

## 猪链球菌 2 型 89K 毒力岛研究进展

朱静<sup>1,2</sup> 王长军<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

(2. 南京医科大学 基础医学院 江苏 南京 210029)

**摘要:** 高致病性猪链球菌 2 型的致病机制仍是未解之谜。毒力岛不仅赋予病原菌特殊的致病能力, 而且在细菌的适应性进化过程中扮演重要角色。对猪链球菌 2 型 89K 毒力岛功能性基因的深入剖析有助于更全面地掌握病原菌的致病特性。综述了猪链球菌 2 型 89K 毒力岛的结构与进化过程, 以及国内外对毒力岛中二元信号转导系统、IV 型分泌系统、ABC 转运蛋白、毒素-抗毒素系统等重要基因的研究进展, 力图从基因水平为猪链球菌 2 型的致病机制寻找突破口。

**关键词:** 猪链球菌, 2 型, 89K, 毒力岛, 进展

## Research progress on 89K pathogenicity island of *Streptococcus suis* serotype 2

ZHU Jing<sup>1,2</sup> WANG Chang-Jun<sup>1,2\*</sup>

(1. Research Institute for Medicine of Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

(2. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

**Abstract:** The pathogenic mechanism of *Streptococcus suis* serotype 2 is still unsolved. Pathogenicity island not only gives pathogen special ability of pathogenic but also plays an important role in bacterial evolution process. Thorough analysis of the functional genes in 89K pathogenicity island contributes to a more comprehensive grasp of the characteristics of

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170124, 30972638, 81071317, 81171527, 81172794); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2011097, BK2011098)

\*通讯作者: Tel: 86-25-80867003; ✉: science2008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-08-30; 接受日期: 2012-10-24

*Streptococcus suis* serotype 2. This paper summarized the structure and evolution process of 89K pathogenicity island and the research progress of domestic and foreign, including in two-component signal transduction system, type IV secretion system, ATP-binding cassette transporter protein, toxin-antitoxin system and other important genes, trying in gene level to find a breakthrough in pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2.

**Keywords:** *Streptococcus suis*, Serotype 2, 89K, Pathogenicity island, Research progress

细菌基因组中存在某些可在不同菌株之间水平转移的基因片段, 统称为基因组岛(Genomic island)。毒力岛(Pathogenicity islands, PAI)是一种特殊的基因组岛, 一般为分子量大(>30 kb)、载有多个毒力基因、不稳定的染色体 DNA 片段, 可编码细菌的分泌系统、信号传导系统和调节系统等。常与 tRNA 基因或插入序列相连, 一般存在于强毒株中, 而在相关弱毒株或无毒株中鲜有分布。PAI 的细菌谱较广, 可通过基因水平转移, 从一种病原菌转移到另一种细菌, 并构建新的基因组岛或 PAI。大肠杆菌中已发现 5 个毒力岛, 其中肠致病性大肠杆菌(EPEC)携带肠细胞脱落位点毒力岛(LEE)。该毒力岛的获得使大肠杆菌获得致病力, EPEC 与宿主细胞间的相互作用由简单的粘附变为细菌对宿主细胞多步骤的损伤过程<sup>[1]</sup>。

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)属于革兰氏阳性 B 组链球菌, 是一种重要的人畜共患传染病病原菌。1998 年和 2005 年我国江苏、四川两省分别暴发大规模 SS2 感染猪和人的公共卫生事件中, 患者临床上出现罕见的链球菌中毒性休克综合征(Streptococcal toxic shock syndrome, STSS), 致死率高, 引起国内外的高度关注<sup>[2]</sup>。对国内这两次疫情分离鉴定的流行菌株/强毒株 98HAH12、05ZYH33 进行全基因组测序和比较基因组学分析, 发现均携带一个独特的长约 89 kb 的基因片段, 而在国内无毒株、国外致病株和国际血清型参考株 P1/7 中未检测到该结构。该 89 kb 片段在 GenBank 中的序号为

05SSU0903–05SSU0981, 被命名为 89K 毒力岛(PAI<sub>89K</sub>)。PAI<sub>89K</sub> 的发现, 为揭示我国 SS2 高致病性, 尤其是引发 STSS 的分子机制开辟了方向<sup>[3]</sup>。本文对国内外 SS2 PAI<sub>89K</sub> 生物学特性研究进展做一综述。

## 1 SS2 PAI<sub>89K</sub> 的结构与进化

89 kb 片段具有的以下 6 个结构特征提示 89K 片段通过基因水平转移而来, 具有毒力岛的特性: 长约 89 kb, 在毒力岛 20–100 kb 的长度范围内; 位于高度保守 50S 核糖体基因 3'-端, 类似于一般情况下毒力岛位于细菌染色体的 tRNA 位点内或附近; GC 含量为 36.8%, 明显低于全基因组的 41.1%; 含有分泌系统、信号传导系统和调节系统基因; 含有众多与基因移动相关的组分: 如转座子、整合酶、切离酶等; 仅存在于强毒株 98HAH12 与 05ZYH33 中, 不存在于无毒株中。毒力岛的基本结构<sup>[4]</sup>如图 1 所示。

在 GenBank 中进行序列比对显示 SS2 PAI<sub>89K</sub> 的同源序列分布在 30 多种不同的细菌中。荷兰无毒株 T15 中检测到两个区域, 与 PAI<sub>89K</sub> 具有相似多态性<sup>[5]</sup>; 典型北美毒株 89/1591 中发现了约 30 kb 的片段<sup>[6]</sup>。这表明 98HAH12 与 05ZYH33 所含 89K 序列的形成存在一个进化过程, 并非一个形成已久的完整序列。

有分析认为, SS2 PAI<sub>89K</sub> 序列存在 4 个保守区, 中间插入了 3 个非保守区及一段 Tn916 转座子, 表现为异源序列相嵌合的结构特征<sup>[7]</sup>。以 PAI<sub>89K</sub>

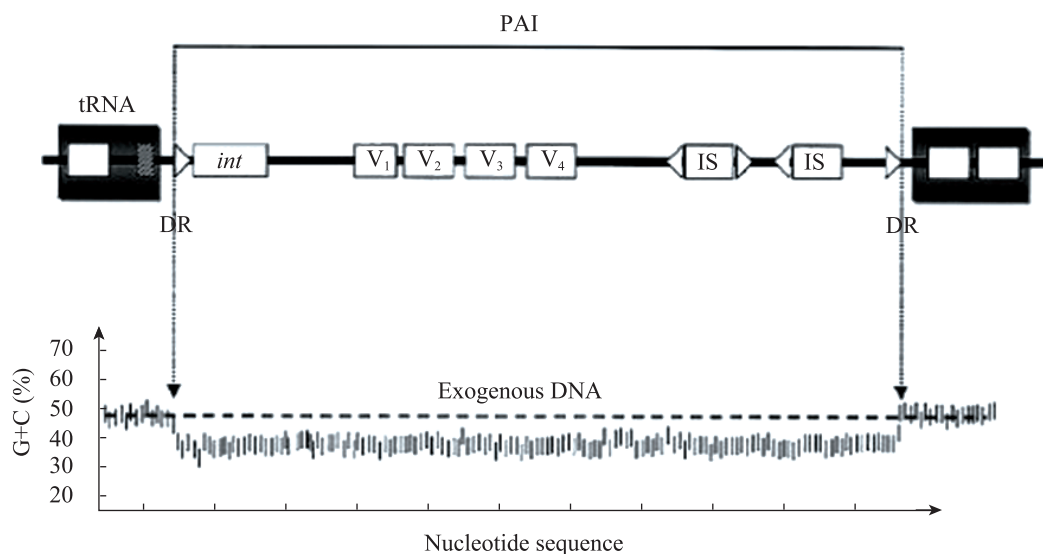


图 1 毒力岛的基本结构示意图

Fig. 1 General structure of PAI

注: DR: 同向重复序列; *int*: 整合酶基因; IS: 插入序列;  $V_1$ – $V_4$ : 毒力基因。

Note: DR: Direct repeat; *int*: Integrase gene; IS: Insertion sequence;  $V_1$ – $V_4$ : Virulence gene.

的各 ORF 作为搜索序列, 在蛋白质数据库 Uniprot 中进行比对, 可得同源蛋白总计 3 000 余条。保守区主要分布在链球菌属细菌中; 非保守区分布覆盖链球菌、粪肠球菌、芽孢杆菌、葡萄球菌等 50 余个菌种的 200 多个菌株。推测保守区在祖先状态时是一个连续整体, 不同来源的非保守区经过多次水平转移和重组事件插入到保守区之间, 形成了致病岛的嵌合结构。

SS2 PAI<sub>89K</sub> 能利用自身的 IV 型分泌系统瞬时切离形成环状染色质, 经转移后又能在整合酶的作用下在基因组特异性位点重新整合<sup>[8]</sup>。这种切离-整合的频率为  $10^{-6}$ 。通过这种进化机制, 无毒或低毒菌株发生了毒力变异。这是首次在革兰氏阳性菌中发现由 IV 型分泌系统介导基因水平转移而获得的毒力岛。当毒力岛能够复制并在菌株进行自动传播时, 实际上就意味着它是一个整合的质粒、接合型转座子或噬菌体, 在进化方面极有意义。随后的研究在 PAI<sub>89K</sub> 两侧分别发现 15 bp 的正向重复序列, 含这段序列的菌株可与

毒力岛同源重组, 发生毒力转化。猪链球菌 1/2、2、3、7 及 9 型已证实含有这段特殊序列, 而 1 型证实不含这段序列<sup>[9]</sup>。

## 2 SS2 PAI<sub>89K</sub> 功能基因研究

功能分析发现 PAI<sub>89K</sub> 保守区与 DNA 片段的切离整合及水平转移相关; 非保守区主要参与了转运、转导系统及各种酶的合成。生物信息学预测该 PAI<sub>89K</sub> 含有多个与致病性相关的基因组分, 如 2 组二元信号转导系统、3–4 组细菌 IV 型分泌系统、3 组 ABC 转运系统、毒素-抗毒素系统、透明质酸酶、凝集素受体的编码基因等。

### 2.1 二元信号转导系统

二元信号转导系统 (Two-component signal transduction system, TCSTS) 是广泛存在于细菌中的跨膜信号传导机制。病原菌在感染宿主的过程中, 能通过该系统密切感受和响应体内外各种微环境的变化, 进而调节各种基因表达以完成其致病过程<sup>[10]</sup>。

05ZYH33 全基因组中含 15 组 TCSTS, 而在推定的 PAI<sub>89K</sub> 中存在 2 组。本课题组针对性的选择基因 05SSU0943-0944 为研究对象, 与唾液链球菌 SalK/R 有一定的同源性, 故命名为 SalK/SalR<sup>[11]</sup>。SalK/SalR 曾被报道与介导细菌分泌 Salivaricin (一种细菌素) 有关<sup>[12]</sup>, 而与细菌毒力的关系在这次研究中首次发现。SalK/SalR 的 GC 含量为 29.9%, 明显低于 89K 毒力岛(36.8%) 及 05ZYH33 全基因组(41.1%), 这也是毒力岛基因水平转移的重要证据。体外实验及动物实验结果显示, SalK/SalR 缺失的突变株在活体组织器官中定殖能力显著下降, 易被中性粒细胞所杀灭, 毒力缺失, 而 SalK/SalR 功能互补的菌株能恢复对动物的强致病性, 表明 SalK/SalR 对于 05ZYH33 的强致病性是必不可少的。基因芯片研究结果显示 SalK/SalR 的缺失会导致 26 个基因的转录出现显著的下调, 其中有 2 个可能是潜在的毒力因子。

但有学者构建了 89K TCSTS 05SSU0906-0907 插入失活突变株, 突变株的生物学特性和对小鼠的致病性与野生株相比差异不显著<sup>[13]</sup>。可能是因为突变株毒力由多种因素构成, 还需要其他实验方法, 例如猪模型做进一步验证。

## 2.2 IV 型分泌系统

细菌的分泌系统包括 I-VI 型, 其中, IV 型分泌系统(Type IV secretion system, T4SS)介导基因水平转移, 通过细菌间接合作用, 传递抗性基因和毒力基因; 还能转运效应蛋白质分子到宿主细胞, 参与细菌致病<sup>[14]</sup>。此外, T4SS 还可转运效应分子到宿主靶细胞, 在激发宿主产生过度的免疫炎症应答中起作用<sup>[15]</sup>。PAI<sub>89K</sub> 5'-端有 4 个基因组成的 T4SS 样系统, 与根瘤土壤杆菌的 VirB/VirD4 系统具有高同源性。

对 VirB4 同源的 T4SS 样系统关键基因 05SSU0969, 获得基因敲除突变体后, 发现其毒

力与野生型相比有下降趋势<sup>[16]</sup>。这提示该基因直接或间接地与毒力相关, 可能参与某些大分子物质的运输, 为其提供能量。对基因 05SSU0969 和 05SSU0973 进行敲除, 分别获得 virD4-89K 和 virB4-89K 缺失突变株, 结果显示缺失株细菌刺激宿主诱生细胞因子的能力显著减弱、引发宿主免疫应答的能力降低, 大大削弱了中国强毒株的高致病性<sup>[17]</sup>。表明 T4SS 样系统参与转运了某种未发现的能够刺激机体产生过度炎症性应答进而产生大量炎症因子释放的效应分子。

## 2.3 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter protein)是一大类膜整合蛋白, 主要通过物质转运作用参与生物的各种生理功能。目前已报道的与毒力相关的细菌中 ABC 转运蛋白通常与细菌在苛刻环境中的生存有关, 如在酿脓链球菌中与在巨噬细胞内存存有关的 SalY<sup>[18]</sup>。ABC 转运蛋白家族负责运输与 SS2 致病性高度相关的溶血素、蛋白酶、肽类抗生素等, 可能参与了引发 STSS<sup>[19]</sup>。

有学者对我国猪链球菌 PAI<sub>89K</sub> 上一个被注释为假想转运蛋白的基因进行了初步鉴定<sup>[20]</sup>, 将该假想转运蛋白命名为 89k/pTP, 生物信息学分析显示 89k/pTP 可能属于 ABC 转运蛋白家族。89k/pTP 基因与 ABC 转运蛋白 05SSU0911 近邻, 其编码的蛋白很可能与 05SSU0911 编码的蛋白相互作用, 形成猪链球菌的一个转运复合体, 参与物质的运输, 从而根据宿主环境直接或间接地调节毒力。对 89k/pTP 基因进行插入失活后用小鼠感染模型比较野生株和 89k/pTP 突变株的毒力, 结果显示突变株毒力降低, 在小鼠体内明显受抑制。此后, 有研究构建了 ABC 转运蛋白 05SSU0910 敲除突变体<sup>[21]</sup>, 并初步分析其活性, 然而突变株的生物学活性和对小鼠的致病性与野生株相比差异不显著。

## 2.4 毒素-抗毒素系统

毒素-抗毒素系统(Toxin-antitoxin system, TA)由不稳定的抗毒素蛋白(Antitoxin)与稳定的毒素蛋白(Toxin)共表达组成。毒素蛋白通常抑制机体生长, 抗毒素蛋白与其形成复合体以中和毒性。在营养缺乏等不良生长条件下, 不稳定的抗毒素蛋白减少, 导致细菌的生长抑制和死亡。近年研究发现 TA 可参与到基因组岛的稳定过程当中<sup>[22]</sup>。

05ZYH33 基因组序列经分析有 4 对 TA 系统存在, 其中 05SSU0936-0937 基因编码的 TA 系统位于 PAI<sub>89K</sub> 内, 与化脓链球菌 Epsilon-zeta 的 II 型毒素-抗毒素系统同源, 命名为 SezAT。SezAT 构成了一对有活性的 TA 系统, 其活性测定表明: SezT 为毒素蛋白, 抑制细菌生长; SezA 为抗毒素蛋白, 能中和 SezT 的毒性作用。基因敲除可获得 sezT 缺失株, 但 sezA 及整个 SezAT 系统的敲除突变株是致死性的, 这也从侧面反映了 SezAT 的活性<sup>[23]</sup>。SezAT 稳定 89K 毒力岛的功能, 还有待进一步研究。

## 2.5 其它功能基因

除了前述的多种功能基因外, SS2 PAI<sub>89K</sub> 上的基因还有许多未解的谜团。比如 05SSU0968 和 05SSU0971 编码的 IV 型分泌系统基因 VirB1 和 VirB6; 05SSU0946-0948 编码的 ABC 转运系统基因羊毛硫细菌素转运子; 05SSU0965 编码的凝集素受体等。

## 3 展望

细菌的基因进化过程中, 点突变、基因重组和基因水平转移是主要的推动因素。毒力岛的发现使人们对细菌毒力进化有了新的认识, 基因水平转移比单纯突变获得新基因更加快捷。细菌在短期内发生质与量的飞跃, 产生许多新的变种, 这种演变是细菌进化的关键。SS2 PAI<sub>89K</sub> 是一个不稳定的序列结构, 容易丢失已有的片段或再度

募集新片段, 处在动态变化的过程中。如此结构和功能上的调整, 很可能造成宿主菌致病、耐药性等的改变。在我们致力于研究外源 DNA 的获得对新病原菌产生的重要性时, 同样也不能忽视正常基因组片段的丢失对增强病原菌毒力所产生的影响。STSS 最初在化脓链球菌(GAS)散发感染中有报道, 在 GAS 中已阐明 STSS 的发病机制与 M 蛋白、超抗原等毒力因子有关, 但在 SS2 中未找到其同源的基因。这提示 SS2 在 PAI<sub>89K</sub> 的作用下, 其致病过程存在独特的分子机制。为了从整体水平研究 PAI<sub>89K</sub> 的致病作用, 学者们用高温、丝裂霉素 C、亚硝基胍 MNNG、电转化等各种诱导方法, 试图获得一株 PAI<sub>89K</sub> 缺失的 SS2 突变株, 都未能成功, 原因可能是 PAI<sub>89K</sub> 含有细菌生存所必需的重要调控基因, 基因敲除产生致死突变。应融合现代遗传学、免疫学和生物信息学等工具, 力求从全局和整体调控水平更深入地探索 SS2 PAI<sub>89K</sub>, 研究其致病机理, 为预防和治疗策略提供参考。

## 参 考 文 献

- [1] Aguilera L, Ferreira E, Giménez R, et al. Secretion of the housekeeping protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the LEE-encoded type III secretion system in enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2012, 44(6): 955-962.
- [2] Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Medicine, 2006, 3(5): e151.
- [3] Chen C, Tang JQ, Dong W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates[J]. PLoS One, 2007, 2(3): e315.
- [4] 王长军, 唐家琪. 病原菌毒力岛研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008(2): 265-270.
- [5] Wu ZW, Li M, Wang CJ, et al. Probing genomic

- diversity and evolution of *Streptococcus suis* serotype 2 by NimbleGen tiling arrays[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 219.
- [6] Feng YJ, Cao M, Wu ZW, et al. *Streptococcus suis* in Omics-Era: where do we stand[J]. Bacteriology and Parasitology, 2011, S2-001.
- [7] 胡力文, 邹凌云, 倪青山, 等. 2型猪链球菌89K致病岛进化途径分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(6): 467-472.
- [8] Li M, Shen X, Yan J, et al. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(6): 1670-1683.
- [9] Zhang AD, Yang M, Hu P, et al. Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 523.
- [10] Stephenson K, Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2002, 2(5): 507-512.
- [11] Li M, Wang CJ, Feng YJ, et al. SalK/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2080.
- [12] Upton M, Tagg JR, Wescombe P, et al. Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(13): 3931-3938.
- [13] 李文君, 袁媛, 郑玉玲. 猪链球菌2型双组分信号转导系统 gene0906-0907插入失活突变体的构建及活性分析[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(3): 232-236.
- [14] Takamatsu R, Teruya H, Takeshima E, et al. Molecular characterization of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in T cells[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 127.
- [15] Juhas M, Crook DW, Hood DW. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence[J]. Cellular Microbiology, 2008, 10(12): 2377-2386.
- [16] 郭洁, 骈亚亚, 郑玉玲, 等. 2型猪链球菌 gene0969基因敲除突变体的构建及毒力分析[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(3): 347-350.
- [17] Zhao Y, Liu GK, Li S, et al. Role of a type IV-like secretion system of *Streptococcus suis* 2 in the development of streptococcal toxic shock syndrome[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2011, 204(2): 274-281.
- [18] Phelps HA, Neely MN. SalY of the *Streptococcus pyogenes* lantibiotic locus is required for full virulence and intracellular survival in macrophages[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(9): 4541-4551.
- [19] Davidson AL, Dassa E, Orelle C, et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(2): 317-364.
- [20] 袁媛, 路玲玲, 李文君. 2型猪链球菌假想转运蛋白89k/pTP与毒力的相关分析[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 685-688.
- [21] 骈亚亚, 郭洁, 郑玉玲, 等. 猪链球菌2型ABC转运蛋白 gene0910敲除突变体的构建及活性分析[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(1): 6-10.
- [22] Wozniak RAF, Waldor MK. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element[J]. PLoS Genetics, 2009, 5(3): e1000439.
- [23] 王敏, 李明, 钟秋, 等. 高致病性2型猪链球菌毒素-抗毒素系统 SezAT 的鉴定与活性研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 191-202.