

肺炎克雷伯菌毒力基因与 TLR4 表达的相关性研究

王鹤鸣, 刘 周, 王珊珊, 唐 伟, 周 强

摘要 目的 分析肺炎克雷伯菌(KP)的毒力基因及耐药性分布,研究高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)与经典肺炎克雷伯菌(cKP)感染的肺炎患者 Toll 样受体 4(TLR4)在血清及细胞水平的表达及 TLR4 与临床预后的相关性。方法 收集患者菌株及血清,检测菌株毒力基因及耐药性,将所收集临床菌株分为 hvKP 组与 cKP 组,ELISA 方法检测患者血清中的 TLR4 水平,比较各组 TLR4 表达的差异及与患者临床肺炎评分的相关性,并通过 hvKP 与 cKP 菌株分别感染人肺泡上皮细胞 A549,qRT-PCR 方法检测 TLR4 的 mRNA 表达水平。结果 hvKP 组毒力基因中 kfu、rmpA1、rmpA2 的检出率最高,分别达 100%、87.8%、80.5%。hvKP 组的血清 TLR4 水平相比 cKP 组明显升高,在细胞 mRNA 水平检测到同样结果,并且 TLR4 水平与临床预后的 PSI 评分、CURB-65 评分呈正相关。结论 rmpA1、rmpA2 及 magA 基因联合诊断 hvKP 准确性较高,hvKP 感染引起血清及细胞水平 TLR4 的更高表达,TLR4 水平与临床预后评分呈正相关性,血清 TLR4 水平可能作为 KPN 患者尤其是 hvKP 感染的患者诊断及预后的检测指标。

关键词 肺炎克雷伯菌;毒力基因;高毒力;Toll 样受体 4;A549

中图分类号 R 378.99

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1328-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.029

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是社区获得性感染和医院感染最常见的革兰阴性菌,检出率分别可达 6.8% 和 6.69%^[1]。KP 根据毒力特点可分为经典肺炎克雷伯菌(classic *K. pneumoniae*, cKP)和高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *K. pneumoniae*, hvKP)。hvKP 的毒力显著高于 cKP,它可以侵害健康的年轻个体,致死率达 3%~32%^[2]。目前研究多将荚膜多糖合成相关基因 ≥ 2 个阳性或铁

载体相关基因 ≥ 3 个阳性的 KP 菌株定义为 hvKP^[3]。肺上皮细胞可以分泌 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)^[4]、细胞因子等以应对肺炎克雷伯菌肺炎(*K. pneumoniae pneumonia*, KPN)。TLRs 接收相关微生物配体信号并启动下游级联反应,其中 TLR4 参与介导炎症反应、氧化应激、诱导细胞凋亡等,但可能引发过度的炎症反应^[5]。该研究拟通过分析临床菌株毒力基因等流行病学特征,进而阐明 hvKP 及 cKP 感染的患者体内或细胞水平 TLR4 的表达水平及其与临床预后的差异,为 KPN 的临床诊断及治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选取 2020 年 10 月—2021 年 10 月间安徽医科大学第二附属医院收治的 85 例 KPN 患者,并收集同期收治的 55 例体检健康者作为对照。收集培养出的 KP 菌株 65 株,并收集检出 KP 患者的血清与临床病历资料。

1.1.2 纳入标准 符合《中国成人社区获得性肺炎临床实践指南》^[6-7],在痰培养或肺泡灌洗液中检出 KP,外周血检查:白细胞总数、中性粒细胞以及 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)增高;结合患者 X 线或 CT 检查,明确诊断为 KPN。

1.1.3 实验仪器及试剂 全自动细菌分析仪(法国 Biomerieux 公司);生物安全柜(力新仪器上海有限公司);细菌多点接种仪(法国 Interscience 公司);聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪器(德国 Biometra 公司);凝胶成像仪(北京大龙有限公司);PCR 引物(上海生工生物公司);酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物有限公司),人肺泡上皮细胞 A549 来自中国科学院(上海)。

1.2 方法

1.2.1 毒力基因检测 用煮沸法提取各菌株的 DNA,采用 PCR 方法检测 8 种毒力基因^[8],包括:①荚膜多糖合成和调控相关基因 rmpA1、rmpA2、magA;②铁载体系统相关基因 iucA、kfu、iroN、iroB;③

2022-05-29 接收

基金项目:安徽省转化医学研究基金(编号:2021zhyc-C47);安徽省自然科学基金(编号:1908085QH366)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:王鹤鸣,女,硕士研究生;

周 强,男,副教授,主任技师,硕士生导师,责任作者,
Email:zhouqiang1973@163.com

菌毛合成相关基因 *mrkD*^[5-6]。毒力基因的引物序列参照表 1。各菌株的 PCR 产物进行凝胶电泳后记录结果并进行比对。

表 1 KP 毒力基因的 PCR 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	退火温度(℃)	bp
<i>rmpA1</i>	F: GAGTAGTTAATAAATCAATAGCAAT	50	516
	R: CAGTAGGCATTGCAGCA		
<i>rmpA2</i>	F: GTGCAATAAGGATGTTACATTA	50	535
	R: GGATGCCCTCCTCCTG		
<i>iucA</i>	F: AATCAATGGCTATTCCCGCTG	59	239
	R: CGCTTCACCTCTTTCACTGACAGG		
<i>iroN</i>	F: GCTTATTCTCCCCAACCC	58	829
	R: TCAGAAATGAACTACCGCCC		
<i>kfu</i>	F: GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	55	797
	R: TTTCGTGTGGCCAGTCACTC		
<i>iroB</i>	F: ATCTCATCATCTACCTCCGCTC	65	235
	R: GGTTGCCGCTCGTTTTCAT		
<i>magA</i>	F: GGTGCTCTTTACATCATTCG	59	1282
	R: GCAATGGCCATTGCGCTTAG		
<i>mrkD</i>	F: TTCTGCACAGCGGTCCC	64	340
	R: GATACCCGGCGTTTTCGTTAC		

1.2.2 药敏试验 敏感与耐药判读参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100-S26 文件 2018 年推出的判读标准^[9]。采用琼脂平板稀释法测定菌株对于 15 种常用抗菌药物的最低抑菌浓度。

1.2.3 ELISA 实验 收集患者外周血清,通过毒力基因检测将实验对象分为 cKP 组与 hvKP 组,健康体检者血清作为健康对照组,采用 ELISA 方法测定两实验组及对照组外周血清 TLR4 的表达水平,检测过程均严格按照试剂盒说明书及仪器操作指南进行。

1.2.4 KP 侵染 A549 细胞实验 A549 细胞用含有 10% 胎牛血清和青霉素-链霉素的 1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 箱中培养。当细胞生长至 80%~90% 密度时,铺 12 孔板,更换为不含双抗的培养基。

实验将临床培养鉴定出的 hvKP、cKP 两种菌株,分别于哥伦比亚血琼脂平板上过夜生长后,刮取单个菌落于 LB 培养基中,37℃ 温箱中摇动培养,分光光度计测量 600 nm 吸光度=0.35,此时细菌处于生长指数期,10 000 r/min 离心 15min,无菌生理盐水清洗重悬,通过稀释涂板法计菌落数量,在 A549 细胞 12 孔板中,每孔加入 4 μl 菌液,测得 MOI = 100:1。

1.2.5 qRT-PCR 在 12 孔板中使用 hvKP、cKP 分别侵染 A549 细胞,设立未感染的空白细胞为对照

组,在 CO₂ 培养箱中培养 6 h 后,收集细胞,用 TRIzol 试剂提取细胞 RNA,TLR4 引物序列:上游 5'-AATCTAGAGCACTTGGACCTTTCC-3',下游 5'-GGGTTTCAGGACAGGTCTAAAGA-3'。在 10 μl 反应体系中使用 1 μl 总 RNA 进行 qRT-PCR 反应。采用比较阈值循环(CT)方法,通过计算与内参基因 GAPDH 比值来确定目的基因的表达水平。每组重复实验 3 次。

1.2.6 临床严重程度及预后评分 根据医院病历系统获取病人基本信息与临床特征如年龄、体温、脉搏、呼吸频率、血压、PH、血尿素氮、血糖、血钠、红细胞比积、氧分压及相关影像学表现等,根据临床 PSI 评分^[10]及 CURB-65 评分^[11]对 KPN 患者进行分级,分析患者血清 TLR4 水平与临床肺炎评分之间的相关性。本研究已获安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,Shapiro-Wilk 方法进行正态性检验,所获数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组定量数据均数比较采用 *t* 检验,多组样本差异性比较使用方差分析,分类变量之间的比较采用卡方检验,等级相关分析采用 Spearman 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毒力基因检测结果 hvKP 组中毒力基因阳性率最高的前 3 种为: *kfu* (100%), *rmpA1* (87.8%), *rmpA2* (80.5%)。与 cKP 组相比,毒力基因有统计学差异的是 *rmpA1* ($P = 0.000$), *rmpA2* ($P = 0.000$), *magA* ($P = 0.000$), *ironB* ($P = 0.000$)。其他基因虽差异无统计学意义,但在 hvKP 组中的阳性率均高于 cKP 组(表 2)。hvKP 及 cKP 基因电泳条带结果见图 1。

表 2 hvKP 和 cKP 的毒力基因比较[n(%)]

毒力基因	株数	hvKP (n=41)	cKP (n=44)	χ^2 值	P 值
<i>rmpA1</i>	43(50.6)	36(87.8)	7(15.9)	43.888	0.000
<i>rmpA2</i>	45(52.9)	33(80.5)	12(27.3)	24.124	0.000
<i>iucA</i>	36(42.4)	19(46.3)	17(38.6)	0.516	0.473
<i>iroN</i>	11(12.9)	6(14.6)	5(11.4)	0.201	0.654
<i>kfu</i>	85(100)	41(100)	44(100)	-	-
<i>iroB</i>	25(29.4)	21(51.2)	4(9.1)	18.143	0.000
<i>magA</i>	17(20)	17(41.5)	0	22.805	0.000
<i>mrkD</i>	81(95.3)	40(97.6)	41(93.2)	0.908	0.341

2.2 药敏实验结果 药敏结果显示本院所收集肺炎克雷伯杆菌对替加环素最敏感,敏感率为 97.6%;

表3 hvKP 和 cKP 的抗生素敏感性比较[$n(\%)$]

药物	株数	hvKP ($n=41$)	cKP ($n=44$)	χ^2 值	P 值
替加环素	83 (97.6)	39 (95.1)	44 (100)	2.198	0.138
阿米卡星	68 (80.0)	38 (92.7)	30 (68.2)	7.963	0.005
哌拉西林/他唑巴坦	60 (70.6)	38 (92.7)	21 (47.7)	20.202	<0.001
阿莫西林/克拉维酸	62 (72.9)	37 (90.2)	25 (56.8)	12.014	0.001
头孢呋辛	40 (47.1)	26 (63.4)	14 (31.8)	8.505	0.004
头孢他啶	55 (64.7)	35 (85.4)	20 (45.5)	14.803	<0.001
头孢曲松	45 (52.9)	32 (75.6)	13 (29.5)	20.014	<0.001
头孢吡肟	56 (65.9)	34 (82.9)	22 (50.0)	10.237	0.001
头孢西丁	51 (60.0)	33 (80.5)	18 (40.9)	13.853	<0.001
头孢呋辛酯	40 (47.1)	26 (63.4)	14 (34.1)	8.505	0.004
厄他培南	60 (70.6)	39 (95.1)	21 (47.7)	22.963	<0.001
亚胺培南	59 (69.4)	37 (90.2)	22 (50.0)	16.189	0.000
左氧氟沙星	57 (67.1)	37 (90.2)	20 (45.5)	19.274	0.000
复方新诺明	58 (68.2)	29 (70.7)	29 (65.9)	0.228	0.633
头孢哌酮/舒巴坦	61 (71.8)	37 (90.2)	24 (54.5)	20.512	0.000

其次是阿米卡星和阿莫西林/克拉维酸,敏感率分别为 80.0% 及 72.9%。在 hvKP 中对替加环素最敏感,敏感率为 95.1%。cKP 的头孢曲松、厄他培南、左氧氟沙星、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦耐药性明显高于 hvKP (表 3)。

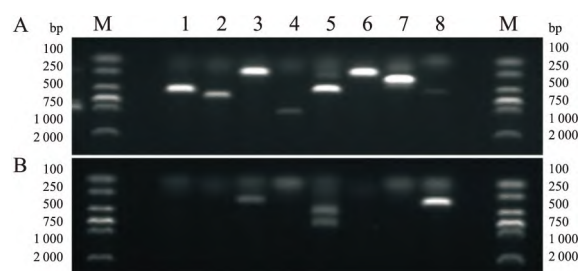


图1 KP 毒力基因电泳条带结果

A: hvKP 毒力基因条带; B: cKP 毒力基因条带; M: Marker; 1: *rmpA1*; 2: *rmpA2*; 3: *iucA*; 4: *iroN*; 5: *hly*; 6: *iroB*; 7: *magA*; 8: *mrkD*

2.3 ELISA 实验结果 通过对 KP 菌株毒力基因检测,将收集的临床血清分为 hvKP 组及 cKP 组。血清 TLR4 的 ELISA 结果显示,相比 cKP 组, hvKP 组的血清 TLR4 水平明显高于健康对照组 (图 2), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 qRT-PCR 实验结果 qRT-PCR 法检测显示,相比于空白细胞对照,在 hvKP 感染 6 h 后的 A549 细胞中,TLR4 的 mRNA 表达水平明显升高,而在 cKP 感染的细胞中 TLR4 升高不明显 (图 3), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 临床肺炎评分预后分析 对 KPN 患者根据临床肺炎评分进行分级后,结果显示患者血清 TLR4 水平与 PSI 评分呈正相关性,PSI 评分越高的患者,

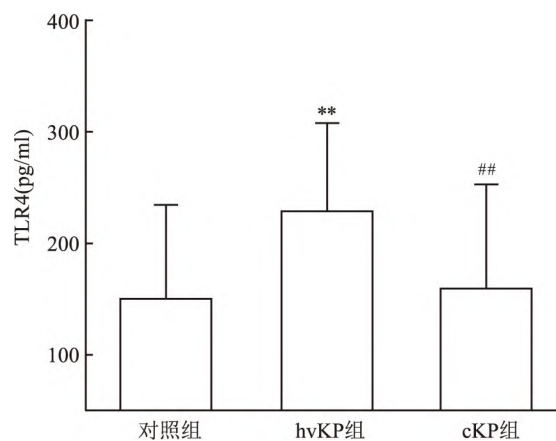


图2 hvKP、cKP 感染的患者及健康体检组

血清中 TLR4 的表达量

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 hvKP 组比较: ## $P < 0.01$

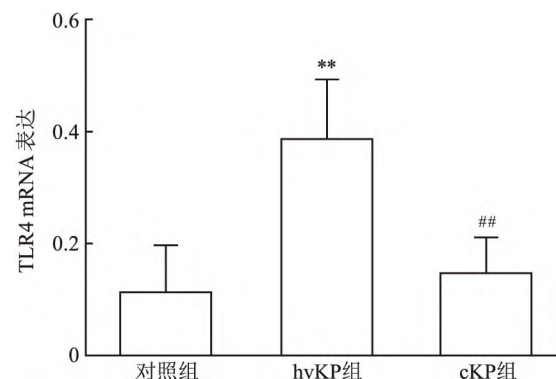


图3 TLR4 在 mRNA 水平上的表达

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 hvKP 组比较: ## $P < 0.01$

血清 TLR4 水平也越高 (图 4A); 在 CURB-65 评分中,2 分的患者血清 TLR4 水平高于 0~1 分的患者 (图 4B), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。应用 Spearman 相关分析表示,血清 TLR4 水平与 PSI、

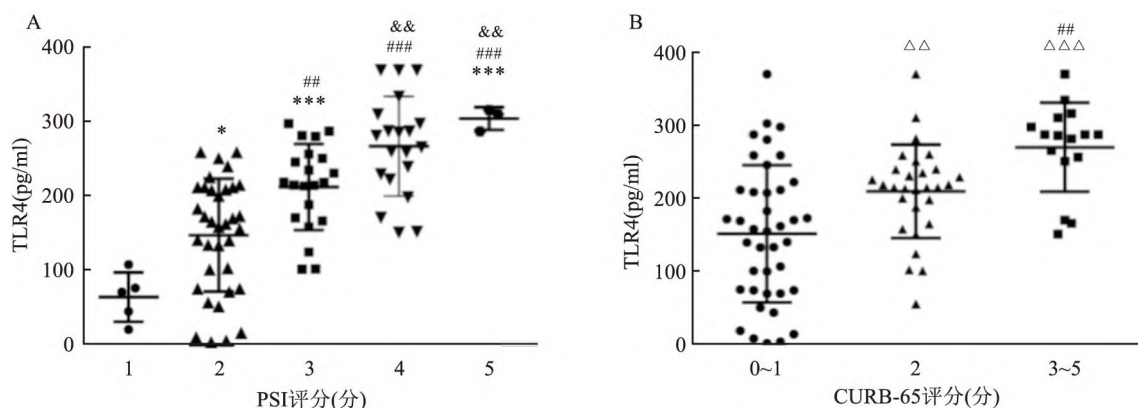


图4 血清TLR4水平与各肺炎评分的相关性

A:不同PSI评分的患者血清TLR4水平;B:不同CURB-65评分的患者血清TLR4水平;与1分比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与2分比较:## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与3分比较:&& $P < 0.01$,&&& $P < 0.001$;与0~1分比较:△△ $P < 0.01$,△△△ $P < 0.001$

CURB-65评分均存在正相关关系($r:0.692, 0.466; P < 0.001$)。

3 讨论

KP是与人类关系密切的一种机会性致病菌^[12],在免疫功能低下的人群中通过铁摄取系统、CPS、LPS等多种毒力因子,可以引起以呼吸道为主的多部位的感染。目前,治疗KP感染的常用药物有碳青霉烯类(例如亚胺培南,美罗培南)、内酰胺类及喹诺酮类等,但近年来KP的耐药率逐渐升高^[13]。此外,hvKP感染的发病率和病死率也存在持续上升趋势,并且目前hvKP的明确诊断主要依靠细菌培养及基因检测,需要较长的时间,给临床治疗也带来了严峻的挑战。hvKP可产生大量的荚膜多糖,并且拥有较强的抗吞噬作用以及抗杀菌作用,可以促进炎症反应以及加重感染。荚膜多糖是hvKP重要的毒力因子,主要通过抗巨噬细胞吞噬作用、抵抗抗菌肽等作用从而帮助细菌免疫逃逸^[4]。目前hvKP的分子标志物诊断仍存在争议,本研究通过对收集的临床菌株的毒力基因检测,显示 $rm-pA1$ 、 $rm-pA2$ 及 $magA$ 基因联合诊断hvKP的特异性及准确性较高,可作为临床hvKP检测的重要分子标志物。

从呼吸道快速清除入侵细菌对于有效的宿主防御机制对抗细菌性肺炎具有重要意义。除了直接的细菌吞噬和杀伤外,肺上皮细胞表面的TLR4识别病原菌后,可以趋化并刺激中性粒细胞等,激活免疫反应^[14],并促进CRP等的分泌,TLR4水平的上升并不是单独的,与机体的炎症反应有密切的关联。

本研究证实hvKP感染的人肺泡上皮细胞中TLR4表达水平明显上升,提示肺上皮细胞对hvKP的感染做出反应并过表达TLR4介导免疫反应等对抗感染。

通过对KPN患者血清中TLR4水平的检测,显示与hvKP感染的患者TLR4水平相比,cKP感染的患者及健康体检者有明显的升高,提示TLR4可能在毒力基因的介导下参与了hvKP菌株感染人体的防御过程。根据对患者临床预后的肺炎评分分级,结果显示血清TLR4水平与PSI评分及CURB-65评分呈正相关性,TLR4水平越高的患者由评分预测的临床预后情况越差,提示TLR4可作为衡量患者体内的病程进展程度的指标,血清TLR4水平可能作为hvKP感染的患者诊断和评估预后的潜在生物标志物。并且猜测,通过抑制TLR4可以减轻机体由于炎症反应带来的损伤,但需进一步实验研究毒力基因与蛋白通路之间的联系以及起到保护作用的机制。

参考文献

- [1] 文细毛,任南,吴安华,等.全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J].中华医院感染学杂志,2011,21(2):350-5.
- [2] Martin R M, Bachman M A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 4.
- [3] 杨朋,旷凌寒,罗美,等.376株肺炎克雷伯菌的毒力基因分析[J].华西医学,2021,36(8):1037-43.
- [4] Maier B B, Hladik A, Lakovits K, et al. Type I interferon promotes alveolar epithelial type II cell survival during pulmonary

- Streptococcus pneumoniae infection and sterile lung injury in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(9): 2175–86.
- [5] Leite F R, de Aquino S G, Guimarães M R, et al. Relevance of the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) on RANKL, OPG, and nod expressions induced by TLR and IL-1R signaling in bone marrow stromal cells[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 1–8.
- [6] Cao B, Huang Y, She D Y, et al. Diagnosis and treatment of community-acquired pneumonia in adults: 2016 clinical practice guidelines by the Chinese Thoracic Society, Chinese Medical Association[J]. *Clin Respir J*, 2018, 12(4): 1320–60.
- [7] Zheng L, Fei J, Feng C M, et al. Serum 8-iso-PGF2 α predicts the severity and prognosis in patients with community-acquired pneumonia: A retrospective cohort study[J]. *Front Med (Lau-sanne)*, 2021, 8: 633442.
- [8] Ye M, Tu J, Jiang J, et al. Clinical and genomic analysis of liver abscess-causing *Klebsiella pneumoniae* identifies new liver abscess-associated virulence genes[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 165.
- [9] Humphries R, Bobenchik A M, Hindler J A, et al. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute *performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, M100, 31st edition[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(12): e0021321.
- [10] Patel S. Calculated decisions: PSI/PORT score: pneumonia severity index for community-acquired pneumonia [J]. *Emerg Med Pract*, 2021, 23(Suppl 2): CD2–3.
- [11] Ilg A, Moskowitz A, Konanki V, et al. Performance of the CURB-65 score in predicting critical care interventions in patients admitted with community-acquired pneumonia [J]. *Ann Emerg Med*, 2019, 74(1): 60–8.
- [12] Li B, Zhao Y, Liu C, et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(9): 1071–81.
- [13] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2018年CHINET中国细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(1): 1–10.
- [14] Regueiro V, Moranta D, Campos M A, et al. *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(2): 714–24.

Correlation between virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* and TLR4 expression

Wang Heming, Liu Zhou, Wang Shanshan, Tang Wei, Zhou Qiang

(Dept of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To analyze the distribution of virulence genes and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* (KP), and to study the correlation between the difference of TLR4 expression in serum and cell levels of patients infected with hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKP) and classical *K. pneumoniae* (cKP) and clinical prognosis.

Methods The strains and serum of patients with KP were collected, the virulence genes were detected by PCR amplification, and the drug susceptibility was detected; Strains were divided into the hvKP group and cKP group. The expression level of TLR4 in serum was detected by ELISA. A549 human alveolar epithelial cells were infected with hvKP and cKP. The expression of TLR4 was determined by quantitative PCR. **Results** The detection rates of *kfu*, *rmpA1* and *rmpA2* in virulence genes of hvKP group were the highest, reaching 100%, 87.8% and 80.5% respectively. The serum TLR4 level was significantly higher in the hvKP groups than that in the control and cKP groups, which was positively correlated with PSI score and CURB-65 score about clinical prognosis. The expression of TLR4 mRNA was significantly higher in the hvKP groups than that in the control and cKP groups. **Conclusion** The combination of *rmpA1*, *rmpA2* and *magA* genes has higher accuracy in diagnosing hvKP infection. Higher expression of TLR4 in serum and cells induced by hvKP infection, and TLR4 level positively correlated with the clinical severity of infected KP, suggesting that TLR4 may be involved in the pathophysiological process of hvkp infection. Serum TLR4 can be used as a detection index for the diagnosis and prognosis of patients with KPN, especially patients with hvkp infection.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; virulence gene; hypervirulent; toll-like receptor 4; A549