

2型猪链球菌脑膜炎小鼠模型的构建及其转录组学分析

施科达^{#1,2}, 臧莹安^{#1}, 李艳², 翟少伦², 徐民生^{1,2}, 刘凯³, 李春玲^{*2}

1 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510225

2 广东省农业科学院动物卫生研究所 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室 农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640

3 汕尾市金瑞丰生态农业有限公司, 广东 汕尾 516400

施科达, 臧莹安, 李艳, 翟少伦, 徐民生, 刘凯, 李春玲. 2型猪链球菌脑膜炎小鼠模型的构建及其转录组学分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5413-5426.

SHI Keda, ZANG Ying'an, LI Yan, ZHAI Shaolun, XU Minsheng, LIU Kai, LI Chunling. Establishment and transcriptomic analysis of the mouse model of meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5413-5426.

摘要: 【背景】2型猪链球菌(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2)可感染宿主引起严重的脑膜炎, 对养猪业和人类公共卫生安全构成重大威胁。【目的】构建 *S. suis* 2 感染小鼠脑膜炎模型, 并对其脑组织进行转录组学分析, 为揭示 *S. suis* 2 感染宿主后引起脑膜炎的分子机制和发现潜在的治疗靶点提供理论依据。【方法】采用 *S. suis* 2 感染小鼠, 并对其脑组织进行病理组织学分析确认构建脑膜炎小鼠后, 对其脑组织进行转录组学分析, 对比 *S. suis* 2 感染和未感染小鼠的差异表达基因, 并对差异表达基因进行基因本体论(gene ontology, GO)功能、京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集和韦恩分析。【结果】脑病理组织学分析结果显示, *S. suis* 2 感染的小鼠脑膜中有大量的炎症细胞浸润, 并且血管周围出现“袖套”现象, 并能从感染小鼠的组织器官中再分离出攻毒的 *S. suis* 2 菌株, 结果证明构建了 *S. suis* 2 感染脑膜炎小鼠模型。转录组学分析结果表明, 感染 *S. suis* 2 与未感染的小鼠相比, 存在 397 条差异表达基因, 其中 109 个基因表达水平下调, 288 个基因表达水平上调。GO 功能富集分析表明, 差异表达

资助项目: 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目(2023KJ119); 广东省农业科学院学科团队建设项目(202122TD); 广东省科技计划项目(2023B0202010009); 广东省农业科学院大广食品专家工作站建设项目(2023-16); 广东省自然科学基金面上项目(2023A1515012206)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Guangdong Provincial Modern Agricultural Industry Common Key Technology Research and Development Innovation Team Construction Project (2023KJ119), the Guangdong Academy of Agricultural Sciences Discipline Team Construction Project (202122TD), the Guangdong Province Science and Technology Project (2023B0202010009), the Guangdong Academy of Agricultural Sciences Daguang Food Expert Workstation Construction Project (2023-16), and the General Project of Guangdong Provincial Natural Science Foundation (2023A1515012206).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: lichunling@gdaas.cn

Received: 2023-07-25; Accepted: 2023-09-14; Published online: 2023-10-17

基因主要富集于细胞成分功能中的细胞质和细胞质膜, 生物过程功能中的信号传导、转录调控、凋亡过程、系统免疫和对细菌的应答, 以及分子功能中的蛋白结合。KEGG 通路富集分析表明差异表达基因主要富集于多个重要的信号通路, 包括细胞因子-细胞因子受体相互作用、免疫应答相关通路、凋亡通路、细胞吞噬和代谢等。韦恩分析显示, 脑源神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, *bdnf*)基因交会于脑膜炎关联基因集、耳聋关联基因集和 *S. suis* 2 感染差异表达基因集, 且表达显著下调; *c4b*、*fas*、*icam1*、*cxcl1*、*csf3*、*lrg1* 和 *nde1* 基因交会于脑膜炎关联基因集和 *S. suis* 2 感染差异表达基因集, 且表达均显著上调。【结论】本研究构建了 *S. suis* 2 感染的小鼠脑膜炎模型, 并对脑组织进行了转录组学分析, 揭示了 *S. suis* 2 感染后小鼠脑中多个重要的差异表达基因和分子信号通路, 并绘制了分子信号通路网络, 为 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎的分子机制研究提供了新的理论依据和潜在的治疗靶点。

关键词: 2型猪链球菌; 感染; 脑膜炎; 转录组学; 免疫反应

Establishment and transcriptomic analysis of the mouse model of meningitis caused by *Streptococcus suis* serotype 2

SHI Keda^{#1,2}, ZANG Ying'an^{#1}, LI Yan², ZHAI Shaolun², XU Minsheng^{1,2}, LIU Kai³, LI Chunling^{*2}

1 College of Animal Science & Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, Guangdong, China

2 Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Disease Prevention of Guangdong Province, Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510640, Guangdong, China

3 Shanwei Jin Rui Feng Ecological Agriculture Limited Company, Shanwei 516400, Guangdong, China

Abstract: [Background] *Streptococcus suis* serotype 2 (*S. suis* 2) causes severe meningitis in the host, posing a major threat to the pig industry and human public health. [Objective] The mouse model of meningitis induced by *S. suis* 2 infection was established, and its brain tissue was analyzed by transcriptomics to provide a theoretical basis for revealing the molecular mechanism of meningitis caused by *S. suis* 2 infection in mouse and discovering potential therapeutic targets. [Methods] *S. suis* 2 was used to infect mouse, and the histopathological changes in the mouse brain tissue were observed to verify the model of meningitis in mouse was successfully established. Furthermore, transcriptomic analysis was performed to identify the differentially expressed genes (DEGs) between the *S. suis* 2-infected and uninfected mouse. Moreover, gene ontology (GO) functional annotation, Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and Venn analysis were performed for the DEGs. [Results] *S. suis* 2 successfully infected mouse and caused meningitis. The brain of the infected mouse showed infiltration of massive inflammatory cells and perivascular cuffing around the blood vessels. Moreover, the *S. suis* 2 strain was isolated from the tissues of the modeled mouse. The results proved that the mouse model of meningitis caused by *S. suis* 2

infection was successfully established. A total of 397 DEGs were identified, including 109 genes with down-regulated expression and 288 genes with up-regulated expression. GO functional annotation showed that the DEGs were mainly enriched in the cytoplasm, plasma membrane, signal transduction, regulation of transcription, apoptotic process, immune system process, response to bacteria, and protein binding. KEGG pathway enrichment analysis indicated that the DEGs were mainly enriched in multiple important signaling pathways regulating host cytokine-cytokine receptor interaction, immune response, apoptosis, phagocytosis, and metabolism. The Venn analysis showed that the brain-derived neurotrophic factor (*bdnf*) gene converged in meningitis-related genes set, deafness-related genes set, and DEGs set of *S. suis* 2 infection, with significantly down-regulated expression. The *c4b*, *fas*, *icam1*, *cxcl1*, *csf3*, *lrg1*, and *nde1* genes converged in the meningitis-related genes set and the DEGs set of *S. suis* 2 infection, with significantly up-regulated expression. **[Conclusion]** A mouse model of meningitis induced by *S. suis* 2 infection was successfully established. The transcriptomics of the brain tissue of the model mouse revealed several key DEGs and signaling pathways, and the molecular signaling pathway network was built. The findings provide a new theoretical basis for revealing the molecular mechanism of *S. suis* 2 induced-meningitis and exploring potential therapeutic targets.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2; infection; meningitis; transcriptomics; immune response

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种人畜共患病原,感染宿主后主要引起脑膜炎、败血症、关节炎和心内膜炎。根据荚膜抗原不同,*S. suis*可以分为35种(1-34型和1/2型)血清型,其中血清型2型最为常见,感染范围最广,也是毒力最强的血清型^[1]。首例人感染2型猪链球菌(*S. suis* 2)的病例在1968年由丹麦报道,至今已经有1600多例感染的报道^[2]。越南、柬埔寨、泰国和中国曾发生人感染*S. suis* 2,引起发病和死亡^[3-6]。近年来,全世界范围仍有散发的病例报道^[7-10]。*S. suis* 2在全世界范围的流行严重威胁着养猪业和人类公共卫生健康。

S. suis 2感染能引起宿主强烈的、全身性的免疫反应。Domínguez-Punaro等^[11]使用*S. suis* 2感染小鼠模型研究发现,感染的小鼠血清中出现高水平的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、IL-6、CCL2和CCL5等炎症因子和趋化因子,在表现为脑膜炎的小鼠脑髓系细胞中出现TLR2、CD14、NF- κ B和TNF- α 等炎症通

路中重要分子的mRNA水平上调,表明炎症反应在*S. suis* 2感染小鼠的发病机制中起重要作用。Vadeboncoeur等^[12]和Schwerk等^[13]也发现*S. suis* 2能够引起宿主内皮/上皮细胞中的炎症趋化因子IL-6、IL-8和MCP-1的大量产生。有报道表明,*S. suis* 2感染宿主后,宿主能快速产生先天免疫应答,激活巨噬细胞的NF- κ B和MAPK信号通路,引起大量炎症因子和趋化因子释放,导致大量细胞发生凋亡^[14-16]。

目前,大多数关于*S. suis* 2感染的研究都集中于免疫器官^[14,17]或免疫细胞^[18],阐述宿主外周免疫系统在*S. suis* 2感染过程中的防御作用。由于血脑屏障具有特殊的屏障作用,可屏蔽外周循环血液中的信号分子、抗体和免疫细胞等非选择性地进入脑中枢系统中,使大脑免受外周免疫反应造成的损伤,有效地保护脑免受外周循环中病原体 and 有毒物质的侵害^[19-20],但*S. suis* 2感染宿主突破血脑屏障引起脑膜炎的分子机制仍不清晰^[10,21]。

转录组测序分析已广泛应用于微生物感染机制研究,能系统地阐明病原与宿主之间的相互作用关系^[22]。de Greeff 等^[15]和 Liu 等^[18]对 *S. suis* 2 感染后的猪肺泡巨噬细胞、THP-1 单核细胞进行转录组学分析发现,细胞中与免疫反应、宿主防御、细胞凋亡和参与信号转导有关的基因表达显著上调。Li 等^[17]对 *S. suis* 2 感染猪的脾脏进行转录组学分析,结果表明高致病性 *S. suis* 2 主要通过 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2) 和 CD14 途径激活相关通路,持续诱导炎症因子和趋化因子的高水平分泌,并分泌毒素破坏组织。目前,关于 *S. suis* 2 感染小鼠引起脑膜炎后整体的脑内转录调控水平仍然未知,引起脑膜炎的分子机制研究未见详细报道。

本研究构建 *S. suis* 2 感染小鼠脑膜炎模型,对发生脑膜炎的脑组织进行转录组学分析,旨在揭示 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎的分子通路调控网络,为 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎的分子机制研究提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10 只 4 周龄、无特定病原(specific pathogen free, SPF)级别的 BALB/c 雄性小鼠购自广东省医学实验动物中心,于广东省农业科学院动物卫生研究所 SPF 小鼠实验室饲养。动物实验经广东省农业科学院动物卫生研究所实验动物伦理审查委员会审查和批准(YC-SPE-2023018)。

1.2 主要试剂和仪器

脑-心浸液肉汤(brain-heart infusion broth, BHI)培养基和血琼脂培养基,广东环凯微生物科技有限公司;新生牛血清,广州蕊特生物科技有限公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)相关试剂,南京诺唯

赞生物科技股份有限公司。PCR 仪和实时荧光定量 PCR 仪, Roche 公司;离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;超净工作台, ESCO 公司;凝胶成像系统,上海天能生命科学有限公司;恒温振荡培养箱,上海志诚仪器仪表有限公司。

1.3 *S. suis* 2 的培养

按照说明书配制 BHI 培养基,加入小牛血清,配制终浓度为 10%小牛血清的 *S. suis* 2 培养基。取 5 μ L 的 *S. suis* 2 冻存菌液加入 5 mL *S. suis* 2 培养基,于 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡摇床 225 r/min 振荡培养 8 h,一部分菌液进行细菌涂板计数,一部分放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.4 *S. suis* 2 感染小鼠

将 *S. suis* 2 菌液 4 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入 PBS 配制成浓度为 1×10^9 CFU/mL 的 *S. suis* 2 菌液。感染组每只小鼠肌肉注射 100 μ L *S. suis* 2 菌液,空白对照组注射等体积的 PBS,持续观察小鼠状态。感染 48 h 后对小鼠进行脱颈椎法处死,剖检,取出脑组织,利用福尔马林固定或液氮冷冻后转入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.5 *S. suis* 2 的分离和鉴定

将组织器官(心、肝、脾、肺、肾、脑)置于超净台中,用 75%乙醇表面消毒,无菌手术刀切开组织,用火焰灼烧过的无菌接种环蘸取组织内部,采用平板划线接种法接种于血琼脂培养基后,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 18 h。挑取单个菌落扩大培养,随后进行 PCR 扩增和琼脂凝胶电泳鉴定。PCR 引物信息见表 1,PCR 采用 Taq Plus Master Mix II 试剂进行。PCR 体系和反应条件参考 Taq Plus Master Mix II 说明书。

1.6 脑组织学切片和 H&E 染色

将固定好的脑组织进行酒精梯度脱水(50%、70%、80%、90%和 100%各 5 min),二甲苯透明 10 min 2 次,用石蜡浸润包埋 1 h,冷却后切片,切片厚 4 μ m。将切片于 56 $^{\circ}$ C 烘干 3 h 后进行梯度复水(二甲苯 10 min 2 次;梯度

表 1 *Streptococcus suis* 2 PCR 鉴定引物信息Table 1 Primer information of PCR for detection of *Streptococcus suis* 2

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	PCR product length (bp)
16S rRNA	CAGTATTTACCGCATGGTAGATAT	CTAAGATACCGTCAAGTGAGAA	319
<i>cps</i> type 2	GTTGAGTCCTTATACACCTGTT	CAGAAAATTCATATTGTCCACC	460

酒精 100%、90%、80%、70%和 50%各 5 min) 和 H&E 染色(hematoxylin-eosin staining)。

1.7 转录组文库构建和测序

脑组织样品由华大基因科技有限公司进行总 RNA 提取、文库构建和测序。转录组学相关操作按照华大基因科技有限公司的标准操作流程进行。主要步骤为: 取一定量的 RNA 样品, 适温变性打开其二级结构, 使用 oligo (dT) 磁珠富集 mRNA。打断 mRNA 反转录成第一链 cDNA 和第二链 cDNA。末端修复、加“A”和接头连接, 配制反应体系, 并设置反应程序, 修复双链 cDNA 末端, 并在 3'末端加上 A 碱基; 配制接头连接反应体系, 并设置反应程序, 使接头与 cDNA 连接。采用 PCR 反应对 cDNA 产物进行扩增, 随后对文库进行质检, 按照华大基因科技有限公司的标准建库操作流程进行。将 PCR 产物变性为单链后, 配制环化反应体系, 并设置反应程序, 得到单链环状产物, 消化掉未被环化的线性 DNA 分子。随后上机测序(深圳华大智造科技股份有限公司, MGI 2000)。

1.8 转录组测序结果分析

将测序原始数据(raw data)上传至 NCBI (BioProject 登录号为 PRJNA990671)。数据使用 Dr. Tom 多组学数据挖掘系统(<https://biosys.bgi.comopen in new window>)进行数据分析、绘图及挖掘。差异表达基因分析使用 HISAT2 (v2.1.0) 软件将 clean data 比对到参考基因组上。使用 Bowtie2 (v2.3.4.3)将 clean data 比对到参考基因集上。该参考基因集由 Dr. Tom 多组学数据挖

掘系统提供。对差异表达基因进行基因本体论 (gene ontology, GO)功能富集分析、京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析(<http://www.geneontology.org/open in new window>), 设置 $P \leq 0.05$ 为显著表达差异阈值。

1.9 RT-qPCR 验证

取小鼠脑组织总 RNA 800 μg , 采用逆转录酶(HiScript[®] II Reverse Transcriptase)进行逆转录, 按照说明书配制反应体系, 37 °C 15 min、85 °C 5 s 进行逆转录反应。逆转录后的 cDNA 在 Roche LC480 荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR。随机选取引物序列见表 2。采用 SYBR Green Master Mix 进行 RT-qPCR 反应。反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 在 60 °C 采集 SYBR 荧光信号, 40 个循环。

1.10 统计学分析

小鼠脑组织采用 3 次独立重复的样品进行转录组学分析和 RT-qPCR 试验, RT-qPCR 实验数据以平均数 \pm 标准差表示, 应用 GraphPad Prism 软件进行数据统计分析。荧光定量 PCR 结果采用 *t* 检验进行显著性差异分析, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *S. suis* 2 感染小鼠脑膜炎模型的构建

BALB/c 小鼠在 *S. suis* 2 感染 48 h 后出现精神沉郁、被毛凌乱、身体震颤。将 *S. suis* 2 感染的小鼠脱颈椎处死后, 剖检。*S. suis* 2 感染的小鼠脑表面脑膜充血(图 1A)。小鼠脑病理组

表 2 差异表达基因 RT-qPCR 验证引物

Table 2 RT-qPCR primers for the differentially expressed genes

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>lrg1</i>	CCAATAACTCTCTGTCCAGCACG	TCTTGTTTCGGTTGGCGACCAG
<i>cd300lf</i>	GATGCTGGCATTACTGGTGTGG	GGTTGTCACACTGTGAAGATGGTGG
<i>sele</i>	GGACACCACAAATCCCAGTCTG	TCGCAGGAGAACTCACAACCTGG
<i>illr2</i>	CAGTGCAGCAAGACTCTGGTAC	GCAAGTAGGAGACATGAGGCAG
<i>gpr65</i>	GGCACAACCAAGCCACGAAAA	AAAACGCAGCGGATGAGCACCA
<i>notum</i>	CGTGGTACACTCAAGGATGTGC	GCCTTATGGCTGTCATGGAAGC
<i>fam180a</i>	CATCGGCCAAAGAGGTCTTGT	ATCTCCAGGTCTGGGCTGATCT
<i>pkp1</i>	CCTTTCTCTGGCTGGTGTGATG	GAGTAGTTCGTCATAGTCTGGC
<i>erg2</i>	CCTTTGACCAGATGAACGGAGTG	CTGGTTTCTAGGTGCAGAGATGG
<i>dbnf</i>	GGCTGACACTTTTGAGCACGTC	CTCAAAGGCACTTGACTGCTG

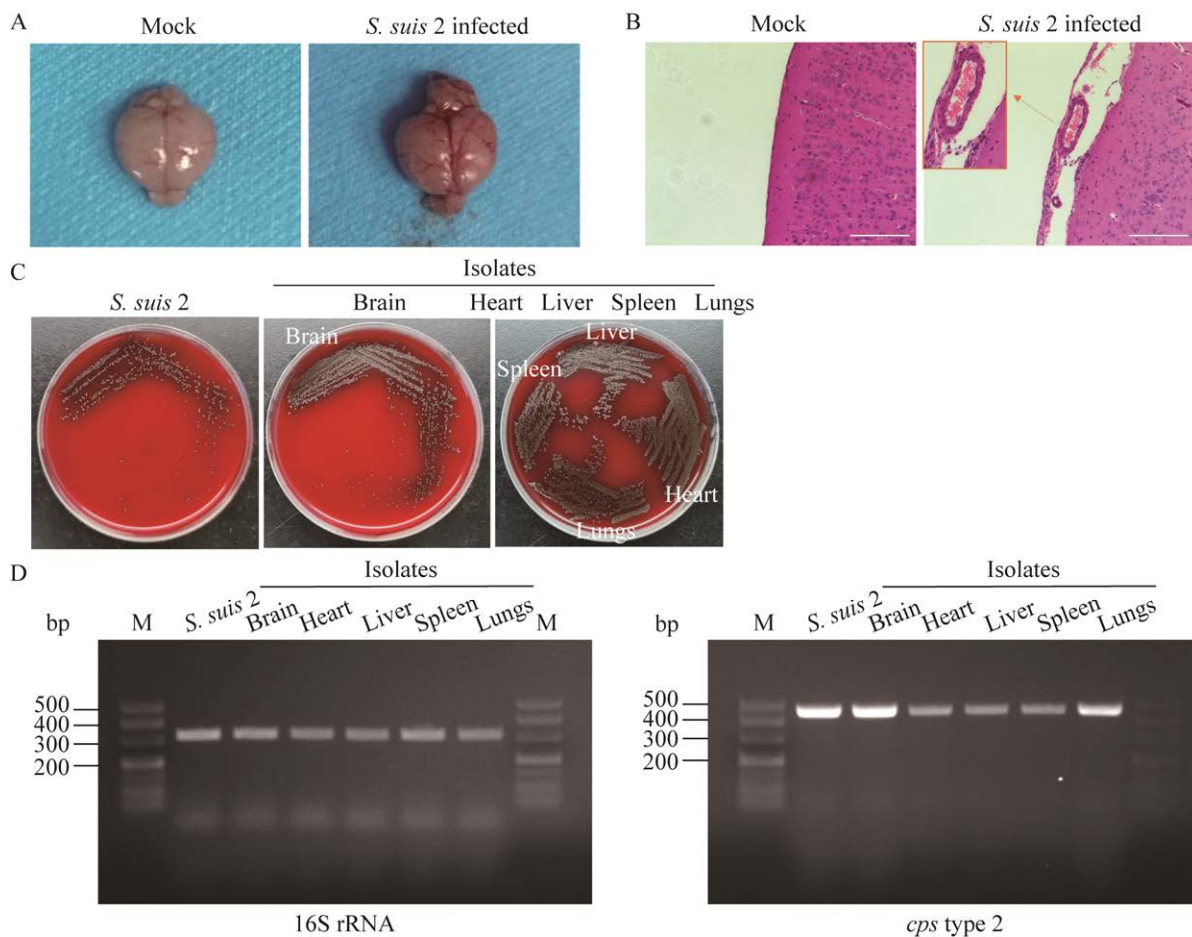


图 1 *Streptococcus suis* 2 感染小鼠脑膜炎模型的构建 A: 小鼠脑组织. B: 小鼠脑组织 H&E 染色. C: 重新分离的 *S. suis* 2 在血平板菌落形态. D: 重新分离的 *S. suis* 2 16S rRNA 和 *cps* 基因 PCR 鉴定. M: DNA Marker

Figure 1 *Streptococcus suis* 2 infection causes meningitis in mouse. A: Brain tissue of mouse. B: H&E stain of brain tissue. C: Colony morphology of re-isolated *S. suis* 2 on blood plate. D: PCR identification of 16S rRNA gene and *cps* gene of re-isolated *S. suis* 2. M: DNA Marker.

织学检测结果显示, 所有感染 *S. suis* 2 的小鼠脑膜均有大量炎症细胞浸润, 血管周围形成“袖套现象”(图 1B)。结果表明, *S. suis* 2 成功感染 BALB/c 小鼠, 构建小鼠脑膜炎模型成功。采集各组织器官, 对感染发病的小鼠各个组织中的 *S. suis* 2 再分离并进行 PCR 鉴定。各个组织分离的细菌接种在羊血琼脂平板上于 37 °C 培养 24 h 后, 菌落呈灰白色、 α -溶血样, 与攻毒菌株一致(图 1C)。PCR 结果表明, 各个组织分离的细菌均为 *S. suis* 2, 16S rRNA 基因阳性, 2 型荚膜多糖(capsular polysaccharides, cps)基因阳性, 与攻毒菌株一致(图 1D)。

2.2 *S. suis* 2 感染小鼠脑膜炎脑组织差异表达基因分析和 GO 富集分析

对空白对照组小鼠($n=3$)和 *S. suis* 2 感染组的小鼠($n=3$)脑组织进行转录组学分析。设置基因表达差异阈值: \log_2 (fold change)值大于 1、 $P<0.05$ 为显著性差异, 在感染 *S. suis* 2 的小鼠脑中未发现 109 个表达下调基因和 288 个表达上调基因。火山图展示了上调和下调的基因, 并标注了差异极显著的基因名称(图 2A)。对筛选出的差异表达基因进行聚类分析, *S. suis* 2 感染组 3 个重复样本和空白对照组 3 个重复样本被聚类为 2 个不同的组别, 说明差异表达基因的表达均有很好的重复性, 数据可靠(图 2B)。基于生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)的差异表达基因进行 GO 功能富集分析。显著富集结果表明(图 2C), 基因表达差异主要富集在细胞成分的细胞质和细胞质膜等, 生物过程的信号转导(signal transduction)、转录正调控(positive regulation of transcription)、凋亡(apoptotic process)、免疫系统过程(immune system process)和对细菌的应答(response to bacterium)等相关功能, 分子功能的蛋白结合

(protein binding)等相关功能。

2.3 差异表达基因 KEGG 通路富集分析和网络分析

差异表达基因主要富集在 10 个与免疫应答相关的通路(图 3A、3B), 分别为吞噬(phagosome)、凋亡(apoptosis)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、NF- κ B 信号通路(NF-kappa B signaling pathway)、AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway)、金黄色葡萄球菌感染(*Staphylococcus aureus* infection)、补体和凝血级联(complement and coagulation cascades)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)和 JAK-STAT 信号通路(JAK-STAT signaling pathway)。吞噬作用、肿瘤坏死因子信号通路、凋亡通路和 NF- κ B 信号传导通路富集的基因表达均为上调。其中, *fas3* 基因和 *nfkbia* 基因关联 3 个免疫应答信号通路, *icam*、*sele* 和 *hras* 基因关联 4 个免疫应答相关的信号通路。

差异表达基因还富集于代谢通路(metabolic pathways)、神经配体-受体相互作用通路(neuroactive ligand-receptor interaction)、细胞因子-因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)和过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路(peroxisome proliferators activated receptor signaling pathway, PPAR signaling pathway)。

2.4 差异表达基因集韦恩分析

通过 DisGeNET 平台(<https://www.disgenet.org/home/>)查找脑膜炎关联基因和耳聋发生关联基因, 与本研究中的 *S. suis* 2 感染脑差异表达基因进行韦恩分析。如图 4 所示, 脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, *bdnf*)基因交会于脑膜炎关联基因集、耳聋发生关联基因集和 *S. suis* 2 感染差异表达基因集的交集中, 并且表达水平下调。此外, *c4b*、*fas*、

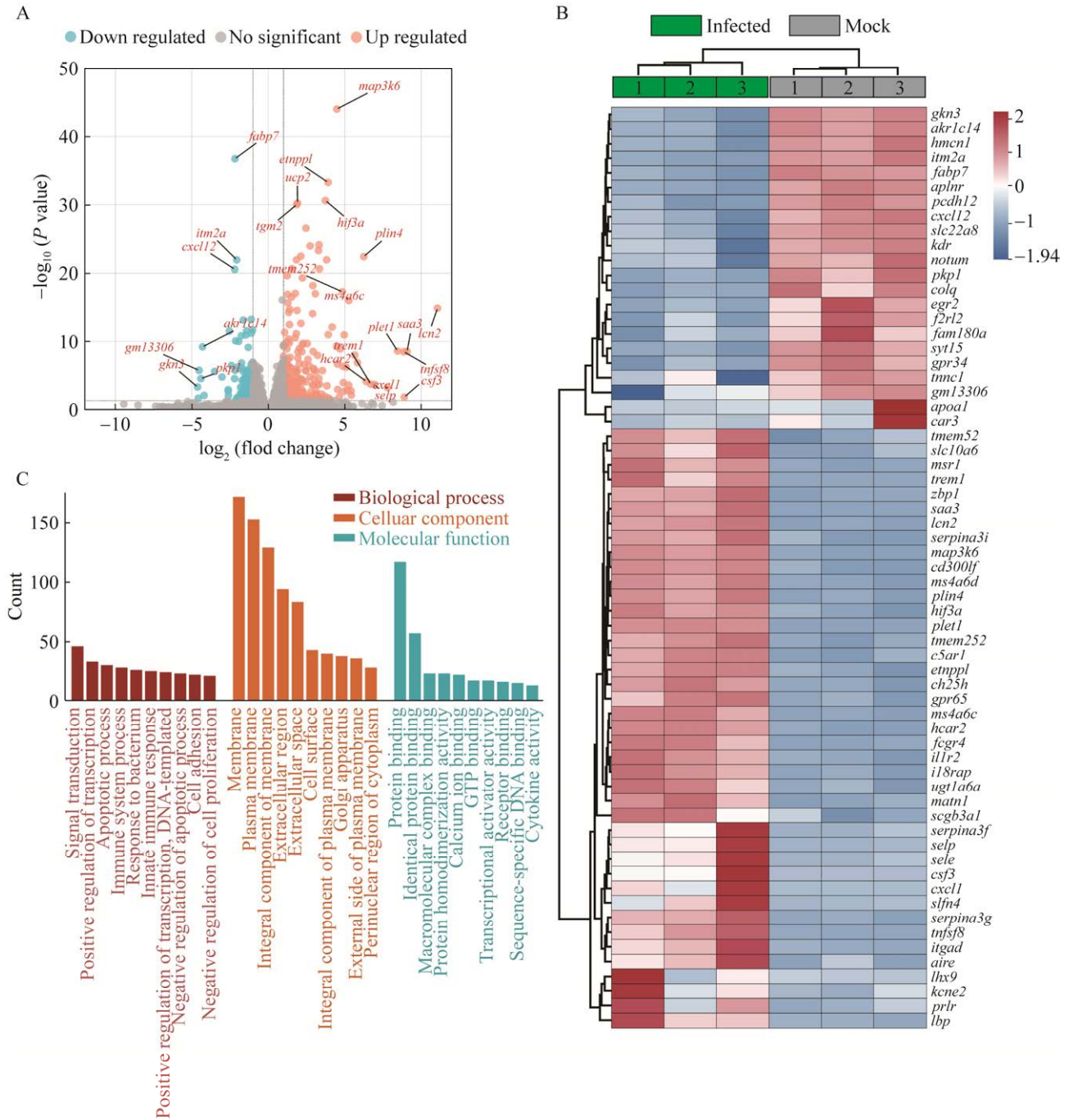


图 2 *Streptococcus suis* 2 感染小鼠脑膜炎的转录组差异分析 A: 差异表达基因火山图. B: 差异表达基因热图. C: 差异表达基因 GO 功能富集图

Figure 2 Differential transcriptome analysis of meningitis-infected mouse infected with *Streptococcus suis* 2. A: Volcano plot of differentially expressed genes. B: Heat map of differentially expressed genes. C: GO function enrichment of differentially expressed genes.

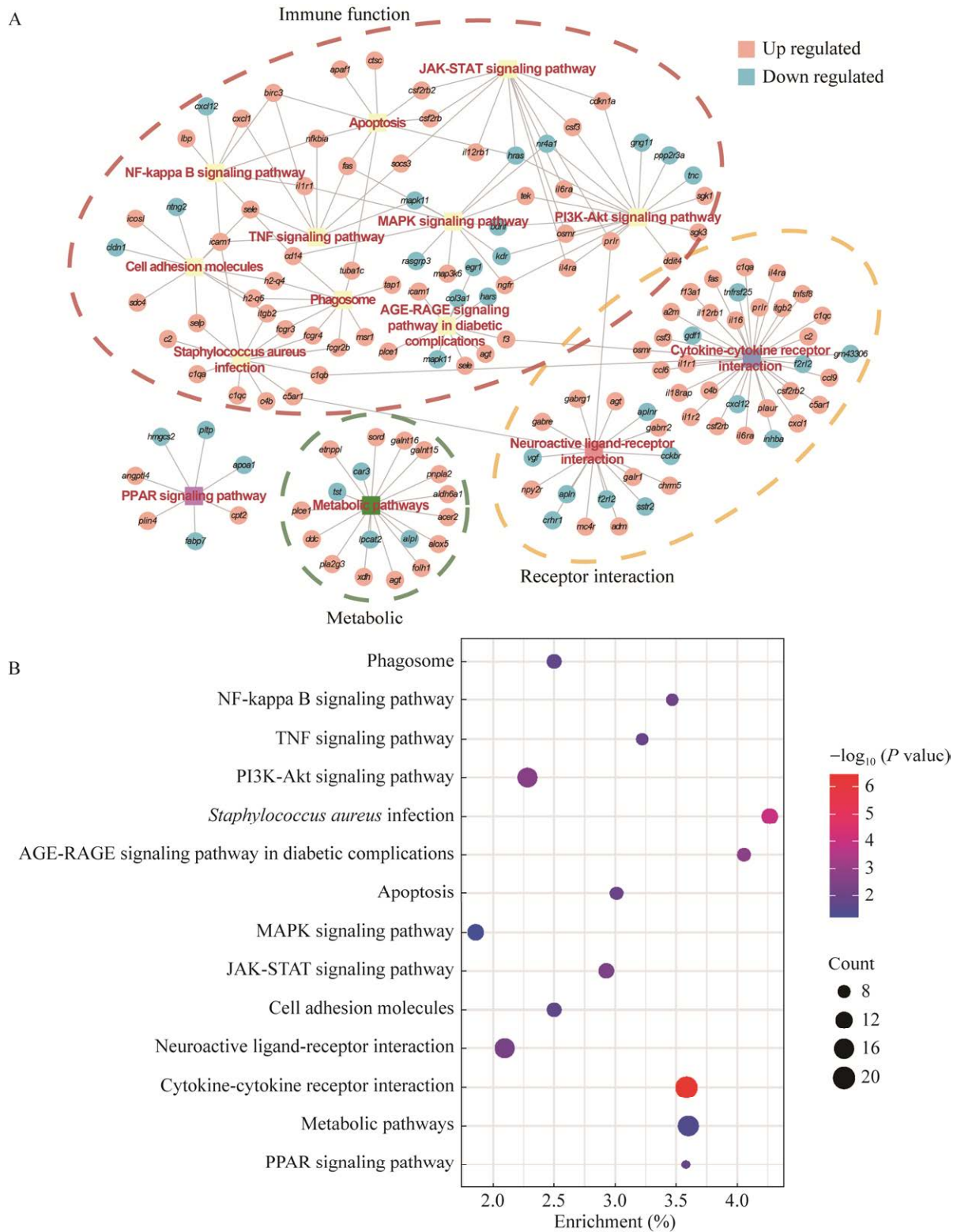


图 3 差异表达基因 KEGG 分析 A: KEGG 通路富集网络关系图. B: KEGG 通路富集气泡图

Figure 3 KEGG analysis of differentially expressed genes. A: KEGG pathway enrichment. B: Bubble plot of differentially expressed genes KEGG pathway.

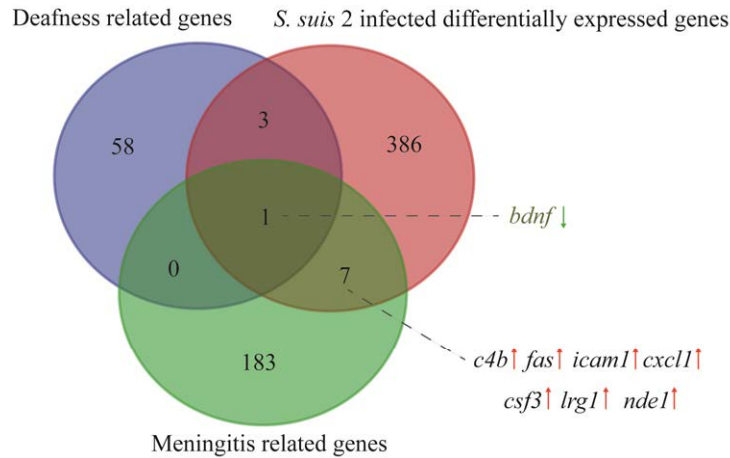


图4 *Streptococcus suis* 2 感染引起脑膜炎差异表达基因韦恩分析图 红色箭头代表差异表达基因上调, 绿色箭头代表下调

Figure 4 Venn analysis of differentially expressed genes in meningitis infected by *Streptococcus suis* 2. The red arrows indicated the up-regulation of differentially expressed genes, and the green arrows indicated the down-regulation.

icam1、*cxcl1*、*csf3*、*lrg1* 和 *nde1* 基因交会于脑膜炎关联基因集和 *S. suis* 2 感染差异表达基因集, 并且表达水平均上调。

2.5 差异表达基因 RT-qPCR 验证结果

从转录组学中上调/下调差异表达基因中分别随机选取 5 条基因, 进行 RT-qPCR 验证, 引物序列见表 2。RT-qPCR 结果显示, *lrg1*、*cd300lf*、*sele*、*il1r2* 和 *gpr65* 基因的表达均为显著上调; *notum*、*fam180a*、*pkp1*、*erg2* 和 *dbnf* 基因的表达均为显著下调(图 5)。10 条差异表达基因的表达趋势与转录组学结果趋势一致。

3 讨论与结论

S. suis 2 已成为需要高度关注和重视的人畜共患病原体, 特别是在东南亚地区, *S. suis* 2 感染对公共卫生构成了巨大威胁。*S. suis* 2 感染患者可出现多种临床症状, 包括脑膜炎、败血症、关节炎和心内膜炎等^[10,21]。目前对 *S. suis* 2 感染的研究主要集中于外周系统免疫细胞、器官的免疫反应或防御作用。*S. suis* 2 感染宿主突

破血脑屏障引起脑膜炎的分子机制仍不清晰。本研究采用 BALB/c 小鼠成功构建了 *S. suis* 2 感染小鼠脑膜炎模型, 对 *S. suis* 2 感染小鼠的脑组织进行转录组学分析, 对差异表达基因进

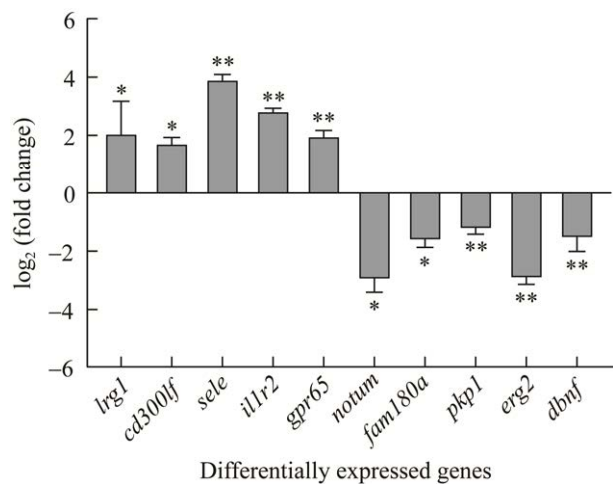


图5 差异表达基因 RT-qPCR 验证 *S. suis* 2 感染组与未感染组比较, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 5 Verification of differentially expressed genes by RT-qPCR. *S. suis* 2 infected group compared with mock group. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

行 GO 富集分析、KEGG 通路分析, 并绘制小鼠感染 *S. suis* 2 脑膜炎模型的转录水平信号通路调控网络, 有助于深入研究 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎的分子机制和发现潜在的治疗靶点。

转录组学分析中, 差异表达基因中的 III 组分泌性磷脂酶 A2 (group III phospholipase A2, *pla2g3*) 基因显著上调。有研究报道, 携带溶血素基因的 *S. suis* 2 可以通过黏附内皮细胞诱导分泌 PLA2G3 异常升高, 直接发挥细胞溶解效应或间接损伤脑微血管内皮完整性, 从而改变血脑屏障的通透性, 导致 *S. suis* 2 侵入脑部引起脑膜炎^[23-24]。PLA2G3 可能是 *S. suis* 2 感染突破小鼠血脑屏障引起脑膜炎的重要调控靶点。此外, 脑中炎症因子和趋化因子包括 CXCL1、CCL6、IL16、CCL9 和 TNF 的基因表达显著上调; 炎症因子受体包括 IL1R1、IL1R2、IL4RA、IL6RA、CSF2RB、IL18RAP 和 IL12RB1 的基因表达显著上调。结果表明, *S. suis* 2 感染后脑中大量的炎症因子、趋化因子释放和炎症受体被激活, 参与到脑内细胞的免疫反应和脑膜炎的发生中。

本研究对差异表达基因进行 GO 富集分析, 差异表达基因主要富集在 GO 功能中的生物过程, 包括转录的正调控、凋亡、凋亡负调控、免疫反应、对细菌的应答、先天性免疫反应、细胞黏附和细胞增殖负调控等。其中, 免疫反应、先天性免疫反应和对细菌应答的分子生物过程表明脑中的细胞能对 *S. suis* 2 感染产生免疫应答作用, 并对侵入脑部的细菌做出防御回应。中枢系统的免疫反应可能与小胶质细胞直接发挥免疫作用有关, 抑或是趋化因子招募外周的免疫细胞进入血脑屏障发挥免疫作用^[25-26]。凋亡和凋亡负调控是细胞抵御细菌维持细胞环境稳态的重要表现。脑中大量细胞过度凋亡和炎症会引起不可逆的神经元轴突损伤。因此, 维持

生理性的炎症、细胞凋亡和清理病原之间平衡在脑膜炎的治疗中具有重要的意义^[27]。

KEGG 通路富集和网络分析表明, 差异表达基因主要富集于免疫功能相关通路、代谢通路和细胞因子-因子受体相互作用。主要的免疫功能相关通路包括 TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、凋亡通路和吞噬作用。TNF 信号通路和 NF- κ B 信号通路参与细胞对应激、细菌或病毒等刺激的反应, 在调节感染免疫反应中发挥关键作用。TNF 结合 TNF 受体 1 (TNFR1) 激活 NF- κ B 的磷酸化和核易位, 编码炎症因子和趋化因子的基因表达上调, 导致大量的炎症因子和趋化因子释放, TNF 和 NF- κ B 通路是引起宿主脑膜炎发生的重要通路^[11,28]。AGE-RAGE 信号通路激活 NADPH 氧化酶诱导细胞氧化应激, 导致细胞内氧化应激增加和累积, 从而激活 NF- κ B 的磷酸化和易位, 促进炎症因子和趋化因子的分泌, 进而调控细胞的免疫功能^[29]。吞噬作用对宿主抵抗病原体侵入至关重要^[30], Ma 等^[31]发现 *S. suis* 2 可以被 Toll 样受体 (TLR) 2 和 TLR4 识别, 激活 NADPH 氧化酶衍生的活性氧, 通过细胞内累积活性氧激活 p38、MAPK 和 ERK1/2 信号通路, 促进中性粒细胞吞噬体的形成, 最终诱导中性粒细胞外陷形成, 抵抗细菌的侵入。本研究表明, *S. suis* 2 感染小鼠引起的脑膜炎主要是由多个免疫相关通路激活和共同调控, 并激活细胞的吞噬作用和细胞凋亡。

代谢调节是病原体侵入宿主后生存和毒力的关键。与宿主竞争葡萄糖、乳糖和氨基酸等营养产物, 已被证明是一些细菌和真菌毒力所必需的^[32-33]。*S. suis* 2 感染小鼠引起的脑膜炎中多个差异表达基因富集于代谢通路, 表明 *S. suis* 2 的侵入宿主过程中可能参与宿主脑细胞代谢通路竞争, 影响宿主代谢功能。

听力损伤或耳聋是 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎最常见的后遗症^[21]。van Samkar 等^[34]对 *S. suis* 2 感染的患者进行了系统调查,表明 489 名患者中的 259 名(53%)出现听力损伤、功能下降。目前,关于 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎后期发生听力损伤的机制仍不清晰。本研究通过韦恩分析发现, *bdnf* 基因交会于脑膜炎关联基因、耳聋关联基因和 *S. suis* 2 感染小鼠发生脑膜炎的差异表达基因的交集中,并且表达显著下调。BDNF 信号传导是中枢神经系统发育和维持所必需的,内耳耳蜗和前庭神经元的存活需要 BDNF 维持。BDNF 对成熟的耳蜗内毛细胞维持正常的递质释放至关重要^[35],缺乏 BDNF/TrkB 传导信号可能会引起听力下降,补充 BDNF 可以一定程度地修复听力损伤^[36-37]。连娣^[38]和陈琼等^[39]报道了外源性 BDNF 可以用于细菌性脑膜炎发生后的神经损伤预防或修复,促进神经元增殖,增加内源性的神经修复。Xu 等^[40]用 BDNF 预处理的大鼠感染肺炎球菌脑膜炎,结果表明 BDNF 能抑制炎症因子的表达,保护神经元,减少海马体凋亡。BDNF 在脑膜炎中具有调控炎症和修复神经损伤的作用。本研究表明 BDNF 在调节 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎导致的神经元损伤和耳聋中具有重要的作用。

本研究构建了 *S. suis* 2 感染小鼠脑膜炎模型,并对其脑组织进行了转录组学分析,揭示了 *S. suis* 2 感染小鼠引起脑膜炎的多个重要的差异表达基因和分子信号通路,并绘制了分子信号通路网络,为 *S. suis* 2 感染引起脑膜炎的分子机制研究提供新的理论依据和潜在的治疗靶点。

REFERENCES

- [1] GOTTSCHALK M, SEGURA M, XU JG. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2007, 8(1): 29-45.
- [2] STAATS JJ, FEDER I, OKWUMABUA O, CHENGAPPA MM. *Streptococcus suis*: past and present[J]. *Veterinary Research Communications*, 1997, 21(6): 381-407.
- [3] 杜亚平, 钱卫娟, 徐国彬. 猪链球菌 2 型菌株引起 8 例化脓性脑膜炎调查[J]. *中华预防医学杂志*, 2000, 34(5): 305.
DU YP, QIAN WJ, XU GB. Investigation on 8 cases of purulent meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2 strain[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2000, 34(5): 305 (in Chinese).
- [4] 吕强, 吴建林, 袁珩, 罗隆泽, 刘学成, 欧阳兵, 刘莉, 刘伦光, 黄燕. 四川省人感染猪链球菌病流行病学调查分析[J]. *预防医学情报杂志*, 2005, 21(4): 379-383.
LÜ Q, WU JL, YUAN H, LUO LZ, LIU XC, OUYANG B, LIU L, LIU LG, HUANG Y. Epidemiological analysis of human infection with swine *Streptococcus* in Sichuan Province[J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2005, 21(4): 379-383 (in Chinese).
- [5] HUI ACF, NG KC, TONG PY, MOK V, CHOW KM, WU A, WONG LKS. Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience[J]. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2005, 107(5): 366-370.
- [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] 王海峰, 李亚飞, 张白帆, 胡晓, 刘利容, 刘蕾, 张娜, 赵嘉咏, 叶莹, 黄学勇. 河南省 5 起人感染猪链球菌病疫情特征分析[J]. *河南预防医学杂志*, 2022, 33(9): 647-649, 677.
WANG HF, LI YF, ZHANG BF, HU X, LIU LR, LIU L, ZHANG N, ZHAO JY, YE Y, HUANG XY. Incidence characteristics of five events of human infection with *Streptococcus suis* in Henan Province[J]. *Henan Journal of Preventive Medicine*, 2022, 33(9): 647-649, 677 (in Chinese).
- [8] DÍEZ de LOS RÍOS J, REYNAGA E, GARCÍA-GONZÁLEZ M, CÀMARA J, ARDANUY C, CUQUET J, QUESADA MD, NAVARRO M, VILAMALA A, PÁRRAGA-NIÑO N, QUERO S, ROMERO A, BENÍTEZ RM, ALTIMIRAS J, PEDRO-BOTET ML. Clinical and epidemiological characteristics of *Streptococcus suis* infections in Catalonia, Spain[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8: 792233.

- [9] JI LY, CHEN ZG, LI F, HU QH, XU LC, DUAN XK, WU HG, XU SQ, CHEN QC, WU S, QIU SX, LU HQ, JIANG M, CAI R, QIU YQ, LI YH, SHI XL. Epidemiological and genomic analyses of human isolates of *Streptococcus suis* between 2005 and 2021 in Shenzhen, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1118056.
- [10] SUSILAWATHI NM, TARINI NMA, FATMAWATI NND, MAYURA PIB, SURYAPRABA AAA, SUBRATA M, SUDEWI AAR, MAHARDIKA GN. *Streptococcus suis*-associated meningitis, Bali, Indonesia, 2014–2017[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(12): 2235-2242.
- [11] DOMÍNGUEZ-PUNARO MC, SEGURA M, PLANTE MM, LACOUTURE S, RIVEST S, GOTTSCHALK M. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(3): 1842-1854.
- [12] VADEBONCOEUR N, SEGURA M, AL-NUMANI D, VANIER G, GOTTSCHALK M. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 35(1): 49-58.
- [13] SCHWERK C, ADAM R, BORKOWSKI J, SCHNEIDER H, KLENK M, ZINK S, QUEDNAU N, SCHMIDT N, STUMP C, SAGAR A, SPELLERBERG B, TENENBAUM T, KOCZAN D, KLEIN-HITPASS L, SCHROTEN H. *In vitro* transcriptome analysis of porcine choroid plexus epithelial cells in response to *Streptococcus suis*: release of pro-inflammatory cytokines and chemokines[J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(11): 953-962.
- [14] WANG SJ, WANG G, TANG YD, LI SQ, QIN L, WANG MH, YANG YB, GOTTSCHALK M, CAI XH. *Streptococcus suis* serotype 2 infection induces splenomegaly with splenocyte apoptosis[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(6): e0321022.
- [15] de GREEFF A, BENGAL L, WICHGERS SCHREUR PJ, VALENTIN-WEIGAND P, REBEL JMJ, SMITH HE. Involvement of NF- κ B and MAP-kinases in the transcriptional response of alveolar macrophages to *Streptococcus suis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 141(1/2): 59-67.
- [16] LIU SF, MALIK AB. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2006, 290(4): L622-L645.
- [17] LI R, ZHANG AD, CHEN B, TENG L, WANG Y, CHEN HC, JIN ML. Response of swine spleen to *Streptococcus suis* infection revealed by transcription analysis[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 556.
- [18] LIU ML, CHEN T, FANG LR, XIAO SB, CHEN HC. Microarray analyses of THP-1 cells infected with *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 150(1/2): 126-131.
- [19] MULDOON LL, ALVAREZ JI, BEGLEY DJ, BOADO RJ, del ZOPPO GJ, DOOLITTLE ND, ENGELHARDT B, HALLENBECK JM, LONER RR, OHLFEST JR, PRAT A, SCARPA M, SMEYNE RJ, DREWES LR, NEUWELT EA. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2013, 33(1): 13-21.
- [20] ABDULLAHI W, TRIPATHI D, RONALDSON PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2018, 315(3): C343-C356.
- [21] HUONG VTL, HA N, HUY NT, HORBY P, NGHIA HDT, THIEM VD, ZHU XT, HOA NT, HIEN TT, ZAMORA J, SCHULTSZ C, WERTHEIM HFL, HIRAYAMA K. Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of *Streptococcus suis* infection in humans[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1105-1114.
- [22] WESTERMANN AJ, VOGEL J. Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22(6): 361-378.
- [23] SUI YT, CHEN Y, LV QY, ZHENG YL, KONG DC, JIANG H, HUANG WH, REN YH, LIU P, JIANG YQ. Suilyin disrupts the blood-brain barrier by activating group III secretory phospholipase A2[J]. *Life*, 2022, 12(6): 919.
- [24] 曹蕊蕊, 贾凯翔, 方仁东. 链球菌突破血脑屏障的作用机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(12): 5311-5320.
- CAO XR, JIA KX, FANG RD. Progress in mechanism of *Streptococcus* penetrating blood-brain barrier[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(12): 5311-5320 (in Chinese).
- [25] MENNICKEN F, MAKI R, de SOUZA EB, QUIRION

- R. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 1999, 20(2): 73-78.
- [26] DUTKIEWICZ J, ZAJĄC V, SROKA J, WASIŃSKI B, CISAK E, SAWCZYN A, KLOC A, WÓJCIK-FATLA A. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II Pathogenesis[J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2018, 25(1): 186-203.
- [27] NEAL JW, GASQUE P. How does the brain limit the severity of inflammation and tissue injury during bacterial meningitis?[J]. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2013, 72(5): 370-385.
- [28] van LOO G, BERTRAND MJM. Death by TNF: a road to inflammation[J]. Nature Reviews Immunology, 2023, 23(5): 289-303.
- [29] WAUTIER MP, CHAPPEY O, CORDA S, STERN DM, SCHMIDT AM, WAUTIER JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2001, 280(5): E685-E694.
- [30] KAUFMANN SHE, DORHOI A. Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions[J]. Immunity, 2016, 44(3): 476-491.
- [31] MA F, CHANG XJ, WANG GY, ZHOU H, MA Z, LIN HX, FAN HJ. *Streptococcus suis* serotype 2 stimulates neutrophil extracellular traps formation via activation of p38 MAPK and ERK1/2[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 2854.
- [32] TROHA K, AYRES JS. Metabolic adaptations to infections at the organismal level[J]. Trends in Immunology, 2020, 41(2): 113-125.
- [33] DRESEN M, VALENTIN-WEIGAND P, BERHANU WELDEAREGAY Y. Role of metabolic adaptation of *Streptococcus suis* to host niches in bacterial fitness and virulence[J]. Pathogens, 2023, 12(4): 541.
- [34] van SAMKAR A, BROUWER MC, SCHULTSZ C, van der ENDE A, van de BEEK D. *Streptococcus suis* meningitis: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2015, 9(10): e0004191.
- [35] ZUCCOTTI A, KUHN S, JOHNSON SL, FRANZ C, SINGER W, HECKER D, GEISLER HS, KOPSCALL I, ROHBOCK K, GUTSCHE K, DLUGAICZYK J, SCHICK B, MARCOTTI W, RUTTIGER L, SCHIMMANG T, KNIPPER M. Lack of brain-derived neurotrophic factor hampers inner hair cell synapse physiology, but protects against noise-induced hearing loss[J]. Journal of Neuroscience, 2012, 32(25): 8545-8553.
- [36] KUCHARAVA K, BRAND Y, ALBANO G, SEKULIC-JABLANOVIC M, GLUTZ A, XIAN XD, HERZ J, BODMER D, FUSTER DG, PETKOVIC V. Sodium-hydrogen exchanger 6 (NHE6) deficiency leads to hearing loss, via reduced endosomal signalling through the BDNF/Trk pathway[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 3609.
- [37] LEAKE PA, AKIL O, LANG HN. Neurotrophin gene therapy to promote survival of spiral ganglion neurons after deafness[J]. Hearing Research, 2020, 394: 107955.
- [38] 连娣. 外源性脑源性神经营养因子提高肺炎链球菌脑膜炎内源性神经干细胞自身修复能力的实验研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2016.
- LIAN D. Experimental study on exogenous brain-derived neurotrophic factor improving the self-repair ability of endogenous neural stem cells from *Streptococcus pneumoniae* meningitis[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2016 (in Chinese).
- [39] 陈琼, 江镜全, 唐晓华, 郭旭光, 夏勇. 脑源性神经营养因子与细菌性脑膜炎神经损伤的预防[J]. 实用医学杂志, 2014(13): 2176-2178.
- CHEN Q, JIANG JQ, TANG XH, GUO XG, XIA Y. Brain-derived neurotrophic factor and prevention of nerve injury in bacterial meningitis[J]. The Journal of Practical Medicine, 2014(13): 2176-2178 (in Chinese).
- [40] XU DF, LIAN D, WU J, LIU Y, ZHU MJ, SUN JM, HE DK, LI L. Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis[J]. Journal of Neuroinflammation, 2017, 14(1): 156.