

链球菌致热外毒素 SpeB 致病性研究进展

Advances in pathogenesis of streptococcal exotoxin B in *Streptococcus pyogenes*

张 波 (ZHANG Bo), 李学如 (LI Xue-ru), 江南屏 (JIANG Nan-ping), 任瑶瑶 (REN Yao-yao)

(西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

[关键词] 链球菌致热外毒素 B; A 族链球菌; 感染; 免疫; 病原菌

[中图分类号] R378.1⁺2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2012)04-0316-03

链球菌致热外毒素 B (Streptococcal exotoxin B, SpeB) 是 A 群链球菌 (group A *Streptococcus*, GAS) 以酶原形式分泌到胞外后形成的活性巯基蛋白酶。其能降解宿主胞外基质、免疫球蛋白和补体成分以及 GAS 自身表面黏附素 M 蛋白、F1 蛋白、C5a 肽酶和其他一些分泌蛋白, 破坏宿主防御系统, 帮助细菌逃避免疫清除, 协助 GAS 最初感染部位的扩散和入侵宿主深层组织^[1]。因此, SpeB 被认为是 GAS 的重要致病因子, 在 GAS 引起的严重侵袭性感染过程中起重要作用。本文就 SpeB 结构与表达调控、免疫逃逸和致病性等方面的研究进展作一介绍, 以为临床诊断治疗和研究 A 群链球菌感染提供一定的参考。

GAS (又称化脓性链球菌) 感染可引起人类多种疾病, 从急性咽炎、扁桃体炎到严重侵袭性感染坏死性筋膜炎和链球菌中毒休克综合征 (Streptococcal toxic shock syndrome, STSS)、链球菌感染后的变态反应性后遗症如急性风湿热和急性肾小球肾炎, 危害更为严重^[2]。目前包括细菌表面蛋白、透明质酸荚膜、链球菌溶血素、透明质酸酶、链激酶、核酶和链球菌致热外毒素在内的许多 GAS 毒力因子已被确定, 其中 SpeB 是引起 GAS 严重侵袭性感染的关键因子^[3]。基于 SpeB 在 GAS 致病过程中的重要作用, 增强对 SpeB 致病性的了解, 对于防止 GAS 感染具有积极意义。

1 SpeB 结构表达与调控

1.1 *speB* 基因与 SpeB 蛋白 到目前为止, 所有的临床分离 GAS 菌株染色体 DNA 上都检测到了 *speB* 基因。*speB* 的开放阅读框架编码 398 个氨基酸残基, 在切除 27 个氨基酸残基的信号肽后, 以分子量 40 kD 的酶原形式在 GAS 对数生长后期或稳定生长的早期分泌到胞外, 形成由 Cys47、His195 和 Trp212 三个氨基酸残基组成活性中心的分子量为 28 kD 的活性 SpeB。根据 308 和 317 位点氨基酸残基的不同, SpeB 蛋白可分为 mSpeB1 (Ser308 和 Ala317)、mSpeB2 (Gly308 和 Ala317) 和 mSpeB3 (Ser308 和 Ser317) 3 种主要形式, 三者具有相似的半胱氨酸蛋白酶活性, 但只有 mSpeB2 具有与人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 结合的精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸 (RGD) 结构域。SpeB 的 RGD 结构域可能参与^[4]: (1) 细菌黏附宿主细胞表面; (2) 抑制血小板聚集; (3) 聚集 SpeB 在感染部位, 增强 SpeB 的降解效率。

1.2 SpeB 在体内的表达与调控 虽然所有 GAS 菌株都存在 *speB* 基因, 但并不是所有菌株都产胞外毒素 SpeB, 约有 25%~40% 的临床分离株很少或根本没有 SpeB 活性, 即使在产 SpeB 菌株中, 表达量也各不相同^[5]。GAS 在人体血液或通过小鼠感染腹腔模型传代后, 可诱发细菌菌落形态和毒力

[收稿日期] 2011-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (31070117)

中央高校基本科研业务专项资金 (SWJTU11ZT25)

[作者简介] 张波 (1988-), 女 (汉族), 江苏省连云港市人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

[通讯作者] 李学如 E-mail: xueruli@sina.com

基因表达模式的改变,呈现相对较大菌落不表达 SpeB,小菌落 SpeB 表达上调。

Aziz 等^[6]推测,GAS 在宿主体内下调 SpeB 表达,可以保留细菌表面蛋白和分泌蛋白,帮助细菌成功建立感染。因此,SpeB 阴性菌株被认为是侵入性株,噬菌体编码的 DNase 是 SpeB 表达从阳性转化到阴性的必要因子^[7]。

2 SpeB 与免疫

2.1 SpeB 与细胞凋亡 GAS 一直被认为是胞外病原体,但最近的研究^[8]发现,在 36% 的无症状携带者和 93% 的感染 GAS 扁桃体炎患者的上皮细胞检测到了 GAS;在急性侵袭性疾病或无症状 GAS 携带者的巨噬细胞和巨噬细胞样细胞中也发现了 GAS 的存在。胞内 GAS 除引起复发性感染外,也造成上皮细胞凋亡。GAS 毒力因子如蛋白质 F1 和 SpeB 被认为在诱导上皮细胞凋亡过程中起关键作用,具有活性的 SpeB 蛋白酶被证明为诱导培养细胞凋亡所必需。在 SpeB 诱导细胞凋亡过程中,观察到线粒体功能障碍和钙结合蛋白基因表达上调以及 SpeB 激活内在和外在半胱天冬酶途径。这些观察结果表明,SpeB 导致线粒体功能障碍和触发细胞凋亡可能是通过受体结合途径完成的。进一步的研究^[9]确定,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 为 SpeB 的细胞受体,SpeB 结合位点 RGD 基序突变,降低其诱导细胞凋亡的能力。此外,Fas 与 SpeB 的结合能力也与细胞凋亡有关。抗 Fas 抗体抑制 SpeB 诱导细胞凋亡,这表明 SpeB 诱导细胞凋亡是通过 Fas 介导的细胞凋亡信号途径来实现的。这些研究结果说明,活性 SpeB 蛋白酶是触发细胞凋亡的重要条件,SpeB 诱导细胞凋亡途径可能与白细胞介素-1 β 转化酶家族蛋白和 Fas 介导的细胞凋亡途径有关;诱导吞噬细胞凋亡有助于细菌逃避免疫清除^[10]。

2.2 SpeB 与 GAS 免疫清除逃逸 SpeB 是 GAS 抵抗巨噬细胞清除和在宿主血液中生存的一个重要因素。GAS-小鼠模型显示,*speB* 突变株感染后能有效地从腹膜中清除,但野生型菌株不能;纯化的 SpeB 能降低 U937 细胞的吞噬活性,SpeB 能清除抗体和补体,逃避抗体和补体介导的细胞吞噬作用。其作用机制可能是通过以下途径完成^[11]:(1) SpeB 识别和酶解 IgG 的抗原结合部位(Fab 结合部位),避免 Fc γ - 受体介导的吞噬作用,在细菌表面留下与宿主相似的免疫球蛋白的非特异部位;(2) SpeB

降解血清补体 C3,削弱补体 C3 片段对 GAS 表面的调理作用;(3)降解血清中的灭菌蛋白,补体活化正调节子;(4)从 GAS 表面释放 C5a 肽酶,灭活 C5a 白细胞趋化活性。

3 SpeB 与 GAS 的致病性

3.1 SpeB 与严重 GAS 感染 临床流行病学监测结果显示^[2],SpeB 是引起严重 GAS 感染的关键因素,SpeB 表达与 GAS 感染疾病的严重程度相关。在 GAS 感染的主要血清型 M1 型菌株中,高表达 SpeB 的菌株与 GAS 感染严重症状如 STSS、软组织坏死以及死亡率相关^[12]。在小鼠感染模型中,血清型 M1、M3 和 M49 的 *speB* 突变菌株,通过腹膜和气袋感染小鼠,与野生型菌株相比较,表现出了较少的死亡率;在 *speB* 突变株培养液中补充重组 SpeB 蛋白,通过气袋感染小鼠,增加了小鼠的死亡率;*speB* 突变株在感染过程中,还显示减少菌血症和 GAS 在器官间的传播。小鼠皮下感染 *speB* 突变株造成的溃疡明显小于野生型,SpeB 免疫小鼠成活率高于野生株^[13]。但也有研究显示出相反的结果,在 M1 分离株中,GAS 疾病的严重性与 SpeB 表达呈负相关,降低 SpeB 表达,可能有助于维持细菌表面 M1 蛋白结构的完整性,有利于抵抗宿主免疫清除^[14]。这些相反结果表明一个事实,即严重 GAS 感染并不仅依赖于特定的致病因子如 SpeB,细菌毒力与宿主因子之间的相互作用力可能决定最终的感染结果。

3.2 SpeB 与急性链球菌感染肾小球肾炎(acute post-streptococcal glomerulonephritis, APSGN) GAS 感染可引起非化脓性后遗症,如风湿热和 APSGN。风湿热是一种复杂的咽喉感染,是 5~15 岁儿童中的常见疾病^[15]。APSGN 是由 GAS 感染引发的自身抗体介导免疫复合体造成感染后发病,SpeB 蛋白(酶原和活性形式)及其抗体参与 APSGN 发病。最近的研究^[16]显示,在肾活组织检查中,增加抗 SpeB 的抗体滴度和 SpeB 蛋白沉积与 APSGN 高度相关,这意味着 SpeB 在 APSGN 致病过程中起重要作用。在 SpeB - 超免疫小鼠模型的小鼠肾小球发现了免疫球蛋白沉积、补体活化和白细胞渗透物,抗 SpeB 单克隆抗体与肾血管内皮细胞能进行交叉反应,并造成肾脏损伤^[17]。这些研究表明,SpeB 和抗-SpeB 抗体的确参与了 APSGN 发病。

目前大量的实验证据表明, SpeB 在 GAS 致病过程中起着重要的作用, 尽管部分实验结果存在不一致性, 但我们认为, 这些相互矛盾的结果可能是使用不同的菌株或不同的感染模型所致。另外, GAS 菌株的多样性也可能是造成这一现象的主要原因。由于不同 GAS 菌株基因组中前噬菌体呈现多样性^[18], 当细菌面对同样的刺激时, 菌株之间这种差异也可能会引起不同的反应。正是由于这些多样性的存在, 使得目前我们对参与 SpeB 表达调节网络和 SpeB 致病过程中的作用还不能完全理解。因此, 进一步了解 GAS 如何调节 SpeB 表达, 将有助于我们阐明 SpeB 在 GAS 感染过程中的作用。

[参考文献]

- [1] Chiang-Ni C, Wu J J. Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*[J]. J Formos Med Assoc, 2008, 107(9): 677 - 685.
- [2] Bessen D E. Population biology of the human restricted pathogen [J]. Infect Genet Evol, 2009, 9(4): 581 - 593.
- [3] Corroll R K, Musser J M. Musser from transcription to activation: how group A *Streptococcus*, the flesh-eating pathogen, regulates SpeB cysteine protease[J]. Mol Microbiol, 2011, 81(3): 588 - 601.
- [4] Stockbauer K E, Magoun L, Liu M, et al. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A *Streptococcus* with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(1): 242 - 247.
- [5] 李学如, 李尧, 王艳, 等. 酪素平板法检测临床分离 A 族链球菌致热外毒素 B 活性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6): 699 - 700.
- [6] Aziz R K, Pabst M J, Jeng A, et al. Invasive M1T1 group A *Streptococcus* undergoes a phase-shift in vivo to prevent proteolytic degradation of multiple virulence factors by SpeB[J]. Mol Microbiol, 2004, 51(1): 123 - 134.
- [7] Walker M J, Hollands A, Anderson-Smith M L, et al. DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection[J]. Nat Med, 2007, 13(8): 981 - 985.
- [8] Thulin P, Johansson L, Low D E, et al. Viable group A streptococci in macrophages during acute soft tissue infection [J]. PLoS Med, 2006, 3(3): e53.
- [9] Tsai W H, Chang C W, Lin Y S, et al. Streptococcal pyrogenic exotoxin B-induced apoptosis in A549 cells is mediated through $\alpha_v\beta_3$ integrin and Fas[J]. Infect Immun, 2008, 76(4): 1349 - 1357.
- [10] Viera N T, Romero M J, Montero M K, et al. Streptococcal erythrogenic toxin B induces apoptosis and proliferation in human leukocytes[J]. Kidney Int, 2001, 59(3): 950 - 958.
- [11] Kuo C F, Lin Y S, Chuang W J, et al. Degradation of complement 3 by streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits complement activation and neutrophil opsonophagocytosis[J]. Infect Immun, 2008, 76(3): 1163 - 1169.
- [12] Shiseki M, Miwa K, Nemoto Y, et al. Comparison of pathogenic factors expressed by group A *Streptococci* isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome and scarlet fever[J]. Microb Pathog, 1999, 27(4): 243 - 252.
- [13] Kuo C F, Luo Y H, Lin H Y, et al. Histopathologic changes in kidney and liver correlate with streptococcal pyrogenic exotoxin B production in the mouse model of group A streptococcal infection[J]. Microb Pathog, 2004, 36(5): 273 - 285.
- [14] Kansal R G, McGeer A, Low D E, et al. Inverse relation between disease severity and expression of the streptococcal cysteine protease, SpeB, among clonal M1T1 isolates recovered from invasive group A streptococcal infection cases[J]. Infect Immun, 2000, 68(11): 6362 - 6369.
- [15] Cunningham M W. Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 609(1): 29 - 42.
- [16] Batsford S R, Mezzano S, Mihatsch M, et al. Is the nephritogenic antigen in post-streptococcal glomerulonephritis pyrogenic exotoxin B (SPE B) or GAPDH? [J]. Kidney Int, 2005, 68(3): 1120 - 1129.
- [17] Luo Y H, Kuo C F, Huang K J, et al. Streptococcal pyrogenic exotoxin B antibodies in a mouse model of glomerulonephritis [J]. Kidney Int, 2007, 72(6): 716 - 724.
- [18] Aziz R K, Edwards R A, Taylor W W, et al. Mosaic prophages with horizontally acquired genes account for the emergence and diversification of the globally disseminated M1T1 clone of *Streptococcus pyogenes* [J]. J Bacteriol, 2005, 187(10): 3311 - 3318.