

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

Klebsiella pneumoniae 肝膿瘍治病因子基因之選殖

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：90-FH-06

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

計畫主持人：張淑玉

共同主持人：蘇哲弘

計畫參與人員：張淑玉、蘇哲弘

執行單位：食品衛生系

中華民國 91 年 02 月 25 日

Klebsiella pneumoniae 肝膿瘍致病因子基因之選殖

張淑玉 蘇哲弘

嘉南藥理科技大學食品衛生系
嘉南藥理科技大學工業安全衛生系

前言

有效的控制院內感染，常是降低致病率及死亡率的重要因素，在革蘭氏陰性菌中，*Klebsiella pneumoniae* 是最常見引起院內感染的重要病原菌，其常易引起菌血症、腦膜炎、肺炎及尿路系統之感染 [1, 2, 3]。而由 *K. pneumoniae* 菌引起之化膿性肝膿瘍在外國早期之文獻中並不常見，然在 1960 年代開始發現 *K. pneumoniae* 肝膿瘍之發生有逐年增加趨勢。據國外文獻報告，其發生率佔所有化膿性肝膿瘍之 27% [4, 5]。相對於此，近年來在台灣地區高達 50~80% 的化膿性肝膿瘍為 *K. pneumoniae* 感染 [6, 7, 8]。更重要的，國內許多 *K. pneumoniae* 肝膿瘍患者皆發生肝外轉移病症，而造成很嚴重的合併症 [9, 10, 11]。最麻煩之合併症是轉移至眼球，發生敗血性內眼炎導致失明 [12]，而國外則很少有此種病例報告，如此大的差異，頗受國內感染專家學者的重視。

K. pneumoniae 感染，造成國內化膿性肝膿瘍的致病原因可從宿主與細菌兩方面探討。就宿主而言，對於 *K. pneumoniae* 肝膿瘍最常見的隨伴疾病是糖尿病(53%)，因此有學者認為糖尿病病友之免疫力系統有缺陷，而使其易發生化膿性肝膿瘍，然而 *K. pneumoniae* 肝膿瘍病友中，仍有將近一半並非糖尿病病友，僅以免疫力問題難以說明肝膿瘍中 *K. pneumoniae* 佔高比例的情形。而就病原菌本身而言，國內較少做這方面的研究，惟文獻報告 *K. pneumoniae* 感染的重要致病因子為：親水性莢膜多醣類(hydrophilic capsular polysaccharide)及脂多醣體(lipopolysaccharide, LPS)的產生可保護菌體，使其具抗血清及吞噬細胞的能力(13-20)。纖毛(pili, singly or in combination)，或黏著蛋白(nonfimbrial protein adhesin)賦以菌體對人類呼吸器官及尿路器官之上表細胞的附著力(21-24)。黏著力(adherence)亦是此菌株能在小腸聚集成菌落及貯存於尿路感染的重要因素(25,26)。

有關 *K. pneumoniae* 致病因子較深入的研究，許多文獻報告指出大部分臨床分離 *K. pneumoniae* 菌皆含莢膜，實驗結果亦顯示莢膜多醣為重要的致病因子(27,28)。莢膜分型(capsular serotypes)調查顯示已被分型之 *K. pneumoniae* 臨床分離菌株已有 77 種，而動物實驗結果顯示 K1 及 K2 型最具毒性(29)，國內臨床分離菌也以這兩種菌型最多；國外文獻報告指出由尿路感染、肺炎及菌血病病友所分離的菌株以 K2 型最多。

由以上研究背景知 *K. pneumoniae* 雖然是種早期就被發現是院內重要感染菌株，但其致病因子與其致病機轉的研究尚屬萌芽階段，目前以分子生物手法選殖出致病因子，除了莢膜合成有關之基因與攝取鐵離子有關的 fur 蛋白(ferric uptake regulator)被選殖出(30)以外，其他有關 *K. pneumoniae* 致病因子分子生物學上的深入研究，目前尚付之闕如(31)。由於台灣地區的肝膿

瘍致病菌以 *K. pneumoniae* 為最主要的致病菌，且此菌引起的肝膿瘍併發敗血症內眼炎又為國內特有的現象，因此由臨床分離的 *K. pneumoniae* 菌株之生化特性研究、致病因子之探討，特別是其與化膿性肝膿瘍之關連性之追究，致病機轉之解明，快速診斷方法之開發，偵測及尋求更迅速有效的治療，仍是刻不容緩之事。有鑒於此，本研究著重於致病因子探討，其基因之選殖、基因表現之調節、環境因子之誘發之研究。

材料與方法

(一) 使用菌株及其培養條件

我們所使用的菌株，是由成大醫院病人檢體中分離篩選到的 *Klebsiella pneumoniae*。用來進行形質轉換(transformation) 的宿主細胞 *E. coli* BL21 : *hsdS gal (λ cIts857 indl Sma7 nin5 lacUV-T7 genl)*，LB 完全培養基 (Luria-Bertani medium) 含 1% Bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract 1% NaCl。質體 DNA 的抽取及質體 DNA 在大腸桿菌之轉形作用 (transformation)皆參照 Sambrook 等人所著 Molecular cloning。

(二) SDS-PAGE 分析

菌體懸浮於 400 ul Tris-HCl pH 7.0 buffer 中，以 sonicator 將菌體打破，在 100°C 沸水煮沸 5 分鐘後，以 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)-15% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)，進行蛋白質之分析。

(三) 重組蛋白之構築與純化

核酸分解酶前向引導子(forward primer)序列為 5'-GGGGAAATAACATATGAAATACTCAG-3'，其中有限制酶 *NdeI* 的切割位置，而逆向引導子(reverse primer)序列為 5'-CGTAGTAAGCTTGCCCTCCC-3'，其中限制酶的切位為 *HindIII*。相同的，外膜蛋白之前向引導子(forward primer)序列為 5'-ACAAGGATACATATGAATATCAAACTG-3'，有限制酶 *NdeI* 的切割位置，逆向引導子(reverse primer)序列為 5'-TTTATTTCTCGAGTGCTTTATTGA-3'，有限制酶 *XhoI* 的切割位置。將這些 PCR 產物分別與載體 pET-21b 相互接合，完成重組蛋白基因之構築。之後，將此二段融合基因藉由轉形作用(transformation)送入 *E. coli* BL21 中大量表現。含質體的 *E. coli* BL21 培養至 OD₆₀₀ 為 0.6 時，經 1mM IPTG 誘導至少 6 小時，以 sonicator 將菌體打破，用 0.45um 的濾膜過濾，離心 13000rpm，45 分鐘，取上清液，因此蛋白質之 C 端因融合了六個 Histidine，所以可用 Ni²⁺ resin 進行親和性分離管柱(Affinity chromatography)予以純化。經 DNA 序列比對及蛋白質 SDS-PAGE 表現情形，確定已構築好的質體，均可正確表現蛋白質的產物。

(四) 酵素聯結免疫分析法(ELLISA)

將所純化的蛋白質以 PBS 稀釋成 10~20ug 100ul⁻¹，作為抗原，加入 96 槽的 plate bottom 中，37°C 吸附(coating)2 小時，將抗原吸取出，以 washing buffer 洗 3 次，加入 blocking buffer 200ul，於 4°C 下反應 O/N，以 washing buffer 洗 3 次分別將一級抗體稀釋成適當濃度，每槽加入 100ul，37°C 作用 2 小時以 washing buffer 清洗 3 次後，加入稀釋倍數 1:4000 之 HRP-2nd Ab 每槽 100ul，37°C 反應 2 小時同樣以 washing buffer 清洗 3 次後，加入事先稀釋為一半濃度的 substrate solution 100ul，約 5~10 分鐘，每槽均出現藍色反應時，加入 0.25N HCl 此時顏色會由藍轉黃，便可以

ELISA reader 測出其 OD₄₅₀ 吸光值。

結果與討論

我們取自於醫院的一株 *K. pneumonia*，將其染色體構築在載體 pBR322 上，並進行一連串的篩檢工作，順利的選殖出二段疑為致病因子的基因。第一段是利用核酸分解酶測試培養基 (Dnase test agar plate with toluidine blue O) 而篩出一段具有分解核酸活性之基因，因培養基中已添加一染料 Toluidine blue O，隨著與去氧核糖核酸被酵素所分解後的產物結合，而在培養基上菌落周圍呈現一紅色的光環。經美國國家生物技術資料中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 資料庫 (database) 比對後，發現它和許多有名的人類腸道伺機感染致病菌之核酸分解酶有高度相似性，如耶爾辛桿菌 (*Yersinia*) (endonuclease ; similarity=67.0% , identity=55.1%)、沙門氏桿菌 (*Salmonelleae*) (endonuclease ; similarity=67.0% , identity=47.6%) 及衣形體菌屬 (*Chlamydia psittaci*) (virulence factor "type III" ; similarity=74.0% , identity=48.0%)。而耶爾辛桿菌 (*Yersinia*) 及沙門氏桿菌 (*Salmonelleae*) 更是近年來研究 type III 分泌毒力因子途徑最為熱門的致病菌。其全長有 537 個鹼基對，178 個氨基酸，蛋白質大小為 18.7kDa (圖一)。第二段外膜蛋白基因恰巧位於核酸分解酶基因之上游，全長有 789 個鹼基對，263 個氨基酸，蛋白質大小為 28.9kDa (圖二)。而外膜蛋白質與核酸分解酶兩段之間只差一個氨基酸，故推測此二段基因乃共用同一啓動子 (promoter)，經美國國家生物技術資料中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 資料庫 (database) 比對後，發現為一外膜蛋白質 (outer membrane protein)，與知考克斯氏體菌會引起人類 Q 熱病及慢性心內炎，屬於革蘭氏陰性菌棒狀型細菌，其外膜蛋白質為血清學檢查和疫苗發展的一目標抗原 (target antigen)。

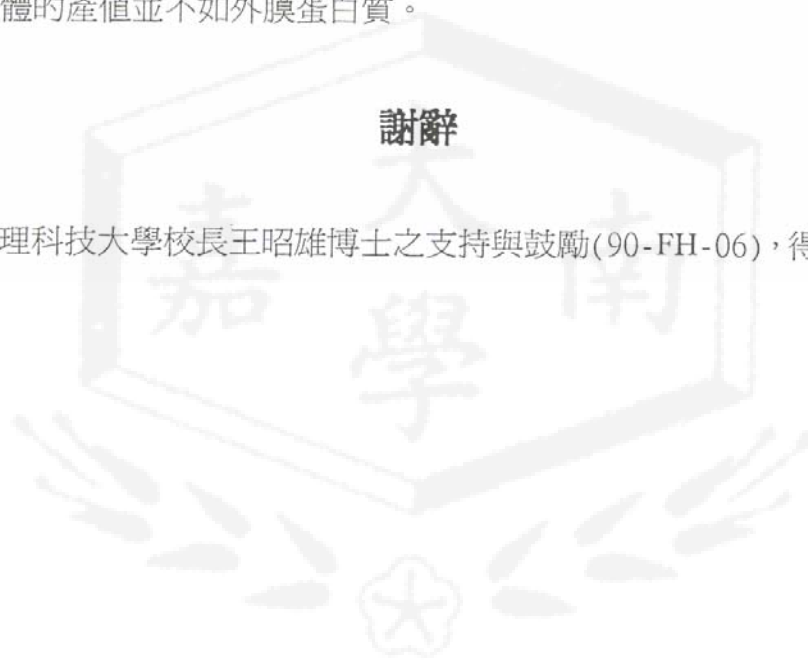
我們將純化好的核酸分解酶、外膜蛋白質，以 10~20ug ml⁻¹ 的濃度進行 ELISA 檢測。取自於台南成功大學附設醫院感染科所收集證實已受克雷伯氏肺炎感染病人之血清，作為一級抗體。以 ELISA reader 讀出其在 OD₄₅₀ 的吸光值，予以數字化。其結果如圖三、四。由我們的數據看來，隨著血清稀釋倍數的增加，所採樣病人的血清其 OD₄₅₀ 吸光值，也隨之下降。但是一般健檢民眾，在沒有遭受克雷伯氏肺炎桿菌的感染狀況下，針對其某些特定致病蛋白之抗體，理應趨於零。但是由我們的結果看來，其吸光值亦隨著血清稀釋倍數下降，並非如預期成基線 (baseline) 的現象 (或者也應只有在低稀釋倍數時，才可測出其 OD₄₅₀ 有吸光的情形)。我們猜測可能是因為克雷伯氏肺炎桿菌是人體內之伺機性感染菌，而作為對照組的樣品是取自於醫院中健檢的民眾，或許其中有些人體內已有 *K. pneumoniae* 潛藏，因此在體內已誘出一些抗體，拉高了平均值，這亦包含醫院從事者，因接觸感染源的機會增多；此外，採樣的血清範圍過於廣泛，不同年齡層及不同環境，均會對 ELISA 結果增添許多變異；另外採樣數目不足亦可能為主因之一。所以要使對照組 (control) 之 450nm 吸光值回歸到基線，除了應該擴大所收集之樣品數，更應該依年齡、工作環境分成數組，如醫院工作者、同一社區居住者或新生寶寶 (未受任何感染菌感染) . . . 等，再依流行病學之方式統計計算之。

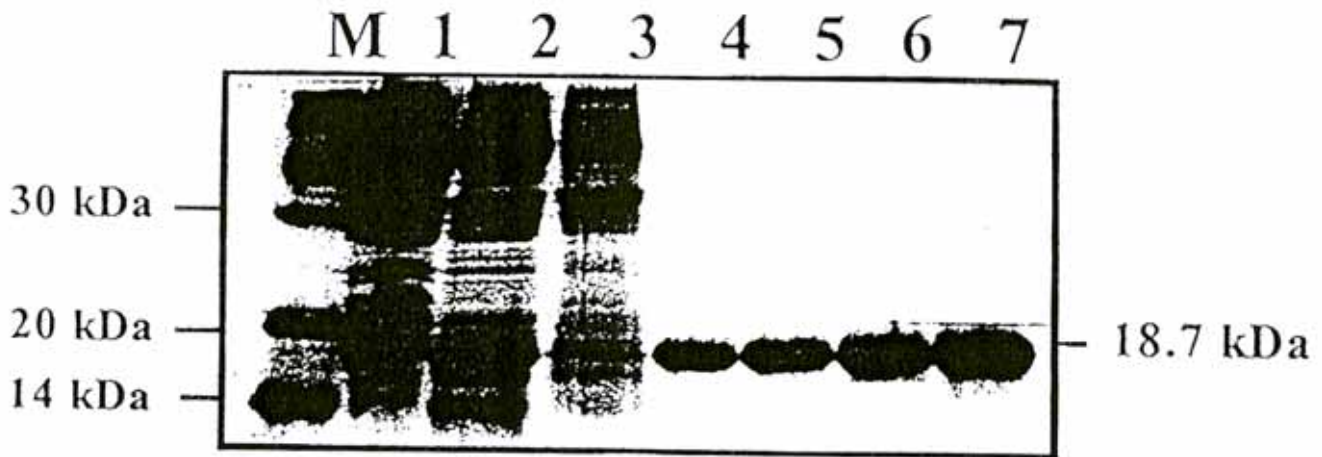
比較核酸分解酶、外膜蛋白質的吸光值可知，因外膜蛋白質是分佈於菌體外的蛋白質之一，理論上是發展為疫苗的最好對象，因此其 ELISA OD₄₅₀ 吸光值應高於對照組甚多，然扣除對照組數值的變異 (討論如上)，實驗組的結果確有明顯的增高，但幅度並非預期中的大，因此問題

可能出現在抗原-血清抗體間的專一性。因實驗組樣品可能受不同血清型菌株感染，在這些菌株間的外膜蛋白可能產生變異，或許這可解釋為何實驗組吸光值不如預期中的高。至於核酸分解酶，由結果看來，似乎抗原並沒有被血清抗體偵測到(實驗組和對照組差距不大)，可能其並非分泌性蛋白質，因此不易被免疫細胞辨識而產生抗體。然若是如此，其吸光值應與對照組相近，為何又有部分 ELISA 反應，一種解釋乃是基於 Strauss 研究，發現菌體外 toxin complex 是導致小白鼠致死的重要因子，此 toxin complex 主要成份包含有莢膜多醣體(CPS)、脂多醣體(LPS)及 7%蛋白質。將此 7%蛋白質去除後，則影響小白鼠致死率甚大(Strauss, 1987)。而核酸分解酶可能為那 7%蛋白質中的成份，並隨著莢膜層剝落，因此仍會產生部分免疫反應。另一可能為 *K. pneumoniae* 菌株藉由 endocytosis 進入細胞內，當其侵入細胞後在潛伏期內所分泌核酸分解酶並不被免疫細胞辨識，只有尚未進入細胞內的 *K. pneumoniae* 菌株所分泌的核酸分解酶可產生抗體，因此抗體的產值並不如外膜蛋白質。

謝辭

本研究承蒙嘉南藥理科技大學校長王昭雄博士之支持與鼓勵(90-FH-06)，得以完成，謹此謝忱。





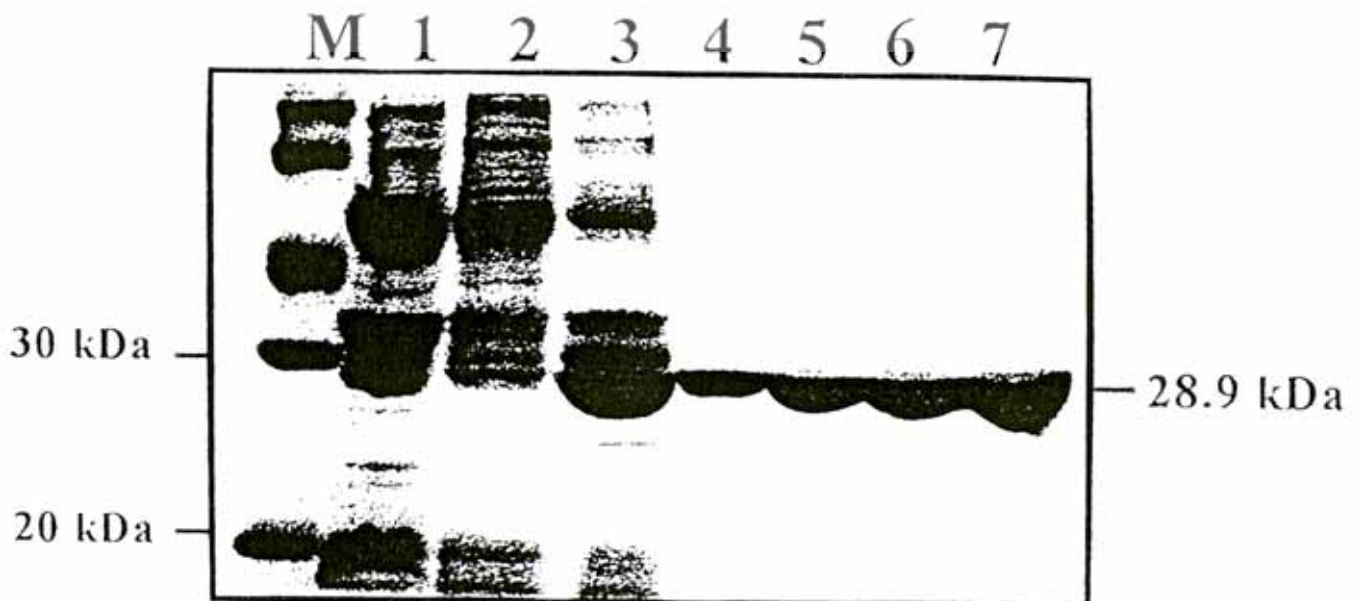
圖一、利用鎳親和性管柱純化核酸分解酶(DI)重組蛋白

lane 1 : 載體 pET21-(b)/BL21 ;

lane 2 : 打破菌體後之上清液 ;

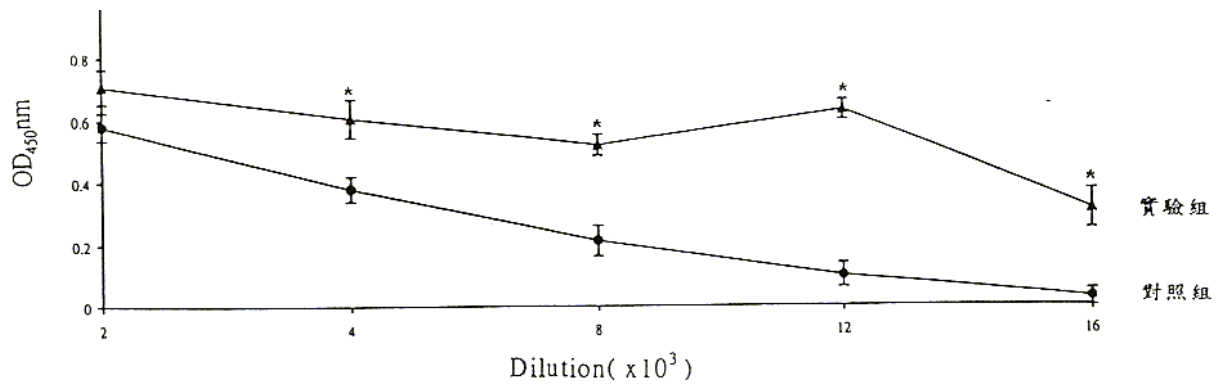
lane 3 : 打破菌體後之 pellets ;

lane 4 ~ lane 7 : 純化後之重組蛋白依次為 1 ug ~ 4 ug 。



圖二、利用鎳親和性管柱純化外膜蛋白(OMP1)重組蛋白

lane 1 : 載體 pET-21(b)/BL21 ;



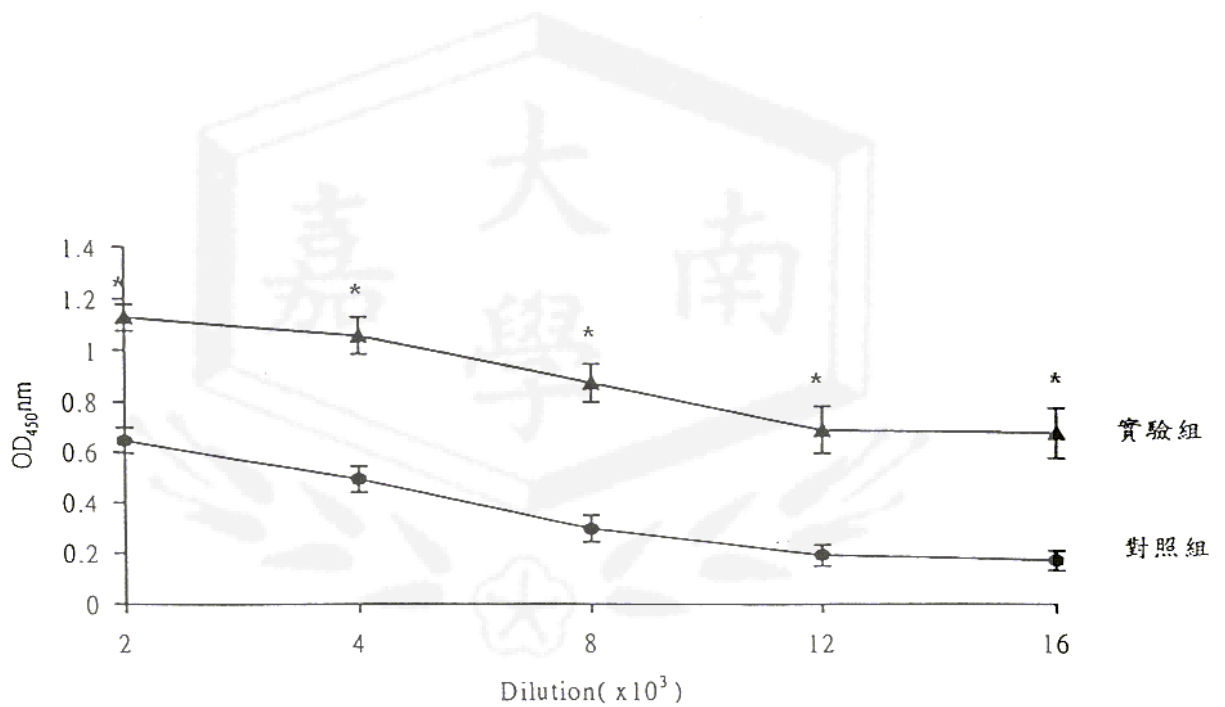
圖三、以純化後之核酸分解酶(D1)為抗原，在不同血清稀釋倍數下所獲得之 ELISA 分析結果 (“*” 表 P<0.05)

實驗組: 受 *K. pneumoniae* 感染病人之血清，共 14 個樣本

縱軸: OD₄₅₀ 吸光值(mean ± S.E.M)

對照組: 健康檢查民眾之血清，共 12 個樣本

橫軸: 血清稀釋倍數



圖四、以純化後之外膜蛋白質(OMP1)為抗原，在不同血清稀釋倍數下所獲得之 ELISA 分析結果 (“*” 表 P<0.05)

實驗組: 受 *K. pneumoniae* 感染病人之血清，共 14 個樣本

縱軸: OD₄₅₀ 吸光值(mean ± S.E.M)

對照組: 健康檢查民眾之血清，共 12 個樣本

橫軸: 血清稀釋倍數

1. Kreger, B. E., Craven, D. E., Carling, P. C. and W. R. McCabe. "Gram-negative bacteremia, III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients". *Am. J. Med.*, 68, pp.332-343, 1980.
2. Darfeuillemichaud, A., Jallat, C., Aubel, D., Sirot, D., Sirot, J., and Joly, B. "R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections". *Infect. Immun.* 60, pp.44-55, 1992.
3. Greenstein AJ, Lowenthal D, Hammer GS, Schaffner F, Aufses AH. Jr. "Continueng changing patterns of disease in pogenic liver abscess: a study of 38 patients". *Am. J Gastroenterol*, 79, pp.217-226, 1984
4. Goldman JM, Kowalec JK. "Hepatic abscess and osteomyelitis from *Klebsiella pneumoniae*". *JAMA*, 240, pp.2660, 1978.
5. Seeto RK, Rockey DC. "Pyogenic liver abscess: changes in etiology, management, and outcome". *Medicine*, 75, pp.99-113, 1996.
6. Lee TY, Wan YL, Tsai CC. "Gas-containing liver abscess: radiological findings and clinical significance". *Abdom Imaging*, 19, pp.47-52, 1994.
7. Yang CC, Chen CY, Lin XZ, Chang TT, Shin JS, Lin CY. "Pyogenic liver abscess in Taiwan: emphasis on gas-forming liver abscess in diabetes". *Am. J. Gasterol*, 88, pp.1911-1915, 1993.
8. Liu YC, Cheng DL, Chen YS, Yen MY, Wang JH, Wang YS, Wann SR, Lin HH, Huang WK. "A pilot study of oral fleroxacin once daily compared with conventional therapy in patients with bacterial liver abscess". [Abstract] In: Proceedings of the 7th International Congress for Infectious Diseases. Hong Kong. 296, 1996.
9. Chiu CT, Lin DY, Liaw YF. "Metastaticseptic endophthalmitis in pyogenic liver abscess". *J. Clin. Gastroenterol*, 10, pp.524-527, 1988.
10. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Shi FW, Wang LS. "Pyogenic liver abscess: clinical manifestations and value of percutaneous catheter drainage treatment". *J. Formos.Med. Assoc*, 89, pp. 571-576, 1990.
11. Chang FY, Chou MY, Fan RL, Shaio MF. "A clinical study of *Klebsiella* liver abscess". *J. Formos. Med. Assoc*, 87, pp.282-287, 1988.
12. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. "Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess: their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteria in diabetic patients". *Arch. Intern. Med*, 151, pp. 1557-1559, 1991.
13. Cryz, S. J., Jr., E. Furer, and R. Germanier. "Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide." *Infect. Immun.* 43: 440-441.1984.
14. Cryz, S. J., Jr., E. Furer, and R. Germanier. "Protection against fatal *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis by passive trtansfer of anti-capsular polysaccharide." *Infect. Immun.* 45: 139-142.1984.

15. Domenico, P., W. G. Johanson, Jr., and D. C. Straus. "Labor pneumoniae in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*." *Infect. Immun.* 37: 327-335.1982.
16. Simoons-Smit, A. M., A. M. J. J. Verweij-Van Vaught, and D. M. Maclarsen. "The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*." *J. Med. Microbiol.* 21: 133-137.1986.
17. Williams, P., P. A. Lambert, C. G. Haigh, and M. R. W. Brown. "The influence of the O and K antigens of *Klebsiella aerogens* on surface hydrophobicity and susceptibility to phagocytosis and antimicrobiol agents." *J. Med. Microbiol.* 21: 125-132.1986.
18. Merino, S., S. Camprubi, S. Alberti, V. J. Benedi, and J. M. Tomas. "Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing." *Infect. Immun.*60: 2529-2535.1992.
19. Alberti, S., D. Alvarez, S. Merino, M. T. Casado, F. Vivanco, J. M. Tomas, and V. J. Benedi. "Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*." *Infect. Immun.*64: 4726-4732.11996.
20. Aguilar, A., S. Merino, X. Rubires, and J. M. Tomas. "Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37 °C." *Infect. Immun.*65: 1245-1250.1997.
21. Darfeuille-Michaud, A. C. Jallat, D. Aubel, D. Sirot, C. Rich, J. Sirot, and B. Joly. "R-plasmid-encoded adhesive factors in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections." *Infect. Immun.*60: 44-55.1992.
22. Williams, P., and J. M. Tomas. "The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*." *Rev. Med. Microbiol.* 1: 196-204.1990.
23. Hornick, D. B., B. L. Aallen, M. A. Horn, and S. Clegg. "Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products." *Infect. Immun.*60: 1577-1588.1992.
24. Tarkkanen, A. M., R. Virkola, S. Clegg, and T. K. Korhonen. "Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells." *Infect. Immun.*65: 1546-1549.1997.
25. Darfeuille-Michaud, A., C. Jallat, D. Aubel, D. Sirot, C. Rich, J. Sirot, and B. Joly. "R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections." *Infect. Immun.*60: 44-45.1992.
26. Favre-Bonte, S., A. Darfeuille-Michaud, and C. Forestier. "Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human Intestine-407 cells." *Infect. Immun.*63: 1318-1328.1995.
27. Tomas, J. M., V. J. Benedi, B. Ciurana, and J. Jofre. "Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity." *Infect. Immun.* 54: 85-89.1986.
28. Williams, P., and J. M. Tomas. "The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*." *Rev. Med. Microbiol.* 1: 196-204.1990.
29. Mizuta, K., M. Ohta, M. Mori, T. Hasegawa, I. Nakashima, and N. Kato. "Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the 01 group: relationship to their capsular (K) types." *Infect. Immun.* 40:56-61.1983.

30. Laurie, A. Achenbach, Wei Yang. "The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis." *Gene* 185:201-207.1997.
31. P. Podschun, U. Ullmann. "Klebsiella spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors." *Clin. Microbiol. Rev.* 11:589-603.1998.

