

[文章编号] 1000-2200(2008)01-0009-04

· 基础医学 ·

金黄色葡萄球菌毒素基因的检测及临床应用

蔡朝阳¹, 马筱玲², 纪冰², 赵燕³

[摘要] 目的: 了解医院获得性金黄色葡萄球菌(HA-SA)和社区获得性金黄色葡萄球菌(CA-SA)所携带肠毒素、表皮剥脱性毒素(ETs)、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)及杀白细胞素基因(PVL)的特点。方法: 应用PCR法检测肠毒素A、B、C、D、E基因, ETs A、B基因, TSST-1以及PVL。结果: 116株金黄色葡萄球菌中, 85株为HA-SA, 检出肠毒素A基因6株, 肠毒素C基因1株, 肠毒素D基因1株, PVL2株; 31株为社区获得性金黄色葡萄球菌, 检出肠毒素A基因1株, 肠毒素B基因1株, 肠毒素D基因1株, PVL7株; 所有菌株均未检测到肠毒素E、ETs A、B和TSST-1基因。CA-SA PVL检出率显著高于HA-SA, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.005$), 而肠毒素、ETs和TSST-1基因检出率比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 金黄色葡萄球菌可分泌多种毒素, 在分离金黄色葡萄球菌的同时, 应注意其毒素检测。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 肠毒素; 表皮剥脱性毒素; 中毒性休克综合征毒素-1; 杀白细胞素; 基因

[中国图书资料分类号] R 378.11 **[文献标识码]** A

Detection of *Staphylococcus aureus* toxigenes and its clinical applicationCAI Chao-yang¹, MA Xiao-ling², JI Bing², ZHAO Yan³

(1. Department of Microbiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Laboratory Medicine, Anhui Provincial Hospital, Hefei Anhui 230001;

3. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230022, China)

[Abstract] **Objective:** To study genic feature of *Staphylococcal* enterotoxins (SEs), exfoliative toxins (ETs), toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) and Pantone-Valentine leukocidin (PVL) carried by both hospital-acquired *Staphylococcus aureus* (HA-SA) and community-acquired *Staphylococcus aureus* (CA-SA). **Methods:** The genes of SEA-SEE, ETA, ETB, TSST-1 and PVL were detected by PCR. **Results:** Out of 116 SA strains, 85 strains were HA-SA. SEA was detected in 6 strains, SEC in 1 strain, SED in 1 strain, and PVL in 2 strains. Thirty one strains were CA-SA. SEA was detected in 1 strain, SEB in 1 strain, SED in 1 strain, and PVL in 7 strains. SEE, ETA, ETB and TSST-1 were negative in all SA. PVL positive rate detected in CA-SA was much higher than that in HA-SA ($P < 0.005$), while positive rates of SEs, ETs, TSST-1 were not significant different between CA-SA and HA-SA ($P > 0.05$). **Conclusions:** *Staphylococcus aureus* may secrete various toxins, detecting should pay attention to whose toxins while separating *Staphylococcus aureus*.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus* enterotoxins; exfoliative toxins; toxic shock syndrome toxin 1; Pantone-Valentine leukocidin; genes

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是医院和社区获得性感染的常见病原菌之一, 可以引起皮肤和全身的广泛感染^[1], 包括脓疱性皮炎、疖、皮下脓肿、皮肤烫伤综合征、新生儿和成人中毒性休克综合征、发疹性疾病以及食物中毒^[2]。SA 可以产生多种毒素, 主要有葡萄球菌肠毒素 (*Staphylococcal* enterotoxins, SEs)、葡萄球菌溶血素、杀白细胞素 (Pantone-Valentine leukocidin, PVL)、表皮剥脱性毒素 (exfoliative toxins, ETs) 以及中毒性休克综合征毒素-1 (toxic shock syndrome toxin 1, TSST-1) 等^[3]。目

前已有多种方法检测这些毒素和相关基因, PCR 法被证明是快速和可靠的方法。本文利用 PCR 法分别检测医院获得性金黄色葡萄球菌 (hospital-acquired *Staphylococcus aureus*, HA-SA) 和社区获得性金黄色葡萄球菌 (community-acquired *Staphylococcus aureus*, CA-SA) 携带的 SEA ~ SEE、ETA、ETB、TSST-1 和 PVL 基因, 并比较 HA-SA 和 CA-SAS 携带 SEA ~ SEE、ETA、ETB、TSST-1 和 PVL 基因的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 85 株细菌从住院患者标本中分离, 分别来源于痰 (43 株)、脓液 (4 株)、创面分泌物 (19 株)、血液 (6 株)、前列腺液 (4 株)、尿液 (3 株)、胸腔积液 (1 株)、引流液 (1 株)、穿刺液 (2 株) 以及导管 (2 株); 31 株细菌分离于安徽省立医院门

[收稿日期] 2006-11-21

[基金项目] 安徽省科技攻关项目 (07010302192)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 微生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 2. 安徽省立医院 检验科, 安徽 合肥 230001; 3. 安徽医科大学第一附属医院 检验科, 安徽 合肥 230022

[作者简介] 蔡朝阳 (1975 -), 男, 硕士研究生, 助教。

[通讯作者] 马筱玲, 女, 硕士生导师, 教授。

诊皮肤科的皮肤和软组织感染的标本,且患者在就医之前1年内没有如下情况:曾住院,长期特殊护理,外科手术,血液透析和无留置导管或人工医疗装置等。所有116株细菌均经法国Bio-Merieux公司GPI鉴定系统鉴定为SA。

1.1.2 试剂和仪器设备 细菌鉴定仪:VITEK32全自动微生物分析仪(法国);PCR扩增仪:T-gradient Biometra(德国);凝胶电泳仪:DYY-10C(北京);PCR试剂:购于TaKaRa公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)公布的基因序列,利用Primer Premier 5.0软件设计及参考文献^[4],引物由大连宝生物合成,引物序列见表1。

表1 金黄色葡萄球菌SEs、ETs、TSST、PVL基因引物

目的基因	引物	引物序列(5'-3')	扩增产物
SEA	SEA-1	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127 bp
	SEA-2	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
SEB	SEB-1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477 bp
	SEB-2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	
SEC	SEC-1	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271 bp
	SEC-2	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
SED	SED-1	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319 bp
	SED-2	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	
SEE	SEE-1	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	178 bp
	SEE-2	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	
TSST	TST-1	AAG CCC TTT GTT GCT TGC G	445 bp
	TST-2	ATC GAA CTT TCG CCC ATA CTT T	
ETA	ETA-1	CTA GTG CAT TTG TTA TTC AAG ACG	119 bp
	ETA-2	TGC ATT GAC ACC ATA GTA CTT ATT C	
ETB	ETB-1	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TTC AAT G	262 bp
	ETB-2	AAA GTT ATT CAT TTA ATG CAC TGT CTC	
PVL	PVL-1	ATC ATT ACG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCCA	433 bp
	PVL-2	GCA TCA AST GTA TTG GAC ATG ATC CA	

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 用牙签挑取平板上的2~3个菌落放入400 μl双蒸水中,混匀,100℃煮沸15~30 min后,10 000 r/min离心5 min,吸3 μl上清作为PCR扩增模板。

1.2.2 PCR扩增体系及反应条件 扩增反应总体积为50 μl,10×Buffer缓冲液5 μl,Taq酶(5 u/μl)0.25 μl,dNTP 3 μl,引物各1 μl,模板3 μl,加灭菌去离子水至50 μl。扩增SEs基因热循环参数为:95℃预变性4 min,95℃1 min,55℃1 min,72℃2 min,循环30次,72℃延伸7 min;扩增ETA、ETB和TSST基因循环参数为:95℃预变性4

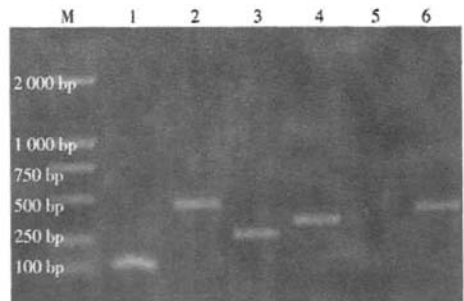
min,95℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,循环30次;扩增PVL基因热循环参数为:94℃预变性4 min,94℃30 s,52℃30 s,72℃1 min,循环30次,72℃延伸3 min。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳 170 mg琼脂糖粉末与17 ml TBE缓冲液混合加热煮沸,冷却至60℃加入溴乙锭1.5 μl,制备成1%的琼脂糖凝胶。1 μl上样缓冲液与6 μl PCR扩增产物混合后加入1%琼脂糖凝胶孔,1×TBE为电泳缓冲液,用水平式电泳槽100 V,电流为80 mA,时间为30 min。300 nm紫外灯观察结果,凝胶成像系统成像。

1.3 统计学方法 采用χ²检验。

2 结果

85株HA-SA中,共检测出肠毒素基因8株(9.41%),其中肠毒素A基因6株(7.06%),肠毒素C基因1株(1.18%),肠毒素D基因1株(1.18%);PVL基因2株(2.35%);31株CA-SA中,共检测出肠毒素基因3株(检出率为9.68%),其中肠毒素A基因1株(3.23%),肠毒素B基因1株(3.23%),肠毒素D基因1株(3.23%);PVL基因7株(22.58%)。所有标本均未检测出SEE、ETA、ETB和TSST-1(见图1)。CA-SA检测出PVL基因高于HA-SA,差异有统计学意义(P<0.005);携带SEs、ETs和TSST基因差异均无统计学意义(P>0.05)(见表2)。



M: marker;1:SEA;2:SEB;3:SEC;4:SED;5:SEE;6:PVL

图1 金黄色葡萄球菌肠毒素及杀白细胞素基因

表2 HA-SA和CA-SA携带毒素基因率(%)比较

细菌来源	n	SEs*	ETs*	TSST-1	PVL
HA-SA	85	8(9.41)	0	0	2(2.35)
CA-SA	31	3(9.68)	0	0	7(22.58)
合计	116	11(9.48)	—	—	9(7.76)
χ ²	—	0.10	0.00	0.00	10.31
P	—	>0.05	>0.05	>0.05	<0.005

*:SEs包括SEA~SEE;ETs包括ETA、ETB

3 讨论

金黄色葡萄球菌能产生和分泌多种酶和毒素,这些酶和毒素已经被证明与食物中毒、中毒性休克、皮肤烫伤样综合征以及作为超抗原功能相关^[5]。目前国内虽有检测 SA 肠毒素报道,但报道仅见于食物中毒患者或相关食品标本分离的 SA,亦未见关于 ETA、ETB、TSST-1 和 PVL 基因检测的报道,本文首次对 SA 所携带毒素基因联合检测。

PVL 是一种细胞毒素,这种毒素能够在中性粒细胞的细胞膜上产生溶解性孔洞。有研究显示,构成 PVL 的组件可以诱使中性粒细胞释放中性粒细胞趋化因子。由于其毒性强,近年来受到很大关注,在儿童以及年轻人坏死性肺炎患者分离的 SA 也检测出 PVL 基因^[4],疾病起初侵犯皮肤或皮下组织引起坏死斑。临床标本分离的 SA,其 PVL 基因检出率一般不超过 5%。目前国内尚未见 PVL 基因检测报道。本文研究发现 116 株 SA 中检测出 9 株 PVL 基因,检出率为 7.76%,其中在 85 株 HA-SA 中仅检测出 2 株 PVL 基因,检出率仅为 2.35%,这与 Holmes^[2]等报道 HA-SA 中 PVL 基因分离率为 1.6% 相近;而在 31 株 CA-SA 中,却检测出 7 株 PVL 基因,检出率为 22.58%。HA-SA 和 CA-SA 在携带 PVL 基因上具有显著性差异($P < 0.005$)。携带 PVL 基因的 SA 与社区获得性感染有密切相关性,国外已有多篇报道^[6,7]在 CA-SA 中 PVL 基因检出率较高,而 HA-SA 中 PVL 基因检出率则较低。美国 CDC 将携带 PVL 基因作为社区获得性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌标志之一。本文分离的 CA-SA 均为社区获得性甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌,而携带有 PVL 基因的社区获得性甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌一旦获得 *mecA* 基因成为甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌,将产生多重耐药性且具有 PVL,由于 PVL 毒性强,有一定的致死性,将会给患者带来严重后果。有报道^[8]社区获得性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌携带 PVL 基因可能更多,而我们分离的 CA-SA 均为社区获得性感染甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌,对社区获得性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌的 PVL 基因检测值得进一步研究。

肠毒素是一类结构相关、毒力相似、抗原性不同的胞外蛋白质,除早期报道 SEA ~ SEE 等 5 种经典肠毒素外,此外又发现了 SEG、SEH、SEI、SEJ、SEK、SEL、SEM 和 SEU 等多种肠毒素^[9,10],临床分离的 SA 所分泌肠毒素 95% 以上为 SEA ~ SEE。肠毒素的主要作用可以引起食物中毒,故在食物中毒患者呕吐物或相关食品中分离的 SA,其携带肠毒素基因

率高。本文在对 116 株医院获得性和社区获得性金黄色葡萄球菌中检测出 11 株肠毒素基因,阳性率为 9.48%,与赵建等^[11]报道阳性率为 56.2% 差异较大,考虑可能为不同标本,不同地域,不同自然环境,SA 流行菌株也不同,其携带毒素基因亦不一样。本文检测的标本来源于医院住院和门诊皮肤科患者分离的 SA,而赵建等^[11]是从食物中毒的患者以及相关食品标本中分离的 SA。116 株 SA 中有 85 株为 HA-SA,检测出产肠毒素基因的 SA 有 8 株,阳性率为 9.41%,31 株为 CA-SA,检测出产肠毒素基因的 SA 有 3 株,阳性率为 9.68%,HA-SA 和 CA-SA 在携带肠毒素基因率上比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。考虑携带肠毒素基因金黄色葡萄球菌主要引起食物中毒,而与医院获得性或社区获得性感染无关。

由金黄色葡萄球菌产生的表皮剥脱性毒素(ETA、ETB)可引起烫伤样皮肤综合征,从局部的大水疱到广泛的皮肤脱落^[12]。虽然表皮剥脱性毒素损伤机体组织过程还不是很清楚,但是有证据显示表皮剥脱性毒素可损伤皮肤保护层,从而损伤机体组织和侵入深层组织^[13]。本文在医院和社区获得性感染金黄色葡萄球菌中均未检测到 ETA 和 ETB 基因,本文分离的标本来源于普通患者,并无水疱或广泛皮肤脱落患者,考虑感染类型不同,金黄色葡萄球菌携带毒素基因也不同。

TSST-1 是引起中毒性休克的主要原因,特别是使用月经栓的病例。和肠毒素一样,中毒性休克综合征毒素也属于超抗原家族。本文在医院和社区获得性金黄色葡萄球菌中均未检测到 TSST-1 基因,考虑为感染类型不同,金黄色葡萄球菌携带毒素基因也不同。

[参 考 文 献]

- [1] 管俊昌,夏佩莹,唐素兰.金黄色葡萄球菌 L 型产 B 型肠毒素及其基因的研究[J].蚌埠医学院学报,2004,29(4):283-285.
- [2] Holmes A, Ganner M, McGuane S, et al. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Pantan-Valentine leukocidin genes in England and Wales: Frequency, characterization, and association with clinical disease[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2384-2390.
- [3] Archer GL. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen[J]. *Clin Infect Dis*, 1998, 26(5): 1179-1181.
- [4] Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, et al. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying pantan-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(3): 381-385.
- [5] Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, et al. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1434-1439.
- [6] Liassine N, Auckenthaler R, Descombes MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Switzerland contains the Pantan-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2): 825-828.

TRAIL 受体在子宫内膜癌细胞株的表达

王才智¹, 吕合作², 席玉玲¹, 晋茂生¹, 何玉¹, 郭才¹, 凌斌³

[摘要] 目的: 研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)受体在正常子宫内膜组织、子宫内膜癌组织和癌旁组织的表达特征。方法: 采用 RT-PCR 技术, 检测 20 例正常子宫内膜、20 例子宫内膜癌及癌旁组织中 TRAIL 受体 DR4、DR5 和假受体 DcR1、DcR2 阳性表达情况。结果: TRAIL 受体 DR4、DR5 的 mRNA 在人正常子宫内膜组织、子宫内膜癌组织和癌旁组织中均表达, 诱骗受体 DcR1 的 mRNA 在子宫内膜各组织中的表达率不同, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 而诱骗受体 DcR2 的 mRNA 在子宫内膜癌组织中的表达率明显低于正常子宫内膜组织和癌旁组织, 差异具有统计学意义($P < 0.005$), 癌旁组织细胞中 DcR2 表达和正常子宫内膜组织相近($P > 0.05$)。结论: TRAIL 诱骗受体 DcR1、DcR2 在子宫内膜癌中的低表达可能与其发病机制有关, 可能对防止子宫内膜癌变具有一定作用。

[关键词] 子宫肿瘤; Ishikawa 细胞株; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; TRAIL 受体

[中国图书资料分类号] R 737.33; R 329.24 [文献标识码] A

Expression of TRAIL receptors in human endometrial carcinoma cell line

WANG Cai-zhi¹, LÜ He-zuo², XI Yu-ling¹, JIN Mao-sheng¹, HE Yu¹, GUO Cai¹, LING Bin³

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

3. Department of Gynecology and Obstetrics, Anhui Provincial Hospital, Hefei Anhui 230001, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of death receptors (DR4, DR5) and decoy receptors (DcR1, DcR2) of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in normal endometrium tissues, carcinoma endometrium tissues and the adjacent tissues. Methods: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect mRNA positive expressions of the receptors of TRAIL in 20 cases of normal endometrium tissues, 20 cases of carcinoma endometrium tissues and the adjacent tissues. Results: DR4 and DR5 were expressed in normal endometrium tissues, carcinoma endometrium tissues and the adjacent tissues. DcR1 expressed differently in the tissues of endometrium, but with no statistical significance ($P > 0.05$); the expression of DcR2 was much lower in the carcinoma endometrium tissues than in normal or tumor adjacent tissues ($P < 0.005$); the expression of DcR2 was similar in normal and tumor adjacent tissues ($P > 0.05$). Conclusions: The low expression of DcR2 in the carcinoma of endometrium may be concerned with its pathogenesis, which might play a role in preventing endometrium from carcinomatous change.

[Key words] uterine neoplasms; Ishikawa cell line; tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand; TRAIL receptors

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related

apoptosis inducing ligand, TRAIL) 是 1995 年发现的 TNF 超家族中的凋亡分子, 它的结构、功能及作用机制, 近年来引起基础与临床多学科的关注, 尤其 TRAIL 能有选择性地诱导肿瘤细胞凋亡, 而对正常细胞无细胞毒性作用^[1], 这为肿瘤的生物治疗提供新的思路。有关 TRAIL、TRAIL 受体及其信号传导途径与肿瘤的关系早有研究, 但它们在子宫内膜癌

[收稿日期] 2007-07-10

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2003kj69)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 第一附属医院 妇产科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 3. 安徽省立医院 妇产科, 安徽 合肥 230001

[作者简介] 王才智(1968-), 男, 副主任医师, 副教授。

[7] Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, et al. A Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3356-3363.

[8] Salliot C, Zeller V, Puechal X, et al. Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: Report of 4 French cases [J]. *Scand J Infect Dis*, 2006, 38(3): 192-195.

[9] Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in *Staphylococcal* isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(10): 3411-3414.

[10] El-Huneidi W, Bdour S, Mahasneh A. Detection of enterotoxin genes seg, seh, sei, and sej and of a novel aroA genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006, 56(2): 127-132.

[11] 赵建, 丁水军, 陆扁, 等. 48 株金黄色葡萄球菌的肠毒素分布及其耐药性研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(7): 841-842.

[12] Ladhani S. Recent developments in *Staphylococcal* scalded skin syndrome [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(6): 301-307.

[13] Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, et al. Toxin in bullous impetigo and *Staphylococcal* scalded-skin syndrome targets desmoglein 1 [J]. *Nat Med*, 2000, 6(11): 1275-1277.