 还起着稳定细胞外膜的作用,PNAG 与阳离子肽之间的静电斥力增加了生物膜对多黏菌素 B 的耐受能力。

4 与鲍氏不动杆菌 PNAG 合成及调控相关的基因

4.1 *pga* 基因簇

通过将大肠杆菌 *pgaABC* 及其他革兰阴性菌中的同源基因位点,与美国国家生物技术信息中心数据库中的鲍氏不动杆菌基因组数序列进行 BLASTP 序列比对,明确了鲍氏不动杆菌中与编码合成 PNAG 相关的基因位点,并命名为 *pgaA*、*pgaB*、*pgaC*。

pgaA 编码外膜蛋白,*pgaB* 编码的蛋白含有多糖脱乙酰基酶结构域,一般认为 *pgaA* 和 *pgaB* 共同参与 PNAG 的外膜转运。*pgaC* 含有多次跨膜域和与糖基转移酶 2 家族有同源性的细胞质域,参与 PNAG 合成和内膜转运^[18]。在大肠杆菌中,由 *pgaB* 所编码的 PNAG 的去乙酰化糖基是多糖的功能结构,参与细菌细胞间黏附,从而促使生物膜形成^[19]。此外,*pgaB* N-末端结构域隶属于糖脂酶 4 家族,具有金属依赖性,结合正二价的钴离子、镍离子、铁离子后均能提高 PNAG 去乙酰化水平,从而利于生物膜生成^[20]。鲍氏不动杆菌与大肠杆菌的基因位点及结构具有一定的同源性,由此推测,鲍氏不动杆菌 *pgaB* 可能也存在类似的金属结合位点,影响生物膜形成。

鲍氏不动杆菌 *pgaABC* 基因簇的表达编码合成 PNAG,*pga* 基因簇位点缺失后无法合成 PNAG,而通过 *pga* 基因位点回补可以恢复;在含有 *pga* 位点菌株的合成产物中加入 DispersinB 后无法检测到 PNAG,则再次证实 *pga* 基因簇的表达可以编码合成 PNAG。Choi 等^[12]通过 PCR 技术检测临床来源的 30 株多药耐药鲍氏不动杆菌显示,这些菌株均含有相同的 *pga* 位点;在体外培养条件下,从 14 株中检测到高水平的 PNAG,只有 2 株无法检测到 PNAG。以上均含有 *pga* 位点的多药耐药鲍氏不动杆菌临床菌株中 PNAG 合成能力的差异,提示 *pga* 表达程度的不同。多核苷酸磷酸化酶可以负向调控大肠杆菌 PNAG 合成中 *pga* 基因簇的表达^[21],但

鲍氏不动杆菌中是否存在类似的 *pga* 基因调节位点,可否通过调控 *pga* 基因簇的表达从而影响 PNAG 的合成,目前尚不清楚。

4.2 密度感应基因 *abaI*

生物膜形成过程中,细菌在聚集、黏附、形成微菌落的同时,通过正反馈自诱导机制,合成并分泌信号分子,感知细菌群体密度及周围环境,调控细菌群体的生物学行为^[22]。多数革兰阴性菌以 N-酰基高丝氨酸内酯(AHL)作为感应信号,进行细菌间的信号交流,调节生物膜的形成。现已证实,鲍氏不动杆菌也是通过分泌 AHL 调节生物膜形成,而 AHL 的分泌受其密度感应基因 *abaI* 调控^[23]。Niu 等^[24]通过生物膜的半定量实验研究观察到,*abaI* 缺陷鲍氏不动杆菌菌株所形成的生物膜明显减少,且不具备典型的生物膜结构,证实 *abaI* 对成熟生物膜的形成不可或缺。窦懿等^[25]研究显示,在鲍氏不动杆菌生物膜形成过程中,*abaI* 表达变化与基因簇 *pgaABC* 变化趋势一致。但鲍氏不动杆菌中的密度感应基因 *abaI* 与生物膜功能基因簇 *pgaABC* 之间是否存在相互作用,尚需进一步探讨。

5 针对 PNAG 的靶向治疗

病原体疫苗多数以菌株特异性表面抗原或毒素作为靶向抗原研制而成^[26],可以减少患者的患病率及病死率,缓解临床因大量使用抗生素导致的细菌耐药情况^[27]。因此,病原体疫苗的研发已成为当前病原菌新型防治手段的探讨热点。PNAG 中的去乙酰化糖基可以作为表面抗原诱导产生特异性抗体,发挥免疫调节与杀伤作用。由于 PNAG 中去乙酰化糖基所占比例因病原菌种类不同差异很大,现常使用人工合成的完全去乙酰化的含有 β -1-6 糖苷键的低聚物代替,多为九聚体形式^[26]。多糖抗原共价结合载体蛋白后,可以提高细菌疫苗多糖抗原的免疫原性。Bentancor 等^[28]研究显示,在体外培养条件下,以多糖抗原九聚氨基葡萄糖胺共价结合载体蛋白破伤风类毒素后产生的抗血清,对产 PNAG 的鲍氏不动杆菌具有明显的杀伤作用;且在分别建立的鲍氏不动杆菌肺炎及菌血症小鼠模型中注入上述抗血清后,可以减少小鼠肺部及血液中的鲍氏不动杆菌数量。

用于制备疫苗的靶向抗原需在病原菌中广泛表达,PNAG 即为多种病原菌所共有,符合这一要求。现已有以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 PNAG 作为靶向抗原的研究,由金黄色葡萄球菌中的 PNAG 作为抗原产生的抗体对大肠杆菌有免疫杀伤作用^[29]。继金黄色葡萄球菌和大肠杆菌之后,鲍氏不动杆菌可能成为又一种可以其 PNAG 作为靶向抗原进行研究的常见致病菌。

6 总结与展望

生物膜是细菌致病及耐药的重要因素之一,PNAG 在细菌形成成熟生物膜的过程中必不可少,但目前有关鲍氏不动杆菌 PNAG 的研究甚少。由于不同菌属的生物膜所含的 EPS 成分不尽相同,目前仍缺乏对 PNAG 的定量分析。生物膜的形成过程受多种信号分子调控,而 PNAG 的调控基因是否受其他信号分子的影响暂不清楚。目前,多药耐药及泛耐药鲍氏不动杆菌呈全球流行趋势,亟须探索如何有效地减少

和控制鲍氏不动杆菌引起的严重感染。通过对鲍氏不动杆菌 PNAG 的深入研究,进一步探讨鲍氏不动杆菌生物膜形成中的分子调控机制及生物膜在鲍氏不动杆菌耐药中的作用,是日后控制生物膜源性感染的关键环节。此外,针对 PNAG 的免疫靶向治疗研究有可能成为未来探索的方向。

参考文献

- [1] Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, et al. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen [J]. *Virulence*, 2012,3(3):243-250.
- [2] McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models[J]. *FEMS Microbiol Rev*,2013,37(2):130-155.
- [3] Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections[J]. *BMC Infect Dis*,2013,13:47.
- [4] Donlan RM. Biofilms and device-associated infections[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001,7(2):277-281.
- [5] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999,284(5418):1318-1322.
- [6] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nat Rev Microbiol*,2010,8(9):623-633.
- [7] Bales PM, Renke EM, May SL, et al. Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens[J]. *PLoS One*,2013,8(6):e67950.
- [8] Gening ML, Tsvetkov YE, Titov DV, et al. Linear and cyclic oligo-beta-(1->6)-D-glucosamines: synthesis, conformations, and applications for design of a vaccine and oligodentate glycoconjugates[J]. *Pure Appl Chem*,2013,85(9):1879-1891.
- [9] Cywes-Bentley C, Skurnik D, Zaidi T, et al. Antibody to a conserved antigenic target is protective against diverse prokaryotic and eukaryotic pathogens[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2013,110(24):E2209-2218.
- [10] Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview[J]. *Microbes Environ*,2011,26(2):101-112.
- [11] Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation[J]. *Future Microbiol*, 2009,4(3):273-278.
- [12] Choi AH, Slamti L, Avci FY, et al. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation[J]. *J Bacteriol*,2009,191(19):5953-5963.
- [13] 向军, 孙珍, 宋菲, 等. 烧伤患者鲍氏不动杆菌 pgaABC 基因簇表达及生物膜表型变化[J]. *中华烧伤杂志*,2011,27(2):100-103.
- [14] Worthington RJ, Richards JJ, Melander C. Small molecule control of bacterial biofilms[J]. *Org Biomol Chem*,2012,10(37):7457-7474.
- [15] Ganeshnarayan K, Shah SM, Libera MR, et al. Poly-N-acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms[J]. *Appl Environ Microbiol*,2009,75(5):1308-1314.
- [16] 向军, 孙珍, 杨新刚, 等. 烧伤临床鲍氏不动杆菌分离株生物膜内 *aba I* 基因表达的变化[J]. *中华烧伤杂志*,2012,28(2):101-105.
- [17] Henry R, Vithanage N, Harrison P, et al. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-beta-1, 6-N-acetylglucosamine [J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2012,56(1):59-69.
- [18] Whitney JC, Howell PL. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria [J]. *Trends Microbiol*, 2013,21(2):63-72.
- [19] Itoh Y, Rice JD, Goller C, et al. Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1, 6-N-acetyl-D-glucosamine [J]. *J Bacteriol*, 2008,190(10):3670-3680.
- [20] Little DJ, Poloczek J, Whitney JC, et al. The structure- and metal-dependent activity of *Escherichia coli* PgaB provides insight into the partial de-N-acetylation of poly-beta-1, 6-N-acetyl-D-glucosamine[J]. *J Biol Chem*,2012,287(37):31126-31137.
- [21] Carzaniga T, Antoniani D, Dehò G, et al. The RNA processing enzyme polynucleotide phosphorylase negatively controls biofilm formation by repressing poly-N-acetylglucosamine (PNAG) production in *Escherichia coli* C [J]. *BMC Microbiol*, 2012,12:270.
- [22] Diggle SP, Crusz SA, Cámara M. Quorum sensing [J]. *Curr Biol*, 2007,17(21):R907-910.
- [23] Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen [J]. *Crit Rev Microbiol*,2010,36(4):349-360.
- [24] Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Bacteriol*,2008,190(9):3386-3392.
- [25] 窦懿, 朱彩莲, 宋菲, 等. 鲍曼不动杆菌 *abaI* 基因表达对生物膜形成的影响 [J]. *中华创伤杂志*, 2013,29(10):924-927.
- [26] Gening ML, Maira-Litrán T, Kropec A, et al. Synthetic beta-(1->6)-linked N-acetylated and nonacetylated oligoglucosamines used to produce conjugate vaccines for bacterial pathogens [J]. *Infect Immun*,2010,78(2):764-772.
- [27] Garcia-Quintanilla M, Pulido MR, McConnell MJ. First steps towards a vaccine against *Acinetobacter baumannii* [J]. *Curr Pharm Biotechnol*,2013,14(10):897-902.
- [28] Bentancor LV, O'Malley JM, Bozkurt-Guzel C, et al. Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine is a target for protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections [J]. *Infect Immun*, 2012,80(2):651-656.
- [29] Cerca N, Maira-Litrán T, Jefferson KK, et al. Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2007,104(18):7528-7533.

(收稿日期:2014-10-20)

(本文编辑:贾津津)