

研究报告

猪链球菌 2 型 PPCDC 蛋白对血脑屏障通透性的影响

贾文丹, 梅纪坤, 王梓萌, 李丰阳, 雷连成, 李娜*

吉林大学 动物医学学院 人畜共患传染病重症诊治全国重点实验室, 吉林 长春 130062

贾文丹, 梅纪坤, 王梓萌, 李丰阳, 雷连成, 李娜. 猪链球菌 2 型 PPCDC 蛋白对血脑屏障通透性的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 632-642.

JIA Wendan, MEI Jikun, WANG Zimeng, LI Fengyang, LEI Liancheng, LI Na. *Streptococcus suis* type 2 PPCDC protein affects permeability of blood-brain barrier[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 632-642.

摘要:【背景】猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)是引起全球经济和公共卫生问题的重要人兽共患病病原菌, 引发脑膜炎、关节炎和败血症等临床症状。磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶(phosphopantothenoylcyteine decarboxylase, PPCDC)在前期构建的猪体外血脑屏障模型与猪链球菌全基因组噬菌体随机展示文库的相互作用中被筛选出来, 但其影响血脑屏障的机制尚不清楚。

【目的】探究 PPCDC 在 SS2 诱导脑膜炎过程中发挥的作用。【方法】利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统诱导表达重组蛋白 rPPCDC, 通过体外构建人脑微血管内皮细胞单层屏障模型和体内小鼠感染模型探究其对血脑屏障通透性的影响, 制备 rPPCDC 疫苗进行小鼠免疫保护试验。【结果】成功纯化出可溶性重组蛋白 rPPCDC, 发现其在体外可以降低单层屏障模型的细胞跨膜电阻值, 增加突破单层屏障的 SS2 数量。体内可促进 SS2 对小鼠的致病性。进一步研究发现, 接种 rPPCDC 疫苗的小鼠血清中有更高的 rPPCDC 抗体水平, 存活率升高。【结论】PPCDC 能够增强血脑屏障通透性, 促进 SS2 对小鼠血脑屏障的破坏和脑部感染, 并具有免疫保护效力, 为后续 SS2 致病机制研究和疫苗研发提供新思路。

关键词: 猪链球菌 2 型; 磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶; 血脑屏障; 免疫保护

资助项目: 国家重点研发计划(2021FYD1800405)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021FYD1800405).

*Corresponding author. E-mail: vetlina2013@126.com

Received: 2024-11-14; Accepted: 2024-12-30; Published online: 2025-01-07

***Streptococcus suis* type 2 PPCDC protein affects permeability of blood-brain barrier**

JIA Wendan, MEI Jikun, WANG Zimeng, LI Fengyang, LEI Liancheng, LI Na*

State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Severe Zoonotic Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: **[Background]** *Streptococcus suis* type 2 (SS2) is a major zoonotic pathogen leading to global economic and public health problems, causing meningitis, arthritis, and sepsis. Phosphopantothienoylcysteine decarboxylase (PPCDC) was screened out in the previous study about the interaction between the porcine blood-brain barrier model *in vitro* and *S. suis* genome-wide phage display random library, while the mechanism of PPCDC in affecting the blood-brain barrier remains unclear. **[Objective]** To explore the role of PPCDC in the SS2-induced meningitis. **[Methods]** In this study, the recombinant protein rPPCDC was expressed in *Escherichia coli*. The monolayer barrier model of human brain microvascular endothelial cells *in vitro* and the mouse infection model *in vivo* were established to study the effect of rPPCDC on the permeability of blood-brain barrier. Furthermore, the rPPCDC vaccine was prepared for the immunoprotection test in mice. **[Results]** The soluble recombinant protein rPPCDC was successfully purified. This protein reduced the transmembrane resistance of cells in the monolayer barrier model, increased the number of SS2 breaking through the monolayer barrier *in vitro*. In addition, the protein enhanced the pathogenicity of SS2 in mice. The mice vaccinated with rPPCDC had higher serum levels of rPPCDC antibodies and increased survival. **[Conclusion]** PPCDC can enhance the permeability of blood-brain barrier and promote the destruction of blood-brain barrier and brain infection of SS2 in mice, thus exerting the immunoprotective effect. The findings provide new ideas for the future research on the pathogenic mechanism of SS2 and the development of vaccines.

Keywords: *Streptococcus suis* type 2; PPCDC; blood-brain barrier; immunoprotection

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种革兰氏阳性球菌,对全球范围内猪养殖业构成严峻挑战,并严重威胁着人类的生命健康安全^[1]。研究者们根据猪链球菌荚膜抗原的差异,已经成功鉴定出 29 种不同的血清型^[2]。在这些血清型中,猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)是尤为重要的一种,它不仅广泛存在于受感染的猪只中,而且具有较高的致病性和传播性^[3]。SS2 感染引起猪的脑膜炎、败血症、关节炎、心内膜炎等,人类通过接触带病动物或受污染的生

猪肉产品患病,从而引发脑膜炎、化脓性关节炎、心内膜炎等^[4-5],严重危害公共卫生安全。

脑膜炎是 SS2 感染引起的最重要的临床特征。SS2 的感染进程取决于病原体和宿主之间复杂的相互作用^[6],猪链球菌能否突破由脑血管内皮细胞等构成的血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)决定了其能否诱发宿主脑膜炎。在对 SS2 致病机理展开探究的过程中,荚膜多糖、烯醇化酶、溶血素等与致病性相关的毒力因子被发现,它们直接或间接地参与了 SS2 对宿主

的黏附、入侵、繁殖和扩散等过程^[7]。实验室前期通过构建猪体外 BBB 模型与猪链球菌全基因组噬菌体随机展示文库相互作用,筛选出 14 种可能参与猪链球菌突破 BBB 过程的蛋白分子^[8],除溶血素^[9]等几种已被研究报道的相关分子外,磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶(phosphopantothenoylcyteine decarboxylase, PPCDC)在前期研究中被发现可能参与猪链球菌破坏 BBB 的过程^[10],但并未开展相关研究。

因此,我们假设 PPCDC 在 SS2 感染宿主的过程中,通过损害 BBB 完整性导致脑膜炎的发生。我们使用体外人脑微血管内皮细胞单层屏障模型和 SS2 感染的小鼠模型探究 PPCDC 蛋白对 BBB 通透性的影响,以期为后续探究 SS2 与机体免疫反应机制和筛选疫苗成分提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 样品

猪链球菌 2 型 SC19 菌株、质粒 pET28a 和永生生化人脑微血管内皮细胞(human cortical microvessels endothelial cells/D3, hCMEC/D3),本实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 感受态细胞, TaKaRa 公司。

SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,体重为 20–22 g,辽宁长生生物技术股份有限公司。实验过程符合吉林大学动物伦理福利要求,审查编号为:SY202201009。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

脑心浸液(brain heart infusion, BHI)肉汤培养基,青岛海博生物技术有限公司;1640 培养基, Gibco 公司。2 \times Prime STAR Premix、限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒小提试剂盒,天根生化科

技(北京)有限公司;Ni SepharoseTM 6 Fast Flow 蛋白纯化柱, GE 公司;His-tag 小鼠单克隆抗体,碧云天生物技术股份有限公司;山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体, Affinity Biosciences 公司;Montanide Gel-01 pr, Seppic 公司;ELISA 试剂盒,伊莱瑞特生物科技股份有限公司。琼脂糖水平电泳槽和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司;PCR 基因扩增仪,杭州博日科技股份有限公司;跨上(内)皮细胞电阻测定仪,默克密理博公司。

1.3 引物设计

查询 NCBI 公布的猪链球菌 2 型 SC19 菌株的 PPCDC 基因序列(CP020863.1),设计并合成引物 P1 (5'-CGCGGATCCATGGCTAATATCACAC TTGC-3')和 P2 (5'-CCCAAGCTTTTATTTTTCATCAAGGGTG-3')。

1.4 重组表达载体 pET28a-PPCDC 的构建

吸取 37 °C、180 r/min 于 BHI 液体培养基中培养过夜的 SS2 SC19 菌液,12 000 r/min 离心 5 min 弃上清,用无菌水重悬后,100 °C 煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,提取出 SC19 全基因组 DNA。采用 P1/P2 扩增 PPCDC 目的基因。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Prime STAR Premix 25 μ L,模板(118.2 ng/ μ L) 1 μ L, P1、P2 (10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 10 s, 58 °C 5 s, 72 °C 1 min, 35 次循环;72 °C 10 min;4 °C 保存。回收 PCR 产物,将 PPCDC 基因与 pET28a 载体均用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切,产物经纯化后连接并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,按照上述程序进行 PCR 反应鉴定及测序鉴定,选择鉴定为阳性的重组质粒冻存。

1.5 重组蛋白 rPPCDC 的诱导表达及纯化

将鉴定为阳性的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,用诱导剂 IPTG 诱导蛋白表达。6 000 r/min、4 °C 离心 10 min 收集菌体沉

淀, 重悬后冰上超声破碎, 功率 200 W, 超声 5 s、停止 5 s, 共 15 min, 重复 4 次直至菌液透明不黏稠, 使其裂解释放内容物, 使用 Ni-NTA 亲和柱进行纯化。为了确定洗脱目的蛋白的咪唑浓度, 收集不同浓度咪唑洗脱后的蛋白液进行 SDS-PAGE 分析。超滤进一步浓缩、纯化蛋白。

采用 BCA 法测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 使用脱脂奶粉室温封闭, 经过一抗(His-tag 小鼠单克隆抗体)、二抗(山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体)孵育, 进行化学发光检测, 通过曝光获取并分析结果。

1.6 PPCDC 对 SS2 与 hCMEC/D3 侵袭、黏附影响的检测

hCMEC/D3 细胞在 6 孔板中培养至占孔底 80% 左右(约 10^6 个), 弃去培养基, 对照孔加入基础培养基, 处理孔加入 rPPCDC 进行刺激, 37 °C 孵育 3 h。以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=20 侵染细胞, 37 °C 孵育 1 h, PBS 清洗, 加入 0.5% Triton 作用 15 min 后, 6 000 r/min、4 °C 离心 1 min 收集沉淀, 涂布平板, 计算出细菌总数。侵袭实验是在侵染细胞 1 h 后, PBS 清洗, 孔内加入含有庆大霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 1640 培养基孵育 1 h 以清除表面细菌, 再进行上述裂解、涂板试验, 计算得出侵袭菌数。黏附菌数为细菌总数与侵袭菌数之差。

1.7 PPCDC 对体外 hCMEC/D3 单层屏障模型通透性影响的检测

调整 hCMEC/D3 浓度为 4×10^4 个/mL, 每孔 500 μL 铺在 transwell 细胞培养小室中。测定 hCMEC/D3 单层屏障细胞跨膜电阻值, 单位为 Ω/cm^2 。细胞跨膜电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER)= $1.12 \times (\text{刺激组电阻} - \text{空白组电阻})$ 。监测到 TEER 值持续稳定后, 表明单层屏障构建成功。

待单层屏障建立后, 设置对照(PBS)组、rPPCDC 组、SS2 组及 SS2+rPPCDC 组。测定蛋白刺激后 1、2、3、6、9、12、24 h 的 TEER 值。同时, 蛋白添加 1 h 后, 向 SS2 及 SS2+rPPCDC 组添加菌株 SC19 刺激 2 h, 吸取 transwell 下室培养基, 涂板培养后进行菌落计数。

1.8 PPCDC 对小鼠 BBB 通透性的检测

将 15 只雌性 BALB/c 小鼠平均分至 SS2 组、SS2+PPCDC 组和对照(PBS)组。分别对各组小鼠尾静脉注射 150 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ rPPCDC 或等体积对照用 PBS。30 min 后, 将对数期 SS2 菌株(OD_{600} 值约为 0.8)以 1×10^8 CFU 的剂量腹腔注射小鼠。感染 24 h 后通过心脏灌注后取脑, 取脑前 1 h 尾静脉注射 200 μL 1%伊文思蓝(evans blue, EB)。取 3/4 脑组织, 使用甲酰胺提取脑中 EB, 采用分光光度计测量上清液 OD_{600} , 对脑中 EB 含量进行定量分析。取 1/4 脑, 匀浆后涂板计数, 检测脑组织菌量变化。

1.9 重组蛋白 rPPCDC 疫苗的制备及动物免疫

rPPCDC 与 10% Gel-01 混合后通过背部多点皮下注射 100 μg 蛋白, 对小鼠进行免疫接种, 对照组为生理盐水, 14 d 及 28 d 后分别进行二次免疫和加强免疫。采集小鼠尾尖血制备血清, 山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体为二抗, 利用间接 ELISA 方法检测血清中重组蛋白的抗体水平。使用 ELISA 试剂盒检测血清中 IFN- γ 和 IL-4 的表达水平。最后用对数期 SS2 菌株以 1×10^8 CFU 的剂量腹腔感染小鼠, 记录小鼠存活情况。

1.10 统计学分析

利用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析, 采用独立样本 t 检验确定差异性。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体 pET28a-PPCDC 的构建结果

分别扩增质粒 pET28a、SC19 全基因组及构建的重组表达载体 pET28a-PPCDC 中的 PPCDC 基因片段, 经过电泳后, 在重组表达载体 pET28a-PPCDC 泳道中可见约为 549 bp 的基因片段, 与预期片段大小相符(图 1A)。对 pET28a-PPCDC 重组质粒进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 结果显示得到预期大小的目的基因片段(图 1B)。同时, 测序结果显示无氨基酸改变的碱基突变, 表明阳性重组质粒 pET28a-PPCDC 构建成功。

2.2 重组蛋白 rPPCDC 的诱导表达及纯化结果

保存的阳性重组质粒经转化、诱导表达

后, 使用 Ni-NTA 亲和柱进行纯化, 经超滤进一步浓缩蛋白。制备蛋白样本进行 SDS-PAGE 分析, 在 15–25 kDa 之间显现出一条较宽的蛋白条带, 大小符合预测的蛋白分子质量大小 22 kDa, 即确定 rPPCDC 重组蛋白在上清液中表达, 被 500 mmol/L 咪唑成功洗脱(图 2A), 经超滤得到进一步浓缩、纯化的蛋白(图 2B)。

同时对 pET28a-PPCDC 重组质粒的 PPCDC 蛋白表达情况进行 Western blotting 验证。结果显示, 存在一条约 22 kDa 的条带(图 2C), 与预期蛋白片段相似, 表明成功诱导并纯化 rPPCDC 蛋白。

2.3 PPCDC 对 SS2 与 hCMEC/D3 侵袭、黏附的影响

结果显示, 相较于对照组, 重组蛋白 rPPCDC 的添加没有明显改变黏附在 hCMEC/D3 上的菌数, 但侵入细胞内的菌数有所增加(图 3)。这表明 PPCDC 增强了 SS2 对 hCMEC/D3 的侵袭。

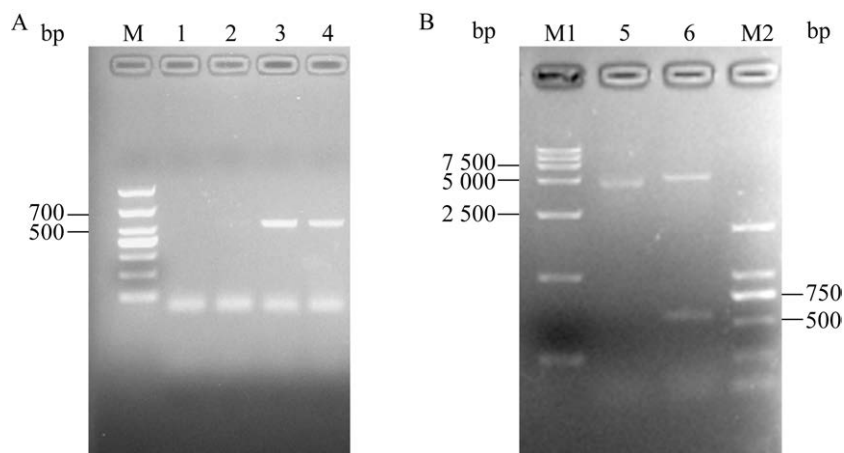


图 1 重组表达载体 pET28a-PPCDC 的鉴定 A: PCR 鉴定结果(M: DL1000 DNA marker; 1: 阴性对照; 2: pET28a 质粒; 3: SC19 全基因组; 4: 重组表达载体 pET28a-PPCDC)。B: 双酶切鉴定结果(M1: DL15000 DNA marker; 5: 重组表达载体 pET28a-PPCDC; 6: 重组表达载体 pET28a-PPCDC 双酶切片段; M2: DL2000 DNA marker)。

Figure 1 Identification of the recombinant expression vector pET28a-PPCDC. A: PCR identification results (M: DL1000 DNA marker; 1: Negative control; 2: pET28a plasmid; 3: SC19 complete genome; 4: Recombinant expression vector pET28a-PPCDC). B: Double enzyme digestion results (M1: DL15000 DNA marker; 5: Recombinant expression vector pET28a-PPCDC; 6: Recombinant expression vector pET28a-PPCDC double restriction fragment; M2: DL2000 DNA marker).

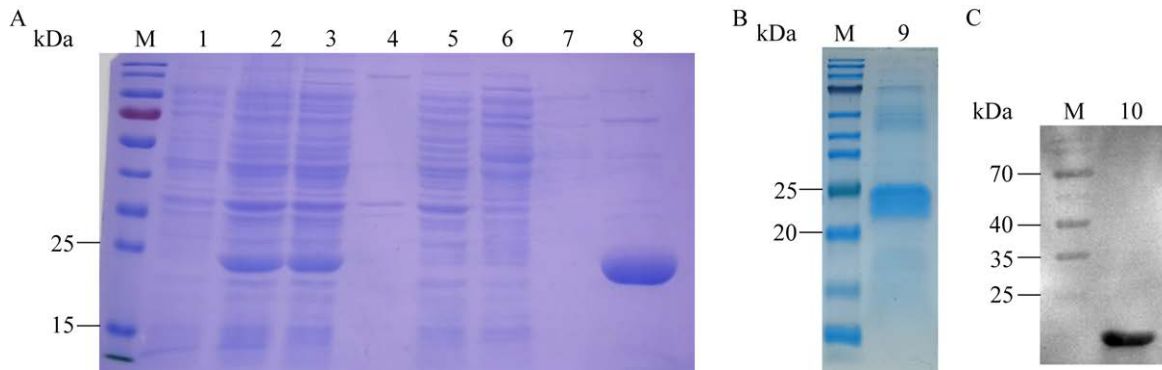


图 2 诱导表达及纯化鉴定 A:诱导表达纯化 PPCDC 的 SDS-PAGE 结果(1: IPTG 诱导前菌液; 2: IPTG 诱导后菌液; 3: 破碎后上清; 4: 破碎后沉淀; 5: 流出液; 6: 20 mmol/L 咪唑洗脱蛋白液; 7: 50 mmol/L 咪唑洗脱蛋白液; 8: 500 mmol/L 咪唑洗脱蛋白液)。B: rPPCDC 的 SDS-PAGE 检测结果(9: 重组蛋白 rPPCDC)。C: rPPCDC 的 Western blotting 检测结果(10: 重组蛋白 rPPCDC)。M: 蛋白 marker。

Figure 2 Identification of induced expression and purification. A: SDS-PAGE results of induced expression and purified PPCDC (1: Bacterial broth before IPTG induction; 2: Bacterial broth after IPTG induction; 3: Supernatant after crushing; 4: Precipitation after crushing; 5: Effluent; 6: 20 mmol/L imidazole-eluting protein solution; 7: 50 mmol/L imidazole-eluting protein solution; 8: 500 mmol/L imidazole-eluting protein solution); B: SDS-PAGE results of rPPCDC (9: Recombinant protein rPPCDC); C: Western blotting results of rPPCDC (10: Recombinant protein rPPCDC). M: Protein marker.

2.4 PPCDC 对体外 hCMEC/D3 单层屏障模型通透性的影响

hCMEC/D3 单层屏障模型是一种重要的实验工具, 用于模拟和研究体内 BBB 的功能和特性, 模型良好的屏障功能和稳定性至关重要。如图 4A 所示, 在小室接种 hCMEC/D3 细胞后的 8 d 内, 模型的电阻值持续升高, 之后便趋于稳定, 表明建立的体外 hCMEC/D3 单层屏障模型状态良好, 可用于后续实验。

TEER 值反映了细胞间紧密连接程度及细胞通透性, 值越高, 表示连接越紧密, 屏障功能更好^[11]。我们将重组蛋白 rPPCDC 加入上室, 利用跨上(内)皮细胞电阻测定仪持续监测单层屏障模型 TEER 值 24 h 内的变化。结果显示, 相较于 PBS 组, 在 rPPCDC 作用于体外单层屏障模型 2 h 后, rPPCDC 组模型 TEER 值下

降趋势更加明显, 并且显著低于对照组(图 4B), 表明 PPCDC 具有增加 hCMEC/D3 单层屏障模型通透性的作用。另外, 我们评估了穿越单层屏障的菌落数。结果如图 4C 所示, 相较于对照组, 重组蛋白 rPPCDC 添加后显著增加了突破单层屏障的 SS2 (SC19)的数量, 提示 PPCDC 损害了 BBB 的屏障功能, 使得 SS2 更容易突破屏障。

2.5 PPCDC 增加小鼠 BBB 的通透性

当 BBB 受损时, 脑伊文思蓝(evans blue, EB)染料可渗透进入脑组织, 通过检测脑组织中 EB 染料的含量或分布可以评估 BBB 的通透性。相较于 PBS 组, 感染后的 SS2 组及 SS2+rPPCDC 组小鼠脑部都显示了一定程度的组织蓝染, 另外, SS2+rPPCDC 组的蓝染程度更深, 区域面积更大(图 5A)。绘制标准曲线, 计算脑组织中 EB 含量,

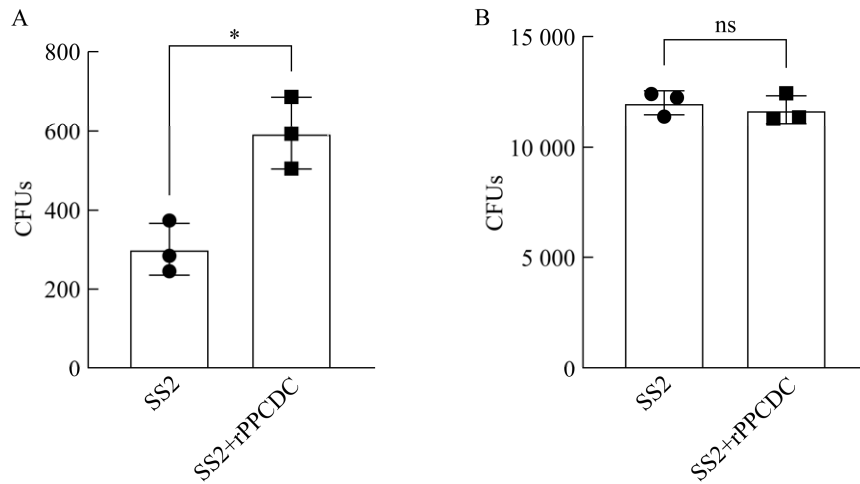


图3 PPCDC对SS2侵袭(A)、黏附(B)hCMEC/D3细菌数量的影响

Figure 3 Effect of PPCDC on the number of bacteria invading (A) and adhering (B) to hCMEC/D3 by SS2. *: $P < 0.05$; ns: $P > 0.05$.

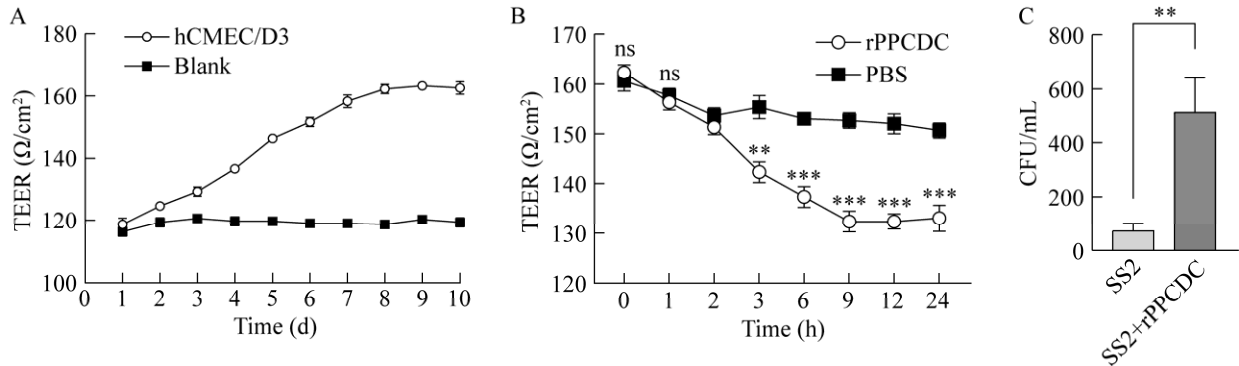


图4 rPPCDC对单层屏障模型通透性的影响 A: 单层屏障模型的建立; B: rPPCDC作用单层屏障模型后TEER值的测定; C: 突破单层屏障模型的细菌数量。

Figure 4 Effect of rPPCDC on the permeability of monolayer barrier model. A: The establishment of hCMEC/D3 barrier model; B: The detection of TEER of barrier model after treatment with rPPCDC; C: Number of bacteria breaking across the monolayer barrier model. ns: $P > 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

结果显示, rPPCDC蛋白感染组小鼠脑部EB的含量显著高于SS2组(图5B)。同时,对脑组织中活菌进行计数,发现SS2+rPPCDC组数量显著高于SS2组(图5C),进一步说明PPCDC增加了BBB的通透性。上述结果证实,在SS2感染过程中PPCDC对小鼠BBB通透性的加强作用。

2.6 重组蛋白rPPCDC疫苗效果评价

为了评估重组蛋白rPPCDC的免疫原性,我们使用rPPCDC与佐剂混合制备成疫苗,对小鼠进行初次免疫、二次免疫及加强免疫,SS2感染后观察小鼠存活率。第3次免疫后小鼠血清抗体水平检测结果显示,免疫组小鼠血清抗体水平显著提高(图6A)。同时,我们使用

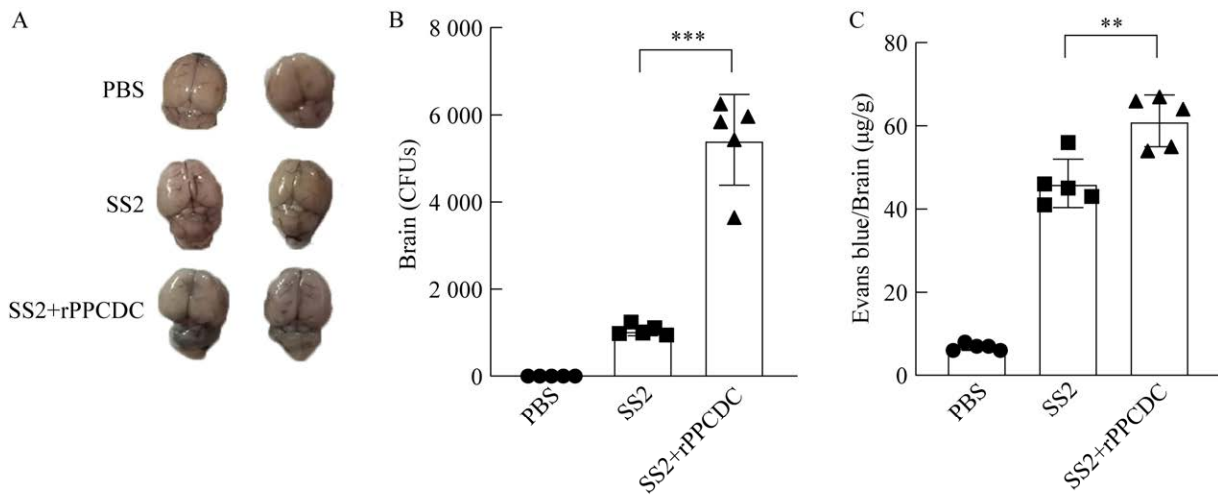


图 5 rPPCDC 对血脑屏障通透性的影响 A: EB 染色后小鼠脑组织图; B: 脑组织菌载量; C: 脑组织伊文思蓝含量。

Figure 5 Effect of rPPCDC on the permeability of blood-brain barrier. A: Histogram of mouse brain after EB staining; B: Number of bacteria in brain tissue; C: Evans blue levels in brain tissue. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

ELISA 分析加强免疫后小鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 的诱导水平,以分别评估 rPPCDC 所引起的 Th1 型和 Th2 型免疫反应水平。结果显示,相较于对照组,免疫组小鼠产生的 IFN- γ 和 IL-4 水平显著升高(图 6B、6C),激发小鼠产生细胞和体液免疫反应。另外, rPPCDC 免疫延迟了 SS2 感染后小鼠的死亡时间,同时对照组小鼠 7 d 内的存活率为 16.7%,而免疫组较高为 33.3%,这提高了小鼠的存活率(图 6D)。这些数据提示 rPPCDC 具有良好的反应原性和免疫原性,可作为 SS2 (SC19)候选保护抗原。

3 讨论

猪链球菌是一种严重危害人畜安全的病原菌,在所有血清分型中,猪链球菌 2 型(SS2)在世界范围内分离率最高、致病性最强^[12],多次引起国际社会的高度关注。SS2 感染后病程发展迅速,若引发的疾病没有导致宿主死亡,SS2 将有机会进一步通过 BBB 引发脑膜炎^[13]。虽

然已经确定了一些假定的 SS2 毒力因子^[14-15],但其致病机制在很大程度上尚不清楚,发现 SS2 毒力因子并进一步揭示其致病机理尤为重要。

辅酶 A (coenzyme A, CoA)是一种广泛存在于动、植物及微生物中的必需辅助因子,CoA 及其衍生物参与了 TCA 循环、脂肪酸分解等多种代谢途径^[16],对维持机体正常的生理功能至关重要。PPCDC 作为原核生物和真核生物 CoA 合成通用途径中的关键酶,在 SS2 CoA 合成及参与代谢过程中发挥着重要作用。实验室前期经过猪链球菌全基因组噬菌体随机展示文库和猪体外 BBB 模型相互作用筛选出 14 种蛋白分子,其中包括已被研究报道的 SS2 毒力因子溶血素、烯醇化酶等,与 SS2 致病性密切相关^[8]。同时,PPCDC 作为其中的一种,或许也在 SS2 突破 BBB 的过程中发挥某种作用机制,具有作为 SS2 潜在毒力因子的可能性,但至今仍未开展相关研究。与 PPCDC 类似,丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)也是 SS2 代

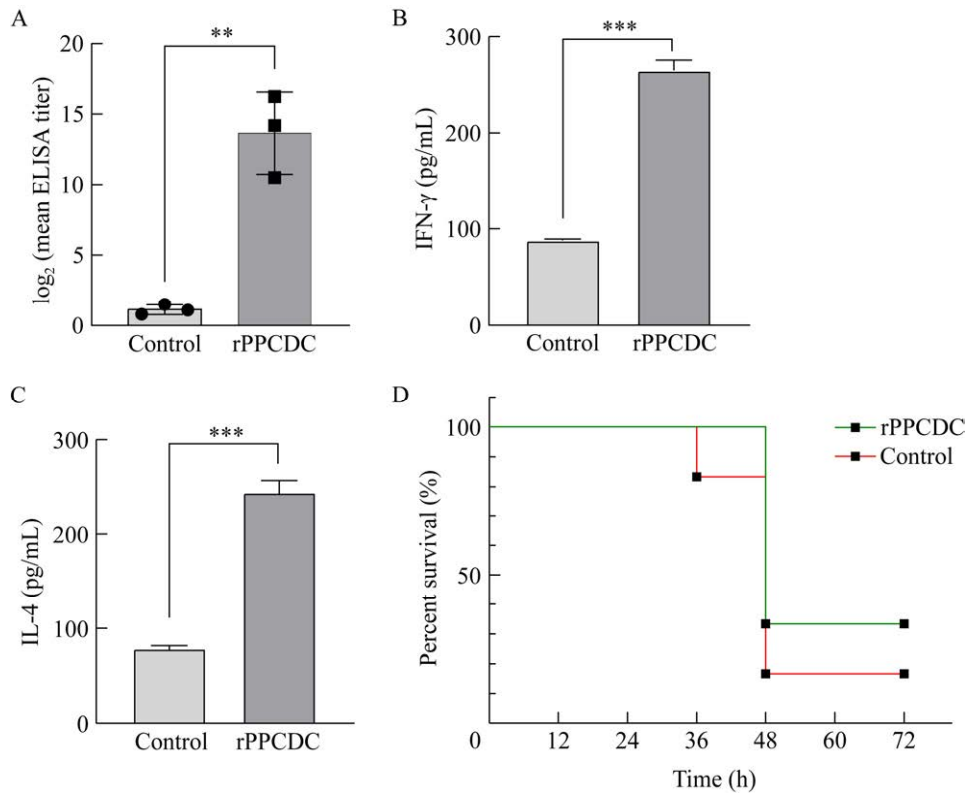


图 6 重组蛋白 rPPCDC 疫苗效果评价 A: 小鼠血清中 rPPCDC 抗体水平的检测; B: 小鼠血清中 IFN- γ 浓度检测; C: 小鼠血清中 IL-4 浓度检测; D: SS2 攻菌后小鼠存活率。

Figure 6 Efficacy evaluation of recombinant protein rPPCDC vaccine. A: Determination of rPPCDC antibody levels in mouse serum; B: Detection of IFN- γ concentration in mouse serum; C: Detection of IL-4 concentration in mouse serum; D: Survival rate of mice challenged with SS2. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

谢过程中的重要分子, *pdh* 缺失降低了多个黏附相关基因的表达, 导致 SS2 侵袭、生物膜形成和抗应激能力显著降低^[17]。本研究验证了 PPCDC 在 SS2 破坏 BBB 过程中发挥的毒力作用。

致病菌的黏附和侵袭是细菌扩增、入侵机体细胞的基础, 是致病过程中的关键步骤^[18]。研究发现, 大肠杆菌 K1 中的毒力因子 *csiR* 通过调控人脑微血管内皮细胞中的信号传导诱导肌动蛋白细胞骨架重排, 增强了细菌侵入细胞和穿透 BBB 的能力^[19]。SS2 的黏附、侵袭导致中枢神经系统受到严重感染, 损伤了 BBB 的屏障功能, 并诱发机体脑膜炎。目前, 已知荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)、甘油醛-3-磷酸

脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)等可通过增强 SS2 的黏附提高其对机体的致病性^[20], 但关于 SS2 侵袭能力及机制的研究较少。本研究发现, 重组蛋白 rPPCDC 增加了 SS2 入侵 hCMEC/D3 细胞的细菌数量, 为研究 SS2 与宿主相互作用提供了有用的线索。

BBB 是中枢神经系统和血液之间一个复杂、动态的天然屏障, 负责防御多种有害物质, 并提供日常脑细胞代谢所需的营养物质^[21], 但不排除一些病原菌可能通过各种机制打破这一屏障, 引起脑部疾病。利用永生代化人细胞系 hCMEC/D3 构建体外 BBB 模型已被广泛用于脑膜炎病原菌黏附和侵袭过程的研究, 具有高通

量、可重复性、同源性和低成本等优点^[22]。跨膜电阻 TEER 值通常被用来评估单层 BBB 模型的渗透性和完整性^[23]，值的大小与屏障功能成正相关。有研究表明，SS2 烯醇化酶显著降低了 BBB 模型的 TEER 值，并且增加了穿越屏障模型的 SS2 菌数^[24]。同时，SS2 烯醇化酶诱导宿主热休克蛋白 60 表达升高，被其作用的屏障模型的 TEER 值显著降低，证实了热休克蛋白 60 可以在体内、外提高 BBB 的通透性^[25]。本研究发现 PPCDC 可以在体内、外增加 BBB 的通透性，拓宽对 PPCDC 的认知。

BBB 平衡机体环境和抵御病原的能力很大程度上取决于内皮细胞间的紧密连接，紧密连接蛋白是构成这一屏障的结构基础，包括 claudins、occludin 和 zonula-occludin 家族成员，这些蛋白的减少或分布变化可能会使 BBB 的通透性增加，损害其屏障功能。例如，脑膜炎大肠杆菌诱导的血小板衍生生长因子 B 负向调节紧密连接蛋白的表达，增加内皮通透性，导致 BBB 破坏并被细菌侵入^[26]，引起中枢神经系统功能障碍。在目前研究的基础上，我们推测 PPCDC 可能会通过影响内皮细胞间的紧密连接来改变 BBB 通透性，为后续开展进一步的机制研究提供了方向。

此外，疫苗接种是预防猪链球菌感染最有效的方法之一^[27]，猪链球菌的几种抗原蛋白已被筛选作为候选亚单位疫苗。在本研究中发现，rPPCDC 能够诱导小鼠产生较高的特异性 IgG 抗体水平，诱导细胞和体液免疫反应，有效提高 SS2 感染小鼠的存活率。表明 PPCDC 蛋白具有良好的抗原性，有望作为潜在的免疫原性蛋白进行研究。

4 结论

本研究揭示了 PPCDC 影响 BBB 通透性的

实验现象及部分作用机制。PPCDC 可能是 SS2 引起宿主脑膜炎的潜在毒力因子，其能够增加 BBB 通透性，并且具有一定的免疫原性。PPCDC 增强了 SS2 侵袭细胞的能力，引起通过 BBB 的 SS2 数量增加，引发机体脑膜炎。本研究为猪链球菌病的防治提供新视角、新思路和新靶点。

REFERENCES

- [1] VÖTSCH D, WILLENBORG M, WELDEAREGAY YB, VALENTIN-WEIGAND P. *Streptococcus suis*-the two faces of a pathobiont in the porcine respiratory tract[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 480.
- [2] ZHU JL, WANG JP, KANG WM, ZHANG XY, KERDSIN A, YAO HC, ZHENG H, WU ZF. *Streptococcus suis* serotype 4: a population with the potential pathogenicity in humans and pigs[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2024, 13(1): 2352435-2352435.
- [3] BLEUZÉ M, GOTTSCHALK M, SEGURA M. Neutrophils in *Streptococcus suis* infection: from host defense to pathology[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2392.
- [4] HAAS B, GRENIER D. Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: a veterinary, medical, and economic challenge[J]. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2018, 48(3): 159-166.
- [5] ROODSANT TJ, van der ARK KCH, SCHULTSZ C. Translocation across a human enteroid monolayer by zoonotic *Streptococcus suis* correlates with the presence of Gb3-positive cells[J]. *iScience*, 2024, 27(3): 109178.
- [6] FENG YJ, ZHANG HM, WU ZW, WANG SH, CAO M, HU D, WANG CJ. *Streptococcus suis* infection: an emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases?[J]. *Virulence*, 2014, 5(4): 477-497.
- [7] 胡云皓, 佟仁冬, 辛凌翔, 刘燕, 王豪杰, 郝力力, 朱良全. 猪链球菌 2 型的主要毒力因子与先天性免疫逃逸机制[J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60(10): 98-105.
- [8] HU YH, TONG RD, XIN LX, LIU Y, WANG HJ, HAO LL, ZHU LQ. Major virulence factors and innate immune evasion mechanisms of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(10): 98-105 (in Chinese).
- [8] 朱僧. 2 型猪链球菌突破血脑屏障的相关毒力因子筛选[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2013.
- [8] ZHU S. Screening of virulence genes contributing to *Streptococcus suis* type 2 translate across the blood brain barrier[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2013 (in Chinese).
- [9] LI XD, LI QY, ZHANG ZR, WANG CC, HUO XY, LAI HJ, LU H, LU WJ, QIAN YL, DONG WQ, TAN C, LIU ML. Canagliflozin inhibited the activity of hemolysin and reduced the inflammatory response caused by *Streptococcus suis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(17): 13074.
- [10] LIU HT, ZHU S, SUN YY, LI N, GU JM, SUN CJ,

- FENG X, HAN WY, JIANG JX, LEI LC. Selection of potential virulence factors contributing to *Streptococcus suis* serotype 2 penetration into the blood-brain barrier in an *in vitro* co-culture model[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(1): 161-170.
- [11] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER JP, XU JG, SEGURA M, GOTTSCHALK M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing[J]. Emerging Microbes & Infections, 2014, 3(6): e45.
- [12] TAN MF, TAN J, ZHANG FF, LI HQ, JI HY, FANG SP, WU CC, RAO YL, ZENG YB, YANG Q. Exogenous glycogen utilization effects the transcriptome and pathogenicity of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 938286.
- [13] BRAVO-ALONSO I, MORIN M, ARRIBAS-CARREIRA L, ÁLVAREZ M, PEDRÓN-GINER C, SOLETTI L, SANTOLARIA C, RAMÓN-MAIQUES S, UGARTE M, RODRÍGUEZ-POMBO P, ARIÑO J, MORENO-PELAYO MÁ, PÉREZ B. Pathogenic variants of the coenzyme A biosynthesis-associated enzyme phosphopantothienoylcysteine decarboxylase cause autosomal-recessive dilated cardiomyopathy[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2023, 46(2): 261-272.
- [14] JIANG HX, WU T, LIU JN, YU XB, LIU HT, BAO CT, LIU MM, JI YL, FENG X, GU JM, HAN WY, LI N, LEI LC. Caveolae/rafts protect human cerebral microvascular endothelial cells from *Streptococcus suis* serotype 2 α -enolase-mediated injury[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 254: 108981.
- [15] 梅纪坤. 胶原酶样蛋白酶促进猪链球菌 2 型诱发脑膜炎的作用及机制[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2023. MEI JK. Effect and mechanism of collagenase-like protease in promoting meningitis induced by *Streptococcus suis* type 2[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2023 (in Chinese).
- [16] LI Q, MA CF, FU Y, HE YN, YU YF, DU DC, YAO HC, LU CP, ZHANG W. Factor H specifically capture novel Factor H-binding proteins of *Streptococcus suis* and contribute to the virulence of the bacteria[J]. Microbiological Research, 2017, 196: 17-25.
- [17] WANG Y, WANG YX, LI JP, GONG SL, SUN LY, GRENIER D, LI Y. Pdh is involved in the cell division and Normal septation of *Streptococcus suis*[J]. Microbiological Research, 2019, 228: 126304.
- [18] WU D, CHEN Q, CHEN XJ, HAN F, CHEN Z, WANG Y. The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8(1): 217.
- [19] ZHENG YY, SUN H, WANG YL, JIN C, LI XY, PANG Y, GE QW, WANG L, LIU B. CsiR-mediated signal transduction pathway in response to low iron conditions promotes *Escherichia coli* K1 invasion and penetration of the blood-brain barrier[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2024.
- [20] KOUKI A, HAATAJA S, LOIMARANTA V, PULLIAINEN AT, NILSSON UJ, FINNE J. Identification of a Novel Streptococcal Adhesin p (SadP) protein recognizing galactosyl- α 1-4-galactose-containing glycoconjugates convergent evolution of bacterial pathogens to binding of the same host receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(45): 38854-38864.
- [21] QI DK, LIN HY, HU BY, WEI Y. A review on *in vitro* model of the blood-brain barrier (BBB) based on hCMEC/D3 cells[J]. Journal of Controlled Release, 2023, 358: 78-97.
- [22] JAGTIANI E, YEOLEKAR M, NAIK S, PATRAVALE V. *In vitro* blood brain barrier models: an overview[J]. Journal of Controlled Release, 2022, 343: 13-30.
- [23] LIU HT, LEI SY, JIA L, XIA XJ, SUN YY, JIANG HX, ZHU RN, LI SG, QU GG, GU JM, SUN CJ, FENG X, HAN WY, LANGFORD PR, LEI LC. *Streptococcus suis* serotype 2 enolase interaction with host brain microvascular endothelial cells and RPSA-induced apoptosis lead to loss of BBB integrity[J]. Veterinary Research, 2021, 52(1): 30.
- [24] WU T, JIA L, LEI SY, JIANG HX, LIU JN, LI N, LANGFORD PR, LIU HT, LEI LC. Host HSPD1 translocation from mitochondria to the cytoplasm induced by *Streptococcus suis* serovar 2 enolase mediates apoptosis and loss of blood-brain barrier integrity[J]. Cells, 2022, 11(13): 2071.
- [25] AHISHALI B, KAYA M. Evaluation of Blood-brain Barrier Integrity using Vascular Permeability Markers: Evans Blue, Sodium Fluorescein, Albumin-Alexa Fluor Conjugates, and Horseradish Peroxidase[M]//Permeability Barrier. New York, NY: Springer US, 2020: 87-103.
- [26] YANG RC, QU XY, XIAO SY, LI L, XU BJ, FU JY, LV YJ, AMJAD N, TAN C, KIM KS, CHEN HC, WANG XR. Meningitic *Escherichia coli*-induced upregulation of PDGF-B and ICAM-1 aggravates blood-brain barrier disruption and neuroinflammatory response[J]. Journal of Neuroinflammation, 2019, 16(1): 101.
- [27] KIM BJ, HANCOCK BM, BERMUDEZ A, del CID N, REYES E, van SORGE NM, LAUTH X, SMURTHWAITE CA, HILTON BJ, STOTLAND A, BANERJEE A, BUCHANAN J, WOLKOWICZ R, TRAVER D, DORAN KS. Bacterial induction of Snail1 contributes to blood-brain barrier disruption[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(6): 2473-2483.