

祝昊丹,倪艳秀,茅爱华,等. 丝氨酸/苏氨酸激酶对猪链球菌 2 型应激和毒力的影响[J].江苏农业学报,2016,32(3):593-600.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.017

## 丝氨酸/苏氨酸激酶对猪链球菌 2 型应激和毒力的影响

祝昊丹, 倪艳秀, 茅爱华, 周俊明, 俞正玉, 吕立新, 何孔旺

(江苏省农业科学院兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014)

**摘要:** 为阐明丝氨酸/苏氨酸激酶(STK)对猪链球菌 2 型强毒株的应激耐受和毒力的影响,比较了亲本株 SS2-1 及其丝氨酸/苏氨酸激酶基因缺失株  $\Delta stk$  在各种应激环境(热、酸、氧化应激和高渗应激)中的生长能力,利用 HEp-2 细胞模型比较各菌株的黏附能力,比较各菌株在猪全血中的存活能力,利用仔猪模型评价 STK 基因缺失前后细菌的毒力差异。结果表明,丝氨酸/苏氨酸激酶基因缺失后,细菌在各种应激环境中的生存能力明显减弱,对 HEp-2 细胞的黏附能力减弱,在猪全血中的存活能力显著降低,对仔猪的致病力明显降低。此外,缺失株  $\Delta stk$  在仔猪体内各器官的定殖能力也显著降低。说明丝氨酸/苏氨酸激酶与猪链球菌的应激和毒力密切相关。

**关键词:** 猪链球菌 2 型; 丝氨酸/苏氨酸激酶; 应激; 毒力

中图分类号: S858.285.1<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)03-0593-08

## The impact of serine/threonine kinase on stress response and virulence of *Streptococcus suis* type 2

ZHU Hao-dan, NI Yan-xiu, MAO Ai-hua, ZHOU Jun-ming, YU Zheng-yu, LYU Li-xin, HE Kong-wang  
(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To investigate the effect of serine/threonine kinases (STK) in *Streptococcus suis* type 2 virulent strain on stress tolerance and virulence, the growth characteristics of wild type SS2-1 and STK-deletion strain  $\Delta stk$  were compared under different stress conditions (high temperature, acidic pH, oxidative stress, and high osmolarity.) *in vitro*. The  $\Delta stk$  mutant showed defects in their ability to grow under various stress conditions, compared to the wild-type strain. The  $\Delta stk$  exhibited a significant decrease in HEp-2 cell adhesion, and a reduced survival rate in whole blood. In the piglet model, the  $\Delta stk$  also showed a weak virulence compared to wild-type strain. The *in vivo* colonization experiments revealed that the mutant strain  $\Delta stk$  displayed reduced bacterial colonization in the tissues of piglets. These results suggest that the STK is closely related to the stress response and virulence of SS2.

lated to the stress response and virulence of SS2.

**Key words:** *Streptococcus suis* type 2; serine/threonine kinase; stress tolerance; virulence

收稿日期:2015-10-26

**基金项目:** 国家博士后基金项目(2012M521026);国家自然科学基金项目(31302114);公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303041);江苏省自主创新探索性研究项目[CX(14)5042]

**作者简介:** 祝昊丹(1983-),女,黑龙江哈尔滨人,博士,主要从事人畜共患病防控技术研究。(Tel) 025-84390988; (E-mail) zhuhaodan0311@126.com

**通讯作者:** 何孔旺, (Tel) 025-84390748; (E-mail) kwh2003@263.net

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是引起猪链球菌病的主要病原,也是一种重要的人畜共患病原。根据荚膜多糖抗原性的差异,猪链球菌分为 33 个血清型<sup>[1-6]</sup>,其中 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)最为常见,毒力最强,危害最严重。猪链球菌不仅引

起猪的脑膜炎、败血症、关节炎、肺炎及急性死亡,也可感染人,引起脑膜炎、中毒休克综合征及死亡。1998 年江苏省和 2005 年四川省暴发了由 SS2 引起的人及猪的链球菌病,引起了全世界的关注<sup>[7-8]</sup>。近年来,越南和泰国等东亚国家相继报道了人感染 SS2 并死亡的病例<sup>[9]</sup>。猪链球菌不仅对养猪业造成重大经济损失,也给公共卫生和食品安全带来严重威胁。

与其他致病菌一样,在感染过程中,SS2 通过信号传导系统感知复杂多变的宿主体内环境,调节各种相关基因的表达,以达到在宿主体内生存、繁殖和致病的目的。研究发现,细菌中的信号传导网络除了经典的双组份系统(TCS)外,也存在真核生物样的丝氨酸/苏氨酸激酶(Serine-threonine kinase, *STK*)和磷酸酶(Serine/threonine phosphatase, *STP*)。*STK/STP* 通过对靶蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基的磷酸化/去磷酸化,调控细胞内的各种生命活动,如细菌的生长、分化、细胞壁的生物合成、应激反应、代谢途径、自溶、黏附宿主细胞和毒力等<sup>[10-22]</sup>。化脓链球菌的丝氨酸/苏氨酸激酶(*SP-STK*)基因缺失后,细菌在液体培养基中生长时有下沉趋势;细菌对上皮细胞的黏附能力降低和抵抗吞噬细胞能力显著降低<sup>[13,19]</sup>。肺炎链球菌的丝氨酸/苏氨酸激酶(*StkP*)能够促进细菌在体内的停留;*StkP* 能够调节肺炎链球菌基因组接近 4% 的基因转录,包括细胞壁的生物合成、氧化应激、DNA 修复、铁摄取、嘌呤和嘧啶代谢相关基因等<sup>[23]</sup>。

作为一种重要的人兽共患病原菌,猪链球菌是否也受 *STK* 的调控,值得探讨。因此,在前期试验中,利用大肠杆菌-猪链球菌穿梭质粒 pSET4s 构建了 SS2 强毒株 SS2-1 的丝氨酸/苏氨酸激酶(*SsSTK*)基因缺失株  $\Delta stk$ ,利用 CD1 小鼠感染模型评价了 *SsSTK* 基因缺失前后细菌的毒力变化<sup>[24]</sup>。本研究旨在评价丝氨酸/苏氨酸激酶基因缺失后,SS2 在各种应激环境中的生长能力及对仔猪致病力,探讨猪链球菌 2 型中丝氨酸/苏氨酸激酶与细菌应激和毒力的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、试剂和引物

猪链球菌 2 型强毒株 SS2-1,1998 年分离自江苏患病猪体。丝氨酸/苏氨酸激酶基因缺失株  $\Delta stk$

在前期试验中构建<sup>[24]</sup>。SS2 菌株用 THB (Todd-Hewitt broth, BD, USA) 或 THY (THB+2% Yeast Extract) 液体和 5% 绵羊血 THB 平板 37 °C 培养。细菌 RNA 提取试剂盒为 OMEGA 公司产品。逆转录试剂盒和荧光定量 RT-PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司产品。荧光定量所用引物(表 1)由上海 Invitrogen 公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequences

引物	引物序列 (5'→3')
16SrRNA-1	GTTGCCAACGGGTGAGTAA
16SrRNA-2	TCTCAGGTGGGCTATGTATCG
GAPDH-1	CTTGTAATCCCAGAATTGAACGG
GAPDH-2	TCATAGCAGCGTTACTTCTTCAGC
FBPS-1	GGTGGCCCAGCAGGCCAATG
FBPS-2	CCGCCAATCCCTGCTCTGTC
MRP-1	GTTGAGCAAGTTGAAGCGCA
MRP-2	GGTACCTTCGCCATCACAA
EF-1	AGGCTGCTAAGGATGCCGTTCG
EF-2	CGCCTACTGCTTCTGCACTGTCC
IMPDH-1	TCGACCAACATGACAAGCGA
IMPDH-2	ATCCTTCGCAGCATTTGGGA
SsnA-1	TGCCTTTGCTCAAGCTCTTCGTG
SsnA -2	TGCCTTTTACTGTGCCCAGGCCA
SspA-1	TGACCAGGCAGTTGAAGCAGCG
SspA-2	TGCCTGAGCGCTTGTCAGAACG
Sly-1	TGATGAACCAGAATCTCCAAGCAAG
Sly-2	GTCTTGATACTCAGCATTTGCCACTA
SodA-1	GTAAGAAACAATGACCCTTCACCAC
SodA-2	GCAAAGCAATTCAGAAAAGAGCA
Ad-1	TGCCTTTGCTCAAGCTCTTCGTG
Ad-2	TGCCTTTTACTGTGCCCAGGCCA
OppuABC-1	CAGAGTCGCCGTTCCGATAA
OppuABC-2	GGAACCTTGCCAGCAGTAGT

### 1.2 *SsSTK* 对 SS2 应激能力的影响试验

1.2.1 热应激试验 分别挑取亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta stk$  单菌落于 5 ml 不含抗生素的 THY 液体培养基中,过夜培养。用 10 ml 新鲜 THY 液体培养基调整各细菌浓度到  $OD_{600}$  为 0.1,分别放在 37 °C 和 40

℃温箱培养 12 h。取 100  $\mu\text{l}$  菌液进行 10 倍连续稀释,取各种稀释倍数的菌液 100  $\mu\text{l}$  涂布于 THY 平板,37 ℃ 孵育 24 h 后进行菌落计数。每组设立 2 个重复,试验重复 3 次。比较缺失株和亲本株对热应激的差异。

**1.2.2 酸应激试验** 分别收集对数生长中后期的亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta\text{stk}$  菌液于 4 ℃、4 000  $g$  离心 10 min,甘氨酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.0)洗 1 次。然后用不同 pH 的 THY 液体培养基重悬菌体,37 ℃ 孵育 45 min。取 100  $\mu\text{l}$  菌液进行 10 倍连续稀释,取各种稀释倍数的菌液 100  $\mu\text{l}$  涂布于 THY 平板,37 ℃ 孵育 24 h 后进行菌落计数。每组设立 2 个重复,试验重复 3 次。比较缺失株和亲本株对酸的耐受能力差异。

**1.2.3 氧化应激试验** 亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta\text{stk}$  培养至对数生长中期,分别在终体积为 1 ml 的 THY 液体培养基中加入  $1 \times 10^7$  CFU 的细菌和一定浓度(40 mmol/L 和 80 mmol/L)的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,混匀后室温共孵育 20 min,同时设立不含  $\text{H}_2\text{O}_2$  的对照。取 100  $\mu\text{l}$  菌液进行 10 倍连续稀释,取一定稀释倍数的菌液 100  $\mu\text{l}$  涂布于 THY 平板,37 ℃ 孵育 24 h 后进行菌落计数。每组设立 3 个重复,试验重复 3 次,比较缺失株和亲本株对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的敏感性差异。

**1.2.4 渗透压应激试验** 收集过夜培养的亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta\text{stk}$  细菌培养物,分别用含有 0.4 mol/L NaCl 的 THY 液体培养基和不含 NaCl 的 THY 液体培养基调整各细菌浓度至  $OD_{600}$  到 0.2。每次在无菌条件下取 1 ml 菌液,每隔 1 h 利用分光光度计测量培养物在 600 nm 波长下的  $OD$  值,连续测量 8 h。每组设立 3 个重复,试验重复 3 次,比较  $\text{STK}$  基因缺失株和亲本株在不同渗透压环境中的存活能力。

### 1.3 $\Delta\text{sSTK}$ 对 SS2 毒力的影响试验

**1.3.1 细胞黏附试验** HEp-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基复苏,在 37 ℃、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养传代,进行细菌黏附试验前 12 h 将细胞转接到 24 孔培养板。将对数生长中后期的亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta\text{stk}$  用 1640 培养基稀释至合适的浓度,将 1 ml 菌液(约  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml)加入到长满单层 HEp-2 细胞的 24 孔板中,将细胞板置于 37 ℃ 孵育 90 min,吸掉培养液, PBS 洗涤 3 次。24 孔板中加入 200  $\mu\text{l}$  含 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% EDTA 的 PBS 洗脱细胞。向洗脱的细胞中加入 800  $\mu\text{l}$  含 0.025% TritonX-100 的

PBS 破碎细胞。取 100  $\mu\text{l}$  细胞破碎液进行 10 倍连续稀释,取各种稀释倍数的细胞破碎液 100  $\mu\text{l}$  涂布于 THY 平板,37 ℃ 过夜生长后计算菌落数量,比较不同菌株对 HEp-2 细胞黏附的差别。

**1.3.2 全血存活试验** 采集健康猪血,酶联免疫试验检测为 SS2 阴性,按照 Bonifait 等的方法<sup>[25]</sup>进行全血存活试验。将 SS2 各菌株培养至稳定期早期,4 ℃、11 000  $g$  离心 10 min 收集菌体,用 RPMI 1640 将其稀释到  $OD_{600}$  为 0.1,取 1 ml 猪全血、300  $\mu\text{l}$  抗 SS2 血清和 100  $\mu\text{l}$  菌液混合,37 ℃ 孵育 2 h,分别收集感染 0 h 和 2 h 的全血混合物,10 倍连续稀释,取合适稀释倍数的混合液 100  $\mu\text{l}$  涂于 THY 平板,37 ℃ 培养 24 h 后进行细菌计数。将 0 h 的菌落数作为 100%。试验重复 2 次,每次设 3 个重复。

### 1.3.3 仔猪致病力试验

**1.3.3.1 仔猪存活试验** 分别挑取亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta\text{stk}$  单菌落接种于 THY 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养至对数生长中后期( $OD_{600}$  0.6 ~ 0.8),离心收集菌体,无菌 PBS 洗涤 2 次,调整细菌浓度到  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml。通过耳缘静脉注射的方法,用 0.5 ml 亲本株和缺失株分别攻击 4~5 周龄仔猪(每菌株注射 6 头仔猪)。密切观察感染动物的体征,每天测定 2 次感染动物的体温,比较各组仔猪的发病情况及存活时间。

**1.3.3.2 竞争感染实验** 4~5 周龄健康仔猪 9 头随机分成 3 组。分别用亲本株、缺失株和等比例的亲本株/缺失株混合菌通过耳缘静脉注射的方法接种(每只猪  $5.0 \times 10^6$  CFU),密切观察仔猪的体征和临床症状。一旦亲本株感染组出现典型的临床表现,如关节炎、高热、脑膜炎等,立即处死 3 个感染组的所有动物。各组试验动物均进行血液、心脏、肝、脾、肺、肾、脑和关节液等标本的采集(无菌操作)。各脏器取约 0.2 g,称量后,加入 2 ml 的无菌 PBS,超声破碎脏器,10 倍连续稀释,取合适稀释倍数的均质破碎液 100  $\mu\text{l}$  涂于 THY 平板;用 PBS 将血液 10 倍连续稀释,取合适稀释倍数的稀释液 100  $\mu\text{l}$  涂于 THY 平板,每个稀释度涂 3 块平板,37 ℃ 培养 24 h 后进行菌落计数。混合感染组的组织均质破碎液分别涂于含有氯霉素抗性和不含氯霉素抗性 THY 平板,37 ℃ 孵育 24 h,通过平板计数和抗性筛选测定各被检组织中亲本株和缺失株的细菌数量,其中缺失株的细菌含量等于氯霉素抗性平板上长出的菌落

数,而亲本株的细菌含量等于 THY 平板上的菌落数减去氯霉素抗性平板上的菌落数。

#### 1.4 SsSTK 调控毒力因子的转录谱分析

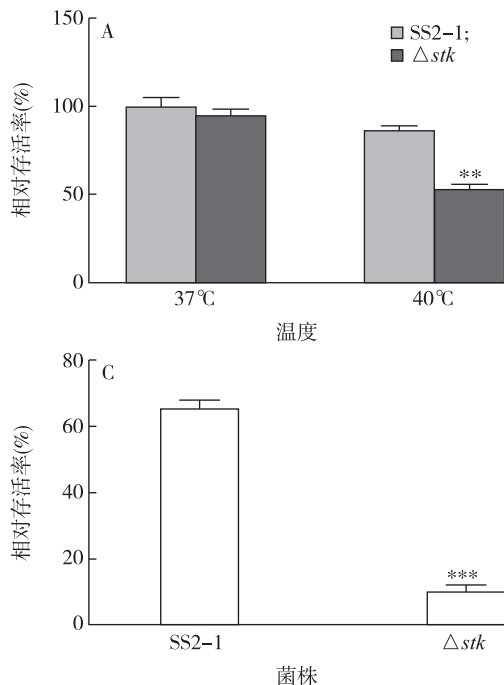
1.4.1 细菌 RNA 的提取 挑取 THB 绵羊血平板上的 SS2-1 和  $\Delta stk$  单菌落接种至 THY 液体培养基,37 °C 过夜培养,以 1:100 的比例转接至 5 ml 新鲜的 THY 液体培养基中,待培养到对数生长中后期 ( $OD_{600}$  0.6~0.8) 时,4 °C 离心收集菌体。细菌 RNA 的提取按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 用 PrimeScript 试剂盒 (TaKaRa 公司产品) 将 RNA 样品反转录成 cDNA。设计引物扩增 150~250 bp 的序列 (表 1)。利用 ABI 7500 实时定量 PCR 系统和 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa 公司产品) 将 cDNA 样品进行实时定量 PCR 分析。扩增条件为 95 °C 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 40 个循环。每个样品重复 3 次。将 16S rRNA 作为内参在相同条件下扩增以使反应标准化。实时定量 PCR 扩增完成后,根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相关倍数变化值<sup>[26]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 SsSTK 对 SS2 应激耐受的影响

细菌在感染宿主的过程中会接触到各种应激因



素,包括营养不良、温度升高、pH 变化、渗透压升高及来自巨噬细胞内的氧化性杀伤物质。因此,我们通过体外试验比较了亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta stk$  在各种应激环境 (热、酸、 $H_2O_2$  和高渗透压) 中的生长特性。结果表明,与亲本株相比, SsSTK 表达缺陷株在高温 (40 °C) 和酸性 pH 值的环境中生存能力明显降低 (图 1)。40 mmol/L  $H_2O_2$  孵育 20 min, 亲本株存活率为 65%, 缺失株有 90% 的细菌被杀死; 在 80 mmol/L  $H_2O_2$  的环境中, 20min 后细菌全部死亡 (图 1)。与亲本株 SS2-1 相比, 缺失株  $\Delta stk$  在高盐环境中的生长完全被抑制 (图 1)。说明 SsSTK 表达缺陷株在各种应激环境中的生存能力明显降低, 故 SsSTK 参与了细菌的应激反应。

### 2.2 SsSTK 对 SS2 毒力的影响

SS2 黏附到宿主的黏膜上皮细胞是感染过程中的重要步骤, 为研究 SsSTK 对细菌黏附的影响, 利用 HEp-2 上皮细胞模型检测各菌株的黏附能力。以亲本株 SS2-1 对 HEp-2 细胞的黏附率为 100%, 缺失株  $\Delta stk$  对 HEp-2 细胞的黏附率相比亲本株减少了 41.3% (图 2), 说明 STK 基因缺失后, SS2 对 HEp-2 细胞的黏附能力显著下降。

SS2 穿过扁桃体和上呼吸道的粘膜屏障进入血

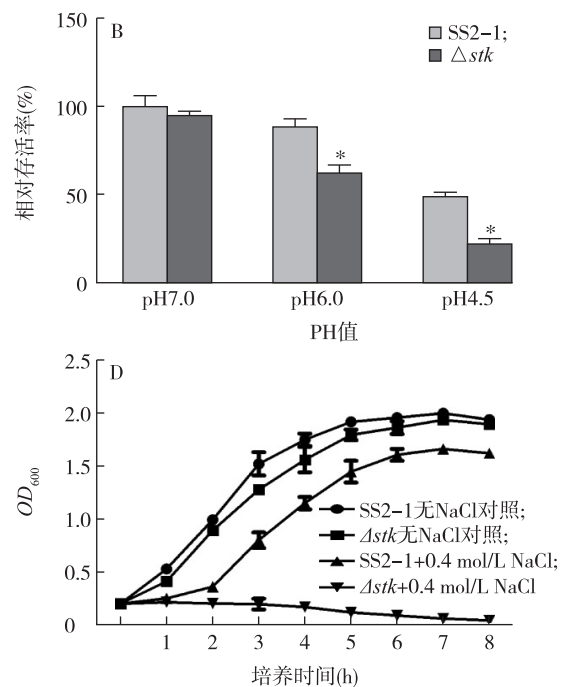


图1 亲本株 SS2-1 和缺失株  $\Delta stk$  在热 (A)、酸 (B)、40 mmol/L  $H_2O_2$  (C) 和高渗透压 (D) 应激环境中的生长特性

Fig.1 The growth characteristics of SS2-1 and  $\Delta stk$  strains under different stress conditions including high temperature (A), acidic pH (B), 40 mmol/L  $H_2O_2$  (C), and high osmolarity (D)



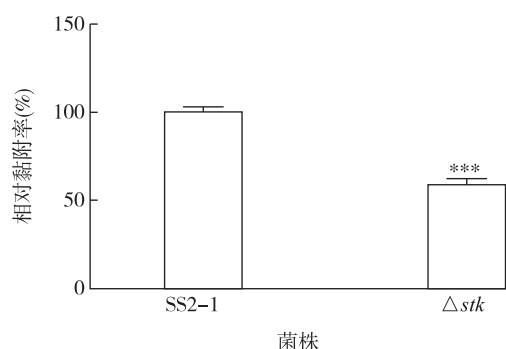
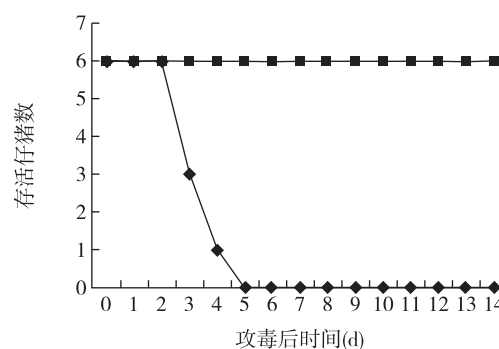


图2 丝氨酸/苏氨酸激酶(STK)对SS2黏附HEp-2细胞的影响

Fig.2 Effects of serine-threonine kinase (STK) on SS2 adhesion to HEp-2 cells



◆ SS2-1; ■  $\Delta stk$

图4 仔猪攻毒存活曲线

Fig.4 Survived piglets after challenged with wild type and mutant strains

液循环并存活下来,是细菌致病的核心。为了评价 *SsSTK* 缺失前后细菌在血液中的存活能力,以感染前(0 h)的菌落数作为 100%,孵育 2 h 后的菌落数与之相比,计算各菌株的存活率。结果表明,亲本株的存活率为 31.2%,缺失株为 21.2% (图 3)。与 SS2 亲本株相比,缺失株在全血中的存活率显著下降。

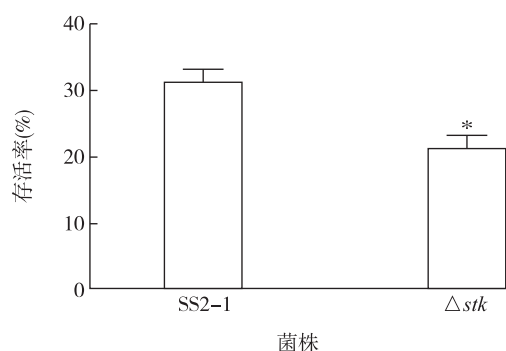


图3 SS2 在全血中的存活率

Fig.3 Survivals of SS2 wild type and mutant in whole blood

### 2.3 亲本株(SS2-1)和缺失株( $\Delta stk$ )对仔猪的致病性比较

用相同剂量的亲本株和缺失株分别攻击 4~5 周龄的健康仔猪,结果(图 4)显示 SS2-1 攻击组的 6 头仔猪于接种后 48 h 内均发现有明显的临床症状,体温升高、关节肿大、进食减少、精神沉郁、跛行和神经症状等,攻毒后第 3 d 有仔猪开始死亡,5 d 内 6 头仔猪全部死亡。死亡仔猪解剖后可见脑膜充血、出血、脑水肿,肺淤血、水肿,脾淤血、出血、肿大等病变。 $\Delta stk$  攻击组的 6 头仔猪全部存活,在整个试验过程中仅有 2 头出现了轻微的临床症状。

用亲本株 SS2-1、缺失株  $\Delta stk$  和等比例的亲本株/缺失株混合菌通过静脉注射分别感染 4~5 周龄仔猪,发现亲本株/缺失株混合菌攻毒组的仔猪也表现出与亲本株攻毒组相同的临床症状,在接种后第 3 d 仔猪病情发展严重。将 3 组仔猪一并处死,无菌采集各组仔猪的脏器标本进行细菌分离,通过平板计数测定各被检组织中亲本和(或)缺失株的细菌数量,结果见表 2。亲本株 SS2-1 感染动物组中,各组织脏器中均能分离到细菌,其中以扁桃体、关节液和血液中数量最多。而缺失株  $\Delta stk$  感染组中,3 只仔猪的各脏器均未分离到细菌。在亲本株/缺失株混合感染组中,在仔猪的一些特定脏器分离到亲本株 SS2-1,未分离到缺失株  $\Delta stk$ 。说明 *SsSTK* 缺失后,细菌在动物体内的定殖能力显著降低。

### 2.4 *SsSTK* 调控毒力因子的转录谱分析

通过体外培养的不同菌株毒力相关因子相对定量比较发现,缺失株  $\Delta stk$  中黏附相关蛋白 FBPS 和 GAPDH 的转录水平分别是亲本株转录水平的 0.34 和 0.70 倍,与亲本株相比降低了 30%~66%;应激相关因子 SodA、AD 和 OppuABC 的转录水平分别是亲本株的 0.58、0.79 和 0.65 倍,与亲本株相比降低了 22%~43%; $\Delta stk$  中其他毒力因子如 mrp、ef、impdh、sly、sspA 和 ssnA 转录水平分别是亲本株转录水平的 0.33、0.23、0.62、0.26、0.39 和 0.23 倍(图 5)。qRT-PCR 结果表明,*SsSTK* 参与调控细菌中黏附素、应激相关因子和毒力因子的转录水平,*SsSTK* 基因缺失后,细菌黏附能力下降,在血液中的存活能力降低,在各种应激环境中的生存能力降低。缺失株  $\Delta stk$  对仔猪的致病力下降,揭示了 *SsSTK* 调

表 2 亲本株和缺失株在仔猪不同脏器中定植能力的比较

Table 2 Comparison of colonization of SS2-1 (WT) and  $\Delta stk$  in various tissues and organs of piglets

组织	亲本株感染组 细菌数量 (CFU/g)			亲本株/缺失株共感染组 细菌数量 (CFU/g)						缺失株感染组 细菌数量 (CFU/g)		
	4#	10#	11#	13#		18#		20#		5#	15#	17#
	WT	WT	WT	WT	$\Delta stk$	WT	$\Delta stk$	WT	$\Delta stk$	$\Delta stk$	$\Delta stk$	$\Delta stk$
血液	$3.0 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$4.5 \times 10^3$	-	$4.0 \times 10^3$	-	$2.0 \times 10^3$	-	-	-	-
关节液	$1.9 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肝	$2.8 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$	-	$1.4 \times 10^4$	-	-	-	$8.0 \times 10^3$	-	-	-	-
肾	$1.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^4$	-	-	-	$1.2 \times 10^5$	-	$13.0 \times 10^4$	-	-	-	-
脾	$9.2 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$5.9 \times 10^4$	-	$1.5 \times 10^4$	-	$1.2 \times 10^4$	-	-	-	-
脑	$1.9 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$	-	$7.3 \times 10^3$	-	$2.2 \times 10^4$	-	-	-	-
肺	$3.3 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$4.9 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	-	$1.9 \times 10^4$	-	$1.5 \times 10^4$	-	-	-	-

注: 4#、10#、11#……, 仔猪的编号。WT: 亲本株;  $\Delta stk$ : 缺失株。- 表示未分离到细菌。

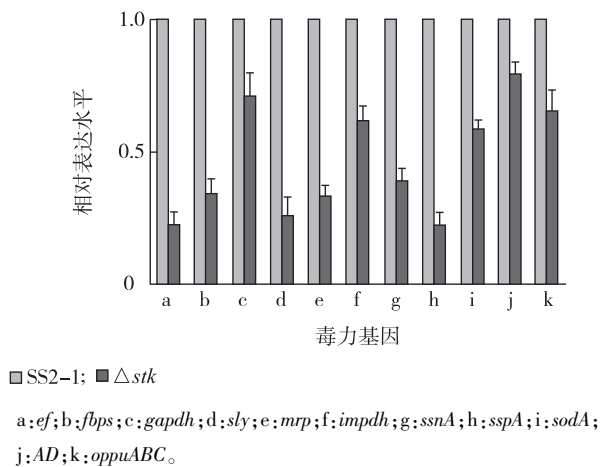


图 5 亲本株 (WT) 和缺失株 ( $\Delta stk$ ) 中毒力基因的表达差异

Fig.5 Difference in virulence gene expression between SS2-1 (WT) and  $\Delta stk$  strains

控细菌毒力的分子机制。

3 讨论

可逆的蛋白质磷酸化过程是细胞内信号转导的一个关键调节机制。在真核生物中,蛋白质磷酸化级联网络系统参与多种信号传递过程,该网络需要大量的丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸激酶及其相对应的磷酸酶的协同作用。自从在 *M. xanthus* 中发现第 1 对真核生物型丝氨酸/苏氨酸激酶/磷酸酶 (*ESTKs/ESTPs*) 起,它们在原核细胞信号转导中的重要性就引起了极大关注<sup>[11]</sup>。随着基因组测序技术的发展,陆续在一些细菌中发现了 *ESTKs/ESTPs* 的存在,并且对一些重要致病菌的 *ESTK/ESTP* 的功能进行了鉴定,包括无乳链球菌、肺炎链球菌和化脓链球菌

等。在本研究中,通过一系列体内和体外试验,评价了丝氨酸/苏氨酸激酶对猪链球菌 2 型强毒株 SS2-1 在各种应激环境中的生存特性及其对仔猪的致病力,探讨了丝氨酸/苏氨酸激酶在猪链球菌感染过程中的作用。

有报道指出猪链球菌病的发生始于该菌在鼻咽组织的定殖,与呼吸道上皮细胞的相互作用对该菌感染初期十分重要,伴随而来的就是细菌在呼吸道的扩散以及入侵血液<sup>[27]</sup>。HEp-2 是公认的上皮细胞模式细胞,因此本研究利用 HEp-2 细胞来评价 *SsSTK* 对细菌黏附宿主的影响,试验结果表明缺失株  $\Delta stk$  对 HEp-2 的黏附能力与亲本株相比显著下降。在 A 群链球菌 (GAS) 中,敲除了 *SP-STK* 激酶结构域或胞外结构域或完整基因的菌株均表现出对人咽头细胞黏附能力的降低。*ESTKs/ESTPs* 常参与蛋白质磷酸化级联反应网络协调各种信号的反应,因此推测 SS2 的 *ESTK* 可能参与调控细菌黏附相关蛋白质的基因表达,从而引起黏附力下降。qRT-PCR 结果表明 *SsSTK* 下调了细菌黏附相关蛋白 GAPDH 和 FBPS 的表达水平。也有研究结果表明,黏附素可通过介导细菌与宿主的黏附来影响其致病性<sup>[28-29]</sup>。这些结果均表明 *SsSTK* 介导细菌的黏附和毒力是通过控制 GAPDH 和 FBPS 的表达来实现的。

猪链球菌在通过呼吸道传播之后必须在血液存活下来才能诱发疾病。比较缺失株与亲本株在猪全血中的存活能力,发现缺失株的存活力显著降低,亲本株对血液中吞噬细胞的抵抗能力较强。相似的结果在 SS2 P1/7 的枯草杆菌蛋白酶突变株中也有报道<sup>[25]</sup>;无乳链球菌中 *StkI* 的表达对细菌在全血中

的存活能力也是十分重要的。有研究表明, *ESTK* 影响细菌在宿主体内定殖和持续存在的时间,如粪肠球菌的 *PrkC* 和肺炎链球菌的 *StkP*。体内定殖试验结果也证实了缺失株  $\Delta stk$  在特定脏器肝、脾、脑、肾及血中的分布数量均显著低于亲本株,说明 *SsSTK* 基因缺失后,细菌在体内存活较少,感染宿主后对器官的损伤能力也明显降低。

在致病过程中,猪链球菌必须侵入深层组织和血液循环系统,所以细菌需要适应一系列不良的环境条件,包括高温、pH 值变化、渗透压变化和氧化应激环境。研究表明,细菌的 *ESTK* 通常为膜相关蛋白,包括胞内的 N 端激酶结构域(Hanks' I - XI 结构域)、中间的跨膜区和胞外的 C 端感应结构域(PASTA 结构域),PASTA 结构域能够将环境中的信号迅速传递到胞内。由于 *SsSTK* 的胞外区含有 4 个重复的 PASTA 结构域,因此,我们比较了 *SsSTK* 基因缺失株在不同应激环境中的生长特性。结果表明,缺失株  $\Delta stk$  在各种应激环境中,包括热、酸、 $H_2O_2$  和高渗透压等,生长明显被抑制。在猪链球菌触发因子 *Tig* 的缺失株中也观察到了相似的结果<sup>[25]</sup>。缺失株  $\Delta stk$  在各种应激环境中的存活能力显著降低可能是因为应激反应相关基因(*sodA*, *ad* 和 *oppuABC*)的表达量下调所致。*sodA* 和 *AD* 已经被证实与 SS2 的氧化应激和酸性应激密切相关<sup>[26-27]</sup>。*GAS*、*oppuABC* 可编码一种甘氨酸甜菜碱/脯氨酸转运蛋白,其在高盐浓度环境中,可保护细菌免受渗透压的收缩破坏<sup>[18,33]</sup>。因此,我们推测缺失株  $\Delta stk$  对各种环境应激的耐受力较低,导致其在宿主体内的存活机率显著降低,这可能是细菌毒力显著降低的一个重要原因。

动物体内试验结果表明,*STK* 表达缺陷株的毒力显著降低,如无乳链球菌的丝氨酸/苏氨酸激酶和磷酸酶(*Stk1/Stp1*)双缺失后,细菌毒力显著降低<sup>[10]</sup>。化脓链球菌 *Stk1* 缺失株对大鼠的致病能力显著降低<sup>[18]</sup>。本试验中,仔猪感染试验结果表明,缺失株不能导致仔猪发病和死亡,失去了致病力。竞争试验结果也表明,缺失株在仔猪体内的定殖能力极大减弱,甚至丧失。以上试验结果说明,*SsSTK* 基因缺失可引起细菌毒力降低。导致缺失株毒力明显降低的可能原因与毒力因子 *mrp*、*ef*、*fbps*、*gapdh*、*impdh*、*sly*、*sspA*、*ssnA*、*sodA*、*ad* 和 *oppuABC* 的表达下调有关。

总之,本研究揭示了 SS2 中 *SsSTK* 对细菌毒力和应激的影响,明确了 *SsSTK* 在细菌致病过程中的作用。*SsSTK* 可能通过调控其他一些重要因子来影响细菌致病过程中的各个步骤,包括黏附、定殖和在宿主体内存活等。至于 *SsSTK* 通过调节何种基因的表达,并通过何种途径影响相关基因的表达,进而影响细菌毒力的分子机制仍需在将来的研究中进一步阐明。

## 参考文献:

- [1] 汪伟,何孔旺,倪艳秀,等.猪链球菌 2 型粘附相关因子荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].江苏农业学报,2014,30(3): 560-566.
- [2] 王海丽,徐公义,赵德明.多重 PCR 检测猪链球菌种及主要致病血清型[J].江苏农业科学,2014,42(8): 212-213,221.
- [3] HILL J E, GOTTSCALK M, BROUSSEAU R, et al. Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti* [J]. Vet Microbiol, 2005, 107: 63-69.
- [4] 王凤云,林峰,陈玉霞,等.猪瘟与猪链球菌病混合感染的诊断与防治[J].江苏农业科学,2014,42(9): 183-185.
- [5] 祝昊丹,倪艳秀,周俊明,等.猪链球菌 2 型丝氨酸/苏氨酸磷酸酶的鉴定和特性分析[J].江苏农业学报,2014,30(3): 548-553.
- [6] 胡巧云,袁小宁,熊毅,等.2 型猪链球菌 *SspA* 基因序列及其免疫原性分析[J].南方农业学报,2015,46(7): 1310-1314.
- [7] YE C, ZHU X, JING H, et al. *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12: 1203-1208.
- [8] TANG J, WANG C, FENG Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. PLoS Med, 2006, 3: e151.
- [9] FITTIPALDI N, SEGURA M, GRENIER D, et al. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis* [J]. Future Microbiol, 2012, 7: 259-279.
- [10] RAJAGOPAL L, CLANCY A, RUBENS C E. A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 14429-14441.
- [11] MUNOZ-DORADO J, INOUE S, INOUE S, et al. A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium [J]. Cell, 1991, 67: 995-1006.
- [12] RANTANEN M K, LEHTIO L, RAJAGOPAL L, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of two *Streptococcus agalactiae* proteins; the family II inorganic pyrophos-

- phatase and the serine/threonine phosphatase[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2006, 62: 891-894.
- [13] ECHENIQUE J, KADIOGLU A, ROMAO S, et al. Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Infect Immun, 2004, 72: 2434-2437.
- [14] MAESTRO B, NOVAKOVA L, HESEK D, et al. Recognition of peptidoglycan and beta-lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae* [J]. FEBS Lett, 2011, 585: 357-363.
- [15] OSAKI M, ARCONDEGUY T, BASTIDE A, et al. The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: cellular organization and physiological characterization [J]. J Bacteriol, 2009, 191: 4943-4950.
- [16] SASKOVA L, NOVAKOVA L, BASLER M, et al. Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Bacteriol, 2007, 189: 4168-4179.
- [17] JIN H, PANCHOLI V. Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification [J]. J Mol Biol, 2006, 357: 1351-1372.
- [18] BUGRYSHEVA J, FROELICH B J, FREIBERG J A, et al. Serine/Threonine protein kinase Stk is required for virulence, stress response, and penicillin tolerance in *Streptococcus pyogenes* [J]. Infect Immun, 2011, 79: 4201-4209.
- [19] PANCHOLI V, BOEL G, JIN H. *Streptococcus pyogenes* Ser/Thr kinase-regulated cell wall hydrolase is a cell division plane-recognizing and chain-forming virulence factor [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 30861-30874.
- [20] MOTLEY S T, LORY S. Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Infect Immun, 1999, 67: 5386-5394.
- [21] RAVICHANDRAN A, SUGIYAMA N, TOMITA M, et al. Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas species* [J]. Proteomics, 2009, 9: 2764-2775.
- [22] BELTRAMINI A M, MUKHOPADHYAY C D, PANCHOLI V. Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase [J]. Infect Immun, 2009, 77: 1406-1416.
- [23] BURNSIDE K, RAJAGOPAL L. Aspects of eukaryotic-like signaling in Gram-positive cocci: a focus on virulence [J]. Future Microbiol, 2011, 6: 747-761.
- [24] 祝昊丹 倪艳秀, 周俊明, 等. 猪链球菌丝氨酸/苏氨酸激酶基因缺失株的构建及其致病性研究 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30 (6): 1360-1368.
- [25] BONIFAIT L, DE L A C D P M, VAILLANCOURT K, et al. The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis* [J]. BMC Microbiol, 2010, 10: 42.
- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(delta delta C(T)) method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [27] LALONDE M, SEGURA M, LACOUTURE S, et al. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines [J]. Microbiology, 2000, 146 (Pt 8): 1913-1921.
- [28] DE GREEFF A, BUYS H, VERHAAR R, et al. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Infect Immun, 2002, 70: 1319-1325.
- [29] BRASSARD J, GOTTSCHALK M, QUESSY S. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin [J]. Vet Microbiol, 2004, 102: 87-94.
- [30] WU T, ZHAO Z, ZHANG L, et al. Trigger factor of *Streptococcus suis* is involved in stress tolerance and virulence [J]. Microb Pathog, 2011, 51: 69-76.
- [31] SMITH H E, VECHT U, WISSELINK H J, et al. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs [J]. Infect Immun, 1996, 64: 4409-4412.
- [32] WINTERHOFF N, GOETHE R, GRUENING P, et al. Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the Arginine Deiminase system of *Streptococcus pyogenes* [J]. J Bacteriol, 2002, 184: 6768-6776.
- [33] LIU M, HANKS T S, ZHANG J, et al. Defects in *ex vivo* and *in vivo* growth and sensitivity to osmotic stress of group A *Streptococcus* caused by interruption of response regulator gene vicR [J]. Microbiology, 2006, 152: 967-978.

(责任编辑:张震林)