

研究报告

核糖体蛋白 SA 介导猪链球菌 2 型毒力因子烯醇化酶损伤宿主细胞线粒体

杜苏兰¹, 张付贤¹, 孙毅², 刘峰¹, 姜合祥^{*2}, 雷连成^{*1,2}

1 长江大学动物科学学院, 湖北 荆州 434020

2 吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062

杜苏兰, 张付贤, 孙毅, 刘峰, 姜合祥, 雷连成. 核糖体蛋白 SA 介导猪链球菌 2 型毒力因子烯醇化酶损伤宿主细胞线粒体[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2063-2075.

DU Sulan, ZHANG Fuxian, SUN Yi, LIU Feng, JIANG Hexiang, LEI Liancheng. Ribosomal protein mediates *Streptococcus suis* serotype 2 virulence factor enolase to damage host cell mitochondria[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2063-2075.

摘要:【背景】正常生理状况下核糖体蛋白 SA (ribosomal protein SA, RPSA)主要在细胞内表达,参与多种细胞功能。在发生感染性疾病时, RPSA 往往会异位于胞膜,介导微生物的感染。【目的】全面揭示 RPSA 在猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)感染宿主过程中的作用。【方法】首先利用本课题组已有的脑脊液和血清蛋白组学数据库(SS2 脑膜炎感染模型的仔猪和健康仔猪),借助生物信息学手段分别筛选脑脊液和血清中的差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs),并对其涉及的信号通路进行分析。通过体外烯醇化酶(enolase, ENO)刺激宿主细胞,检测宿主细胞线粒体膜电位、钙离子含量和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等指标变化,揭示 RPSA 介导 SS2-ENO 对宿主细胞主要能量细胞器——线粒体功能的影响。【结果】生物信息学揭示 SS2 感染宿主后, RPSA 和相关蛋白显著富集在代谢和糖酵解/糖异生等能量有关通路。SS2-ENO 刺激导致宿主细胞线粒体膜电位下降、钙离子和 ROS 水平升高。封闭 RPSA 后缓解了 ENO 对线粒体膜电位、细胞活性氧和细胞内钙离子含量的影响。【结论】RPSA 介导 SS2 毒力因子 ENO 损伤宿主细胞线粒体功能。本研究丰富了 SS2 感染时 RPSA 的作用机制,为 SS2 脑膜炎疾病的防治提供了理论基础。

关键词:猪链球菌 2 型; 核糖体蛋白 SA; 蛋白质组学; 线粒体损伤; 脑膜炎

资助项目: 国家自然科学基金(32072823)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072823).

*Corresponding authors. E-mail: JIANG Hexiang, jianghx91@163.com; LEI Liancheng, leiliancheng@163.com

Received: 2022-11-03; Accepted: 2022-12-15; Published online: 2023-01-13

Ribosomal protein mediates *Streptococcus suis* serotype 2 virulence factor enolase to damage host cell mitochondria

DU Sulan¹, ZHANG Fuxian¹, SUN Yi², LIU Feng¹, JIANG Hexiang^{*2}, LEI Liancheng^{*1,2}

¹ College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434020, Hubei, China

² College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] Under normal physiological conditions, ribosomal protein SA is mainly expressed in cells and involved in a variety of cell functions. In the occurrence of infectious diseases, RPSA expresses in the cell membrane and mediates the infection of microorganisms. [Objective] To comprehensively reveal the role of RPSA in infection of hosts by *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2). [Methods] The available cerebrospinal fluid and serum proteomics database (piglets with meningitis induced by SS2 and healthy piglets) was used, and bioinformatics methods were employed to screen the differentially expressed proteins (DEPs) in cerebrospinal fluid and serum and the involved signaling pathways were summarized. The host cells were stimulated by enolase (ENO) *in vitro*, and the changes of mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ concentration, and reactive oxygen species were detected to reveal the effect of RPSA-mediated SS2-ENO on the main functions of the energy-generating organelle mitochondria in host cells. [Results] RPSA and related proteins were mainly enriched in energy-related pathways such as metabolism and glycolysis/gluconeogenesis after SS2 infection. SS2-ENO stimulation resulted in decreased mitochondrial membrane potential and increased Ca²⁺ level and ROS level in host cells. Blockade of RPSA alleviated the influence of ENO on mitochondrial membrane potential, ROS and Ca²⁺ concentration. [Conclusion] RPSA mediates the SS2 virulence factor ENO to damage host cell mitochondria. This study enriches the mechanism of RPSA in SS2 infection and provides a theoretical basis for the prevention and treatment of SS2 meningitis.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2; ribosomal protein SA; proteomics; mitochondrial damage; meningitis

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)是一种人畜共患病原菌, 它可以穿过宿主血脑屏障(blood brain barrier, BBB)侵入中枢神经系统, 导致猪和人的脑膜炎发生^[1]。

核糖体蛋白 SA (ribosomal protein SA, RPSA), 又称 37 kDa 层粘连蛋白受体前体(37LRP)、67 kDa 层粘连蛋白受体(67LR)或 P40 蛋白, 在细胞核、细胞质、细胞器、细胞膜和胞外囊泡中广泛表达^[2-3]。RPSA 定位的广泛性

预示了其多功能蛋白, 包括核糖体翻译、细胞迁移、细胞骨架重组等, 在转移性癌症、微生物感染、神经退行性疾病和发育畸形等疾病中具有非常重要的作用^[4]。

大量研究表明, RPSA 参与包括 SS2 在内多种病原微生物突破 BBB 的过程^[4]。目前, RPSA 已被认为是治疗神经系统感染的潜在靶点^[5]。本课题组的前期研究显示, SS2 毒力因子烯醇化酶(enolase, ENO)刺激脑微血管内皮细胞(brain

microvascular endothelial cells, BMECs), 通过结合 RPSA 激活 P38/ERK- EIF4E 信号途径, 诱导 BMECs 发生凋亡并破坏宿主 BBB^[6], 促进脑膜炎发生。本课题组最近的研究显示, SS2 感染以及毒力因子 ENO 刺激 BMECs 可以促进 RPSA 从胞内向胞膜转移, 介导了 ENO 诱导细胞凋亡的发生^[3]。

近年来, RPSA 发挥抗感染的功能被逐步揭示。口蹄疫病毒感染宿主细胞后, RPSA 能够通过抑制 MAPK 信号通路来阻止病毒复制^[7]。RPSA 的胞内结构域能够结合寨卡病毒的胞膜(E)蛋白, 以招募去泛素化酶 EIF3S5 的方式减弱 E 蛋白的泛素化, 从而抑制寨卡病毒感染^[8]。这些结果表明, RPSA 在不同病原感染过程中可能发挥不同的功能。因此, 全面揭示 RPSA 在 SS2 感染宿主过程中的作用具有重要意义。本研究利用生物信息学方法, 通过筛选蛋白共表达数据库和蛋白互作数据库预测 RPSA 共表达和互作相关蛋白, 揭示这些蛋白在 SS2 脑膜炎病理中参与的能量、代谢相关信号途径, 全面理解 RPSA 在 SS2 感染中的功能, 以期为后续 RPSA 的深入研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SpectraMax iD3 酶标仪, Molecular Devices 公司; 脑微血管内皮细胞 HCMEC/D3, 本实验室保存; RPMI 1640 培养基, Gibco 公司; 活性氧检测试剂盒、Fluo-4 AM、线粒体膜电位检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; RPSA 抗体, Proteintech 公司; 细胞六孔板, 广东洁特生物股份有限公司。

1.2 健康仔猪和 SS2 脑膜炎仔猪脑脊液和血清的蛋白组学分析

本课题组在前期建立了 SS2 感染仔猪的脑

膜炎模型, 并对 SS2 脑膜炎仔猪和健康仔猪的脑脊液和血清进行蛋白组学测序, 分析筛选了 SS2 脑膜炎仔猪的脑脊液和血清差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)^[9-10]。本研究使用 Metascape 在线软件(<http://metascape.org>)对脑脊液和血清的 DEPs 进行 gene ontology (GO)生物途径分析; 然后使用在线软件([https:// bioinfogp.cnb.csic.es/](https://bioinfogp.cnb.csic.es/))对蛋白组学数据进行韦恩图分析, 筛选脑脊液和血清蛋白质组学中共同的 DEPs, 并将这些蛋白定义为 SS2 脑膜炎相关蛋白; 最后使用 Cytoscape 软件对其进行 KEGG 分析和可视化分析。

1.3 生物信息学分析 RPSA 蛋白在 SS2 脑膜炎病理过程中的主要功能

使用数据库 (<https://www.innatedb.com/> 和 <http://iid.ophid.utoronto.ca/>)搜索 RPSA 的互作蛋白, 并分别命名为 RPSA I 和 RPSA II; 使用韦恩图分析 RPSA I 和 RPSA II, 并将二者的共同蛋白称为 RPSA 互作相关蛋白; 韦恩图分析 RPSA 互作相关蛋白、脑脊液 DEPs 和血清 DEPs 后, 对脑脊液和/或血清中差异表达的 RPSA 互作相关蛋白合并后使用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)进行蛋白互作分析和 KEGG 分析。同样地, 使用数据库 (<https://www.coexpedia.org/> 和 https://coexpresdb.jp/gene_coexpression/) 搜索与 RPSA 共表达的蛋白, 分别命名为 RPSA CI 和 RPSA CII, 并将二者的共同蛋白命名为 RPSA 共表达相关蛋白。韦恩图分析 RPSA 共表达相关蛋白、脑脊液 DEPs 和血清 DEPs 后, 对脑脊液或血清中差异表达的 RPSA 共表达相关蛋白合并后进行蛋白互作分析和 KEGG 分析。最后, 通过韦恩图分析进一步筛选和总结 SS2 致脑膜炎过程中在脑脊液和/或血清与 RPSA 既互作又共表达的蛋白。

1.4 细胞线粒体膜电位、钙离子含量和活性氧水平的检测

1.4.1 线粒体膜电位的测定

用 10、20 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ENO 蛋白分别刺激宿主细胞 12、24 和 36 h, 再将各组细胞用 PBS 清洗后, 装载 JC-1 探针(1 \times)避光孵育 20 min, 用 JC-1 缓冲液洗涤 2 次, 酶标仪检测荧光强度, 通过红绿荧光比值的变化来反映 ENO 刺激下宿主细胞线粒体膜电位的变化。本试验重复 3 次。

1.4.2 钙离子含量检测

用 10、20 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ENO 蛋白分别刺激宿主细胞 12、24 和 36 h, 再将各组细胞用 PBS 清洗后, 装载 Fluo-4 AM 探针(终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$)避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 酶标仪检测荧光强度, 本试验重复 3 次。

1.4.3 活性氧水平检测

用 10、20 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ENO 蛋白分别刺激宿主细胞 12、24 和 36 h, 再将各组细胞用 PBS 清洗后, 装载 DCFH-DA 探针(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 酶标仪检测荧光强度, 细胞内 DCFH-DA 荧光

强度反映活性氧的水平。本试验重复 3 次。

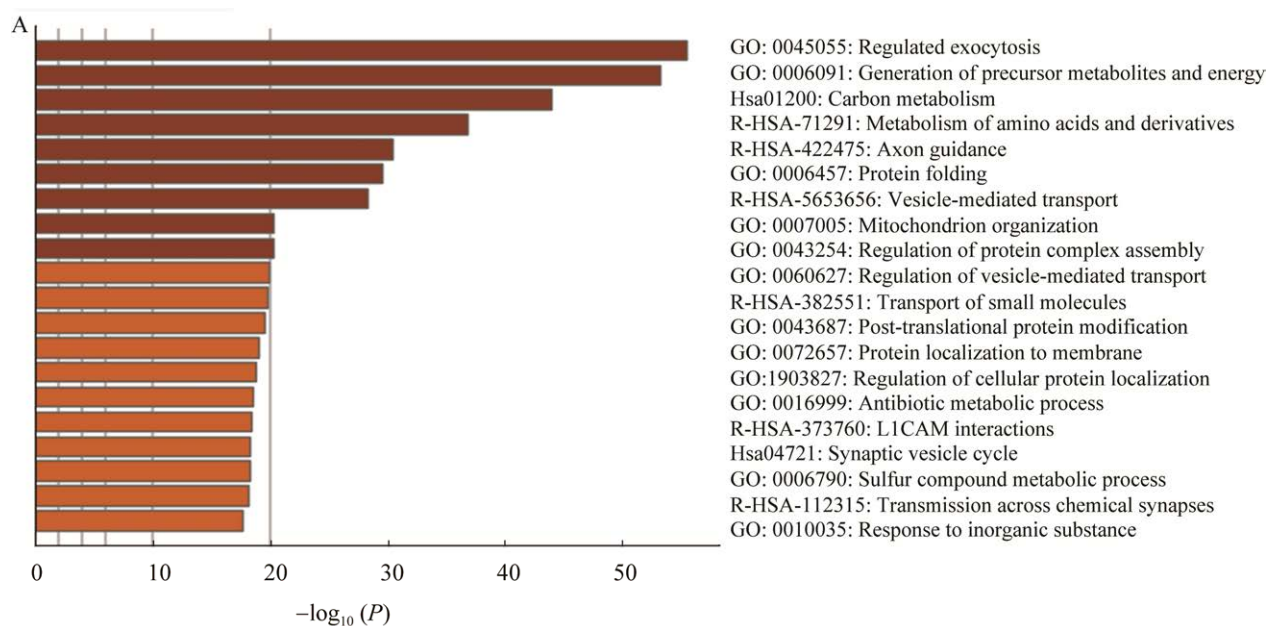
1.5 RPSA 介导 ENO 损伤宿主细胞线粒体功能

为了确定 RPSA 在宿主细胞线粒体损伤中的作用, 本试验将 HCMEC 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞长到 80%–90%, 加入终浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ 的 RPSA 特异性抗体处理细胞 1 h, 1 h 后 D-Hanks 清洗细胞后, 加入终浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ENO 蛋白刺激细胞, 根据 1.4 检测细胞线粒体膜电位、细胞钙离子含量和细胞活性氧含量。

2 结果与分析

2.1 SS2 脑膜炎仔猪脑脊液和血清应答的差异性

对脑脊液中的 DEPs 进行 GO 生物途径分析, 结果这些 DEPs 显著富集在调节胞吐、代谢、轴突导向、蛋白折叠和蛋白复合物组装等生物途径(图 1A)。而且, 与线粒体组织和代谢相关的 DEPs 大多显著下调(图 1B)。GO 分析血清中的 DEPs, 结果血清中的 DEPs 显著富集在调节胞吐、血小板活化、无机物应答和超纤维丝组装等



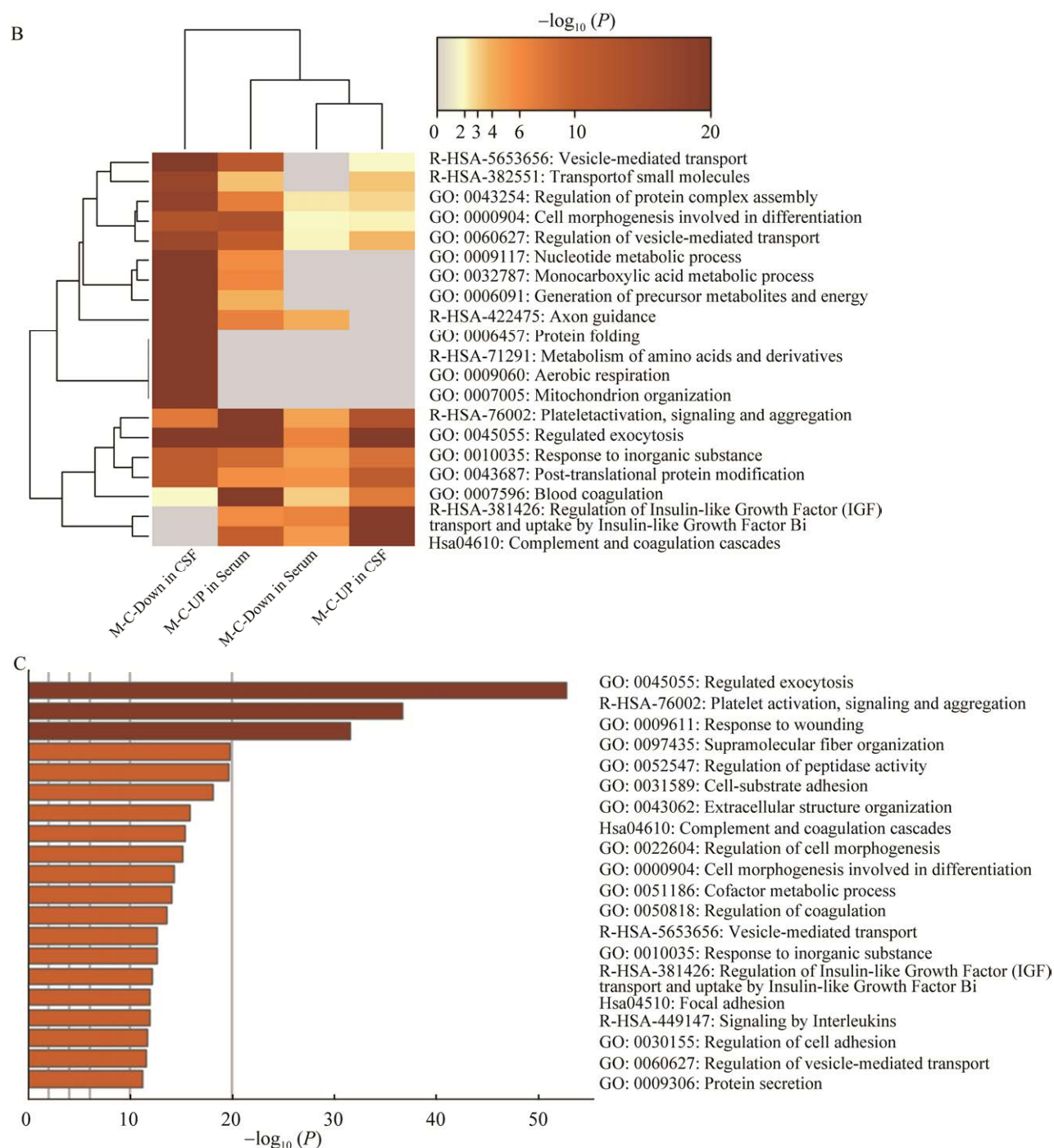


图 1 SS2 脑膜炎脑脊液和血清 DEPs 的 GO 生物途径差异性分析 A: 脑脊液 DEPs 的 GO 生物途径分析. B: 脑脊液和血清上调 DEPs 和下调 DEPs 的 GO 生物途径分析. C: 血清 DEPs 的 GO 生物途径分析. 每一行代表每个 GO 条目, 使用离散的色彩表示统计显著性, 颜色越深表示显著性越强, 灰色表示缺乏意义

Figure 1 Differential analysis of GO biological pathway of DEPs in SS2 meningitis cerebrospinal fluid. A: GO biopathway analysis of DEPs in cerebrospinal fluid. B: GO biopathway analysis of up-/down- regulated DEPs in cerebrospinal fluid and serum. C: GO biopathway analysis of DEPs in serum. One row per cluster represents each GO entry, which uses a discrete color scale to represent statistical significance. The darker the color, the greater the significance, and the gray color indicates a lack of significance.

生物途径(图 1C)。另外,与这些通路相关的 DEPs 大多显著上调,但是涉及血凝集和补体级联反应的相关 DEPs 在脑脊液和血清中大多都显著上调(图 1B),提示补体反应是脑组织清除病原菌的主要应答方式。

2.2 SS2 脑膜炎仔猪脑脊液和血清应答的共性

对 SS2 脑膜炎仔猪和健康仔猪的脑脊液和血清

分别进行比较,在脑脊液中筛选了 997 个 DEPs,而在血清中筛选了 316 个 DEPs,其中有 102 个 DEPs 在脑脊液和血清中都存在(图 2A)。进一步将筛选的脑脊液和血清共有的 DEPs 进行 KEGG 分析,发现这些蛋白主要富集的能量代谢相关通路主要有糖酵解/糖异生和胆固醇代谢等。同时,筛选出了 RHOA、ACTG1、DUSP3 和 APOE 等 cross-talk 蛋白分子,这些蛋白参与了不同的信号通路(图 2B)。

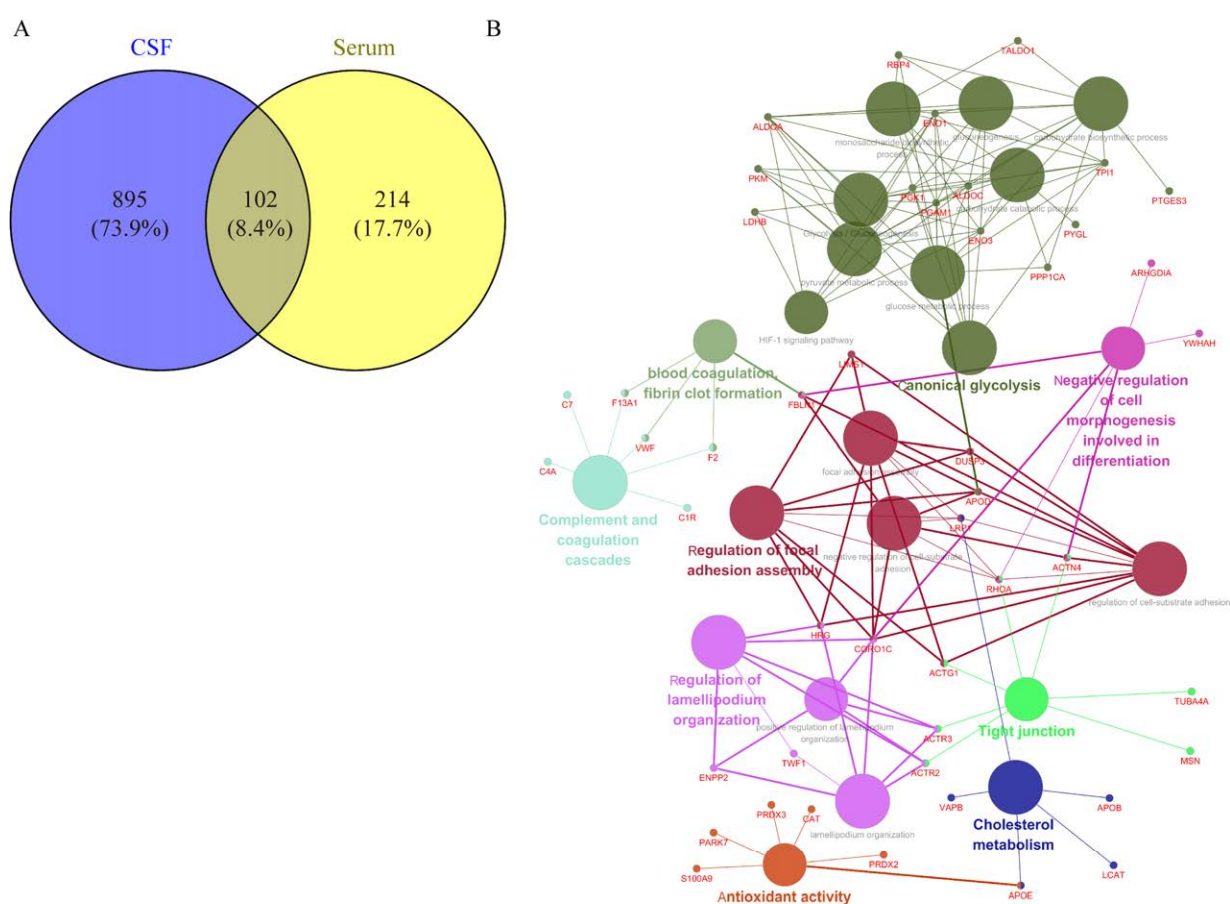


图 2 SS2 脑膜炎脑脊液和血清 DEPs 的 GO 生物途径共性分析 A: 脑脊液和血清 DEPs 的韦恩图分析(数字表示每组中 DEPs 的个数,交点表示各组共有的 DEPs 个数). B: 脑脊液和血清中共同差异表达蛋白的 KEGG 分析(不同的圆圈表示 DEPs 显著富集的信号通路,分支上的蛋白表示参与该信号通路的 DEP)

Figure 2 GO biological pathway commonality analysis of SS2 meningitis cerebrospinal fluid and serum DEPs. A: Venn diagram analysis of DEPs in cerebrospinal fluid and serum (the number in the Venn diagram shows the number of DEPs in each group, and the intersection represents the DEPs shared by each group). B: KEGG analysis of common DEPs from cerebrospinal fluid and serum (different circles indicate signal pathways where DEPs are enriched and proteins on branches indicate DEPs involved in the signaling pathway).

2.3 RPSA 共表达蛋白在 SS2 脑膜炎病理过程中的主要功能

使用 2 个数据库分别检索了 RPSA 共表达蛋白, 分别命名为 RPSA CI 和 RPSA CII。通过韦恩图分析, 共筛选了 263 个在 2 个数据库中固有的 RPSA 共表达蛋白(图 3A)。然后将 RPSA 共表达蛋白、脑脊液 DEPs 和血清 DEPs 进行韦恩图分析。在 102 个脑脊液和血清共同 DEPs 中, 有 HSP90AB1、ACTG1、LDHB 等 11 个 DEPs 与 RPSA 共表达。另外, EIF4A1、MYL6、PRDX1 等 6 个只存在于血清中 DEPs 与 RPSA 共表达, 55 个脑脊液中的 DEPs 与 RPSA 共表达(图 3B)。对这些蛋白进行互作网络可视化和 KEGG 分析, 发现这些蛋白在代谢、碳代谢和糖酵解等途径富集(图 3C)。

2.4 RPSA 互作蛋白在 SS2 脑膜炎病理过程中的主要功能

使用 2 个数据库分别检索了 RPSA 互作蛋白, 分别命名为 RPSA I 和 RPSA II。将这些 RPSA 互作蛋白进行韦恩图分析, 结果 147 个蛋白在 2 个数据库中固有(图 4A)。将共有的 RPSA 互作蛋白、脑脊液 DEPs 和血清 DEPs 进行韦恩图分析。在 102 个脑脊液和血清共同

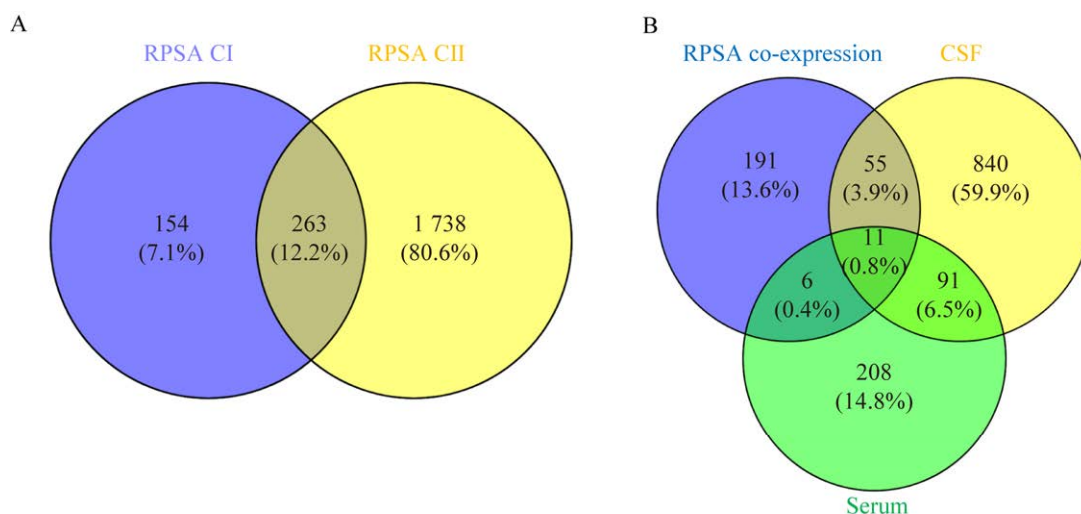
的 DEPs 中, 只有 HSP90AB1 与 RPSA 蛋白互作, 而在血清中有 EIF4A1、FN1、和 HSPA5 等 4 个 DEPs 与 RPSA 互作, 共有 34 个存在于脑脊液中的 DEPs 与 RPSA 互作(图 4B)。对这些蛋白进行互作网络可视化和 KEGG 分析, 结果互作的这些蛋白除了在阿尔茨海默病等神经性疾病中显著富集, 还与钙信号途径有关(图 4C)。

2.5 筛选 SS2 致脑膜炎过程中与 RPSA 既共表达又相互作用的蛋白

通过韦恩图分析并筛选了 SS2 致脑膜炎过程脑脊液和/或血清中与 RPSA 既存在共表达关系又相互作用的蛋白, 结果共筛选了 EIF4A1 等 16 个 DEPs 与 RPSA 存在互作及共表达关系(图 5)。

2.6 ENO 刺激损伤宿主细胞线粒体功能

用 JC-1 探针比较不同浓度 ENO 蛋白刺激不同时间对 HCMEC 细胞线粒体膜电位变化的影响, 结果显示, 当体外添加 20 $\mu\text{g/mL}$ 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ENO 蛋白刺激细胞 12 h 时, 细胞的 JC-1 多聚体/单体比值显著下降, 说明高剂量的 ENO 蛋白刺激宿主细胞会造成细胞线粒体膜电位下降(图 6A)。



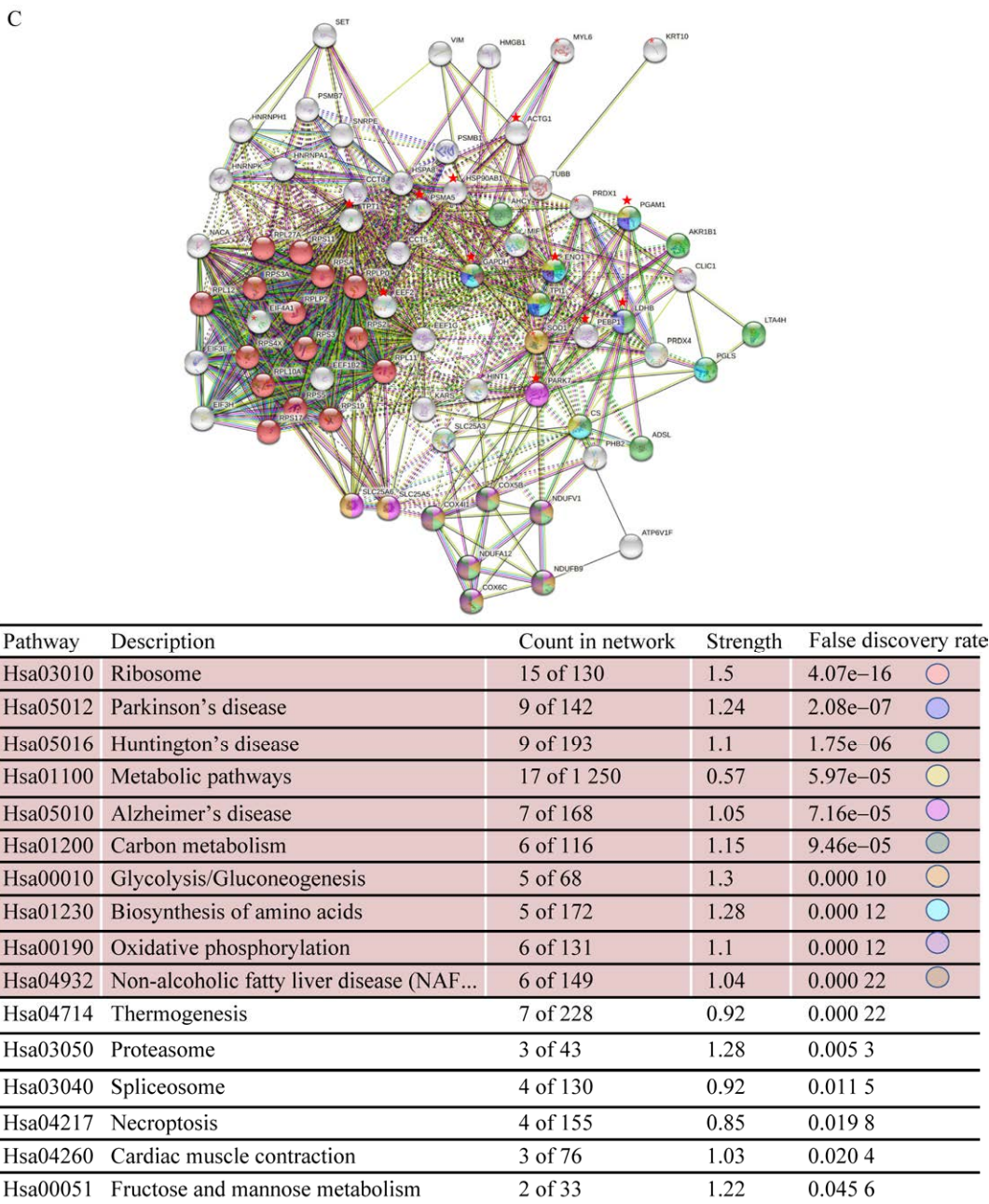


图 3 SS2 脑膜炎中 RPSA 共表达蛋白的筛选和功能分析 A: 来自两个独立数据库中 RPSA 共表达蛋白的韦恩图分析. B: RPSA 共表达相关蛋白、脑脊液 DEPs 和血清 DEPs 的韦恩图分析. C: 交互网络可视化脑脊液和血清中的 RPSA 共表达相关蛋白(★表示在脑脊液和血清中都显著表达, *表示在血清中显著表达;其余的表示在脑脊液中显著表达). D: KEGG 富集分析脑脊液和血清中的 RPSA 共表达相关蛋白

Figure 3 Screening and functional analysis of RPSA co-expressed proteins related with SS2 meningitis. A: Venn diagram analysis of RPSA co-expressed related proteins which from two independent databases. B: Venn diagram analysis of RPSA co-expressed related proteins and DEPs in cerebrospinal fluid and serum. C: The visualization of the interaction network of the RPSA co-expressed related proteins in the cerebrospinal fluid and serum (★ indicates significant expression in both cerebrospinal fluid and serum, * indicates significant expression in serum, and the rest means significant expression in cerebrospinal fluid). D: KEGG enrichment analysis of RPSA co-expressed related proteins in cerebrospinal fluid and serum.

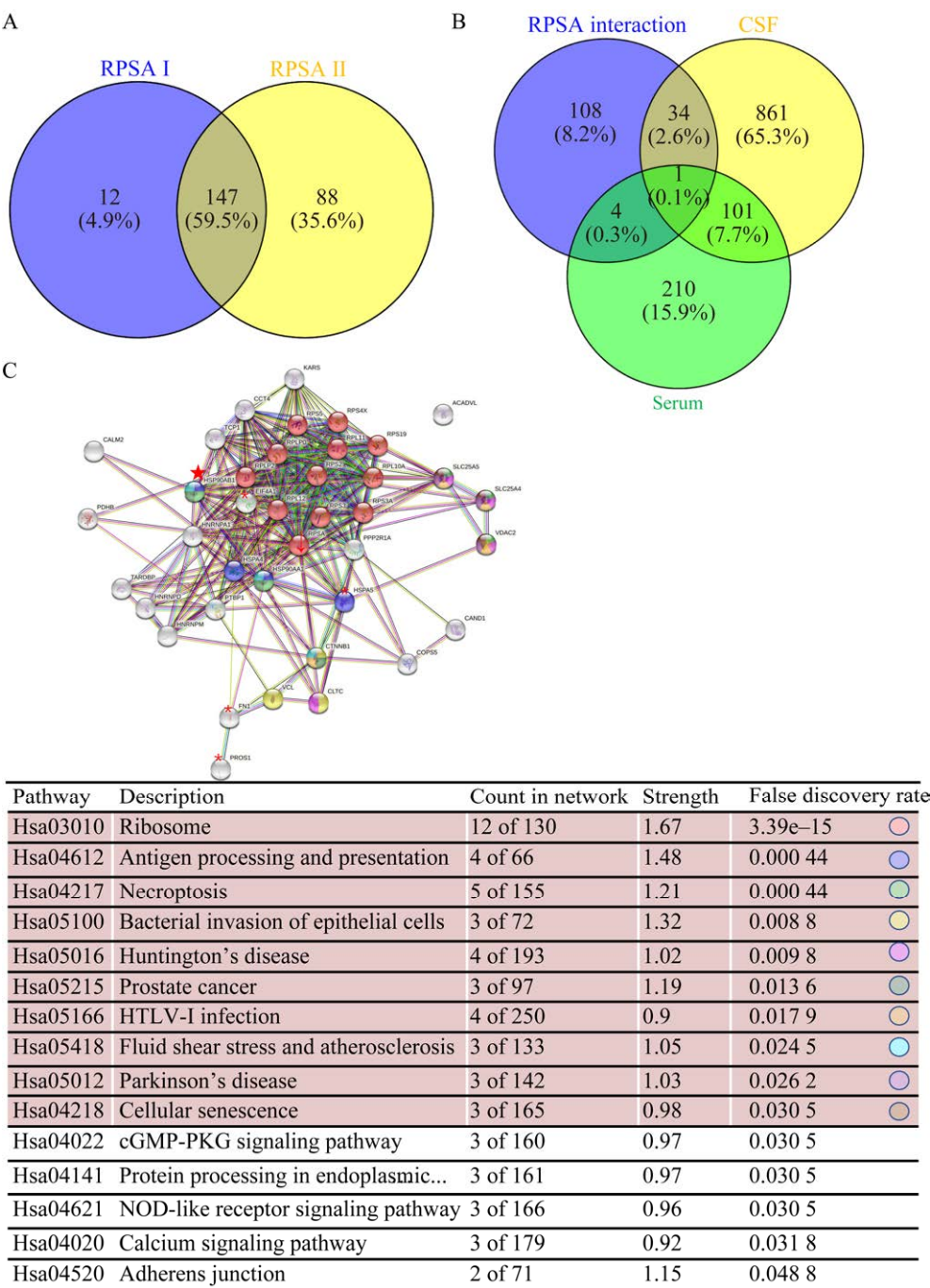


图 4 SS2 脑膜炎中 RPSA 互作蛋白的筛选和功能分析 A: 来自两个独立数据库中 RPSA 相互作用蛋白的韦恩图分析. B: RPSA 互作相关蛋白、脑脊液 DEPs 以及血清 DEPs 的韦恩图分析. C: 交互网络可视化脑脊液和血清中的 RPSA 互作相关蛋白(★表示在脑脊液和血清中都显著表达,*表示在血清中显著表达,其余的表示在脑脊液中显著表达). D: KEGG 富集分析脑脊液和血清中的 RPSA 互作相关蛋白

Figure 4 Screening and functional analysis of RPSA-interacting proteins related with SS2 meningitis. A: Venn diagram analysis of proteins that interact with RPSA from two independent databases. B: Venn diagram analysis of RPSA interaction related proteins and DEPs which are from cerebrospinal fluid and serum. C: The visualization of the interaction network showing the RPSA interaction related proteins in the cerebrospinal fluid and serum (★ marks significant expression in both cerebrospinal fluid and serum, * marks significant expression in serum, and the rest means significant expression in cerebrospinal fluid). D: KEGG enrichment analysis of RPSA interaction related proteins in cerebrospinal fluid and serum.

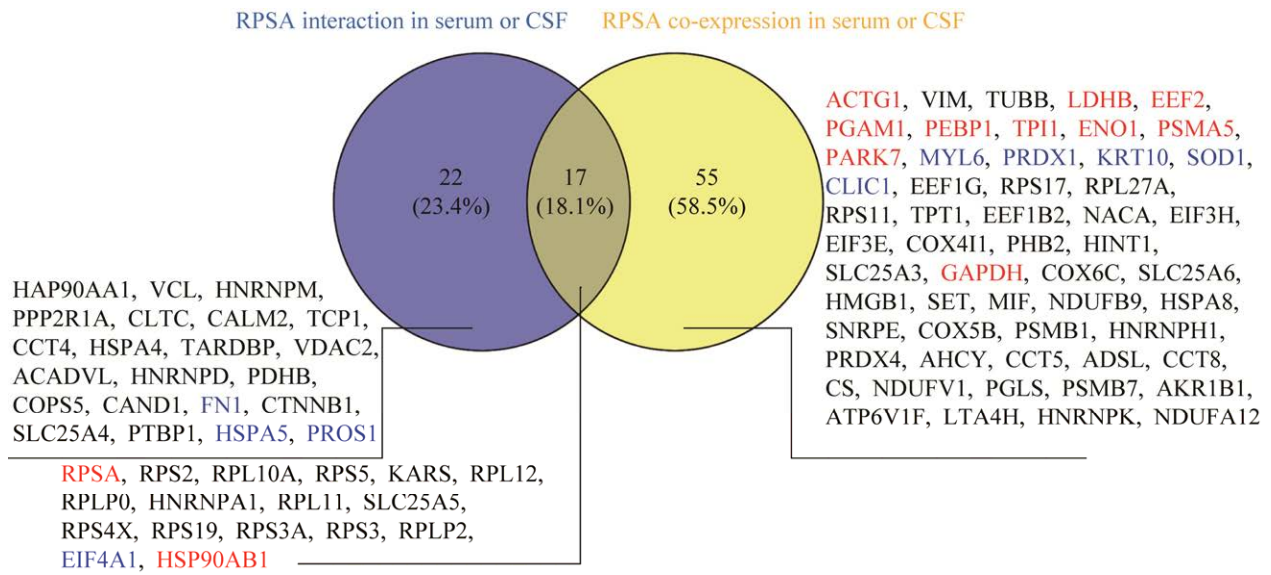


图5 韦恩图分析筛选SS2脑膜炎中与RPSA既互作又共表达的相关蛋白 红色字体表示在脑脊液和血清中都存在的蛋白, 蓝色字体表示只在血清中存在的蛋白, 其余表示只在脑脊液中存在的蛋白

Figure 5 The Venn diagram analysis of the proteins in related with SS2 meningitis that both interacted and co-expressed with RPSA. Abbreviations in red font indicates expressed in both cerebrospinal fluid and serum, ones in blue font indicates expressed proteins in serum, and the rest are of serum origin.

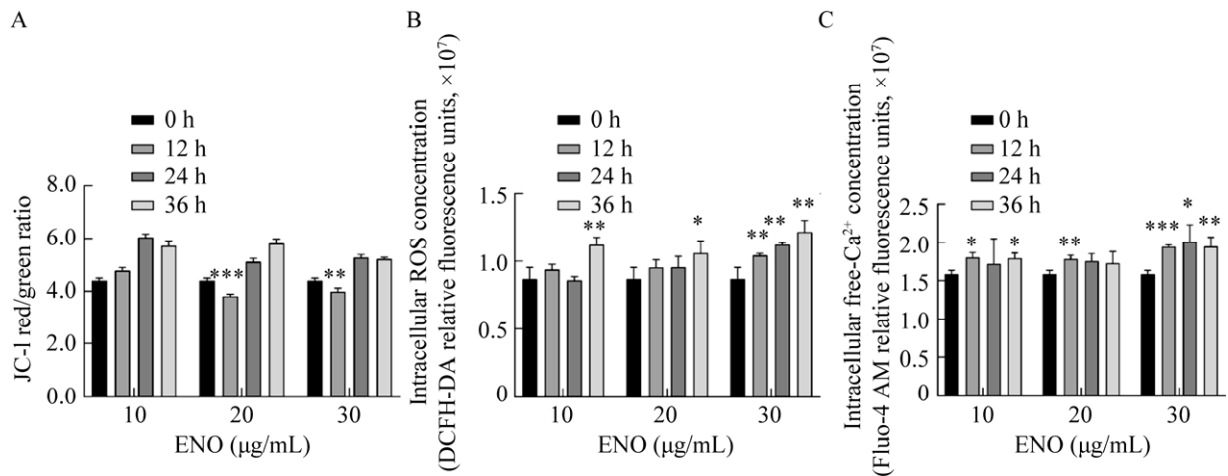


图6 ENO对细胞线粒体膜电位、活性氧及 Ca^{2+} 含量的影响 A: 细胞线粒体膜电位检测. B: 细胞活性氧含量检测. C: 细胞 Ca^{2+} 含量检测. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 6 Effect of ENO on cell mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, and Ca^{2+} concentration. A: Detection of cell mitochondrial membrane potential. B: Detection of cell reactive oxygen species content. C: Detection of cell Ca^{2+} content. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

不同浓度的 ENO 蛋白作用后, 细胞的 ROS 含量和游离 Ca^{2+} 含量也均发生变化, 即加 ENO 蛋白刺激组的 ROS 和 Ca^{2+} 明显高于空白组, 而且随着 ENO 蛋白浓度和作用时间的增加, ROS 和 Ca^{2+} 含量逐渐增加, 呈一定的时间剂量效应关系(图 6B、6C)。

2.7 RPSA 介导 ENO 损伤宿主细胞线粒体功能

细胞经 RPSA 特异性抗体封闭 1 h 后, 用 ENO 蛋白刺激 12 h, 检测细胞线粒体膜电位、ROS 含量和游离 Ca^{2+} 含量。结果显示, RPSA 封闭之后可以减缓 ENO 对线粒体膜电位的影响, 但无显著性(图 7A); 可显著降低 ENO 蛋白升高的 ROS 含量($P<0.05$)和胞内 Ca^{2+} 浓度($P<0.01$) (图 7B、7C)。表明 RPSA 介导了 ENO 对细胞线粒体功能的损伤。

3 讨论与结论

本研究通过生物信息学方法比较了 SS2 感

染前后仔猪脑脊液和血清应答的异同点, 筛选了脑脊液和血清中相同的 DEPs。将这些 DEPs 与 RPSA 相关蛋白(包括互作和共表达的相关蛋白)进行分析后, 总结了 RPSA 在 SS2 脑膜炎致病机理中可能发挥的功能, 为丰富 RPSA 的功能提供了理论参考。

脑组织的供能来源主要是葡萄糖, 而糖酵解和糖的有氧氧化是脑组织供能的主要方式^[11]。本研究对脑脊液 DEPs 的 KEGG 富集分析显示, 在 SS2 感染后脑脊液中涉及糖酵解/糖异生和氧化磷酸化的 DEPs 显著下调。不仅如此, 脑脊液中代谢相关的 DEPs 也大多显著下调。这些结果表明, SS2 致脑膜炎过程中脑脊液的代谢水平发生显著变化, 而且能量供应途径可能受到损伤。众所周知, 线粒体是细胞内的能量工厂, 为细胞生命活动提供所需的 ATP^[12]。本研究发现 SS2 感染后线粒体相关的 DEPs 在脑脊液中显著下调, 使用 SS2 毒力因子 ENO 对脑微血管内皮细胞进行刺激, 结果显示宿主细胞的线粒体

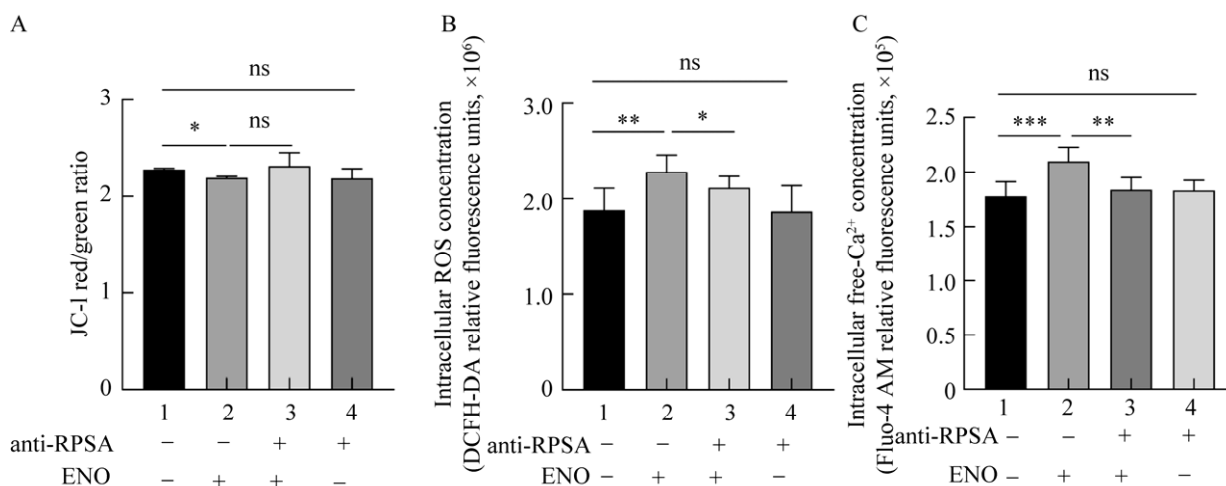


图 7 RPSA 对 ENO 损伤细胞线粒体的影响 A: 细胞线粒体膜电位检测. B: 细胞活性氧含量检测. C: 细胞 Ca^{2+} 含量检测. ns: $P\geq 0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 7 Effect of RPSA on mitochondria injured by ENO. A: Detection of cell mitochondrial membrane potential. B: Detection of cell reactive oxygen species. C: Detection of cell Ca^{2+} content. ns: $P\geq 0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

功能明显发生损伤。因此, 猜测仔猪脑脊液能量供应的受损可能与线粒体损伤有关。另外, 线粒体作为细胞的能量工厂, 维持着细胞正常的代谢和功能, 而线粒体功能的损伤可能使细胞的代谢和功能紊乱, 导致细胞发生凋亡^[13]。因此, ENO 引起线粒体功能损伤可能是导致细胞凋亡的原因之一。封闭细胞表面 RPSA 蛋白可缓解 SS2 毒力因子 ENO 对细胞线粒体功能的损伤, 也可能进一步地缓解线粒体损伤造成的细胞凋亡, 这一猜想及其具体机制仍需进一步验证。

在脑脊液中, 宿主清除病原菌的方式主要是补体级联反应、吞噬、内吞和抗生素等^[14-15]。然而这些反应往往需要消耗能量, 所以能量供应不足可能会降低宿主脑脊液清除病原菌的效率。另外, 本研究发现在血清中糖酵解/糖异生相关 DEPs 显著上调, 同时与病原菌清除相关的 DEPs 大多也显著上调。因此, SS2 感染后血清对病原菌的清除往往更加强烈, 这可能是 SS2 感染导致宿主发生中毒性休克综合征的原因之一。从本研究可以看出脑脊液和血清针对 SS2 的应答反应表现出明显的差异性, 但其中的机制需要进一步研究。

本研究分析 SS2 脑膜炎仔猪脑脊液和血清中与 RPSA 密切相关的 DEPs, 发现这些蛋白不仅在与神经性疾病、代谢、糖酵解/糖异生和黏附连接等有关的通路显著富集, 而且在 NOD 样信号途径和坏死等通路也显著富集, 提示 RPSA 可能通过以上途径调控宿主对 SS2 的应答。而且, RPSA 参与的信号途径与宿主响应 SS2 感染的应答特点基本一致, 说明 RPSA 在 SS2 感染过程中起重要作用。因此, 本研究通过特异性抗体封闭细胞膜表面的 RPSA 缓解 ENO 对细胞线粒体功能的损伤, 说明 RPSA 可能参与了 SS2 对细胞线粒体的破坏。不仅如此, 本研究还筛选了 HSP90AB1、SLC25A4 和

HSPA5 等蛋白分子, 但它们在 SS2 脑膜炎病理过程中与 RPSA 之间的作用关系有待进一步验证。

REFERENCES

- [1] DUTKIEWICZ J, ZAJĄC V, SROKA J, WASIŃSKI B, CISAK E, SAWCZYN A, KLOC A, WÓJCIK-FATLA A. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II-Pathogenesis[J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM, 2018, 25(1): 186-203.
- [2] BRASSART B, da SILVA J, DONET M, SEURAT E, HAGUE F, TERRY C, VELARD F, MICHEL J, OUADID-AHIDOUCH H, MONBOISSE JC, HINEK A, MAQUART FX, RAMONT L, BRASSART-PASCO S. Tumour cell blebbing and extracellular vesicle shedding: key role of matrikines and ribosomal protein SA[J]. British Journal of Cancer, 2019, 120(4): 453-465.
- [3] JIANG HX, WU T, LIU JN, YU XB, LIU HT, BAO CT, LIU MM, JI YL, FENG X, GU JM, HAN WY, LI N, LEI LC. Caveolae/rafts protect human cerebral microvascular endothelial cells from *Streptococcus suis* serotype 2 α -enolase-mediated injury[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 254: 108981.
- [4] DIGIACOMO V, MERUELO D. Looking into laminin receptor: critical discussion regarding the non-integrin 37/67-kDa laminin receptor/RPSA protein[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2016, 91(2): 288-310.
- [5] HUANG SH, JONG A. Evolving role of laminin receptors in microbial pathogenesis and therapeutics of CNS infection[J]. Future Microbiology, 2009, 4(8): 959-962.
- [6] LIU HT, LEI SY, JIA L, XIA XJ, SUN YY, JIANG HX, ZHU RN, LI SG, QU GG, GU JM, SUN CJ, FENG X, HAN WY, LANGFORD PR, LEI LC. *Streptococcus suis* serotype 2 enolase interaction with host brain microvascular endothelial cells and RPSA-induced apoptosis lead to loss of BBB integrity[J]. Veterinary Research, 2021, 52(1): 30.
- [7] ZHU ZX, LI WW, ZHANG XL, WANG CC, GAO LL, YANG F, CAO WJ, LI KL, TIAN H, LIU XT, ZHANG KS, ZHENG HX. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP1 interacts with host ribosomal protein SA to maintain activation of the MAPK signal pathway and promote virus replication[J]. Journal of Virology, 2020, 94(3): e01350-e01319.

- [8] HU DW, WANG YC, LI AX, LI Q, WU CF, SHEREEN MA, HUANG SY, WU KL, ZHU Y, WANG WB, WU JG. LAMR1 restricts Zika virus infection by attenuating the envelope protein ubiquitination[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 1795-1807.
- [9] LIU HT, JIA L, GUO WF, SUN YY, ZHU RN, LI SG, QU GG, JIANG HX, WANG JJ, GU JM, SUN CJ, FENG X, HAN WY, LEI LC. Differential protein profiling of cerebrospinal fluid in piglets with severe meningoencephalitis caused by *Streptococcus suis* type 2 compared to controls[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 35.
- [10] JIANG HX, LIU JN, WU T, LIU MM, SUN Q, WANG JJ, ZHU RN, QU GG, LI SG, LIU HT, LEI LC. Proteomics analysis of important molecules in serum from meningitic piglets caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2020, 14(5): 502-510.
- [11] BORDONE MP, SALMAN MM, TITUS HE, AMINI E, ANDERSEN JV, CHAKRABORTI B, DIUBA AV, DUBOUSKAYA TG, EHRKE E, de FREITAS AE, de FREITAS GB, GONÇALVES RA, GUPTA D, GUPTA R, HA SR, HEMMING IA, JAGGAR M, JAKOBSEN E, KUMARI P, LAKKAPPA N, et al. The energetic brain - a review from students to students[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2019, 151(2): 139-165.
- [12] 白春昀, 翁稚颖, 肖创, 贺源, 刘伟军, 郑昌博, 陈晨, 杨为民. 线粒体功能障碍与糖尿病血管并发症关系研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(3): 323-329.
- [13] BAI CY, WENG ZY, XIAO C, HE Y, LIU WJ, ZHENG CB, CHEN C, YANG WM. Research progress on the relationship of mitochondrial dysfunction to diabetic vascular complications[J]. *Medical Journal of Chinese PLA*, 2020, 45(3): 323-329 (in Chinese).
- [14] VAKIFAHMETOGLU-NORBERG H. The role of mitochondria in metabolism and cell death[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 482(3): 426-431.
- [15] 秦迪, 张杰, 马轲, 高宇, 蔺小奇, 胡桂秋, 杨勇军. RCAN1 促进沙门菌诱导的 NLRC4 炎性体活化[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(3): 557-561.
- [16] QIN D, ZHANG J, MA K, GAO Y, LIN XQ, HU GQ, YANG YJ. RCAN₁ promotes *Salmonella*-induced NLRC4 inflammasome activation[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40(3): 557-561 (in Chinese).
- [17] 郭洋, 伊鹏霏, 张涛, 李鹏, 韦旭斌, 穆祥. 猪链球菌性脑膜炎致病机制相关靶细胞、关键致病因子研究进展及中兽医辨证论治初探[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(1): 190-195.
- [18] GUO Y, YI PF, ZHANG T, LI P, WEI XB, MU X. Research progress of target cells and key pathogenic factors related to the pathogenesis of streptococcus meningitis in pigs and preliminary study on syndrome differentiation and treatment of traditional Chinese veterinary medicine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(1): 190-195 (in Chinese).