

慢性鼻-鼻窦炎患者鼻分泌物中金黄色葡萄球菌毒力基因的分析

刘洋¹ 罗庆² 范立² 汤燕琴² 陈潜² 张志远²

[摘要] 目的:比较慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(CRSwNP)及慢性鼻-鼻窦炎不伴鼻息肉(CRSsNP)患者鼻腔金黄色葡萄球菌携带毒力基因的差异,探索不同毒力因子与鼻窦炎、鼻息肉发病之间的关系。方法:以 71 例 CRS 患者为实验组(CRSwNP 患者 33 例,CRSsNP 患者 38 例),同期 103 例非 CRS 者为对照组。采用 PCR 方法对从鼻腔内分泌物中分离鉴定的 41 株金葡菌所携带的 17 种毒力基因进行检测。结果:①实验组 *seb* 检出率明显高于对照组($\chi^2=5.864, P<0.05$);CRSwNP 组中 *seb* 检出率高于 CRSsNP 组($P<0.05$);其余 5 种肠毒素基因实验组与对照组比较均差异无统计学意义($P>0.05$);②金葡菌黏附素在实验组及对照组中均有检出,且检出率都较高,比较实验组和对照组检出率时,差异无统计学意义($P>0.05$);③编码溶血素的 HL α 、HL β 基因在实验组和对照组中检出率都较高,且这两种基因在实验组与对照组中比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:携带有肠毒素基因的金葡菌更易引起 CRS,且可能携带肠毒素种类越多的菌株感染与鼻息肉的发病关系越大。

[关键词] 鼻窦炎;金黄色葡萄球菌;毒力基因

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.18.004

[中图分类号] R765.4 [文献标志码] A

Analysis of virulence genes of *Staphylococcus aureus* in nasal secretions of patients with chronic rhinosinuitis

LIU Yang¹ LUO Qing² FAN Li² TANG Yanqin² CHEN Qian² ZHANG Zhiyuan²

(¹Department of ENT and Stomatology, First People's Hospital of Fuzhou, Fuzhou, 344000, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University)

Corresponding author: ZHANG Zhiyuan, E-mail: zzyent@126.com

Abstract Objective: To investigate the differences of virulence genes of *Staphylococcus aureus* in patients with chronic sinusitis with nasal polyps (CRSwNP) and chronic sinusitis without nasal polyps (CRSsNP), and to explore the relationship between different virulence factors and the incidence of sinusitis and nasal polyps. **Method:** The PCR method was used to detect 17 kinds of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal secretions of 41 strains. **Result:** ①The detection rate of SEB in the experimental group was significantly higher than that in the control group, the detection rate of SEB in the CRSwNP group was higher than that in the CRSsNP group, and the other 5 kinds of enterotoxin genes were not statistically significant between the experimental group and the control group; ②Staphylococcus aureus adhesin in the experimental group and the control group were detected, and the detection rate was relative higher in both control and experimental groups. However, the detection rate were not statistically significant between the experimental group and the control group; ③The detection rate of HL α and HL β genes encoding hemolysin was higher in the experimental group and the control group, and there was no significant difference between the 2 groups in the experimental group and the control group. **Conclusion:** *Staphylococcus aureus* carrying enterotoxin gene was more likely to cause CRS. The greater the incidence of nasal polyps was found in patients infected by *Staphylococcus aureus* carrying more enterotoxin gene.

Key words sinusitis; *Staphylococcus aureus*; virulence gene

金黄色葡萄球菌(金葡菌)广泛存在于自然界和人体的皮肤、鼻腔等部位,是一种毒力很强的革兰阳性球菌,可引起如皮肤软组织感染、中毒性休克综合征、败血症、心内膜炎等疾病。国内外学者比较慢性鼻-鼻窦炎(chronic rhinosinuitis, CRS)患者与健康对照者细菌学特点时,发现在 CRS 患者中金葡菌丰

度较健康对照者明显增高,因而认为金葡菌为鼻腔内常见感染细菌之一^[1-3]。金葡菌的致病力强弱主要取决于产生的毒力因子,主要有肠毒素(SAEs)、毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、溶血素、杀白细胞素(PVL)及黏附素等。Bachert 等^[4]提出 SAEs 可作为超抗原诱导鼻息肉的发生;SAEs^[5-7]还可以作为普通毒素,降低鼻腔纤毛活性,影响黏液纤毛清除功能,从而引发 CRS;有学者发现溶血素也可降低鼻腔纤毛活性,从而提高罹患 CRS 可能性^[8]。本研究采

¹抚州市第一人民医院耳鼻咽喉口腔科(江西抚州,344000)

²南昌大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:张志远, E-mail: zzyent@126.com

用 PCR 方法,对从慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(CRSw-NP)及慢性鼻-鼻窦炎不伴鼻息肉(CRSsNP)患者鼻腔分离的金葡萄菌所携带的 17 种毒力基因进行检测,探索不同毒力因子与鼻窦炎、鼻息肉发病之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2015-05—2016-05 期间在我院手术治疗的 CRS 患者 71 例(实验组),其中 CRSwNP 者 33 例,CRSsNP 者 38 例;年龄 15~73 岁,平均 42.6 岁;病程 3 个月~38 年,平均 16.2 个月,均符合慢性鼻-鼻窦炎诊断标准^[9]。同期 103 例非 CRS 者(鼻内镜及鼻窦 CT 检查均未见异常;无慢性鼻窦

炎、鼻息肉病史;排除免疫缺陷性疾病、慢性肉芽肿病、囊性纤维化病、糖尿病、先天和后天性支气管扩张及鼻-鼻窦真菌病)作为对照组。全部受检者 4 周内无局部或全身急性炎症感染,取样前 4 周内局部或全身未使用过抗生素和类固醇激素等药物。

1.2 主要试剂和仪器

溶菌酶 K, Taq PCR Master MIX, DNA Marker, VITEK 2 全自动微生物鉴定分析系统, ABI Veriti PCR 仪, DYY-6C 型电泳仪, Bio-Rad 凝胶成像分析仪等。

1.3 研究方法

1.3.1 引物设计与合成 见表 1。根据 GenBank 公布的肠毒素基因序列,用 PrimerPremier 5.0 软件设

表 1 金黄色葡萄球菌基因引物序列

目的基因	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
sea	F:TGCAGGGAACAGCTTTAGGC R:GTGTACCACCCGCACATTGA	249
seb	F:ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA R:ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	405
sec	F:TACGCCAGATGAGTTGCACA R:CCCATTATCAAAGTGGTTTCCTTCA	361
sed	F:GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG R:GCTGTATTTTTCTCCGAGAGT	493
see	F:TCAATGTGCTGGAGGCACACC R:GCCTCTTTGCACCTTACCGCCA	265
tsst-1	F:ATCGTAAGCCCTTTGTTG R:GTGGATCCGTCATTCATTG	578
HL α	F:CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R:CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	210
HL β ^[10]	F:GTGCACTTACTGACAAATAGTGC R:GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	310
pvl ^[11]	F:ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R:GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433
fnbpA	F:GCAGCCAAGAACGGTATCAG R:TAGCCATTACGACAGAGCCA	335
fnbpB ^[12]	F:CTTTACCTTGTTCCACTGGTTTAGAAG R:GGGAGTAACAGCTAATGGTCG	1679
cna ^[13]	F:TTCACAAGCTTGGTATCAAGAGCATGG R:GAGTGCCTTCCCAAACCTTTTGAGC	452
clfA	F:ATTGGCGTGGCTTCAGTGCTTG R:GCTTGATTGAGTTGTTGCCGGTGT	357
clfB	F:TGGCGGCAAATTTTACAGTGACAGA R:AGAAATGTTTCGCGCCATTTGGTTT	404
sdrC	F:CCGATGGTGGCGAAGTTGAT R:AGCCGGAGTATGTTTACCTGC	611
sdrD	F:GGAAATAAAGTTGAAGTTTC R:ACTTTGTCATCAACTGTAAT	500
sdrE ^[14]	F:CAGTAAATGTGTCAAAAAGA R:TTGACTACCAGCTATATC	767

计 sea、seb、sec、sed、see、tsst-1 引物,参照文献获得 HL α 、HL β 、pvl、fnbpA、fnbpB、clfA、clfB、cna、sdrC、sdrD、sdrE 引物,由上海生工生物工程公司合成。

1.3.2 提取 DNA 将自中鼻道分泌物中经分离鉴定的金葡菌菌株采用酶解法提取 DNA。

1.3.3 PCR 扩增体系及反应条件 PCR 扩增体系 (25 μ l):前引物 0.5 μ l,后引物 0.5 μ l,Mix 12.5 μ l,DNA 3 μ l,双蒸水 8.5 μ l。扩增反应条件:①肠毒素基因:94 $^{\circ}$ C 5 min,30 \times (94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s),72 $^{\circ}$ C 8 min;②HL α 、HL β 、pvl:94 $^{\circ}$ C 5 min,30 \times (94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s),72 $^{\circ}$ C 8 min;③fnbpA、fnbpB:94 $^{\circ}$ C 5 min,30 \times (94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 90 s),72 $^{\circ}$ C 8 min;④黏附素基因:94 $^{\circ}$ C 5 min,30 \times (94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 60 s),72 $^{\circ}$ C 8 min。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增结束后,取 7.5 μ l 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,110V 电压下 30 min。电泳完成后在凝胶成像系统中成像,观察 PCR 扩增结果。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

对于 SAEs 基因,在实验组中检出率依次为 seb(55.17%),sea(27.59%),sec、tsst-1(20.69%),sed(13.79%);在对照组中,仅检出 sea、seb 这两种基因,且检出率不高,只有 8.33%,41 株金葡菌均未检出 see 基因。6 种 SAEs 基因,仅 seb 基因在实验组与对照组中比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.864, P < 0.05$),且实验组 seb 检出率高于对照组,进一步比较 CRSwNP 组与 CRSsNP 组的 seb 检出率时,发现 CRSwNP 组中 seb 检出率高于 CRSsNP 组($P < 0.05$),提示 seb 可能与鼻息肉发生有关。

本实验检测了 8 种常见的编码黏附素基因,在实验组及对照组中均有检出,且检出率都较高,实验组中,除了 fnbpB、cna 基因外,余下 6 种基因检出率在 80% 以上,特别是 fnbpA、clfA,检出率达 100%;对照组中,检出率相对较低的有 cna(33.33%)、fnbpB(50.00%)、clfB(66.67%),余下基因检出率均在 80% 以上。比较实验组和对照组检出率,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

编码溶血素的 HL α 、HL β 基因在实验组和对照组中检出率都较高,特别是 HL α 基因,41 株金葡菌中全部检出携带有该基因,这两种基因在实验组与对照组中比较均差异无统计学意义($P > 0.05$);编码杀白细胞素的 pvl 基因检出率很低,仅在 CRSwNP 组中检出 1 例。具体不同分组毒力基因分布见表 2,部分基因电泳图见图 1~3。

表 2 毒力基因分布

毒力基因	实验组(阳性株数)			对照组	P
	CRSwNP 组	CRSsNP 组	合计		
sea	6	2	8	1	0.347
seb	12	4	16	1	0.015
sec	5	1	6	0	0.223
sed	4	0	4	0	0.438
see	0	0	0	0	—
tsst-1	3	3	6	0	0.223
HL α	15	14	29	12	1.000
HL β	13	11	24	9	0.891
pvl	1	0	1	0	1.000
fnbpA	15	14	29	12	1.000
fnbpB	10	8	18	6	0.715
cna	9	9	18	4	0.168
clfA	15	14	29	12	1.000
clfB	15	12	27	10	0.703
sdrC	15	13	28	12	1.000
sdrD	11	13	24	11	0.804
sdrE	12	12	24	10	1.000

3 讨论

金葡菌的致病力强弱主要取决于产生多种毒力因子,其中分泌的 SAEs 既可作为超抗原,又可以作为普通毒素,导致多种慢性气道炎性疾病^[15]。然而金葡菌表达 SAEs 能力与鼻腔微环境及鼻腔内菌量有关^[16]。本研究中对比较实验组与对照组毒力基因检出率时,仅 seb 基因差异有统计学意义,进一步比较 CRSwNP 组与 CRSsNP 组的 seb 检出率时,发现 CRSwNP 组中 seb 检出率高于 CRSsNP 组,此结果与缪建良等^[17]研究 CRSsNP 和 CRSwNP 患者血清 SEB 特异性 IgE 较对照组均有明显增高,差异有统计学意义,而血清 SEA 和 SEC 特异性 IgE 未见明显升高的结果相符,由此推测,SEB 可能在鼻窦炎、鼻息肉发病过程中起一定作用。余下 5 种 SAEs,除了 see 没有检出外,其余在实验组中均有检出,但在实验组与对照组中比较差异均无统计学意义。Heymans 等^[18]和申迹等^[19]在检测 CRS 和健康者鼻腔分离菌株 SAEs 基因时,发现除了 seq 基因外,其余 SAEs 在鼻窦炎组与对照组差异均无统计学意义,而 el-Fiky 等^[20]在类似研究中发现,鼻窦炎组 tsst-1 基因检出率比对照组高,且 CRSwNP 组 tsst-1 检出率也高于 CRSsNP 组。虽然本研究中除了 seb 外,其余 SAEs 在实验组与对照组中差异均无统计学意义,但不能认为 SAEs 在鼻窦炎、鼻息肉发病过程中没有作用,卫红齐等^[7]将不同浓度 SEA 注射至兔上颌窦腔内,发现低浓度 SEA 可引起鼻窦黏膜变应性炎症反应,在高浓度时,可引起纤毛丢失及上皮脱落;Bachert 等^[21]在鼻息肉黏膜中发现有多种 SAEs 特

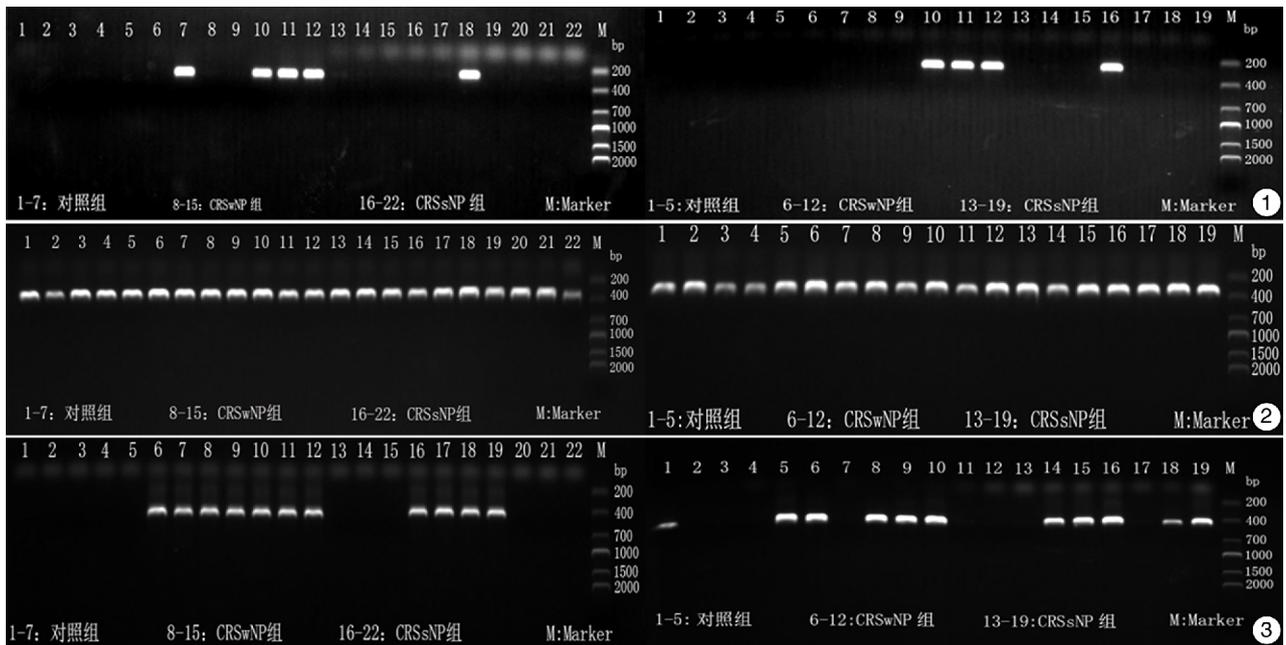


图 1 sea 基因电泳图； 图 2 clfA 基因电泳图； 图 3 cna 基因电泳图

异性 IgE 抗体,进一步用抗 SAEs-IgE 抗体对鼻息肉患者皮下注射治疗,有显著效果。

携带 PLV 基因的金葡萄菌大多与皮肤及软组织感染有关,也可导致坏死性皮肤损伤及坏死性肺炎等,在本研究中仅 CRSwNP 组中检出 1 株携带 PLV 基因菌株,与 Thunberg^[22]和 Heymans^[18]等结果类似,推测可能金葡萄菌分泌的 PVL 对鼻窦炎、鼻息肉发病的作用较小。编码溶血素的 HL α 、HL β 基因在实验组和对照组中检出率都较高,意味着绝大部分金葡萄菌菌株都携带这两种基因,Yun 等^[8]在用 HL α 毒素处理离体鼻腔黏膜时,发现 HL α 毒素可降低纤毛活性, Kim 等^[23]用 HL β 毒素进行类似研究也发现,HL β 毒素可损害纤毛功能;HL α 毒素还参与金葡萄菌生物膜的形成^[24]。感染的产生离不开细菌定植,而缺失黏附能力的细菌会被鼻腔黏液纤毛清除系统清除,从而失去侵入宿主组织的机会,这也能解释本研究中实验组及对照组分离株中,编码黏附素基因检出率非常高。Cna^[25]及 SdrE^[26]对于金葡萄菌的免疫逃避有一定作用,FnBPs^[27]、ClfB^[28]和 ClfA 等参与生物膜形成。鉴于黏附素在金葡萄菌定植及感染方面的作用,有学者就发现重组的黏附素可作为抗金葡萄菌感染疫苗的潜在抗原,并且发现多种表面锚定蛋白组合疫苗比单一蛋白疫苗在抗细菌黏附、诱导抗体产生和免疫保护方面具有优势^[29],虽然还只是动物实验阶段,但为预防和治疗金葡萄菌的感染提供了很好的思路,也为 CRS 的治疗多了一个选择方案。

本研究检测的是金葡萄菌毒力基因而非毒素蛋白本身,因而可在此研究基础上继续分析 CRSwNP 和 CRSsNP 患者鼻腔金葡萄菌实际表达的毒素

蛋白质谱;亦可进一步行动物实验,将一种或数种毒力因子注射到小鼠鼻腔,看其是否可诱导 CRS 或鼻息肉及比较其诱导能力,如能证实金葡萄菌毒力因子确实是鼻窦炎病因,将为鼻窦炎、鼻息肉的治疗提供更多方向。

参考文献

- [1] 李军,吴彦桥,李晓明,等.慢性鼻-鼻窦炎伴或不伴鼻息肉患者细菌培养及药敏试验分析[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,30(2):115-118.
- [2] FEAZEL L M, ROBERTSON C E, RAMAKRISHNAN V R, et al. Microbiome complexity and Staphylococcus aureus in chronic rhinosinusitis[J]. Laryngoscope,2012,122:467-472.
- [3] SAM B, ANDREW F, EDWARD C, et al. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection[J]. BMC Infect Dis, 2013,13:210-210.
- [4] BACHERT C, GEVAERT P G, JOHANSSON S, et al. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol,2001,107:607-614.
- [5] 于睿莉,朱冬冬,董震,等.金黄色葡萄球菌肠毒素 B 对人鼻黏膜上皮细胞的促炎作用[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,42(3):202-206.
- [6] MIN Y G, OH S J, WON T B, et al. Effects of staphylococcal enterotoxin on ciliary activity and histology of the sinus mucosa [J]. Acta Otolaryngol, 2006,126:941-947.
- [7] 卫红齐,朱政文,曹忠胜,等.金黄色葡萄球菌肠毒素对兔上颌窦黏膜上皮超微结构及炎症反应的影响[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,49(12):1006-1012.
- [8] YUN Y S, MIN Y G, RHEE C S, et al. Effects of al-

- pha-toxin of *Staphylococcus aureus* on the ciliary activity and ultrastructure of human nasal ciliated epithelial cells[J]. *Laryngoscope*, 1999, 109: 2021–2024.
- [9] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组. 慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南(2012年,昆明)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 48(2): 92–94.
- [10] JARRAUD S, MOUGEL C, THIOULOUSE J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (Alleles), and human disease[J]. *Infect Immun*, 2002, 70: 631–641.
- [11] LINA G, PIÉMONT Y, GODAIL-GAMOT F, et al. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia[J]. *Clin Infect Dis*, 1999, 29: 1128–1132.
- [12] XIONG Y Q, SHARMA-KUINKEL B K, CASILLAS-ITUARTE N N, et al. Endovascular infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are linked to clonal complex-specific alterations in binding and invasion domains of fibronectin-binding protein A as well as the occurrence of fnbB[J]. *Infect Immun*, 2015, 83: 4772–4780.
- [13] NASHEV D, TOSHKOVA K, SALASIA S I O, et al. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 233: 45–52.
- [14] PEACOCK S J, MOORE C E, JUSTICE A, et al. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *staphylococcus aureus*[J]. *Infect Immun*, 2002, 70: 4987–4996.
- [15] BACHERT C, GEVAERT P, ZHANG N, et al. Role of staphylococcal superantigens in airway disease[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 93: 304–314.
- [16] SIVARAMAN K, VENKATARAMAN N, COLE A M. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors[J]. *Future Microbiol*, 2009, 4: 999–999.
- [17] 缪建良,朱鲁平,陆汉强,等.慢性鼻窦炎鼻息肉患者血清金黄色葡萄球菌肠毒素 IgE 抗体检测[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2010, 18(6): 355–357.
- [18] HEYMANS F, FISCHER A, STOW N W, et al. Screening for staphylococcal superantigen genes shows no correlation with the presence or the severity of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis[J]. *PLoS One*, 2010, 5: e9525–e9525.
- [19] 申迹,项锦银,寇巍,等.慢性鼻-鼻窦炎中金黄色葡萄球菌肠毒素基因研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(30): 3134–3137.
- [20] EL-FIKY L M, KHAMIS N, MOSTAFA BEL D, et al. Staphylococcal infection and toxin production in chronic rhinosinusitis[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2009, 23: 264–267.
- [21] BACHERT C, ZHANG N. Chronic rhinosinusitis and asthma: novel understanding of the role of IgE 'above atopy'[J]. *J Int Med*, 2012, 272: 133–143.
- [22] THUNBERG U, HUGOSSON S, MONECKE S, et al. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with chronic rhinosinusitis [J]. *APMIS*, 2015, 123: 37–44.
- [23] KIM C S, JEON S Y, MIN Y G, et al. Effects of β toxin of *Staphylococcus aureus* on ciliary activity of nasal epithelial cells [J]. *Laryngoscope*, 2000, 110: 2085–2085.
- [24] CAIAZZA N C, O'TOOLE G A. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus* [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185: 3214–3217.
- [25] KANG M, KO Y P, LIANG X, et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 20520–20531.
- [26] SHARP J A, ECHAGUE C G, HAIR P S, et al. *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e38407–e38407.
- [27] O'NEILL E, POZZI C, HOUSTON P, et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190: 3835–3850.
- [28] ABRAHAM N M, JEFFERSON K K. *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium [J]. *Microbiology*, 2012, 158: 1504–1512.
- [29] MIDDLETON J R. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development [J]. *Vaccine*, 2008, 7: 805–815.

(收稿日期:2017-05-21)