

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.04.031

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190926.1515.006.html>(2019-09-27)

金黄色葡萄球菌在软组织创伤感染致病机制中的研究进展*

李瞳瞳¹综述,唐佩福²审校

(1.天津市天津医院骨科,天津 300211;2.中国人民解放军总医院骨科,北京 100853)

[摘要] 随着我国工业和交通业迅猛发展,急性开放性外伤合并感染的患者逐年增多。金黄色葡萄球菌是软组织创伤感染的首要病原菌,探讨其致病过程与免疫逃避及耐药的分子机制有助于寻找特异性干预手段,对临床治疗开放外伤合并难治性感染具有重要意义。本文简述了近年来金黄色葡萄球菌在软组织创伤感染致病机制中的研究进展,涵盖细菌从污染定植、分泌毒力因子到逃避免疫防御并形成生物膜,使感染迁延不愈的研究前沿,还特别介绍了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌致病的分子机制。

[关键词] 金黄色葡萄球菌;创伤感染;致病机制;毒力因子;免疫逃避

[中图分类号] R378.1+1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)04-0650-04

Research progress in the pathogenic mechanism of traumatic soft-tissue infection caused by *Staphylococcus aureus**

LI Tongtong¹, TANG Peifu²

(1. Department of Orthopedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 2. Department of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] With the rapid development of industry and transportation, more and more patients suffer from acute soft-tissue trauma with infection in recent years. *Staphylococcus aureus* is the most common pathogen of traumatic soft-tissue infection. Therefore, it has important significance in the study of pathogenic process and its molecular mechanism of immune evasion and drug resistance help for searching specific intervention means for treating soft-tissue trauma with refractory infection in clinic. This review focuses on the latest research progress in the pathogenic mechanism of traumatic soft-tissue infection caused by *Staphylococcus aureus*, including bacterial colonization, virulence factor secretion, immune evasion and biofilm formation, with particular emphasis on the molecular mechanism of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections.

[Key words] *staphylococcus aureus*; traumatic infection; pathogenic mechanism; virulence factor; immune evasion

金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*, SA)是最常见的人体致病菌之一,既可造成社区获得性感染,又能引起院内感染。作为一种革兰阳性球菌,它广泛存在于人的体表、上呼吸道尤其是鼻咽部,可引起皮肤软组织感染、局部脓肿、肺炎、骨髓炎甚至脑膜炎、败血症等危及生命的感染。随着我国工业和交通业迅猛发展,急性开放性外伤合并感染的患者逐年增多,而金黄色葡萄球菌是首要病原菌。现就金黄色葡萄球菌在软组织创伤感染致病机制中的研究进展综述如下。

1 概 述

多数情况下金黄色葡萄球菌以共生的状态定植于皮肤表面和鼻腔(主要是鼻前孔),并不引发感染。据估计,在美国约 20% 的成人前鼻孔内长期定植有金

黄色葡萄球菌,还有 30% 的人也会间歇性携带该菌,近年来的流行病学研究发现皮肤定植的细菌数量也相当大,儿童皮肤表面细菌培养的阳性检出率更高^[1]。感染是细菌与宿主相互作用的结果,金黄色葡萄球菌与免疫系统之间的平衡关系使细菌处于一种无症状的定植状态,不会出现侵袭性感染。然而当软组织创伤后,原有的平衡被打破,金黄色葡萄球菌不仅会定植在创面并破坏组织细胞,同时还会通过一系列对抗机体免疫反应的机制引发持续反复感染和慢性感染,造成创面迁延不愈。

2 细菌定植

黏附是细菌定植过程的第一步,也是感染的先决条件。黏附机制目前比较公认的是基于 DLVO 理论的解释,即二步黏附过程。开放性创伤为金黄色葡萄

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81472112)。

作者简介:李瞳瞳(1987—),医师,医学博士,主要从事骨及软组织创伤的研究。

球菌接触创面组织提供了机会,当二者间范德华吸引力与静电排斥力达到平衡时即发生贴附,为可逆性黏附;随后细菌的表面分子与创面组织接触,形成较为牢固的分子桥连而定植,此时黏附过程已不可逆转。

金黄色葡萄球菌表面有很多蛋白和非蛋白质性质的分子介导该不可逆黏附。蛋白质分子包括以共价键方式连接的 MSCRAMM 家族(如纤连蛋白结合蛋白 FnBPA/B、纤维蛋白原结合蛋白 ClfA/B、Sdr 蛋白家族、蛋白 A、铁离子调节表面蛋白、金黄色葡萄球菌表面蛋白等)和以离子键或疏水作用等非共价键方式连接的自溶素、SERAM 家族、跨膜蛋白等;非蛋白质分子主要包括胞间多糖黏附素、细胞壁磷壁酸(WTA)和脂磷壁酸等^[2]。其中尤以 MSCRAMM 家族的分子最受关注,例如 FnBP,研究发现该分子缺失的菌株定植能力显著下降,引起机体炎性反应也较轻,血浆 IL-6 水平和细胞 NF- κ B 激活处于较低水平,提示 FnBP 是金黄色葡萄球菌致病力的关键分子^[3]。小鼠创面感染模型证实,用 FnBP 和 ClfA 的关键结构域重组蛋白免疫动物后,创面定植的细菌数量明显减少、愈合速度加快^[4-5]。WTA 在金黄色葡萄球菌感染的初始定植阶段发挥着重要作用。近年来在小鼠皮肤脓肿模型中证实,CA-MRSA 的致病力与 WTA 直接相关^[6]。

金黄色葡萄球菌通过各种黏附分子既可以直接定植在组织细胞表面(如上皮细胞和内皮细胞),也可以牢固结合血浆蛋白及多种细胞外基质成分(如纤连蛋白、纤维蛋白原、玻连蛋白、骨唾液蛋白、弹性蛋白、胶原等)。金黄色葡萄球菌的黏附与定植通常在 15 min 至 1.5 h 内即可完成,如条件适宜细菌很快进入增殖阶段并聚集形成菌落簇^[1]。

3 细菌毒力

金黄色葡萄球菌可分泌 20 余种毒力因子,既包括破坏组织细胞的细菌外毒素,也包括入侵免疫系统的多种毒性蛋白,如溶血素、酚溶性调控蛋白、肠毒素、杀白细胞素、中毒性休克综合征毒素-1、凝固酶、表皮剥脱毒素、胞外细菌蛋白酶等。近年来,溶血素和酚溶性调控蛋白在金黄色葡萄球菌引起的软组织感染中的致病作用已得到学界公认。

溶血素是金黄色葡萄球菌分泌的重要毒力因子,是具有穿孔活性的强致病性毒素。根据抗原性不同,可分为 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种类型,其中 α 毒素(α -toxin)在软组织感染中最为重要也最受关注。 α 毒素是由 hla 基因编码的一种不耐热蛋白质,相对分子质量约 33.2×10^3 ,其单体可结合于宿主细胞膜上的解整联蛋白和金属蛋白酶 10,并进行装配成为七聚体在细胞膜疏水区形成跨膜微孔道,使细胞内外离子平衡受到破坏,最终裂解细胞^[7]。 α 毒素对多种细胞均有裂解作用,如红细胞、人角化细胞、上皮细胞、淋巴细胞、血小板等;也会造成小血管平滑肌痉挛,导致局部血流阻滞及缺血坏死;还可诱导促炎介质和细胞因子释放和细

胞凋亡。 α 毒素在金黄色葡萄球菌造成的软组织感染过程中是极为重要的毒力因子,是造成组织坏死的主要原因。当 hla 基因突变或缺陷导致细菌无法正常表达 α 毒素时,金黄色葡萄球菌毒力显著下降,在小鼠软组织感染模型中甚至不会造成明显皮损,细菌数量也大幅减少^[8-9]。

酚溶性调控蛋白(phenol-soluble modulins, PSMs)是金黄色葡萄球菌另一个非常重要的毒素因子,分为 α 和 β 两型。与溶血素不同,酚溶性调控蛋白虽然也具有裂解细胞的能力,但并非特异性也不依赖于受体^[7]。体外研究证实,金黄色葡萄球菌被中性粒细胞吞噬后会分泌酚溶性调控蛋白裂解中性粒细胞,使细菌从中释放出来而存活^[10]。动物实验也证实了酚溶性调控蛋白在软组织感染中的作用,当 psmA 基因缺失,金黄色葡萄球菌形成皮肤脓肿的能力明显下降^[11]。

α 毒素和酚溶性调控蛋白是金黄色葡萄球菌感染软组织过程最关键的两个毒力因子,且广泛存在于几乎所有菌株中。此外,许多其他毒素和蛋白酶也参与了该致病过程,如 PVL、LukED、 γ 溶血素、凝固酶、vWbp、Ssp、ScpA 等^[12-13],但它们在感染过程中的作用还需要进一步研究。

4 抑制免疫防御

流行病学研究发现,金黄色葡萄球菌所致软组织感染的复发率较高,即使经过系统治疗仍有约 20% 的患者在 1 年内复发,个别情况下甚至超过 50%^[14]。这与该菌所具有的一系列免疫逃逸功能有关,可抑制免疫防御过程,不但能避免被机体清除,而且成为日后感染复发的根源。

固有免疫在机体清除细菌过程中起着重要作用,金黄色葡萄球菌显著抑制固有免疫功能。除了已经提到的 PSMs、杀白细胞素(如 PVL、Luk)和 γ 溶血素对吞噬细胞的破坏作用,金黄色葡萄球菌还通过超抗原样分子 SSLs、趋化抑制蛋白 CHIPS、甲酰基肽受体样抑制因子 FLIPr 等抑制中性粒细胞渗出和趋化过程;通过胶原黏附素、蛋白 A(SpA)、免疫球蛋白结合因子(Sbi)、细胞外黏附蛋白 Eap 等抑制补体激活和吞噬过程;亦可表达腺苷合成酶 AdsA、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶 KatG、金色类胡萝卜素、乳酸脱氢酶、Eap 类似物、硫化氢、 α 毒素等抑制免疫细胞对细菌的杀伤作用^[15-17]。尤其 AdsA 通过干扰腺苷和脱氧腺苷信号通路,不但抑制中性粒细胞氧化爆发过程、降低巨噬细胞与树突细胞的 MHC-II 和 IL-12 表达水平,而且能诱导巨噬细胞凋亡^[15,18-19]。近期研究还发现,Pmt 外排泵能使金黄色葡萄球菌获得对人体抗菌肽的抗性,从而逃避中性粒细胞的清除作用^[20]。

金黄色葡萄球菌对适应性免疫同样具有抑制作用。蛋白 A 可以结合并交联 VH3⁺ 细胞上的受体,促使 B 细胞凋亡、浆细胞发生体细胞高度突变和种类转换重组而非特异性激活,虽然也产生抗体但针对性

差,无法建立正常体液免疫;T 细胞超抗原 SA_g 可使抗原呈递细胞的 MHC-II 分子和辅助 T 细胞的 TCRs 之间发生交联,导致 T 细胞无效性成熟并大量分泌细胞因子(如 IL-2、IFN γ 、IL-1 β 、TNF),无法建立有效的细胞免疫^[15]。最近一项研究发现,金黄色葡萄球菌能通过 TarP 酶改变自身 WTA 的免疫原性,从而干扰机体免疫识别,逃避宿主免疫防御^[21]。

5 生物膜

金黄色葡萄球菌完成定植后不仅会分泌大量毒力因子,还会产生胞外聚合物将菌落包裹,并使内部细菌彼此粘连形成生物膜,临床约 60% 的慢性不愈合创面均与细菌生物膜有关。细菌形成生物膜十分迅速,金黄色葡萄球菌急性感染后 24 h 即可产生成熟生物膜结构。生物膜不仅使细菌牢固附着于创面组织,还可以保护细菌免受抗生素、消毒剂和免疫系统的攻击,导致感染持续时间延长、创面迁延不愈。

金黄色葡萄球菌生物膜的胞外聚合物主要由多糖间黏附素 PIA、胞外 DNA(eDNA)、蛋白和细胞碎片等构成,尤其 PIA 和 eDNA 是生物膜基质的主要成分。PIA 是由 D-葡萄糖胺通过 β -1,6 糖苷键相连接构成的多聚体,其合成主要受到 icaADBC 基因调控,在 PIA 依赖的生物膜形成途径中发挥极其重要的作用^[22]。eDNA(extracellular DNA)主要介导细菌黏附创面组织和生物膜结构的稳定性,金黄色葡萄球菌可通过自溶等多种途径释放 eDNA,当其释放和降解过程受到干预,则生物膜的成熟将受到影响。

生物膜不仅可以通过其中的细菌释放毒素直接损伤组织,也可以吸引白细胞渗出释放小分子杀菌物质或酶间接造成组织损伤,生物膜的存在本身也影响上皮爬行和愈合过程。研究表明,生物膜感染后会诱导产生 microRNA146 和 106,它们会抑制 ZO-1 和 ZO-2,进而影响皮肤紧密连接和屏障功能,以至于虽然皮肤可以愈合,但正常功能受损,容易出现感染或进一步的并发症^[23]。最近流行病学统计发现,软组织感染创面分离出的金黄色葡萄球菌都具有形成生物膜的特性,尤其是糖尿病患者创面内的菌株,提示生物膜形成与感染慢性化及再发关系密切^[24]。

6 耐药菌株

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是临床上引起严重感染的重要病原。自从 20 世纪 80 年代,MRSA 开始广泛流行,并不断出现新的菌株,从最早的只在院内传播影响易感染人群,发展到 20 世纪 90 年代后期出现社区相关感染(community-associated, CA)-MRSA 侵袭的部位中以皮肤和软组织最为常见。在美国,几乎所有 CA-MRSA 所造成的感染都源于 USA300 菌株,它也是美国急诊科所报道的皮肤软组织感染首要病菌^[8]。

MRSA 对多种抗生素具有抗性,主要源于它的 SCCmec 元件所携带的甲氧西林抗性基因,其中

mecA 基因可以表达青霉素结合蛋白 PBP2a,为 MRSA 耐 β -内酰胺类抗生素提供了替代性靶位蛋白^[25]。相比于 HA-MRSA,CA-MRSA 毒力也有所增强,一种解释为细胞裂解毒素破坏中性粒细胞使其免受机体清除,其中广受关注的就是 PVL(panton-valentine leukocidin),其编码基因位于可移动的基因元件上,可经过噬菌体溶源性转换或质粒介导等方式转入菌体并整合至其染色体上;另一种解释是 CA-MRSA 通过提高核心基因编码的毒素表达水平增加毒力,如 PSMs、 α 毒素等。最近一项针对 PVL 阴性的 CA-MRSA 菌株 ST72 的研究表明, α 毒素和毒力调控因子 Agr 在影响细菌毒力方面发挥主要作用,尤其前者在皮肤软组织感染过程中比 PSMs 更为重要^[8]。

7 小结与展望

软组织创伤使创面暴露开放,为细菌感染提供了机会。金黄色葡萄球菌不但能通过各种黏附分子牢固固定植到创面组织,而且能合成并释放一系列毒力因子造成靶细胞裂解、组织坏死,还能破坏宿主的固有免疫和适应性免疫反应逃逸机体的清除作用,并形成生物膜保护细菌免受抗生素、消毒剂和免疫系统的攻击,导致感染持续存在、创面迁延不愈,也为日后感染反复发作埋下隐患。尤其是近些年来,CA-MRSA 的广泛传播使软组织感染的形式更加复杂,耐药性和更强的毒力使其成为临床严重感染的重要病原。这需要广大医务工作者和科研人员对其进行更为深入的研究,以便进一步揭示感染机制,为临床预防和治疗软组织创伤感染提供理论支撑和指导。

参考文献

- [1] POPOV L, KOVALSKI J, GRANDI G, et al. Three-Dimensional Human Skin Models to Understand *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Infection[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 41.
- [2] SUN Y, EMOLO C, HOLTFRETER S, et al. Staphylococcal protein A contributes to persistent colonization of mice with *Staphylococcus aureus*[J]. *J Bacteriol*, 2018, 200(9): e00717-e00735.
- [3] SHINJI H, YOSIZAWA Y, TAJIMA A, et al. Role of Fibronectin-Binding proteins a and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *staphylococcus aureus* [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(6): 2215-2223.
- [4] SCHENNINGS T, FARNEBO F, SZEKELY L, et al. Protective immunization against *Staphylococcus aureus* infection in a novel experimental wound model in mice [J]. *APMIS*, 2012, 120(10): 786-793.

- [5] LI X, WANG X, THOMPSON C D, et al. Pre-clinical efficacy of clumping factor a in prevention of staphylococcus aureus infection [J]. *MBio*, 2016, 7(1): e02232.
- [6] WANNER S, SCHADE J, KEINHÖRSTER D, et al. Wall teichoic acids mediate increased virulence in *Staphylococcus aureus* [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 16257.
- [7] LACEY K A, GEOGHEGAN J A, MCLOUGHLIN R M. The role of staphylococcus aureus virulence factors in skin infection and their potential as vaccine antigens [J]. *Pathogens*, 2016, 5(1): E22.
- [8] CHEN Y, YE H AJ, CHEUNG GY, et al. Basis of virulence in a Panton-Valentine leukocidin-negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain [J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(3): 472-480.
- [9] CHUA K Y, MONK I R, LIN Y H, et al. Hyperexpression of α -hemolysin explains enhanced virulence of sequence type 93 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 31.
- [10] SUREWAARD B, DE HAAS C, VERVOORT F, et al. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis [J]. *Cell Microbiol*, 2013, 15(8): 1427-1437.
- [11] KOBAYASHI S D, MALACHOWA N, Whitney A R, et al. Comparative analysis of USA300 virulence determinants in a rabbit model of skin and Soft tissue infection [J]. *J Infect Dis*, 2011, 204(6): 937-941.
- [12] MALACHOWA N, KOBAYASHI S D, PORTER A R, et al. Contribution of staphylococcus aureus coagulases and clumping factor a to abscess formation in a rabbit model of skin and Soft tissue infection [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158293-e0158293.
- [13] LINDSAY S, OATES A, BOURDILLON K. The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing [J]. *Int Wound J*, 2017, 14(6): 1237-1247.
- [14] CREECH C B, AL-ZUBEIDI D N, FRITZ S A. Prevention of Recurrent Staphylococcal Skin Infections [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2015, 29(3): 429-464.
- [15] THAMMAVONGSA V, KIM H K, MISSIAKAS D A. Staphylococcal manipulation of host immune responses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(9): 529-543.
- [16] TOLIVER-KINSKY T, CUI W H, TORO G, et al. H₂S, a bacterial defense mechanism against the host immune response [J]. *Infect Immun*, 2019, 87(1): e00218-e00272.
- [17] COHEN T S, BOLAND M L, BOLAND B B, et al. *S. aureus* Evades Macrophage Killing through NLRP3-Dependent Effects on Mitochondrial Trafficking [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(9): 2431-2441.
- [18] THAMMAVONGSA V, MISSIAKAS D M, SCHNEEWIND O. *Staphylococcus aureus* Downgrades Neutrophil Extracellular Traps to Promote Immune Cell Death [J]. *Science*, 2013, 342(6160): 863-866.
- [19] WINSTEL V, MISSIAKAS D, SCHNEEWIND O. *Staphylococcus aureus* targets the purine salvage pathway to kill phagocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26): 6846-6851.
- [20] CHEUNG G Y, FISHER E L, MCCAUSLAND J W, et al. Antimicrobial peptide resistance mechanism contributes to staphylococcus aureus infection [J]. *J Infect Dis*, 2018, 217(7): 1153-1159.
- [21] GERLACH D, GUO YL, DE CASTRO C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* alters cell wall glycosylation to evade immunity [J]. *Nature*, 2018, 563(7733): 705.
- [22] ARCIOLA CR, CAMPOCCIA D, RAVAIOLI S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 5: 7.
- [23] ROY S, ELGHARABLY H, SINHA M, et al. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function [J]. *J Pathol*, 2014, 233(4): 331-343.
- [24] KWIECINSKI J, KAHLMETER G, JIN T. Biofilm formation by staphylococcus aureus isolates from skin and Soft tissue infections [J]. *Curr Microbiol*, 2015, 70(5): 698-703.
- [25] ROLO J, WORNING P, NIELSEN J B, et al. Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*-mediated beta-lactam resistance in staphylococci [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(4): e1006674.