

# 艰难梭菌黏附因子研究进展\*

饶凤琴<sup>1</sup>, 吴昌学<sup>1</sup>, 崔古贞<sup>2</sup>, 程玉梅<sup>3</sup>, 齐晓岚<sup>1\*\*</sup>, 洪伟<sup>1\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室 & 贵州省分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学附院 综合 ICU, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 艰难梭菌是一种机会性致病菌,是导致抗生素相关性腹泻和伪膜性结肠炎的主要病原菌。在艰难梭菌致病周期中,艰难梭菌黏附于肠壁细胞、进一步产生毒素并入侵肠上皮细胞尤为重要,是其致病过程的关键环节。艰难梭菌黏附过程需要多种黏附因子的参与,目前已知的黏附因子有细胞壁结合蛋白(Cwp6、Cwp8、Cwp2)、S层蛋白(SlpA)、细胞表面蛋白(Cwp66)、热休克蛋白(GroEL)、纤维连接蛋白(Fbps)、鞭毛蛋白(FliC、FliD)及脂蛋白(CD0873)等。本文对艰难梭菌黏附因子的研究进展进行综述。

**[关键词]** 艰难梭菌; 黏附因子; 致病机制; 艰难梭菌感染; 伪膜性结肠炎; 肠上皮细胞; 炎症

**[中图分类号]** R378.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)10-1117-05

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.10.001

## Review of *Clostridioes difficile* Adhesion Factors

RAO Fengqin<sup>1</sup>, WU Changxue<sup>1</sup>, CUI Guzhen<sup>2</sup>, CHENG Yumei<sup>3</sup>, QI Xiaolan<sup>1</sup>, HONG Wei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases (Ministry of Education), Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Department of Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

艰难梭菌(*Clostridioes difficile*)是一种革兰阳性、专性厌氧的产芽孢杆菌,是导致艰难梭菌相关性腹泻的主要原因<sup>[1]</sup>。艰难梭菌感染(*Clostridioes difficile* infection, CDI)的临床表现可从轻度、短暂性、自限性腹泻到可危及生命的伪膜性结肠炎<sup>[2-3]</sup>。正常人体肠道内微生物处于平衡状态,抗生素的使用会扰乱肠道内微生物群落的平衡,进而导致有益微生物种类和数量减少,使有益微生物对艰难梭菌的阻遏效应被解除,艰难梭菌迅速占据肠道生态位,大量繁殖并产生毒素(tcdA、tcdB及二元毒素),这些毒素攻击肠上皮细胞,导致肠道炎症,最终导致CDI的发生<sup>[4]</sup>。近年来,随着艰难梭菌强毒株核糖体027型的出现,CDI表现出高致死率和高复发率的特征,因而日益受到研究者的关注<sup>[5]</sup>。2011年,美国大约有近50万人感染艰难梭菌,约29 000人因CDI而死亡,2013年美国疾病控

制与预防中心将*C. difficile*列为需要紧急控制的病原微生物<sup>[6]</sup>。对欧洲多个国家的研究数据显示,CDI确诊后30 d内CDI的死亡率从3%(法国)~30%(英国)不等<sup>[7]</sup>。所以,对艰难梭菌生物特性进行深入研究对防治CDI具有重要意义。研究发现,艰难梭菌黏附于宿主肠细胞表面对其进一步的定值、入侵以及毒力因子发挥作用尤为重要,如无法黏附于宿主细胞,便无法进一步的定植,将迅速被宿主细胞的非特异性防御机制清除,而艰难梭菌黏附过程由多种黏附因子共同作用。许多研究已经确定了涉及黏附和定植过程的因素,如S层蛋白、黏附素Cwp66、鞭毛、热休克蛋白GroEL和水解酶等,影响这些因素的黏附因子中,目前已知的有细胞壁结合蛋白(Cwp6、Cwp8、Cwp2)、S层蛋白(SlpA)、细胞表面蛋白(Cwp66)、热休克蛋白(GroEL)、纤维连接蛋白(Fbps)、鞭毛蛋白(FliC、FliD)

\*[基金项目] 国家自然科学基金(31601012;31560318;31760318); 贵州省科技计划项目黔科合平台人才[(2017)5652]

\*\*通信作者 E-mail: hongwei\_gmu@foxmail.com; 154981793@qq.com

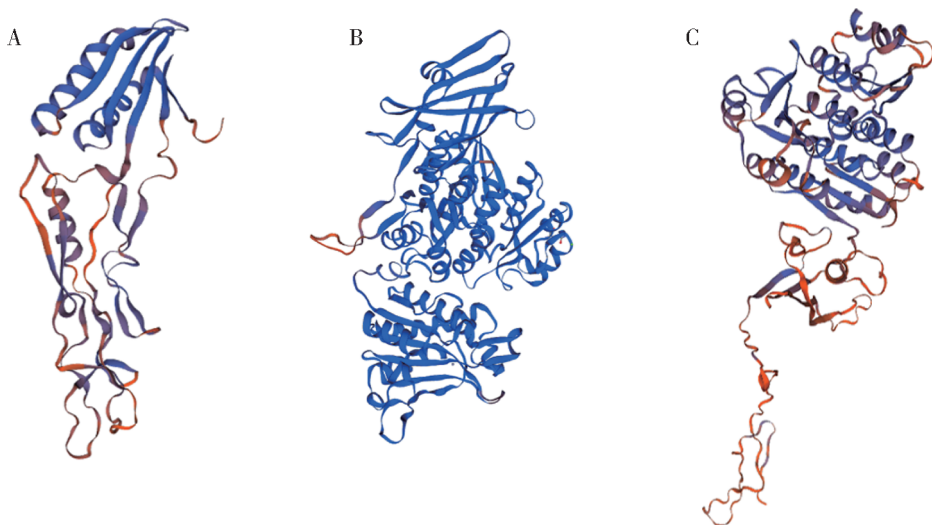
网络出版时间:2019-10-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191022.2308.001.html>

及脂蛋白 (CD0873) 等。研究这些黏附因子对于 CDI 的防治具有极其重要的意义,本文就黏附因子的研究进展进行综述。

# 1 细胞壁结合蛋白及 S 层蛋白 (S-layer protein)

艰难梭菌细胞壁蛋白绝大多数属于细胞壁结合蛋白 (cell wall binding proteins, CWBs) 大家族,这个家族包括 S 层蛋白 (S layer protein, Slp)、半胱氨酸蛋白酶 Cwp84 和相变蛋白 CwpV<sup>[8]</sup>。Slp 是细胞表面最丰富的蛋白质,艰难梭菌在其表面表达一个 S 层,在电镜下形成一个规则的二维阵列,每个菌株携带一个 S 层,由 2 种不同的蛋白质组成,一种是高分子量蛋白 P47,另一种是低分子量蛋白 P36,都由 *slpA* 基因编码。SlpA 是 S 层蛋白之一,用粗制或纯化的 SlpA 预处理宿主细胞,或用抗 SlpA 血清培养艰难梭菌,均可显著减少艰难梭菌对细胞的黏附,表明该蛋白对艰难梭菌的黏附能力有影响<sup>[9-10]</sup>。细胞壁结合蛋白 Cwp2,也是 S 层蛋白之一。艰难梭菌菌株 *cwp2* 基因缺失突变株对人克隆结肠腺癌细胞 CaCo-2 的黏附能力比野生型低 (85.7 ± 14.0)%。*cwp2* 基因的失活还会导致毒素 TcdA 在体外释放增加,提示 Cwp2 在宿主细胞黏附中发挥重要促进作用<sup>[11]</sup>。最近的研究表明,在

细胞黏附过程中,多糖与蛋白质的相互作用可能也发挥了重要作用。2008 年, Ganeshapillai 等<sup>[12]</sup> 分析出艰难梭菌细胞表面多糖主要由五糖基 (PS-I) 和磷酸六糖基 (PS-II) 构成。Usenik 等<sup>[13]</sup> 发现 CWP6 与 CWP8 通过各自的三串联 CWB2 基序锚定到 PS II 结构上。类似的机制在炭疽芽孢杆菌中也有报道, CWP6s 可通过 S 层同源 (SLH) 基序的伪三聚体排列与丙酮基化的次生细胞壁多糖非共价结合。与炭疽杆菌一样,艰难梭菌 CWP-CWB-Motif 形成三聚体,能够与 PS-II 结合,可能是艰难梭菌与细胞壁结合蛋白识别,结合的关键结构<sup>[9-14]</sup>。用蛋白质三级结构预测软件 Swiss-Model (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 同源建模 SlpA、Cwp6、Cwp8 三级结构模型 (图 1), Cwp6 由 3 个 CWB2 基序串联组成, Cwp8 中结构域 2 (CWB2) 位于分子的左端,该结构域由残基 K94-S175 组成,由一条 α 螺旋,螺旋一侧的三条反平行 β 链和另一侧的发夹组成。SlpA 与 Cwp6、Cwp8 具有同样的 CWB2 串联基序。胶原蛋白 A,即 CbpA 属于附基质分子 MSCRAMM 家族,对胶原蛋白有黏附性,是艰难梭菌细胞壁锚定蛋白,可暴露在细菌表面,靶向人体肠道细胞胶原蛋白,从而对肠上皮细胞的黏附定植过程中具有一定程度的贡献<sup>[15]</sup>。以上这些说明细胞壁上的结合蛋白可能通过靶向识别并结合肠腺细胞上的信号蛋白使细菌的黏附能力增加。



注: A 为 SlpA, B 为 Cwp6, C 为 Cwp8。

图 1 SlpA、Cwp6、Cwp8 蛋白的 3 级结构

Fig. 1 Tertiary structure of SlpA, Cwp6 and Cwp8 protein

## 2 细胞表面蛋白

Cwp66 是艰难梭菌中第一个被发现并证明的黏附因子,也称为黏附素蛋白。2001 年, Waligora 等<sup>[16]</sup>研究证实艰难梭菌在经过 60 °C 热激处理后黏附细胞能力的增强是由细胞表面蛋白 Cpw66 所介导,这种热激后黏附能力增加的现象,受到 Cwp66 抗体抑制。有趣的是 Roberts<sup>[17]</sup>在 2003 年用反义 RNA 方法敲降艰难梭菌 *cwp66* 基因表达,发现敲降后的艰难梭菌在蛋白表达和黏附方面均无统计学差异。这个结果与 Waligora 等<sup>[16]</sup>的发现相悖,造成这种相悖结果可能的原因是反义 RNA 敲降 *cwp66* 的方法可能对该基因的表达抑制并不完全,*cwp66* 完全敲除可能真正解开 Cwp66 蛋白功能的“神秘面纱”。

## 3 热休克蛋白

热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)被认为是许多细菌病原体的主要抗原,一些微生物表达免疫原性 GroEL(HSP60)同源物,会引起宿主免疫原性反应。抗生素的使用让肠道菌群结构紊乱,艰难梭菌抗生素压力状态, GroEL 的表达会增加, GroEL 表达上升会增加艰难梭菌细胞黏附能力<sup>[18-19]</sup>。

## 4 纤维连接蛋白

纤维连接蛋白(fibronectin),是一种普遍存在于脊椎动物体液和细胞外基质中约 450 kDa 的糖蛋白。纤维连接蛋白结合蛋白(fibronectin-binding protein, Fbps)是一种黏附蛋白,主要存在于链球菌和葡萄球菌中。在革兰阳性菌中, Fbps 暴露于细菌表面,通过甘氨酸(LPXTG)与细胞壁锚定。2003 年, Hennequin 等<sup>[20-21]</sup>发现艰难梭菌与纤维连接蛋白、纤维蛋白原、胶原蛋白和玻璃体连接蛋白等细胞外基质蛋白结合,从而定植于宿主细胞。与纤维蛋白的结合是由于存在由 *fbp68* 基因编码的 Fbps,介导了细菌与宿主细胞的纤维连接蛋白结合,使细菌附着在组织上。

## 5 鞭毛蛋白

鞭毛(flagellum)是许多细菌都具有的帮助细

菌运动的器官,在很多病原菌产生毒素过程发挥了重要作用,如参与空肠弯曲杆菌和嗜肺军团菌的内化,参与空肠弯曲杆菌、幽门螺杆菌的细胞黏附及定植等<sup>[22-25]</sup>。一些研究者由此推测艰难梭菌在肠道的黏附定植与鞭毛相关蛋白有关,并做了一系列研究。Tasteyre 等<sup>[26]</sup>提出鞭毛蛋白 FliC 与 FliD 参与了 *C. difficile* 与细胞的黏附过程。Dingle 等<sup>[27]</sup>将编码 FliC 与 FliD 的基因 *fliC* 和 *fliD* 敲除后,艰难梭菌对肠腺细胞的黏附能力增加。Barketi 等<sup>[28]</sup>将 *fliC* 失活后,艰难梭菌毒性基因表达会上调。这些研究说明了艰难梭菌鞭毛蛋白的存在对黏附过程有抑制作用,进一步推测鞭毛对细菌黏附有阻碍作用。

## 6 脂蛋白

脂蛋白对诸如绿脓杆菌,布鲁氏菌等病原菌与宿主细胞的黏附有关,为研究脂蛋白 CD0873 与艰难梭菌黏附的关系,研究者使用 ClosTron 系统构建了突变株,突变株对 Caco-2(人肠腺上皮细胞系)细胞黏附能力显著降低,且 CD0873 抗体也能显著降低艰难梭菌对 Caco-2 细胞的黏附能力,显示了脂蛋白 CD0873 也参与了艰难梭菌的细胞黏附过程<sup>[29]</sup>。

## 7 总结与展望

近年来, CDI 受到越来越多的重视,尤其是在中国,随着艰难梭菌院内感染病例报道逐渐增多,越来越多的学者把目光转移到 CDI 致病机制的研究<sup>[30-32]</sup>。艰难梭菌会导致抗生素性腹泻产生,严重者可发展为危及生命的伪膜性结肠炎。CDI 过程中,艰难梭菌黏附于肠壁细胞是关键步骤,当艰难梭菌黏附于肠上皮细胞后,细胞中某种因子激活艰难梭菌毒性基因,大量产生 TcdA、TcdB 及二元毒素 CDT 毒素,这些毒素进一步内化进入肠腺细胞,破坏正常的细胞连接,与宿主免疫系统发生相互作用,最终导致 CDI 的发生。艰难梭菌黏附定植于宿主细胞是由多种黏附因子介导,目前研究发现,细胞壁结合蛋白 Cwp8、Cwp6、Cwp2, S 层蛋白 SlpA,细胞表面蛋白 Cwp66,热休克蛋白 GroEL,纤维连接蛋白 Fbp68,鞭毛蛋白 FliC、FliD,脂蛋白 CD0873 等参与了艰难梭菌与肠上皮细胞的黏附过程。这些黏附因子氨基酸组成中,大部分由赖氨酸

主导,且环状折叠占比较多(42.1%~58.7%),这提示了黏附作用可能和蛋白质的组成和折叠方式有关,但是具体的关联还亟待研究。对艰难梭菌黏附因子的作用进行研究,对于了解艰难梭菌吸附、入侵宿主和逃避宿主的免疫系统非常重要,这些黏附因子可以根据其功能制备成疫苗和各种检测试剂,如黏附因子 FliC 可做成疫苗,进行 CDI 的防治。目前,在仓鼠模型中以 FliC 胶囊作为口服疫苗预防 CDI 已经取得成功,若能够顺利应用到临床上,这将是一个防治 CDI 的重大突破<sup>[33]</sup>。而对于其他已知或未知黏附因子的研究,如黏附因子的表达调控过程、与细胞之间的相互作用,以及与毒素的表达调控关系尚不明确,还有待更加深入的研究。此研究的难点有 2 点:(1)艰难梭菌拥有的基因组过多,确定与 CDI 致病相关的基因种类、数量及名称极其困难;(2)对于基因功能的研究,基因敲除是一个非常重要的方式,而艰难梭菌基因敲除系统还不完善,有待研究者完善。

## 8 参考文献

- [1] EDWARDS A N, TAMAYO R, MCBRIDE S M. A novel regulator controls *Clostridium difficile* sporulation, motility and toxin production[J]. Mol Microbiol, 2016,100(6): 954-971.
- [2] SARTELLI M, MALANGONI M A, ABU-ZIDAN F M, et al. WSES guidelines for management of *Clostridium difficile* infection in surgical patients[J]. World J Emerg Surg, 2015,10:38.
- [3] MUNDY L S, SHANHOLTZER C J, WILLARD K E, et al. Laboratory detection of *Clostridium difficile* [J]. A comparison of media and incubation systems, Am J Clin Pathol, 1995,103(1):52-56.
- [4] BUFFIE C G, BUCCI V, STEIN R R, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile* [J]. Nature, 2015,517(7533):205-208.
- [5] CHENG J W, XIAO M, KUDINHA T, et al. The first two *Clostridium difficile* ribotype 027/ST1 isolates identified in Beijing, China-an emerging problem or a neglected threat[J]. Sci Rep, 2016, 6:18834.
- [6] LESSA F C, WINSTON L G, MCDONALD L C, et al. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States[J]. N Engl J Med, 2015,372(24):2369-2370.
- [7] WIEGAND P N, NATHWANI D, WILCOX M H, et al. Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection[J]. J Hosp Infect, 2011,81(1):1-14.
- [8] CORVER J, CORDO V, VAN LEEUWEN H C, et al. Covalent attachment and Pro-Pro endopeptidase (PPEP-1)-mediated release of *Clostridium difficile* cell surface proteins involved in adhesion[J]. Mol Microbiol, 2017, 105(5):663-673.
- [9] MERRIGAN M M, VENUGOPAL A, ROXAS J L, et al. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile* [J]. PLoS One, 2013,8(11):78404.
- [10] SAVARIAU-LACOMME M P, LEBARBIER C, KARJALAINEN T, et al. Transcription and analysis of polymorphism in a cluster of genes encoding surface-associated proteins of *Clostridium difficile* [J]. J Bacteriol, 2003,185(15):4461-4470.
- [11] BRADSHAW W J, KIRBY J M, ROBERTS A K, et al. Cwp2 from *Clostridium difficile* exhibits an extended three domain fold and cell adhesion in vitro [J]. FEBS J, 2017, 284(17):2886-2898.
- [12] GANESHAPILLAI J, VINOGRADOV E, ROUSSEAU J, et al. *Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units[J]. Carbohydr Res, 2008,343(4):703-710.
- [13] USENIK A, RENKO M, MIHELIC M, et al. The CWB2 cell wall-anchoring module is revealed by the crystal structures of the *Clostridium difficile* cell wall proteins Cwp8 and Cwp6 [J]. Structure, 2017, 25(3):514-521.
- [14] WILLING S E, CANDELA T, SHAW H A, et al. *Clostridium difficile* surface proteins are anchored to the cell wall using CWB2 motifs that recognise the anionic polymer PSII [J]. Mol Microbiol, 2015,96(3):596-608.
- [15] TULLI L, MARCHI S, PETRACCA R, et al. CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen [J]. Cell Microbiol, 2013, 15(10):1674-1687.
- [16] WALIGORA A J, HENNEQUIN C, MULLANY P, et al. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties [J]. Infect Immun, 2001, 69(4):2144-2153.
- [17] ROBERTS A P, HENNEQUIN C, ELMORE M, et al. Development of an integrative vector for the expression of antisense RNA in *Clostridium difficile* [J]. J Microbiol Methods, 2003, 55(3):617-624.
- [18] HENNEQUIN C, PORCHERAY F, WALIGORA-DU-

- PRIET A, et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence[J]. Microbiology, 2001, 147(1): 87–96.
- [19] HENNEQUIN C, COLLIGNON A, ANDKARJALAINEN T. Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress[J]. Microb Pathog, 2001, 31(5): 255–260.
- [20] HENNEQUIN C, JANOIR C, BARC M C, et al. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*[J]. Microbiology, 2003, 149(10): 2779–2787.
- [21] POILANE I, KARJALAINEN T, BARC M C, et al. Protease activity of *Clostridium difficile* strains[J]. Can J Microbiol, 1998, 44(2): 157–161.
- [22] DIETRICH C, HEUNER K, BRAND B C, et al. Flagellum of legionella pneumophila positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells[J]. Infect Immun, 2001, 69(4): 2116–2122.
- [23] GRANT C C, KONKEL M E, CIEPLAK W J R, et al. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of campylobacter jejuni in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures[J]. Infect Immun, 1993, 61(5): 1764–1771.
- [24] MCSWEEGAN E, AND WALKER R I. Identification and characterization of two campylobacter jejuni adhesins for cellular and mucous substrates [J]. Infect Immun, 1986, 53(1): 141–148.
- [25] EATON K A, SUERBAUM S, JOSEPHANS C, et al. Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes [J]. Infect Immun, 1996, 64(7): 2445–2448.
- [26] TASTEYRE A, BARC M C, COLLIGNON A, et al. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization[J]. Infect Immun, 2001, 69(12): 7937–7940.
- [27] DINGLE T C, MULVEY G L, ARMSTRONG G D. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters [J]. Infect Immun, 2011, 79(10): 4061–4067.
- [28] BARKETI-KLAI A, MONOT M, HOYS S, et al. The flagellin FliC of *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during in vivo infection[J]. PLoS One, 2014, 9(5): 96876.
- [29] KOVACS-SIMON A, LEUZZI R, KASENDRA M, et al. Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*[J]. J Infect Dis, 2014, 210(2): 274–284.
- [30] PRATTINGEROVA J, SARVIKIVI E, OLLGREN J, et al. Increased hospital-specific nosocomial rates of *Clostridium difficile* infection in finnish hospitals with high prevalence of imported cases at admission[J]. J Hosp Infect, 2018, 102(2): 169–171.
- [31] HONG W, CHENG Y, RAO F, et al. Co-infection of *Clostridioides (Clostridium) difficile* GMU1 and *Bacillus cereus* GMU2 in one patient in Guizhou, China[J]. Anaerobe, 2018, 54: 159–163.
- [32] LI X, GAO X, HU H, et al. Clinical efficacy and microbiome changes following fecal microbiota transplantation in children with recurrent *Clostridium Difficile* infection [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2622.
- [33] BRUXELLE J F, TSAPIS N, HOYS S, et al. Protection against *Clostridium difficile* infection in a hamster model by oral vaccination using flagellin FliC-loaded pectin beads[J]. Vaccine, 2018, 36(40): 6017–6021.

(2019-07-08 收稿, 2019-10-08 修回)

编辑: 刘 平