

荚膜唾液酸对猪链球菌激活巨噬细胞 TLR2-AKT-NF- κ B 信号通路影响的研究

朱静^{1,2} 胡丹² 刘丽娜² 张锦海² 张凤玉^{1,2} 郝丽娜² 耿美玲²
郑峰² 朱进² 潘秀珍² 王长军^{1,2*}

(1. 南京医科大学 基础医学院 江苏 南京 210029)

(2. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

摘要: 【目的】探索猪链球菌 2 型感染后单核/巨噬细胞启动信号转导通路机制, 探讨荚膜唾液酸对细菌激活巨噬细胞 TLR2-AKT-NF- κ B 信号通路的影响。【方法】以小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞为研究对象, 采用 RT-PCR、Western blotting、免疫荧光和 ELISA 法分别检测猪链球菌 2 型野毒株、唾液酸缺失突变株、唾液酸回复突变株感染后不同时间点巨噬细胞 TLR2 mRNA 转录水平、AKT 磷酸化水平、NF- κ B 激活程度以及前炎症因子 TNF- α 分泌水平; 再分别用 TLR2 阻断剂和 PI-3K 抑制剂预处理巨噬细胞, 检测上述分子的表达水平。【结果】唾液酸缺失株可选择性的活化信号转导通路途径。RT-PCR 结果表明, 缺失株 TLR2 mRNA 表达水平自 1 h 开始升高, 1.5 h 达高峰后有所下降; Western blotting 显示, 缺失株 TLR2 蛋白表达水平 7 h 达高峰, 9 h 下降; p-AKT 水平 1.5–5 h 持续稳定在高峰水平, 7 h 后开始下降; 免疫荧光可见 15 min NF- κ B 激活-核转运输程度较高; ELISA 结果显示, 10 h 之后 TNF- α 的水平显著高于野生株和回复株。使用 TLR2 阻断剂和 PI-3K 抑制剂, 三菌株通路活化程度均明显受抑制。【结论】荚膜唾液酸可抑制宿主免疫细胞 TLR2-AKT-NF- κ B 信号通路的激活, 藉此参与细菌逃避宿主的免疫防御作用。

关键词: 猪链球菌 2 型, 巨噬细胞, 荚膜唾液酸, 信号通路

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170124, 30972638, 81071317, 81171527, 81172794); 江苏省自然科学基金项目(No. BK2011097, BK2011098)

*通讯作者: Tel: 86-25-80867003; ✉: science2008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-10-25; 接受日期: 2012-12-10

Research on the role of capsular sialic acid in *Streptococcus suis* activate macrophage TLR2-AKT-NF- κ B signaling pathway

ZHU Jing^{1,2} HU Dan² LIU Li-Na² ZHANG Jin-Hai² ZHANG Feng-Yu^{1,2}
HAO Li-Na² GENG Mei-Ling² ZHENG Feng² ZHU Jin²
PAN Xiu-Zhen² WANG Chang-Jun^{1,2*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)
(2. Research Institute for Medicine of Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

Abstract: [Objective] To explore the mechanism of signaling pathways *Streptococcus suis* serotype 2 infected monocytes/macrophages leaded, discuss the role of capsular sialic acid component played in *Streptococcus suis* activate macrophage TLR2-AKT-NF- κ B signaling pathway. **[Methods]** RAW264.7 as the target cell line, RT-PCR, Western blotting, immunofluorescence and ELISA were applied to detect different infection time of wild type strain, sialic acid knockout strain and sialic acid complementary strain on macrophages TLR2 mRNA transcription level, AKT phosphorylation level, NF- κ B activation level, as well as TNF- α secretion level. Pretreat with TLR2 blocking agent and PI-3K inhibitor on macrophages, detect the expression level above. **[Results]** Sialic acid knockout strain activates signal transduction pathways selectively. RT-PCR results show that TLR2 mRNA expression levels began to increase at 1 h, 1.5 h reached its peak then slowly decline. Western blotting showed that TLR2 protein expression level reached its peak at 7 h, 9 h decline. Level of p-AKT is stable at its peak during 1.5–5 h, 7 h decline. Immuno fluorescence showed high level of NF- κ B activation-nuclear translocation at 15 min. ELISA results indicate TNF- α secretion level was significantly higher than the other two strains after 10 h. TLR2 blocking agent and PI-3K inhibitor significantly suppressed the activation degree of three strains. **[Conclusion]** Capsular sialic acid could inhibit activation of the TLR2-AKT-NF- κ B signaling pathway to some extent, thus participate in bacteria evading the host immune defense.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Macrophages, Capsular sialic acid, Signaling pathways

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是重要的人畜共患病病原菌。不仅可致猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、肺炎、败血症,还可感染人导致脑膜炎、败血症、心内膜炎等,并且可引发严重的链球菌中毒休克综合征(Streptococcal toxic shock syndrome, STSS),病程凶险,病死率高。尤其是 1998 年和 2005 年分别在我国的江苏

和四川暴发大规模的疫情,造成相关从业人员重大生命财产损失^[1-2]。因此,加快对国内流行强毒株致病机理的研究显得十分迫切。

唾液酸作为 SS2 荚膜多糖的 5 种组成成分之一,已被证实是多种致脑膜炎链球菌的重要毒力因子。有研究表明 B 群链球菌(Group B *Streptococcus*)可能通过唾液酸成分模拟哺乳动物细胞

表面分子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,以逃避机体天然免疫应答^[3]。

本课题组前期针对 SS2 中国强毒株 05ZYH33 的唾液酸合成酶编码基因 *neuB* 构建了唾液酸合成酶基因敲除突变株 $\Delta neuB$ 及其回复突变株 $C\Delta neuB$ ^[4]。电镜检查发现,突变株 $\Delta neuB$ 相对于野生株荚膜明显变薄、质地更加紧密;小鼠致病性实验结果表明,突变株 $\Delta neuB$ 毒力显著减弱;体外小鼠全血细胞刺激实验显示, $\Delta neuB$ 刺激后炎症因子 MCP-1、IL-6 的分泌水平显著升高;相比于野生株 $\Delta neuB$ 在宿主专职免疫细胞内的存活能力显著减弱^[5]。实验证明,唾液酸很有可能在 SS2 识别宿主免疫细胞并刺激其产生炎症因子等方面有重要影响。

Toll-样模式识别受体(TLRs)是免疫系统中的一类重要分子。Han Zheng 等^[6]的研究表明,多种 TLR 联合参与宿主外周血单核细胞识别猪链球菌、启动炎症反应的过程。肺炎链球菌和沙门氏菌等病原菌表面的荚膜多糖参与 TLR 识别过程,并显著改变宿主免疫细胞的活化状态和反应后果,成为病原菌逃避宿主免疫杀伤的“保护膜”^[7]。鉴于唾液酸突变株与野生株在体内外病原学特征的显著差异,提示 SS2 表面荚膜唾液酸可能参与细菌激活宿主特异 TLRs 过程,影响宿主免疫应答的强度与后果。本文将探讨 SS2 荚膜唾液酸在逃避宿主 TLRs 固有免疫应答中的作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

LightCycler 2.0 Real-Time PCR 仪, Roche 公司产品; Gel DocTM XR 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司产品; BX51T-32P01-FLB3 荧光显微镜, Olympus 公司产品; Multiskan MK3 酶联免疫测定仪,

Thermo 公司产品。

1.2 主要试剂

THB 培养基购于美国 Difco 公司;细胞培养液 DMEM、胎牛血清购于加拿大维森特生物技术公司;细胞培养板购于上海康宁公司; LY294002 购于美国 Cell Signaling 公司; Anti-mTLR2-IgG 购于美国 InvivoGen 公司; RNA 提取试剂盒购于美国 Promega 公司; NF- κ B 激活-核转运检测试剂盒购于江苏碧云天生物技术研究所; cDNA 逆转录试剂盒、SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒购于 TaKaRa 公司; Rabbit Anti-AKT、Rabbit Anti-phospho-AKT、Rabbit Anti-TLR2、Rabbit Anti- β -actin、Goat anti-Rabbit IgG/HRP 购于北京博奥森生物技术公司; ELISA 测定试剂盒购于美国 R&D Systems 公司; 庆大霉素、BSA 购于南京百斯凯生物科技公司。

1.3 菌株及培养条件

SS2 强致病株 05ZYH33 (分离自 2005 年在四川资阳暴发感染 STSS 的患者)由本实验室保存;唾液酸合成酶基因敲除突变株 $\Delta neuB$ 及其回复突变株 $C\Delta neuB$ 由本实验室构建;本实验所用菌株的详细表型及相关特征见表 1。菌株保存在 80%的甘油-THB 菌液中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保藏。菌株在 5%血平板上 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后挑取单菌落于 THB 液体培养基中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 18 h, 继而按 1:100 转接到新鲜的 THB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

表 1 实验所用的菌株
Table 1 Bacterial strains used in this study

菌株 Bacterial strains	表型及相关特征 Properties/Function	来源 Sources
05ZYH33	血清型 2 型, 强致病株, <i>neuB</i> ⁺	本实验室分离保存
$\Delta neuB$	血清型 2 型, <i>Spc</i> ^R , <i>neuB</i> ⁻	本实验室构建保存
$C\Delta neuB$	血清型 2 型, <i>Cm</i> ^R , <i>neuB</i> ⁺	本实验室构建保存

注: *Spc*: 庆大霉素; *Cm*: 氯霉素。

Note: *Spc*: Spectinomycin; *Cm*: Chloromycetin.

振荡培养直至细菌生长到对数期($OD_{600}=0.4$)。收集菌体后用 PBS 洗 2 次, 调整菌液的浓度为 10^8 CFU/mL, 确切的浓度以最终的混悬液涂 THB 固体板计数为准。

1.4 细胞株及培养条件

小鼠单核-巨噬细胞株 RAW264.7 (ATCC TIB-71, Rockville, MD, USA), 由南京医科大学病原生物学系惠赠。RAW264.7 保存在 DMEM high glucose 培养基中。DMEM 完全培养基包含 DMEM high glucose 培养基、热灭活的胎牛血清、青霉素(100 IU/mL)及链霉素(100 IU/mL)成分。细胞在 37°C 、5% CO_2 的培养箱内孵育。48 h 孵育的 RAW264.7 收集后 PBS 洗 3 次, 用 DMEM high glucose 培养基稀释至 10^5 CFU/mL, 铺满 24 孔细胞培养板待用。

1.5 引物设计合成

根据 GenBank 中 BALB/c 小鼠的 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、 β -Actin 基因序列, 利用 Primer Express 3.0 软件设计引物, 引物序列见表 2。引物由上海赛百盛基因公司合成。

2 方法

2.1 RAW264.7 TLR 表达检测

2.1.1 RT-PCR 法检测 RAW264.7 TLR mRNA 转录: 分别将 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 与 RAW264.7 以感染复数(Multiplicity of infection, MOI) 100:1 孵育 0.25、0.5、1、1.5、3、5、7 h 后, 提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA。按 SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒说明书, 混合反应体系由以下组分构成: 终浓度为 $1\times$ 的 SYBR *Premix Ex*

表 2 荧光定量 PCR 引物
Table 2 Primer pairs in real-time PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	扩增片段大小 PCR product size (bp)
TLR1 基因上游引物 TLR1 Forward primer	CACAGCTCCTTGGTTTTAATG	92
TLR1 基因下游引物 TLR1 Reverse primer	AATCGTCTGAGCAAAGAGACA	
TLR2 基因上游引物 TLR2 Forward primer	CCCTTCTCCTGTTGATCTTGCT	80
TLR2 基因下游引物 TLR2 Reverse primer	CGCCACATCATTCTCAGGTA	
TLR4 基因上游引物 TLR4 Forward primer	TGTGGAAGCCTTCCTGGATG	74
TLR4 基因下游引物 TLR4 Reverse primer	CCTCTGCCTTCACTACAGAGACTTT	
TLR5 基因上游引物 TLR5 Forward primer	TTGTTTTCTTCGCTTCGTGTT	186
TLR5 基因下游引物 TLR5 Reverse primer	GTCTTCGGTGGATATGTTGTAGAG	
TLR6 基因上游引物 TLR6 Forward primer	CCAAGAACAAAAGCCCTGAG	190
TLR6 基因下游引物 TLR6 Reverse primer	TGTTTTGCAACCGATTGTGT	
β -actin 基因上游引物 β -actin Forward primer	GCTCTGGCTCCTAGCACCAT	200
β -actin 基因下游引物 β -actin Reverse primer	GCCACCGATCCACACAGAGT	

Taq 10 μL , 终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的各引物 0.4 μL , 待测样品 cDNA 溶液 2 μL , 灭菌双蒸水 7.2 μL ; 体系总体积为 20 μL 。检测的反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 共 40 个循环。每次反应均设置融解曲线分析, 以证实无非特异性扩增发生。BALB/c 小鼠的 β -Actin 基因作为内参。

2.1.2 Western blotting 检测 RAW264.7 TLR2 蛋白表达: 分别将 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 与 RAW264.7 以感染复数 100:1 孵育 1、3、5、7、9 h 后提取细胞总蛋白, 使用紫外分光光度计测定蛋白浓度, -70°C 保存。取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 采用电转印法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭纤维素膜 1 h。TBST 洗涤后, 加 Rabbit Anti-TLR2 (1:100 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗涤后加 Goat anti-Rabbit IgG/HRP (1:1 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。洗涤后 DAB 显色。同时检测 β -Actin 蛋白。

2.2 Western blotting 检测 RAW264.7 AKT 及 p-AKT 蛋白表达

分别将 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 与 RAW264.7 以感染复数 100:1 孵育 0.25、0.5、1、1.5、3、5、7 h 后提取细胞总蛋白, 其余步骤同 2.1.2。分别以 Rabbit Anti-AKT 及 Rabbit Anti-phospho-AKT 作为一抗, 检测 AKT 及 p-AKT 蛋白。

以 1 mg/L 的 mTLR2 拮抗剂 Anti-mTLR2-IgG、10 $\mu\text{mol/L}$ 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI-3K 阻断剂 LY294002 分别作用于 RAW264.7 细胞 1 h 后, 加入 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 感染细胞。选取最佳时间点检测 AKT 及 p-AKT 蛋白。

2.3 RAW264.7 NF- κ B 激活-核转运检测

分别将 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 与 RAW264.7 以感染复数 100:1 孵育 15 min, 洗涤、固定后, 封闭 1 h。以 NF- κ B p65 一抗孵育 1 h, 洗

涤后以抗兔 Cy3 二抗孵育 1 h, 洗涤后加细胞核染色液(DAPI)染色 5 min, 封片。以荧光显微镜 350 nm 波长观察 DAPI, 细胞核呈蓝色荧光; 以 540 nm 波长观察 Cy3, NF- κ B 呈红色荧光。叠加同一视野内的两图, 紫红色区域为 NF- κ B 核转运激活区。

以 1 mg/L 的 mTLR2 拮抗剂 Anti-mTLR2-IgG、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI-3K 阻断剂 LY294002 分别作用于 RAW264.7 细胞 1 h 后, 加入 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 感染细胞。按上述方法检测 NF- κ B 的激活-核转运程度。

2.4 ELISA 法检测细胞因子

分别将 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 与 RAW264.7 以感染复数 100:1 孵育 2、4、6、8、10、14、18、24 h 后, 取上清, 根据 R&D Systems ValukineTM ELISA 说明书进行操作, 检测样本中前炎症因子 TNF- α 的分泌水平。

以 1 mg/L 的 mTLR2 拮抗剂 Anti-mTLR2-IgG、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI-3K 阻断剂 LY294002 分别作用于 RAW264.7 细胞 1 h 后, 加入 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $C\Delta neuB$ 感染细胞。按上述方法检测样本中前炎症因子 TNF- α 的分泌水平。

2.5 统计学处理

实验所有数据取决于平均数 \pm 标准误差。RT-PCR 每个样本同时设立 3 个平行管, 根据目的基因和 β -Actin 基因的 C_t 值, 计算目的基因的相对表达量, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。ELISA 定量测定细胞因子的含量每次每样 2 个复孔, 运用 SPSS 软件非配对 t 检验分析差异是否具有统计学意义。 P 值小于 0.05 时具有显著性差异。

3 结果与分析

3.1 RAW264.7 TLR mRNA 转录水平分析

利用 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 和 β -Actin 引物所扩增的基因片段比照融解曲线和

扩增曲线, 显示了扩增的一致性且具有平台期。以 β -Actin 基因转录水平除去实验误差, 以野生株 05ZYH33 处理组为参照。结果表明 $C\Delta neuB$ 处理组的相对转录水平无明显改变, $\Delta neuB$ 处理组 TLR2 的相对转录水平自 1 h 开始升高, 1.5 h 达高峰后有所下降, 直到 7 h 时间点仍有极显著差异。1-7 h 的差异具有统计学意义($n=3, P<0.01$)。基因的相对转录水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, 结果见表 3。

3.2 RAW264.7 TLR2 蛋白表达水平

Western blotting 检测 RAW264.7 TLR2 蛋白表达水平, 以 β -Actin 蛋白表达水平除去实验误差。结果显示敲除突变株 $\Delta neuB$ 处理组 TLR2 激活显著, 1、3、5、7 h TLR2 表达水平逐渐增加, 7 h 达高峰, 9 h 开始下降。05ZYH33 及 $C\Delta neuB$ 处理组在上述时间点 TLR2 表达水平无显著差异。结果如图 1 所示。

3.3 RAW264.7 AKT 及 p-AKT 蛋白表达水平

Western blotting 检测 RAW264.7 p-AKT 蛋白表达水平, 以 AKT 蛋白表达水平除去实验误差。结果显示敲除突变株 $\Delta neuB$ 处理组 0.25、0.5、1、1.5 h p-AKT 表达水平逐渐增加, 1.5、3、5 h 稳定在高峰, 7 h 下降。05ZYH33 及 $C\Delta neuB$ 处理组上述时间点 p-AKT 表达水平未见显著变

化。结果如图 2A、B 所示。以 1 mg/L 的 mTLR2 拮抗剂 Anti-mTLR2-IgG 预处理 RAW264.7 1 h 后加 SS2 作用 1.5 h, 发现 $\Delta neuB$ 处理组的 p-AKT 表达水平下调; 以 10 μ mol/L 及 50 μ mol/L 的 PI-3K 阻断剂 LY294002 预处理的 RAW264.7 p-AKT 表达水平显著下调, 其中 50 μ mol/L 的 PI-3K 阻断剂处理组下调作用显著, 结果如图 2C、D 所示。

3.4 NF- κ B 激活-核转程度

用免疫荧光法检测 NF- κ B 激活-核转程度, 结果如图 3 所示。 $\Delta neuB$ 处理组红染 p65 亚基主要集中在胞核, 胞浆相对较浅, 表明该组 NF- κ B 激活-核转程度较高。05ZYH33 及 $C\Delta neuB$ 处理组红染 p65 亚基在胞核中浓度下降, 胞浆染色较深, 表明 NF- κ B 滞留在胞浆区, 激活-核转程度较低。mTLR2 拮抗剂及 PI-3K 阻断剂分别预处理 RAW264.7 后, $\Delta neuB$ 组 NF- κ B 转运进入细胞核均明显受到抑制。

3.5 前炎症因子分泌水平

ELISA 法检测 3 组菌株刺激后 RAW264.7 的 TNF- α 分泌水平。结果显示, 12 h 开始, $\Delta neuB$ 处理组刺激细胞分泌 TNF- α 的水平显著高于 05ZYH33 及 $C\Delta neuB$ 处理组。以 mTLR2 拮抗

表 3 各菌株刺激 RAW264.7 TLR mRNA 转录水平
Table 3 Transcript level of bacteria-induced TLR mRNA in RAW264.7

		0.25 h	0.5 h	1 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h
$\Delta neuB$	TLR1	1.30±0.19	1.24±0.09	1.46±0.24	1.42±0.19	1.40±0.22	1.73±0.20	1.78±0.30
	TLR2	1.34±0.07	1.73±0.10	3.03±0.12	7.26±0.06	4.50±0.19	3.71±0.23	3.92±0.09
	TLR4	1.01±0.18	1.26±0.21	1.55±0.24	2.45±0.06	2.08±0.17	1.52±0.23	1.75±0.26
	TLR5	0.96±0.17	1.39±0.11	1.04±0.33	1.18±0.27	1.59±0.35	1.08±0.24	1.19±0.26
	TLR6	1.36±0.20	1.36±0.28	1.08±0.15	1.43±0.15	1.60±0.17	1.36±0.09	1.21±0.27
	$C\Delta neuB$	TLR1	0.93±0.23	1.03±0.18	1.13±0.27	1.40±0.26	1.18±0.24	1.41±0.10
TLR2		0.93±0.38	0.99±0.17	0.98±0.06	0.85±0.12	1.04±0.16	1.10±0.17	0.88±0.03
TLR4		1.04±0.17	1.19±0.19	1.17±0.30	1.21±0.24	1.20±0.26	0.95±0.17	1.21±0.09
TLR5		1.21±0.20	1.39±0.29	0.88±0.17	1.11±0.33	0.92±0.26	1.29±0.21	0.96±0.22
TLR6		1.01±0.20	1.11±0.09	1.21±0.27	1.13±0.26	1.25±0.25	1.00±0.10	1.05±0.23

注: 05ZYH33 组的 TLR mRNA 转录水平设为 1.00。有极显著差异的数据加粗显示。

Note: Transcript level of 05ZYH33 TLR mRNA set as 1.00. Data with significant difference are in boldface.

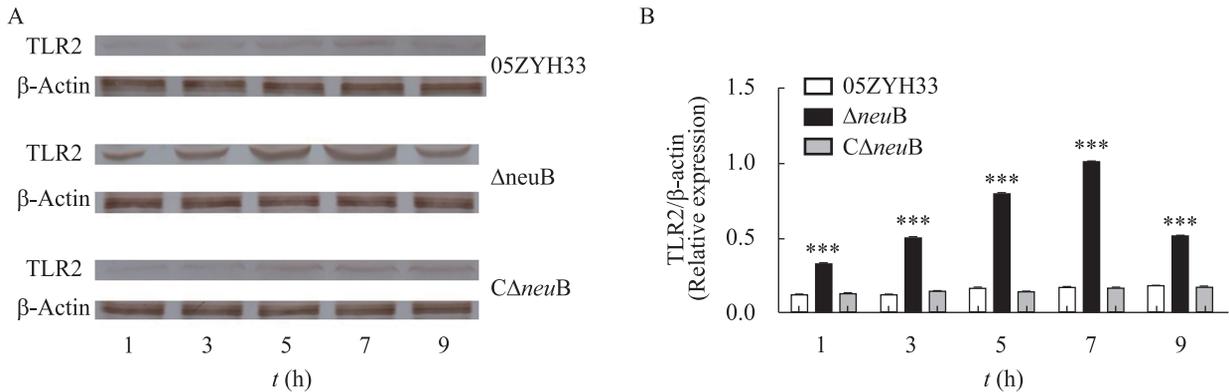


图1 3株SS2分别对RAW264.7 TLR2蛋白表达水平的影响

Fig. 1 Effect of three SS2 strains on TLR2 protein expression

注: A: Western blotting 结果, $\Delta neuB$ 处理组 1、3、5、7 h TLR2 表达水平逐渐增加, 7 h 达高峰, 9 h 下降。05ZYH33 组和 $C\Delta neuB$ 处理组无显著差异; B: TLR2 蛋白相对表达量统计分析, $\Delta neuB$ 处理组各时间点均高于野生组和回复互补组, 有极显著性差异 ($n=3, P<0.01$)。

Note: A: Western blotting showed TLR2 protein expression level of $\Delta neuB$ strain increase in 1, 3, 5, 7 h, reach its peak at 7 h, and 9 h decline. 05ZYH33 strain and $C\Delta neuB$ strain showed no significant difference; B: TLR2 protein relative expression analysis, $\Delta neuB$ strain is higher than 05ZYH33 strain and $C\Delta neuB$ strain at each time point, with very significant difference ($n=3, P<0.01$).

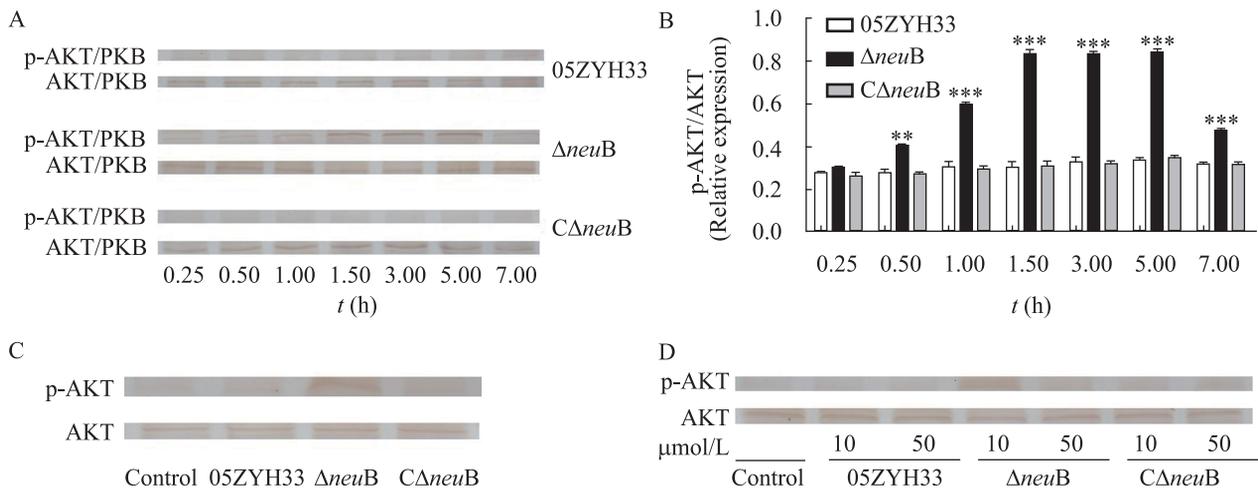


图2 3株SS2分别对RAW264.7 p-AKT蛋白表达水平的影响

Fig. 2 Effect of three SS2 strains on p-AKT protein expression

注: A: Western blotting 结果, $\Delta neuB$ 处理组 p-AKT 表达水平 1.5、3、5 h 稳定在高峰, 7 h 下降, 其余两组无明显差异; B: p-AKT 相对表达量统计分析, $\Delta neuB$ 处理组 0.5 h 以后时间点均高于另两组, 有显著性差异 ($n=3, P<0.05$); C: Western blotting 结果, 在 mTLR2 拮抗剂 Anti-mTLR2-IgG 的作用下, p-AKT 表达水平下调; D: Western blotting 结果, 在 PI-3K 阻断剂 LY294002 的作用下, p-AKT 表达水平显著下调, 呈阻断剂浓度依赖性。

Note: A: Western blotting showed p-AKT level of $\Delta neuB$ strain is stable at its peak during 1.5, 3, 5 h, 7 h decline, 05ZYH33 strain and $C\Delta neuB$ strain showed no significant change; B: p-AKT relative expression analysis, $\Delta neuB$ strain showed higher p-AKT protein expression than the other two groups after 0.5 h, with significant difference ($n=3, P<0.05$). C: Western blotting showed TLR2 blocking agent Anti-mTLR2-IgG suppressed p-AKT protein expression. D: Western blotting showed PI-3K inhibitor LY294002 suppressed p-AKT protein expression, in a concentration-dependent manner.

剂及 PI-3K 阻断剂分别预处理 RAW264.7 后, 所有实验组的 TNF- α 分泌水平均下降, 其中 PI-3K 阻断剂处理组下降作用更显著。 $\Delta neuB$ 处理组的整体 TNF- α 分泌水平仍高于另两组, $P < 0.05$ 。阴性对照组未检测到 TNF- α 分泌。结果见图 4。

4 讨论

病原菌与宿主的博弈存在两个动态平衡的过程: 一个是病原菌通过增强毒力感染宿主; 宿主启动免疫应答清除病原菌。另一个是宿主免疫应答过弱则被感染; 免疫应答过强则为炎症。因此, 探讨病原菌毒力因子在宿主免疫应答过程中的作用很有意义。

固有免疫是机体抵御微生物入侵的第一道屏障, 其主要成员为吞噬细胞, 包括: 中性粒细胞、单核/巨噬细胞、树突状细胞。表达于吞噬细胞表面的 TLRs 可通过识别细菌表面广谱的病原体相

关分子模式, 启动宿主抗感染的天然免疫应答。目前已经发现的 TLR 家族至少有 11 个 (TLR1-TLR11)^[8], 在金黄色葡萄球菌^[9]、大肠杆菌^[10]等革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌中均有广泛报道。TLR1、TLR6 一般与 TLR2 联合作用, 主

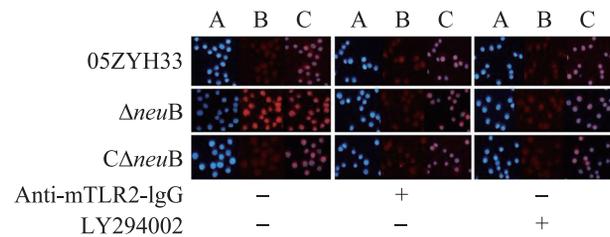


图 3 3 株 SS2 分别对 RAW264.7 NF- κ B 核转运的影响
Fig. 3 Effect of three SS2 strains on NF- κ B activation-nuclear translocation

注: A: 单用蓝色荧光显示结果; B: 单用红色荧光显示结果; C: 红蓝荧光叠加显示结果(400 \times)。图中核染料(DAPI)染蓝细胞核; 抗兔 Cy3 抗体染红 NF- κ B p65 亚基; 叠加后 NF- κ B 激活-核转运区呈紫色。 $\Delta neuB$ 处理组 NF- κ B 激活-核转运程度较高。在阻断剂的作用下, NF- κ B 激活-核转运程度均下降。

Note: A: Blue fluorescence display; B: Red fluorescence display; C: Blue and red fluorescence overlay display (400 \times). Nucleus is dyed blue by DAPI; NF- κ B p65 subunit is dyed red by Rabbit Anti-Cy3 antibody; NF- κ B activation-nuclear translocation zone showed purple after overlay. $\Delta neuB$ strain showed high level of NF- κ B activation-nuclear translocation. TLR2 blocking agent and PI-3K inhibitor significantly suppressed the NF- κ B activation-nuclear translocation degree.

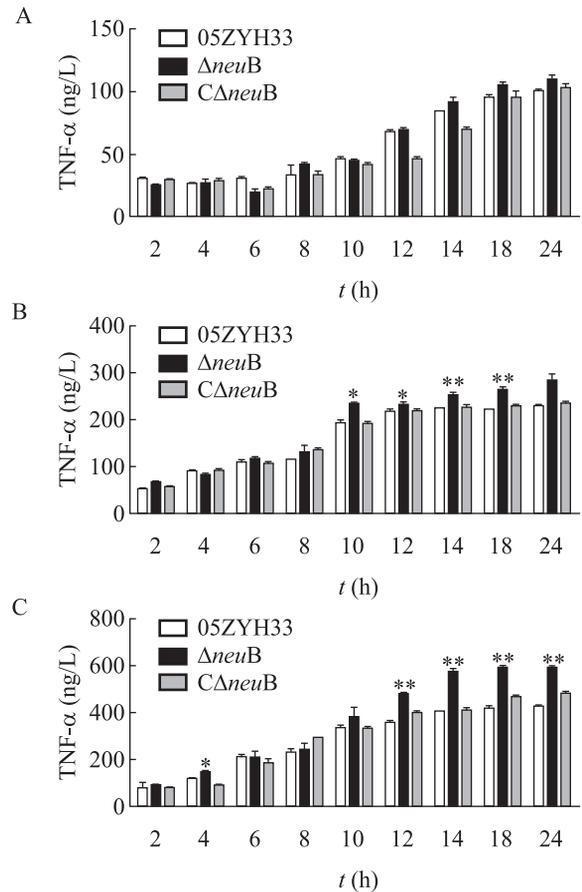


图 4 3 株 SS2 分别刺激 RAW264.7 分泌 TNF- α 的水平
Fig. 4 Effect of three SS2 strains on RAW264.7 TNF- α secretion

注: A: TNF- α 分泌水平统计分析, 12 h 开始, $\Delta neuB$ 处理组刺激细胞分泌 TNF- α 的水平显著高于另两组($n=2$, $P < 0.05$); B: 在 mTLR2 拮抗剂 Anti-mTLR2-IgG 的作用下, TNF- α 分泌水平下降; C: 在 PI-3K 阻断剂 LY294002 的作用下, TNF- α 分泌水平下降, 呈阻断剂浓度依赖性。

Note: A: TNF- α secretion level analysis, $\Delta neuB$ strain showed higher TNF- α secretion than the other two groups after 12 h ($n=2$, $P < 0.05$); B: TLR2 blocking agent Anti-mTLR2-IgG suppressed TNF- α secretion; C: PI-3K inhibitor LY294002 suppressed TNF- α secretion, in a concentration-dependent manner.

要识别脂蛋白; TLR2 的配体较广泛, 包括脂蛋白、肽聚糖、脂磷壁酸、阿拉伯甘聚糖、及酵母多糖等; TLR4 可识别脂多糖、热休克蛋白等; TLR5 的唯一配体是鞭毛蛋白; TLR3 及 TLR7-TLR9 主要识别核酸序列^[11]。多篇文献曾报道 TLR2、TLR6、TLR9 等参与抗链球菌的免疫应答^[12-14]。探讨表达于巨噬细胞的 TLRs 对于了解宿主抗 SS2 感染的机制十分关键。

本研究选取位于巨噬细胞表面的、可能识别细菌细胞壁成分的 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 为研究对象。我们在前期研究中发现, SS2 唾液酸合成酶基因 *neuB* 敲除后导致细菌荚膜成分改变, 因此可使细菌的某些细胞壁成分暴露, 从而更容易激活宿主细胞的 TLR2 信号通路。在此之前, Mariela Segura 等^[15]也曾报道 SS2 荚膜多糖抑制了巨噬细胞 J774.A1 吞噬通路 PI-3K/AKT/PKC α 的激活。一般情况下, TLR2 与 TLR1 或 TLR6 联合识别抗原^[16]。本实验中 TLR1 与 TLR6 未见明显激活, 一方面可能是检测手段的局限性, 需要后续进一步验证; 另一方面可能该通路的激活是 TLR2 特异性的, 这在 SS2 荚膜多糖抗巨噬细胞吞噬实验中曾有报道^[17]。AKT 为 PI-3K 的下游分子, 实验中一般以 p-AKT 的表达水平代表 PI-3K 通路活性。TLR1、TLR2、TLR6 均包含 PI-3K p85 亚基的结合基序(YXXM), 这三类 TLRs 可直接激活 PI-3K; 而 TLR3、TLR4、TLR5 之类的 TLRs 理论上亦可通过间接途径激活 PI-3K^[18]。同时, 巨噬细胞表面的多种受体, 如 G 蛋白偶联受体、GABA 受体, 也可激活 PI-3K。由此看来, AKT 的激活是多途径的。在本实验中, 敲除株 $\Delta neuB$ 相对于野生株 AKT 磷酸化水平显著上调, 但达高峰的时间点早于 TLR2 蛋白, 很可能是其他受体通路的共同参与造成的。NF- κ B 是炎症因子的调节中枢。一般情况下, NF- κ B 可诱导 TNF- α 、IL-1 β 、MIP1 α/β 、RANTES 等多种

前炎症因子的表达^[19]。TNF- α 是炎症反应中出现最早、最重要的炎性介质, 能激活中性粒细胞和淋巴细胞、使血管通透性增加, 并促进其他细胞因子的合成和释放^[20]。因此, 本实验选取了 TNF- α 作为炎症因子分泌水平的检测靶标。同时, 我们还以 ELISA 法检测了 IL-1 β 的分泌水平, 结果各实验条件下分泌均处于基础水平, 没有统计学差异。后续我们将扩大细胞因子的检测种类, 力求得到更全面更完善的结果。猪链球菌荚膜唾液酸与宿主细胞相互作用信号通路分子机制可能是错综复杂的, 许多参与的分子与信号通路必然有不同程度相互联系和作用。鉴于未能全面展开相关研究分析, 目前尚不排除 p38MAPK 和 JNK 信号通路在此过程中参与细胞因子分泌的可能性, 这也是我们下一步重要的实验研究内容。

本研究进一步探讨了荚膜唾液酸成分在猪链球菌突破固有免疫屏障中的部分信号通路分子机制。上述实验结果显示, SS2 的唾液酸合成酶基因敲除突变株 $\Delta neuB$ 株可显著刺激 TLR2 表达、磷酸化 AKT、激活 NF- κ B、刺激 TNF- α 分泌, 亦可逐一被 TLR2 抑制剂 Anti-mTLR2-IgG 及 PI-3K 阻断剂 LY294002 阻断, 层层揭示了该通路的逐级转导过程: TLR2 \rightarrow AKT \rightarrow NF- κ B \rightarrow TNF- α 。通过该研究, 我们推测 SS2 荚膜唾液酸成分缺失后, 能够显著激活宿主单核/巨噬细胞 TLR2 分子, 导致通路下游 AKT 磷酸化水平升高, 核转录因子 NF- κ B 激活, 从而导致炎症因子释放, 使得细菌更加容易被机体识别并清除, 导致毒力下降。该研究为 Carlin 等^[3]提出的荚膜唾液酸成分为 SS2 的重要毒力相关因子提供了佐证, 同时为防控猪链球菌致病增添了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis*

- serotype 2[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(5): e151.
- [2] Chen C, Tang J, 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] Carlin AF, Lewis AL, Varki A, et al. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(4): 1231-1237.
- [4] 董瑞萍, 王长军, 程功, 等. 猪链球菌2型唾液酸合成酶 *neuB* 基因敲除突变株的构建及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 238-244.
- [5] 石洁, 胡丹, 朱静, 等. 猪链球菌2型荚膜唾液酸对细菌毒力和宿主炎症反应的影响[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 498-504.
- [6] Zheng H, Luo X, Segura M, et al. The role of toll-like receptors in the pathogenesis of *Streptococcus suis*[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 156(1/2): 147-156.
- [7] Raffatellu M, Sun YH, Wilson RP, et al. Host restriction of *Salmonella enterica* serotype Typhi is not caused by functional alteration of SipA, SopB, or SopD[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(12): 7817-7826.
- [8] Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Artificial Organs, 2011, 34(9): 799-810.
- [9] Wang J, Roderiquez G, Norcross MA. Control of adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1, and TLR2[J]. Scientific reports, 2012, 2: 606.
- [10] Xu S, Liu X, Bao Y, et al. Constitutive MHC class I molecules negatively regulate TLR-triggered inflammatory responses via the Fps-SHP-2 pathway[J]. Nature Immunology, 2012, 13(6): 551-559.
- [11] Eleftheriadis T, Pissas G, Liakopoulos V, et al. Toll-Like receptors and their role in renal pathologies[J]. Inflammation & Allergy Drug Targets, 2012, 11(6): 464-477.
- [12] Lecours MP, Segura M, Fittipaldi N, et al. Immune receptors involved in *Streptococcus suis* recognition by dendritic cells[J]. PloS One, 2012, 7(9): e44746.
- [13] de Toledo A, Nagata E, Yoshida Y, et al. *Streptococcus oralis* coaggregation receptor polysaccharides induce inflammatory responses in human aortic endothelial cells[J]. Molecular Oral Microbiology, 2012, 27(4): 295-307.
- [14] Lammers AJ, de Porto A, de Boer OJ, et al. The role of TLR2 in the host response to pneumococcal pneumonia in absence of the spleen[J]. BMC Infectious Diseases, 2012, 12(1): 139.
- [15] Segura M, Gottschalk M, Olivier M. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis[J]. International Immunology, 2004, 16(9): 5322-5330.
- [16] Murray PJ, Smale ST. Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways[J]. Nature Immunology, 2012, 13(10): 916-924.
- [17] Graveline R, Segura M, Radzioch D, et al. TLR2-dependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness[J]. International Immunology, 2007, 19(4): 375-389.
- [18] Strassheim D, Asehnoune K, Park JS, et al. Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils[J]. Journal of Immunology, 2004, 172(9): 5727-5733.
- [19] Zheng ZW, Hao WB, Luo SH. Regulation of NF-kappaB signaling pathway by poxvirus[J]. Bing du xue bao, 2012, 28(4): 471-476.
- [20] Finucane OM, Reynolds CM, McGillicuddy FC, et al. Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2012, 71(4): 622-633.