

• 专题报道 •

新生隐球菌的胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶活性检测

徐赤宇, 温海*, 王溪涛, 朱红梅, 顾菊林, 徐红

(第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**测定不同孵育条件、来源和血清型的新生隐球菌分泌的胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的活性。**方法:**30℃和37℃下用含有偶氮白蛋白的琼脂培养基培养不同来源及血清型的36株新生隐球菌菌株,测量其产生的廓清晕环的大小,计算CH值[菌落半径/(菌落半径+廓清晕环半径)]来比较其胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的活性强弱;用丝氨酸蛋白酶的特异性抑制剂观察两种酶活性改变;酶谱法观察菌株浓缩上清液中胞外蛋白水解酶活性和相对分子质量。**结果:**36株菌株在30℃和37℃培养条件下它们的平均CH值分别为0.558±0.170和0.575±0.169,两者间无显著差异;血清A(n=13)、B(n=13)、D/AD(n=6)型菌株各自的平均CH值分别为0.564±0.144、0.515±0.078和0.482±0.072,各组间无显著差异;临床分离株(n=23)、环境分离株(n=9)和荚膜缺陷株(n=4)各自的平均CH值分别为0.570±0.177、0.513±0.069和0.942±0.075(P<0.05)。对照组(不含抑肽酶)和抑肽酶不同浓度组(1.2、1.6 mU)的平均CH值分别为0.459±0.188、0.975±0.287、0.733±0.252(P<0.01)。菌株浓缩液中含有复杂的胞外蛋白酶类成分。**结论:**新生隐球菌胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的活性在30℃、37℃下无显著差异;在临床分离株中比环境分离株和荚膜缺陷株强;在不同血清型菌株间无显著差别;可被丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制。

[关键词] 新生隐球菌;血清型;胞外蛋白水解酶;丝氨酸蛋白酶;抑肽酶

[中图分类号] R 379.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0125-04

Activity detection of extracellular proteinase and serine protease secreted by *Cryptococcus neoformans*

XU Chi-yu, WEN Hai*, WANG Xi-tao, ZHU Hong-mei, GU Ju-lin, XU Hong (Department of Dermatology and Venereology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the activities of extracellular proteinase and serine protease secreted by *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) of different sources and serotypes and incubated under different conditions. **Methods:** Thirty-six *C. neoformans* strains of different sources and serotypes were incubated in protein agar medium at 30℃ and 37℃ separately. Activities of extracellular proteinase and serine protease were analyzed by determining Clearance Halos (CHs) produced by *C. neoformans*. Activity changes of the 2 proteases were analyzed after treated with serine protease inhibitors. The activity and the molecular weight of extracellular proteinase in the concentrated supernatant were measured using zymography assay. **Results:** Thirty-three of 36 *C. neoformans* strains produced specific Clearance Halos around the colonies, and their mean CHs at 30℃ and 37℃ were 0.558±0.170 and 0.575±0.169, respectively (P>0.05). The mean CHs of serotype A (n=13), B (n=13), and D/AD (n=6) strains were 0.564±0.144, 0.515±0.078 and 0.482±0.072, respectively (P>0.05); the mean CHs of clinical (n=23), environmental (n=9), and uncapsuled strains (n=4) were 0.570±0.177, 0.513±0.069, and 0.942±0.075, respectively (P<0.05). The mean CHs of control group (without protease inhibitor) and groups treated with protease inhibitor (1.2 mU and 1.6 mU) were 0.459±0.188, 0.975±0.287 and 0.733±0.252, respectively (P<0.01). Rich extracellular protease was found in the concentrated supernatant. **Conclusion:** The incubation temperature (30℃ and 37℃) has no effect on activities of extracellular proteinase and serine protease, and the activities of clinical strains are significantly stronger than those of other 2 strains; the activities in different serotypes groups have no significant difference and can be inhibited by serine protease inhibitors.

[KEY WORDS] *Cryptococcus neoformans*; serotypes; extracellular proteinase; serine protease; aprotinin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 125-128]

部分致病性真菌在体外或感染宿主过程中能够分泌内源性和外源性胞外蛋白酶^[1],这些酶具有蛋白水解活性,并可参与菌株对组织的黏附、渗透及调节被感染宿主的免疫系统等活动。同时发现胞外蛋白水解酶主要成分丝氨酸蛋白酶在脑损伤过程中可

[基金项目] 国家自然科学基金(30471566)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30471566)。

[作者简介] 徐赤宇,博士,主治医师。现在解放军第210医院皮肤科,大连116000。E-mail: dr_xuchiyu@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: wenhai98@sohu.com

提高血脑屏障的通透性^[2],并有神经毒性介质作用^[1]。已知新生隐球菌培养的上清液中含有胞外蛋白水解酶类等活性成分^[3]。其中,胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶被认为是潜在的毒性因子。对它们功能的深入研究,将有助于揭示出新生隐球菌如何穿透血脑屏障致病的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 新生隐球菌菌株 36 株,包括环境分离株 9 株、临床分离株 23 株、荚膜缺陷株 4 株;血清 A 型 13 株、血清 B 型 13 株、血清 D/AD 型 6 株。所有菌株均为中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室提供。主要试剂和仪器:特制真菌培养基、检测蛋白琼脂廓清率的特殊培养基、过滤膜、偶氮白蛋白、抑肽酶(Sigma 公司)、PLAU(uPA)尿激酶型血浆酶原激活物 ELISA 检测试剂盒、0.1% 考马斯亮蓝 R-250、二氧化碳孵箱(Heraeus Electronic Inc.); SW-CJ-IE 型净化工作台(苏州净化设备厂);倒置相差显微镜(Olympus 公司);半径测量仪。

1.2 培养基的制备 (1)特制真菌培养基: Glycine (13 mmol/L)、 KH_2PO_4 (29.4 mmol/L)、 MgSO_4 (10 mmol/L)、thiamine (3 $\mu\text{mol/L}$)、葡萄糖(15 mmol/L)等成分混匀后分装于无菌试管 4℃ 保存。(2)检测蛋白琼脂廓清率的特殊培养基: 1.5% 琼脂、葡萄糖 15 mmol/L、glycine 13 mmol/L、 KH_2PO_4 29.4 mmol/L、 MgSO_4 10 mmol/L、thiamine 3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1% azoalbumin (pH 4.5)等混匀后倒入无菌平皿 4℃ 保存。(3)在检测廓清率的培养基中加入抑肽酶,配成含有 4 种浓度(0.4、0.8、1.2、1.6 mU)抑制剂的培养基。

1.3 接种 (1)所试菌株经活化后,用 PBS 调节菌悬液浓度至 1×10^7 CFU/ml,在备用的含有偶氮白蛋白的特殊培养基上,选取成等边三角形的 3 点并记录,用加样器分别滴 10 μl 菌悬液,每份标本接种 4 个平皿,30℃ 和 37℃ 各标记 2 个。分别培养 3~16 d。(2)30℃ 条件,加入抑制剂培养基的菌株,接种方法同前面。

1.4 特选菌株培养上清液浓缩和酶谱法检测 分别将 CZBLS49、ATCC56992、野生株 B3501、CZYD7、Cap70 在特制真菌培养基中培养的上清液 10 ml 放入 PEGC2000(聚乙二醇)袋中,2 h 后上清液被浓缩成 1 ml,即浓缩 10 倍;观察特选菌株浓缩

上清液中胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的活性和近似相对分子质量,对照实验用糜蛋白酶和凝血酶消化琼脂培养基中蛋白后测量近似相对分子质量。

1.5 结果测量时间和方法 由于菌株分泌的胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的活性作用,通过测量消化琼脂培养基平皿中 0.1% 的偶氮白蛋白出现颜色改变的廓清率晕环直径大小。所有的实验菌株培养 3 d 内未见廓清晕环的出现,4~5 d 不清楚,6 d 以后开始出现。到 12~15 d 最为清晰透明,菌落周围的黄色圈渐渐变淡至透明。3~4 周后菌落周围混浊不透明。因此,选用培养第 14 天为测量日。借鉴根据 Price 的蛋黄平板测量法,CH 值 = 菌落半径 / (菌落半径 + 廓清晕环半径)。CH 值小,胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的量多,活性强;反之 CH 值大,胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的量少,活性弱;CH 值为 1 表示菌株没有分泌胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶。实验重复 6 次($n=6$)。加抑制剂组测量时间和方法同前。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 菌株培养结果

2.1.1 温度对菌株培养的影响 在 30℃ 和 37℃ 培养 14 d 后,36 株菌中有 33 株能在其菌落周围产生特异性廓清晕环,即未被考马斯亮蓝染色的白色晕环(图 1A)。23 株新生隐球菌临床分离株在两种温度培养时均产生廓清晕环,9 株环境分离株有 8 株产生廓清晕环,1 株为阴性反应,CH 值为 1。荚膜缺陷株中的 Cap55、Cap60 株均未产生廓清晕环。两种培养温度下的 CH 值分别为 0.558 ± 0.170 和 0.575 ± 0.169 ,两者无显著差异。

2.1.2 不同血清型菌株培养结果 CH 值最小的为分离自痰液的 CZBLS49,血清型为 B 型,在 30℃ 培养时,CH 值为 0.363 6。其次 CH 值最小为来自脑脊液的 ATCC56992,血清型为 B 型,在 30℃ 培养时,CH 值为 0.380 1。在 37℃ 培养条件下,血清 A、B、D/AD 型菌株的 CH 值分别为 0.564 ± 0.144 、 0.515 ± 0.078 和 0.482 ± 0.072 ,3 组间均无显著差异。

2.1.3 不同来源菌株培养结果 临床株、环境株和荚膜缺陷株的 CH 值分别为 0.570 ± 0.177 、

0.513±0.069 和 0.942±0.075, 各组间有显著差异 ($P<0.05$)。

2.2 丝氨酸蛋白酶抑制剂对菌株培养的影响 与对照组(图 1B)比较发现随着培养基中所含抑肽酶浓度的增加, 菌落周围廓清晕环直径逐渐变小(图 1C), 对照组和抑肽酶不同浓度组(1.2、1.6 mU)的 CH 值分别为 0.459±0.188、0.975±0.287 和 0.733±0.252, 有显著性差异 ($P<0.01$)。

2.3 菌株浓缩上清液酶谱法测定结果 菌株浓缩上清液中所含的酶消化了凝胶中的相应底物蛋白,

用酶谱法可以观察到缺少考马斯亮蓝 R-250 染色的条带区域显示凝胶上, 相对分子质量大约在 200 000、100 000、75 000、50 000 范围。发现相对分子质量为 200 000 和 100 000 条带均存在于特选 5 株浓缩上清液所分离的酶底物凝胶中。75 000、50 000 条带很弱不易被观测, 需仔细辨别可在分离的底物凝胶中找到。对照组利用糜蛋白酶和凝血酶在近似相对分子质量为 25 500 和 35 000 处显示出被消化的廓清带, 与糜蛋白酶和凝血酶的相对分子质量大致相符(图 2)。

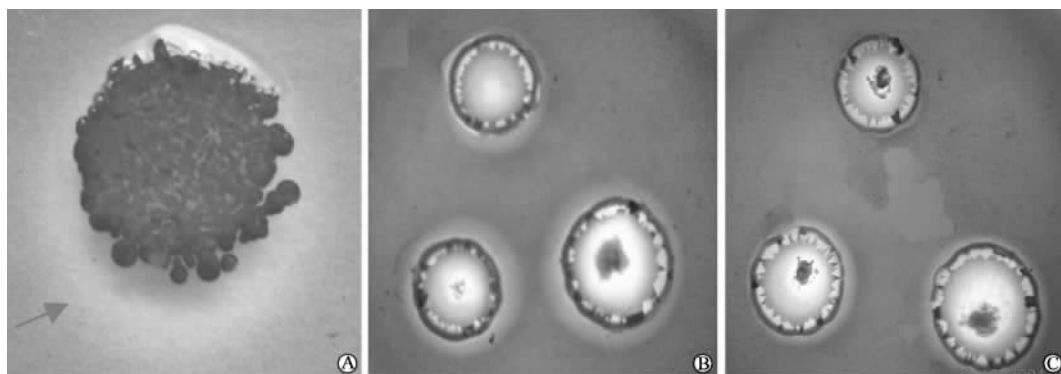


图 1 蛋白琼脂廓清晕环观察结果

Fig 1 Protein agar plates showing clearance halos

A: *C. neoformans* colony after cultured with glucose(15 mmol/L), glycine(13 mmol/L), KH_2PO_4 (29.4 mmol/L), MgSO_4 (10 mmol/L), thiamine($3 \mu\text{mol/L}$), and 0.1% azoalbumin for 12-15 d. CZBLS49 colonies were washed off then the plates were stained with 0.1% Coomassie blue R-250 for 4 h and subsequently destained with 40% methanol-10% acetic acid. Light staining indicated the absence of the protein azoalbumin, suggesting there was proteolytic digestion. Arrow pointed the area lacking Coomassie blue staining; B: *C. neoformans* colony in normal agar; C: *C. neoformans* colony in agar containing serine protease inhibitors

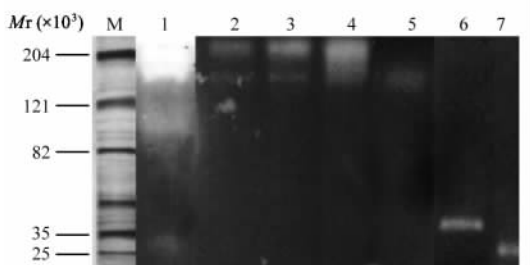


图 2 培养菌株浓缩上清液的底物凝胶电泳结果

Fig 2 Substrate gel electrophoresis of concentrated supernatant

M: Marker; 1: CZBLS49; 2: ATCC56992; 3: B3501; 4: CZYD7; 5: Cap70; 6: Aprotinin; 7: Chymotrypsin

3 讨论

研究发现许多致病性真菌在体外或感染宿主过程中分泌蛋白水解酶^[1], 如新生隐球菌分泌的含有

丝氨酸蛋白酶、磷脂酶等组分的胞内外蛋白酶类物质, 认为这些酶可能介导菌体克服宿主的保护屏障引发真菌性感染和深部真菌病。

对于真菌分泌物中的酶类成分有多种检测方法, 其中底物凝胶分析法是一种可靠的检测蛋白水解活性的有效经典方法, 条带的廓清率提供了发生在凝胶中的蛋白水解活性的证据及蛋白水解酶近似的相对分子质量。

本实验中特选的新生隐球菌培养的浓缩上清液的底物凝胶分析发现至少存在 4 条有蛋白水解活性条带, 其相对分子质量分别为 50 000、75 000、100 000、200 000。因为巯基乙醇还原性和蛋白质样本的煮沸均在 SDS 中保留蛋白水解活性, 所以测得的相对分子质量相对于标准仅仅为近似值, 有人认为所获取的相对分子质量超过实际的 15%~20%。实验中用糜蛋白酶和凝血酶作为对照组得到的条带

相对分子质量为 25 500、35 000,与这两种酶的实际相对分子质量基本吻合。根据本实验选取的隐球菌浓缩上清液得到的 5 种条带说明发生了复杂的蛋白水解活性及蛋白水解酶降解反应,这与 Chen 等^[4]和 Yoo 等^[5]的报道基本相符。

本研究结果表明,36 株新生隐球菌在 30℃ 和 37℃ 时培养 6~7 d 后,绝大多数都产生了特异性廓清晕环,与 Chen 等^[4]报道的结果一致;但不同菌株的 CH 值差异较大,提示其毒力、致病力和所含的丝氨酸蛋白酶量可能与此相关。同时,发现不同培养温度下所有菌株的 CH 值无统计学差异,表明 0℃、37℃ 下隐球菌胞外蛋白酶类物质活力没有显著差异,只要有合适的培养基条件菌株就能分泌胞外蛋白酶类物质。

实验表明不同来源的菌株其 CH 值存在明显差异。临床痰液分离株表现出最高的胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶活力,环境分离株次之,而荚膜缺陷株较小。提示来源不同可能是影响隐球菌胞外蛋白酶类成分活性的一个主要的因素,同 Rodrigues 等^[6]报道的新生隐球菌分泌的丝氨酸蛋白酶可造成肺组织损害和降解细胞外基质结果相一致。

血清分型对新生隐球菌分泌胞外蛋白水解酶的影响研究表明菌体荚膜的存在和缺失同自身分泌有密切关系。目前对新生隐球菌的分型还只是停留在根据其荚膜多糖的抗原性决定的血清型来区分的,而且荚膜多糖被认为是新生隐球菌最重要的毒力因子。本实验用 A 型、B 型、D/AD 型 4 种血清型菌株以及荚膜缺陷株之间进行比较,发现胞外蛋白水解酶类成分与荚膜多糖抗原性无关,但与荚膜缺陷株相比较时 CH 值却有显著差异,说明胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶与菌株的多糖荚膜是具有协同性的毒力因子。

当菌株接种在含有一定浓度单位的丝氨酸蛋白酶特异性抑制剂(抑肽酶)的培养基中一段时间后,发现菌落周围蛋白廓清晕环较对照组缩小。当抑肽酶浓度为 0.8 mU 时出现抑制作用,随着抑制剂浓度的增高,CH 值变得越大,各组之间存在明显统计学差异。这表明抑肽酶对新生隐球菌分泌的胞外蛋白水解酶的抑制作用出现在浓度为 0.8 mU 时。抑肽酶对隐球菌胞外蛋白水解酶类成分抑制作用与其浓度相关。表明丝氨酸蛋白酶抑制剂可降低隐球菌分泌胞外蛋白水解酶及丝氨酸蛋白酶的活性,它们将有望成为预防和治疗致病性真菌感染药物。

[参考文献]

- [1] Monod M, Capoccia S, Lechenne B, et al. Secreted proteases from pathogenic fungi[J]. *Int J Med Microbiol*, 2002, 292: 405-419.
- [2] Nagy Z, Kolev E, Csonka E, et al. Perturbation of the integrity of the blood-brain barrier by fibrinolytic enzymes[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998, 9: 471-478.
- [3] Ruma-Haynes P, Brownlee AG, Sorrell TC. A rapid method for detecting extracellular proteinase activity in *Cryptococcus neoformans* and a survey of 63 isolates[J]. *Med Microbiol*, 2000, 49: 733-737.
- [4] Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996, 3: 570-574.
- [5] Yoo JJ, Lee YS, Song CY, et al. Purification and characterization of a 43-kilodalton extracellular serine proteinase from *Cryptococcus neoformans*[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 722-726.
- [6] Rodrigues ML, dos Reis FC, Puccia R, et al. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase[J]. *Microb Pathog*, 2003, 34: 65-71.

[收稿日期] 2005-07-07

[修回日期] 2005-09-22

[本文编辑] 贾泽军

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948
CN31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725