

文章编号: 1002-2694(2012)01-0066-04

## 猪链球菌 2 型毒力相关因子及保护性抗原研究进展\*

何永聚<sup>1,2,3</sup>, 祝令伟<sup>1,3</sup>, 冯书章<sup>1,2,3</sup>

中图分类号: S852.61 文献标识码: A

猪链球菌是在世界范围内传播的一个重要的人兽共患病原体,可引起猪的脑脊膜炎、肺炎、心内膜炎、败血病、关节炎等症状。在已分离的猪链球菌 35 个血清型中,猪链球菌 2 型(SS2)流行范围最广。1998 年和 2005 年在中国江苏省与四川省暴发了人感染 SS2 的疫情,分别引起 14 人和 38 人死亡<sup>[1]</sup>。目前已有报道超过 700 人感染 SS2 的病例,且主要集中在东南亚<sup>[2]</sup>。因此 SS2 严重危害着公共卫生安全,已引起了科研人员及公众的广泛关注。

目前已经发现了许多 SS2 典型的毒力因子,其中荚膜多糖是最早被发现的主要的毒力因子<sup>[3]</sup>,之后其它一些毒力因子如溶血素、胞外蛋白因子、溶菌酶释放蛋白、黏附素等也相继被发现。然而研究发现,一些强毒菌株缺失掉这些毒力因子后,SS2 仍有毒力,在一些无毒或弱毒菌株中也能检测到这些毒力因子的存在,因此认为 SS2 可能还存在着结构与功能未知的毒力因子。以下对近几年新发现的毒力相关因子和保护性抗原进行论述。

## 1 调节因子

调节因子是在细菌基因表达调控中,在各种刺激信号的影响下通过信号传导能直接或间接地识别或结合在各顺式作用元件的序列上,参与调控靶基因转录效率的因子,分正调控和负调控。这些因子虽不直接表达毒力蛋白,但大多能调节细菌在体内的生存、对环境的耐受以及毒力因子的表达,是细菌重要的毒力相关因子,也是疫苗研究和新型抗菌药物研究的重要靶点。

1.1 调节因子 *luxS* *luxS* 因子被报道在调节细菌各种活动和种间传播方面发挥显著作用。在 Wang Y 等<sup>[4]</sup>的研究中,他们构建了 SS2 基因缺失菌株  $\Delta luxS$ ,与野生株相比,突变株溶血活力明显降低,对 HEp-2 细胞的黏附也降低了 51%。通过

实时定量 PCR 显示,已知的毒力因子如 *gdh*、*cps*、*mrp*、*gapdh*、*sly*、*fbps* 和 *ef* 等在体内的表达分别降低 0.66、0.61、0.45、0.48、0.29、0.57 和 0.38。在感染斑马鱼动物模型的实验中, $\Delta luxS$  的半数致死剂量显著升高。这些实验结果表明,*luxS* 的缺失,使细菌的溶血活力、对细胞的粘附力及一些重要毒力因子的转录水平发生了变化。*luxS* 因子因能干扰细菌的信号传输,对细菌毒力因子的表达有重要作用。

1.2 二元信号调节系统 *CiaRH* 二元信号调节系统(Two-component regulatory systems, TCS)是致病菌中普遍存在的一种跨膜信号转导机制,在调节毒力基因的表达中有重要作用。Li J 等<sup>[5]</sup>构建了 TCSCiaRH 基因敲除突变株,并研究突变株与野生株比较在体内与体外毒力变化情况,突变株对 Hep-2 和 PIEC 上皮细胞的粘附力显著减弱,*CiaRH* 缺失使巨噬细胞对 SS2 的吞噬力增加,也提高了 SS2 在体内血液中的清除率,CD1 小鼠与猪的体内感染实验也表明细菌致病力减弱。这些结果表明,*CiaRH* 对猪链球菌 2 型的毒力也是必需的。

1.3 正向调节因子 *AdcR* 和 *Fur* 锌和铁是细菌中一些蛋白的重要组分,在链球菌中 *AdcR* 和 *Fur* 控制着锌和铁运输。在 Aranda J 等<sup>[6]</sup>的研究中,利用鼠模型测定 SS2  $\Delta AdcR$  和  $\Delta Fur$  缺失株的毒力变化。结果显示, $\Delta AdcR$  和  $\Delta Fur$  缺失株与野生型亲本株比较,毒力显著减弱,并且所有缺失菌株对氧化应激反应更加敏感。他们的数据证明 *AdcR* 和 *Fur* 基因在 SS2 氧化应激反应与 SS2 的全毒力中发挥着重要作用。

1.4 触发因子(Trigger factor) Wu T 等<sup>[7]</sup>在研究中,阐明了触发因子与细菌耐受应激与毒力的关系,并构建了 SS2 的 SC21 菌株 *tig* 全基因缺失菌株( $\Delta tig$ )和恢复互补菌株( $C\Delta tig$ ),实验证明,缺失菌株对 HEp-2 细胞的粘附力显著减弱、溶血能力下降,并对热、氧化、酸等应激耐受能力下降,通过实时定量 PCR 显示 *tig* 基因对已知的 SS2 的主要毒力因子,如 *cps*、*sly*、*mrp* 等有显著影响,同时  $\Delta tig$  的 LD<sub>50</sub> 也显著降低。这些都指明触发因子在 SS2 感

\* 国家“973”计划项目(2006CB504402);吉林省科技发展计划资助项目(20080130)

通讯作者:冯书章,Email: shuzhangf@yahoo.com

作者单位:1. 军事医学科学院军事兽医研究所,长春 130122;

2. 吉林大学畜牧兽医学院,长春 130062;

3. 吉林省人兽共患病预防与控制实验室,长春 130122

染的发病机制和应激耐受方面发挥重要作用。

1.5 转录调控因子 *Rgg* 王忠胜等<sup>[8]</sup>构建了 SS2 强毒株 05ZYH33 调控因子 *Rgg* 的突变株,用基因芯片的方法分析野生株与缺失株的基因表达差异,并在突变株中发现了 45 个基因表达变化较大的基因,其中 19 个表达上调,26 个表达下调。这些基因在细菌毒力、免疫抗原、DNA 合成和修复、基础代谢和 ABC 转运系统等方面起着重要作用,说明 *Rgg* 是一个全局调控因子。

## 2 表面蛋白

细菌的表面元件,尤其是表面蛋白,由于和外界环境直接接触,与病原菌的生存能力和致病性等密切相关。表面蛋白大多在细菌对细胞的黏附、血液的侵袭、凝血过程、免疫逃避以及营养物质跨膜递送等多方面发挥关键作用,是多种病原菌感染宿主的必要环节<sup>[9]</sup>。SS2 等革兰氏阳性菌表面蛋白要锚定在细菌细胞壁上,需要分选酶的切割并在分选酶的催化下与肽聚糖共价键结合。表面蛋白一般是重要的毒力因子或具有良好的免疫原性的保护性蛋白。

2.1 分选酶 Srt(Sortase) 革兰氏阳性细菌表面蛋白和菌毛要锚定在细胞壁上需要分选酶(sortase, Srt)的催化参与。在 SS2 基因组中已知有 6 个与 Srt 同源性的蛋白(*srtA*、*srtB*、*srtC*、*srtD*、*srtE*、*srtF*),其中 *srtB*、*srtC*、*srtD* 是一个簇。*srtA* 是管家分选酶,负责所有含“LPXTG”基序的表面蛋白的催化和锚定。陈红娜等<sup>[10]</sup>利用基因重组原理构建了 *srtBCD* 缺失的突变株,体外实验结果显示 *srtBCD* 缺失后细菌的生长速率减慢,与 Hep-2 上皮细胞的粘附率明显降低,小鼠毒力实验数据表明突变株毒力无明显变化。实验证明 SS2 的 *srtBCD* 基因与细菌的黏附能力有重要关系。陈红娜等<sup>[11]</sup>还构建了 05ZYH33 *srtF* 同源突变体,突变菌株与野生菌株在菌落形态、生长速率及对小鼠的致病力上均无显著差异,但在小鼠竞争实验中发现,突变株在心脏的定殖及感染能力上显著减弱。

2.2 菌毛亚单位(pilus subunit) 细菌的菌毛是细菌比较关键的毒力因子,其菌毛亚单位也看作极好的疫苗候选者,但是菌毛成分在 SS2 中的功能性和免疫保护潜力还未被研究。Garibaldi M 等<sup>[12]</sup>使用蛋白组学方法,发现了一个 SS2 表面蛋白,经生物信息学分析、免疫印迹及免疫荧光检测显示是细菌的菌毛亚单位辅基,用小鼠模型做重组菌毛亚单位蛋白的免疫保护性实验,结果表明对小鼠 SS2 的感染有显著的保护作用。秦跃红等<sup>[13]</sup>构建

了 SS2 中国强毒株 05ZYH33 菌毛骨架蛋白编码基因 SSU2101 敲除突变株,生物学特性和小鼠致病性试验显示:虽然突变株的菌落形态、溶血活性以及染色特性方面与野生株之间均无明显差异,但突变株的毒力比野生株显著减弱。研究结果也提示菌毛在 SS2 感染致病过程中起重要作用。

2.3 保护性抗原 HP0197 HP0197 是一种新的已被确定的具有免疫原性的蛋白,在 C 端具有典型分选信号“LPXTG”,与已知的蛋白没有任何同源性。Zhang A<sup>[14]</sup>等发现 HP0197 是一种新的表面保护性抗原,并对其保护性进行了鉴定,在猪和小鼠模型内研究了它的保护效力,并做了体外细胞试验和被动免疫试验。证明 HP0197 具有很好的保护效力,这个蛋白也被认为很可能成为新型疫苗的候选者。

2.4 保护性抗原 HP0272 Chen B 等<sup>[15]</sup>发现了一个新的具有免疫原性的表面蛋白 HP0272,用纯化的 HP0272 免疫小鼠模型,能诱发显著的体液免疫反应,有很高的抗体滴度,对致死剂量的 SS2 感染具有完全的保护作用。实时定量 PCR 发现 HP0272 在几乎所有的 SS2 菌株和半数其他型的参照菌株中存在,可以作为新型疫苗的候选者。

2.5 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(6-phosphogluconate-dehydrogenase) 6-磷酸葡萄糖脱氢酶是与戊糖磷酸循环有关的酶,它催化 6-磷酸葡萄糖氧化脱羧成 5-磷酸核糖,同时释放 NADP, NADP 认为是 NADPH 的主要来源。Tan C<sup>[16]</sup>等对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因进行克隆表达,并证明 6-磷酸葡萄糖脱氢酶是一种细胞壁表面蛋白,在小鼠模型中进行试验,证明 6-磷酸葡萄糖脱氢酶具有粘附素的作用,在 hep-2 及 hela 竞争抑制性细胞试验中,6-磷酸葡萄糖脱氢酶竞争性干扰 SS2 对这两种细胞的粘附,干扰率分别为 72% 和 66%。在动物保护性实验中,对 CD-1 小鼠内的保护效率达 80%,是一种较好的保护性细胞表面抗原。

2.6 类枯草杆菌丝氨酸蛋白酶 SspA (subtilisin-like serine protease) Bonifait L 等<sup>[17]</sup>证实 SS2 中的 SspA 与在其它致病性链球菌中的功能一样,在 SS2 的感染过程中发挥重要作用。Hu Q 等<sup>[18]</sup>研究发现在 SS2 发病机制中 SspA 位于细菌表面,分别进行体内与体外表达发现,体内表达远远高于体外表达, SspA 蛋白约 170 kDa,具有生化活性,与其他微生物产生的枯草杆菌蛋白酶相似。它具有很高的蛋白酶水解活性,同时能够水解纤维蛋白原 Aa 链,因此可以抑制有凝血酶介导的纤维蛋白的生成。SspA 在 SS2 感染机制中发挥着重要作用,敲除这

个基因的突变株与野生菌株相比毒力明显减弱,在感染动物体内能够促进抗体的产生,证明 SspA 与 SS2 毒力有关。

**2.7 IgA1 蛋白酶** 致病菌的 IgA1 蛋白酶有助于细菌侵入机体的黏膜免疫系统。Zhang A 等<sup>[19]</sup>研究发现,当 *iga* 基因缺失时,SS2 的侵袭力明显减弱。因此推断,在侵入宿主的黏膜免疫系统时,分泌性的 IgA1 蛋白酶发挥着重要作用。另外,感染实验表明,敲除 *iga* 基因的菌株导致该致病菌的致死率下降。实验研究也表明 IgA1 蛋白酶可能是猪链球菌的毒力因子之一,在 SS2 的致病机制中起一定作用。

**2.8 HtpS (histidine triad protein of *Streptococcus suis*) 蛋白** 三联组氨酸蛋白属于一个与猪链球菌表面相关的蛋白家族,该家族包含来自肺炎链球菌和化脓性链球菌的 *PhfA*、*PhfB*、*PhfD*、*PhfE*、*HtpA* 5 个成员,它们也被证实可作为宿主感染的保护性抗原。Shao Z 等<sup>[20]</sup>研究发现在 SS2 的 05ZYH33 菌株中有一段与 *HtpA*、*PhfD* 高度同源的基因序列,并命名为 *HtpS*。他们发现 *HtpS* 在 SS2 高度保守并在猪链球菌 35 个血清型中广泛存在(29/35)。在 SS2 感染中表达的 *HtpS* 蛋白经免疫印迹和流式细胞仪验证属于细胞表面相关蛋白。抗 *HtpS* 蛋白血清能增加人体内补体 3 的沉积并能降低 SS2 在血液中的溶血效应。经重组蛋白 *HtpS* 免疫后的小鼠能显著增加它们在 SS2 感染后的存活率。

### 3 其它毒力相关因子

**3.1 *Trag* (transfer gene G) 基因** *Trag* 基因是利用体内诱导抗原技术 IVI-AT (*in vivo*-induced antigen technology) 通量筛选鉴定的猪链球菌 2 型的致病相关因子,*Trag* 参与细菌的分泌途径,是 IV 型分泌系统 (type IV secretion system, TFSS) 的组成成分,*Trag* 基因在细菌感染过程中可能参与毒力因子的转移、毒力蛋白的分泌,使宿主菌产生相应的酶或毒素,导致毒力增强。祝吴丹<sup>[21]</sup>等检测 1998 年江苏及 2005 年四川流行株和其它临床分离株中的 *Trag* 基因分布结果显示,SS2、SS7 中几乎都有 *Trag* 基因的存在,SS9 中大部分含有 *Trag*,但是非毒力菌株 SS1、SS1/2 和兰氏 C 群猪源链球菌中没有 *Trag* 基因,这表明 *Trag* 基因可能与猪链球菌的毒力有关。

**3.2 *lin0523* 基因** 李鹏等<sup>[22]</sup>利用温敏穿梭自杀质粒 pSET4s,定点敲除 SS2 野生型强毒株 ZY458

的 *lin0523* 基因,构建基因缺失突变菌株 458 $\Delta$ *lin*,利用家兔感染模型对 ZY458 及其突变菌株的生物学特性进行比较研究。接种 ZY458 感染组家兔 5/5 死亡,458 $\Delta$ *lin* (plin) 感染组家兔 4/5 死亡。而 458 $\Delta$ *lin* 感染组家兔生长正常,未出现任何明显临床症状,证实 *lin0523* 基因与猪链球菌 2 型的毒力密切相关。

**3.3 SSG14 基因岛** 祝令伟等<sup>[23]</sup>通过比较猪链球菌 2 型强毒株与弱毒株和无毒株的基因组差异,发现一个只存在于强毒株,而在弱毒或无毒菌株中没有的基因岛,并命名为 SSG14。该基因岛全长 11 269bp,包含 11 个编码基因,部分基因推测为可能的膜表面蛋白基因或氨基酸结合蛋白基因。新发现的基因岛 SSG14 具有致病性基因岛的各项典型特征,可能与猪链球菌 2 型强毒株的致病性有关。

**3.4 AI1 (angiogenin inhibitor 1) 透明质酸酶 (hyaluronidase, HAase)** 是能使透明质酸产生低分子化作用酶的总称,它在 SS2 感染过程中能够降低体内透明质酸的活性,从而提高 SS2 在组织中液体渗透能力<sup>[24]</sup>。Tao Wu 等<sup>[25]</sup>发现了 1 个与 SS2 透明质酸酶有关的新型血管生成素抑制因子 AI1,血管生成素抑制因子是 1 种核糖核酸酶。应用酵母双杂交系统显示 AI1 与酵母中的透明质酸酶有关系,免疫共沉淀分析也证明 AI1 与透明质酸酶有关系。并且在正常细胞和 SS2 感染的细胞中都发现了所筛选的 CDNA 的转录和翻译,且这些过程主要集中于 293T 细胞的细胞质中。这些结果表明 AI1 可能通过干扰 SS2 中透明质酸酶影响 SS2 感染的发病机制。

**3.5 异柠檬酸脱氢酶 IDH (isocitrate dehydrogenase)** 异柠檬酸脱氢酶是柠檬酸循环过程中的关键酶,这个酶可以催化柠檬酸化合物经氧化脱羧作用生成  $\alpha$ -酮戊二酸和 NAD(P)H,在细菌的生存中不可缺少。Wang P 等<sup>[26]</sup>过表达并研究了 SS2 强毒株 05ZYH33 中的 IDH, IDH 大小约为 74 kDa,并且发现在 SS2 中,阳性  $Mg^{2+}$  是对 IDH 影响最大的二价离子。IDH 优化最合适的 pH 分别是  $Mn^{2+}$  7.0、 $Mg^{2+}$  8.5,温度分别是  $Mn^{2+}$  30  $^{\circ}C$ 、 $Mg^{2+}$  50  $^{\circ}C$  活力最高。在 SS2 中 IDH 对  $NAD^{+}$  是一个重要的辅酶,Wang P 等研究认为 IDH 是 SS2 生存中重要的代谢酶,并期望 IDH 作为 SS2 感染检测和血清学诊断的重要因子。

综上所述,虽然已经发现了很多 SS2 的毒力因子,但 SS2 如何在动物体内传播和感染,其主要的毒力因子是如何发挥作用的仍然所知有限。对已验

证的、具有免疫保护作用的 SS2 强毒株主要毒力因子荚膜多糖(*cps*)的争论也很多,因为很多无毒菌株也是有荚膜的。除 *cps* 外,很多可能的主要毒力因子也不是仅存在于猪链球菌强毒株中的,在弱毒或无毒菌株中它们都可以被发现。一些强毒菌株的毒力因子被敲除后,在多数情况下,它们的毒力会丧失或下降,这可能是由于 SS2 的致病机理是多因子共同协作的结果,毒力因子之间的关系可能是互补的,1 个因子的缺失导致整个菌株毒力的丧失或下降。所以对 SS2 的致病机理及毒力因子等方面的研究意义重大,还需广大科研工作者进一步探索。

### 参考文献:

- [1] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, et al. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen [J]. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7(3): 201-209.
- [2] Wertheim HF, Nghia HD, Taylor W, et al. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen [J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(5): 617-625.
- [3] Chabot-Roy G, Willson P, Segura M, et al. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils [J]. *Microb Pathog*, 2006, 41(1): 21-32.
- [4] Wang Y, Zhang W, Wu Z, et al. Functional analysis of *luxS* in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 152(1/2): 151-160.
- [5] Li J, Tan C, Zhou Y, et al. The two-component regulatory system CiaRH contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2 [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 148(1): 99-104.
- [6] Aranda J, Garrido ME, Fittipaldi N, et al. The cation-uptake regulators AdcR and Fur are necessary for full virulence of *Streptococcus suis* [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144(1/2): 246-249.
- [7] Wu T, Zhao Z, Zhang L, et al. Trigger factor of *Streptococcus suis* is involved in stress tolerance and virulence [J]. *Microb Pathog*, 2011, 51(1/2): 69-76.
- [8] 王忠胜, 曾小涛, 袁媛, 等. 猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 转录调控因子 Rgg 基因敲除突变体与野生株的基因表达差异分析 [J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(6): 812-817.
- [9] 祝令伟, 郭学军, 冯书章. 革兰氏阳性细菌分选酶功能和应用研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(10): 966-969.
- [10] 陈红娜, 廖辉, 王长军, 等. 猪链球菌 2 型分选酶 *srtBCD* 基因敲除株的构建及其生物学特性分析 [J]. *微生物学通报*, 2011, 51(3): 386-392.
- [11] 陈红娜, 王长军, 潘秀珍, 等. 猪链球菌 2 型 *srtF* 基因敲除突变株的构建及其毒力 [J]. *微生物学通报*, 2010, 37(12): 1786-1792.
- [12] Garibaldi M, Rodriguez-Ortega MJ, Mandanici F, et al. Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection [J]. *Vaccine*, 2010, 28(20): 3609-3616.
- [13] 秦跃红, 王长军, 陈红娜, 等. 猪链球菌 2 型菌毛骨架蛋白编码基因 SSU2101 敲除突变株的构建及其生物学功能 [J]. *微生物学通报*, 2010, 37(8): 1176-1181.
- [14] Zhang A, Chen B, Li R, et al. Identification of a surface protective antigen, HP0197 of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Vaccine*, 2009, 27(38): 5209-5213.
- [15] Chen B, Zhang AD, Li R, et al. Evaluation of the protective efficacy of a newly identified immunogenic protein, HP0272, of *Streptococcus suis* [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2010, 307(1): 12-18.
- [16] Tan C, Fu S, Liu M, et al. Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 130(3/4): 363-370.
- [17] Bonifait L, Vaillancourt K, Gottschalk M, et al. Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 148(2/4): 333-340.
- [18] Hu QY, Liu P, Yu ZJ, et al. Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, 48(3/4): 103-109.
- [19] Zhang A, Mu X, Chen B, et al. IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis* [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 148(2/4): 436-439.
- [20] Shao Z, Pan X, Li X, et al. HtpS, a novel immunogenic cell surface-exposed protein of *Streptococcus suis*, confers protection in mice [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2011, 314(2): 174-182.
- [21] 祝昊丹, 顾宏伟, 陆承平. 体内表达新基因 *trag* 在猪链球菌的分布及其免疫反应性分析 [J]. *微生物学通报*, 2008, 48(12): 164-168.
- [22] Li P, Liu J, Zhu L, et al. *VirA*: a virulence-related gene of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Microb Pathog*, 2010, 49(5): 305-310.
- [23] 祝令伟, 蔡雪辉, 刘军, 等. 猪链球菌 2 型新基因岛 SSG14 的发现 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(7): 615-618.
- [24] Allen AG, Lindsay H, Seilly D, et al. Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis* [J]. *Microb Pathog*, 2004, 36(6): 327-335.
- [25] Wu T, Yuan F, Chang H, et al. Identification of a novel angiogenesis inhibitor 1 and its association with hyaluronidase of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Microb Pathog*, 2010, 49(1/2): 32-37.
- [26] Wang P, Jin M, Su R, et al. Enzymatic characterization of isocitrate dehydrogenase from an emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis* [J]. *Biochimie*, 2011, 93(9): 1470-1475.

收稿日期: 2011-08-04; 修回日期: 2011-09-14