

杨岚,张永安,周洋.无乳链球菌与小鼠巨噬细胞互作转录组测序分析[J].华中农业大学学报,2024,43(6):307-315.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.06.030

## 无乳链球菌与小鼠巨噬细胞互作转录组测序分析

杨岚<sup>1</sup>,张永安<sup>1,2,3</sup>,周洋<sup>1,2,3</sup>

1. 华中农业大学水产学院,武汉 430070; 2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室,广州 510542;  
3. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心,武汉 430070

**摘要** 巨噬细胞是先天性免疫系统的重要组成部分,但无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)却能在巨噬细胞内存活并以巨噬细胞为载体入侵中枢神经系统。为解析无乳链球菌在巨噬细胞内存活机制,将无乳链球菌 HN016 与 RAW264.7 共孵育,提取胞内细菌 RNA 后进行转录组测序(RNA-seq)、Gene Ontology(GO)及 Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG)富集分析;于体外将 HN016 与罗非鱼原代巨噬细胞孵育,提取胞内细菌 RNA,并利用 quantitative real-time PCR(qPCR)验证目标基因(包括:*sip*、*fbxA*、*cylB*、*cylD*、*cylE*、*neuA*、*cpsB* 和 *cfb*)表达情况。结果显示,与无处理组相比,共筛选到 1 215 个差异表达基因(DEG),其中 896 个上调基因,319 个下调基因。GO 富集结果显示,DEG 在分子功能、生物学过程和细胞组分 3 大类中均显著富集。KEGG 富集结果显示,显著富集通路主要为 ABC 转运体、核糖体和群体感应等代谢途径。在 DEG 中,筛选到无乳链球菌毒力相关基因 27 个,包括 *fbxA*(+8.65)、*sip*(+6.28)、*cylD*(+4.93)和 *cfb*(-4.65)等,并利用 qPCR 验证 RNA-seq 结果,二者数据一致。而检测罗非鱼原代巨噬细胞内存活细菌的转录水平发现其目标基因的表达水平与小鼠巨噬细胞的相似。因此推测,无乳链球菌在被巨噬细胞吞入后,巨噬细胞内的有害环境增强了无乳链球菌的信号传导机制,刺激了无乳链球菌的能量运输和对巨噬细胞所产生的次生代谢物代谢的能力,并且提高了毒力相关基因的表达水平。

**关键词** 无乳链球菌;小鼠巨噬细胞 RAW264.7;胞内存活;次生代谢物

**中图分类号** S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)06-0307-09

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*),也被称为 B 组链球菌(group B *Streptococcus*, GBS),是一种革兰氏阳性细菌,具有广泛的宿主范围,包括哺乳动物、爬行动物、两栖动物以及鱼类<sup>[1]</sup>。无乳链球菌不仅侵染人类,也会引起养殖鱼类尤其是罗非鱼的严重感染,并且能穿过血脑屏障,入侵中枢神经系统<sup>[2-3]</sup>,导致人类和鱼类的严重脑膜炎症状<sup>[4-5]</sup>。迄今为止,研究人员提出了无乳链球菌的 3 种主要入侵策略,包括:经细胞(transcellular)、旁细胞(paracellular)和特洛伊木马(Trojan horse)。其中,特洛伊木马机制是无乳链球菌利用被感染的宿主细胞,突破血脑屏障转移到中枢神经系统<sup>[2,6]</sup>。

在无乳链球菌感染期间,宿主免疫系统产生响应,趋化因子招募巨噬细胞和中性粒细胞到感染部位,以消除入侵的病原体<sup>[7]</sup>。在巨噬细胞中,细菌被

吞入吞噬体,其中溶酶体形成高度酸性环境,并产生抗菌肽、活性氧和活性氮等物质,以杀死细菌<sup>[8-9]</sup>。有研究者认为化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) 在吞噬细胞中的生存是该病原菌建立感染的一个重要机制<sup>[10]</sup>。此外,也有研究证明巨噬细胞在单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)经血传播到脑内皮细胞时充当载体,然后进一步传播李斯特菌到脑实质中<sup>[11]</sup>。根据已有研究报道,无乳链球菌能够在巨噬细胞内存活一定时间,并利用荚膜多糖、双组份系统 CovS/CovR 等抵抗巨噬细胞内的恶劣条件,提高细菌的胞内存活率<sup>[12-13]</sup>。然而,无乳链球菌的胞内存活机制目前尚未完全明了。因此,解析无乳链球菌在巨噬细胞内存活机制,对明确无乳链球菌的人脑过程和致病机制至关重要。

本研究以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为模型,利

收稿日期:2024-04-11

基金项目:岭南现代农业实验室科研项目(NT2021008);现代农业产业技术体系专项(CARS-46)

杨岚,E-mail:yang\_lan\_21@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:周洋,E-mail:zhouyang@mail.hzau.edu.cn

用二代测序法鉴定无乳链球菌在巨噬细胞胞内存活过程中产生差异性表达的基因,并用罗非鱼原代巨噬细胞验证小鼠巨噬细胞结果,旨在为解析无乳链球菌的巨噬细胞胞内存活机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和细胞

无乳链球菌 HN016 菌株于 2010 年在广州分离自发病的罗非鱼体内,其基因组序列已上传至 GenBank 数据库,登录号为 CP011325.1。无乳链球菌用 THB 液体/固体培养基于 28 °C 培养。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由笔者所在实验室用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 传代保存。

### 1.2 试剂

THB 培养基购自青岛高科园海博生物技术有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清和青霉素-链霉素购自 Gibco 公司;Percoll 白细胞分离液购自 GE Healthcare 公司;反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Kit) 购自 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 检测试剂盒 (SYBR premix Ex Taq™ Kit) 购自北京擎科生物技术有限公司;试验中所用引物均由北京擎科生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 引物信息  
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	序列 5'-3' Sequence 5' to 3'	目标基因 Target gene
<i>cfb</i> -F	TAGCTTAGTTATCCCAAATCCC	<i>cfb</i>
<i>cfb</i> -R	TAAAGACTTCATTGCGTGCC	
<i>cpsB</i> -F	GTTTCGACATCACATAGAAG	<i>cpsB</i>
<i>cpsB</i> -R	GTATAGTACAATTCTCCACC	
<i>cylB</i> -F	GGGCTGCAGGTATTATCGAA	<i>cylB</i>
<i>cylB</i> -R	ATTTCCACAAAAGCAAACG	
<i>cylD</i> -F	CGTCGTGCCAACTT	<i>cylD</i>
<i>cylD</i> -R	CACCAGCTCTATCATCAGTAA	
<i>cylE</i> -F	CCAGGAAGTTACCCGATTGAG	<i>cylE</i>
<i>cylE</i> -R	GCCAGGAGGAGAATAGGAAATC	
<i>fbsA</i> -F	AGATCGCATAGCACAGCA	<i>fbsA</i>
<i>fbsA</i> -R	AAAGTAGCGTTGGGCATT	
<i>neuA</i> -F	ATCGTCGCCAAGATTTACAACC	<i>neuA</i>
<i>neuA</i> -R	CTAATGTTACACCACCTTGGGAAT	
<i>sip</i> -F	GGGGCTGCTACAGTTCTT	<i>sip</i>
<i>sip</i> -R	AGGGCAAGCTGTTAGTCAA	
16S-F	CGACGATACATAGCCGACCT	16S rRNA
16S-R	CCGTCACCTTGGTAGATTTTCC	

### 1.3 转录组样品制备

将无乳链球菌 HN016 培养至对数生长期, PBS 清洗 2 遍后重悬于 DMEM 培养基, 以 MOI=10 向 RAW264.7 细胞孔板中加入菌液, 1 500 r/min 离心 5 min 使得细菌与细胞充分接触, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 1 h。孵育后, 移去培养基, 加入含青霉素 (5 μg/mL)-链霉素 (100 μg/mL) 双抗的 DMEM 培养基孵育 1 h 以杀灭胞外细菌, 后用 PBS 清洗 2 遍, 加入灭菌去离子水常温裂解 20 min, 直至于显微镜下观察到细胞发生膨胀破裂, 释放胞内细菌。取适量裂解液稀释涂板计数菌量, 剩余裂解液 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。另取等量细菌加入无细胞的孔板内作为无处理组, 同样条件下孵育 2 h 后, 直接 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 于 -80 °C 保存。

### 1.4 转录组测序

从菌体样品中提取总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。去除 rRNA, 从总 RNA 中分离出 mRNA, 随后将纯化得到的 mRNA 片段化并作为模板, 利用随机引物反转录合成第一链 cDNA。在进行第二链合成时, dNTP 试剂中用 dUTP 代替 dTTP, 使 cDNA 第二链中碱基包含 A/U/C/G。双链的 cDNA 结构为黏性末端, 加入 End Repair Mix 补成平末端, 随后在 3' 末端加上 1 个 A 碱基, 用于连接 Y 字形的接头。在 PCR 扩增前, 用 UNG 酶将 cDNA 第二链消化, 从而使文库中仅包含 cDNA 第一链。经检测合格的文库再通过 Truseq SBS Kit (300 cycles) (Illumina) 二代测序平台进行测序。

### 1.5 序列组装

利用 Trimmomatic 软件, 去除接头序列、低质量读段序列及长度过短序列, 得到高质量的测序数据。利用 Rockhopper 软件, 将质控后得到的高质量测序序列以 HN016 菌株基因组 (CP011325.1) 为参考进行比对, 使测序序列定位到基因组。

### 1.6 差异表达分析

采用 RPKM (reads per kilobase of transcript per million reads mapped) 计算基因表达量。利用 edgeR 筛选差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG), 筛选标准为  $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$  和  $P \leq 0.05$ 。使用软件 Goatools (<https://github.com/tanghaibao/GOatools>) 进行 GO 富集分析; 使用 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>) 进行 KEGG PATHWAY 富集分析,  $P \leq 0.05$  则认为是显

著富集。

### 1.7 毒力相关差异表达基因聚类分析

将筛选得到的DEG与毒力因子数据库VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs>)进行比对,筛选与无乳链球菌毒力相关的DEG。

### 1.8 罗非鱼原代巨噬细胞吞噬试验

(1)配制 Percoll 溶液(以 10 mL 体积为例)。34% Percoll 溶液:3.4 mL Percoll、5.59 mL dH<sub>2</sub>O、1 mL HBSS (10×)和 25 μL Heparin (10<sup>4</sup> U/mL); 51% Percoll 溶液:5.1 mL Percoll、3.89 mL dH<sub>2</sub>O、1 mL HBSS (10×)和 25 μL Heparin (10<sup>4</sup> U/mL); (2)制备 34% Percoll-51% Percoll 分层:向 15 mL 离心管中加入 4 mL 34% 的 Percoll 溶液,然后在溶液底部缓慢加入 4 mL 51% Percoll 溶液,注意不要扰动界面;(3)取出罗非鱼头肾,用剪刀剪成 1 mm<sup>3</sup> 的碎块,将组织碎块转移到 100 μm 细胞筛网中,用 5 mL 注射器活塞轻轻按压组织碎块,按压过程中缓慢加入 DMEM 培养基,使单个细胞通过 100 μm 细胞过滤器;(4)水平离心机 4 °C 1500 r/min 离心 30 min(注意:离心机的加速度和减速度均应设为 0); (5)收集 3~4 mL 处于 34% Percoll-51% Percoll 界面的白细胞,转移入 15 mL 离心管,加入 6 mL 含肝素钠的 DMEM 培养基,混匀后 4 °C 1500 r/min 离心 10 min;重复 1 次;(6)加入含有 2% FBS 的 DMEM 培养基,重悬细胞,用血球计数板调整细胞浓度,转移至 12 孔细胞板,28 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养,待原代巨噬细胞贴壁之后,移除悬浮细胞和培养液,重新加入新鲜 DMEM 培养基,28 °C 培养待用;(7)无乳链球菌培养到对数期后,离心并重新悬浮于含有 2% FBS 的 DMEM 中;(8)以 MOI=10 将细菌接种于罗非鱼原代巨噬细胞,1500 r/min 离心 5 min 后于 28 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内培养 1 h。孵育后,移去培养基,加入含青霉素(5 μg/mL)-链霉素(100 μg/mL)双抗的 DMEM 培养基孵育 1 h 以杀灭胞外细菌,然后 PBS 清洗 2 遍,加入灭菌去离子水 20 min 裂解细胞,释放胞内细菌。(9)利用 Trizol 法提取细菌 RNA,经反转录为 cDNA 后存于 -20 °C 冰箱待用。

### 1.9 实时荧光定量 PCR

差异表达基因中进行 qPCR(quantitative real-time PCR)验证。使用反转录试剂盒(PrimeScript<sup>TM</sup> RT Kit)进行反转录,SYBR premix Ex Taq<sup>TM</sup> Kit 进行荧光定量 PCR,内参基因为 16S rRNA。qPCR 反应体系(20 μL):模板 cDNA 2 μL,

上下游引物各 0.5 μL,SYBR premix Ex Taq<sup>TM</sup> Kit 10 μL,ddH<sub>2</sub>O 7 μL。反应程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。试验独立重复 3 次,分析方法采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAW264.7 胞内存活细菌检测

裂解 RAW264.7 细胞后,取裂解液稀释涂板,计数胞内存活细菌。结果显示,在试验条件下,RAW264.7 细胞内存活细菌量为 3.05×10<sup>5</sup> CFU/mL,吞入率为 16.31%。说明无乳链球菌能够被 RAW264.7 细胞吞入,且能够在胞内存活并保持活性。

### 2.2 差异表达基因的筛选

经 Truseq SBS Kit(300cycles)平台测序,共获得了 36.82 G 数据,转录组各样本 Q20 接近 99%,且 Q30>90%,表明转录组测序质量较好,可用于后续分析(表 2)。

表 2 细菌转录组数据

Table 2 Transcriptome data of bacteria

组别 Group	总数据量/G Total data	质控数据/% Clean rate
互作 1 Interaction 1	6.43	99.18
互作 2 Interaction 2	7.09	99.18
互作 3 Interaction 3	8.43	99.27
无处理 1 Untreated 1	4.59	98.65
无处理 2 Untreated 2	5.51	98.64
无处理 3 Untreated 3	4.77	98.63

采用 DESeq 分析发现,在互作组和无处理组之间,共计有 1 215 个 DEG。相较于无处理组,互作组中有 896 个基因表达量显著上调,319 个基因表达量显著下调(图 1)。

### 2.3 差异基因功能注释与富集分析

DEG 总共匹配到 19 个 GO 条目,分别是生物进程(biological process)9 类(47.37%)、细胞组分(cellular component)3 类(15.79%)和分子功能(molecular function)7 类(36.84%)(图 2)。

对所有 DEG 进行 GO 富集分析,以获得其潜在的功能注释。GO 富集结果显示,DEG 主要集中在生物进程,包括细胞蛋白质代谢过程(cellular protein metabolic process,GO:0044267)、细胞酰胺代谢过程(cellular amide metabolic process,GO:0043603)、酰胺生物合成过程(amide biosynthetic process,GO:0043604)、肽类代谢过程(peptide metabolic process,

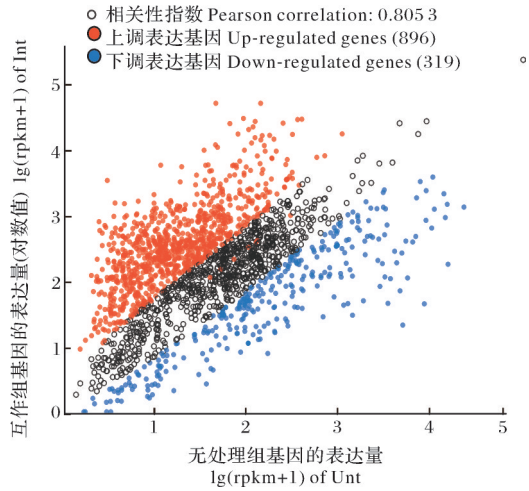


图1 差异基因散点图

Fig.1 Scatter-plot of DEGs

GO: 0006518) 和 蛋白翻译 (translation, GO:

0006412)(图3)。

有1166条DEG注释到KEGG数据库,分属于115个代谢通路,其中注释序列数量较多的途径分别为代谢途径(metabolism)、遗传信息处理(genetic information processing)和环境信息处理(environmental information processing)等通路(图4)。

KEEG富集分析显示,表达上调的DEG主要在ABC运输工具(ABC transporters, ko02010)、核糖体(ribosome, ko03010)和群体感应(quorum sensing, ko02024)等通路显著性富集(图5A);而表达下调的DEG主要在糖酵解/糖生成(glycolysis/gluconeogenesis, ko00010)、半乳糖代谢(galactose metabolism, ko00052)和丙酮酸代谢(pyruvate metabolism, ko00620)等通路显著性富集(图5B)。

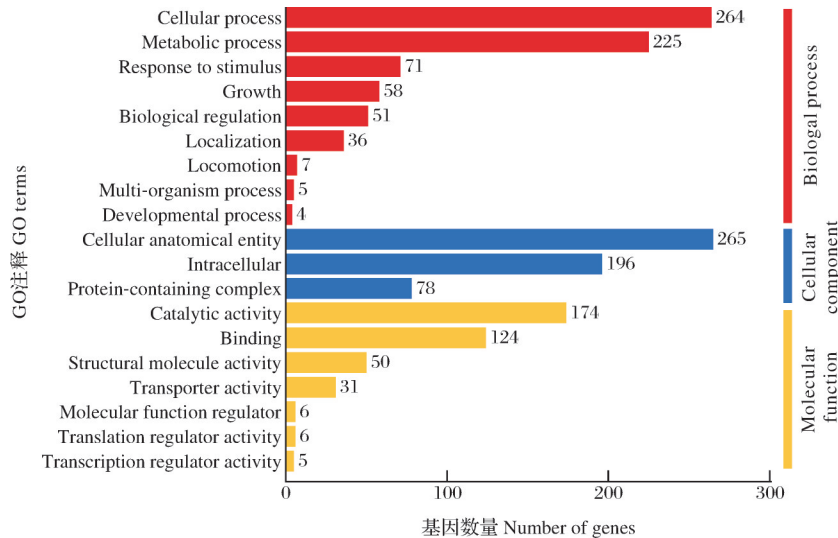


图2 差异基因的GO注释

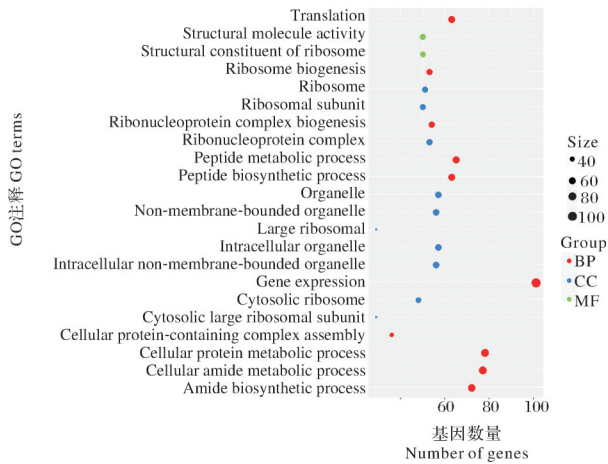
Fig.2 GO annotations of DEGs

2.4 毒力相关DEG聚类分析

为探究在巨噬细胞胞内存活期间无乳链球菌毒力相关基因的表达水平,将转录组中DEG与毒力基因数据库进行比对,筛选得到27个无乳链球菌毒力相关DEG,其中22个基因上调表达,5个基因下调表达(图6)。这些DEG可分为以下8个大类:(1)毒素(toxin),包括:cylE(+3.53)、cylK(+3.43)、cpsX(+3.33)、neuA(+2.92)、cylF(+2.80)、tig/ropA(+2.68)、cylB(+2.26)、cpsB(+2.20)、cfb(-4.65)、eno(-3.68)、gapdh(-2.44)、psaA(-1.21)和cba(-1.18);(2)黏附(adherence),包括:fbsA(+8.65)、fbsB(+7.08)、sip(+6.28)、pa-

va(+5.77)和cylX(+5.69);(3)蛋白酶(protease),包括:cylA(+3.87)和acpC(+3.58);(4)酶类(enzyme),包括:htrA(+4.35)和cylG(+3.34);(5)免疫活性抗原(immunoreactive antigen),包括:cylJ(+4.24)和cylI(+3.92);(6)抗吞噬(antiphagocytosis):cppA(+5.50);(7)内毒素(endotoxin):cylD(+4.93);(8)免疫逃逸(immune evasion):cylZ(+4.32)。

此外,在非差异表达基因中,比对到18个无乳链球菌毒力基因,包括cpsC~cpsK、groEL、groEL、neuB、rmlA、tuf、galU、rfbD、rmlB、hylB和rmlC(表3)。



BP:生物进程 Biological process; CC:细胞组分 Cellular component; MF:分子功能 Molecular function.

图 3 差异基因的 GO 富集分析

Fig.3 GO enrichment analysis of DEGs

### 2.5 定量验证

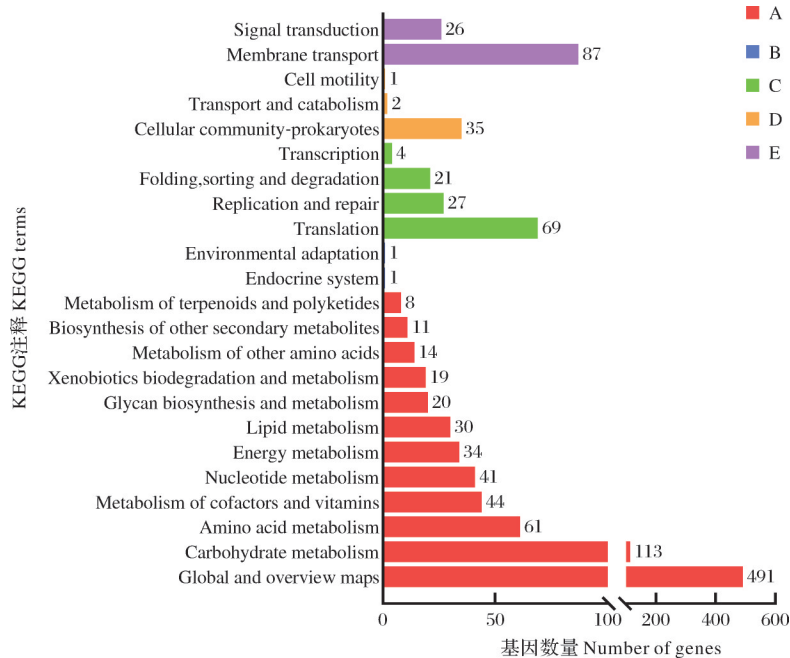
选择上述 DEG 中的 8 个基因 (*sip*、*fbxA*、*cylB*、*cylD*、*cylE*、*neuA*、*cpsB* 和 *cfb*) 分别在小鼠传代巨噬细胞和罗非鱼原代巨噬细胞进行定量表达验证。qPCR 检测结果显示,在 RAW264.7 内存活的无乳链球菌中,上述 8 个基因的  $\log_2$  (fold change) 分别为 +8.44、+7.64、+7.51、+6.14、+5.99、+5.58、+4.08 和 -2.69,且表达变化趋势与转录组测序结果

一致(图 7A)。在罗非鱼原代巨噬细胞内存活的无乳链球菌中,上述 8 个基因的  $\log_2$  (fold change) 分别为 +8.45、+8.02、+5.86、+7.93、+5.20、+6.45、+3.77 和 -3.18,其变化趋势与小鼠巨噬细胞中的相似(图 7B)。

## 3 讨论

本研究将无乳链球菌 HN016 菌株与小鼠巨噬细胞 RAW264.7 共孵育,待细菌被吞入后,收集胞内细菌提取 RNA 并进行 RNA-Seq。通过差异表达基因分析,发现无乳链球菌在巨噬细胞胞内存活期间出现大量的基因表达变化,进一步的 GO 和 KEGG 功能富集分析结果表明,DEG 主要在代谢相关通路显著性富集。这一结果与在化脓性链球菌、副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*) 和多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 的研究中所发现的一致,表明在胞内存活期间,病原菌多数上调表达基因同代谢相关<sup>[14-16]</sup>。富集通路包括 ABC 运输体,它可以通过离子和营养物质的输入/输出来促进细菌的代谢和毒力<sup>[17]</sup>。这一结果说明无乳链球菌可能通过改变新陈代谢通路来利用外界资源以及适应变化的环境条件。

此外,我们还将 DEG 与无乳链球菌毒力因子数



A:代谢途径 Metabolism; B:生物体系统 Organismal systems; C:遗传信息处理 Genetic information processing; D:细胞过程 Cellular processes; E:环境信息处理 Environmental information processing.

图 4 差异基因的 KEGG 注释

Fig.4 KEGG annotations of DEGs

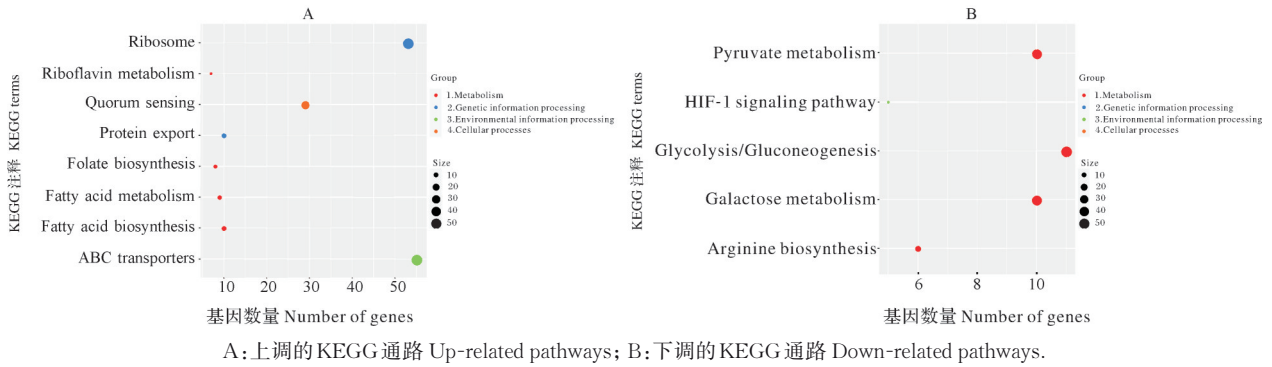


图5 差异基因的KEGG富集分析

Fig.5 KEGG enrichment analysis of DEGs

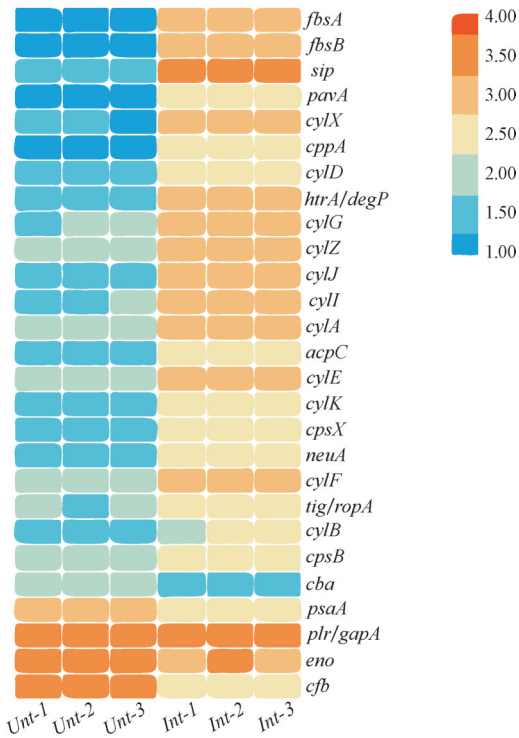


图6 毒力相关DEG聚类分析

Fig.6 Clustering analysis of virulence-related DEGs

数据库进行比对,发现了27个毒力相关DEG。其中,筛选到的毒力基因 *cfb* 负责编码28.4 ku的蛋白分子CAMP因子,CAMP一直被认为是一种重要的致病因子:当给兔或小鼠注射纯化的CAMP时,会导致兔或小鼠立即死亡<sup>[18-19]</sup>。目前,对CAMP致病机制的理解包括其低聚物能够在宿主膜上形成离散孔,以及它与糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白的结合从而促进细胞裂解<sup>[20]</sup>。该基因的下调表达表明,在无乳链球菌进入巨噬细胞的早期阶段(1h),无乳链球菌不会立即分泌CAMP来裂解细胞,得以在细胞中潜伏一段时间,以“特洛伊木马”形式突破血脑屏障,进入中枢神经系统。在无乳链球菌中, *neuA* 与 *neuB*、*neuC*、

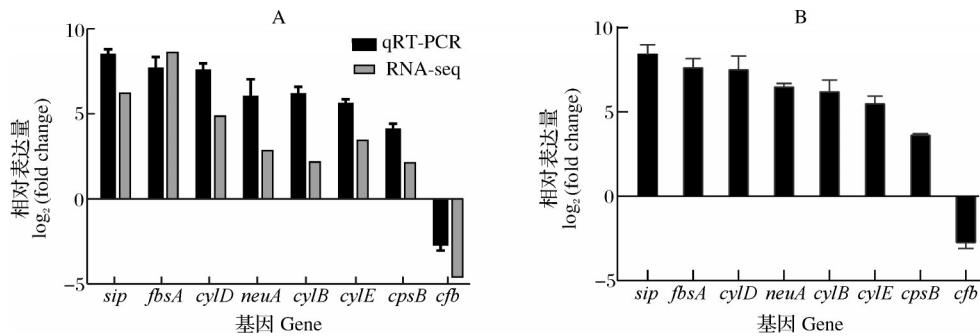
*neuD*一同编码唾液酸酶。唾液酸酶能够特异性地催化和激活无乳链球菌荚膜多糖表面的唾液酸,从而抑制补体替代途径中C3b在细菌表面的沉积。这种抑制能够导致巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬作用下降,进而提高无乳链球菌在宿主体内的存活率<sup>[21-22]</sup>。我们推测, *neuA* 的显著上调表达是无乳链球菌在与巨噬细胞孵育期间抗吞噬作用的结果。此外,在筛选到的27个毒力基因中包含5个黏附相关基因,分别是 *fbsA*、*fbsB*、*sip*、*pavA* 和 *cylX*。其中, *FbsA* 主要被认为可以促进黏附,而 *FbsB* 被证明是入侵人体细胞所必需的<sup>[23-24]</sup>。而这些黏附相关基因的显著上调表达,原因可能在于细菌与巨噬细胞孵育时间较短,即有些基因在黏附入侵过程中上调表达,入侵细胞后还未来得及回调。除DEG中的毒力相关基因外,我们在非差异表达基因中也比对到了18个毒力基因,其中有9个毒力基因(*cpsC*~*cpsK*),它们属于荚膜多糖合成操作子,而由 *cps* 基因簇编码的荚膜多糖是无乳链球菌的主要毒力因子<sup>[25]</sup>。有研究者通过对 *cps* 基因簇的插入诱变,构建了1个非包囊突变体( $\Delta cps$ ), $\Delta cps$ 在罗非鱼感染过程中表现出毒力的明显减弱<sup>[26-27]</sup>。在本研究中,这9个 *cps* 基因虽然全部呈上调趋势,但其差异并不显著,我们推测是由于孵育时间较短,无乳链球菌还未来得及完全上调 *cps* 基因簇的表达水平。因此,在后续的研究中,可以增加多个时间点的检测,从而更加全面系统地展现无乳链球菌在巨噬细胞内存活期间转录组水平的变化情况。

本研究通过RNA-Seq,初步揭示了被小鼠巨噬细胞吞入后无乳链球菌转录组的变化,发现巨噬细胞胞内压力影响着无乳链球菌的1215个基因的表达,这些DEG显著富集于一些与代谢、生物合成相关的GO类别和KEGG途径,这些途径与无乳链球菌

表 3 毒力相关非差异表达基因  
Table 3 Virulence-related non-DEGs

基因 Gene	差异倍数 $\log_2(fc)$	P 值 P-value	功能 Function	类型 Type
<i>cpsC</i>	0.041 6	9.87E-09	Capsular polysaccharide biosynthesis protein cpsC	Antiphagocytosis
<i>cpsD</i>	1.141 4	0.086 9	CpsD autokinase	Antiphagocytosis
<i>cpsE</i>	1.831 2	0.359 8	Glycosyl transferase CpsE	Antiphagocytosis
<i>cpsF</i>	1.854 4	0.316 1	Polysaccharide biosynthesis protein CpsF	Antiphagocytosis
<i>cpsG</i>	1.626 0	0.909 2	Polysaccharide biosynthesis protein CpsG	Immune evasion
<i>cpsH</i>	1.249 2	0.203 4	Capsular polysaccharide synthesis protein CpsH	Antiphagocytosis
<i>cpsI</i>	1.928 1	0.212 9	Capsular polysaccharide biosynthesis protein CpsI	Antiphagocytosis
<i>cpsJ</i>	1.864 1	0.329 8	Capsular polysaccharide biosynthesis protein CpsJ	Immune evasion
<i>cpsK</i>	1.433 8	0.551 4	Capsular polysaccharide biosynthesis protein CpsK	Immune evasion
<i>groEL</i>	0.883 5	0.005 6	Chaperonin GroEL	Adherence
<i>neuB</i>	1.779 2	0.502 9	Sialic acid synthase	Immune evasion
<i>rmlA</i>	0.097 1	2.51E-08	Glucose-1-phosphate thymidyl transferase	Antiphagocytosis
<i>tuf</i>	1.448 7	0.548 7	Translation elongation factor Tu	Adherence invasion
<i>galU</i>	1.751 5	0.567 9	Glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Immune evasion
<i>rfbD</i>	1.139 0	0.080 7	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	Immune evasion
<i>rmlB</i>	-0.155 4	9.54E-11	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	Immune evasion
<i>hylB</i>	-0.024 4	2.05E-09	Hyaluronate lyase	Enzyme
<i>rmlC</i>	-0.649 4	4.09E-16	DTDP-4-keto-6-deoxyglucose-3,5-epimerase	Antiphagocytosis

注 Note:  $\log_2(fc)$ :  $\log_2$  (fold change).



A: RAW264.7 内存活细菌 Survival bacteria in RAW264.7; B: 罗非鱼原代巨噬细胞内存活细菌 Survival bacteria in primary culture macrophages of tilapia.

图 7 部分毒力基因相对表达水平

Fig.7 Relative expression levels of virulence genes

的生命活动密切相关。推测无乳链球菌在被巨噬细胞吞入后,巨噬细胞内的有害环境增强了无乳链球菌的信号传导机制,刺激了无乳链球菌的能量运输和对巨噬细胞所产生的次生代谢物代谢的能力,并且提高了毒力相关基因的表达水平。本研究结果可为进一步解析无乳链球菌在巨噬细胞内的存活机制奠定基础。

参考文献 References

[1] ELLIOTT J A, FACKLAM R R, RICHTER C B. Whole-

cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(3): 628-630.  
 [2] COUREUIL M, LÉCUYER H, BOURDOULOUS S, et al. A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood-brain barriers[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(3): 149-159.  
 [3] DANEMAN R, PRAT A. The blood-brain barrier [J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(1): a020412 [2024-04-11]. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412.  
 [4] SEALE A C, BIANCHI-JASSIR F, RUSSELL N J, et al. Estimates of the burden of group B streptococcal disease world-

- wide for pregnant women, stillbirths, and children[J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(suppl 2):200-219.
- [5] EVANS J J, KLESIOUS P H, SHOEMAKER C A. An overview of *Streptococcus* in warm water fish[J]. Aquaculture, 2006, 7: 10-13.
- [6] BENMIMOUN B, PASTEFANAKI F, PÉRICHON B, et al. An original infection model identifies host lipoprotein import as a route for blood-brain barrier crossing [J/OL]. Nat Commun, 2020, 11: 6106 [2023-04-11]. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19826-2>.
- [7] SHABAYEK S, SPELLERBERG B. Acid stress response mechanisms of group B streptococci[J/OL]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 395 [2023-04-11]. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00395>.
- [8] FLANNAGAN R S, COSÍO G, GRINSTEIN S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(5):355-366.
- [9] RUSSELL D G, VANDERVEN B C, GLENNIE S, et al. The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(8): 594-600.
- [10] KAPLAN E L, CHHATWAL G S, ROHDE M. Reduced ability of penicillin to eradicate ingested group A streptococci from epithelial cells: clinical and pathogenetic implications [J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(11):1398-1406.
- [11] DREVETS D A, JELINEK T A, FREITAG N E. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice [J]. Infect Immun, 2001, 69(3): 1344-1350.
- [12] NIZET V, KIM K S, STINS M, et al. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci [J]. Infect Immun, 1997, 65(12):5074-5081.
- [13] CUMLEY N J, SMITH L M, ANTHONY M, et al. The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages [J]. Infect Immun, 2012, 80(5):1650-1661.
- [14] HERTZÉN E, JOHANSSON L, KANSAL R, et al. Intracellular *Streptococcus pyogenes* in human macrophages display an altered gene expression profile [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(4): e35218 [2023-04-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035218>.
- [15] JIN H, WAN Y, ZHOU R, et al. Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS) [J]. Environ Microbiol, 2008, 10(12):3326-3336.
- [16] GUO D C, LU Y, ZHANG A Q, et al. Identification of genes transcribed by *Pasteurella multocida* in rabbit livers through the selective capture of transcribed sequences [J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 331(2):105-112.
- [17] DAVIDSON A L, DASSA E, ORELLE C, et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, 72(2): 317-364.
- [18] LANG S H, PALMER M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin [J]. J Biol Chem, 2003, 278(40):38167-38173.
- [19] SKALKA B, SMOLA J. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor: a new finding about diffusible exo-substances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* [J]. Zentralbl Bakteriologie, 1981, 249(2):190-194.
- [20] HENSLER M E, QUACH D, HSIEH C J, et al. CAMP factor is not essential for systemic virulence of group B *Streptococcus* [J]. Microb Pathog, 2008, 44(1):84-88.
- [21] HAFT R F, WESSELS M R, MEBANE M F, et al. Characterization of *cpsF* and its product CMP- *N*-acetylneuraminic acid synthetase, a group B streptococcal enzyme that can function in K1 capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 1996, 19(3):555-563.
- [22] WANG E L, WANG K Y, CHEN D F, et al. Molecular cloning and bioinformatic analysis of the *Streptococcus agalactiae neuA* gene isolated from tilapia [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2):6003-6017.
- [23] SCHUBERT A, ZAKIKHANY K, PIETROCOLA G, et al. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells [J]. Infect Immun, 2004, 72(11):6197-6205.
- [24] GUTEKUNST H, EIKMANN B J, REINSCHIED D J. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells [J]. Infect Immun, 2004, 72(6):3495-3504.
- [25] YAMAMOTO S, MIYAKE K, KOIKE Y, et al. Molecular characterization of type-specific capsular polysaccharide biosynthesis genes of *Streptococcus agalactiae* type Ia [J]. J Bacteriol, 1999, 181(17):5176-5184.
- [26] ZHANG D F, KE X L, LIU Z G, et al. Capsular polysaccharide of *Streptococcus agalactiae* is an essential virulence factor for infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) [J/OL]. J Fish Dis, 2018; jfd.12935 [2023-04-11]. <https://doi.org/10.1111/jfd.12935>.
- [27] CIESLEWICZ M J, CHAFFIN D, GLUSMAN G, et al. Structural and genetic diversity of group B *streptococcus* capsular polysaccharides [J]. Infect Immun, 2005, 73(5): 3096-3103.



## Transcriptome analysis of *Streptococcus agalactiae* surviving in mouse macrophages

YANG Lan<sup>1</sup>, ZHANG Yongan<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Yang<sup>1,2,3</sup>

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510542, China;
3. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Wuhan 430070, China

**Abstract** Macrophage is an essential component of the innate immune system. However, *Streptococcus agalactiae* has the ability to survive within macrophage, allowing it to infiltrate the central nervous system. To elucidate the mechanisms underlying the survival of *S. agalactiae* within macrophages, we investigated the genome-wide transcriptional changes of *S. agalactiae* following phagocytosis by RAW264.7 and explored the metabolic pathways and genes associated with the intracellular survival of *S. agalactiae*. The *S. agalactiae* strain HN016 was co-incubated with RAW264.7 and the intracellular bacteria were subjected to transcriptome sequencing (RNA-seq), gene ontology (GO), and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. Additionally, HN016 was incubated with primary tilapia macrophages *in vitro* and RNA from the intracellular bacteria were extracted. Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to verify the expression of the target genes. The results showed that a total of 1 215 differentially expressed genes (DEGs), including 869 up-regulated genes and 319 down-regulated genes, were screened, compared with the untreated group. DEGs were significantly enriched in all three Go terms: molecular function, biological process, and cellular component. KEGG enrichment analysis showed that the main enriched pathways were ABC transporter, ribosome, quorum sensing, and glycolysis/gluconeogenesis. Among the DEGs, 27 virulence-related genes were screened, including *fbxA* (+8.65), *sip* (+6.28), *cylD* (+4.93), and *cfb* (-4.65). qPCR was used to validate the RNA-seq results, and the agreement between two datasets demonstrated the reliability of the RNA-seq analysis. The transcript levels of surviving bacteria in primary macrophages of tilapia were similar to those in mouse macrophages. Based on these findings, it was hypothesized that the noxious environment within macrophage enhanced the signaling mechanisms, energy transport capacity, and metabolic capacity of secondary metabolites produced by macrophages, as well as the expression levels of virulence-related genes of *S. agalactiae*.

**Keywords** *Streptococcus agalactiae*; mouse leukemia cells of monocyte macrophage RAW264.7; intracellular survival; secondary metabolite

(责任编辑:边书京)