

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT94-09

計畫名稱：創傷弧菌聚集缺失突變株之構築

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：張竣凱

子計畫主持人：

中華民國 95 年 02 月 28 日

摘要

創傷弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 是一株生活在海水中的高致死率致病菌，且其發病到死亡往往只要 2-3 天，在臨床的病徵主要是食入含有創傷弧菌的海產所引發的敗血症，或是經由外傷感染包括海產養殖器具或海產刺傷所造成的組織潰爛。因為此致病菌好發於肝臟相關疾病以及免疫力低弱的患者，並且台灣肝病患者比率相當高，再加上近年來感染病例持續增加，因此尋找創傷弧菌致病基因以進一步加以控制並治療此致病菌所造成的傷害更是刻不容緩。

血清是防禦外來微生物侵犯體內的重要防線，其中富含多種的抗菌蛋白 (antimicrobial peptides)，包括補體 (complement)、defensin 及 polymyxin B....，致病菌之所以能感染並侵入體內存活造成傷害就必須具有抵抗這些抗菌蛋白殺菌作用的機制，細菌可能在外在環境變化時比如在含有抗菌蛋白 (polymyxin B) 的環境進行其基因及表現型的改變，已應付環境的變化。同時我們發現創傷弧菌在抗菌蛋白 polymyxin B 的環境下，往往會形成菌體聚集的現象，並且這些形成菌體聚集現象的菌株是明顯地比無菌體聚集現象的菌株更具有抗菌蛋白的抗性，因此，由我們初步的結果顯示，創傷弧菌菌體聚集的現象可能扮演細菌抵抗抗菌蛋白殺菌作用的重要機制，除此之外，這菌體可能由一些因子來調節菌體的聚集現象。最重要的是創傷弧菌在面對抗菌蛋白時會形成菌體聚集現象，以避免抗菌蛋白的殺菌作用，此現象是目前研究仍然未知的。

我們利用轉位子突變方式找出創傷弧菌菌體聚集相關的基因，實驗結果顯示，可利用轉位子將創傷弧菌進行染色體突變，其成功率為 94% (1,983 株 / 2,100 株)，再進一步進形分析以篩選這些菌體聚集相關的基因，並探討其在抗殺菌作用及感染過程的角色。

前言

創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一株常存在海產食品的高致死率的致病菌，近年來有許多國家也出現相當多的病例，包括美國、墨西哥、韓國及日本等(Bisharat et al., 1999; Hlady and Klontz, 1996; Paik et al., 1995)，此菌的感染途徑常常是經由傷口侵入或由飲食造成感染，感染後所造成的臨床症狀主要有三種：1.原發性敗血症(primary septicemia)：其感染原因主要是食入生的或未煮熟的海鮮類食品，創傷弧菌經由腸胃道而感染，臨床上病人會有發熱、寒顫、嘔吐等症狀，常常導致菌血症及敗血性休克，其死亡率高達 50%以上(Blake et al., 1979; Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992; Shapiro et al., 1998)，原發性敗血症也常常伴隨著肌肉軟組織及皮膚的壞死(Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992)，除此之外，且此菌感染發病病程相當快，往往發病 2 天後患者會休克，進而導致死亡(Blake et al., 1979; Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992)。2.傷口感染(wound infection)：通常是由於傷口直接碰觸含有創傷弧菌的海水或海產食品，或是由於處理海產食品時遭刺傷而感染，感染部位會有紅腫及水泡，之後很快造成組織壞死、潰爛或嚴重的蜂窩性組織炎，病程若惡化會發展成嚴重的次發性敗血症而導致死亡，死亡率約為 25% (Blake et al., 1979; Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992; Shapiro et al., 1998)。3. 腸胃炎：此症狀較輕微，常導致腹痛及下痢，往往會自然復原。創傷弧菌的感染宿主的特異性一直是造成感染的主要因素，其感染的宿主往往具有潛在的慢性疾病包括肝病或免疫系統低弱，都是容易感染的宿主(Tacket et al., 1984)。近來，美國疾病管制中心指出，自 1996 至 2002 由於弧菌感染的病例已增加了 126% (Centers for Disease Control and Prevention)，而台灣的臨床病例在近年也不斷地持續增加(Chuang et al., 1992; Chang et al., 1994; Hsueh et al., 2004)。

創傷弧菌的致病機制目前仍然尚未清楚，除了夾膜(Yoshida et al., 1985)以及我們所找到的鉀離子吸收蛋白(TrkA; Chen et al., 2004)以外，仍未找到致病力強的致病因子。其它可能的致病因子尚有 解酵素(lipase)、磷酸解酵素(phospholipase)、核酸分解酵素(DNase)、蛋白質分解酵素(protease)、溶血酵素(hemolysin)、細胞毒素(cytolysin) (Kreger and Lockwood, 1981; Olive et al., 1986)和 type IV leader peptidase/N-methyltransferase (Paranjpye et al., 1998)，尤其細胞毒素以及蛋白質分解酵素是在創傷弧菌的感染機制研究較清楚的，然而它們的基因缺失菌株分別進行小鼠的致死性測試，結果它們的基因缺失菌株和野生株對小鼠的半致死率(LD₅₀)並無明顯差別，顯示細胞毒素以及蛋白質分解酵素均不是一個重要的致病因子(Shao and Hor, 2000; Wright and Morris, 1991)。

致病菌可在感染部位經由微血管侵犯到其它身體組織、器官，由於血液清具有殺菌作用，是避免細菌感染相當重要的防禦機制，因此致病菌都具有許多抵抗血清殺菌作用的系統，這些抗血清殺菌作用的系統目前較

明確的有莢膜(capsule)，它可以避免血清殺菌作用，以達到感染人體的目的。而血清之所以具有殺菌作用是因為含有一群抗菌蛋白 (cationic antimicrobial peptides)，如補體(complement)、bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) 及 defensin (Levy, 2000)，這些抗菌蛋白的殺菌機制主要是抗菌蛋白會插入細胞膜形成孔洞，導致菌體瓦解而死亡(Hancock et al., 1995; Hancock and Chapple, 1999)，除此之外，在皮下組織、上皮細胞及免疫細胞如巨噬細胞及白血球也會分泌許多抗菌蛋白，這類型的抗菌蛋白包括有 defensins (Harder et al., 1997), azurocidin (Shafer et al., 1984; Pohl et al., 1990), melittin, magainins, polymyxin B, protamine sulfate, polylysin 及 cecropins (Vaara, 1992)。目前有些抗菌蛋白包括 ambicin (nisin), gramicidin S, polymyxin B 在臨床或商業上已被使用，然而創傷弧菌對 polymyxin B 或 complement 已具有抗性，其對這些抗菌蛋白的抗性機制目前仍然未清楚。

目前致病菌對抗生素或抗菌蛋白的抗藥性機制雖然尚未清楚，近來已陸續有相關研究報告指出，致病菌會受外在環境的不同而改變菌體性質，使其本身在惡劣的環境下繼續生存下來而持續感染生物體(Dziejman and Mekalanos, 1995)，在 *Salmonella typhimurium* 的研究報告指出，此菌之所以具有抗菌蛋白 (polymyxin B) 抗性主要是因為環境調節因子(Environmental response regulator; PhoP)在抗菌蛋白的環境下會進行菌體性質的改變，使菌體具有抗菌蛋白的抗性(Vescovi et al., 1996; Wosten et al., 2000)，相似的研究結果也在 *Pseudomonas aeruginosa* 發現，其外膜蛋白 outer membrane H1 會受環境的影響而增加，並且也會增加對抗菌蛋白 polymyxin B 的抗性(Nicas and Hancock, 1980)。有關於菌體聚集而增加抗藥性的研究報告甚少，目前大多僅限於菌體聚集的研究，如 Helaine 等指出在 *Neisseria meningitidis* 具有一個與纖毛蛋白 pilin 相似的蛋白叫 PilX，PilX 對於菌體的聚集是必要的因子，而且 PilX 也會促進菌體利用纖毛附著於人體細胞(Helaine et al., 2005)；對於菌體聚集而增加抗藥性的研究方面，目前較清楚的主要是在菌體生物膜的形成而增加抗藥性，Drenkard 及 Ausubel 在其研究報告指出 *Pseudomonas* 對抗生素抗藥性主要可能是菌體受到含有抗生素環境，藉由調節因子改變菌體的特性，包括菌體外形的改變，使得細菌轉變為易形成生物膜(biofilm)的菌體，導致菌體對抗生素抗藥性的增加(Drenkard and Ausubel, 2002)，顯示菌體形成生物膜極可能是致病菌對抗生素或抗菌蛋白產生抗藥性的機制之一。另外，最近的研究指出，在抗藥性相當高的菌株 *Enterococcus faecalis* 的表面具有一個特殊的聚集蛋白(aggregation substance; AS)，此蛋白會使 *E. faecalis* 產生菌體聚集現象並且會使菌體產生抗藥性(Waters et al., 2004)，由這些研究結果顯示，形成菌體聚集的機制似乎與細菌能抵抗抗生素或抗菌蛋白的殺菌作用有著緊密關係。

目的

由於創傷弧菌的致死性高，而且此菌易於含有抗菌蛋白的血清中生長，因此創傷弧菌必然至少有一套抗殺菌的機制，使其能不斷增值造成感染的目的，先前的研究結果已知創傷弧菌具有抗菌蛋白 polymyxin B 的抗性，我們以抗菌蛋白 polymyxin B 處理菌體做為觀察菌株變化的模式，數株菌株經由 polymyxin B 處理後發現大部分菌株是容易形成菌體聚集現象，而且菌體並沒有瓦解破裂而死亡，相對地，無菌體聚集現象的菌株後來是較容易破裂死亡，並且這些無菌體聚集現象的細菌幾乎都是屬於環境來源的菌株，在最近的研究報告也指出，經過抗菌蛋白-乳鐵蛋白 lactoferrin 處理的 *Staphylococcus aureus* 會導致菌體外觀的改變且會使得菌體發生聚集現象(Diarra et al., 2003)，因此，這種菌體聚集現象或許是創傷弧菌之所以能在適應在血液血清中不被抗菌蛋白殺死並順利增值的重要機制之一。綜合以上所言，我們期望藉由構築轉位子突變株基因庫，以菌體聚集分析實驗篩選菌體聚集缺失突變株並將菌體聚集相關基因選殖，以期能在致病菌的感染控制有所助益。

方法及材料：

菌種

E. coli 用來進行與 *Vibrio vulnificus* 接合生殖的宿主；*Vibrio vulnificus* 是臨床敗血病的致病菌。

轉位子突變株庫(transposon mutant library)之構築

培養帶有抗生素 kanamycin 抗性基因的轉位子質體的 *E. coli* 及創傷弧菌於 LB 培養液於 37°C 培養 16 小時後，利用接合生殖的方式將帶有轉位子質體的 *E. coli* 和創傷弧菌混合，放在 LB 培養基上培養 2 小時，以 LB 培養液將細菌沖洗下來，將菌液塗抹於含有抗生素 kanamycin 及 polymyxin B 的培養基，於 37°C 隔夜培養。

聚合酵素鏈反應(PCR)

將菌落點至含有 200 μM dNTP、1X DNA polymerase buffer、0.5U Taq DNA polymerase 及 50 pmole 正向引子 (5'-ATGAGCCATATTCAACGGGA-3') 與 50 pmole 反向引子 (5'-TTAGAAAAACTCATCGAGCA-3') 的試管中，總體積 50 μl；反應條件為 94°C 30s、55°C 30s、72°C 50s，共 30 循環，反應後取 5 μl 的產物進行電泳分析。

結果與討論

轉位子突變株庫(transposon mutant library)之構築

轉位子突變株庫(transposon mutant library)經由抗生素 polymyxin B 與

kanamycin 培養基篩選共獲得 2,100 株，將這些突變株再進一步在含有抗生素 ampicillin 的培養基篩選，以確認正確插入染色體的突變株，共獲得 1,983 株，比率約為 94%，藉由聚合酵素鏈反應(PCR)進行對 kanamycin 抗性基因存在與否分析得知，經由抗生素篩選出的菌株隨意挑選 8 株，而這 8 株菌株在聚合酵素鏈反應成陽性的比率約為 100%，因此，此創傷弧菌菌株是可利用轉位子將染色體基因隨意突變的方式，再進一步進行菌體聚集基因的篩選。

參考文獻：

- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., and Colodner, R. (1999) Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet* **354**: 1421-1424.
- Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., and Heublein, P.C. (1979) Disease caused by a marine *Vibrio*: Clinical characteristics and epidemiology. *N Engl J Med* **300**: 1-5.
- Bonner, J.R., Coker, A.S., Berryman, C.R., and Pollock, H.M. (1983) Spectrum of vibrio infections in a Gulf Coast community. *Ann Intern Med* **99**: 464-469.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2003) Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-selected sites, United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* **52**: 340-343.
- Chang, J.J., Sheen, I.S., Peng, S.M., Chen, P.C., Wu, C.S., and Leu, H.S. (1994) *Vibrio vulnificus* infection: report of 8 cases and review of cases in Taiwan. *Chang Gung Med J* **17**: 339-346.
- Chen, Y.C., Chuang, Y.C., Chang, C.C., Jeang, C.L., and Chang, M.C. (2004) A K⁺ uptake protein, TrkA, is required for serum, protamine, and polymyxin B resistance in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **72**: 629-636.
- Chuang, Y.C., Yuan, C.Y., Liu, C.Y., Lan, C.K., and Huang, A.H. (1992) *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clin Infect Dis* **15**: 271-276.
- Diarra, M.S., Lacasse, P., Deschenes, E., Grondin, G., Paradis-Bleau, C., and Petitclerc, D. (2003) Ultrastructural and cytochemical study of cell wall modification by lactoferrin, lactoferricin, and penicillin G against *Staphylococcus aureus*. *J Electron Microsc* **52**: 207-215.
- Drenkard, E., and Ausubel, F.M. (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**: 740-743.
- Dziejman, M., and Mekalanos, J.J. (1995) Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. In *Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J.A., and Silhavy, T.J. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 305-317.
- Hancock, R.E.W., and Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents*

- Chemother* **43**: 1317-1323.
- Hancock, R.E.W., Falla, T., and Brown, M. (1995) Cationic bactericidal peptides. *Adv Microb Physiol* **37**: 135-175.
- Harder, J., Barteis, J., Christophers, E., and Schröder, J.M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**: 861.
- Helaine, S., Carbonnelle, E., Prouvensier, L., Beretti, J.I., Nassif, X., and Pelicic, V. (2005) PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol* **55**: 65-77.
- Hlady, W.G., and Klontz, K.C. (1996) The epidemiology of Vibrio infection in Florida, 1981-1993. *J Infect Dis* **173**: 1176-1183.
- Hsueh, P.R., Lin, C.Y., Tang, H.J., Lee, H.C., Liu, J.W., Liu, Y.C., and Chuang, Y.C. (2004) Vibrio vulnificus in Taiwan. *Emerg Infect Dis* **10**: 1363-1368.
- Klontz, K.C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H.T., Baldy, L.M., and Gunn, R.A. (1988) Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections: Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Ann Intern Med* **109**: 318-323.
- Kreger, A., and Lockwood, D. (1981) Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **33**: 583-590.
- Kumamoto, K.S., and Vukich, D.J. (1998) Clinical infections of *Vibrio vulnificus*: a case report and review of the literature. *J Emerg Med* **16**: 61-66.
- Levy, O. (2000) Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* **96**: 2664-2672.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States reply to Dr. Hedberg. *Emerg Infect Dis* **5**: 841-842.
- Nicas, T.I., and Hancock, R.E.W. (1980) Outer membrane protein H1 of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in adaptive and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamicin. *J Bacteriol* **143**: 872-878.
- Oliver, J.D., Wear, J.E., Thomas, M.B., Warner, M., and Linder, K. (1986) Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **5**: 99-111.
- Paik, K.W., Moon, B., Park, C.W., Kim, K.T., Ji, M.S., Choi, S.K., Rew, J.S., and Yoon, C.M. (1995) Clinical characteristics of ninety-two cases of *Vibrio vulnificus* infections. *Kor J Infect Dis* **27**: 355-365.
- Paranjpye, R.N., Lara, J.C., Pepe, J.C., Pepe, C.M., and Strom, M.S. (1998) The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to Hep-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. *Infect Immun* **66**: 5659-5668.
- Pohl, J., Pereira, H.A., Martin, N.M., and Spitznagel, J.K. (1995) Amino acid sequence of CAP37, a human neutrophil granule-derived antibacterial and monocyte-specific chemotactic glycoprotein structurally similar to neutrophil elastase. *FEBS Lett* **272**: 200-204.
- Shapiro, R.L., Altekkruse, S., Hutwagner, L., Bishop, R., Hammond, R., Wilson, S.,

- Ray, B., Thompson, S., Tauxe, R.V., Griffin, P.M., and Vibrio Working Group (1998) The role of gulf coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. *J Infect Dis* **178**: 752-759.
- Shafer, W.M., Martin, L.E., and Spitznagel, J.K. (1984) Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphates. *Infect Immun* **45**: 29-35.
- Shao, C.P., and Hor, L.I. (2000) Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* virulence in mice. *Infect Immun* **68**: 3569-3573.
- Tacket, C.O., Brenner, F., and Blake, P.A. (1984) Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J Infect Dis* **149**: 558-561.
- Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Micro Rev* **56**: 359-411.
- Véscovi, E.G., Soncini, F.C., and Groisman, E.A. (1996) Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**: 165-174.
- Waters, C.M., Hirt, H., McCormick, J.K., Schlievert, P.M., Wells, C.L., and Dunny, G.M. (2004) An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Mol Microbiol* **52**: 1159-1171.
- Wösten M.M.S.M., Kox, L.E.F., Chamnongpol, S., Soncini, F.C., and Groisman, F.C. (2000) A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **29**: 113-125.
- Wright, A.C., and Morris, J.G. Jr. (1991) The extracellular cytolsin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect Immun* **59**: 192-197.
- Yoshida, S., Ogawa, M., and Mizuguchi, Y. (1985) Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **47**: 446-451.