

猪链球菌 2 型荚膜缺失株生物学特性及其免疫保护性

胡丹 王长军 潘秀珍 唐家琪*

(南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

摘要: 对前期构建的猪链球菌 2 型中国强致病株 05ZYH33 荚膜缺失株 $\Delta cps2B$ 进行相关生物学特性及免疫保护性研究。通过比较野生株 05ZYH33 和荚膜缺失株 $\Delta cps2B$ 生物学特性发现, $\Delta cps2B$ 株显微形态发生改变, 失去与 2 型荚膜特异抗血清发生凝集反应的能力, 突变株更易被全血清除, 对上皮细胞 HEP-2 的粘附能力增强。动物保护性实验结果表明该荚膜缺失株 $\Delta cps2B$ 具有良好的免疫保护作用。研究结果提示荚膜在细菌抵抗吞噬和细菌粘附过程中发挥重要作用。

关键词: 猪链球菌 2 型, 荚膜多糖, 生物学特性, 免疫保护

Characterization of a nonencapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2 and evaluation of its protective abilities in a mouse model

HU Dan WANG Chang-Jun PAN Xiu-Zhen TANG Jia-Qi*

(Research Institute for Medicine of Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

Abstract: The biological function of a formerly constructed nonencapsulated mutant $\Delta cps2B$ from 05ZYH33 was characterized, and its protection against infection was evaluated. We found that $\Delta cps2B$ have reduced ability to form long chain capsule polysaccharide and no longer agglutinated with the specific anti-capsular serum. The $\Delta cps2B$ could be cleared more easily by the whole blood of human and piglet, while the capacity of adhesion to epithelial cells increased greatly. Animal infection experiment demonstrated that the $\Delta cps2B$ protect mice from lethal challenge with *S. suis* 2. These observations indicate that the capsule plays an essential role in the pathogenesis and invasiveness of *S. suis* 2.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Capsular polysaccharide, Biological characteristics, Immunoprotection

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30730081, 30972638, 81071317); 江苏省自然科学基金项目(No. BK2009042, BK2010025, BK2010114, BK2010113); 南京军区医学科技创新课题(No. 09Z040, 07Z045)

*通讯作者: Tel: 86-25-84526002; ✉: tjq85@hotmail.com

收稿日期: 2010-08-30; 接受日期: 2010-11-10

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* 2, *S. suis* 2)是一种重要的人畜共患病病原菌,在世界范围内已报道的人感染病例超过 400 例,死亡超过 70 人。特别值得关注的是 1998 年和 2005 年在我国江苏省和四川省分别爆发了大规模的 *S. suis* 2 感染疫情,感染者在临床上出现高比例的、国内外未曾报道过的中毒性休克综合征(*Streptococcal toxic shock syndrome*, STSS),病情呈现高侵袭、深部组织感染的特点^[1-2],引起国内外广泛关注,表明该流行菌株具有较强的侵袭力和致病性。

关于 *S. suis* 2 毒力因子的研究,报道较多的包括荚膜多糖(Capsular polysaccharide, CPS)、溶菌酶释放蛋白(Muramidase released protein, MRP)、胞外因子(Extracellular factor, EF)、溶血素(Suilysin, Sly)及膜蛋白转肽酶(Sortase A, SrtA)等^[3-5],其中 CPS 被认为是 *S. suis* 2 极为重要的毒力因子。荚膜对细菌的生存具有重要意义,它主要由多糖类物质组成,细菌不仅可以利用荚膜抵御不良环境,保护自身不受白细胞吞噬,而且能选择性粘附到特定细胞表面,表现出对靶细胞的专一攻击能力^[6]。细菌荚膜的纤丝还能把细菌分泌的消化酶贮存起来,以备攻击靶细胞之用^[7]。

为了探讨荚膜多糖在 *S. suis* 2 中国强致病株侵袭力和致病性方面发挥的作用,本课题组以 2005 年四川流行的强致病株 05ZYH33 株为研究对象,前期完成 05ZYH33 株荚膜缺失株 $\Delta cps2B$ 的构建,并证实其对小鼠基本丧失毒力^[8]。本文将 $\Delta cps2B$ 与 05ZYH33 株的生物学特性进行详细的比较,并对 $\Delta cps2B$ 免疫保护作用进行研究,以期探讨其作为 *S. suis* 2 疫苗的可能性。通过对 $\Delta cps2B$ 生物学特性和致病性方面进行的系统分析比较,为全面了解中国强致病株 05ZYH33 株的致病机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

THB 培养基购自美国 Difco 公司, RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物公司,2 型荚膜特异性抗血清购自丹麦 STATENS 公司,革兰氏染色液购自安徽弘慈医疗,

人抗凝血为南京军区总医院提供,仔猪抗凝血采自本室实验仔猪,人喉上皮细胞系 Hep-2 购自中国科学院细胞库,胰蛋白酶购自南京生兴公司,96 孔细胞板购自上海康宁公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠和山羊抗兔 IgG、底物 OPD 购自南京大治生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生长速率比较:在相同培养条件下,分别挑取 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 单菌落分别接种于 5 mL 含壮观霉素(100 mg/L)和不含壮观霉素的 THB 培养基中,37 °C 振荡培养过夜。次日取出过夜培养的细菌,测定 600 nm 处吸光度值,用 THB 培养基将两者稀释至约 1×10^8 CFU/mL 浓度。然后分别取 50 μ L 突变株和野生株分别接种于 THB 培养基 5 mL 中,于 37 °C,200 r/min 振荡培养,每隔 1 h 分别取样测定 OD_{600} ,以培养时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标,绘制突变株和野生株生长曲线,比较二者有无显著差别。以上每个菌株样本重复 3 管进行测定。

1.2.2 形态观察:根据细菌生长曲线,将 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 于 THB 培养基(含 10%胎牛血清)中培养至对数中期,接种环取样均匀涂布载玻片,自然晾干后进行革兰氏染色,置于显微镜下观察细菌形态。

1.2.3 凝集实验:THB 琼脂血平板上分别挑取 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 单菌落,过夜培养后,取 5 μ L 均匀涂布于载玻片上,滴加 *S. suis* 2 荚膜特异抗血清 5 μ L,置于显微镜下观察细菌与抗血清凝集情况。

1.2.4 全血存活实验:THB 琼脂血平板上分别挑取 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 单菌落,过夜培养,待 OD_{600} 达到 1.0 时(约 1×10^9 CFU/mL),分别取 1×10^6 CFU 05ZYH33 和 1×10^6 CFU $\Delta cps2B$ 加入到 2 mL 人抗凝血和仔猪抗凝血中,将全血与细菌混匀,于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中共孵育 8 h,然后将含有菌液的全血分别稀释后涂布于 THB 平板和含有壮观霉素抗性的 THB 平板,分别计算出突变株与野生株的存活数量,并计算出在全血中的存活比。以上每个菌株样本重复 3 次。

1.2.5 粘附实验:我们对照先前的报道方法^[9-10],

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

略作改进: 96 孔板每孔加入 Hep-2 细胞悬液 100 μL (约 1×10^6 细胞), 然后分别加入 $\Delta cps2B$ 和 05ZYH33 菌液 100 μL (约 1×10^7 CFU), 使感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 10。充分混匀后 380 \times g 离心 5 min, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 条件下孵育 2 h, 用 0.05% 胰蛋白酶和 0.03% EDTA 溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min, 之后加入冰浴去离子水 80 μL , 将细胞从培养孔里吹打起来, 用细胞裂解液梯度稀释并涂布于 THB 平板。按照公式(CFU on plate/CFU in original inoculum) $\times 100\%$ 计算粘附能力, 每个样品 2 份, 并重复 3 次。

1.2.6 动物免疫保护实验: 6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 20 只, 随机分为实验组和对照组, 每组 10 只。实验组首次每只小鼠腹腔注射 $\Delta cps2B$ 菌液 1×10^8 CFU, 以后分别在第 14 天、21 天以同样剂量和途径各加强免疫一次。对照组同步注射等量的 THB 培养基。第 24 天断尾采血, 分离血清, 间接 ELISA 测定抗血清效价。第 28 天实验组和对照组均腹腔注射致死剂量 05ZYH33 菌液各 1 mL (约 2×10^8 CFU), 次日起观察小鼠发病及死亡情况, 共观察 14 d。

1.2.7 间接 ELISA 检测抗血清效价: 将 $\Delta cps2B$ 全菌进行超声裂解, 测上清蛋白浓度, 按 5 mg/L 浓度包被酶标板, 100 μL /孔, 放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 每孔加入 100 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; 多抗血清从 1:100 开始倍比稀释, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 将 HRP 标记的山羊抗鼠进行 1:5 000 稀释, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; OPD 底物显色液, 100 μL /孔, 反应 10 min 后加入终止液 100 μL /孔终止反应; 酶标仪检测 OD_{490} 值, $P/N > 2.1$ 为阳性标准。

2 结果

2.1 生长速率比较

图 1 是在相同培养条件下绘制的 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 生长曲线, 从图中可以看出, 二者的生长速率基本相近, $\Delta cps2B$ 于接种 3 h 左右进入对数生长期, 生长速率略快于 05ZYH33; 05ZYH33 约在培养 8 h 后进入平台期, 而 $\Delta cps2B$ 进入平台期略慢于 05ZYH33, 大概是在培养 9 h 后。

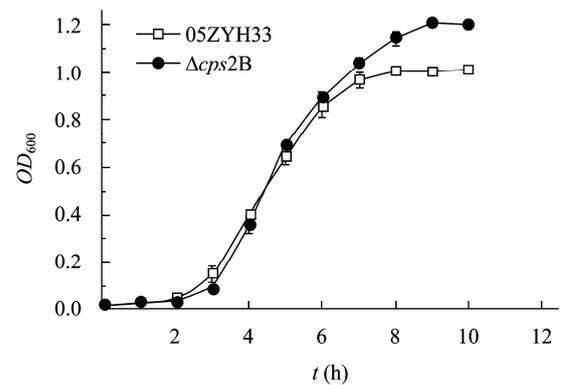


图 1 *S. suis* 2 突变株 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 的生长曲线比较

Fig. 1 Comparison of the Growth characteristics of the *S. suis* 2 mutant $\Delta cps2B$ and the wild-type strain 05ZYH33

2.2 形态比较

取对数生长期 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 进行革兰氏染色, 显微镜($\times 1\ 000$)下观察发现: 二者均为革兰氏染色阳性, 菌体形态为圆形或椭圆形, 呈链状排列(图 2), $\Delta cps2B$ 与野生株 05ZYH33 相比呈散在排列, 且链较短, 表明荚膜缺失株 $\Delta cps2B$ 成链能力减弱。

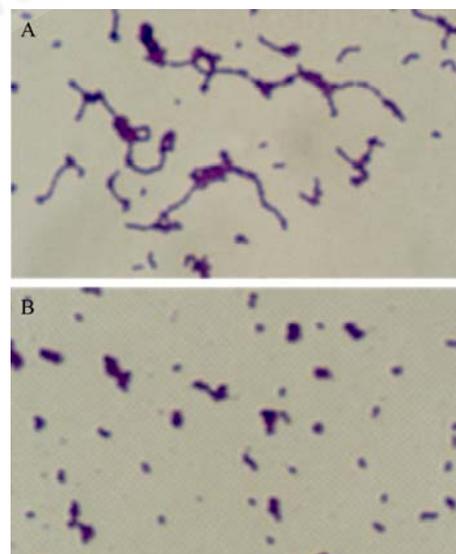


图 2 *S. suis* 2 突变株 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 镜下形态比较($\times 1\ 000$)

Fig. 2 Microbiological characterization of the mutant $\Delta cps2B$ and the wild-type strain 05ZYH33 ($\times 1\ 000$)

Note: A: 05ZYH33; B: $\Delta cps2B$.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2.3 凝集实验

将突变株和野生株分别与 2 型荚膜特异性抗血清进行反应发现, $\Delta cps2B$ 与特异性抗血清在 30 min 内镜下未见特征性凝集反应; 而 05ZYH33 在与特异性抗血清作用约 2 min 后镜下可见特异性凝集反应(图 3), 提示 $\Delta cps2B$ 2 型荚膜特异性抗原或表位发生缺失。

2.4 全血存活实验

稀释涂板计数后, 分别计算出野生株和突变株在全血中 8 h 后存活数量, 结果如表 1 所示。

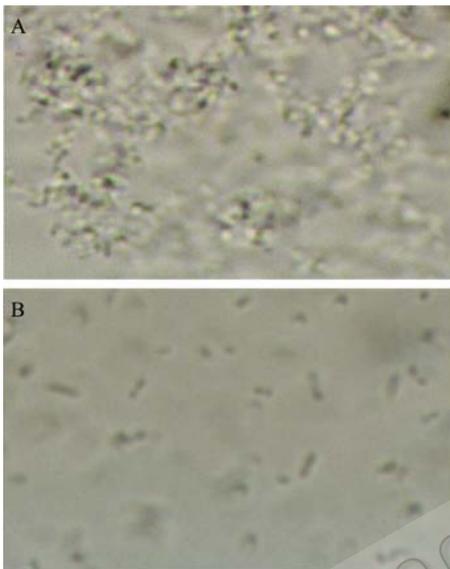


图 3 *S. suis* 2 突变株 $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 与抗血清的凝集反应($\times 1\ 000$)

Fig. 3 The $\Delta cps2B$ and the wild-type strain 05ZYH33 agglutinated with the specific anti-capsular serum ($\times 1\ 000$)

Note: A: 05ZYH33; B: $\Delta cps2B$.

	表 1 全血存活计数					
	Table 1 Survival counting in whole blood					
	人抗凝血 Human blood			仔猪抗凝血 Piglets blood		
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	1 [#]	2 [#]	3 [#]
05ZYH33	1.5×10^9	9.0×10^8	8.0×10^8	4.0×10^8	6.0×10^8	5.7×10^8
$\Delta cps2B$	1.7×10^5	7.0×10^4	2.7×10^5	1.1×10^8	1.2×10^8	1.0×10^8
05ZYH33/ $\Delta cps2B$	8.0×10^3	1.3×10^4	2.9×10^3	3.6	5.8	5.7

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

根据统计学分析, 无论在人抗凝血中还是在仔猪抗凝血中, $\Delta cps2B$ 和野生株 05ZYH33 存活情况具有显著差异($P < 0.01$), 提示在全血中 $\Delta cps2B$ 都比野生株 05ZYH33 更易被清除。

2.5 粘附实验

研究认为, 致病菌粘附到粘膜表面是其感染宿主的必要步骤。本实验比较分析了野生株 05ZYH33 和 $\Delta cps2B$ 对 Hep-2 粘附能力的差异, 结果显示 $\Delta cps2B$ 对 Hep-2 的粘附能力明显增强($P < 0.01$) (图 4)。

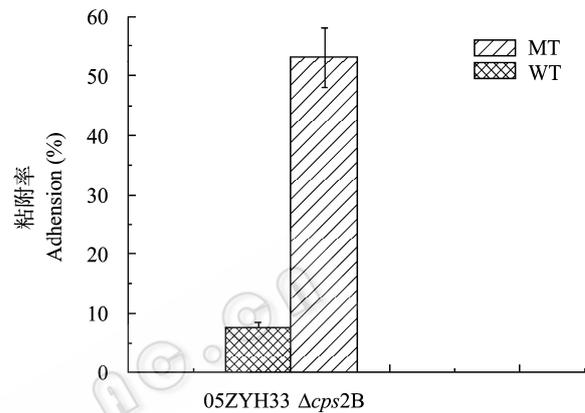


图 4 05ZYH33 和 $\Delta cps2B$ 对上皮细胞 HEP-2 粘附率的比较

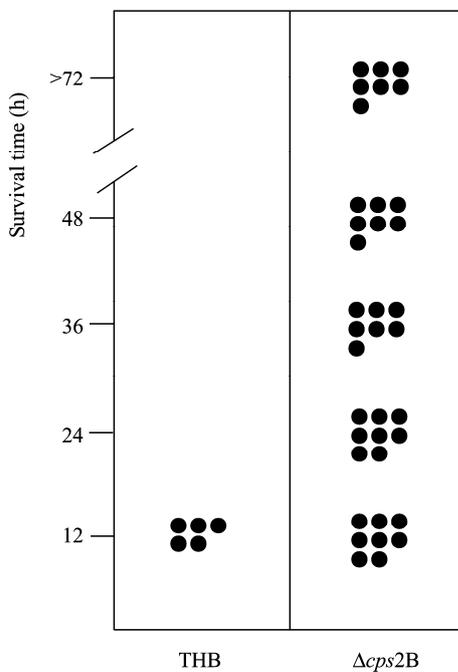
Fig. 4 Adhesion of the WT 05ZYH33 and $\Delta cps2B$ strain to human epithelial (Hep-2) cells

2.6 动物免疫保护实验

如图 5 所示, 用致死剂量(2×10^8 CFU)野生株 05ZYH33 攻击小鼠后, 注射 THB 培养基的对照组 10 只小鼠 24 h 内全部死亡, 而 $\Delta cps2B$ 免疫组的小鼠 24 h 内死亡 2 只, 延至 48 h 共计死亡 3 只, 存活 7 只, 连续观察 14 d, 存活 7 只均无任何发病症状。统计学分析免疫组小鼠和对照组小鼠存活率差异显著($P < 0.05$), 表明 $\Delta cps2B$ 具有免疫保护作用。

2.7 免疫小鼠血清抗体滴度

末次免疫小鼠 3 d 后剪尾取血, 间接 ELISA 测定多抗血清效价可达 1:25 600, 结果如表 2 所示。

图 5 $\Delta cps2B$ 保护性点图Fig. 5 $\Delta cps2B$ protection experimentNote: 1: Immunifaction with THB; 2: Immunifaction with $\Delta cps2B$.表 2 间接 ELISA 法检测血清抗体滴度
Table 2 Serum antibody titer detect by indirect ELISA

抗体稀释倍数 Dilution ratio	OD_{490} /多抗血清 OD_{490} /Anti- $\Delta cps2B$ serum	OD_{490} /阴性对照 OD_{490} /Negative control	P/N 值 Positive/Negative
100	2.134	0.211	10.10
200	1.762	0.366	4.80
400	1.670	0.199	8.39
800	1.483	0.185	8.01
1 600	1.168	0.148	7.89
3 200	0.899	0.112	8.02
6 400	0.575	0.103	5.58
12 800	0.412	0.081	5.08
25 600	0.284	0.079	3.59

3 讨论

关于 *S. suis* 2 致病机理的研究一直是一个热点, 其中荚膜多糖作为重要毒力因子被广泛关注和研究。本课题组对 1998 年和 2005 年流行的强致病株 98HAH12 株, 05ZYH33 株(两株均分离自 STSS 病人)及无毒株 05JYS68 株(分离自江苏健康猪)进行了全基因组测序, 并对基因组进行了注释^[2]。基因注释结

果显示, 05ZYH33 株中含有荚膜合成基因 *cps2B*。同源比对发现, 该基因编码的氨基酸序列与肺炎链球菌的荚膜多糖合成蛋白 Wzd 的氨基酸序列相似性为 58%。本实验通过研究前期构建的敲除突变株 $\Delta cps2B$ 生物学特性以及免疫保护作用发现, $\Delta cps2B$ 菌体显微形态结构发生改变, 细菌成链能力明显下降, 有研究结果显示 05ZYH33 株 *covR* 基因敲除突变株荚膜表型更为增厚且细菌成链能力大为增强^[11], 我们不难推测荚膜多糖作为包裹在细菌表面的大分子成分, *cps2B* 基因缺失后, 细菌的荚膜合成能力受阻, 细菌失去表面的粘多糖使得它们彼此之间的粘附能力减弱, 从而使细菌的成链能力减弱。

根据我们的实验结果发现, 无论是在人血中还是在仔猪血中, 体外实验都显示 $\Delta cps2B$ 株更加容易被血液所清除, 提示荚膜在 05ZYH33 株感染过程中发挥着抵抗吞噬的作用。特别是在人抗凝血中, 野生株与敲除株的存活比是其在猪抗凝血中的数百倍, 这种差异可能是由于人和猪宿主的不同造成, 具体原因还有待我们进一步研究。大量研究表明, 荚膜多糖因其亲水性及其空间占位、屏障作用, 可有效抵抗宿主吞噬细胞的吞噬作用, 最大限度的阻止补体的活化和聚集, Carlin 等报道 B 型链球菌在感染的初级阶段或在细菌进入血液循环后, 细菌表面都为了一层唾液酸化的多糖荚膜包被, 多糖这种组分可产生分子模效应, 与表达于白细胞表面的唾液酸识别免疫球蛋白超家族凝集素(Siglecs)结合, 主动传递抑制信号, 以逃避机体天然免疫攻击^[12]。不仅如此, 荚膜多糖可覆盖细菌菌体胞壁或胞膜上绝大多数的表面蛋白成分, 使机体的天然免疫对细菌无能为力, 这也同时影响机体针对这些表面蛋白的特异性体液免疫应答的产生。荚膜多糖的缺失, 使得细菌更加容易被免疫系统所清除。

细菌对宿主细胞的粘附和侵袭是其侵入机体和引发宿主致病的关键一步, 本实验中 $\Delta cps2B$ 株相比野生株表现出更强地与上皮细胞粘附的能力, 因此推断, 在 *S. suis* 2 05ZYH33 株粘附并突破呼吸道粘膜上皮细胞的过程中, 荚膜多糖的存在并不利于细

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

菌的粘附和侵袭,这一结果与此前文献报道相一致。Benga L 等对 *S. suis* 2 欧洲流行株 S735 株及其荚膜缺失株进行研究时提出, *S. suis* 2 荚膜的表达在致病不同阶段的表达量是不同的。在细菌与上皮细胞发生作用时,荚膜的表达量是下调的;而当细菌一旦进入血液循环,细菌的荚膜表达量是上调的,这样能够帮助细菌抵抗机体的免疫应答对其进行吞噬,荚膜多糖的存在并不能帮助 *S. suis* 2 对上皮细胞进行粘附^[13]。随后的实验发现荚膜多糖的表达可以抑制 *S. suis* 2 与脑血管内皮细胞进行粘附^[14]。

由于 *S. suis* 2 的毒力因子及致病机制仍不清楚,这就严重制约了 *S. suis* 2 的疫苗的研究。*S. suis* 2 疫苗目前研究主要集中在毒力相关因子少数抗原构建的亚单位疫苗研制,免疫保护能力不强,而且其免疫保护作用只能维持数月^[15]。目前 *S. suis* 2 被确切证实的毒力因子只有荚膜多糖一个,利用荚膜多糖的抗原性可以预防一些荚膜致病菌引起的疾病。最成功的典范是肺炎 CPS 亚单位疫苗,该疫苗对肺炎链球菌非常有效,已经成为当前预防小儿和老年肺炎的首选。但是 *S. suis* 2 的 CPS 提取一直是一个难题,无法获得高纯度的 CPS 使得 *S. suis* 2 的荚膜多糖结合疫苗的研究成为一个瓶颈。本实验通过前期构建的荚膜缺失株 $\Delta cps2B$ 证实其对小鼠基本丧失毒力后,进一步免疫保护实验结果显示 $\Delta cps2B$ 株能够在小鼠体内产生良好的免疫保护能力,提示荚膜缺失株通过暴露其它的抗原,也能对小鼠产生保护性抗体,荚膜多糖的存在不一定是其获得保护性抗体的必须条件,这就为 *S. suis* 2 的疫苗研究提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Med, 2006, 3(5): e151.
- [2] Chen C, Tang JQ, Dong W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 chinese isolates[J]. PLoS ONE, 2007, 2(3): e315.
- [3] Staat s JJ, Plattner BL, Stewart GC, et al. Presence of the *Streptococcus suis* suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus*

- suis* type 2 isolates[J]. Vet Microbiol, 1999, 70(3/4): 201-211.
- [4] Gottschal MG, Lacouture S, Dubreuil JD. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin[J]. Microbiolgy, 1995, 141(Pt 1): 189-195.
- [5] Wang CJ, Li M, Feng YJ, et al. The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* 2[J]. Arch Microbiol, 2009, 191(1): 23-33.
- [6] Siitonen A, Takala A, Ratiner YA, et al. Invasive *Escherichia coli* infections in children: bacterial characteristics in different age groups and clinical entities[J]. Pediatr Infect Dis J, 1993, 12(7): 606-612.
- [7] Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Infect Immun, 2003, 71(1): 218-225.
- [8] 胡丹, 王长军, 唐家琪, 等. 猪链球菌 2 型中国强致病株 05ZYH33 荚膜缺陷菌株的构建[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(2): 93-97.
- [9] Vanier GM, Segura M, Gottschalk M, et al. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Infect Immun, 2004, 72(3): 1441-1449.
- [10] Vanier G, Segura M, Gottschalk M. Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Can J Vet Res, 2007, 71(2): 81-89.
- [11] Pan XZ, Ge JC, Li M, et al. The orphan response regulator CovR: a globally negative modulator of virulence in *Streptococcus suis* serotype 2[J]. J Bacteriol, 2009, 191(8): 2601-2612.
- [12] Carlin AF, Lewis AL, Varki A, et al. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes[J]. J Bacteriol, 2007, 189(4): 1231-1237.
- [13] Benga L, Goethe R, Rohde M, et al. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells[J]. Cell Microbiol, 2004, 6(9): 867-881.
- [14] Benga L, Friedl P, Valentin-Weigand P. Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells[J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2005, 52(9): 392-395.
- [15] Garibaldi M, Rodríguez-Ortega MJ, Beninati C, et al. Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection[J]. Vaccine, 2010, 28(20): 3609-3616.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

JOURNALS.IM.AC.CN

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>