

研究报告

猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶介导细菌应激与致病作用

占冬波, 刘海发, 龙如意, 王占丰, 朱乐欣, 廖兵荣, 蒋小武*

宜春学院医学院, 江西 宜春 336000

占冬波, 刘海发, 龙如意, 王占丰, 朱乐欣, 廖兵荣, 蒋小武. 猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶介导细菌应激与致病作用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 241-249.

ZHAN Dongbo, LIU Haifa, LONG Ruyi, WANG Zhanfeng, ZHU Lexin, LIAO Bingrong, JIANG Xiaowu. Thioredoxin reductase contributes to stress response and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 241-249.

摘要:【背景】硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TRR)是硫氧还蛋白系统关键组成部分, 对病原菌应对体内外氧化应激、调节细菌稳态和介导致病过程具有重要作用。【目的】探究硫氧还蛋白还原酶 TRR 在人畜共患猪链球菌 2 型感染过程中参与的生物学效应。【方法】同源重组法构建猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶 *trr* 基因缺失株(Δtrr)及回补株($c\Delta trr$), 通过细菌染色、点板计数、体外细胞和动物感染模型等试验比较分析 *trr* 基因对细菌形态、抗应激反应及致病过程的影响。

【结果】缺失 *trr* 对猪链球菌 2 型形态与生长特性的影响不大, 但可增强细菌抗热应激、氧化应激和酸应激能力, 缺失株对上皮细胞黏附力下降, 侵袭进入脑血管内皮细胞作用显著降低, 易于被吞噬细胞吞噬清除, 对小鼠模型致病效应显著减弱。【结论】猪链球菌 2 型 TRR 因子参与细菌应激反应, 介导细菌黏附、侵袭等致病过程, 是猪链球菌 2 型新的潜在毒力因子。

关键词: 猪链球菌 2 型; 硫氧还蛋白还原酶; 应激反应; 致病作用

资助项目: 江西省自然科学基金(20202BABL215025); 江西省卫健委科技项目(202131064)

This work was supported by the Jiangxi Provincial Natural Science Foundation (20202BABL215025) and the Jiangxi Provincial Department of Health Commission Project (202131064).

*Corresponding author. E-mail: xwjiang@zju.edu.cn

Received: 2023-07-04; Accepted: 2023-08-30; Published online: 2023-09-18

Thioredoxin reductase contributes to stress response and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2

ZHAN Dongbo, LIU Haifa, LONG Ruyi, WANG Zhanfeng, ZHU Lexin, LIAO Bingrong, JIANG Xiaowu*

College of Medicine, Yichun University, Yichun 336000, Jiangxi, China

Abstract: [Background] The thioredoxin reductase (TRR), one of the key components in the thioredoxin system, plays a key role in the oxidative stress response, homeostasis, and infection of pathogens. [Objective] To examine the role of TRR in the infection of *Streptococcus suis* type 2 (SS2), a zoonotic pathogen. [Methods] The *trr*-deleted mutant (Δtrr) and complementation strain ($c\Delta trr$) of SS2 were constructed by homologous recombination on the basis of the wild-type (WT) strain HA9801. The Gram staining, plate counting, and cell and mouse infection assays were employed to examine the morphological characteristics, stress resistance, and infection process of the strains. [Results] The deletion of *trr* showed no effect on the morphological or growth characteristics of SS2, while it enhanced the tolerance to heat, oxidative, and acid stress conditions compared with WT. Δtrr presented reduced adhesion on murine epithelial cells and invasion capacity in cerebrovascular endothelial cells. It was easily to be phagocytosed and presented lower pathogenicity in RAW264.7 cells and mice. [Conclusion] TRR is involved in the stress responses, adhesion, and invasion and serves as a novel virulence factor for SS2.

Keywords: *Streptococcus suis* type 2; thioredoxin reductase; stress response; pathogenicity

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种兼性厌氧革兰阳性菌,根据表面荚膜多糖抗原多态性,至少分为 35 个血清型,即 1-34 和 1/2 型,但研究表明 *S. suis* 20、22、26、32 和 34 不应该归为猪链球菌^[1-2]。猪链球菌 2 型(*S. suis* type 2, SS2)是 *S. suis* 中分布最广、较易分离的一种常见的致病性血清型,属于人兽共患病原菌,可感染人,导致淋巴结肿大、脑膜脑炎、关节肿大和败血症等病症^[3-5]。我国曾于 1998 年和 2005 年分别在江苏省和四川省暴发了两起人感染猪链球菌 2 型公共卫生事件,累计导致 229 人感染、52 人死亡,引发国内外相关学者的广泛关注^[3,5]。

宿主遭受病原菌侵染时会激活吞噬细胞释放大量的自由基,如活性氧(reactive oxygen species, ROS)与活性氮(reactive nitrogen species,

RNS)来抵抗病原菌,导致菌体氧化还原水平失衡,脂质、蛋白质等生物大分子变性,最终病原菌被氧化损伤^[6-8]。然而,病原菌自身存在多种抗氧化系统来抑制宿主细胞氧化损伤效应^[9]。其中硫氧还蛋白系统(thioredoxin system)是病原菌抵御宿主氧化损伤的重要环节之一;该系统由硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)、硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TRR)、硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase, TrxP)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)组成,是抵御氧化应激的关键系统;Trx 系统以 Trx 作为氢供体,可通过修饰、调控细菌有关毒力因子的表达与分泌影响细菌在应激环境、巨噬细胞以及小鼠体内的繁殖与存活,介导细菌的感染与致病过

程^[7,9]。TRR 是目前已知唯一能够还原 Trx 的酶,可催化 Cys-Xaa-Xaa-Cys 基序,通过二硫醇/二硫键平衡还原来调节 Trx 还原态^[9-12]。在不同细菌具有特定的硫醇依赖的抗氧化系统。特别是大多数革兰氏阴性细菌缺乏 TRR,主要是通过谷胱甘肽-谷氧还蛋白(glutathione-glutaredoxin, GSH-Grx)系统清除 ROS 与 RNS 以维持氧化还原稳态^[13],而大多数革兰氏阳性细菌主要的抗氧化胁迫系统是 Trx 系统,这使得 Trx 系统对于大多数革兰氏阳性细菌在氧化应激下的生存至关重要^[14]。近年来,Trx 系统已成为病原菌感染与致病过程研究的热点。

本实验室前期对猪链球菌 2 型 *trr* 基因进行了生物信息学分析,通过原核表达、纯化 SsTRR 蛋白制备了 anti-SsTRR 多克隆抗体,并检测到 SsTRR 蛋白在 SS2 胞浆中^[15]。本研究旨在采用同源重组方法获得 *trr* 基因缺失株(Δtrr),并通过细胞与小鼠感染模型探究 TRR 在 SS2 致病过程中的作用,探明该因子介导的生物学效应。

1 材料与方法

1.1 材料

猪链球菌 2 型强毒株 HA9801、pET-30a 表达载体、pSET4s 温敏自杀性质粒、pSET2 穿梭质粒、SsTRR 蛋白及 anti-SsTRR 多克隆抗体,本实验室制备保存;高保真酶、DNA Ligation Kit、细菌基因组提取试剂盒、细菌质粒提取试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta 感受态细胞,北京全式金生物技术股份有限公司;脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)培养基干粉, Oxoid 公司;庆大霉素干粉、壮观霉素干粉、LB 培养基和 ECL 化学发光试剂盒, Solarbio 公司;胎牛血清和 DMEM, Gibco 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗,武汉三鹰生物技术有限公司。PCR 仪, Eppendorf 公司;电转仪, Bio-Rad 公司;凝胶

成像仪,上海培清科技有限公司;生化培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司;细胞培养箱, Thermo Fisher Scientific 公司。

人喉上皮细胞 HEp-2、小鼠脑微血管内皮细胞 bEND3.0、小鼠巨噬细胞 RAW264.7 均为实验室保存;四周龄雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物实验经过宜春学院医学伦理委员会审批(审批号为 2022018)。

1.2 猪链球菌 2 型 *trr* 基因缺失与回补株构建

参考 Liu 等^[16]报道的同源重组法,以菌株 HA9801 (WT)基因组为模板,使用上、下游同源臂引物(表 1),按照 PCR 扩增试剂盒与产物回收试剂盒说明书高保真扩增、纯化 *trr* 基因上、下游同源臂,再进行同源臂融合扩增回收。用 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切温敏质粒 pSET4s 与同源臂,连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。用 LB 平板 37 °C 培养过夜,挑取克隆,PCR 检测阳性后送测序。测序确认无误后将重组质粒 pSET4s::*trr* 电转 SS2-HA9801 感受态细胞,在含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的 BHI 培养基中,28 °C、150 r/min 培养 4–5 h。涂布平板,次日进行 PCR 鉴定。阳性克隆 28 °C 传 5–10 代,进行双交换鉴定。双交换菌液 37 °C 传代、凋亡质粒,PCR 鉴定 *trr* 基因缺失情况,获得 Δtrr 缺失株。

互补质粒构建的方法是将已报道的启动子片段与 *trr* 基因片段融合^[16],并与 pSET2 连接,将 pSET2::*trr* 载体电转化至 Δtrr 感受态中,37 °C、150 r/min 的 BHI 培养基中培养 3 h,涂布 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素(spectinomycin, Spc)抗性 BHI 平板过夜,挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定,获得 $c\Delta trr$ 回补株。

1.3 生长特性检测

参考文献[16]报道方法,分别挑取亲本株 HA9801、缺失株 Δtrr 及回补株 $c\Delta trr$ 单菌落至

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Function
<i>trr</i> -5' flank-F	CCGGAATTCCTTGAACCATAAGCATGATGCGA	Upstream fragment amplification of <i>trr</i>
<i>trr</i> -5' flank-R	AGTATGGGAATACAATGTTTCATATTTACG	
<i>trr</i> -3' flank-F	TTCCCATACTTTTTCTTCTACGCTTTAA	Downstream fragment amplification of <i>trr</i>
<i>trr</i> -3' flank-R	CGCGGATCCTGATGAACCAGGTGAAGAAC	
<i>trr</i> -in-F	CATAAATGCCTGATTGGGT	Internal fragment of <i>trr</i> identification
<i>trr</i> -in-R	ACCGTTTGTAGGTATTCCAG	
<i>trr</i> -ou-F	TTTTGAACGACGGATAGTGT	Outside the homologous region identification
<i>trr</i> -ou-R	ACGTGCAGATGAATTGCA	
<i>ctrr</i> -F	CCGGAATCCAAGACCAAGCGAGTTGA	Complemental gene amplification
<i>ctrr</i> -R	ACGCGTCGACCTATTCAGCTAGTTCTGTGATG	
Spc-F	TACGGAAATTATGACTTAGAGG	Spectinomycin gene identification
Spc-R	GGAGAAGATTCAGCCACT	

BHI 培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡过夜。然后菌液 4 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 使用 PBS (10 mmol/L) 洗涤, 并将菌液 OD_{600} 值均调至 0.4, 再以 1% 接种量转接至 BHI 培养基中, 在 37 °C、180 r/min 的条件下培养, 每隔 1 h 取 3 个 200 μ L 菌液至 96 孔微孔板中测定 OD_{600} 值, 共测定 24 h 并记录数据。

WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌液涂布 BHI 平板过夜, 挑取单菌落进行革兰氏染色, 然后在油镜下观察细菌形态。

1.4 应激试验

参考文献[17]报道的方法, 分别挑取 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 单菌落至 BHI 培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡过夜。用 PBS 调整 OD_{600} 值至 0.6, 取 100 μ L 各菌株分别进行 42 °C 热应激、37 °C pH 5.5 醋酸应激和 20 mmol/L H_2O_2 氧化应激培养 1 h, 以未进行任何应激处理的菌株作为阴性对照组, 在 37 °C 条件下同时培养 1 h。在不同的应激条件下, 用 10 倍倍比稀释法进行细菌计数, 测定应激前后细菌的存活率。

1.5 细胞感染试验

参考 Jiang 等^[17]报道的方法, 以人喉癌上

皮细胞 HEp-2 进行黏附试验。HEp-2 细胞以 2×10^5 个/孔的密度, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 接种到 24 孔板中, 37 °C、5% CO_2 培养 12 h。分别挑取 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 单菌落至 BHI 培养基中, 37 °C、150 r/min 培养过夜。次日菌液 4 000 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤 3 次, 调节菌液 OD_{600} 至 0.4。分别取 100 μ L 各菌液至 HEp-2 中, 37 °C、5% CO_2 孵育 1 h。PBS 洗涤 4 次, 加入无菌水裂解细胞, 10 倍倍比稀释法进行细菌计数。

侵袭试验采用小鼠脑微血管内皮细胞 bEND3.0 模型进行。其试验步骤与黏附试验相同, 但在裂解细胞前需加入含庆大霉素(300 μ g/mL)的 DMEM 杀死胞外表面黏附菌, PBS 洗涤 3 次, 再加入无菌水裂解细胞, 振荡混匀, 点板计数侵袭进入胞内的细菌数。

细胞吞噬试验使用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 进行。将 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 按照 50:1 加入 24 孔板的单层 RAW 264.7 中, 37 °C、5% CO_2 孵育 1 h。加入含庆大霉素(300 μ g/mL)的 DMEM 杀死细胞表面的细菌, 用 PBS 洗涤残留庆大霉素, 加入无菌水裂解细胞, 点板计数吞噬进入胞内的细菌数。

1.6 小鼠全血存活试验

取 37 °C 培养 12 h 的 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌液，4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，PBS 洗涤 2 次，将菌液 OD_{600} 值均调至 0.4。取 50 μ L 菌液加入 450 μ L 采自临床健康的 BALB/c 小鼠新鲜的抗凝全血中，轻摇混匀，将混合物在 37 °C 培养箱中孵育 1 h，取其等量混合物，按 10 倍比梯度稀释，接种于 BHI 平板上，37 °C 培养过夜后菌落计数并计算存活率^[17]。

1.7 小鼠致病性试验

采用 BALB/c 小鼠感染模型，腹腔接种进行致病力检测^[16-17]。收集 37 °C 培养 12 h 的 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌液，PBS 调节 OD_{600} 至 0.5。随机选取 40 只 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠，每组 10 只，腹腔接种 1 mL 的 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 及 10 mmol/L PBS。每隔半天观察记录小鼠死亡情况，持续 1 周。采用 GraphPad 9.0 软件绘制存活曲线。

1.8 统计学分析

试验所有数据均表示为 3 个独立试验的平均值(mean) \pm 标准差(SD)，使用 Student's *t* 检验进行差异性分析。使用 log-rank 检验进行小鼠毒力试验的差异性分析。使用 GraphPad 9.0 软件进行统计学分析及相应的图表制作。

2 结果与分析

2.1 Δtrr 及 $c\Delta trr$ 的构建

根据同源重组法构建 Δtrr (图 1A)，采用引物对 *trr*-in-F/*trr*-ou-R、*trr*-ou-F/*trr*-in-R、*trr*-in-F/*trr*-in-R 和 Spc-F/Spc-R 进行目的基因双交换与缺失鉴定， $c\Delta trr$ 经 Spc 抗性 BHI 平板筛选，进行 PCR 鉴定。结果如图 1B 所示，上述引物在 Δtrr 中未扩增出片段，外侧引物扩增片段经测序不含 *trr* 基因， $c\Delta trr$ 采用 Spc-F/Spc-R 引物对扩增出片段，表明成功构建 Δtrr 及 $c\Delta trr$ 。

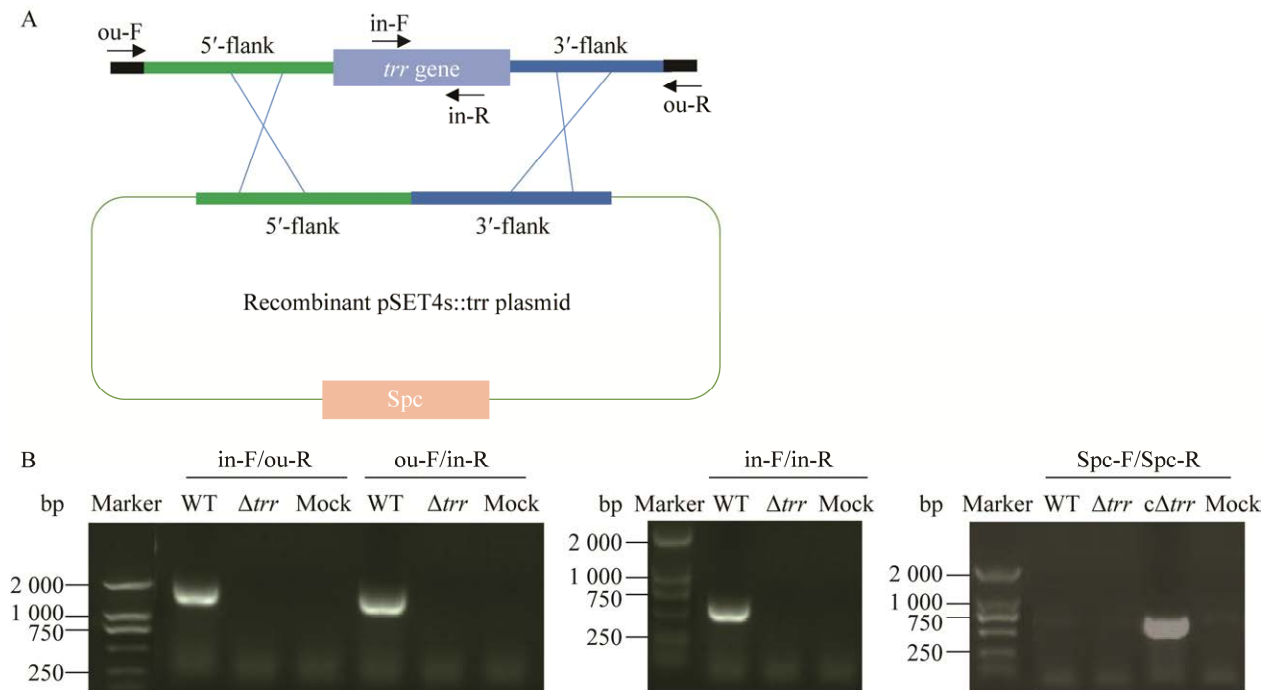


图 1 *trr* 基因缺失株构建 A: 同源重组法构建 *trr* 基因缺失株. B: PCR 检测 *trr* 基因缺失株与回补株

Figure 1 Construction of *trr* gene deletion strain. A: Homologous recombination method for *trr* gene deletion. B: PCR detection of *trr* gene deletion strain and complementary strain.

2.2 *trr* 缺失不影响细菌生长

比较 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 生长曲线, 统计学分析结果如图 2A 所示, 三者生长速率差异不明显($P>0.05$)。对 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 进行革兰氏染色后镜下观察各菌株形态及链长, 结果如图 2B 所示, 菌株均被染为蓝紫色, 其形态及链长无明显区别。

2.3 *trr* 基因参与细菌热应激、氧化应激和酸应激反应

为了研究 *trr* 基因缺失对应激胁迫耐受性的影响, 以 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 进行不同应激条件下各细菌存活能力比较。如图 3 所示, 与 WT 相比, Δtrr 菌株在 42 °C 高温胁迫、pH 5.5 酸胁迫和 20 mmol/L H_2O_2 氧化胁迫下的存活能力显著升高($P<0.05$)。综上所述, *trr* 介导 SS2 应激反应过程。

2.4 TRR 介导 SS2 对宿主细胞的黏附、侵袭、抗吞噬及致病过程

SS2 体外黏附、侵袭和抗吞噬试验结果表明: Δtrr 对 HEp-2 细胞的黏附能力显著低于 WT ($P<0.05$, 图 4A); 与 WT 相比, Δtrr 对 bEND3.0 细胞的侵袭也显著减少($P<0.05$, 图 4B); Δtrr 比 WT 菌株更容易被 RAW 264.7 细胞吞噬($P<0.05$, 图 4C)。提示 *trr* 缺失影响 SS2 对细胞

的黏附、侵袭和抗吞噬能力。新鲜 BALB/c 小鼠全血存活试验显示: Δtrr 菌株在全血中的存活力与 WT 差异相差不大($P>0.05$, 图 4D)。

采用 BALB/c 小鼠感染模型评估细菌致病性, 发现 WT 感染组小鼠在 SS2 攻毒后 12 h 内均出现典型的临床症状, 如寒颤、毛糙、跛行和嗜睡等, 并在 3 d 内死亡 90%; Δtrr 感染组小鼠也有类似临床表征, 但症状较轻, 观察期内死亡 60%; $c\Delta trr$ 组小鼠毒力有所恢复, 2 d 内全部死亡(图 4E)。

3 讨论与结论

细菌中控制着硫醇/二硫键氧化还原平衡反应的生物学系统主要包括 Trx 与 GSH-Grx 系统^[9,13]。Trx 系统在多种病原菌包括肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)等中均发挥其特定的生物学功能。*S. pneumoniae* 中, Trx 系统可协同链球菌属细菌表面甲硫氨酸硫氧化物还原酶(methionine sulfoxide reductase, MSR)系统共同参与细菌体内外氧化还原环境的动态调节, 影响细菌抗应激与感染致病过程^[18-19]。*S. aureus* 中的硫氧还蛋白还原酶 TrxR 对于细菌生长必

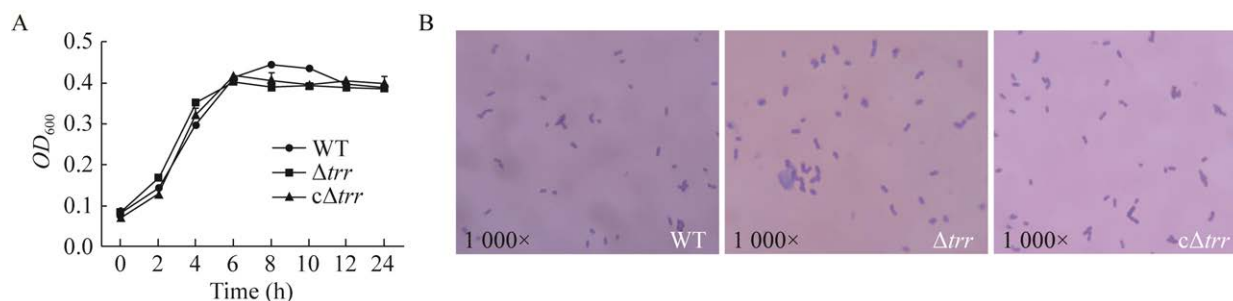


图 2 *trr* 基因缺失对细菌生长与形态的影响 A: WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株的生长曲线测定. B: WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株的革兰氏染色(1 000 \times)

Figure 2 Growth and morphological changes upon *trr* gene deletion. A: Growth curve determination of WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains. B: Gram staining of WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains (1 000 \times).

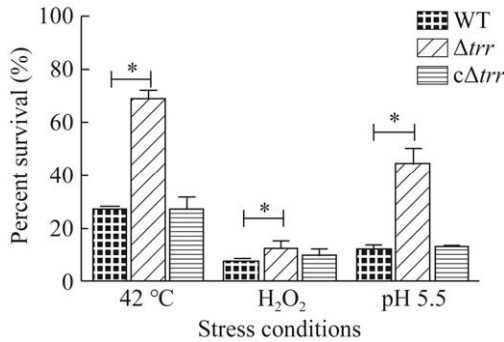


图 3 WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株抗应激能力检测
Figure 3 Tolerance of WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains under differential stress conditions. *: $P < 0.05$.

不可少,氧化应激作用可促进 *S. aureus* 的 TrxA 和 TrxB 基因表达上调,从而有利于二硫键的形成^[20]。LM 的硫氧还蛋白 TrxA 参与细菌抗氧化应激反应、毒力及感染早期效应, TrxA 缺失会显著降低 LM 对氧化剂的耐受性、减弱细菌毒力及鞭毛缺陷,导致 LM 不能运动^[21]。在 *S. suis* 中,有研究证明金诺芬可以与硫氧还蛋白还原酶蛋白活性中心结合抑制其功能,ROS 水平增加,导致 *S. suis* 死亡^[22]。截至目前,Trx 系统在猪链球菌 2 型中的作用很少受到关注。

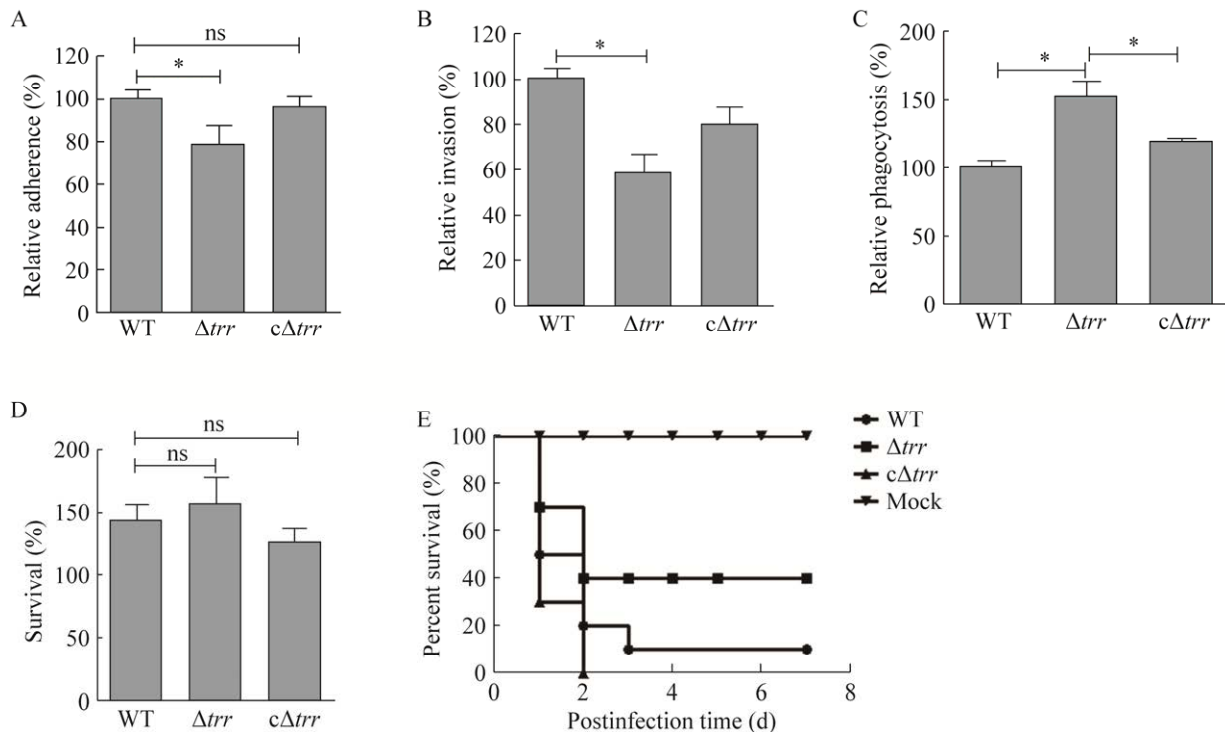


图 4 TRR 介导的致病作用分析 A: WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株在 HEP-2 细胞中的黏附性试验. B: WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株对 bEND3.0 细胞的侵袭试验. C: WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株对 RAW264.7 细胞的吞噬试验. D: WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株在小鼠全血中存活 1 h. E: WT、 Δtrr 和 $c\Delta trr$ 菌株在 BALB/c 小鼠感染模型中的毒力评价. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$

Figure 4 Pathogenicity analysis of TRR factor upon SS2 infection. A: Adhesion assay of WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains in HEP-2 cells. B: Invasive detection of WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains in bEND3.0 cells. C: Phagocytosed WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains in RAW264.7 cells. D: Viability evaluation of WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains survived in whole blood of mice for 1 h. E: Virulence determination of WT, Δtrr and $c\Delta trr$ strains in BALB/c mice. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$.

本研究成功构建致病性猪链球菌 2 型 *trr* 基因缺失株及回补株, 并以此为基础, 探讨 *trr* 在 SS2 的胁迫耐受性、毒力和致病中的潜在作用。结果发现 Δtrr 菌株在氧化应激、高温和酸性诱导的微环境下的存活率较亲本型菌株显著升高, 提示 *trr* 基因可能通过一个复杂调控网络来影响细菌应激耐受能力。据 Ritz 等^[23] 报道, 大肠杆菌在缺乏硫氧还蛋白 Trx1 和 Trx2 基因后, 其细胞质氧化还原电位更易被氧化, 诱导包括过氧化氢酶的激活, 并导致对 H_2O_2 应激反应抗性更高^[23]。大肠杆菌 Trx1 与许多参与细菌氧化应激反应或调控氧化应激反应的蛋白质(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶 I、烷基氢过氧化物还原酶、铁摄取调节蛋白和水合酶等)关联密切^[24]。细菌黏附是 SS2 定殖于宿主的关键起始步骤, 其通过荚膜、菌毛等胞外结构以及表达定位于细菌表面的黏附素蛋白来实现。介导 SS2 对宿主细胞黏附或侵袭过程的关键因子正在逐步挖掘, 如甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GADPH)可以与宿主上皮细胞结合, 促进 SS2 的黏附过程^[25]。研究发现: SS2-*trr* 基因缺失会导致细菌对宿主细胞黏附与侵袭能力减弱, 说明 TRR 因子参与 SS2 对细胞的黏附与侵袭过程。*S. pneumoniae* 中氧化还原关键分子谷胱甘肽还原酶 GR 基因缺失, 也会导致缺失菌对宿主细胞的黏附和侵袭能力显著下降^[26]。相较于亲本株, Δtrr 对小鼠吞噬细胞的抗吞噬能力显著降低, 但并不会影响小鼠全血清清除 SS2 的能力。小鼠活体致病试验发现 *trr* 缺失菌对小鼠毒力减弱, 推测可能与细菌黏附、侵袭作用降低有关。后续试验可对 *trr* 基因调控的毒力因子及调控的分子机制进行深入探索。

综上所述, 本研究阐明了猪链球菌 2 型 TRR 介导的生物学功能, 发现其参与细菌应激

调节作用, 介导 SS2 黏附、侵袭等致病过程, 可能是一种新的潜在毒力因子。关于猪链球菌 2 型硫氧还蛋白系统在氧化应激中发挥的具体作用、参与的氧化应激调节与致病机制等, 仍有待深入研究。

REFERENCES

- [1] NOMOTO R, MARUYAMA F, ISHIDA S, TOHYA M, SEKIZAKI T, OSAWA R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt_2): 438-443.
- [2] JANET EH, GOTTSCHALK M, BROUSSEAU R, HAREL J, HEMMINGSEN SM, GOH SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*[J]. Veterinary Microbiology, 2005, 107(1/2): 63-69.
- [3] 陆承平. 猪链球菌病与猪链球菌 2 型[J]. 科技导报, 2005, 23(9): 9-10.
LU CP. Swine streptococcosis and *Streptococcus suis* type 2[J]. Science & Technology Review, 2005, 23(9): 9-10 (in Chinese).
- [4] SEGURA M. *Streptococcus suis* research: progress and challenges[J]. Pathogens, 2020, 9(9): 707.
- [5] TANG JQ, WANG CJ, FENG YJ, YANG WZ, SONG HD, CHEN ZH, YU HJ, PAN XZ, ZHOU XJ, WANG HR, WU B, WANG HL, ZHAO HM, LIN Y, YUE JH, WU ZQ, HE XW, GAO F, KHAN AH, WANG J, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(5): e151.
- [6] TORRES MA, JONES JDG, DANGL JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 373-378.
- [7] STAERCK C, GASTEBOIS A, VANDEPUTTE P, CALEND A, LARCHER G, GILLMANN L, PAPON N, BOUCHARA JP, FLEURY MJJ. Microbial antioxidant defense enzymes[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 110: 56-65.
- [8] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, COLLET JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(7): 385-396.
- [9] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant

- system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75-87.
- [10] 陆金苗, 韦娜娜, 周金林. 硫氧还蛋白还原酶结构与功能研究进展[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(9): 79-83. LU JM, WEI NN, ZHOU JL. Progress on structures and functions of thioredoxin reductase[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(9): 79-83 (in Chinese).
- [11] HOLMGREN A. Thioredoxin[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1985, 54: 237-271.
- [12] ZELLER T, KLUG G. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes[J]. *Naturwissenschaften*, 2006, 93(6): 259-266.
- [13] COUTO N, WOOD J, BARBER J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 95: 27-42.
- [14] FELIX L, MYLONAKIS E, FUCHS BB. Thioredoxin reductase is a valid target for antimicrobial therapeutic development against gram-positive bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 663481.
- [15] 赖芸, 占冬波, 蒋小武. 猪链球菌 2 型硫氧还蛋白还原酶多克隆抗体制备与亚细胞定位分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(4): 410-414. LAI Y, ZHAN DB, JIANG XW. Preparation of polyclonal serum and subcellular localization analysis of thioredoxin reductase in *Streptococcus suis* type 2[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2022, 17(4): 410-414 (in Chinese).
- [16] LIU HZ, FU H, JIANG XW, LIAO XY, YUE M, LI XL, FANG, WH. PrsA contributes to *Streptococcus suis* serotype 2 pathogenicity by modulating secretion of selected virulence factors[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 236: 108375.
- [17] JIANG XW, ZHU LX, ZHAN DB. Deletion of lacD gene affected stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Journal of Microbiology*, 2022, 60(9): 948-959.
- [18] SALEH M, BARTUAL SG, ABDULLAH MR, JENSCH I, ASMAT TM, PETRUSCHKA L, PRIBYL T, GELLERT M, LILLIG CH, ANTELMANN H, HERMOSO JA, HAMMERSCHMIDT S. Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* surface thioredoxin-fold lipoproteins crucial for extracellular oxidative stress resistance and maintenance of virulence[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2013, 5(12): 1852-1870.
- [19] RIBES S, ABDULLAH MR, SALEH M, HANISCH UK, NAU R, HAMMERSCHMIDT S. Thioredoxins and methionine sulfoxide reductases in the pathophysiology of pneumococcal meningitis[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2016, 214(6): 953-961.
- [20] UZIEL O, BOROVIK I, SCHREIBER R, COHEN G, AHARONOWITZ Y. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(2): 326-334.
- [21] CHENG CY, DONG ZM, HAN X, WANG H, JIANG L, SUN J, YANG YC, MA TT, SHAO CY, WANG XD, CHEN ZW, FANG WH, FREITAG NE, HUANG HR, SONG HH. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [22] LU H, LU WJ, ZHU YW, WANG CC, SHI LM, LI XD, WU ZY, WANG GY, DONG WQ, TAN C, LIU ML. Aurafin has advantages over first-line drugs in the treatment of severe *Streptococcus suis* infections[J]. *Antibiotics*, 2020, 10(1): 26.
- [23] RITZ D, PATEL H, DOAN B, ZHENG M, ÅSLUND F, STORZ G, BECKWITH J. Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(4): 2505-2512.
- [24] KUMAR JK, TABOR S, RICHARDSON CC. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(11): 3759-3764.
- [25] BRASSARD J. Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 102(1/2): 87-94.
- [26] POTTER AJ, TRAPPETTI C, PATON JC. *Streptococcus pneumoniae* uses glutathione to defend against oxidative stress and metal ion toxicity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(22): 6248-6254.