文章编号:1000-5404(2009)02-0093-05

论著

猪链球菌 2 型中国强致病株 05ZYH33 荚膜缺陷菌株的构建

胡　丹[1,2],王长军[2],胡福泉[1],王　晶[2],程　功[2],李　明[1],潘秀珍[2],唐家琪[2]　([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;[2] 南京军区军事医学研究所,南京 210002)

摘　要: 目的　构建猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2,*S. suis* 2)中国强致病株 05ZYH33 荚膜缺陷株。**方法**　利用同源重组基因敲除方法获得 *S. suis* 2 强毒株 05ZYH33 荚膜合成基因 *cps*2B 敲除突变株,通过小鼠攻毒实验证实荚膜缺陷株对细菌毒力的影响。**结果**　PCR 和 Southern 杂交结果均显示 *cps*2B 基因完全被壮观霉素抗性基因替代,表明基因敲除突变体构建成功。电镜结果证实突变体荚膜合成能力缺失,小鼠致病性实验结果显示突变体毒力基本丧失。**结论**　成功构建 05ZYH33 荚膜缺陷株,提示菌体荚膜多糖成分对于猪链球菌 2 型侵袭和致病具有显著作用。

关键词: 猪链球菌 2 型;荚膜多糖;基因敲除;致病性实验
中图法分类号: R378.12; R394-33　　**文献标识码**: A

Development of a nonencapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2 Chinese highly virulent strain 05ZYH33

HU Dan[1,2], WANG Chang-jun[2], HU Fu-quan[1], WANG Jing[2], CHENG Gong[2], LI Ming[1], PAN Xiu-zhen[2], TANG Jia-qi[2] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Military Medicine of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective　To construct a mutant of *Streptococcus suis* serotype 2 (*S. suis* 2) virulent strain 05ZYH33 by knocking out its *cps*2B gene which encoding capsular polysaccharide (CPS) synthase. Methods　The *cps*2B gene in this 05ZYH33 strain was knocked out based on the principle of homologous recombination. PCR analysis and Southern hybridization were used to identify the knockout. Transmission electron microscopy was employed to observe the morphology of the established strain. The virulence of the deficient strain was tested on the murine model of infection. Results　PCR analysis and Southern hybridization showed that *cps*2B was replaced completely by the Spc^r cassette (encoding the gene resistant to spectinomycin). No capsular material was observed on the surfaces of the mutant strain by transmission electron microscopy, suggesting that *S. suis* 2 mutant loss of ability in capsule synthesis. Furthermore, the nonencapsulated mutant was completely avirulent in murine model of infection. Conclusion　The *cps*2B gene deletion mutant of 05ZYH33 was successfully constructed. The CPS synthase of *S. suis* 2 plays an essential role in the pathogenesis and invasiveness of *S. suis* 2 infection.

Key words: *Streptococcus suis* serotype 2; capsular polysaccharide; gene knockout; virulence assay

猪链球菌 2 型(*S. suis* 2)是 1 种重要的人畜共患病的病原体。迄今为止,*S. suis* 2 已在包括欧美、澳大利亚和中国在内的 20 多个国家和地区引发了人感染的病例。尤为值得关注的是,我国的江苏和四川 2 省分别在 1998 年和 2005 年发生 2 起猪链球菌感染猪和人的公共卫生事件,感染者出现了国内外罕见的链球菌中毒性休克综合征(streptococcal toxic shock syndrome, STSS)[1]。本课题组对 1998 年和 2005 年流行的强致病株 98HAH12、05ZYH33(2 株均分离自 STSS 患者)及无毒株 05JYS68(分离自江苏健康猪)进行了全基因组测序,并对基因组进行了注释[2]。基因注释

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA0Z455);国家自然科学基金(30600533,30730081,30670105);江苏省自然科学基金(BK2006014, 2007013, 2008066);重庆市自然科学基金(2008BB5111) Supported by the National Key Technology Research and Development Program (2006AA0Z455), the National Natural Science Foundation of China (30600533, 30730081 and 30670105), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2006014, 2007013, 2008066), and the Natural Science Foundation of Chongqing (2008BB5111)
作者简介:胡　丹,女,江西省九江市人,硕士研究生,医师,主要从事微生物基因组学方面的研究。电话:(025)84507094,E-mail:hudan1234@163.com
通信作者:唐家琪,电话:(025)84526002,E-mail:tjq85@hotmail.com
收稿日期:2008-09-01;**修回日期**:2008-10-06

结果显示,05ZYH33 中含有荚膜合成基因 *cps*2B。同源比对发现,该基因编码的氨基酸序列与肺炎链球菌的荚膜多糖合成蛋白 Wzd 的氨基酸序列相似性为 58%。大量研究表明,荚膜多糖(capsular polysaccharide,CPS)是多种病原菌的毒力因子,在细菌致病过程中发挥重要的作用[3,4]。本研究以强致病株 05ZYH33 为对象,用同源重组方法获得荚膜合成基因 *cps*2B 基因敲除突变体,通过小鼠攻毒实验证实荚膜缺陷株对细菌毒力的影响,旨在为研究 *S. suis* 2 毒力因子及致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

本实验所用的菌株、质粒见表 1。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。各引物的碱基序列(5′→3′)如下。cpsL1:GAATTCCTACTCAACTAGCAACTA(下划线为引入的 *Eco*R Ⅰ酶切位点),cpsL2:GGATCCTACTTCTTGATTGTTCAT(下划线为引入的 *Bam*H Ⅰ酶切位点);cpsR1:CTGCAGGAGAACAATATGGCGATG(下划线为引入的 *Pst* Ⅰ酶切位点),cpsR2:AAGCTTAACTCAGGCTCTCTTCAA(下划线为引入的 *Hind*Ⅲ酶切位点);Spc1:GGATCCGTTCGTGAATACATGTTATA(下划线为引入的 *Bam*H Ⅰ酶切位点),Spc2:CTGCAGGTTTTCTAAAATCTGAT(下划线为引入的 *Pst* Ⅰ酶切位点);out1:CAGAATATGAAATGAGTATCCTTG,out2:GAGTATCCGTACTGAACTCCAAGA;check1:GTGTTGACTGCGGGGTTGG,check2:CCGCTGGGACTGCTTCTTC。

表 1 实验所用的菌株和质粒

菌株和质粒	表型及相关特征	来源
菌株		
S. suis 05ZYH33	血清型 2 型,强致病株,*cps*2B$^+$	本室保存
S. suis Δ*cps*2B	血清型 2 型,*Spc*^{r},*cps*2B$^-$	本室构建
E. coli DH5α	deoR, recA, endA, hsdR, supE, thi, gyrA, relA	本室保存
质粒		
pMD-18T	T 载体,lacZ,*Amp*^{r}	TaKaRa
pUC18	*E. coli* 克隆载体,lacZ,*Amp*^{r}	本室保存
pSET2	*E. coli-S. suis* 穿梭质粒,*Spc*^{r}	Takamatsu *et al*.(2001)
pUC18-cps2B	*cps*2B 基因敲除载体,*Amp*^{r},*Spc*^{r}	本室构建

1.2 主要试剂和仪器

Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶均为 TaKaRa 公司产品,质粒 DNA 抽提试剂盒和胶回收试剂盒为 Promega 公司产品,Todd-Hewitt Broth(THB)培养基购于 Difco 公司,North2South DNA 随机引物生物素标记和化学发光检测试剂盒为 Pierce 公司产品。Gene Pulser Xcell™型电穿孔仪为 Bio-Rad 公司产品,Ultrospec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品,透射电镜 JEM-1010(Jeol Ltd. Tokyo, Japan)。

1.3 实验动物

BALB/c 雌性小鼠,SPF 级,4 周龄,体质量 18 ~ 22 g,购自军事医学科学院实验动物中心。

1.4 *S. suis* 05ZYH33 *cps*2B 基因敲除突变株的构建和鉴定

1.4.1 基因敲除载体的构建 以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板,分别用引物 cpsL1/cpsL2、cpsR1/cpsR2 进行 PCR,扩增 *cps*2B 编码基因的上、下游片段 cpsL 和 cpsR;同时以 pSET2 质粒 DNA 为模板,用引物 Spc1/Spc2 进行 PCR,扩增壮观霉素抗性基因(*Spc*^{r} cassette)。在限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶的作用下,将它们依次克隆到 pUC18 载体的 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Pst* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ 4 个多克隆位点上,形成 1 个在 *Spc*^{r} 基因两侧具有与 *cps*2B 上下游同源序列的基因敲除载体 pUC18-cps2B(图 1)。

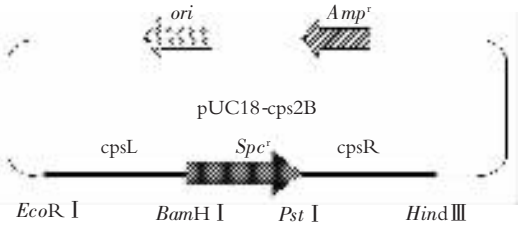


图 1 *cps*2B 基因敲除载体构建示意图

1.4.2 基因敲除突变株的筛选和鉴定 参照 Smith 等[5]的方法制备 *S. suis* 05ZYH33 感受态细菌。在 22.5 kV/cm、500 Ω 和 25 μF 电转参数下,用构建好的基因敲除载体电转化感受态细菌,电转结束后将菌液涂布于 THB 平板(含 100 μg/ml 壮观霉素),37 ℃培养 48 h 后,挑取所有的单菌落进行增菌培养并取 2 μl 菌液作模板,用引物 check1/check2(位于 *cps*2B 编码基因的内部)进行 PCR 初步筛选,对疑似阳性菌再采用交叉 PCR 和 Southern 杂交验证。

1.5 电镜观察

参照 Jacques 等[6]的方法进行。取过夜静止培养的菌液 5 ml 2 500 r/min × 15 min 离心收集菌体,加 PBS 重悬,2 500 r/min离心 15 min,去上清,加入 300 μl 感染猪链球菌 2 型的猪恢复期血清,4 ℃作用 1 h,加入 PBS 重悬,2 500 r/min 离心 15 min,去上清,将菌体在 5% 的戊二醛中固定。电镜样本按常规流程制备:样品在 5% 的戊二醛中固定 2 h 后,用 1% 的四氧化锇固定 1 h,梯度酒精脱水后,用环氧树脂 812 包埋并切成 70 nm 左右厚度组织,快速用水化的醋酸双氧铀(aqueous uranyl acetate)/柠檬酸铅(Rey-nolds' lead citrate)染色,用透射电镜进行观察。

1.6 动物实验

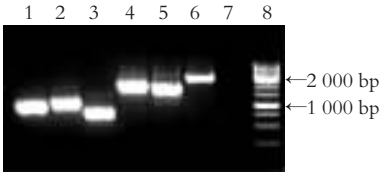
参照 Beaudoin 等[7]的方法进行。取 BALB/c 小鼠共 30 只,分为 3 组,每组 10 只。将野生株 05ZYH33 和突变株 Δ*cps*2B 于 37 ℃过夜培养,次日以 1∶100 的比例接种于新鲜 THB 中生长至 $D(600)$ 达 1.0,菌液用 THB 稀释 5 倍后,取 1 ml(约 10^8 CFU)菌液腹腔注射小鼠。阴性对照组注射 THB 培养基 1 ml。

2 结果

2.1 *S. suis* 05ZYH33 *cps*2B 基因敲除突变株的构建和鉴定

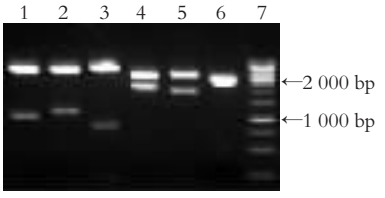
2.1.1 *cps*2B 基因敲除载体的构建 根据 *S. suis* 05ZYH33 全基因组序列并以基因组 DNA 为模板,用引物 cpsL1/cpsL2、cpsR1/cpsR2 成功扩增出 *cps*2B 编码基因的上游片段 cpsL(1 000 bp)和下游片段 cpsR(800 bp),同时用引物 Spc1/Spc2 从 pSET2 质粒中扩增出 *Spc*^{r} 基因(1 130 bp),电泳结果如图 2

所示。将这 3 个片段分别装入 T 载体后,根据引入的相应酶切位点,在限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶的作用下,将它们分别克隆到 pUC18 载体的 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、*Pst*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ 4 个多克隆位点上,形成基因敲除载体 pUC18-cps2B。双酶切(图 3)和测序结果均显示 3 个片段连接正确,载体构建准确无误。



1:引物 cpsL1/cpsL2;2:引物 Spc1/Spc2;3:引物 cpsR1/cpsR2;4:引物 cpsL1/Spc2;5:引物 Spc1/cpsR2;6:引物 cpsL1/cpsR2;7:阴性对照;8:DNA 标准

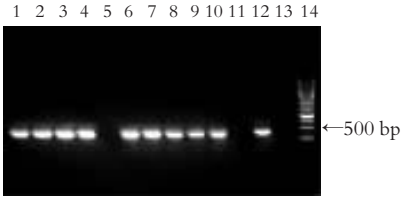
图 2　PCR 扩增产物凝胶电泳图



1:pUC18-cps2B 经 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切结果;2:pUC18-cps2B 经 *Bam*HⅠ、*Pst*Ⅰ双酶切结果;3:pUC18-cps2B 经 *Pst*Ⅰ、*Hind*Ⅲ双酶切结果;4:pUC18-cps2B 经 *Eco*RⅠ、*Pst*Ⅰ双酶切结果;5:pUC18-cps2B 经 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ双酶切结果;6:pUC18-cps2B 经 *Eco*RⅠ、*Hind*Ⅲ双酶切结果;7:DNA 标准

图 3　基因敲除载体 pUC18-cps2B 的双酶切鉴定

2.1.2　*cps*2B 基因敲除突变株的筛选　　取 5 μl 基因敲除载体 pUC18- cps2B 电转化 *S. suis* 05ZY/H33 感受态细菌,转化平板经 37 ℃培养 48 h 后,从平板上挑取单菌落摇菌培养,使用引物 check1/check2 进行菌液 PCR。由于引物 check1/check2 位于 *cps*2B 编码基因内部(产物大小 410 bp),如果 *cps*2B 编码基因被敲除,用引物 check1 和 check2 进行扩增便会得到阴性结果,如果仍能扩增出预期大小的产物,说明 *cps*2B 未被敲掉。通过这种方法进行筛选,在 1 组菌液 PCR 中,发现有 2 株扩增结果为阴性(图 4 泳道 5、11),选择第 5 泳道对应的菌株突变体 5 作进一步验证。



1~11:突变体 1~11;12:阳性对照(05ZYH33 菌株 DNA 为模板);13:阴性对照(未加 DNA 模板);14:DNA 标准

图 4　*cps*2B 基因敲除突变体的部分 PCR 初步筛选结果

2.1.3　*cps*2B 基因敲除突变株△*cps*2B 的 PCR 鉴定　　分别于编码基因上、下游片段 cpsL 和 cpsR 的两侧再设计 1 对引物 out1/out2,引物的位置如图 5 所示。如果发生等位基因置换,那么 *Spc*^{r}基因将取代 *cps*2B 编码基因,用引物 out1/Spc2 配对进行 PCR 就应该能够扩增出一定大小的片段(2 268 bp),用引物 Spc1/out2 配对 PCR 应该能扩增出理论值为 2 201 bp 的条带,用引物 Spc1/Spc2 进行 PCR 也应该能扩增出 *Spc*^{r}基因,而在野毒株 05ZYH33 中,用以上这些引物进行 PCR 都会得到阴性结果。而原来以 05ZYH33 基因组为模板,用引物 check1/check2 能扩增出的 410 bp 的目的片段,在突变株中将不复存在。根据以上推理,结果各 PCR 产物的大小与理论情况完全一致(图 6),表明突变体 5 就是 *cps*2B 编码基因缺失的突变株,将其重新命名为△*cps*2B。

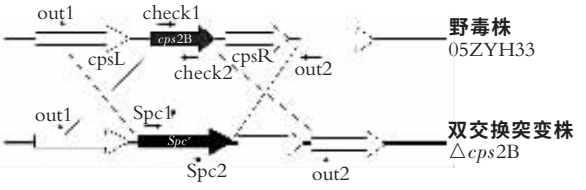
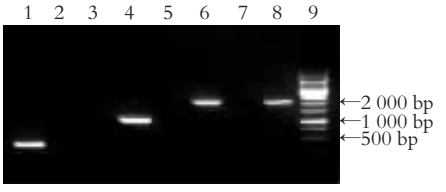


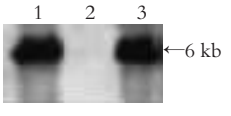
图 5　同源重组



1:以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板,引物 check1/check2 PCR 产物;2:以 △*cps*2B 基因组 DNA 为模板,引物 check1/check2 PCR 产物;3:以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板,引物 Spc1/Spc2 PCR 产物;4:以 △*cps*2B 基因组 DNA 为模板,引物 Spc1/ Spc2 PCR 产物;5:以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板,引物 out1/Spc2 PCR 产物;6:以 △*cps*2B 基因组 DNA 为模板,引物 out1/Spc2 PCR 产物;7:以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板,引物 Spc1/out2 PCR 产物;8:以 △*cps*2B 基因组 DNA 为模板,引物 Spc1/out2 PCR 产物;9:DNA 标准

图 6　*cps*2B 基因敲除突变株△*cps*2B 的 PCR 验证

2.1.4　*cps*2B 基因敲除突变体 Δ*cps*2B 的 Southern 杂交鉴定　　为进一步验证 Δ*cps*2B 的正确性,通过 Southern 杂交对 Δ*cps*2B 基因组上的突变基因进行定位分析。实验验证探针为 *cps*2B 中间片段(引物 check1/check2 的 PCR 产物),采用随机引物法进行生物素标记,操作参照试剂盒说明书进行。将各基因组 DNA 用 *Hind*Ⅲ酶切过夜后,电泳分离各片段(0.8% 琼脂糖凝胶),采用毛细管法将凝胶中的 DNA 转印至尼龙膜,80 ℃烘烤 2 h 固定 DNA。从预杂交开始到最后的曝光均严格按照说明书上的操作步骤进行。结果如图 7 所示,在 05ZYH33 和另一对照 mutant1 基因组酶切产物中 6 kb 附近均出现了 1 条 *cps*2B 探针杂交条带,与预计酶切片段大小 5.9 kb 和 5.8 kb 相符,而在 Δ*cps*2B 中则未出现杂交条带,表明 *cps*2B 基因已被敲除。

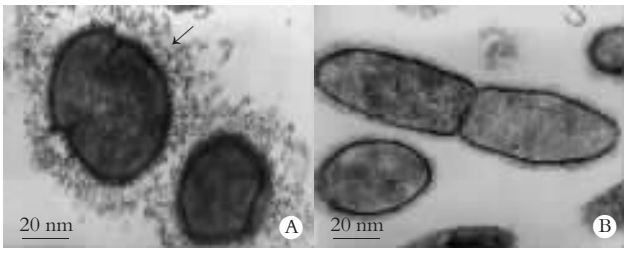


1:05ZYH33 基因组经 *Hind*Ⅲ酶切杂交结果;2:Δ*cps*2B 基因组经 *Hind*Ⅲ酶切杂交结果;3:突变体 1 基因组经 *Hind*Ⅲ酶切杂交结果

图 7　突变株 Δ*cps*2B 的 Southern 杂交分析

2.2 透射电镜结果

电镜结果显示,野生株有明显的荚膜层包绕在细菌的外周,但是突变株 △*cps*2B 外周未见荚膜的包绕(图 8),表明 *cps*2B 基因与 *S. suis* 2 荚膜合成密切相关,敲除 *cps*2B 基因后,荚膜合成受阻,表明所获得的 *cps*2B 编码基因缺失突变株为荚膜缺陷株。



A:野生株 05ZYH33;B:突变株 △*cps*2B ↑:细菌外包裹的荚膜多糖成分

图 8 野生株和突变株电镜观察

2.3 动物实验结果

结果显示,攻毒 1 周后,野毒株注射组 10 只小鼠共死亡 9 只,存活的 1 只也发病严重,而突变株注射组的 10 只小鼠均未表现出任何发病症状,健康状况良好。动物实验结果表明荚膜缺陷突变株丧失了对小鼠的致病性。

3 讨论

2 型猪链球菌毒力因子的研究一直是热点,目前已知的毒力相关因子包括荚膜多糖(CPS)、溶菌酶释放蛋白(MRP)、胞外因子(EF)、溶血素(SLY)等。其中 MRP 和 EF 在欧洲一直被认为存在于强致病株中,与毒力密切相关,但通过基因敲除证实它们并不能使细菌丧失毒力,而且加拿大学者分离的 *S. suis* 2 致病株大多为 MRP^- 和 EF^- 表型;与 MRP 和 EF 相似,大多数欧洲株为溶血素阳性。Norton 等[8] 认为 SLY 可能在猪链球菌侵入和裂解宿主细胞的过程中发挥着重要作用,然而北美株这种蛋白的产生具有多样性,缺失溶血素的突变体在猪体只有微弱的毒力降低[9]。更为重要的是,*S. suis* 2 强毒、弱毒及无毒株都有荚膜多糖包被,提示该因子只能作为 *S. suis* 2 的 1 种必需毒力成分,而要真正建立感染则还须有其他因子的参与。猪链球菌的致病是一个多因子作用的过程,特定的因子只在特定的阶段发挥作用,特殊的功能可以由替代的因子来完成。目前对于 *S. suis* 2 的毒力因子研究还十分匮乏,已被确切证实的毒力因子只有 CPS[10,11]。

1977 年,Windsor[12] 依据传统观念提出决定 *S. suis* 2 侵袭力的是其荚膜多糖,它能保护细菌在免疫动物体内不被吞噬。1998 年,Charland 等[10] 利用转座子插入失活方法获得荚膜多糖缺失株,发现荚膜多糖的缺失可明显提高菌株的疏水性及被小鼠巨噬细胞与猪单核细胞吞噬的能力,变异株更易从血液循环中被清除(而野生菌株在血液中存留时间要超过 48 h),更为重要的是 CPS 缺失突变株不引起小鼠及猪发病。1999 年,Smith 等[11] 克隆了与 *S. suis* 2 荚膜多糖生物合成有关的基因位点,共有 14 个开放阅读框(ORF),其中 11 个基因的表达产物与细菌多糖生物合成所需的蛋白质相似。同样,通过基因敲除技术证实细菌荚膜缺失后在体外非常容易被猪肺泡巨噬细胞摄入,且在中性粒细胞中生存能力下降,通过无菌仔猪鼻腔接种的突变株完全无致病性。由此可见,CPS 在 *S. suis* 2 菌株的致病过程中扮演了非常重要的角色,其作用机制可能是帮助菌体抵抗吞噬细胞吞噬及影响细菌与上皮细胞的黏附。同时,荚膜缺失株在作为 *S. suis* 2 感染的疫苗方面研究也有很大的价值[13]。

Elliott 等[14] 报道 *S. suis* 2 型荚膜多糖由 5 种单糖组成,分别为葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、N-乙酰葡糖胺和 N-乙酰神经氨酸。其中 N-乙酰神经氨酸(唾液酸)成分被认为是细菌的重要毒力相关因子[15]。然而,1996 年 Charland 等[16] 通过唾液酸酶水解及凝集素封闭等方式对 *S. suis* 2 型不同菌株进行处理,处理后的细菌与野毒株在抵抗吞噬及毒力方面无明显差异,从而指出唾液酸在 *S. suis* 2 型致病过程中并不扮演重要角色。目前荚膜多糖成分在抵抗吞噬作用方面的具体机制仍不清楚。

与 CPS 合成相关的 14 个开放阅读框,其中 *cps*2B 基因被认为是编码荚膜合成蛋白,在决定 2 型荚膜多糖链的长度方面起关键作用[9]。本实验通过基因敲除技术,选定 *cps*2B 基因作为靶基因,成功获得 *cps*2B 的基因敲除突变体 △*cps*2B。电镜结果显示,△*cps*2B 为荚膜缺陷株。小鼠致病实验结果显示,该突变体对小鼠不致病。我们将进一步研究突变株和野生株在抵抗细胞吞噬与杀伤方面的差异及突变株的保护作用,以期阐明 CPS 在猪链球菌致病过程中的具体作用,为猪链球菌病的治疗及相应疫苗的研制提供参考。

参考文献:

[1] Tang J, Wang C, Feng Y, *et al*. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Med, 2006, 3(5): e151.

[2] Chen C, Tang J, 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.

[3] Wessels M R, Moses A E, Goldberg J B, *et al*. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci[J]. Proc Natl Acad Sci U S A ,1991, 88(19): 8317 - 8321.

[4] Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois C M, *et al*. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity[J]. Infect Immun, 2003, 71(1): 536 - 540.

[5] Smith H E, Wisselink H J, Vecht U, *et al*. High-efficiency transfor-

mation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbiology, 1995, 141(Pt 1): 181 – 188.
[6] Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, *et al*. Ultrastructural Study of Surface Components of *Streptococcus suis*[J]. J Bacteriol, 1990, 172(6): 2833 – 2838.
[7] Beaudoin M, Higgins R, Harel J, *et al*. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates[J]. FEMS Microbiol Let, 1992, 78(2 – 3): 111 – 116.
[8] Norton P M, Rolph C, Ward P N, *et al*. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, 26(1): 25 – 35.
[9] Lun S, Perez-Casal J, Connor W, *et al*. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2[J]. Microb Pathog, 2003, 34(1): 27 – 37.
[10] Charland N, Harel J, Kobisch M, *et al*. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression[J]. Microbiology, 1998, 144(Pt 2): 325 – 332.
[11] Smith H E, Damman M, van-der-Velde J, *et al*. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor[J]. Infect Immun, 1999, 67(4): 1750 – 1756.
[12] Windsor R S. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type Ⅱ[J]. Vet Rec, 1977, 101(19): 378 – 379.
[13] Fittipaldi N, Harel J, D'Amours B, *et al*. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine[J]. Vaccine , 2007, 25(18): 3524 – 3535.
[14] Elliott S D, Tai J Y. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*[J]. J Exp Med, 1978, 148(6): 1699 – 1704.
[15] Carlin A F, Lewis A L, Varki A, *et al*. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes[J]. J Bacteriol, 2007, 189(4): 1231 – 1237.
[16] Charland N, Kobisch M, Martineau-Doize B, *et al*. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996, 14(4): 195 – 203.

（编辑　吴培红）

文章编号:1000-5404(2009)02-0097-01

个案与短篇

原发性卵巢平滑肌瘤合并输卵管平滑肌瘤 1 例

刘　强,李　力,彭珠芸　（第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042）

患者,女性,50 岁,孕 2 产 1 存 1,因“肛门坠胀 1 个月,检查发现盆腔包块 1 周”于 2008 年 4 月 2 日入我院。患者平时月经规律,末次月经 2007 年 10 月 20 日,1 个月前无明显诱因出现肛门坠胀不适,余无不适,1 周前症状加重,至外院就诊。妇科 B 超提示:盆腔内见 2 个分别为 4.5 cm×4.0 cm、4.5 cm×3.9 cm大小占位,诊断为卵巢肿瘤,予丹鳖胶囊口服后症状无明显缓解,遂至我院。复查妇科 B 超提示:右附件区见 8.7 cm×4.2 cm 低回声块影,可见包膜,边界欠清晰,形态不规则,内部回声不均质,与子宫无明显关系。CDFI:块影边缘测得低阻低速动脉血流信号,RI = 0.55。妇科检查:宫颈光滑;子宫前位,正常大小,活动,质中,无压痛;子宫右后方扪及一 8 cm×5 cm×5 *cm* 大小包块,边界清晰,质硬,活动度欠佳,无压痛,左附件区未扪及异常。入院诊断:①卵巢肿瘤,考虑纤维瘤可能性大;②浆膜下子宫肌瘤? 入院后查 CA125 5.4 U/ml, AFP 1.3 ng/ml。完善各项术前检查后于 4 月 7 日在全麻下行腹腔镜探查术,术中见子宫正常大小,右卵巢见一 9 cm×5 cm×5 cm大小哑铃形实质性包块,色白,质硬,包膜完整,包块位于子宫直肠陷凹,与右侧阔韧带后叶少许疏松粘连,左输卵管浆膜下见一直径约 0.3 cm 大小突起,质硬,乙状结肠与左侧盆壁、左侧阔韧带后叶疏松粘连,左卵巢及右输卵管未见异常。征求患者家属意见后按原计划行全子宫 + 双附件切除术,剖视右卵巢包块,切面灰白质韧,有完整包膜。将右卵巢包块送术中冰冻,冰冻结果:考虑良性卵巢间质源性肿瘤。病理报告:①右卵巢平滑肌瘤,免疫组化:SMA(+),CD34(-),Vim(+),α-IN(-);②左输卵管平滑肌瘤;③全切子宫,子宫腺肌症,宫内膜显增殖期改变,慢性宫颈炎;④左卵巢及右输卵管未见异常。

讨论

原发性卵巢平滑肌瘤属于非特异性间质来源肿瘤,发生率低。1962 年 Sangalli 首次报道,至今国内外共报道 70 余例。其组织来源不清,有学者认为是腹膜下的间叶组织化生为平滑肌组织,激素促进其增生成结节状生长,也有学者认为是同源多中心性平滑肌瘤的发展[1];但大多数学者支持卵巢平滑肌学说,认为来源于卵巢皮层或黄体间质的血管平滑肌,或卵巢韧带内与卵巢相接点的血管壁平滑肌[2]。中肾管遗迹及血管壁也是平滑肌瘤的来源之一。原发性卵巢平滑肌瘤常为单侧,多无自觉症状,常在妇科检查、外科手术或尸检时发现。B 超检查多为单侧中等或增强回声区,瘤体质地均匀,中等大小,无明显囊壁,与盆腔内实性肿瘤和和子宫肌瘤回声相同。核磁共振图像也是很好的辅助诊断方法。该病诊断具有一定困难,需与以下疾病鉴别:①浆膜下子宫肌瘤,有时可自行脱落,不再与子宫相连,而与卵巢相连以获得血供,形成寄生性平滑肌瘤。②卵泡膜细胞瘤,后者的瘤细胞更纤细,细胞排列疏密不均,在发生黄素化时细胞呈圆形或多边形,细胞质丰富,可见空泡。③卵

（下转 100 页）

作者简介:刘　强,女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究,发表论文 6 篇。E-mail:liuqiang750103@126.com

收稿日期:2008-05-30;修回日期:2008-07-21