



## 肺炎链球菌溶血素的研究进展

巫芮, 聂奎\*, 方仁东\*

西南大学动物科技学院, 重庆 400715

**摘要:**肺炎链球菌溶血素(Pneumolysin, PLY)是肺炎链球菌的一种重要毒力因子, 包含4个结构域, 是胆固醇依赖性细胞溶血素(CDCs)的家族成员之一。PLY可广泛作用于宿主组织细胞, 发挥细胞毒性作用。PLY可活化补体经典途径, 诱导巨噬细胞和单核细胞等产生细胞因子, 介导机体免疫应答过程。PLY是肺炎链球菌蛋白疫苗和相关小分子药物研制的重要靶标。本文就PLY的结构、功能及相关疫苗的最新研究进展进行综述。

**关键词:**肺炎链球菌溶血素, 细胞毒性, 促炎效应, 疫苗

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)是一种常定殖在人体鼻咽部的G<sup>+</sup>条件致病菌。SP透过黏膜屏障体系, 下行至肺部或进入血液, 可引起细菌性肺炎、中耳炎、败血症、脑膜炎等多种疾病<sup>[1-2]</sup>。据报道, 全球每年约1450万人感染发生侵袭性肺炎链球菌病(Invasive pneumococcal disease, IPD), 其中儿童为易感高危人群<sup>[3]</sup>。肺炎链球菌溶血素(Pneumolysin, PLY)是SP分泌的一种重要的溶细胞毒素。PLY在增强病原菌侵袭力的同时, 可活化补体经典途径, 诱导巨噬细胞和单核细胞等产生细胞因子, 激活机体免疫系统, 这些特性使其成为蛋白疫苗和小分子药物研制的

重要靶标。本文对PLY的结构、功能及其相关疫苗等研究进展进行综述。

### 1 肺炎链球菌溶血素的结构特性

PLY是由471个氨基酸组成的分子量为53 kDa的一种多功能蛋白, 是属于胆固醇依赖性细胞溶血素(Cholesterol-dependent cytolysins, CDCs)的家族成员之一。PLY由4个不对称或微卷曲的结构域组成, 结构域1和3构成PLY的N端, 其中结构域1带有负电荷, 引导PLY单体分子与细胞膜进行结合<sup>[4]</sup>; 结构域3含有 $\beta$ -折叠和 $\alpha$ -螺旋结

基金项目: 国家自然科学基金(31400762); 重庆市科委专项(cstc2015shmszx80010, cstc2015jcyjBX0108); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(XDJK2015B002); 重庆市研究生科研创新项目(CYS16079); 西南大学国家级大学生创新项目(201610635020); 西南大学教育教学改革研究项目(2014JY070)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-23-68251196; E-mail: 聂奎, [niekui0123@126.com](mailto:niekui0123@126.com); 方仁东, [frend023@hotmail.com](mailto:frend023@hotmail.com)

收稿日期: 2016-07-14; 修回日期: 2016-09-07; 网络出版日期: 2016-10-12

构,参与PLY的构象变化。结构域2作为PLY的“颈部”,以单个甘氨酸连接结构域1和结构域4。C端的结构域4底部含有3个称为L1、L2和L3的环状结构(Loop),另外还有一个富含色氨酸基序(Trp-rich loop)的十一氨基酸多肽序列(ECTGLAWWWWR),这一基序是所有CDCs家族成员与膜上胆固醇结合的重要位点<sup>[5-6]</sup>。但最近有研究指出,PLY的晶体结构与CDCs家族其他成员存在差异,因结构域2和结构域4的交界面无氢键作用,故其在结构域1-3和结构域4之间无弯曲,因此它较其他家族成员更加瘦长<sup>[7]</sup>。

PLY与膜胆固醇结合,形成由34-50个单体分子组成的寡聚化前孔复合物,随后前孔复合物发生构象变化,结构域3中的2个 $\alpha$ -螺旋束变为2个 $\beta$ -发夹,结构域2中的 $\beta$ -折叠转变为 $\alpha$ -螺旋,复合物结构高度减少40 Å。结构域2的构象改变使结构域3更加接近细胞膜表面,促进 $\beta$ -发夹插入细胞膜内,形成一个直径约为25 nm的 $\beta$ -桶状跨膜孔。Farrand等<sup>[5]</sup>发现L1环状结构中的Thr459和Leu460是识别膜胆固醇的位点。随后Taylor等<sup>[8]</sup>提出PLY不仅通过L1识别膜胆固醇,还可通过多个环状结构与胆固醇相互作用。另外有研究指出十一氨基酸多肽序列中的Leu431和Trp433对PLY与胆固醇结合具有重要作用<sup>[9]</sup>。PLY除了可以与膜胆固醇结合外,膜上的碳水化合物也是PLY的一种受体<sup>[10]</sup>。Park等<sup>[9]</sup>指出L3和十一氨基酸多肽序列可以结合膜上的甘露糖。PLY除了在结构上与其他CDCs家族成员不同,在分泌机制上也存在明显的差异。位于胞质内的PLY不能直接分泌至胞外,因为其N端缺乏典型的信号分泌前导序列。研究表明肺炎链球菌感染过程中PLY可能通过自溶素的自溶作用或者溶解性抗生素作用,或是由宿主介导的免疫应答引起细胞壁裂解,

从而释放到胞外发挥其生理作用<sup>[11]</sup>。此外,Price等<sup>[12]</sup>指出结构域2也参与了PLY的分泌过程。

## 2 肺炎链球菌溶血素的功能特性

### 2.1 肺炎链球菌溶血素对细胞和组织的影响

肺炎链球菌感染初期主要定殖在宿主呼吸道,PLY通过作用于富含胆固醇的生物膜,打乱内皮细胞间紧密连接,并抑制支气管上皮纤毛的摆动,破坏机体呼吸道的机械屏障,促进肺炎链球菌对支气管上皮的粘附,减弱对下呼吸道粘液的清除,加速肺炎链球菌的感染。此外,PLY损伤肺泡毛细血管上皮结构,引起肺泡水肿和出血,诱发肺炎链球菌肺炎,产生的肺水为细菌的生长繁殖提供营养物质,促进细菌从上皮渗入肺间隙,最终进入血液导致机体菌血症<sup>[13]</sup>。因此,肺炎链球菌感染引起的肺炎是以上皮细胞高渗透性为特征的肺渗透性水肿。Lucas等<sup>[14]</sup>研究发现PLY能够促进钙离子流入,损伤微管网络组织或是调控血管内皮钙粘蛋白的表达,增加内皮单层的渗透性而引起渗透性水肿。另外也有研究显示PLY可上调血小板粘附因子CD62P,活化血小板,引起机体急性肺损伤和心肌损伤<sup>[15]</sup>。

PLY可通过多条途径诱导细胞焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡等死亡过程。首先,在肺炎链球菌感染小鼠巨噬细胞和小神经胶质细胞的研究中发现PLY可引起炎性小体组装和caspase-1活化诱导细胞焦亡(Pyroptosis)<sup>[16-18]</sup>。其次,PLY可通过线粒体途径影响细胞凋亡。包括由细胞色素C介导的经典凋亡途径和由凋亡诱导因子(Apoptosis-inducing factor, AIF)介导的不依赖于caspase的细胞凋亡途径<sup>[19-20]</sup>。另外,在内皮细胞中PLY还可通过死亡受体途径,激活丝裂原活化

蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase ,p38 MAPK)信号转导通路,调控凋亡过程<sup>[21]</sup>。Rai 等<sup>[22]</sup>最近报道了 PLY 可引起胞浆蛋白泄露和细胞溶解,并促进钙离子的流入和激活不同细胞信号通路。由于胞浆内钙离子水平升高,激活电子传递链和 NADPH 氧化酶,使细胞内活性氧簇(ROS)的产生不受机体调控,直接导致 DNA 双链断裂,阻滞细胞周期,引起细胞凋亡。最后,Gilley 等<sup>[23]</sup>报道了肺炎链球菌侵入心肌层后,通过 PLY 引起心肌损伤,激活坏死性凋亡途径(Necroptosis)。González-Juarbe 等<sup>[24]</sup>提出成孔毒素(Pore-forming toxin ,PFT)可诱导巨噬细胞依赖于 RIP1/3 途径的坏死性凋亡过程,提示 PLY 可能通过损坏细胞膜,破坏质膜上离子平衡,消耗 ATP,诱导细胞坏死性凋亡。

研究发现,PLY 能作用于真核细胞的大量基因,调节其转录活性。在 THP-1 单核细胞系中,利用 cDNA 芯片技术已经证实 PLY 对细胞内 142 种基因有正向调节作用。PLY 诱导组蛋白 H3 的脱磷酸化,减弱组蛋白表观遗传调节作用,从而抑制感染早期免疫基因的转录活性<sup>[25]</sup>。PLY 还可激活一系列信号传导通路。研究显示 PLY 诱导早期细胞膜去极化和质膜上微孔形成,引起钙离子流入,活化 rac GTP 酶和 rho GTP 酶,包括 rac-1 和 rho 相关激酶(Rho-associated kinase ,ROCK),从而诱导靶细胞肌动蛋白细胞骨架进行重排,引起细胞形态学的改变<sup>[26]</sup>。

## 2.2 肺炎链球菌溶血素与免疫系统

**2.2.1 激活补体:**研究表明,在缺少 PLY 特异性抗体的情况下,PLY 仍能通过经典途径激活补体。原因可能是 PLY 的结构域 4 与急性期反应蛋白(C-reaction protein ,CRP)在序列上具有同源性,但 Rossjohn 等<sup>[27]</sup>通过研究 PLY 的分子机制否定了

这一观点,提出 PLY 激活补体的特性与其和 IgG 的 Fc 区域具有功能同源性有关。尽管 PLY 能够激活补体,调节机体炎症应答,但也能够改变补体对入侵细菌的调理吞噬作用,引起肺炎链球菌感染。PLY 诱导机体 C3a 和 C5a 多肽的活化,激活补体系统。与此同时,分泌到胞外的 PLY 也能够使肺炎链球菌免受机体的补体调理作用,同时消耗 C3 补体分子,减弱补体沉积,降低机体内调理素水平,抑制吞噬细胞的吞噬作用和阻碍机体对细菌的清除<sup>[28]</sup>。

**2.2.2 促炎效应:**在肺炎链球菌感染早期,病原菌侵入机体后,引起多种免疫细胞活化,从而诱导宿主产生免疫应答。Riana 等<sup>[29]</sup>研究发现 PLY 诱导中性粒细胞中 IL-8 的合成与释放。另有研究指出 PLY 能促进中性粒细胞产生超氧化物,分泌弹性蛋白酶,诱导前列腺素 E2 与白三烯 B4 的产生<sup>[30]</sup>。最近一项研究表明,PLY 刺激中性粒细胞释放中性粒细胞胞外捕获网(Neutrophil extracellular traps ,NETs)。经证实 NETs 能够捕获病原体并限制其传播,同时提供高浓度的抗菌微环境来杀灭病原体。但是肺炎链球菌中荚膜多糖等毒力因子能够使病原菌免受 NETs 的作用,其结构中的高浓度组蛋白将会进一步引起肺泡上皮细胞和内皮细胞的损伤<sup>[31]</sup>。

肺炎链球菌感染中,PLY 除了可以诱导中性粒细胞产生炎症反应,还可通过 TLR4 作用于巨噬细胞。Shoma 等<sup>[32]</sup>指出肺炎链球菌感染巨噬细胞模型中,PLY 可通过 TLR4,活化 caspase-1,诱导一系列促炎细胞因子的成熟与分泌,例如 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18 等,引起机体的免疫应答过程。Nguyen 等<sup>[33-34]</sup>近来研究发现 PLY 与 TLR4 结合,活化 JNK/P38 信号通路,诱导转录激活因子 ATF3 表达上调,使其在核内与 c-Jun 相互作用,

进一步诱导 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  的成熟与分泌, 参与机体固有免疫应答过程。此外, TLR2 在 PLY 介导的肺部炎症致病机理中也扮演着重要的角色。与野生型小鼠相比, TLR2 敲除小鼠对 PLY 的应答能力减弱, 表明 TLR2 也参与由 PLY 引起的炎症反应。但是研究发现 TLR2 介导的炎症效应出现时间滞后, 提示 TLR2 可能参加机体的适应性免疫应答过程<sup>[35]</sup>。

近年来多项研究指出 PLY 与炎性小体的活化具有紧密联系。我们研究报道了在小鼠腹腔巨噬细胞感染模型中, 肺炎链球菌野生型 D39 菌株能被 NLRP3 和 AIM2 受体分子识别, 通过接头分子 ASC 募集 pro-caspase-1 组装炎性小体, 活化 caspase-1 进而引起 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟与分泌, 诱导机体产生免疫应答; 而 PLY 基因缺失菌株 (*Δply*) 感染巨噬细胞不能诱导炎性小体的活化及相应细胞因子的分泌。肺炎链球菌 D39 体内感染野生型小鼠和炎性小体关键分子 ASC 敲除小鼠 (ASC<sup>-/-</sup>), 结果发现 ASC<sup>-/-</sup> 小鼠被感染后的肺脏带菌数增加, 死亡率升高, 表明 PLY 参与诱导的炎性小体的活化对宿主抗肺炎链球菌感染起重要作用<sup>[16]</sup>。小鼠肺炎链球菌角膜感染模型中, PLY 诱导中性粒细胞内钾离子的流出, 激活 NLRP3 和 ASC 炎性小体, 进一步活化 caspase-1, 诱导 IL-1 $\beta$  的加工和分泌<sup>[17]</sup>。我们通过进一步研究发现了肺炎链球菌感染巨噬细胞中 PLY 诱导 AIM2 炎性小体活化的机理, AIM2 表达水平上调和 AIM2 炎性小体的组装受 I 型干扰素 (Type I IFNs) 的调控。与肺炎链球菌感染野生型小鼠相比, IFNAR1<sup>-/-</sup> 小鼠被感染后 AIM2 表达受限, 阻碍 AIM2 炎性小体的激活和 caspase-1 活化, 下游 IL-18 的分泌水平显著降低<sup>[36]</sup>。肺炎链球菌脑膜炎模型中, PLY 引起胞内 ATP 释放到胞外, 活化溶酶体内的组织蛋

白酶 B, 进一步活化 NLRP3 炎性小体, 诱导产生 IL-1 $\beta$ <sup>[37]</sup>。但是, Lemon 等<sup>[38]</sup>指出尽管 PLY 能够活化炎性小体, 诱导 IL-1 家族的成熟与分泌, 募集巨噬细胞和清除入侵的肺炎链球菌, 诱导机体的固有免疫应答, 但是研究结果显示 IL-1 细胞因子并没有参与机体的适应性免疫应答, 其引起的炎症反应将促进细菌繁殖和传播。

除了上述机制外, Das 等<sup>[39]</sup>研究提出 PLY 作用于巨噬细胞后, 胞内 p38 MAPK 发生磷酸化作用, 诱导巨噬细胞移动抑制因子 (Macrophage migration inhibitory factor, MIF) 表达, 促进鼻咽部巨噬细胞的聚集, 及时清除定殖细菌, 同时诱导机体产生 IgG 抗体, 介导机体的固有免疫应答和适应性免疫应答。此外, 近来有研究发现 PLY 还可以通过促进肺炎链球菌生物膜的形成, 介导机体的免疫应答<sup>[40]</sup>。

### 3 肺炎链球菌溶血素相关疫苗

随着对 PLY 的结构和功能研究的不断深入, PLY 逐渐成为肺炎链球菌新型疫苗研究的热点。目前, 已有研究报道 PLY 相关蛋白疫苗, 例如将 PLY 的第 433 位色氨酸代替为苯丙氨酸, 可获得毒力减弱的 PdB 蛋白, 但仍保留了一定的溶血活性, 免疫小鼠后能够阻断 PLY 引起的肺纤维化效应<sup>[41]</sup>。Goulart 等<sup>[42]</sup>研究指出肺炎链球菌表面蛋白 (PspA) 和 PdB 蛋白融合后制成的蛋白疫苗, 能够提高疫苗的交叉免疫保护作用, 诱导机体产生更为有效的免疫应答。Mann 等<sup>[43]</sup>发现由胆碱结合蛋白 A (CbpA) 和 PLY 类毒素 L460D 组成的融合蛋白可作为重组疫苗的重要靶标, 为宿主提供免疫保护。最近有 2 个 PLY 类毒素相关疫苗已经完成了一期阶段的评估。Kamtchoua 等<sup>[44]</sup>研究表明

肺炎PLY减毒衍生物(PlyD1)具有安全性和免疫原性,可产生中和性抗体IgG,是一种重要的候选蛋白疫苗。此外,由GSK研制的肺炎链球菌和流感嗜血杆菌三价疫苗PhTD-dPly-PD已经进入一期安全性和免疫原性评估阶段,结果显示该疫苗能诱导Th1和Th17细胞免疫应答,可使成人对PLY产生免疫保护作用<sup>[45]</sup>。另外,Liu等<sup>[46]</sup>研究表明第146位丙氨酸缺失的 $\Delta A146Ply$ 是一种良好的免疫佐剂,热休克蛋白DnaJ和 $\Delta A146Ply$ 融合蛋白疫苗可诱导产生分泌性IgA和IL-17,增强对机体的交叉保护作用。

## 4 结语

肺炎链球菌溶血素是肺炎链球菌的重要毒力因子,在肺炎链球菌感染进程中发挥着重要的作用。近年来对PLY致病机制的研究,为治疗IPD奠定了坚实的理论基础。PLY可作用于多种免疫细胞,诱导机体产生免疫应答,若作为一种蛋白疫苗的靶标,将有效预防SP感染。PLY对细胞膜上的肌动蛋白具有高亲和力,通过与结构域3相互作用可引起肌动蛋白磷酸化,提示PLY可作为肌动蛋白细胞骨架的重塑因子<sup>[47]</sup>。PLY还可诱导肺泡巨噬细胞内精氨酸酶I表达,抑制炎症细胞的聚集,使机体免受禽流感病毒感染<sup>[48]</sup>。因此,深入研究PLY的致病机制也可以为其他疾病的治疗提供新的思路。

## 参考文献

[1] Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3(7), doi: 10.1101/cshperspect.a010215.

[2] Vernatter J, Pirofski LA. Current concepts in host-microbe

interaction leading to pneumococcal pneumonia. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2013, 26(3): 277–283.

[3] Tai SS. *Streptococcus pneumoniae* serotype distribution and pneumococcal conjugate vaccine serotype coverage among pediatric patients in East and Southeast Asia, 2000–2014: a pooled data analysis. *Vaccines (Basel)*, 2016, 4(1): 4.

[4] Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Current Molecular Medicine*, 2008, 8(6): 497–509.

[5] Farrand AJ, LaChapelle S, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK, Collier RJ. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(9): 4341–4346.

[6] Marshall JE, Faraj BH, Gingras AR, Lonnen R, Sheikh MA, El-Mezgueldi M, Moody PC, Andrew PW, Wallis R. The crystal structure of pneumolysin at 2.0 Å resolution reveals the molecular packing of the pre-pore complex. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13293.

[7] Lawrence SL, Feil SC, Morton CJ, Farrand AJ, Mulhern TD, Gorman MA, Wade KR, Tweten RK, Parker MW. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14352.

[8] Taylor SD, Sanders ME, Tullos NA, Stray SJ, Norcross EW, McDaniel LS, Marquart ME. The cholesterol-dependent cytolytic pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* binds to lipid raft microdomains in human corneal epithelial cells. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61300.

[9] Park SA, Park YS, Bong SM, Lee KS. Structure-based functional studies for the cellular recognition and cytolytic mechanism of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Structural Biology*, 2016, 193(2): 132–140.

[10] Lim JE, Park SA, Bong SM, Chi YM, Lee KS. Characterization of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*, interacting with carbohydrate moiety and cholesterol as a component of cell membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 430(2): 659–663.

[11] Mitchell TJ, Dalziel CE. The biology of pneumolysin. *Subcellular Biochemistry*, 2014, 80: 145–160.

[12] Price KE, Greene NG, Camilli A. Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(14): 3651–3660.

[13] Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and

- function. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 187–207.
- [14] Lucas R, Yang G, Gorshkov BA, Zemskov EA, Sridhar S, Umapathy NS, Jezierska-Drutel A, Alieva IB, Leustik M, Hossain H, Fischer B, Catravas JD, Verin AD, Pittet JF, Caldwell RB, Mitchell TJ, Cederbaum SD, Fulton DJ, Matthay MA, Caldwell RW, Romero MJ, Chakraborty T. Protein kinase C- $\alpha$  and arginase I mediate pneumolysin-induced pulmonary endothelial hyperpermeability. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2012, 47(4): 445–453.
- [15] Nel JG, Durandt C, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R, Tintinger GR. Pneumolysin mediates platelet activation *in vitro*. *Lung*, 2016, 194: 589–593.
- [16] Fang RD, Tsuchiya K, Kawamura I, Shen YN, Hara H, Sakai S, Yamamoto T, Fernandes-Alnemri T, Yang RL, Hernandez-Cuellar E, Dewamitta SR, Xu YT, Qu HX, Alnemri ES, Mitsuyama M. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(9): 4890–4899.
- [17] Karmakar M, Katsnelson M, Malak HA, Greene NG, Howell SJ, Hise AG, Camilli A, Kadioglu A, Dubyak GR, Pearlman E. Neutrophil IL-1 $\beta$  processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K<sup>+</sup> efflux. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(4): 1763–1775.
- [18] Kim JY, Paton JC, Briles DE, Rhee DK, Pyo S. *Streptococcus pneumoniae* induces pyroptosis through the regulation of autophagy in murine microglia. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44161–44178.
- [19] Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus M, Freyer D, Dagand E, Bermpohl D, Mitchell TJ, Bechmann I, Weber JR. Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infection and Immunity*, 2007, 75(9): 4245–4254.
- [20] Mitchell L, Smith SH, Braun JS, Herzog KH, Weber JR, Tuomanen EI. Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2004, 190(11): 2039–2046.
- [21] Zhou AE, Wang H, Lan K, Zhang XM, Xu WC, Yin YB, Li DR, Yuan J, He YJ. Apoptosis induced by pneumolysin in human endothelial cells involves mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *International Journal of Molecular Medicine*, 2012, 29(6): 1025–1030.
- [22] Rai P, He F, Kwang J, Engelward BP, Chow VTK. Pneumococcal pneumolysin induces DNA damage and cell cycle arrest. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22972.
- [23] Gilley RP, González-Juarbe N, Shenoy AT, Reyes LF, Dube PH, Restrepo MI, Orihuela CJ. Infiltrated macrophages die of pneumolysin-mediated necroptosis following pneumococcal myocardial invasion. *Infection and Immunity*, 2016, 84(5): 1457–1469.
- [24] González-Juarbe N, Gilley RP, Hinojosa CA, Bradley KM, Kamei A, Gao G, Dube PH, Bergman MA, Orihuela CJ. Pore-forming toxins induce macrophage necroptosis during acute bacterial pneumonia. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(12): e1005337.
- [25] Hamon MA, Batsché E, Régnault B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, Cossart P. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(33): 13467–13472.
- [26] Iliev AI, Djannatian JR, Nau R, Mitchell TJ, Wouters FS. Cholesterol-dependent actin remodeling via RhoA and Rac1 activation by the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(8): 2897–2902.
- [27] Rossjohn J, Gilbert RJC, Crane D, Morgan PJ, Mitchell TJ, Rowe AJ, Andrew PW, Paton JC, Tweten RK, Parker MW. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 284(2): 449–461.
- [28] Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *Journal of Immunology*, 2005, 175(3): 1813–1819.
- [29] Cockeran R, Durandt C, Feldman C, Mitchell TJ, Anderson R. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils *in vitro*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186(4): 562–565.
- [30] Cockeran R, Steel HC, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R. Pneumolysin potentiates production of prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> by human neutrophils. *Infection and Immunity*, 2001, 69(5): 3494–3496.
- [31] Nel JG, Theron AJ, Durandt C, Tintinger GR, Pool R, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R. Pneumolysin activates neutrophil extracellular trap formation. *Clinical and Experimental Immunology*, 2016, 184(3): 358–367.

- [32] Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, Nomura T, Hara H, Uchiyama R, Daim S, Mitsuyama M. Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1 $\alpha$  and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infection and Immunity*, 2008, 76(4): 1547–1557.
- [33] Nguyen CT, Kim EH, Luong TT, Pyo S, Rhee DK. ATF3 confers resistance to pneumococcal infection through positive regulation of cytokine production. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 210(11): 1745–1754.
- [34] Nguyen CT, Kim EH, Luong TT, Pyo S, Rhee DK. TLR4 mediates pneumolysin-induced ATF3 expression through the JNK/p38 pathway in *Streptococcus pneumoniae*-infected RAW 264.7 cells. *Molecules and Cells*, 2015, 38(1): 58–64.
- [35] Dessing MC, Hirst RA, de Vos AF, van der Poll T. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7993.
- [36] Fang RD, Hara H, Sakai S, Hernandez-Cuellar E, Mitsuyama M, Kawamura I, Tsuchiya K. Type I interferon signaling regulates activation of the absent in melanoma 2 inflammasome during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*, 2014, 82(6): 2310–2317.
- [37] Hoegen T, Tremel N, Klein M, Angele B, Wagner H, Kirschning C, Pfister HW, Fontana A, Hammerschmidt S, Koedel U. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *Journal of Immunology*, 2011, 187(10): 5440–5451.
- [38] Lemon JK, Miller MR, Weiser JN. Sensing of interleukin-1 cytokines during *Streptococcus pneumoniae* colonization contributes to macrophage recruitment and bacterial clearance. *Infection and Immunity*, 2015, 83(8): 3204–3212.
- [39] Das R, LaRose MI, Hergott CB, Leng L, Bucala R, Weiser JN. Macrophage migration inhibitory factor promotes clearance of pneumococcal colonization. *The Journal of Immunology*, 2014, 193(2): 764–772.
- [40] Shak JR, Ludewick HP, Howery KE, Sakai F, Yi H, Harvey RM, Paton JC, Klugman KP, Vidal JE. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *MBio*, 2013, 4(5): e00655–13.
- [41] Knippenberg S, Ueberberg B, Maus R, Bohling J, Ding N, Tarres MT, Hoymann HG, Jonigk D, Izykowski N, Paton JC, Ogunniyi AD, Lindig S, Bauer M, Welte T, Seeger W, Guenther A, Sisson TH, Gaudie J, Kolb M, Maus UA. *Streptococcus pneumoniae* triggers progression of pulmonary fibrosis through pneumolysin. *Thorax*, 2015, 70(7): 636–646.
- [42] Goulart C, da Silva TR, Rodriguez D, Politano WR, Leite LCC, Darrieux M. Characterization of protective immune responses induced by pneumococcal surface protein A in fusion with pneumolysin derivatives. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59605.
- [43] Mann B, Thornton J, Heath R, Wade KR, Tweten RK, Gao G, El Kasmi K, Jordan JB, Mitrea DM, Kriwacki R, Maisonneuve J, Alderson M, Tuomanen EI. Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(7): 1116–1125.
- [44] Kamtchoua T, Bologa M, Hopfer R, Neveu D, Hu B, Sheng X, Corde N, Pouzet C, Zimmermann G, Gurunathan S. Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. *Vaccine*, 2013, 31(2): 327–333.
- [45] Berglund J, Vink P, Da Silva FT, Lestrade P, Boutriau D. Safety, immunogenicity, and antibody persistence following an investigational *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* triple-protein vaccine in a phase 1 randomized controlled study in healthy adults. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2014, 21(1): 56–65.
- [46] Liu YS, Wang H, Zhang S, Zeng LB, Xu XY, Wu KF, Wang W, Yin NL, Song ZX, Zhang XM, Yin YB. Mucosal immunization with recombinant fusion protein DnaJ- $\Delta$ A146Ply enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice via interleukin 17A. *Infection and Immunity*, 2014, 82(4): 1666–1675.
- [47] Hupp S, Förtsch C, Wippel C, Ma JT, Mitchell TJ, Iliev AI. Direct transmembrane interaction between actin and the pore-competent, cholesterol-dependent cytolysin pneumolysin. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(3): 636–646.
- [48] Wolf AI, Strauman MC, Mozdzanowska K, Williams KL, Osborne LC, Shen H, Liu Q, Garlick D, Artis D, Hensley SE, Caton AJ, Weiser JN, Erikson J. Pneumolysin expression by *Streptococcus pneumoniae* protects colonized mice from influenza virus-induced disease. *Virology*, 2014, (462/463): 254–265.

## Research progress in pneumolysin

Rui Wu, Kui Nie<sup>\*</sup>, Rendong Fang<sup>\*</sup>

College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Pneumolysin is a multifunctional virulence factor expressed by *Streptococcus pneumoniae*. Pneumolysin includes 4 domains and is a member of cholesterol-dependent cytolysins. Pneumolysin has extensive cytotoxicity to a range of host cells. Furthermore, pneumolysin can activate complement classical pathway, and induce macrophages and monocytes to produce proinflammatory cytokines, mediate host immune responses. Consequently, pneumolysin is a potential candidate target for research and development of vaccines and drugs. In this review, the latest research progresses on the structure and function of pneumolysin, and related vaccines are discussed.

**Keywords:** pneumolysin, cytotoxicity, proinflammatory properties, vaccine

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400762), by the Chongqing Science and Technology Commission (cstc2015shmszx80010, cstc2015jcyjBX0108), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2015B002), by the Chongqing Graduated Students Research Project (CYS16079), by the National University Students Innovation Projects of Southwest University (201610635020) and by Education and Teaching Reform Research Project of Southwest University (2014JY070)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68251196; E-mail: Kui Nie, niekui0123@126.com; Rendong Fang, frend023@hotmail.com  
Received: 14 July 2016; Revised: 7 September 2016; Published online: 12 October 2016