

粪肠球菌生物膜细胞外聚合物的研究进展

黎卫兰综述 徐琼审校

(中山大学光华口腔医学院·口腔医学研究所 广州 510055)

[摘要] 粪肠球菌是根管治疗后再感染的主要致病菌,常以生物膜的形式存在。包绕在细菌周围或黏附在细菌表面的糖类、核酸和分泌蛋白对粪肠球菌的初始黏附、生物膜空间结构和细菌间信息交流等起重要的作用。本文就粪肠球菌生物膜及其细胞外聚合物组分和去除方法作一综述。

[关键词] 粪肠球菌; 生物膜; 细胞外聚合物

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.04.016

Research progress on extracellular matrix in *Enterococcus faecalis* biofilm Li Weilan, Xu Qiong. (Research Institute of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] *Enterococcus faecalis* is a predominant organism that plays a major role in the etiology of persistent periradicular lesions after root canal treatment by forming biofilms. The matrix, which holds bacterial biofilms together, is a complex mixture of macromolecules including expolysaccharides, nucleic acid and protein. Extracellular matrix contributes significantly to bacterial adhesion, biofilm structure and information exchanging between bacteria. This review mainly focused on the biofilm structure, extracellular matrix and ways to eliminate the *Enterococcus faecalis* biofilm.

[Key words] *Enterococcus faecalis*; biofilm; extracellular matrix

长期残留在根管内的细菌引发的感染,是根管治疗术失败的主要原因。粪肠球菌因其在根管治疗后再感染的根管内的检出率较高,被认为是顽固性、继发性根管内感染的主要致病菌^[1]。粪肠球菌在根管内主要以生物膜的形成存在,生物膜细胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)对粪肠球菌有保护作用。粪肠球菌 EPS 由多糖、核酸、蛋白质和磷脂等有机物组成,在细菌黏附聚集、空间构型、细菌间信息交流、耐药性和免疫逃避等方面起重要的作用。

1 粪肠球菌生物膜

根管生物膜是由根管内浮游细菌借助菌毛和 EPS 黏附、聚集于牙本质上或浸入牙本质小管深部形成的含丰富管道系统的生态群落。生物膜的形成可大致分为浮游细菌黏附、细菌繁殖和细胞外基质产生、生物膜成熟并形成三维结构、生物

膜分散等阶段。粪肠球菌具有形成生物膜能力强,生物膜成熟时间短的特点。Kishen等^[2]通过扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜发现,粪肠球菌可定植于经体积分数 5.25%的次氯酸钠消毒 1 周后的根管牙本质表面,并分泌网格状基质,2 周后可生成蘑菇样生物膜结构,粪肠球菌表面及其周围附着大量的纤维束状细胞外基质,水道、孔隙穿通其间。在营养受限的根管中,粪肠球菌生物膜具有钙化的特点。George等^[3]通过测定生物膜各时期的钙磷比发现,营养匮乏组粪肠球菌生物膜钙磷比增加,故推测在根管充填情况下,粪肠球菌生物膜可在牙本质表面诱导羟磷灰石再沉积,形成近似钙化的生物膜,有利于其在再感染中持续存在。

2 粪肠球菌的细胞外聚合物组分

检测 EPS 的方法有微观结构观察和组分分析。研究生物膜及其 EPS 的分布和空间构型的方法有扫描电镜、傅里叶红外光谱仪和激光共聚焦显微镜观察等,分析 EPS 组分的方法主要有高效液相层析法、磁共振分析、拉曼光谱分析和紫外分光光度法^[4]。

[收稿日期] 2010-11-18; [修回日期] 2011-04-11

[基金项目] 广东省科技计划基金资助项目(2009B030801115, 2010B050700007)

[作者简介] 黎卫兰(1984—),女,湖南人,硕士

[通讯作者] 徐琼, Tel: 020-83870405

2.1 细胞外多糖

粪肠球菌产生的多糖分为 3 类^[5]：第 1 类是葡聚糖，由 α -1,6-糖苷键连接的葡萄糖组成，因糖苷键的存在，易与细胞外蛋白质结合而形成大相对分子质量的聚合物；第 2 类是磷壁酸，由双糖组成，主要来自细胞壁裂解；第 3 类是杂聚糖，又名鼠李聚糖，由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖胺和葡萄糖胺等单糖组成，其中甘露糖胺和葡萄糖胺均含有 N-乙酰残基。粪肠球菌的杂聚糖 α 皆由上述 5 种单糖组成，但因单糖顺序和连接位点的不同，杂聚糖在不同菌株中的结构具有高度多样化的特征。

细胞外多糖能促进细菌间的黏附，为生物膜形成所必需。粪肠球菌黏多糖的产生与细菌生物膜的形成能力直接相关。定量黏附测试^[6]显示，只有能产生黏多糖的粪肠球菌才能形成生物膜。Theilacker 等^[7]通过构建生物膜相关糖脂合成基因 *bgsA* 突变株和 *bgsA* 过度表达株发现，粪肠球菌产生的糖脂参与生物膜聚集，细胞外多糖的产生对生物膜细菌具有保护作用。一方面，生物膜菌株分泌的大量水不溶性多糖构成生物膜细菌生长的外环境，有利于生物膜抵抗抗生素和冲洗液的渗透以及特异性抗体、自然杀伤细胞和吞噬细胞等对细菌的免疫清除作用。研究^[8]显示，氨基葡聚糖有利于粪肠球菌躲避小鼠腹部巨噬细胞的吞噬，即细胞外多糖的屏蔽作用能阻碍机体的免疫防御。另一方面，细胞外多糖的多孔网状结构有利于细菌捕获周围营养，保证细菌饥饿状态下的新陈代谢。Portenier 等^[9]通过透射电镜发现，饥饿期粪肠球菌产生了丰富的酸性细胞外多糖，这种多糖能被钉红染色而不能被单宁酸染色，且与霍乱弧菌饥饿条件下产生大量被铁蛋白染色的细胞外多糖相似。这说明细胞外多糖的产生是细菌适应不利条件的一种反射，保障其饥饿条件下营养的供给。

2.2 细胞外核酸

细胞外核酸有细胞外 DNA 和细胞外 RNA 两种，细菌生物膜细胞外核酸主要用于研究细胞外 DNA。细胞外 DNA 是细胞外基质的重要组分，对生物膜的三维结构起支撑作用，有利于生物膜的形成和生物膜特殊耐药性的产生。有关铜绿假单胞菌生物膜的研究^[10]显示，细胞外 DNA 成分是其生物膜形成所必需。在 DNase 存在时，生物膜细菌数量明显减少，但随生物膜的成熟，DNase

对生物膜的干扰逐渐削弱，即成熟生物膜有抵挡外部 DNA 酶的作用。这种情况也适合于粪肠球菌^[11]。细胞外 DNA 不仅参与生物膜的形成，而且能增强生物膜的耐药性。有研究^[12]显示，细胞外 DNA 通过螯合阳离子增加生物膜的耐药性。

关于生物膜细胞外 DNA 的来源，目前有 2 种解释。一种认为是细菌主动分泌的。对蜡样芽胞杆菌的研究^[13]提示，嘌呤合成缺陷株不影响细菌的正常生长繁殖，但无细胞外 DNA 的产生和生物膜的形成。不同的生长期，细胞外 DNA 的产量不同。处于指数生长期的浮游细菌产生大量的细胞外 DNA，处于静止期的蜡样芽胞杆菌并不释放细胞外 DNA。另一种观点认为，生物膜细胞外 DNA 来源于死亡菌体裂解的被动释放。这个过程由自溶素介导，参与生物膜的初期形成。Thomas 等^[14]将粪肠球菌生物膜细胞外 DNA 与细菌染色体 DNA 扩增并且经琼脂糖电泳发现，两者具有一致性。他们推测粪肠球菌生物膜细胞外 DNA 主要来源于细菌自溶。粪肠球菌自溶和细胞外 DNA 的释放由细菌分泌明胶酶 (gelatinase, Gel) 和丝氨酸蛋白酶 (serine protease, Spr) 共同调控：gel 缺陷菌株的浮游状态和生物膜状态都不能释放细胞外 DNA，生物膜形成量少、结构不完整；spr 缺陷菌株大量死亡，释放细胞外 DNA，细菌生物膜产量增加。这两种蛋白酶主要是通过控制自溶素 *atlA* 的合成来调控 DNA 释放的^[14]。

2.3 细胞外蛋白

有关粪肠球菌生物膜细胞外蛋白，研究较多的是 Gel。Gel 是粪肠球菌产生的一种含锌分泌型基质金属蛋白酶，可以水解明胶、胶原质、酪蛋白和纤维蛋白，gelE 是其编码基因。此基因与 Spr 编码基因 *sprE* 位于同一个操纵子，两者的表达由反馈移位寄存器 *fsr* 编码的二元组分密度感应系统调控^[15]。*fsr* 操纵子含 *fsrA*、*fsrB*、*fsrC* 和 *fsrD* 基因，*fsrD* 表达的一种名为 Gel 合成激活蛋白质 (gelatinase biosynthesis-activating pheromone, GB-AP) 的自诱导肽^[16]是含 11 个氨基残基的内酯环肽，当这种信号肽积累到一定量时，*fsr* 操纵子下游调控基因 *gelE*-*sprE* 被激活，分别表达 Gel 和 Spr 蛋白；*fsrB* 基因产物具有蛋白水解作用，能切开 *fsrD* 编码的肽内酯；*fsrA* 和 *fsrC* 编码 gel 和 spr 的反应调节器，*fsrC* 能感受细胞外组氨酸激酶的质量浓度，从而激活 *fsrA* 基因的表达。*fsr* 操纵子中任何一个基因突变都会导致粪肠球菌生物膜的形

成能力下降,即粪肠球菌生物膜的形成受到密度感应系统的调控。有关粪肠球菌 *gelE* 基因突变株的研究^[11-17]显示,在 *gelE* 插入失活或基因敲除的情况下,生物膜的形成明显减少,即 *gelE* 影响生物膜的形成。也有研究^[18]认为:*gelE* 基因突变株和野生株在粪肠球菌生物膜的生物量和厚度等方面没有显著差别,*gelE* 与生物膜的形成能力无相关性。

Gel 调控粪肠球菌生物膜形成的机制至今不明,但其促进生物膜形成与以下因素有关^[19]。首先,细菌黏附是生物膜形成的初始阶段,细菌表面的无极性疏水基团有利于细菌之间以及细菌与物面的附着。*Gel* 能切断细菌表面与疏水基团的连接键,使疏水基团外露,从而增强细菌的黏附能力。其次,生物膜的形成受密度感应系统的调控,*gelE* 是 *fsr* 密度感应系统的下位调节基因,具有调节细菌群体行为的作用。*gel* 与生物膜的毒力相关,突变或敲除 *gelE*,粪肠球菌生物膜毒力显著下降。

3 粪肠球菌生物膜的去除

3.1 常规临床控制措施

针对根管生物膜的去除,临床上主要采用根管预备和根管消毒手段。常用的根管消毒液有次氯酸钠、氯己定和乙二胺四乙酸,体积分数 5.25% 的次氯酸钠对粪肠球菌生物膜的清除最佳^[20]。近年来,光活化消毒和臭氧等新型根管消毒技术提高了粪肠球菌生物膜的清除率。

3.2 降解生物膜细胞外基质

粪肠球菌细胞外蛋白是生物膜密度感应系统的核心成分,以细菌密度感应为靶点的信号干扰是抑制生物膜形成和去除生物膜的新方法。在粪肠球菌 *fsr* 密度感应系统中,GBAP 起着关键作用,阻断 GBAP 的信号传导和抑制 GBAP 的生物合成,均能起到抑制生物膜形成的作用。Nakayama 等^[21]报道的一株放线菌属次级代谢产物 *siamycin*,在亚抑菌质量浓度时,可大大降低粪肠球菌 GBAP 和 *Gel* 的产量,可失活细菌自身产生的和外源性的 GBAP,使粪肠球菌不能启动密度感应系统,生物膜形成减少。其机制是,*siamycin* 阻断 GBAP 信号对 *gel* 和 *spr* 的反应调节器 *fsrA*-*fsrC* 双组分的激活作用,切断信号传导通路。近年来,Nakayama 等^[22]报道的另一种真菌代谢产物 *ambuic acid*,通过抑制 GBAP 的合成,可达到阻断粪肠球

菌密度感应系统的作用;但当加入外源性 GBAP,*fsr* 密度感应系统激活,生物膜形成能力恢复。

DNase、RNase 和多糖降解酶以及天然中草药如五倍子^[23],可协同抗生素控制生物膜。其中酶和天然药物能降解细胞外基质,有利于抗生素的渗入,增强生物膜对抗生素的敏感性,从而达到消除生物膜的作用。此类研究在金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌已经展开,但是对粪肠球菌研究较少^[11]。

4 小结

粪肠球菌 EPS 是生物膜的重要成分,在细菌的黏附聚集及其空间构型以及细菌间信息交流、耐药性和免疫逃避等方面起重要的作用。近年来,其研究已经取得一定的进展,但仍有待进一步探索,以提高根管生物膜的清除率和根管治疗的临床疗效。

5 参考文献

- [1] Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures[J]. J Endod, 2008, 34(11):1291-1301.
- [2] Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine *in vitro*[J]. J Biomed Mater Res A, 2006, 77(2):406-415.
- [3] George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*[J]. J Endod, 2005, 31(12):867-872.
- [4] 尹仕海,岳松龄.人牙菌斑细胞外多糖的含量及糖类对其合成的影响[J].华西口腔医学杂志,1986,4(4):260-264.
- [5] Hsu CT, Ganong AL, Reinap B, et al. Immunochemical characterization of polysaccharide antigens from six clinical strains of *Enterococci*[J]. BMC Microbiol, 2006, 6:62.
- [6] Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, et al. Receptor-mediated endocytosis of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* by rat peritoneal macrophages[J]. Indian J Med Res, 2004, 119(Suppl):131-135.
- [7] Theilacker C, Sanchez-Carballo P, Toma I, et al. Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*[J]. Mol Microbiol, 2009, 71(4):1055-1069.
- [8] Baldassarri L, Bertuccini L, Creti R, et al. Glycosaminoglycans mediate invasion and survival of *Enterococcus faecalis* into macrophages[J]. J Infect Dis, 2005, 191(8):1253-1262.

- [9] Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, et al. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments [J]. J Endod, 2005, 31(5) 380-386.
- [10] Whitchurch CB, Tølker-Nielsen T, Ragas PC, et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation [J]. Science, 2002, 295(5559) :1487.
- [11] Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, et al. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development[J]. J Bacteriol, 2008, 190(16) 5690-5698.
- [12] Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(11) e1000213.
- [13] Vilain S, Pretorius JM, Theron J, et al. DNA as an adhesin :*Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(9) 2861-2868.
- [14] Thomas VC, Hiromasa Y, Harms N, et al. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*[J]. Mol Microbiol, 2009, 72(4) :1022-1036.
- [15] Nakayama J, Chen S, Oyama N, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* fsr quorum-sensing system : The small open reading frame fsrD encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal agrd[J]. J Bacteriol, 2006, 188(23) 8321-8326.
- [16] Nishiguchi K, Nagata K, Tanokura M, et al. Structure-activity relationship of gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(2) 641-650.
- [17] Borgmann S, Niklas DM, Klare I, et al. Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit[J]. Int J Hyg Environ Health, 2004, 207(4) 386-389.
- [18] Baldassarri L, Creti R, Recchia S, et al. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices[J]. Int J Artif Organs, 2006, 29(4) 402-406.
- [19] Carniol K, Gilmore MS. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2004, 186(24) : 8161-8163.
- [20] Kishen A, Sum CP, Mathew S, et al. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin[J]. J Endod, 2008, 34(7) 850-854.
- [21] Nakayama J, Tanaka E, Kariyama R, et al. Siamycin attenuates fsr quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*[J]. J Bacteriol, 2007, 189(4) :1358-1365.
- [22] Nakayama J, Uemura Y, Nishiguchi K, et al. Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quorumones in gram-positive bacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2) 580-586.
- [23] 朱炳, 李继遥, 黄正蔚, 等. 五倍子与氯化钠对人工口腔生物膜细菌生长代谢的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(5) 367-369.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第425页)

- 号分化过程中破骨细胞分化因子和细胞间黏附分子-1的表达变化[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(3) 240-243.
- [16] Neutzsky-Wulff AV, Sims NA, Supancharit C, et al. Severe developmental bone phenotype in *Clc-7* deficient mice[J]. Dev Biol, 2010, 344(2) :1001-1010.
- [17] Zhao C, Irie N, Takada Y, et al. Bidirectional ephrinB₂-EphB₄ signaling controls bone homeostasis[J]. Cell Metab, 2006, 4(2) :111-121.
- [18] Matsuo K. Eph and ephrin interactions in bone[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 658 95-103.
- [19] Sims NA. Ephs and ephrins :Many pathways to regulate osteoblasts and osteoclasts[J]. IBMS BoneKEy, 2010, 7 : 304-313.
- [20] Crimeen-Irwina B, Quinn JM, Allana EH, et al. EphB₄ forward signalling in osteoblasts is triggered by soluble clustered ephrin-B₂ and blocked by specific peptide antagonists[J]. Bone, 2009, 44 S1331.
- [21] Martin TJ, Allan EH, Ho PW, et al. Communication between ephrinB₂ and EphB₄ within the osteoblast lineage [J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 658 51-60.
- [22] Allan EH, Häusler KD, Wei T, et al. EphrinB₂ regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(8) :1170-1181.
- [23] Sánchez-Sabaté E, Alvarez L, Gil-Garay E, et al. Identification of differentially expressed genes in trabecular bone from the iliac crest of osteoarthritic patients[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(8) :1106-1114.
- [24] Kwan Tat S, Pelletier JP, Amiable N, et al. Activation of the receptor EphB₄ by its specific ligand ephrin B₂ in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(12) 3820-3830.
- [25] Irie N, Takada Y, Watanabe Y, et al. Bidirectional signaling through ephrinA₂-EphA₂ enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(21) :14637-14644.

(本文编辑 汤亚玲)