

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

49(6): 792 - 798; 4 June 2009

ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

重组猪溶素的生物学活性分析

杜华茂^{1,3}, 许凌峰², 王晓玲³, 李雪梅², 叶长芸³, 徐建国^{3*}

(¹ 西南大学生物技术学院, 重庆 400715)

(² 中国科学院生物物理研究所, 100101 北京)

(³ 中国疾病预防控制中心传染病控制所, 北京 100021)

摘要:【目的】通过研究重组猪溶素(Recombinant Suilysin, rSLY)的生物学活性来分析猪溶素(Suilysin, SLY)在猪链球菌致病过程中的作用。【方法】利用原核表达载体 pET30a(+)表达 SC22 株猪链球菌的猪溶素基因(*sly*), 经 Ni²⁺亲和柱、阴离子交换柱和凝胶过滤纯化获得 rSLY 制品。用微量法测定 rSLY 对人红细胞的溶血效价, 用 LDH 法测定 rSLY 对人外周血白细胞、人胚胎肺源细胞、人胚胎肝细胞和人胚胎心肌细胞的毒性强度, 并用水溶性胆固醇、人血清和特异性抗体阻断 rSLY 的溶血活性。用 Luminex 测定 rSLY 刺激小鼠后血清中前炎性细胞因子的浓度。【结果】我们测得重组猪溶素的溶血效价仅为 0.125 nmol/L, 但 1 nmol/L rSLY 对人外周血白细胞等的细胞毒性强度为 20% ~ 25%。水溶性胆固醇可阻断等摩尔浓度的 rSLY, 人血清样品(游离胆固醇的平均浓度为 1 ~ 2 mmol/L)仅能阻断 1 nmol/L rSLY 的溶血作用。在人血清中添加 15 mg/ml 兔源抗猪溶素 IgG 可使 10 nmol/L rSLY 的裂解强度从 77% 降到 5%, 将猪溶素浓度提高到 100 nmol/L 时, 红细胞裂解强度为 60%。C57BL/6 小鼠经腹腔注射 rSLY 后血清中白介素 6、趋化因子 KC 持续上升, 这与注射牛血清白蛋白的对照组小鼠血清中相应细胞因子浓度有显著性差异。【结论】重组猪溶素不仅能直接损伤宿主细胞还能导致机体产生强烈的炎症反应, 并进而损伤招募到炎症部位的免疫细胞; 血清阻断 rSLY 溶血作用的能力很有限, 特异性抗猪溶素抗体的保护作用表现为剂量依赖性。

关键词: 猪链球菌; 猪溶素; 细胞因子; 胆固醇; 抗体

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0792-07

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种重要的人兽共患病病原, 曾在世界许多养猪国家引起猪链球菌病流行, 疫情期间常有相关从业人员发生机会性感染。自 1968 年报道人间猪链球菌感染以来, 全世界已有 400 余病例, 其中我国有 214 例之多^[1-2]。人和猪在感染发病的临床症状相似: 脑膜炎、心内膜炎、关节炎、肺炎和中毒性休克综合征, 人的预后不良, 多发生失聪, 肾损伤和劳动力丧失。

猪溶素(Suilysin, SLY)是猪链球菌 2 型的一种重

要毒力因子, 能溶解红细胞, 属于依赖胆固醇的溶细胞毒素家簇(cholesterol-dependent cytolysin superfamily, CDCs)成员^[3]。SLY 与 *sly*⁺ 菌株侵袭和裂解上皮细胞有关^[4], 能损伤中性粒细胞, 使 *sly*⁺ 猪链球菌免于被吞噬^[5], SLY 还能刺激人单核细胞、人脑微血管内皮细胞产生高浓度 IL-6, IL-8^[6-8]。但是 Allen, Lun 等分别构建了强毒株 P1/7, 31533 的 *sly* 基因缺失菌株, 但其毒力并未降低^[9-10]; Fabisiak 等调查发现健康猪携带的猪链球菌中有 63% 为 *sly*⁺ 菌

基金项目: 中加联合项目(2008DFA31830); 西南大学博士基金(20700905)

* 通信作者。Tel: +86-10-61739470; Fax: +86-10-61730233; E-mail: xujianguo@icdc.cn

作者简介: 杜华茂(1970-), 男, 四川西充人, 博士, 副教授, 从事细菌蛋白质毒素研究。E-mail: duhamo@swu.edu.cn

收稿日期: 2008-12-04; 修回日期: 2009-03-22

株^[11]。因此猪溶素在感染过程中的作用还有待进一步阐明。本研究克隆并表达了 2005 年四川猪链疫情分离株 SC22 的 *sly* 基因,并在细胞水平和机体整体水平上研究重组猪溶素的生物学活性,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及其培养:猪链球菌 SC22 株分离自休克病人^[2],在 37℃,5% CO₂ 条件下,用 THB 培养基培养猪链球菌。

1.1.2 主要试剂和仪器: Genomic DNA Purification Kit Wizard[®], *Bam*HI, *Xho*I, pET30a (+), mouse-anti-Histag antibody, Rabbit-anti-mouse IgG-HRP (Promega); Ni²⁺ affinity resins, Gel extract kit (QIAGEN), water-soluble cholesterol (sigma)。

1.2 克隆 *sly* 基因

按文献[12]克隆 SC22 株猪链球菌 *sly* 基因。所用引物附加 *Bam*HI, *Xho*I 识别序列, Psly-f: 5'-CCCGGGGATCCATGGTGTAGCAAG-3', Psly-r: 5'-GGCCCTCGAGTTACTCTATCAC-3', PCR 反应条件: 95℃ 5min, 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个反应, 72℃ 延伸 5 min。重组质粒命名为 pET30sly。

1.3 制备重组猪溶素

将质粒 pET30sly 转化大肠杆菌 Rosetta、诱导表达以及镍亲和柱纯化等按文献[12]进行。收集 50 mmol/L、100 mmol/L 咪唑洗脱成分经高压液相层析纯化,更换缓冲液为 10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 后上阴离子交换柱(A 液为 10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0) B 液为 10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 500 mmol/L NaCl), 峰值样品经凝胶过滤纯化,洗脱液为 10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0)。蛋白质样品测定浓度后分装,冻干,保存于 -20℃。

1.4 Western blot 分析

按文献[12]对重组猪溶素进行 Western blot 检测。进行样品经 SDS-PAGE 电泳后电转到硝酸纤维素膜(孔径 0.45 μm),膜经 5% 脱脂奶粉封闭后与抗组氨酸标签的单克隆抗体(1:10000)于 4℃ 孵育过夜,二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG(1:2000)。

1.5 细胞毒性作用

1.5.1 裂解红细胞:将重组猪溶素配制成为 4 nmol/L,经倍比稀释后取 50 μL 各稀释度样品到 96 孔板,每

稀释度作 3 个重复孔,每孔加入 50 μL 2% 人红细胞,混匀后于 37℃ 放置 1 h,肉眼观察红细胞沉集和溶解情况,以 PBS 为低对照。以 50% 红细胞裂解时猪溶素的最低浓度为一个溶血单位^[13]。

1.5.2 裂解有核细胞(LDH 法):选用人外周血白细胞以及人胚胎期心、肝、肺源细胞为研究对象,细胞裂解程度以释放乳酸脱氢酶的量来反映^[14]。人胚胎心肌细胞、人胚胎肝细胞和人胚胎肺细胞(购自协和基础医学细胞中心)用 DMEM(高糖)、20% FBS 于 37℃,5% CO₂ 培养,满瓶后用 0.05% 胰酶、0.02% EDTA 消化传代,将细胞配成 10⁶ 细胞/mL,转入 96 孔细胞板,每孔 100 μL,长满单层后用 PBS 洗涤一次备用。人外周血白细胞用淋巴细胞分离液从人浓缩白细胞液(北京血液中心)制备,经两次 PBS 洗涤后配成 10⁸ 个细胞/毫升的悬液,分装到 96 孔细胞培养板中(50 μL/孔)。

用 DMEM 配制重组猪溶素为 1 nmol/L,每孔加 50 μL,每个浓度作 3 个重复孔,每次试验设高对照含 2% Tritone-100 的 DMEM,低对照为 DMEM。于 37℃ 孵育 1 h,1000 × g 离心 30 min,吸取 50 μL 培养液到另一新 96 孔板中,加 50 μL LDH 反应液(避光),15min 后测定 A₄₉₀ 值。计算细胞毒性强度(裂解程度) = (A₄₉₀ 试验 - A₄₉₀ 低对照) / (A₄₉₀ 高对照 - A₄₉₀ 低对照) × 100%。所有试验重复 3 次。

1.6 阻断作用

1.6.1 水溶性胆固醇的阻断作用:用 PBS 将水溶性胆固醇配制成系列浓度: 2 nmol/L, 1 nmol/L, 0.5 nmol/L, 各取 50 μL 与等体积 2 nmol/L 重组猪溶素混合,每个组作 12 管,放置于 37℃。每个试验组分别于作用后 1、2、3、4 h 取出 3 管加入 2% 红细胞悬液,再于 37℃ 孵育 1 h。经 800 × g 离心 10min,上清液转入敏标板测定 A₅₉₅ 值,以确定血红蛋白释放量^[13]。

1.6.2 抗体的阻断作用:为了模拟感染过程中猪溶素的毒性作用及可能的保护方式,进行了含特异性抗体血清的阻断作用试验。将数分人血清等量混合,56℃ 灭活 30min 后分为四组,加兔抗重组猪溶素 IgG^[15] 至终浓度 3 μg/mL, 30 μg/mL, 以 PBS 为 0% 裂解对照,以 2% Triton-100 为 100% 裂解对照。将血清样品再各分成 3 份,分别与 2 nmol/L, 20 nmol/L, 200 nmol/L 重组猪溶素溶液等量混合后立即加入 2% 红细胞悬液,再于 37℃ 孵育 1 h。经 1000 × g 离心 10 min,上清液转入敏标板测定 A₅₉₅ 值。红细胞裂

解程度按公式计算:裂解度 = $(A_{595} \text{ 试验组} - A_{595} \text{ 低对照}) / (A_{595} \text{ 高对照} - A_{595} \text{ 低对照}) \times 100\%$ [13]。

1.7 刺激小鼠发生炎症反应

将 10 只 C57BL6 小鼠,随机分为两组,于腹腔注射 60 μg 重组猪溶素,对照组注射等量的 BSA。注射后 1、3、5 h 从尾静脉采血并分离血清。血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 KC 等细胞因子浓度用 Luminex 100 测定,测定方法按说明书进行。

1.8 数据统计分析

计算各试验的平均数及标准差,经 t 检验。

2 结果

2.1 克隆与表达

以猪链球菌 SC22 株的染色体 DNA 为模板,PCR 反应扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶显示为约 1.5 kb,重组质粒 pET30sly 经 BamHI- XhoI 双酶切得到与 PCR 产物一样大小的片段,核苷酸序列测定表明克隆片段长 1494bp,与 DQ410882 序列一至。

含表达质粒 pET30sly 的重组 *E. coli* Rosetta 经 IPTG 诱导后在培养液中检测到溶血活性。菌体裂解物经镍亲和柱层析后,50 mmol/L、100 mmol/L 咪唑洗脱液经 SDS-PAGE 检测结果如图 1-A。两样品经离子交换、分子筛纯化后,针对 His-Tag 的 Western

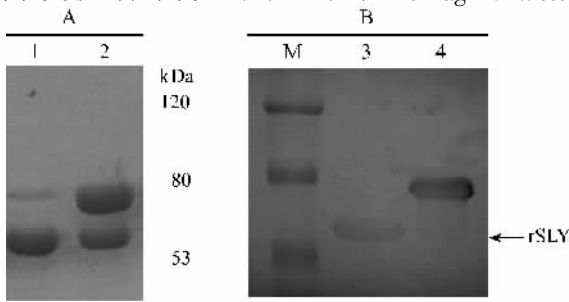


图 1 SDS-PAGE 和 Western blot 检测重组猪溶素

Fig.1 SDS-PAGE (A), Western bolt (B) analysis of rSly. The recombinant *E. coli* Rosetta (pETsly) was cultured in LB at 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 rpm. The cells were collected 4 h after inducing with 1 mmol/L IPTG. Cellular lyses were flowed through Ni $^{2+}$ affinity resins column. Recombinant protein was eluted with imidazole solution after a washing procedure. Protein samples were run on the 12% SDS-polyacrylamide gel, then one gel was dyed with comasmin (A), the parallel gel was detected by western blot assay (B). The first antibody was McAb against His*Tag which was diluted in 1:10000, and the second antibody was rabbit-anti-mouse IgG conjugated with RHP diluted in 1:2000. Lane 1, 3: samples eluted with 50 mmol/L imidazole solution, Lane 2, 4: samples eluted with 100 mmol/L imidazole solution, M: prestained dual color molecular standard.

blot 检测结果如图 1-B。

2.2 细胞毒性

利用微量法在 V 形板上测定了 rSly 的溶血效价,当 rSly 为 0.125 nmol/L 约 50% 细胞裂解。本文还比较了人外周血白细胞、人胚胎肝细胞、人胚胎肝细胞和人胚胎心肌细胞的毒性作用,结果是在 1 nmol/L 重组猪溶素对以上细胞的毒性强度没有差异,为 20% ~ 25%。显然,对于重组猪溶素的溶细胞作用,红细胞比有核细胞更敏感。

2.3 浓度依赖性阻断作用

本实验考查了水溶性胆固醇与 rSly 结合的可逆性,在 1 ~ 4 h 内,肉眼可见在胆固醇与 rSly 的摩尔比例为 1:1 时没有发生溶血,两者比例为 1:2 时有少量红细胞裂,当两者的摩尔比为 1:4 时有大量红细胞溶解。从测定各组的 OD_{595} 值可以看出,1 ~ 4 h 内胆固醇与重组猪溶素的结合保持动态性,但血红素的释放量无显著性差异(图 2)。

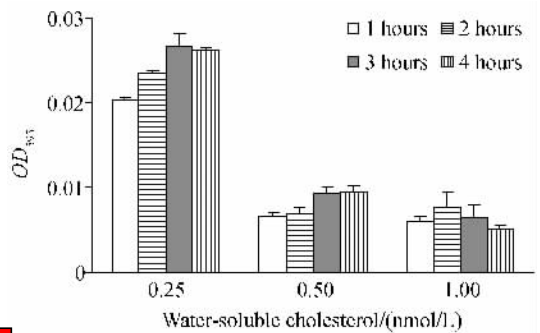


图 2 水溶性胆固醇阻断 1 nmol/L rSly 的溶血作用

Fig.2 Water-soluble Cholesterol blocks the hemolytic activity of 1 nmol/L rSly. The solution of 2 nmol/L, 1 nmol/L, and 0.5 nmol/L of water-soluble cholesterol was mixed with 2 nmol/L of rSly, respectively, and the samples had been kept at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1, 2, 3, and 4 hours before 2% of RBC was added. The samples were left at 37 $^{\circ}\text{C}$ for another 1 hour after the addition of RBC. The supernatant was transferred to a new 96-well plate. A595 value was measured to calculate the amount of hemoglobin released.

在体外模拟感染过程的试验中,血清/特异性 IgG 没有与 rSly 预作用 1 h,而直接加入红细胞,结果发现人血清对 1 nmol/L 重组猪溶素有完全阻断作用,但不能阻断 10 nmol/L、100 nmol/L rSly 的溶血作用。当 rSly 的浓度为 10 nmol/L 时,红细胞裂解度为 77%,在血清中加入 1.5 mg/mL IgG 后裂解度降到 20%,加入 15 mg/mL IgG 后裂解度降到 5% 以下。然而抗体的保护作用也有限度,当 rSly 浓度达 100 nmol/L 时,即使人血清中含 15 mg/mL IgG 红细胞裂解度也高达 66% (图 3)。

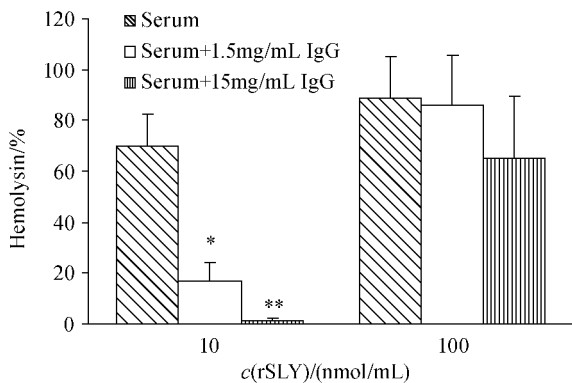


图3 特异性抗体及血清胆固醇抑制溶血活性

Fig. 3 Inhibit effects of antibody and serum cholesterol against Suiysin. Rabbit anti-SLY IgG was added to the human serum to a final concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The sera were mixed with 2 nmol/L, 20 nmol/L, 200 nmol/L of rSLY in an equal volume, respectively, before the addition of 2% Human red blood cell. Samples were then kept at 37°C for 1 hour, and A595 value was measured to detect the amount of hemoglobin released. Two controls were conducted with PBS and 2% Triton-100, respectively. The Hemolytic ratio was calculated as: $((\text{TestA595} - \text{A5950}) / (\text{A595100} - \text{A5950})) \times 100\%$. Sera from three health persons were tested in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 重组猪溶素导致炎症反应

给 6 周龄 C57BL/6 系小鼠腹腔注射相同剂量的 rSLY 和牛血清白蛋白(BSA)后引起不同的反应。注射 BSA 组小鼠精神状态、采食、活动等各方面均无异常表现,小鼠血清中 IL-6, KC 炎症细胞因子表现为先小幅上升后恢复正常,具体是在注射后第 1 小时 IL-6 上升到 94.1 pg/mL (40.4 ~ 198.8 pg/mL)(图 4-A),趋化因子 KC 上升到 388.9 pg/mL (182.9 ~ 471.6 pg/mL),第 3 小时所测值下降,到第 5 小时分别为 52pg/mL (11 ~ 116.5 pg/mL),203 pg/ml (49.2 ~ 358.3 pg/mL)(图 4-B)。注射 rSLY 组小鼠精神沉郁,打堆、少动,不食,采血时感到尾根、耳朵发冷。IL-6 和 KC 浓度在 1~5 小时内呈上升趋势,IL-6 平均浓度从 233.1pg/mL (13.7 ~ 732.3 pg/mL) 上升到 1298 pg/mL (580.3 ~ 2363.8 pg/mL) (图 4-A),趋化因子 KC 平均浓度从 596.9 pg/mL (28.1 ~ 1676.5 pg/mL) 上升到 1573.5 pg/mL (118.5 ~ 2107.3 pg/mL)(图 4-B)。两组的 IL-1 β , TNF- α 水平没有统计学意义的变化。试验结果说明注射 rSLY 导致了很强的炎症反应。实验同时注意到,小鼠间的炎症反应强度表现出一定的差异。

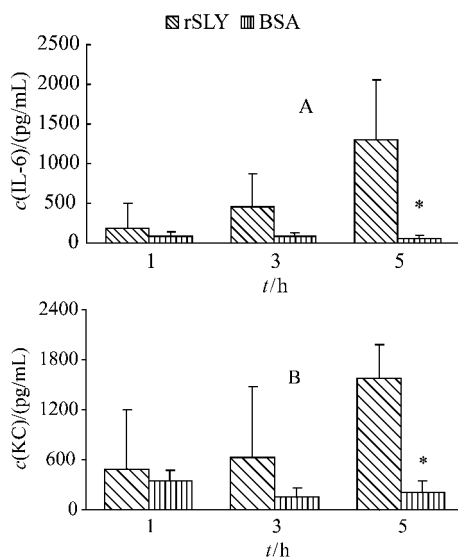


图4 rSLY 刺激小鼠炎症反应

Fig. 4 Inflammatory induced by administration of rSLY. C57BL/6 mice (SPF level) were inoculated i. p. with 0.5ml PBS buffer (pH7.2) containing 60 μg rSLY or BSA, serum were collected at 1, 3, and 5 hours post-treatment. The concentration of IL-6 (A), KC (B), IL-1 β , and TNF- α was measured by Luminex 100. Data of IL-1 β and TNF- α were not shown here as there was no observable change. * $P < 0.05$.

3 讨论

3.1 猪链球菌的致病性与猪溶素的关系

目前从猪、牛、病人体内分离到猪链球菌共有 35 个血清型,用多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)可分为 92 个型(Sequence Type),致病性菌株主要是血清 2 型,分布于 ST1 群中^[13]。但即使如此,与猪链球菌致病相关的基因还不很明确,先后有数十个基因及相应的蛋白质为科学家们关注过^[1]。猪溶素(Suiysin, SLY)是自溶菌酶释放相关蛋白(Muramidase release protein, MRP)和细胞外蛋因子(Extracellular factor, EF)之后第 3 个在致病性猪链球菌中被发现毒力相关因子,属于胆固醇依赖性溶细胞毒素家族(cholesterol-dependent cytolysin superfamily, CDCs)成员。CDC 家簇毒素以“打孔”的方式裂解靶细胞^[3]。Jacobs 等(1996)用纯化的 SLY 免疫过的小鼠和仔猪后用 P1/7 菌株攻击,结果发现经 SLY 免疫过的猪在 P1/7 攻击后仅出现一过性症状,心脏、肺、跗关节都没有分离到细菌,而两个对照组的猪都出现猪链球菌病的临床症状,两头猪为脑膜炎^[14]。然而两个独立的实验室用构建的 *sly* 缺失株所作的动物试验并不支持以上结果。Allen(2001)构建了 P1/7 的 *sly* 缺失株, Lun (2003) 构建了北美菌株 SX332、欧洲菌株 31533 的 *sly* 缺失株,分别用

10^6 CFU 攻击仔猪, 试验表明所有缺失株的毒力并没有下降^[9-10]。Jacob 所做的动物免疫保护试验及 Allen 等的基因缺失菌株毒力试验结果不一致, *sly*⁻致病性菌株(比如 89-1591)的存在^[16]、健康猪携带菌中有 63% 含 *sly* 基因等^[11], 使得人们怀疑 SLY 是一个重要的毒力因子。因受动物保护条例的影响, Allen 和 Lun 的动物试验攻击剂量较低(10^6 CFU), 没有复制出临床急性病例, 作者认为在这个菌量下, 产生的猪溶素是有限的, 体现不了猪溶素对致病力的影响。其二, 在相同的剂量下(3×10^8 CFU), 攻击 89-1591 的 C57BL/6 小鼠在 48h 以后死亡, 而攻击表达 SLY 的 SC22 株在 24 h 内死亡(资料未发表), 说明猪溶素对致病力不是没有影响。再则, Lun(2005)发现猪溶素基因存在复杂的表达调控机制, 因此携带 *sly* 基因的“非致病性”菌株是否与此有关, 还不得而知。在这种情况下, 我们研究了重组猪溶素(rSLY)的生物学活性, 企图找到与致病相关的更直接的证据。

3.2 猪溶素的细胞裂解活性与炎性刺激作用

本实验用体外试验结果可知, 0.125 nmol/L rSLY 可致 50% 红细胞裂解, 1 nmol/L rSLY 对外周血白细胞及肝细胞、肺细胞等有核细胞的毒性强度为 20% ~ 25%, 说明猪溶素在低浓度下对真核细胞表现出普遍的毒性作用, 其中红细胞对猪溶素最敏感。猪溶素的这种普遍性溶细胞毒性作用是否与猪链球菌感染死亡病例的肝、肾、脾、心等器官的实质细胞发生变性、坏死有关, 还有待进一步研究, 但临床病例中描述的“凝血机制不全”应该是猪溶素的溶血作用造成的^[17-18]。猪溶素损伤外周血白细胞, 特别是杀死中性粒细胞并干扰补体依赖性杀伤作用可使猪链球菌避免了免疫杀伤^[5]。猪溶素的另一个生物学效应表现为炎症反应。小鼠经腹腔注射 rSLY 后的 1 ~ 5 h 内, IL-6 和趋化因子 KC 持续上升, 到第五 h, IL-6 平均为 1298 pg/mL, 最高达到 2360 pg/mL; KC 平均达到 1573.5 pg/mL, 最高值约 2100 pg/mL, 这种效应是 rSLY 损伤机体细胞后引起的炎性反应, 还是 rSLY 的直接作用结果呢? Segura 的实验表明猪溶素本身具有炎性刺激作用, 他们用人单核细胞、人脑微血管上皮细胞检测纯化的 SLY 和猪链球菌的其它组份刺激前炎性细胞因子的能力, 结果发现 SLY 作用强于细胞壁成分和荚膜多糖, 与全菌的炎性刺激作用相当^[6-7]。在 2005 年四川猪链球菌疫情期间, 医院收治病人的临床记录显示病人白细胞进行性升

高($10 \sim 30 \times 10^9$ /L), 中性粒细胞比重上升(最高达 0.93), 死亡病例的血白细胞计数低于存活病例^[17]。由此可以推测, 猪溶素通过刺激机体产生前炎性细胞因子将免疫细胞招募到炎症部分, 又通过细胞裂解作用将其大量杀伤, 从而损伤机体天然免疫系统, 猪链球菌得以生存并大量繁殖, 产生更多的毒素。

血清中 IL-6 水平也与病人预后相关。Hack 等(1989)发现血清中 IL-6 低于 40U/mL 的病人能存活, 如果高于 7500 U/mL, 89% 病人因休克而死亡^[19]。金益人等(2001)观察到血清 IL-6 高于 1400 pg/mL 的 5 个婴儿都死亡^[20]。因此 rSLY 单一因子刺激小鼠产生约 1300 pg/mL IL-6 是致病性的一种表现。

3.3 阻断猪溶素的毒性作用

引起我们关注另一个问题是如何阻断猪溶素的毒性作用。科学家们很早就发现胆固醇与“疏醇活化毒素”预孵育后能阻断其溶血作用, 并将这类毒素由“疏醇活化毒素”改名为“胆固醇依赖性溶细胞毒素”。Jacobs 等(1998)发现 LLO 与胆固醇预育后不影响其结合到细胞膜上, 胆固醇能阻止 LLO 在细胞膜上的寡聚化过程^[21]。在人和动物血液中有了一定浓度的游离胆固醇, 可能是猪溶素的天然阻断剂。人血液中总胆固醇的含量为 2.86 ~ 5.7 mmol/L, 其中三分之一为游离胆固醇^[22]。为了模拟人感染猪链球菌后血清胆固醇可能的保护作用, 本研究没有将血清与 rSLY 预作用 1 h, 而直接加入红细胞, 结果表明人血清能完全阻断 1 nmol/L rSLY 的溶血作用, 但对 10 nmol/L rSLY 的阻断作用很弱。目前尚不清楚在猪或人感染猪链球菌后体内猪溶素的浓度, 但在体外培养条件下(按 1% 比例接种), 6 h 后培养液中猪溶素达到 0.125 nmol/L, 10 h 为 4 nmol/L, 过夜培养后达到 32 nmol/L[△]。因此, 有理由相信, 最初感染猪链球菌的数量决定猪溶素的表达量, 并在很大程度上决定疾病的发生与发展。猪溶素在体内的表达水平一旦超过血清的保护域值, 将对血液细胞特别是中性粒细胞进行杀伤, 并导致一系列的生理病理反应。因此, 血清胆固醇、猪溶素、中性粒细胞与猪链球菌间存在复杂的动态关系, 相互影响。我们推测, 当猪链球菌侵入组织后, 在那里没有血清胆固醇的保护, 猪溶素得以更直接地损伤细胞。

特异性抗体具有中和毒素的作用, 在很多细菌性感染中得以应用。本实验考查了特异性 IgG 对 rSLY 的中和作用, 在血清中添加 1.5 mg/mL 特异性

IgG, 可使 10 nmol/L 猪溶素对红细胞的裂解度降到 20%, 添加 15 mg/mL IgG 后降到 5% 以下。但对于 100 nmol/L rSLY, 用 15 mg/mL IgG 也很难阻断, 事实上猪链球菌在局部的繁殖不可能产生如此高浓度的猪溶素。Jacobs(1996)首次证明了猪溶素的免疫保护作用^[14], 王华等(2007)再次重复出这种保护作用^[23], 原因可能就在于特异性抗体中和猪溶素, 使得免疫细胞保持正常功能, 也没有过高的 IL-6 扰乱, 机体才能与猪链球菌相抗衡。

然而这些似乎不能解决猪链球菌的所有问题, 抗猪溶素抗体对 89-1591 是无效的, 这株菌有何种特殊的致病机理? 仍然是个谜。

致谢 本研究过程中, 中国疾病预防控制中心传染病所的王蕾博士为细胞毒性实验提供了技术支持, 孙强正博士和宫照龙博士慷慨献血, 西南大学的谢和芳教授对英文提出宝贵的修改意见, 在此一并致谢。

参考文献

- [1] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary Microbiology*, 2000, 76: 259 – 272.
- [2] Ye CY, Zhu X, Jing H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Disease*, 2006, 12: 1203 – 1208.
- [3] Shimizu T, Hayashi H. [Molecular mechanism of membrane pore formation with cholesterol binding cytolysin: streptolysin O and perfringolysin O]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2001, 46: 532 – 539.
- [4] Norton PM, Rolph C, Ward PN, et al. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 1999, 26: 25 – 35.
- [5] Chabot-Roy, Willson GP, Segura M, et al. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microbial Pathogenesis*, 2006, 41: 21 – 32.
- [6] Segura M, Stankova J, Gottschalk M. Heat-killed *Streptococcus suis* capsular type 2 strains stimulate tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by murine macrophages. *Infection and Immunity*. 1999, 67: 4646 – 4654.
- [7] Segura M, Vadeboncoeur N, Gottschalk M. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clinical Experimental Immunology*, 2002, 127: 243 – 254.
- [8] Vadeboncoeur N, Segura M, Numani DA, et al. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 35: 49 – 58.
- [9] Allen AG, Bolitho S, Lindsay H, et al. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infection and Immunity*, 2001, 69: 2732 – 2735.
- [10] Lun S, Perez-Casal J, Connor W, et al. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 34: 27 – 37.
- [11] Fabisiak M, Kita J, Jedryczko R, et al. Prevalence of the suilysin gene in *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2005, 8: 141 – 145.
- [12] J. 莎姆布鲁克. 分子克隆实验指南. 黄培堂 等译, 第三版, 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] King SJ, Leigh JA, Heath PJ, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40: 3671 – 3680.
- [14] Jacobs AA, Van Den Berget AJ, Loeffen PL. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Veterinary Record*, 1996, 139: 225 – 228.
- [15] 杜华茂. 2005 年猪链球菌的病原学诊断及猪溶素的功能研究. 中国疾病预防控制中心博士论文, 2007.
- [16] Berthelot-Herault F, Gottschalk M, Morvan H, et al. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2005, 69: 236 – 240.
- [17] 祝小平, 欧阳兵, 祖荣强 等. 四少省人感染猪链球菌病死亡病例特征分析. *中华流行病学杂志*, 2006, 26(9): 633 – 635.
- [18] 杨维中, 余宏杰, 景怀琦, 等. 四川省一起伴中毒性休克综合征的人感染猪链球菌 2 型暴发, *中华流行病学杂志*, 2006, 27(3): 185 – 191.
- [19] Hack CE, DeGroot ER, Felt-Bursma RJF, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*, 1989, 74: 1704 – 1710.
- [20] 金益人, 江志雄, 徐林宝, 等. 新生儿严重细菌感染白介素-6 水平变化及临床意义. *中国儿童保健杂志*. 2001, 9(2): 102 – 104.
- [21] Jacobs T, Darji A, Frahm N, et al. Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(6): 1081 –

- [22] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程.第三版.南京:东南大学出版社,2006. 达蛋白对 BALB/C 小鼠的免疫保护性评价.中国兽医学,2007,37(10):863-866.
- [23] 王华,王君玮,陈义平,等.猪链球菌 2 型三种重组表

Biological profiles of recombinant Suiysin

Huamao Du^{1,3}, Lingfeng Xu², Xiaoling Wang³, Xuemei Li², Changyun Ye³, Jianguo Xu^{3*}

⁽¹⁾College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

⁽²⁾Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

⁽³⁾National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China)

Abstract: [Objective] To provide insights into the role of Suiysin in the pathogenesis of *Streptococcus suis* by analysing the biological profiles of recombinant Suiysin (rSLY). [Methods] *sly* gene of *S. suis* strain SC22 was cloned into pET30a(+) vector and overexpressed in *E. coli* Rosseta, and rSLY was purified with Ni²⁺ affinity chromatography, anion exchange chromatography and gel filtration. The hemolytic unit of rSLY was measured with human red blood cells. The cellular toxicity of rSLY to human peripheral white blood cell and cells derived from fetal heart (HEH), liver (HEL), kidney (HEK), lung (HPL) was detected by lactate dehydrogenase (LDH) release assay. The blocking effects of water-soluble cholesterol, serum and specific antibody on the hemolytic activity of rSLY were detected. The amount of proinflammatory cytokines in the serum of mice stimulated by rSLY was measured by Luminex-100. [Results] The hemolytic unit of rSLY was 0.125 nmol/L, but the cellular toxicity of 1 nmol/L rSLY to human peripheral white blood cell, HEH, HEL, HEK and HPF was 20% ~ 25%. The hemolytic activity of rSLY was blocked completely by equal molar of water-soluble cholesterol. Human serum containing 2.8 mmol/L ~ 5.7 mmol/L of cholesterol in physical condition, could merely blocked 1 nmol/L of rSLY to lyse erythrocytes. The human serum with the addition of rabbit anti-rSLY IgG to a final concentration of 15mg/ml decreased the hemolysis by 10nmol/L rSLY from 77% down to 5% successfully, but hemolysis remained 60% when tested with 100nmol/L rSLY. Although IL-1 β and TNF- α didn't display any observable change, the level of interleukin -6 (IL-6) and KC were increased continually in C57BL/6 mice injected intraperitoneumly with rSLY whereas the IL-6 and KC level of mice in the control group only increased slightly and quickly decreased. [Conclusion] The data suggest that rSLY could not only lyse cells but also induce strong inflammatory response and damage immune cells recruited to the sites of inflammation. This finding implies that serum could provide light protection against rSLY, and specific antibody show a concentration-dependent protection.

Keywords: *Streptococcus suis*; suiysin; cytokines; cholesterol; antibody

(本文责编:王晋芳)