文章编号:1000-5404(2009)04-0307-04

论著

clpP基因缺陷对肺炎链球菌毒力表达降低的研究

张 群,胥文春,尹一兵,朱兴华,李有强,张雪梅 (重庆医科大学医学检验系生化教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 探索clpP基因缺陷对肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)毒力的影响。**方法** 用长臂同源多聚酶链式反应(LFH-PCR)方法失活clpP基因,用PCR、Western blot鉴定缺陷菌株,通过RT-PCR分析自溶素(major autolysin A,lytA)、表面黏附A(pneumococcal surface adhesion A, psaA)、溶血素(pneumolysin, ply)和胆碱结合蛋白A(choline binding protein A, cbpA)的表达,并通过动物实验观察clpP基因缺陷株毒力改变情况。**结果** RT-PCR显示clpP缺陷株的4个毒力因子mRNA表达水平均低于野生菌,两者比较有统计学差异($P<0.05$);小鼠毒力实验表明野生菌株半数致死时间为22 h,而缺陷株半数致死时间为8 d,两者比较有统计学差异($P<0.01$);缺陷菌在小鼠体内被清除速度也显著快于野生菌株($P<0.05$)。**结论** clpP基因缺陷使*S. pn*多种毒力因子表达减弱,毒力降低。

关键词: 肺炎链球菌;毒力因子;热休克蛋白;clpP基因
中图法分类号: R378.12;R392-33;R394.6 **文献标识码:** A

clpP gene deletion attenuates virulence of *Streptococcus pneumoniae*

ZHANG Qun, XU Wen-chun, YIN Yi-bing, ZHU Xing-hua, LI You-qiang, ZHANG Xue-mei (Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of clpP gene deletion on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Methods clpP-deficient strain was constructed by LFH-PCR and identified by PCR and Western bloting. Relative quantitative RT-PCR was used to measure the mRNA levels of autolysin A, pneumococcal surface adhesion A, pneumolysin and choline binding protein A. The clpP-deficient strain was applied to infect BALB/c mice to determine its virulence. Results clpP gene was replaced completely by erm cassette. The expression of virulent factors in clpP-deficient strain was lower than that of the wide-type ($P<0.05$). Mice virulence experiments showed median lethal time of wide-type was 22 h, while that of clpP-deficient mutant was 8 d ($P<0.01$). The elimination of clpP-deficient mutant from mice blood was faster than that of wide-type. Conclusion The deficiency of clpP gene decreases the expression of virulent genes of *Streptococcus pneumoniae*, thus resulting in reduction of bacterial virulence.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; virulence factor; heat shock protein; clpP gene

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)是一种常见的条件致病菌,可引起肺炎、中耳炎、菌血症、脑膜炎等严重疾病。*S. pn*从鼻咽部入侵血液或脑膜经历了30~34 ℃或37 ℃的热应激,温度的改变诱导细菌热休克蛋白(heat shock protein, HSP)合成一过性增高[1]。ClpP是细菌中一类高度保守并广泛存在的HSP,与其他Clp分子伴侣家族一起可形成Clp蛋白酶复合体,在复合体中ClpP具有蛋白酶的活性,可通过清除细胞异常或错误折叠的蛋白质以调控某些功能蛋白的稳定性和活性,从而影响细菌的多种生物学性质,因此ClpP可能在肺炎链球菌的致病过程中发挥重要的作用。本研究将通过长臂同源多聚酶链式反应(long flanking homology polymerase chain reaction,LFH-PCR)方法失活*S. pn*的clpP基因,从而获得*S. pn*的clpP缺陷菌株,从分子水平和整体水平比较该突变株与野生菌的毒力表达差异,为深入了解ClpP蛋白酶在

基金项目:国家自然科学基金(30600267)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600267)
作者简介:张 群,女,四川省资阳市人,博士研究生,主要从事肺炎球菌致病机制方面的研究。电话:(023)62007256, E-mail: zhangqun198166@163.com
通信作者:张雪梅,电话:(023)68485216,E-mail: apoe@163.com
收稿日期:2008-05-06;修回日期:2008-10-21

细菌致病过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雌性 BALB/c 小鼠 76 只,体质量 18 ~ 22 g,购自重庆医大学实验动物中心。*S. pn* TIGR4 购于美国典型菌种保藏中心(American typical culture collection, ATCC)。培养基:C + Y 半合成培养基,TSA 血平板。*S. pn* CPM8 染色体 DNA(含有红霉素抗性基因 erm)、感受肽刺激肽(CSP)由美国 Morrison DA 教授惠赠。一抗为鼠的抗 ClpP 多克隆抗体,由本实验室制备;二抗为辣根酶标记的羊抗鼠抗 IgG、DAB 显色试剂盒(北京中杉公司);RNA 提取试剂(Omiga 公司);DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒(上海化舜公司);RT-PCR 试剂(TaKaRa 公司);引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 连接片段的制备 首先用 PCR 分别扩增出 TIGR4 的上游片段 clpP-UP(P1、P3)、下游片段 clpP-DW(P2、P4)和 CMP8 的 erm 基因,引物 P3、P4 分别带有 22 ~ 23 个与 erm 基因 5′、3′端两侧互补的碱基,这样扩增出的上、下游片段就分别带有一段与 erm 基因互补的序列;胶回收 3 个片段,并定量;再通过 PCR 用外侧引物(P1、P2)将这 3 个片段连接起来。胶回收连接片段,1 份用于转化,1 份送宝生物工程有限公司测序部测序。

1.2.2 肺炎链球菌实验室转化 取 -70 ℃保存的 TIGR 菌株 200 μl 培养于 CTM 培养基(10 ml C + Y 中含 1 mmol/L 的 $CaCl_2$ 和 2 g/L BSA)中,当细菌达到一定菌密度时[$D(540)$ = 0.08 ~ 0.10],加入 CSP,冰上放 30 min,加连接片段,37 ℃孵育 90 min,然后铺于含红霉素(0.25 mg/L)的 TSA 上,37 ℃孵箱培养 24 ~ 48 h,挑取血平板上的转化菌落,于含红霉素(0.25 mg/L)的 C + Y 中增菌,保存并提取 DNA。

1.2.3 缺陷菌株的鉴定 缺陷菌株的 PCR 鉴定:分别以 TIGR4、clpP 缺陷菌株(△clpP)的染色体 DNA 为模板,用 erm、clpP 的引物扩增 erm(780 bp)基因和 clpP(355 bp)基因;用 P1、P2 扩增 UP-erm-DW(1 339 bp)。缺陷菌株的 Western blot 鉴定:分别提取 TIGR4、△clpP 的蛋白质,以抗 ClpP 的多克隆抗体检测 ClpP 蛋白。

1.2.4 缺陷菌株的生长情况 分别挑取 TIGR4、△clpP 的单个菌落接种于 C + Y 培养基中,37 ℃培养 12 h,转接于 20 ml C + Y 培养基中,37 ℃培养。定时测定吸光度值 $D(620)$,以吸光度为纵坐标,时间为横坐标绘制细菌的生长曲线。

1.2.5 半定量 RT-PCR 测定毒力因子的 mRNA 表达水平 将野生株和缺陷株在 C + Y 培养基中增菌至相同菌密度,提取细菌总 RNA,并逆转录成 cDNA。然后以 cDNA 为模板,分别扩增 16 S rRNA、自溶素(major autolysin A, lytA)、肺炎链球菌表面黏附素 A(pneumococcal surface adhesion A, psaA)、溶血素(pneumolysin, ply)和胆碱结合蛋白 A(choline binding protein A, cbpA)4 个毒力基因。

1.2.6 小鼠毒力实验 将 TIGR4 及△clpP 在 C + Y 培养基中培养到其 $D(620) = 0.498$(菌密度约 4×10^8 cfu/ml)。28 只 BALB/c 小鼠采用随机数字表分为 2 组,每组 14 只,分别腹腔注射 100 μl TIGR 4 菌液和 100 μl△clpP 菌液,均含 4×10^7 cfu/ml,记录小鼠死亡时间,计算半数致死时间。

1.2.7 *S. pn* 体内清除时间测定 将 TIGR4 及△clpP 于 C + Y 培养基中培养到 $D(620) > 0.5$,用无菌 PBS 稀释到菌密度为 5×10^7 cfu/ml。将 48 只 BALB/c 小鼠采用随机数字表法分为 2 组,分别注射 100 μl 野生株 TIGR4 和 100 μl△clpP 缺陷株菌液。于注射菌液后 12、24、36、48 h 取小鼠心脏血(每时间段 6 只),系列稀释后将野生菌株血标本接种于 TSA 血平板,缺陷菌株的血标本接种于含红霉素(0.25 mg/L)TSA 血板。37 ℃培养 24 ~ 48 h,计数菌落,检测细菌在体内被清除情况。最终的结果以 6 只老鼠血液中细菌计数的平均值表示。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐同时采用 t 检验,方差不齐时采用 F 检验,小鼠毒力实验结果采用 Long-rank 检验,以 SAS 8.0 统计软件进行分析。

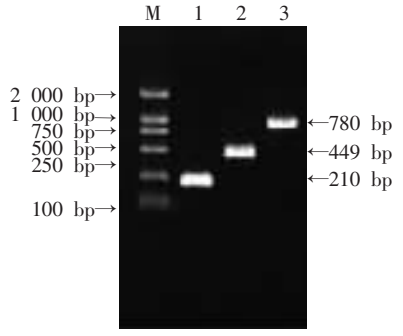
2 结果

2.1 *S. pn* clpP 基因缺陷菌株的获取

分别以 TIGR4、CMP8 的 DNA 为模板,用 PCR 扩增出了 clpP -UP(210 bp)、clpP-DW(449 bp)和 erm(780 bp) 3 个片段(图 1)。LFH-PCR 连接 3 个片段:UP-erm-DW(1 339 bp),测序结果显示 3 个片段连接正确(图 2)。利用同源重组,将连接片断转化入 TIGR4 野生菌株,红霉素血平板筛选出 clpP 缺陷菌株。

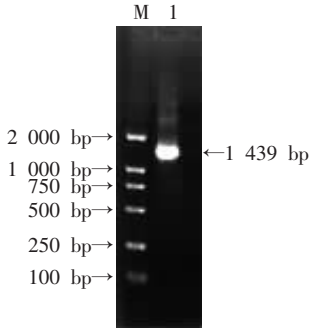
表 1 各基因引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	
P1	TCTGCCTTGTATCTGCTC	
P2	CACAAACGATAGGGCAAA	
P3	ATCAAACAAATTTTGGGCCCGGAACCTCCTTTCGTGACTG	
P4	ATTCTATGAGTCGCTGCCGACTGAAGGCAAACTCGACTGG	
erm	上游: CCGGGCCCAAAATTTGTTTGAT	下游: AGTCGGCAGCGACTCATAGAAT
clpP	上游: CAAACAAGCCGTGGAGAA	下游: CACCCATTGGTTGGTGAA
ply	上游: GATGGCAAATAAAGCAGTAAATGACT	下游: TGATGCCACTTAGCCAACAAATCG
lytA	上游: ACTGGTACTGGTTCGACAAC	下游: CTACTGTGAATTCTGGCCTG
psaA	上游: GGTACATTACTCGTTCTCTTTCTTTCT	下游: GTGTGGGTCTTCTTTTCCTTTTTC
cbpA	上游: GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCA	下游: CTTTAACTTTCACATCGAACTCAGC



M: DNA 标准(DL 2000); 1: clpP-UP; 2: clpP-DW; 3: erm

图 1　PCR 扩增 clpP-UP、clpP-DW、erm 的电泳结果

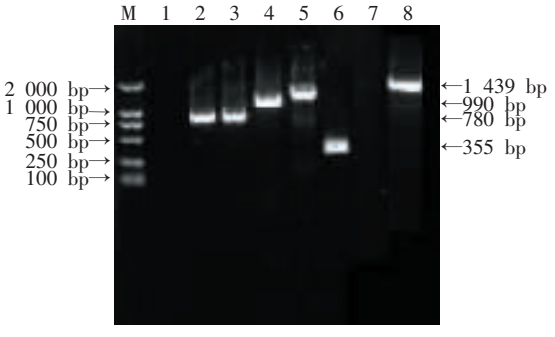


M: DNA 标准(DL 2000); 1: UP-erm-DW

图 2　LFH-PCR 连接 3 个片段的电泳结果

2.2　△clpP 缺陷菌株的 PCR 鉴定

TIGR4 野生菌株在转化了连接片段后,通过同源重组,erm 基因替代染色体上的 clpP 基因,因此缺陷菌株在 780 bp 处可见目的片段,355 bp 处无目的片段;而野生菌株在 780 bp 处无目的片段,355 bp 处有目的片段 (图 3)。P1、P2 扩增缺陷菌株,在约 1 440 bp 处可见目的片段(图 3)。

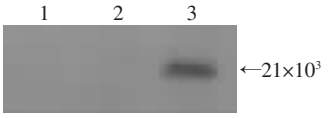


M: DNA 标准(DL 2000); 1: TIGR4 的 erm 基因(阴性对照); 2: CPM8 的 erm 基因(阳性对照); 3: △clpP 的 erm 基因; 4: △clpP 的 clpP-UP + erm ;5: △clpP 的 clpP-DW + erm; 6: TIGR4 的 clpP 基因; 7: △clpP 的 clpP 基因; 8: UP-erm-DW

图 3　clpP 缺陷菌株的 PCR 鉴定结果

2.3　缺陷菌株的 Western blot 鉴定

缺陷菌株 erm 基因替代了染色体上的 clpP 基因,不表达 ClpP 蛋白。因此用抗 ClpP 抗体检测,野生菌 ClpP 蛋白检测结果为阳性,缺陷菌株则为阴性,见图 4。



1:阴性对照; 2: ClpP 在△clpP 中的表达; 3: ClpP 在 TIGR4 中的表达

图 4　Western blot 分析 ClpP 在 TIGR4 和△clpP 中的表达

2.4　TIGR 4 和△clpP 的生长曲线

从生长曲线可以看出在液体培养基中缺陷菌株较野生株生长缓慢趋势,表明 clpP 基因缺陷后影响细菌的生长(图 5)。

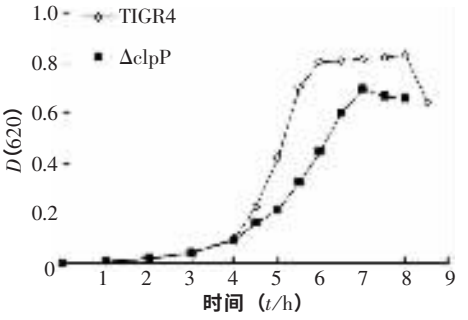
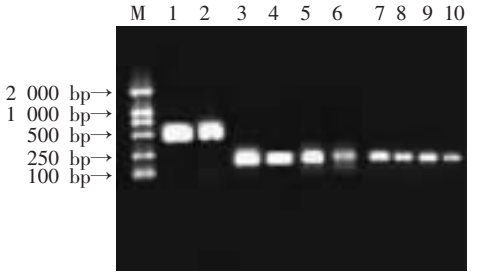


图 5　TIGR 4 和△clpP 单个菌落在 C + Y 培养基中的生长曲线

2.5　半定量 RT-PCR

分别测定 TIGR 4 和△clpP 几个毒力因子的 mRNA 水平,结果见图 6 和表 2。RT-PCR 结果显示毒力基因 ply、psaA、lytA 和 cbpA 在野生菌株和缺陷菌株中都有一定量的表达,但在△clpP 中的表达量较在野生株中明显下降($P < 0.05$)。



M: DNA 标准(DL 2000); 1,2: 16S rRNA 在 TIGR4 和 △clpP 中的 mRNA 表达水平; 3,5,7,9: ply 、psaA、lytA 和 cbpA 在 TIGR4 的 mRNA 表达水平; 4,6,8,10: ply、psaA、lytA 和 cbpA 在△clpP 的 mRNA 表达水平

图 6　*S. pn* TIGR4 和△clpP 毒力因子 mRNA 表达水平

表 2　毒力基因表达量与相应 16S rRNA 表达量的比值

($n = 3, \bar{x} \pm s$)

S. pn	ply	psaA	lytA	cbpA
TIGR4	0.85 ± 0.03	0.73 ± 0.07	0.71 ± 0.05	0.69 ± 0.01
△clpP	0.64 ± 0.04[a]	0.43 ± 0.01[a]	0.53 ± 0.06[a]	0.50 ± 0.02[a]

a: $P < 0.05$,与 TIGR4 比较

2.6　小鼠毒力实验

野生菌株半数致死时间 < 1 d,而缺陷菌株 > 8 d。两者毒力具有统计学差异($P < 0.01$,图 7)。

2.7　*S. pn* 体内清除时间测定

在注射野生菌株液后 48 h,小鼠体内菌密度仍较高,而缺陷菌于注射后 36 h 大部分被清除,48 h 后小鼠体内缺陷菌几乎全部被清除,缺陷菌的清除速度明显快于野生菌株(表 3)。

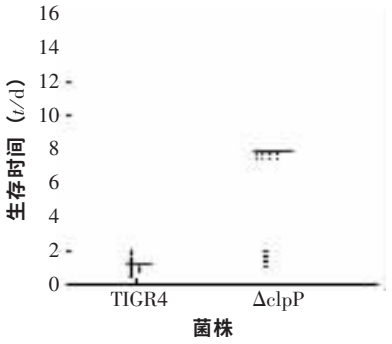


图7 小鼠腹腔注射 *S. pn* 后毒力实验结果

表3 *S. pn* 在小鼠体内清除时间情况 [$n=6$, log(cfu/ml), $\bar{x}\pm s$]

S. pn	12 h	24 h	36 h	48 h
TIGR4	6.23±0.42	5.18±0.46	5.02±0.92	4.34±0.67
△clpP	5.53±0.32	4.04±0.21[a]	2.11±0.19[a]	0.00±0.00[a]

a: $P<0.05$, 与 TIGR4 比较

3 讨论

Clp 蛋白酶广泛存在于各种生物体内,由 Clp ATPase 调节亚基和 ClpP 肽酶亚基组成。ClpP 蛋白属于丝氨酸型蛋白酶,它是 Clp 蛋白酶的水解活性中心[2]。细菌通过合成 Clp 蛋白酶来迅速适应不断变化的环境,使其在不同的生长环境得以生存并参与调节其毒力因子的表达。本研究重点探索了 ClpP 对肺炎球菌毒力的影响。

本研究结果显示 clpP 缺陷菌株的生长繁殖能力大大下降,小鼠毒力实验结果表明,clpP 缺陷菌毒力显著减低,小鼠存活时间明显延长;clpP 缺陷菌在小鼠体内的浓度也明显低于野生菌株,缺陷菌在体内迅速被清除,不能像野生菌株一样在体内大量存活。

从毒力基因的 mRNA 表达来看,clpP 缺陷后 ply、psaA、lytA 和 cbpA 4 种毒力因子的表达均下降。LytA 是自溶酶,可引起 *S. pn* 自溶,释放出内部的各种因子,触发宿主炎症反应[3]。CbpA 是一种重要的黏附分子,可与上皮细胞分泌的补体 C_3 结合而使 *S. pn* 黏附在宿主细胞上[4]。PsaA 是 *S. pn* 的一种黏附分子,其与血链球菌的黏附素 SsaB 和副血链球菌黏附素 FimA 的 DNA 序列有高度的同源性[5]。它是相对分子质量为 37×10^3 的表面抗原,可用于 *S. pn* 疾病的免疫诊断[5]。Ply 是 *S. pn* 的一个重要的毒力因子,属于巯基激活毒素家族,可引起广泛的毒性效应。高浓度的 Ply 在膜上聚集成寡聚物,形成透膜孔,造成细胞溶解;低浓度时,Ply 刺激产生细胞因子,抑制呼吸上皮细胞纤毛的摆动,破坏上呼吸道和肺泡的单层上皮细胞,降低粒细胞的移动和杀菌活性,抑制淋巴细胞的增殖和抗体的合成[6]。以上毒力因子均在 *S. pn* 致病过程中发挥了重要作用。我们的研究结果显示,clpP 缺陷后这些毒力因子表达量都显著下降,这可能是缺陷菌株 *S. pn* 毒力下降的重要原因之一。

动物实验结果显示 clpP 基因缺陷菌株较野生菌株更容易被宿主清除,其感染小鼠的生存时间也较野生菌株显著延长,可见 clpP 基因缺陷可显著减弱 *S. pn* 的毒力。ClpP 作为一种热休克蛋白,具有蛋白水解酶的活性。缺陷该基因导致细菌整体的毒力降低,其原因可能与其蛋白水解酶的功能相关,即 ClpP 可能通过蛋白水解的方式影响某些基因的转录因子的活性。

本研究对 CCD 蛋白酶的活性中心进行研究,发现 clpP 基因缺陷可从多方面减弱 *S. pn* 毒力,这为我们进一步理解 CCD 蛋白酶的作用及其机制奠定基础。本课题组研究表明,ClpP 不仅在不同的血清型中具有高度的保守性,且与其他 *S. pn* 毒力蛋白联合用药能够显著提高疫苗的保护效果,它是 *S. pn* 很好的疫苗靶点[7,8]。同时 Brotz-Oesterhelt 等新开发出的一类抗生素 acyldepsipeptides,就是以 ClpP 为靶点,通过引起蛋白水解失衡,使细菌死亡[9]。本研究对 ClpP 影响细菌毒力的作用机制做了初步分析,这将为以 Clp 为靶点的疫苗和抗菌药物开发提供理论基础。

参考文献:

[1] Lindemann J, Leiacker R, Rettinger G, *et al*. Nasal mucosal temperature during respiration[J]. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2002, 27(3): 135-139.

[2] Wang J, Hartling J A, Flanagan J M. The structure of ClpP at 2.3 A resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis[J]. Cell, 1997, 91(4): 447-456.

[3] Jedrzejas M J. Pneumococcal virulence factor: structure and function [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(2): 187-207.

[4] Smith B L, Hostetter M K. C3 as substrate for adhesion of Streptococcus pneumoniae [J]. J Infect Dis, 2000, 182(2): 497-508.

[5] Berry A M, Paton J C. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae [J]. Infect Immun, 1996, 64(12): 5255-5262.

[6] Novak R, Tuomanen E. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia[J]. Semin Respir Infect, 1999, 14(3): 209-217.

[7] 袁 军, 陈 曜, 曹 炬, 等. 肺炎链球菌毒力因子 ClpP 蛋白酶的体外表达及纯化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18): 1753-1755.

[8] Cao J, Chen D, Xu W, *et al*. Enhanced protection against pneumococcal infection elicited by immunization with the combination of PspA, PspC, and ClpP[J]. Vaccine, 2007, 25(27): 4996-5005.

[9] Brotz-Oesterhelt H, Beyer D, Kroll H P, *et al*. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics[J]. Nat Med, 2005, 11(10): 1082-1087.

(编辑 张 维)