

## 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

石洁<sup>1,2</sup>, 胡丹<sup>1</sup>, 朱静<sup>1,2</sup>, 张先云<sup>1</sup>, 侯田青<sup>1</sup>, 郭静静<sup>1</sup>, 潘秀珍<sup>1</sup>, 李先富<sup>1</sup>, 王长军<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京军区军事医学研究所, 南京 210002

<sup>2</sup>南京医科大学基础医学院, 南京 210029

**摘要:**【目的】阐明猪链球菌 2 型荚膜唾液酸是否影响细菌毒力以及宿主对其炎症反应应答, 为研究猪链球菌 2 型的致病机制奠定基础。【方法】比较实验菌株对 BLAB/c 小鼠模型的致病性; 通过涂板计数的方法检测实验菌株在小鼠体内的分布; 观察小鼠脑组织病理改变, 分析实验菌株感染小鼠后中枢神经系统的病变差异; 从小鼠体外全血细胞水平, 运用 ELISA 法检测实验菌株感染后细胞炎性因子的分泌水平。【结果】荚膜唾液酸合成基因 *neuB* 缺失突变株  $\Delta neuB$  相比野生株 05ZYH33 株, 对小鼠毒力显著降低, 回复突变株  $c\Delta neuB$  毒力回复至野生株水平; 野生株和突变株在血液及脑组织中分布具有显著差异, 均可致 BLAB/c 小鼠脑组织不同程度的损伤; 与野生株组相比较, 细菌/细胞相互作用不同时间点后, 突变株组体外刺激小鼠全血细胞分泌 MCP-1、IL-6 的水平显著提高; 【结论】荚膜唾液酸影响细菌的毒力及宿主细胞对其的炎症反应应答, 它是猪链球菌 2 型穿透血脑屏障导致脑膜炎的重要毒力因子。

**关键词:** 猪链球菌 2 型, 荚膜, 唾液酸, 毒力, 炎症因子

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 04-0498-07

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, *S. suis*) 是一种重要的人畜共患病病原菌, 可同时感染猪和人致脑膜炎、败血症甚至急性死亡等。根据其荚膜多糖抗原表型的不同共分为 33 种血清型, 其中 2 型是最常分离到的高致病血清型<sup>[1]</sup>。尤其值得关注的是在 1998 年和 2005 年, 分别在我国江苏海安和四川资阳爆发的两次大规模的猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* 2, *S. suis* 2) 感染人事件, 患者中出现高比例的链球菌中毒性休克综合征 (Streptococcal toxic shock syndrome, STSS)<sup>[2]</sup>。

引起 *S. suis* 2 强致病力的毒力因子研究主要涉

及荚膜多糖 (Capsular polysaccharide, CPS)、溶菌酶释放蛋白 (Muramidase released protein, MRP)、胞外因子 (Extracellular factor protein, EF)、溶血素 (Suilysin, SLY)、谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, GDH)、透明质酸和粘附素等<sup>[3]</sup>。它们可能在细菌感染宿主的特定阶段发挥作用, 但基因缺失等实验研究发现, 除荚膜多糖外, 其余均与 *S. suis* 2 的致病性无直接关联作用<sup>[4]</sup>。荚膜多糖是目前唯一被公认的 *S. suis* 2 毒力因子, 也是分离株高致病性所必需的组分<sup>[5]</sup>。唾液酸作为荚膜多糖的 5 种单糖成分之一, 已被证实为多种致脑膜炎链

基金项目: 国家自然科学基金 (31170124, 30972638, 81071317, 81171527, 81172794); 江苏省自然科学基金 (BK2011097, BK2010025, BK2010114, BK2010113, BK2011098)

\* 通信作者。Tel: +86-25-80867004; E-mail: science2008@yahoo.com.cn

作者简介: 石洁 (1987-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事猪链球菌致病机理的研究。E-mail: 599066727@qq.com

收稿日期: 2011-12-05; 修回日期: 2011-02-06

球菌的毒力相关因子,如在 B 群链球菌 (Group B *Streptococcus*) 中唾液酸被认为是一种重要的毒力因子,对于细菌突破血脑屏障发挥重要作用<sup>[6]</sup>。但唾液酸化的荚膜对 *S. suis2* 致病性的影响尚不清楚。前期本课题组已成功构建了中国高致病株 05ZYH33 株的荚膜缺失株  $\Delta cps2B$ <sup>[7]</sup> 和唾液酸合成酶缺失株  $\Delta neuB$ <sup>[8]</sup> 以及相应互补株  $c\Delta cps2B$  及  $c\Delta neuB$ , 并对其生物学特性进行了初步研究。本实验将进一步以 BALB/c 小鼠作为感染模型,定性比较实验菌株对小鼠致病性的差异,从体外比较野生株和突变株刺激小鼠全血细胞系统分泌炎症因子水平的差异,深入阐释荚膜唾液酸是如何在 *S. suis2* 的致病过程中起作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株:**猪链球菌 2 型中国高致病株 05ZYH33 株(分离自 2005 年在四川资阳爆发感染 STSS 的患者)由本实验室保存,  $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$ 、 $c\Delta neuB$ 、 $c\Delta cps2B$  由本实验室构建;无毒株 05JYS68 株(分离自江苏健康猪)由本实验室保存,本实验所用菌株的详细表型及相关特征见表 1。

表 1 实验所用的菌株

Table 1 Bacterial strains used in this study

Bacterial strains	Properties/Function	Sources
05ZYH33	High virulent strain of SS2, <i>neuB</i> <sup>+</sup> , <i>cps2B</i> <sup>+</sup>	This lab
$\Delta neuB$	SS2, <sup>#</sup> <i>Spc</i> <sup>R</sup> , <i>neuB</i> <sup>-</sup> , <i>cps2B</i> <sup>+</sup>	This study
$\Delta cps2B$	SS2, <i>Spc</i> <sup>R</sup> , <i>neuB</i> <sup>+</sup> , <i>cps2B</i> <sup>-</sup>	This study
$c\Delta neuB$	SS2, <sup>#</sup> <i>Cm</i> <sup>R</sup> , <i>neuB</i> <sup>+</sup> , <i>cps2B</i> <sup>+</sup>	This study
$c\Delta cps2B$	SS2, <i>Cm</i> <sup>R</sup> , <i>neuB</i> <sup>+</sup> , <i>cps2B</i> <sup>+</sup>	This study
05JYS68	Avirulent strain of SS2	This lab

# *Spc*: spectinomycin, *Cm*: chloramphenicol.

**1.1.2 实验动物:**BALB/c 小鼠 (SPF 级), 雄性, 6 周龄, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

**1.1.3 主要试剂及仪器:**Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基购于 Difco 公司; 细胞培养板购于上海康宁公司, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定试剂盒购于 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); Ultrospec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品; Bio-Rad Model 550 酶标仪。

### 1.2 生长速率的比较

取等量 ( $OD_{600} \approx 0.4$ ) 的实验菌株置于 THB 液体培养基中, 37°C 振荡培养, 每间隔 1 h 测取  $OD_{600}$  值, 直至细菌生长处于稳定期, 重复实验 3 次并绘制生长曲线。

### 1.3 小鼠毒力实验

在平板上分别挑取 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$ 、 $c\Delta neuB$ 、 $c\Delta cps2B$  的单个菌落, 于 THB 培养基中 37°C 振荡培养 18–24 h, 以 1:100 传代接种至新鲜 THB 培养基, 37°C 静置培养 8 h ( $OD_{600} = 1.0$ , 约  $5.0 \times 10^8$  CFU/mL), 用新鲜 THB 培养基将菌液稀释 5 倍, 即  $OD_{600} = 1.0$  12 mL 的 THB + 3 mL 初始菌液, 此时菌液约  $10^8$  CFU/mL ( $LD_{50} = 4.0 \times 10^7$  CFU/mL), 待用。实验用小鼠随机分为 6 组, 分别腹腔注射实验菌液 1 mL (约  $1 \times 10^8$  CFU/只), 并设磷酸盐缓冲液 (PBS) 阴性对照组 (1 mL/只), 并及时观察记录小鼠发病及死亡情况。

### 1.4 *S. suis2* 攻毒及脑组织形态病理分析

在平板上分别挑取 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  的单个菌落, 于 THB 培养基中 37°C 振荡培养 18–24 h, 以 1:100 传代接种至新鲜 THB 培养基, 37°C 静置培养 8 h ( $OD_{600} = 0.4$ ,  $2.7 \times 10^8$  CFU/mL)。取 6 周龄 BALB/c 雄性小鼠, 腹腔注射 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  (1 mL 菌液/只, 8 只/每菌株), 感染 8 h (感染的急性期) 后取外周血稀释涂 THB 板及 *Spc*<sup>R</sup> THB 抗性板计数以评估外周血中的活菌数, 脱颈处死小鼠分离脑组织, 取部分 PBS 匀浆稀释后涂板计数, 剩余组织于 10% 甲醛 4°C 固定、常规制备石蜡切片, 苏木精—伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色后光镜下观察各组小鼠脑组织病理变化, 具体的实验步骤参考文献<sup>[9]</sup>, 略有改动。

### 1.5 小鼠全血体外刺激实验

$10^8$  CFU/mL 细菌的制备同小鼠毒力实验, 取 100  $\mu$ L 的菌液至 ep 管中, 10000  $\times$  g 离心 10 min, 用 100  $\mu$ L 的含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 细胞培养基洗沉淀 1 次, 最后用 100  $\mu$ L 的含 10% FBS 的 DMEM 重悬沉淀, 菌液浓度为  $2.7 \times 10^7$  CFU/mL。眼眶取健康小鼠的外周全血制备新鲜的抗凝血, 用含 10% FBS 的 DMEM 以 1:4 稀释, 轻轻晃动混匀后分装 500  $\mu$ L/每孔的稀释全血至 24 孔细胞培养板中。再加入 10  $\mu$ L (即  $2.7 \times 10^5$  CFU/mL) 相应菌液, 最后用含 10% FBS 的 DMEM 将每孔液体补足

至1 mL,只加细胞培养基的孔为阴性对照孔。轻轻晃动孔板以混匀,将其放入含5% CO<sub>2</sub>的37℃孵箱培养,培养4、8、18和24 h后分别收样,取得的样本经2000 × g离心10 min,取上清,分装后-20℃保存待检测。

### 1.6 ELISA 检测炎症因子及统计分析

根据 R&D Systems Valukine™ ELISA 说明书进行操作,分别检测待检样本中鼠-MCP-1、鼠-IL-6 的水平。

### 1.7 统计分析

实验所有数据取决于平均数 ± 标准误差,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。

## 2 结果和分析

### 2.1 生长速率的比较

首先在相同培养条件下,绘制 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$ 、 $c\Delta neuB$ 、 $c\Delta cps2B$  的生长曲线,证实各个实验菌株的生长速率趋势基本一致。各菌株之间无显著性差异,  $P > 0.05$ , 结果如图 1 所示。

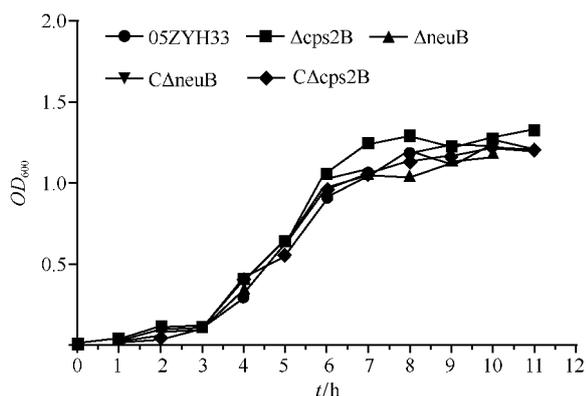


图 1 生长特性比较

Fig. 1 Growth curves.

### 2.2 小鼠毒力实验

用同等剂量 05ZYH33、 $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$ 、 $c\Delta neuB$ 、 $c\Delta cps2B$  菌液攻击小鼠后,THB 阴性对照组动物均无明显发病或异常情况,05ZYH33 野生株组攻击 24 h 后小鼠仅存活 1 只,而  $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  组 24 h 后 10 只小鼠全部存活,观察 48 h 后结果无变化; $c\Delta neuB$  组 24 h 后存活 2 只、 $c\Delta cps2B$  组 24 h 后存活

1 只(图 2)。野生株和突变株两组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示两突变株毒力显著减弱;回复株毒力与野生株之间无显著性差异,提示 *neuB*、*cps2B* 基因回复后菌株毒力又恢复至野生株水平。

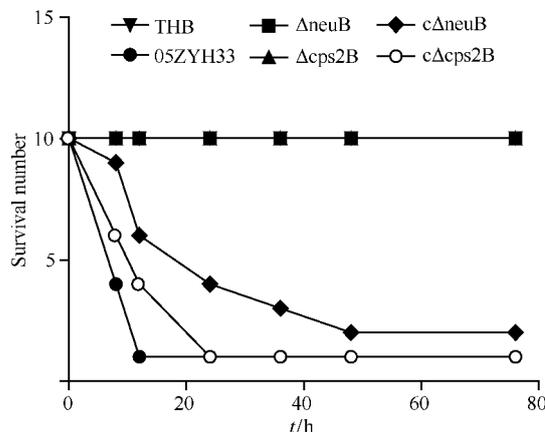


图 2 小鼠生存曲线

Fig. 2 Survival curves for BALB/c mice infectious experiments.

### 2.3 *S. suis* 2 在小鼠血液及脑组织中的分布

取细菌感染 8 h 后小鼠外周血及脑组织匀浆稀释涂板计数,结果如图 3 所示。 $10^8$  CFU/mL 的 05ZYH33 及  $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  菌株感染小鼠 8 h,外周血液中 05ZYH33 菌株的平均定植数大于  $10^6$  CFU/mL,显著多于外周血液中  $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  细菌量(平均值约  $10^4$  CFU/mL)(图 3-A);05ZYH33 菌株在脑组织中平均定植量显著多于  $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  菌株,分别约为  $10^4$ 、 $10^2$ 、 $10^2$  CFU/g(图 3-B);05ZYH33 菌株在外周血及脑组织中分布比率也显著高于  $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  菌株分别约为 0.634、0.533、0.529(100%)(图 3-C)。

### 2.4 *S. suis* 2 感染小鼠脑组织的病理检测

不同菌株感染小鼠 8 h 后将小鼠脑组织进行 HE 染色。镜下观察发现,野生株组及突变株组小鼠脑组织均有不同程度的神经元细胞的凋亡(如图 4)。05ZYH33 感染组小鼠脑组织中可见典型胶质细胞增生样细胞结节,同时可见散在出血灶并伴随显著的白细胞浸润(图 4 箭头所示);而  $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$  感染组小鼠脑组织则未发现明显出血及炎性细胞浸润,组织细胞形态与无毒株 05JYS68 感染组相似。结果如图 4 所示。

### 2.5 *S. suis* 2 体外刺激小鼠全血细胞产生炎症因子的水平

利用 ELISA 法检测分析经不同菌株体外刺激

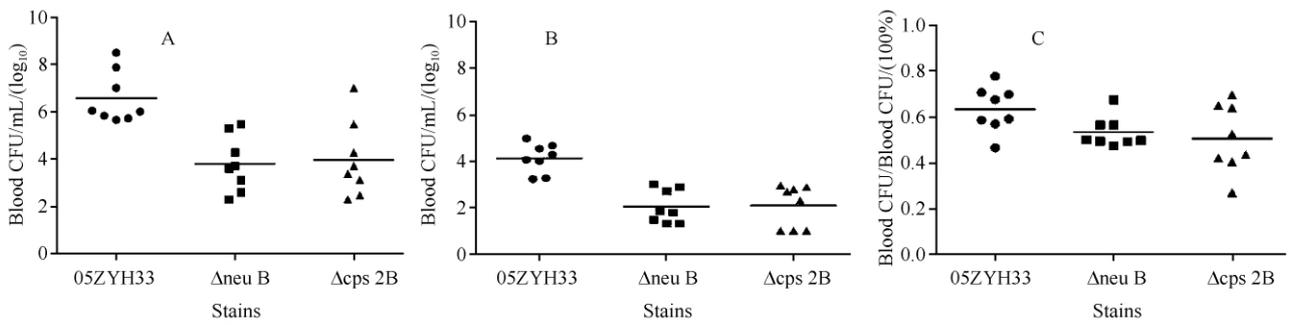


图 3 感染小鼠血液及脑组织中细菌分布量

Fig. 3 Bacteria distribution in blood and brain from mice infected i. p. with *S. suis*2. Eight hours after infection ,blood and brains were harvested and the bacterial counts were determined. The contrast between  $\Delta neuB$  and 05ZYH33: (A, B) \*\*\* $P < 0.001$  ,(C) \*  $P < 0.05$ ; the contrast between  $\Delta cps2B$  and 05ZYH33: (A) \* \*  $P < 0.01$  ,(B) \*\*\* $P < 0.001$  ,(C) \*  $P < 0.05$ .

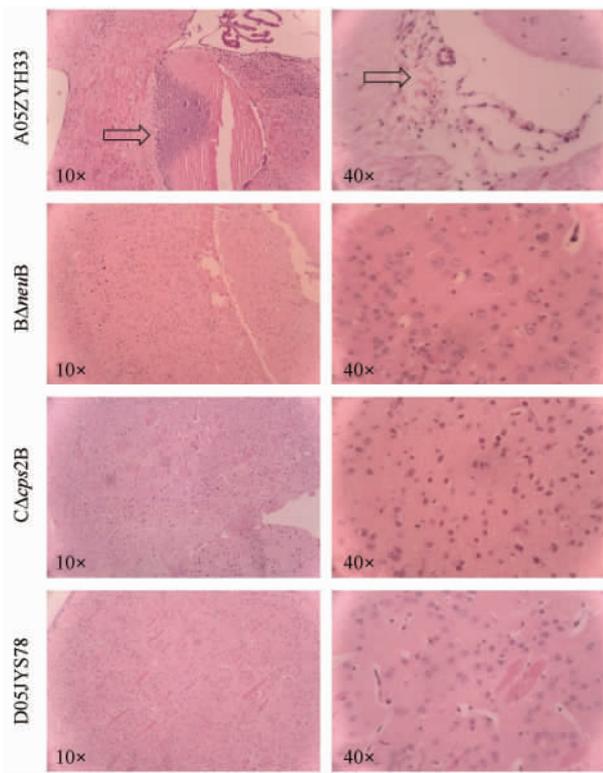


图 4 猪链球菌感染小鼠 8 小时后脑组织病理特征 (HE 染色)

Fig. 4 Pathological characterization of brain tissues of mice infected with indicated *Streptococcus suis* strains for eight hours. Brain tissues of mice infected with 05ZYH33 , $\Delta neuB$  , $\Delta cps2B$  ,or 05JYS68 were prepared for light microscopic analysis and examined for differences in pathological changes induced by the 4 indicated strains (H&E staining).

后小鼠全血细胞释放炎症因子的水平。分离 收集不同相互作用时间(4、8、18 和 24 h)的上清 ,分别测定 MCP-1、IL-6 分泌水平(图 5) 结果显示  $\Delta neuB$ 、

$\Delta cps2B$  刺激细胞分泌 MCP-1、IL-6 的水平显著高于野生株组 , $P < 0.05$ 。小鼠 MCP-1、IL-6 的检测限分别为 2、1.6 ng/mL ,阴性对照组未检测到 MCP-1、IL-6 的分泌。

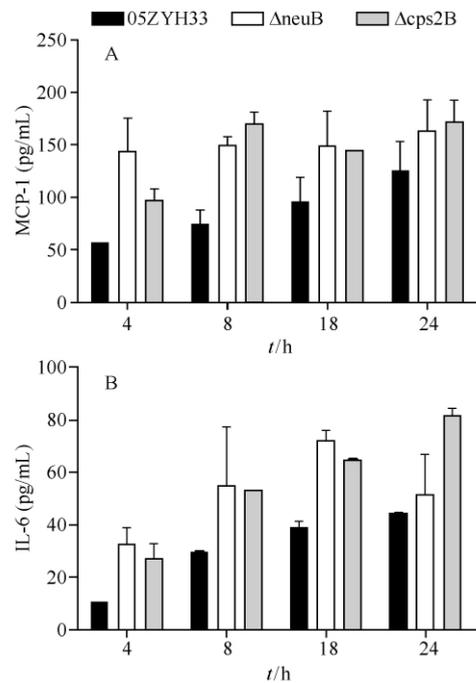


图 5 *S. suis*2 菌株刺激小鼠全血细胞分泌炎症因子水平

Fig. 5 Cytokines production by whole-blood culture system infected with *S. suis*2. A: MCP-1 ;B: IL-6.

### 3 讨论

猪链球菌感染临床表现为不同程度的无症状菌血症到暴发的系统紊乱 ,脑膜炎是其感染的最典型

特征,脑膜及脉络丛的纤维化、水肿和细胞浸润并伴随的脑炎是最常见的组织病理学特征<sup>[10]</sup>。至今,猪链球菌导致机体全身及中枢神经系统感染的分子致病机理仍是挑战,病原菌如何入侵并在血液系统中存活,穿过血脑屏障并在脑脊液中生存繁殖,最终导致中枢神经系统损伤,仍有诸多未知领域。有研究证实,部分品系小鼠可模拟细菌对猪和人类的感染,是建立模型的适宜动物<sup>[11-12]</sup>,但有关小鼠模型研究猪链球菌2型引起中枢神经系统病变及在感染阶段炎症反应应答未见深入的报道。近年来,本课题组前期研究发现适龄的SPF BALB/c小鼠是稳定的毒力评估模型。本实验以BALB/c小鼠为模型分析荚膜唾液酸缺失对猪链球菌2型感染过程的影响。

在证实了野生株05ZYH33,突变株 $\Delta neuB$ 、 $\Delta cps2B$ ,回复株 $c\Delta neuB$ 、 $c\Delta cps2B$ 在相同培养条件下生长速率趋势基本相近的条件下,我们通过小鼠的毒力实验发现,荚膜多糖合成基因 $cps2B$ 及唾液酸合成基因 $neuB$ 缺失后,细菌毒力基本丧失,基因回复后毒力又恢复到野生株的水平,进一步证实了荚膜唾液酸是猪链球菌2型的重要毒力因子。05ZYH33、 $\Delta neuB$ 及 $\Delta cps2B$ 在小鼠血液及脑组织中分布实验结果显示,小鼠机体对突变株的清除能力显著增强。小鼠攻毒8h后脑组织病理切片观察,突变株攻击小鼠脑组织内未发现明显的炎症细胞浸润,而野生株组可见典型的胶质细胞增生,形成胶质细胞结节,同时可见散在出血灶并伴随白细胞浸润;本课题组<sup>[9,13]</sup>前期对野生株感染12h后动物肝组织进行过观察发现,野生株攻击肝脏组织中央静脉和汇管区中均发现大量炎症细胞浸润,表明野生株刺激机体产生过度炎症应答进而造成的炎症因子过度释放,多种炎症细胞的激活和一系列炎症介质的释放促成机体产生一系列病理损伤。

前期本课题组<sup>[14]</sup>检测了突变株和野生株刺激人单核细胞(Human THP-1 monocytes, THP-1)分泌炎症因子IL-6、IL-8的水平,发现荚膜缺失后促进了趋化因子的募集,使得免疫细胞对病原菌侵袭的反应性增强,与人全血杀菌实验<sup>[7-8]</sup>结果相一致。本实验首次运用体外小鼠全血细胞体系来检测不同菌株刺激后炎症因子MCP-1、IL-6的分泌水平,突变株组显著高于野生株组。提示荚膜唾液酸可能在宿主对2型猪链球菌的识别与应答中发挥抑制作用。Segura M<sup>[15]</sup>、Zhao Y<sup>[9]</sup>等分别以仔猪及人的体外全

血系统研究*S. suis*引起的炎症反应应答,实验发现*S. suis*野生株及荚膜缺失株均可引起炎症因子IL-6的释放,但仔猪全血实验指出与野生株相比,荚膜缺失株诱导较低水平的MCP-1的释放。以全血体系代替生物个体进行体外实验可以反映细菌与不同细胞的相互作用结果。研究<sup>[15-16]</sup>认为尽管荚膜唾液酸缺失株更易被全血体系的巨噬细胞所吞噬,导致培养过程中细菌量减少,但是仅少量的缺失株仍能够刺激炎症因子的分泌。具有吞噬作用的荚膜结构通过隐藏猪链球菌细胞壁组分调节炎症反应,影响猪链球菌与宿主细胞之间的相互作用,同时证实细菌细胞壁组分是主要的致炎因素<sup>[17]</sup>。

Ye等<sup>[18]</sup>研究发现中国高致病株05ZYH33株刺激机体产生的炎症介质水平显著高于其它猪链球菌2型致病株,炎症因子的过度释放和激活可能是05ZYH33强致病性的重要原因。临床实验研究指出休克患者血液中炎症因子的表达要远远高于普通脑膜炎患者,中毒性休克综合征作为中国强毒株05ZYH33高致死率的典型特征,课题组<sup>[9,19]</sup>也对*S. suis*2导致STSS的发病机制进行了研究,感染宿主产生了严重的炎症反应。诸多研究均证实以BLAB/c小鼠为感染模型阐明猪链球菌引发脑膜炎、败血症及中毒性休克综合症的机制具有重要的意义。本研究探讨了荚膜唾液酸对猪链球菌感染小鼠致病性的影响,为*S. suis*2感染全身及中枢神经系统后宿主的固有免疫应答机制的研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, Song Y, Zhu X, Sun H, Feng T, Guo Z, Ju A, Ge J, Dong Y, Sun W, Jiang Y, Wang J, Yan J, Yang H, Wang X, Gao GF, Yang R, Wang J, Yu J. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 chinese isolates. *PLoS ONE*, 2007, 2(3): e315.
- [2] Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H, Wu B, Wang H, Zhao H, Lin Y, Yue J, Wu Z, He X, Gao F, Khan AH, Wang J, Zhao GP, Wang Y, Wang X, Chen Z, Gao GF. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Medicine*, 2006, 3(5): 668-676.

- [ 3 ] Baums CG , Valentin-Weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology , pathogenesis and vaccine development. *Animal Health Research Reviews* , 2009 , 10 ( 1 ) : 65-83.
- [ 4 ] Smith HE , Wisselink HJ , Stockhofe-Zurwieden , Vecht U , Smits MM. Virulence markers *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Advances in Experimental Medicine and Biology* , 1997 , 418 , 651-656.
- [ 5 ] Severi E , Hood DW , Thomas GH. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* , 2007 , 153 ( Pt 9 ) : 2817-2822.
- [ 6 ] Marques MB , Kasper DL , Pangburn MK , Wessels MR. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infection and Immunity* , 1992 , 60 ( 10 ) : 3986-3993.
- [ 7 ] 胡丹 , 王长军 , 程功 , 李明 , 王晶 , 潘秀珍 , 唐家琪. 猪链球菌2型荚膜缺失株生物学特性及其免疫保护性. *微生物学通报 ( Microbiology China )* , 2011 , 38 ( 1 ) : 85-90.
- [ 8 ] 董瑞萍 , 王长军 , 程功 , 李明 , 王晶 , 潘秀珍 , 唐家琪. 猪链球菌2型唾液酸合成酶 *neuB* 基因缺失突变株的构建及其生物学特性. *微生物学通报 ( Microbiology China )* , 2009 , 36 ( 2 ) : 238-244.
- [ 9 ] Zhao Y , Liu G , Li S , Wang M , Song J , Wang J , Tang J , Li M , Hu F. Role of a Type IV-like Secretion System of *Streptococcus suis* 2 in the Development of Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases* , 2011 , 204 ( 2 ) : 274-281.
- [ 10 ] Gottschalk M , Xu J , Calzas C , Segura M. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen. *Future Microbiology* , 2010 , 5 ( 3 ) : 371-391.
- [ 11 ] Dominguez-Punaro Mde L , Segum M , Radzioch D , Rivest S , Gottschalk M. Comparison of the susceptibilities of C57BIV6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. *Infection and Immunity* , 2008 , 76 ( 9 ) : 3901-3910.
- [ 12 ] 宋洁 , 黎庶. 猪链球菌2型感染实验动物模型的研究进展. *微生物学免疫学进展 ( Progress in Microbiology and Immunology )* , 2010 , 38 ( 3 ) : 57-60.
- [ 13 ] Zheng F , Ji H , Cao M , Wang C , Feng Y , Li M , Pan X , Wang J , Qin Y , Hu F , Tang J. Contribution of the Rgg Transcription Regulator to Metabolism and Virulence of *Streptococcus suis* Serotype 2. *Infection and Immunity* , 2011 , 79 ( 3 ) : 1319-1328.
- [ 14 ] 石洁 , 李先富 , 张先云 , 朱静 , 潘秀珍 , 王长军. 荚膜唾液酸缺失对2型猪链球菌与人单核细胞相互作用的影响. *免疫学杂志 ( Immunological Journal )* , 2011 , 27 ( 11 ) : 926-930.
- [ 15 ] Vadeboncoeur , N. Segura , M. , Gottschalk , M. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* , 2006 , 47 ( 1 ) : 92-106.
- [ 16 ] Dominguez-Punaro Mde L , Segura M , Contreras I , Lachance C , Houde M , Lecours MP , Olivier M , Gottschalk M. In Vitro Characterization of the Microglial Inflammatory Response to *Streptococcus suis* , an Important Emerging Zoonotic Agent of Meningitis. *Infection and Immunity* , 2010 , 78 ( 12 ) : 5074-5085.
- [ 17 ] Lecours MP , Gottschalk M , Houde M , Lemire P , Fittipaldi N , Segura M. Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and sulysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *The Journal of Infectious Diseases* , 2011 , 204 ( 6 ) : 919-929.
- [ 18 ] Ye C , Zheng H , Zhang J , Jing H , Wang L , Xiong Y , Wang W , Zhou Z , Sun Q , Luo X , Du H , Gottschalk M , Xu J. Clinical , experimental , and genomic differences between intermediately pathogenic , highly pathogenic , and epidemic *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity* , 2009 , 199 ( 1 ) : 97-107.
- [ 19 ] Li M , Shen X , Yan J , Han H , Zheng B , Liu D , Cheng H , Zhao Y , Rao X , Wang C , Tang J , Hu F , Gao GF. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* 2. *Molecular Microbiology* , 2011 , 79 ( 6 ) : 1670-83.

## Capsular saliva acid of *Streptococcus suis* 2 influences virulence and host inflammatory responses

Jie Shi<sup>1,2</sup>, Dan Hu<sup>1</sup>, Jing Zhu<sup>1,2</sup>, Xianyun Zhang<sup>1</sup>, Tianqing Hou<sup>1</sup>, Jingjing Guo<sup>1</sup>, Xiuzhen Pan<sup>1</sup>, Xianfu Li<sup>1</sup>, Changjun Wang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing 210002, China

<sup>2</sup> School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**Abstract:** [Objective] We clarified the pathogenic influence of the absence of *Streptococcus suis* type 2 capsular saliva acid on BLAB/c mice. [Methods] The virulence of the experimental strains were compared; the distribution of strains *in vivo* was determined by quantitative plating. Histopathological analysis was used to qualitatively compare the different pathogenicity of wild strain and knockout strains. ELISA was used to test the levels of cytokine in whole blood cells for the stimulation of strains. [Results] The virulence of mutant strains was significantly reduced, and when the genes were restored, toxicity levels were recovered to that of the wild type strain. The distribution in blood and in the brain between wild strain and knock out strains has significant difference, and *Streptococcus suis* type 2 strains can cause different degrees of brain damage. During the *in vitro* test, the mutant strains can stimulate the whole blood cells to secrete higher levels of MCP-1 and IL-6. [Conclusion] Capsular saliva acid affects bacterial virulence and host cell inflammation response. As an important virulence factor of *Streptococcus suis* type 2, it can damage the blood brain barrier and cause meningitis.

**Keywords:** *Streptococcus suis* 2, capsule, sialic acid, virulence, cytokine

(本文责编:张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170124, 30972638, 81071317, 81171527, 81172794) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011097, BK2010025, BK2010114, BK2010113, BK2011098)

\* Corresponding author. Tel: +86-25-80867004; E-mail: science2008@yahoo.com.cn

Received: 5 December 2011 / Revised: 6 February 2012