

· 基础研究 ·

不同寡营养条件下饥饿期粪肠球菌基因转录水平的体外研究

刘亚文, 陆亚倩, 戴海峰, 李 谨*, 王 娟*

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 在体外模拟根管致病压力条件下, 探究不同寡营养条件对饥饿期粪肠球菌基因转录水平的影响。方法: 将粪肠球菌标准菌株(ATCC 29212)诱导至饥饿期后培养于不同寡营养条件下(0%、0.05%、0.15%和0.25%葡萄糖浓度的培养液), 1周后对其基因转录水平及代谢通路进行分析。结果: 转录组结果显示, 与0.25%相比, 0.15%葡萄糖浓度基因转录水平没有明显变化, 0.05%及0%葡萄糖浓度基因转录水平变化明显, 以0%葡萄糖浓度变化最为显著, 在GO功能上, 显著富集于代谢进程及催化活性, 在KEGG功能上并无显著差异, 排名前3的代谢通路有ABC转运器、磷酸转移酶系统、氨基酸生物合成。结论: 寡营养条件下, 粪肠球菌基因转录水平的变化可能和其在恶劣生存条件下仍能生存和致病有关, 在本研究基础上将进一步探究粪肠球菌相关功能基因和调控通路在致病过程中的机制。

[关键词] 粪肠球菌; 葡萄糖饥饿应激; 转录组测序

[中图分类号] R780.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)05-668-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190508

In vitro study on the gene transcriptional level of *Enterococcus faecalis* during starvation phase under different oligotrophic conditions

Liu Yawen, Lu Yaqian, Dai Haifeng, Li Jin*, Wang Juan*

Jiangsu Key Laboratory of Oral Disease, Department of Endodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the *in vitro* effects of different oligotrophic conditions on the transcriptional level of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) during starvation phase under simulated root canal pressure. **Methods:** The *E. faecalis* (ATCC 29212) was induced to starvation phase and cultured under different oligotrophic conditions (TSB with 0%, 0.05%, 0.15%, and 0.25% glucose), gene transcription levels and metabolic pathways were measured after one week. **Results:** The results showed that there was no significant change in the gene transcription level in the 0.15% glucose group compared with the 0.25% group. The gene transcription level in the 0.05% glucose group and particular in the 0% glucose group changed significantly. In the 0% glucose group, GO function mostly involved in metabolic processes and catalytic activity, and there was no significant difference in KEGG pathway. The top three metabolic pathways were ABC transporter, PTS system and amino acid biosynthesis. **Conclusion:** The changes in gene transcription level of *E. faecalis* under oligotrophic conditions may be related to the survival and pathogenicity of *E. faecalis* under starvation conditions. We will further explore the mechanism of related functional genes and regulatory pathways of *E. faecalis* in the pathogenesis of the disease on the basis of this study.

[Key words] enterococcus faecalis; glucose starvation stress; transcriptome sequencing

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 668-672]

[基金项目] 国家自然科学基金(81300868); 江苏省卫生厅科研课题资助(H201433); 江苏省干部保健科研项目(BJ15030)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lijn6806@163.com; candy1249@126.com

持续性根尖周炎由细菌感染引起, 表现为患牙根尖区反复肿胀不适和进行性根尖周骨质破坏, 是造成牙槽骨缺损和失牙的重要原因^[1], 也是牙体牙髓科医师面临的临床棘手问题。粪肠球菌在持续性感染根管内的检出率较高, 可高达77%, 被认为

是持续性根尖周炎的主要致病菌之一^[2-3]。

粪肠球菌在恶劣条件下能够进入饥饿状态,并以生物膜形式抵抗持续性根尖周炎患牙根管系统内寡营养、强碱性的微环境^[4-5]。葡萄糖是维持细菌生长的重要能量物质,能够影响生物膜的形成^[6],有研究表明葡萄糖的浓度可影响粪肠球菌的生长速度和最大生长量^[7]。处于低代谢水平的饥饿状态粪肠球菌可潜伏于病灶区,在适宜条件下可恢复致病性^[5,8],细菌的微进化可能是其能在这种选择压力环境下生存和致病的机制之一,这种基因水平的变异最终导致其致病性和表型的改变^[9-10]。

本研究拟在体外模拟根管致病压力条件,利用RNA-seq技术探究不同寡营养条件对饥饿期粪肠球菌基因转录水平的影响,从而对进一步探索粪肠球菌在持续性根尖周炎中致病的分子机制提供线索和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

标准菌株粪肠球菌(ATCC 29212)由江苏省口腔疾病研究重点实验室提供。乳酪消化大豆胨琼脂(tryptic soya gar, TSA)、胰蛋白、多聚蛋白胨、酵母提取粉(Oxoid公司,英国);氯化钠、葡萄糖(分析纯,南京劳吉舍生物工程有限公司);羊血(南京迈迪特生物化学有限公司);RNA提取试剂盒(北京BioTeke Corporation公司);紫外分光光度计(Spectramax公司,美国);需氧恒温细胞培养箱(Shell Lab公司,美国);超净工作台(苏州苏净安泰),封口膜(BEMIS公司,美国),HiSeq 2000高通量测序仪(Illumina公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配制

配制含0%、0.05%、0.15%、0.25%葡萄糖的胰蛋白胨大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)培养基:胰蛋白胨(17 g/L)、多聚蛋白胨(3 g/L)、氯化钠(5 g/L)、酵母提取粉(1 g/L)、磷酸氢二钾(2.5 g/L),分别含葡萄糖质量浓度为0、0.5、1.5、2.5 g/L;高温高压(121 °C、1.5 MPa)灭菌15 min。4 °C冰箱中保存,1周内使用。

1.2.2 饥饿生存曲线绘制

参考Heim等^[5]的方法,吸取3 mL单菌落过夜培养种子液至30 mL TSB中,摇床2 h后,取对数生长期菌液加入18个EP管,4 000 r/min,4 °C离心15 min,沉淀洗涤2次,溶于等体积PBS溶液,37 °C避光厌氧

培养48 h。0、1、2、3、4、8、14、24、28 d后,活菌梯度稀释计数法计数,绘制饥饿期生长曲线,实验重复3次。

1.2.3 饥饿期粪肠球菌在不同寡营养条件下的培养

饥饿生存曲线结果显示48 h后粪肠球菌进入饥饿期。故将粪肠球菌接种于60 mm培养皿以形成生物膜,48 h后PBS溶液洗涤3次以去除未黏附细菌。将形成的粪肠球菌生物膜培养于不同寡营养压力环境下1周,37 °C恒温箱中厌氧培养,每24 h更换新鲜培养基,促进粪肠球菌生物膜结构的形成。设0.25%葡萄糖浓度的TSB组为阴性对照。

1.2.4 不同寡营养条件及饥饿期粪肠球菌转录组检测和比较分析

饥饿期生物膜粪肠球菌在不同寡营养环境下培养1周后,剧烈吹打搜集生物膜细菌,RNA试剂盒分离总RNA。使用Truseq™ RNA sample prep Kit进行文库制备;使用Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit试剂盒(Epicentre,美国)去除rRNA;纯化mRNA后进行片段化,反转录构建cDNA文库。连接Truseq™ RNA sample prep Kit中带有index的接头,2%低熔点琼脂糖胶选择300 bp左右片段,回收纯化(Qiagen公司,德国);PCR扩增,2%琼脂糖胶回收目的条带。TBS380 Picogreen(Invitrogen公司,美国)定量,在Illumina HiSeq 2000平台上进行测序。

1.2.5 转录组生物信息学分析

原始图像数据通过Base Calling转换为序列数据,用SeqPrep和Sickle软件过滤原始序列数据以获得高质量的测序数据。使用bowtie软件^[11],质控后得到的高质量序列与指定的参考基因组比对,基于它们与蛋白质家族的同源性,预测基因本体论(Gene Ontology, GO)(<http://www.geneontology.org/>);基于京都基因和基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG),通过使用BLAST算法(blastx / blastp2.2.24+),定位基因,以找到其潜在的生物学通路^[12]。然后进行多假设检验,基因的表达丰度以序列中的reads数表示,比较不同样品间基因表达差异,分析转录组整体的表达情况。使用标准RPKM法(reads per kb per million reads)计算基因表达量。基于RPKM / FPKM[每百万个外显子模型的每千碱基读数/(片段)]获得差异表达基因(DEGs)纠正P值。假发现率FDR值 ≤ 0.05 且 $|\log FC| \geq 1$ 被认为是差异表达^[13]。

1.3 统计学方法

使用SPSS19.0软件对数据进行统计学分析,进行正态性和方差齐性检验,实验重复3次,对饥饿期

细菌数量进行单因素方差分析,定性资料采用率或构成比进行描述。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 粪肠球菌饥饿期生长周期的观察

细菌数量在饥饿诱导2 d内下降明显,至48 h从 10^9 CFU/mL下降至 10^8 CFU/mL,之后的1周内活菌数量维持稳定,随后活菌数量继续下降,在诱导1个月内可降至 10^6 CFU/mL,故本研究以对数期粪肠球菌经PBS诱导48 h后的细菌作为饥饿期粪肠球菌进行后续研究(图1)。

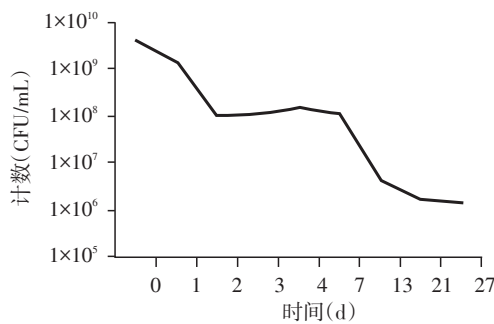


图1 粪肠球菌饥饿期生长曲线

Figure 1 Growth curve of *Enterococcus faecalis* in starvation phase

2.2 粪肠球菌不同寡营养状态基因转录水平的改变

2.2.1 各组样本间相关性比较

根据基因FPKM定量结果,计算出所有样品两两间相关性,相关系数越接近1,表明样品之间相似度越高。0%葡萄糖组与0.25%葡萄糖组差异最大,0.15%组与0.25%组相似,0.05%组与0%组相似,可见不同浓度梯度葡萄糖对粪肠球菌基因转录水平有影响意义,随着葡萄糖浓度递减,相关性也呈递减趋势(表1)。本研究后续主要对比差异最明显的

0%与0.25%葡萄糖组基因转录水平的变化,以探究不同寡营养条件对饥饿期粪肠球菌基因转录水平的影响。

表1 4组样本间相关性系数

Table 1 Correlation coefficient among samples of four groups (r)

样本	0.25%	0.15%	0.05%	0.00%
0.25%	1.000			
0.15%	0.924	1.000		
0.05%	0.686	0.780	1.000	
0.00%	0.668	0.758	0.945	1.000

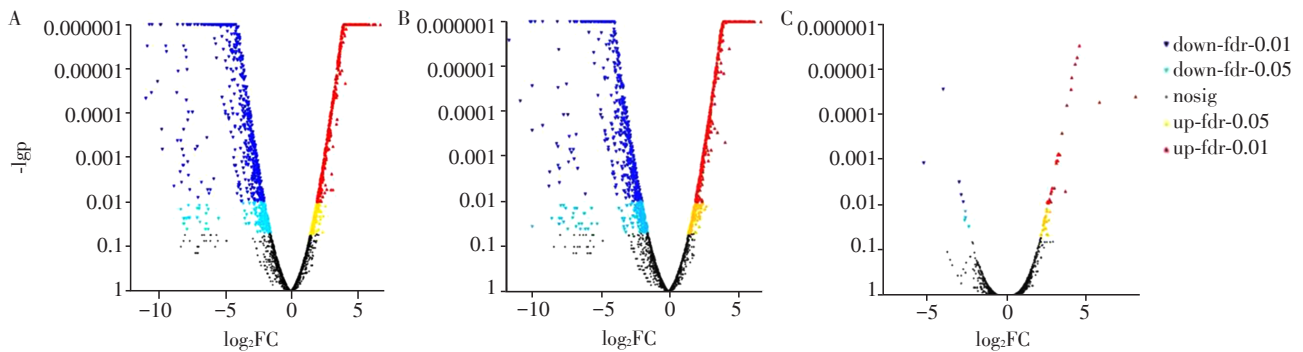
2.2.2 各组转录组表达差异分析

差异调节基因的火山图可以显示差异调节基因变化的倍数以及正向和负向分布情况。结果显示,0%、0.05%与0.25%对比,大多数基因的 \log_2FC 至少为2,而少数基因的 \log_2FC 在1~2之间,正负 \log_2FC 在-11.9~+6.6之间(图2A, B)。0.15%与0.25%对比,差异表达基因较少,但差异调节的基因具有至少2的 \log_2FC ,正负 \log_2FC 在-4~+4.6之间(图2C)。

与0.25%葡萄糖组相比,0%和0.05%葡萄糖组部分基因表达量下调10倍以上:其中0%组下调的基因有膜蛋白、50S核糖体蛋白L33、钴ABC转运体渗透酶、铜输出ATP酶、IS 256家族转座酶、假定蛋白;0.05%组下调的基因有假定脂蛋白、生物素合成蛋白BioY、硫氧还蛋白、假定蛋白、50S核糖体蛋白L33、IS 256家族转座酶、PefM蛋白。50S核糖体蛋白L33、IS 256家族转座酶在两组中都显著下调。

2.2.3 差异基因功能注释分析

GO功能上,与0.25%组相比,0%组中上下调基因多集中在细胞过程、代谢进程、单细胞过程、结合、催化活性。KEGG通路上,多数生物合成、次级



A:0% vs. 0.25%; B:0.05% vs. 0.25%; C:0.15% vs. 0.25%。蓝色代表下调基因,红色代表上调基因。

图2 差异调节基因火山图

Figure 2 The volcanoes of differential regulatory genes

代谢相关基因下调,如泛醌及其他萜类醌生物合成,精氨酸、单酰胺菌素、碳青霉烯、精氨酸与脯氨酸代谢、酪氨酸代谢等;多数初级代谢相关基因上调,包括初级和次级胆汁酸生物合成,亮氨酸;缬氨酸和异亮氨酸降解等相关基因;糖酵解/糖异生成途径基因表达多数上调。

2.2.4 差异基因功能富集分析

通过对GO富集分析产生的GO term进行可视化分析,可以看出这些功能之间的相互关系。通常使用富集得到的P值对这些功能进行颜色标注,直观地看出在哪些功能中存在的差异性最显著。0%与0.25%葡萄糖组相比,代谢进程及催化活性等功能存在明显差异,与GO功能注释结果类似。

2.2.5 4组KEGG通路预测

KEGG通路上,排名前5的通路是ABC转运器、磷酸转移酶系统、氨基酸生物合成、嘌呤代谢、碳代谢,但没有显著性差异。

3 讨论

葡萄糖是维持细菌生长的重要物质能量,Gao等^[14]认为虽然低营养成分不符合粪肠球菌生长的要求,但它有助于抵抗粪肠球菌进入饥饿状态。本研究也发现葡萄糖的浓度可影响粪肠球菌的生存和致病,高质量分数葡萄糖有利于粪肠球菌表面蛋白的合成^[7,15],从而促进生物膜的形成,粪肠球菌也可通过降低代谢水平,减弱次级代谢产物的转运利用来适应低质量分数葡萄糖环境^[16]。随着外界营养成分的减少,细菌戊糖磷酸、糖酵解代谢途径基因多数上调,表明糖代谢可能增强,对产能物质的利用率增高,所产生的能量一方面用于维持基础代谢,一方面用于生物膜内新蛋白质的合成。

本研究中ABC转运器、PTS转运系统等表达水平变化显著。ABC转运通路可能涉及铁离子及多种蛋白的转运,致病菌中的转运体在营养获取、耐药性及其他功能中起着重要作用^[17],这些功能都是细菌在宿主体内存存所必需的。磷酸转移酶系统不仅作为糖磷酸化系统发挥作用,而且还作为复杂的蛋白激酶系统调节各种代谢过程并控制众多基因的表达^[18]。氨基酸代谢相关基因表达水平的变化贯穿始终,表明细菌不断调整蛋白合成速率及种类,以适应饥饿期寡营养的环境。

基因表达是动态的,在营养物质供应、渗透压、pH值变化等的胁迫下,基因的表达情况不同^[19]。通过研究不同环境下基因的表达情况,能够揭示细胞

对外界环境变化做出的响应,分析不同状态下的基因转录水平变化,从而进一步探讨病原菌感染宿主的机制等。细菌转录组的分析能够直接提供基因调控和基因表达等信息,从而为确定致病菌致病机制提供线索和依据。本研究应用的转录组测序技术又称RNA-seq技术,是特定细胞或组织在特定时间或状态下转录出来的所有RNA的集合^[20]。RNA-seq直接对生物样本的cDNA进行建库测序,从而获得来自不同基因的mRNA片段在特定样本中的含量,通过分析转录本的结构和表达水平,发现稀有转录本,预测未知转录本,识别可变剪接位点,进行SNP分析及基因融合鉴定,从而提供全面的基因差异位点和代谢通路调控信息^[21]。

本研究中,50S核糖体蛋白L33、IS 256家族转座酶在0%及0.05%葡萄糖浓度组中都显著下调。编码核糖体蛋白L33的基因统称为rpmG基因,该基因是蛋白质合成调控的相关基因^[22],本实验结果发现rpmG基因表达下调,说明低浓度葡萄糖组中蛋白质合成能力可能降低,Ehrthaler等^[23]通过对稳定转化的烟草质体基因组构建S15、L33和L36核糖体蛋白的双敲除模型,发现该基因的缺失会给DNA复制、转录和蛋白质的合成带来影响。IS 256编码转座酶,广泛存在于多重耐药葡萄糖菌和肠球菌的基因组中,具有多拷贝序列元件以及形成复合氨基糖苷类抗性介导转座子Tn4001的末端^[24]。Perez等^[25]将IS 256 DNA片段整合到粪肠球菌V583菌株fsr基因座中,同源重组后产生突变体可抑制明胶酶活性并防止生物膜形成,发现IS 256插入fsrC导致组氨酸激酶途径被截断,GBAP信号转导通路受损,从而阻止gelE和生物膜的表达。生物膜相关基因和调节因子似乎是IS 256在粪肠球菌中整合的重要热点。后期可对该两个基因对粪肠球菌生存和致病的调控机制进行深入分析。

粪肠球菌在饥饿条件下,能够主动调节自身代谢途径以维持生命活动,各种氨基酸的缺乏使蛋白质合成受阻,细菌会关闭大量代谢进程,以抵御不良条件。探究粪肠球菌相关功能基因和调控通路的变化,可为后期从分子水平上开展粪肠球菌在持续性根尖周炎中作用的基础研究开拓思路。

[参考文献]

- [1] Jr SJ, Rôças IN, Ricucci D, et al. Causes and management of post-treatment apical periodontitis[J]. Br Dent J, 2014, 216(6): 305-312
- [2] Jr SJ, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis

- of microorganisms associated with failed endodontic treatment[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004, 97(1):85
- [3] Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between enterococcus faecalis and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: A systematic review [J]. *J Endod*, 2015, 41(8):1207-1213
- [4] Leron K, Mor S, Shaul B, et al. Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals[J]. *J Oral Microbiol*, 2016, 8(1):321-327
- [5] Heim S, Lleo MDM, Bonato B, et al. The viable but non-culturable state and starvation are different stress responses of enterococcus faecalis, as determined by proteome analysis[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(23):6739-6745
- [6] 冉淑君, 鄂佳, 朱彩莲, 等. 不同理化条件对粪肠球菌生长周期及生物膜形成能力的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2013, 48(9):529-534
- [7] Ran S, Jiang W, Zhu C, et al. Exploration of the mechanisms of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in glucose starvation environments [J]. *Aust Dent J*, 2015, 60(2):143-153
- [8] 周如玉, 平逸帆, 张元, 等. 口腔综合治疗台水路系统中假单胞菌属污染状况的检测[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(4):452-457
- [9] Aguirre-Santoro J, Michelangeli FA, Stevenson DW. Molecular phylogenetics of the *Ronnbergia* Alliance (Bromeliaceae, Bromelioideae) and insights into their morphological evolution [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2016, 100(1):1-20
- [10] O'brien S, Hodgson DJ, Buckling A. The interplay between microevolution and community structure in microbial populations [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(4):821-825
- [11] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome [J]. *Genome Biol*, 2009, 10(3):R25
- [12] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V. BLAST plus: Architecture and applications [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(1):421
- [13] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5):511-515
- [14] Gao Y, Jiang X, Lin D, et al. The Starvation resistance and biofilm formation of enterococcus faecalis in coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus* [J]. *J Endod*, 2016, 42(8):1233-1238
- [15] Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, et al. Effects of glucose on fsr-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis* [J]. *J Infect Dis*, 2004, 190(5):967-970
- [16] 刘红艳, 韦曦, 凌均荣. 饥饿状态粪肠球菌生物膜胞外多糖的合成能力[J]. *中华口腔医学研究杂志(电子版)*, 2012, 6(5):16-20
- [17] Cascorbi I, Haenisch S. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 596:95-121
- [18] Jr MHS, Reizer J. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 13(5):755-764
- [19] Morschhäuser J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen [J]. *J Microbiol*, 2016, 54(3):192-201
- [20] Stavros B, Gili ZS, Eran E. Use of metatranscriptomics in microbiome research [J]. *Bioinform Biol Insights*, 2016, 10(10):19-25
- [21] Choi SC. On the study of microbial transcriptomes using second- and third-generation sequencing technologies [J]. *J Microbiol*, 2016, 54(8):527-536
- [22] Aseev LV, Koledinskaya LS, Boni IV. Regulation of ribosomal protein operons rplM-rpsI, rpmB-rpmG, rplU-rpmA at the transcriptional and translational levels [J]. *J Bacteriol*, 2016, 198(18):2494-2502
- [23] Ehrnthaler M, Scharff LB, Fleischmann TT, et al. Synthetic lethality in the tobacco plastid ribosome and its rescue at elevated growth temperatures [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(2):765-776
- [24] Hennig S, Ziebuhr W. Characterization of the Transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements [J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(16):4153-4163
- [25] Perez M, Callesenriquez M, Del RB, et al. IS256 abolishes gelatinase activity and biofilm formation in a mutant of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 [J]. *Can J Microbiol*, 2015, 61(7):517-519

[收稿日期] 2018-08-27