

金黄色葡萄球菌和纤维连接蛋白结合蛋白A对血管内皮细胞紧密连接的破坏作用

冯洒然¹ 李德志² 林殿杰² 朱玲²

【摘要】目的 观察金黄色葡萄球菌和纤维连接蛋白结合蛋白A基因(fnBA)敲除金黄色葡萄球菌菌株对人微血管内皮细胞(HMEC-1)紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-5的影响,并探讨金黄色葡萄球菌侵袭血管内皮细胞的机制。**方法** 将野生金黄色葡萄球菌菌株NCTC8325与HMEC-1按100:1比例共培养,实时定量RT-PCR检测共培养30 min、60 min和120 min时HMEC-1紧密连接成份ZO-1和Claudin-5 mRNA的表达,同时应用Western blot分析和免疫组织化学染色观察共培养不同时间紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的表达。构建fnBA基因敲除突变菌株NCTC8325ΔfnBA,以野生金黄色葡萄球菌菌株NCTC8325为阳性对照,观察突变株NCTC8325ΔfnBA与HMEC-1共培养120 min后紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的变化。**结果** 金黄色葡萄球菌NCTC8325与HMEC-1共培养30 min、60 min和120 min后紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-5 mRNA的表达在30 min、120 min时较对照组显著下降[30 min时与对照组比较:ZO-1: $t = 4.104$ 、 $P = 0.015$, Claudin-5 mRNA: $t = 2.802$ 、 $P = 0.049$; 120 min时与对照组比较:ZO-1: $t = 3.478$ 、 $P = 0.025$, Claudin-5 mRNA: $t = 1.802$ 、 $P = 0.261$],但60 min时ZO-1、Claudin-5 mRNA的表达有一过性升高。与金黄色葡萄球菌NCTC8325共培养后,免疫组织化学结果发现在30 min时ZO-1和Claudin-5两种紧密连接蛋白较对照组表达显著下降($t = 33.6$ 、 59.03 , P 均 < 0.001),120 min时ZO-1和Claudin-5两种紧密连接蛋白较对照组表达亦显著下降($t = 31.8$ 、 60.75 , P 均 < 0.001); Western blot与免疫组织化学结果一致。与突变菌株NCTC8325ΔfnBA共培养30 min、60 min和120 min后,在30 min和60 min时ZO-1、Claudin-5蛋白的表达与NCTC8325组差异无统计学意义(P 均 > 0.05),在120 min时ZO-1和Claudin-5蛋白的表达较NCTC8325组显著升高,差异均有统计学意义(ZO-1: $t = 14.89$ 、 $P < 0.001$, Claudin-5: $t = 7.008$ 、 $P = 0.002$)。**结论** 金黄色葡萄球菌能通过下调紧密连接蛋白破坏HMEC-1紧密连接屏障,且其表面蛋白FnBPA发挥了重要作用。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 基因敲除; 纤维连接蛋白结合蛋白A基因; 紧密连接; 闭锁小带蛋白1; 紧密连接整合膜蛋白5

Disruption of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal Fn-binding protein A to the tight junction of human microvascular endothelial cells Feng Saran¹, Li Dezhi², Lin Dianjie², Zhu Ling². ¹Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250014, China; ²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250014, China

Corresponding author: Li Dezhi, Email: lidezhiy@163.com

【Abstract】Objective To investigate the changes of tight junction protein ZO-1 and Claudin-5 of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) after incubation with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and fnBA knockout strains, and to explore the mechanism of *S. aureus* invading the vascular endothelial cells. **Methods** Wild NCTC8325 *S. aureus* strain were co-cultured with HMEC-1 in 100:1 ratio for 30 min, 60 min and 120 min.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2020.05.010

基金项目: 山东省自然科学基金项目(No. ZR2014HQ050, No. ZR2015HL38)

作者单位: 250014 济南市, 山东第一医科大学第一附属医院血液科¹; 250014 济南市, 山东第一医科大学附属省立医院呼吸与危重症医学科²

通信作者: 李德志, Email: lidezhiy@163.com

Quantitative real-time-PCR analyses were performed to examine the expressions of ZO-1 and Claudin-5 mRNA. At the same time, the expressions of protein ZO-1 and Claudin-5 were also analyzed by western blot and immunohistochemistry methods. The strain NCTC8325Δ *fnbA* with *fnbA* gene knockout was generated and co-cultured with HMEC-1 for 120 min. Western blot and immunohistochemistry were used to measure the expressions of ZO-1 and Claudin-5. **Results** The mRNA expression at different times showed a pronounced transcription of ZO-1 and Claudin-5 ($P = 0.0017$). The transcriptional level at 60 min was higher. At 30 min, transcriptional levels of ZO-1 and Claudin-5 were higher than 0 min (ZO-1: $t = 4.104$, $P = 0.0148$; Claudin-5: $t = 2.802$, $P = 0.0487$). At 120 min, transcriptional levels of ZO-1 and Claudin-5 were higher than 0 min (ZO-1: $t = 3.478$, $P = 0.0254$; Claudin-5: $t = 1.802$, $P = 0.2611$). After incubation with *S. aureus* NCTC8325, the levels of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-5 were significantly down-regulated at 30 min and 120 min examined by immunohistochemistry (30 min: ZO-1: $t = 33.6$, $P = 0.0001$; Claudin-5: $t = 59.03$, $P = 0.0001$; 120min: ZO-1: $t = 31.8$, $P = 0.0001$; Claudin-5: $t = 60.75$, $P = 0.0001$). The levels of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-5 were consistent with the results of immunohistochemistry. After incubation with *S. aureus* NCTC8325Δ *fnbA* for 30 min, 60 min and 120 min, there were no differences in *S. aureus* NCTC8325 and *S. aureus* NCTC8325Δ *fnbA* group at 30 min and 60 min, but the levels of tight junction proteins ZO-1 and Claudin-5 were significantly up-regulated than the control at 120 min (ZO-1: $t = 14.89$, $P = 0.0001$; Claudin-5: $t = 7.008$, $P = 0.0022$). **Conclusions** *S. aureus* could breach the microvascular endothelial cells so as to favor themselves shuttling by disrupting tight junction proteins ZO-1 and Claudin-5, and FnBPA might play an important role in the process.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; Gene knockout; Fn-binding protein A gene; Tight junction; Zonula occludens-1; Claudin-5

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是全世界社区获得性感染和院内感染的主要致病菌之一。随着静脉导管、各种外科介入治疗的增多和植入材料的应用, 金黄色葡萄球菌血流感染发生率越来越高。金黄色葡萄球菌血流感染是指细菌经由体表或是感染部位入口进入血液后在血液内生长繁殖并随血流播散全身, 可引起全身多种组织器官感染, 甚至导致休克、严重脓毒症甚至多脏器功能衰竭, 传播快, 抗菌治疗时间长, 病死率高, 尤其是随着多重耐药菌的出现, 治疗难度增加, 尽管采取积极治疗, 感染者病死率仍高达20%~30%^[1-2]。

金黄色葡萄球菌侵袭血管内皮的分子机制仍未明确。近年来研究发现部分细菌、病毒感染过程中病原体通过特异性蛋白与其受体结合介导了血管内皮细胞紧密连接结构的破坏, 从而导致血管内皮完整性的破坏。研究表明金黄色葡萄球菌纤维连接蛋白结合蛋白 (fibronectin binding proteins, FnBPs) 尤其是金黄色葡萄球菌纤维连接蛋白结合蛋白A (fibronectin binding proteins A, FnBPA) 在金黄色葡萄球菌侵袭细胞的过程中起重要作用^[3-4]。本研究检测金黄色葡萄球菌对人微血管内皮细胞紧密连接蛋白的影响, 并通过构建纤维连接蛋白结合蛋白A (*fnbA*) 基因缺失突变体菌株, 观察FnBPA在其中

的作用, 为进一步研究金黄色葡萄球菌的血流感染机制奠定基础。

材料与方法

一、主要试剂

人微血管内皮细胞HMEC-1 (苏州大学赠送); 羊抗人ZO-1、兔抗人Claudin-5抗体 (Abcam公司); 羊抗兔IgG抗体、驴抗羊IgG抗体 (Bioswamp公司); IMDEM培养基 (美国Gibco公司产品); 胎牛血清 (杭州四季青生物有限公司); 蛋白质Marker (Thermo公司); 组织细胞快速裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒 (Bioswamp公司); TritonX-100 (Bioswamp公司); DAB浓缩型试剂盒 (Bioswamp公司); YBR Green PCR试剂盒 (KAPA Biosystems); RNase I (Fermentas); 金黄色葡萄球菌菌株NCTC8325 (美国芝加哥大学赠送), 金黄色葡萄球菌*fnbA*基因敲除菌株NCTC8325Δ*fnbA* (本室自行构建)。

二、方法

1. 不同菌株金黄色葡萄球菌与HMEC-1共培养: 人HMEC-1接种于6孔培养板, 用含20%胎牛血清的IMDM培养基在37 °C、5% CO₂, 饱和湿度

条件下培养,当细胞融合成单层细胞时,用PBS洗涤3次,将细胞浓度调整为 2.5×10^5 个/孔。用无血清的培养液将金黄色葡萄球菌NCTC8325和fnbA基因敲除金黄色葡萄球菌NCTC8325 Δ fnbA分别稀释成 2.5×10^7 cfu/ml,接种于HMEC-1单层细胞,即菌体细胞与HMEC-1细胞比例为100:1,进行实验。

2. 金黄色葡萄球菌fnbA基因敲除菌株NCTC8325 Δ fnbA的构建:提取金黄色葡萄球菌NCTC8325菌株的基因组,以合成的含有GGGG-attB1的基因特异性序列为引物,采用PCR技术分别扩增目的基因片段,应用Gateway基因克隆技术,通过同源重组反应^[5]与含有attP1和attP2的pKOR1质粒载体混合,在attB和attP间发生位点特异性重组,构建成含有fnbA基因敲除的质粒,再电转到金黄色葡萄球菌菌株NCTC8325并鉴定^[5]。

3. 实时定量RT-PCR (qRT-PCR) 检测与不同金黄色葡萄球菌菌株共培养时HMEC-1 ZO-1、Claudin-5 mRNA的表达:应用Primer Express 2.0设计引物。ZO-1正义链:5'-GCTCCAGGTAGTGAAT-3',反义链:5'-GCTCCAGGTAGTGAAT-3';Claudin-5正义链:5'-CAGGTGCCAGTGTA-3',反义链:5'-ACCAGGGGGTTGTAG-3'; β -Actin正义链:5'-ACACTGTGCCATCTACG-3',反义链5'-TGTCACGCACGATTTCC-3'。

TRIzol一步法提取总RNA, M-MLV逆转录酶逆转成cDNA, MJ Research Opticonm 2荧光定量PCR仪进行PCR检测。20 μ l的反应体系包括:样品cDNA 1 μ l、上下游引物各0.5 μ l、SYBR Green Mix 10 μ l、灭菌双蒸水8 μ l。反应条件为95 $^{\circ}$ C、10 s, 56 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、25 s共39个循环。以 β -actin作为内参照标定各基因表达量,结果循环阈(cycle threshold, CT)值以 $2^{-\Delta CT}$ 表示。各标本每个基因检测3个复孔。CT值即qRT-PCR扩增过程中,扩增产物的荧光信号达到设定的荧光阈值时的所对应的扩增循环数。

4. 免疫组织化学方法检测与不同金黄色葡萄球菌菌株共培养时HMEC-1紧密连接蛋白的变化:在孔板中加入对应大小的细胞爬片,将细胞消化成单个细胞,接种到12孔板中,按分组处理细胞:空白细胞对照组;野生株细菌感染30 min、60 min、120 min组和基因敲除菌株组。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养过夜;加入95%酒精(加2~3滴冰醋酸)固定15 min; PBS/0.05% Tween 20洗涤3次;加通

透液20 min; PBS/0.05% Tween 20洗涤2次,每次5 min; 3%过氧化氢室温封闭10 min; PBS/0.05% Tween 20洗涤2次,加封闭血清10 min; 甩掉封闭血清,加兔抗人ZO-1、Claudin-5一抗稀释液,置湿盒内,4 $^{\circ}$ C过夜;滴加maxvision 二抗,湿盒孵育,室温下放置20~30 min。PBS冲洗3 min \times 3次。DAB显色,观察到切片有颜色改变时,立即用自来水洗去染色液。苏木素复染3 min, 1%盐酸酒精分化,显微镜下观察,控制染色程度。显色充分后及时将标本置于蒸馏水中终止反应。将玻片置于二甲苯中透明3 min \times 2次,放入65 $^{\circ}$ C烘箱中15 min,中性树胶封片。通过显微镜拍照,采集分析样本相关部位。采用Imagepro Plus 6.0图像分析软件对免疫组织化学图片进行累积光密度(integral light density, IOD)测定分析。

5. Western blot检测与不同金黄色葡萄球菌菌株共培养时HMEC-1紧密连接蛋白的变化:收集各组细胞,加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5, 含150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、1% NP-40、1 mmol/L PMSF、5 μ g/ml抑肽酶、5 μ g/ml亮氨酸),4 $^{\circ}$ C裂解60 min, 12 000 r/min(离心r=13.5 cm)、4 $^{\circ}$ C离心5 min,收集上清,BCA试剂盒检测蛋白浓度(按试剂盒说明书操作进行)。取60 μ g总蛋白,经10% SDS-PAGE电泳后,100V 1 h电转移至PVDF膜,再以10%脱脂奶封闭过夜,兔抗人ZO-1和Claudin-5蛋白抗体(1:1 000)作为一抗杂交1 h,洗膜后与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔IgG(1:10 000)二抗结合1 h,洗膜后经ECL显色,暗室曝光显影。应用图像分析软件(Gel. Pro Analyzer 4.5)对条带进行分析。

三、统计学处理

采用Graphpad 5.0软件进行统计学分析。ZO-1、Claudin-5 mRNA及蛋白表达量为计量资料,均呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用成组设计t检验;多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、金黄色葡萄球菌NCTC8325与HMEC-1共培养不同时间对ZO-1和Claudin-5 mRNA表达的影响

以空白HMEC-1为对照,金黄色葡萄球菌NCTC8325与HMEC-1分别共培养30 min、60 min、

120 min时, qRT-PCR检测金黄色葡萄球菌NCTC8325对ZO-1、Claudin-5 mRNA表达的影响, 结果显示30 min、120 min两个时间点ZO-1、Claudin-5 mRNA较对照组表达均显著下降 ($P < 0.05$), 30 min时ZO-1、Claudin-5 mRNA表达显著下降 ($P = 0.0148, 0.0487, t = 4.104, 2.802$), 120 min时ZO-1、Claudin-5 mRNA表达亦显著下降 ($P = 0.0254$ 和 $0.2611, t = 3.478$ 和 1.802), 但在60 min时ZO-1和Claudin-5 mRNA表达显著升高(图1)。

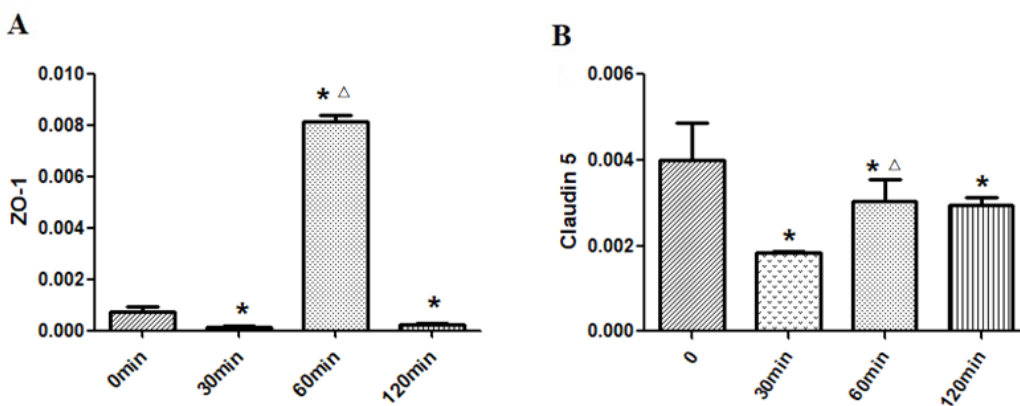
二、金黄色葡萄球菌NCTC8325与HMEC-1共培养不同时间对ZO-1和Claudin-5蛋白表达的影响

以空白HMEC-1为对照, 金黄色葡萄球菌NCTC8325与HMEC-1分别共培养30 min、60 min、120 min时, 免疫组织化学染色和Western blot检测金黄色葡萄球菌NCTC8325对紧密连接是否有破坏作用。免疫组织化学结果发现在30 min时ZO-1和Claudin-5两种紧密连接蛋白较对照组表达显著下降 (P 均= 0.0001, $t = 33.6、59.03$), 同样, 120 min时ZO-1和Claudin-5两种紧密连接蛋白较

对照组表达明显下降 (P 均= 0.0001, $t = 31.8、60.75$), 但60 min时ZO-1表达反而较对照组显著升高, Claudin-5表达虽有下降 ($P = 0.0004$), 但较30 min、120 min时显著升高 (P 均= 0.0001, $t = 22.29、28.84$) (图2)。Western blot结果与免疫组化结果相一致(图3~4)。

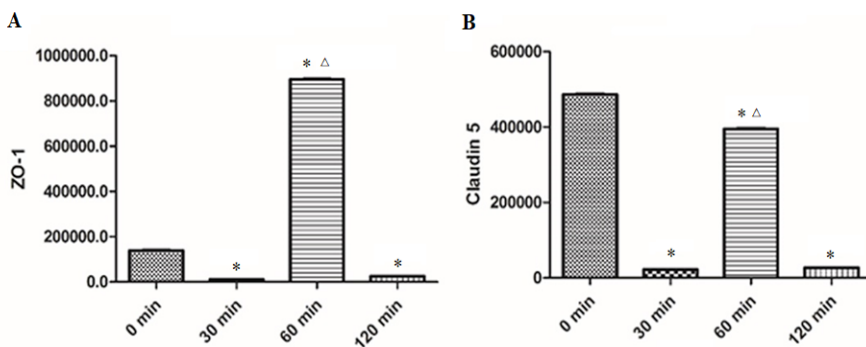
三、免疫组织化学方法观察突变株NCTC8325ΔfnbA与HMEC-1共培养不同时间对ZO-1和Claudin-5蛋白表达的影响

以不加金黄色葡萄球菌的HMEC-1为阴性对照、金黄色葡萄球菌NCTC8325为阳性对照, 免疫组化方法观察突变株NCTC8325ΔfnbA与HMEC-1共培养30 min、60 min、120 min, 结果发现在共培养30 min、60 min时金黄色葡萄球菌NCTC8325与突变株NCTC8325ΔfnbA比较紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-5的表达均无显著变化 ($P = 0.0612$)。在120 min时NCTC8325ΔfnbA紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-5较阳性对照组表达显著增强 ($P = 0.0001、0.0022, t = 14.89、7.008$) (图5)。



注: *: 与对照组(0 min)比较, $P < 0.05$; △: 与30 min、120 min组比较, $P < 0.05$

图1 金黄色葡萄球菌NCTC8325在不同时间对HMEC-1 ZO-1和Claudin-5 mRNA的影响(免疫组织化学染色)



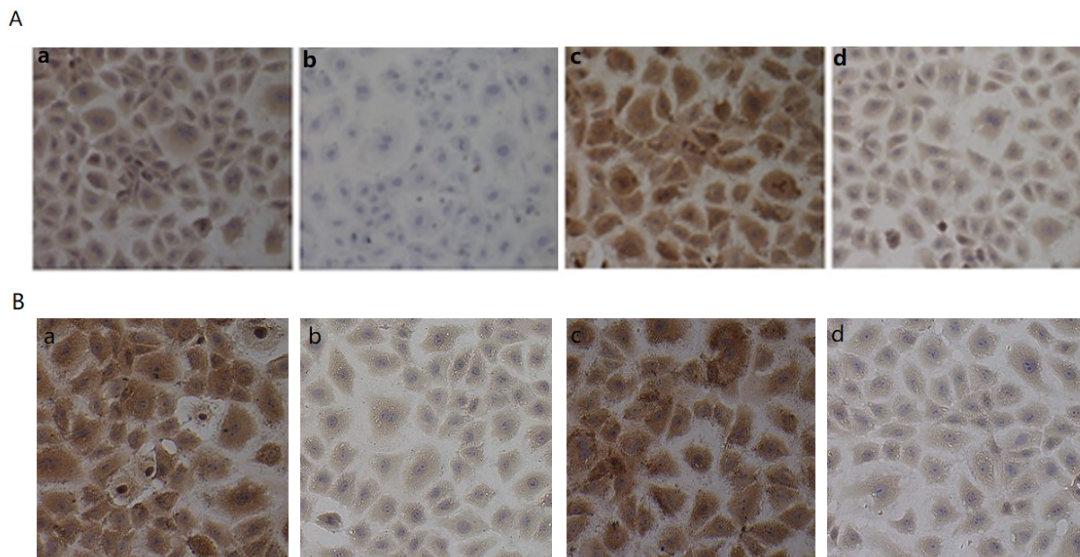
注: *表示与对照组比较, $P < 0.05$; △表示与30 min、120 min组比较, $P < 0.05$

图2 金黄色葡萄球菌NCTC8325在不同时间对HMEC-1紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的影响(免疫组织化学染色)

四、Western blot检测突变株NCTC8325ΔfnbA与HMEC-1共培养不同时间对ZO-1和Claudin-5蛋白表达的影响

以不加金黄色葡萄球菌的HMEC-1为阴性对照、金黄色葡萄球菌NCTC8325为阳性对照

照, Western blot检测突变株NCTC8325ΔfnbA与HMEC-1共培养120min时紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-5的表达, 结果示NCTC8325ΔfnbA紧密连接蛋白ZO-1、Claudin-5的表达较阳性对照组增强(图6)。



注: A: 金黄色葡萄球菌 NCTC8325 在不同时间对 HMEC-1 紧密连接蛋白 ZO-1 的影响; Aa: 为单独培养的 HMEC-1 ZO-1 的表达; Ab、c、d: 金黄色葡萄球菌 NCTC8325 与 HMEC-1 分别共培养 30 min、60 min、120 min 时 ZO-1 的表达。B: 金黄色葡萄球菌 NCTC8325 在不同时间对 HMEC-1 紧密连接蛋白 Claudin-5 的影响。Ba: 为单独培养的 HMEC-1 Claudin-5 的表达; Bb、c、d: 金黄色葡萄球菌 NCTC8325 与 HMEC-1 分别共培养 30 min、60 min、120 min 时 Claudin-5 的表达

图3 金黄色葡萄球菌NCTC8325在不同时间对HMEC-1紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的影响 (200 ×)

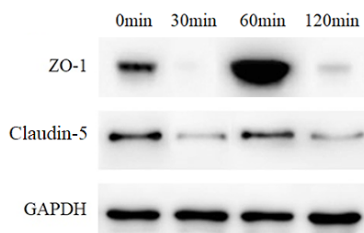
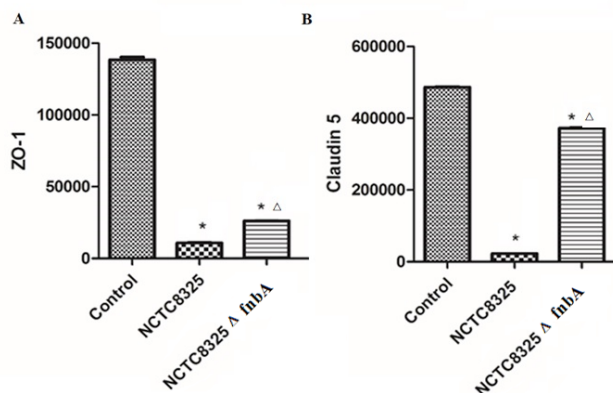
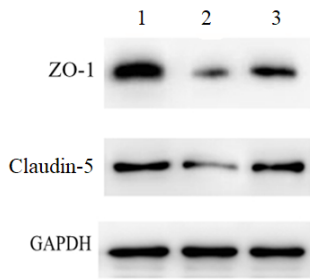


图4 金黄色葡萄球菌NCTC8325在不同时间对HMEC-1紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的影响 (Western blot分析)



注: * 表示与阴性对照组比较, $P < 0.05$; Δ 表示与阳性对照组比较, $P < 0.05$

图5 金黄色葡萄球菌NCTC8325和NCTC8325ΔfnbA在120 min时对HMEC-1紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的影响 (免疫组织化学染色)



注: 1: 阴性对照; 2: NCTC8325阳性对照; 3: NCTC8325 Δ fnbA
图6 金黄色葡萄球菌NCTC8325和NCTC8325 Δ fnbA在120 min时对HMEC-1紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5的影响 (Western blot分析)

讨 论

金黄色葡萄球菌侵袭组织细胞的过程十分复杂,其通过不断进化逃避宿主的免疫攻击,通过多种细胞表面蛋白和细胞外分泌蛋白包括各种黏附蛋白、毒力因子、蛋白酶等参与细菌的定植、黏附,并破坏和降解各种宿主细胞和细胞外基质等^[6-7]。血流感染时,血液循环中的金黄色葡萄球菌在不断繁殖复制的同时侵出血管,进一步播散到各组织器官形成脓肿。但金黄色葡萄球菌侵出血管内皮的机制尚不清楚,尚待进一步研究。

内皮细胞间的紧密连接对维持内皮细胞的正常结构和功能起重要作用,除屏障功能外,对维持细胞极性和细胞的增殖、分化起重要作用^[8-9]。紧密连接主要由跨膜蛋白(如Claudins和Occludins等)和胞质附着蛋白(ZO-1和ZO-2等)组成。Claudins共有24种成员,其中Claudin-5为血管内皮细胞的主要紧密连接蛋白之一^[10]。胞质附着蛋白ZO-1下游连接细胞内相关信号转导酶类和细胞激动蛋白,对维持细胞极性及稳定性起到重要作用^[11]。有研究发现,上皮或内皮细胞紧密连接蛋白形成的这种屏障结构,能够有效地限制大多数细菌等微生物的入侵,但一些病原体已经展示出更多的策略来改变或破坏这些结构从而侵入宿主组织细胞,成为其致病机制的一部分^[12-13]。大肠埃希菌、沙门菌以及幽门螺杆菌等均被发现可通过某种方式破坏紧密连接蛋白Claudins和ZO-1等从而改变紧密连接的通透性,导致其屏障功能破坏^[14-17]。金黄色葡萄球菌也被发现在皮肤感染过程中能通过破坏上皮细胞紧密连接蛋白Claudin-1、Claudin-4和ZO-1而侵入上皮组织^[18-20]。本研究发现,金黄色葡萄球菌菌株NCTC8325能够

破坏HMEC-1的紧密连接蛋白Claudin-5和ZO-1,尤其是在共培养30 min和120 min时,但在60 min时两种紧密连接蛋白的表达均较30 min显著上升,Claudin-5和ZO-1 mRNA的表达亦显著增加,与Bäsler等^[18]研究相一致。Bäsler等将金黄色葡萄球菌作用于人角质形成细胞,发现在接种数小时内紧密连接屏障功能明显增强,而且紧密连接蛋白Occludin和Claudin-4出现明显磷酸化,但随后出现紧密连接蛋白的下调及紧密连接屏障功能的破坏,Bäsler考虑这种短暂的增强是人角质形成细胞的一种早期保护反应,而时间的长短与接种细菌数量也有关^[18-20]。紧密连接屏障的破坏也导致血管通透性下降,为金黄色葡萄球菌侵入或侵出血管内皮细胞提供了通路。

在感染过程中各种病原体会利用自身的优势通过演变各种策略来突破紧密连接屏障,某些病原菌将紧密连接作为自己的受体介导细胞内化,某些病原体通过直接攻击破坏紧密连接屏障。不同细菌也通过不同的方式破坏紧密连接蛋白而发挥作用^[21]。金黄色葡萄球菌破坏紧密连接屏障的作用机制尚未明确,研究也相对较少。黏附是金黄色葡萄球菌侵袭组织细胞的重要步骤^[19],而FnBP是介导金黄色葡萄球菌黏附作用的主要细胞表面蛋白。绝大多数金黄色葡萄球菌均有2种FnBP,即FnBPA和FnBPB,分别由2个相近的fmbA和fmbB基因所编码。虽然FnBPA和FnBPB共同作用可增强金黄色葡萄球菌的侵袭作用,但FnBPA介导作用更强^[22-25]。本研究假设FnBPA在金黄色葡萄球菌破坏内皮细胞紧密连接的过程中发挥一定作用,将fmbA基因敲除突变菌株NCTC8325 Δ fmbA与HMEC-1共培养,观察紧密连接蛋白Claudin-5和ZO-1相对于野生菌株NCTC8325的变化,共培养120 min时突变株对紧密连接蛋白的破坏较野生株明显减轻,验证本研究假设的正确性,但其具体作用机制尚需进一步研究。

综上,本研究通过将金黄色葡萄球菌与微血管内皮细胞共培养来探讨金黄色葡萄球菌侵袭血管内皮细胞的机制,发现金黄色葡萄球菌可以通过下调紧密连接蛋白的表达破坏紧密连接屏障,从而导致血管内皮细胞通透性增强,利于细菌的入侵。fmbA基因敲除突变菌株对紧密连接蛋白的破坏明显减轻,提示金黄色葡萄球菌表面蛋白FnBPA在金黄色葡萄球菌破坏紧密连接的过程中起重要作用,为寻找治疗金黄色葡萄球菌感染的

新策略提供依据。

参 考 文 献

- [1] Kim T, Lee SC, Kim MJ, et al. Clinical significance of follow-up blood culture in patients with a single *Staphylococcus aureus*-positive blood culture[J]. Infect Dis(Lond),2020,52(3):207-212.
- [2] Bonnal C, Birgand G, Lolom I, et al. *Staphylococcus aureus* healthcare associated bacteraemia: An indicator of catheter related infections[J]. Med Mal Infect,2015,45(3):84-88.
- [3] Que YA, Haefliger JA, Piroth L, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis[J]. J Exp Med,2005,201(10):1627-1635.
- [4] Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2016,35(12):1923-1931.
- [5] 冯洒然, 李德志, 徐力, 等. 金黄色葡萄球菌 fnbA 和 fnbB 基因及 fnbAB 双基因缺失突变体菌株的构建[J]. 徐州医科大学学报,2018,38(8):512-518.
- [6] Foster TJ. The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2016,35(12):1923-1931.
- [7] Goudarzi M, Sabzehali F, Heidary M, et al. Molecular investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from blood: USA600 emerges as the major type[J]. J Infect Dev Ctries,2018,12(5):336-341.
- [8] Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition[J]. Semin Cell Dev Biol,2014,36:157-165.
- [9] Citi S. The mechanobiology of tight junctions[J]. Biophys Rev,2019,11(5):783-793.
- [10] Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins[J]. Compr Physiol,2012,2(3):1819-1852.
- [11] Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation[J]. Ann N Y Acad Sci,2012,1258:9-18.
- [12] Guttman JA, Samji FN, Li Y, et al. Evidence that tight junctions are disrupted due to intimate bacterial contact and not inflammation during attaching and effacing pathogen infection in vivo[J]. Infect Immun,2006,74(11):6075-6084.
- [13] Altunbulakli C, Costa R, Lan F, et al. *Staphylococcus aureus* enhances the tight junction barrier integrity in healthy nasal tissue, but not in nasal polyps[J]. J Allergy Clin Immunol,2018,142(2):665-668.
- [14] Viswanathan VK, Koutsouris A, Lukic S, et al. Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function[J]. Infect Immun,2004,72(6):3218-3227.
- [15] Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells[J]. Cell Microbiol,2004,6(8):783-793.
- [16] Boyle EC, Brown NF, Finlay BB. Salmonella enterica serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function[J]. Cell Microbiol,2006,8(12):1946-1957.
- [17] Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, et al. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA[J]. Science,2003,300(5624):1430-1434.
- [18] Bäsler K, Galliano MF, Bergmann S, et al. B iphasic influence of *Staphylococcus aureus* on human epidermal tight junctions[J]. Ann N Y Acad Sci,2017,1405(1):53-70.
- [19] Kim S, Kim HE, Kang B, et al. Lipoteichoic Acid isolated from *Staphylococcus aureus* induces both epithelial-mesenchymal transition and wound healing in HaCaT cells[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017,27(10):1820-1826.
- [20] Bäsler K, Brandner JM. Tight junctions in skin inflammation[J]. Pflugers Arch,2017,469(1):3-14.
- [21] Guttman JA, Finlay BB. Tight junctions as targets of infectious agents[J]. Biochim Biophys Acta,2009,1788(4):832-841.
- [22] Testoni F, Montanaro L, Poggi A, et al. Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesin gene pattern[J]. Int J Artif Organs,2011,34(9):789-798.
- [23] Fowler T, Wann ER, Joh D, et al. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins[J]. Eur J Cell Biol,2000,79(10):672-679.
- [24] Casillas-Ituarte NN, Cruz CHB, Lins RD, et al. Amino acid polymorphisms in the fibronectin-binding repeats of fibronectin-binding protein A affect bond strength and fibronectin conformation[J]. J Biol Chem,2017,292(21):8797-8810.
- [25] Almeida JF, Breyner NM, Mahi M, et al. Expression of fibronectin binding protein A (FnBPA) from *Staphylococcus aureus* at the cell surface of *Lactococcus lactis* improves its immunomodulatory properties when used as protein delivery vector [J]. Vaccine,2016,34(10):1312-1318.

(收稿日期: 2019-10-29)

(本文编辑: 孙荣华)

冯洒然, 李德志, 林殿杰, 等. 金黄色葡萄球菌和纤维连接蛋白结合蛋白A对血管内皮细胞紧密连接的破坏作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020,14(5):411-417.