

肺炎链球菌菌毛蛋白的结构功能研究*

颜子乙¹综述,崔亚利^{1,2},张静¹,郭思琪¹,颜灵逸¹,赵雪¹,江咏梅^{1,2△}审校

(1. 四川大学华西第二医院检验科,成都 610041;2. 妇儿疾病与出生缺陷教育部重点实验室,成都 610041)

[摘要] 肺炎链球菌(*S. pn*)菌毛是肺炎链球菌的胞外结构部分,也是菌体的黏附和毒力因子,在致病过程中起重要作用,作为蛋白疫苗的候选抗原之一,在联合免疫的疫苗策略中颇具潜力。本文以近年来 *S. pn* 菌毛蛋白基因、结构和生物学功能的研究成果为中心,结合菌毛作为蛋白疫苗候选因子的免疫保护效果进行综述,旨在系统地描述 *S. pn* 菌毛结构和功能的研究现状,并为后续疫苗研究提供新的思路。

[关键词] 肺炎链球菌;菌毛;蛋白疫苗

[中图法分类号] R563.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)34-4411-04

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)是上呼吸道常见的定植菌,菌体在突破机体免疫防御后,可引起肺炎、中耳炎、脑膜炎、败血症等局部或全身性感染,于 5 岁以下儿童和老年人群中有很高的发病率和病死率^[1-2]。WHO 将肺炎列为 5 岁以下儿童死亡的首要原因^[3],而儿童超过 50% 的重症肺炎由 *S. pn* 引起,并且在死亡病例中占有更高比例^[4]。

菌毛作为 *S. pn* 重要的蛋白疫苗候选因子,可通过增强对宿主细胞的黏附、识别细胞外基质、参与生物膜形成等方式,介导细菌黏附于宿主细胞表面,也具有侵袭作用,可诱导机体产生炎症反应^[5],进而在宿主组织定植和致病过程中发挥重要作用^[6-7],同时,在 *S. pn* 感染的患者血清中,也可检测到抗菌毛蛋白抗体^[8]。目前,已有学者对 *S. pn* 菌毛蛋白开展相关研究,并取得了阶段性成果,但相关报道较为零散,缺乏系统性。本文将围绕近年来 *S. pn* 菌毛蛋白的分型、结构特征和生物学功能的研究成果,并结合其作为蛋白抗原的免疫保护效果进行综述,旨在为后续研究提供更多思考方向。

1 *S. pn* 菌毛蛋白的分型及结构特征

与其他革兰阳性细菌相似,*S. pn* 菌毛为多个菌毛蛋白亚基共价装配形成的聚合物,每个菌毛蛋白亚基均含有分选酶(sortase, Srt)特异性 LPXTG 样基序,在特定的分选酶催化下,蛋白亚基间发生共价聚合,并将菌毛结构锚定在细胞壁表面的肽聚糖上^[9]。

编码 *S. pn* 菌毛的基因以基因岛的形式存在,根据菌毛基因岛和蛋白亚基结构的不同,目前共发现两种类型的 *S. pn* 菌毛, I 型菌毛和 II 型菌毛,前者由菌毛基因岛(*pilus islet*, PI)-1 编码,是蛋白亚基 RrgA、RrgB 和 RrgC 形成的聚合物;后者由 PI-2 编码,是蛋白亚基 PitB 的聚合物。由于 PI 具有可移动遗传元件特征,*S. pn* 菌株可同时表达两种菌毛、仅表达一种菌

毛或不表达菌毛。

1.1 I 型菌毛结构特征 I 型菌毛是 *S. pn* 中发现最早的菌毛,也是表达最广的一类,流行率约为 30%^[10-11]。*S. pn* 中编码 I 型菌毛的 PI-1 共包括 7 个基因,分别是正向调节基因 *rlrA*、表面结构蛋白亚基基因 *rrgA*、*rrgB*、*rrgC* 和分选酶基因 *srtC-1*、*srtC-2*、*srtC-3*(曾被称为 *srtB*, *srtC*, *srtD*)。其中, *rrgA*、*rrgB*、*rrgC* 可编码 LPXTG 样基序(*rrgA*: YPRTG; *rrgB*: IPQTG; *rrgC*: VPDTG),供分选酶识别催化亚基间的共价聚合,并将菌毛蛋白锚定到细胞壁表面^[12]。

I 型菌毛遍布 *S. pn* 菌体表面,电镜下直径为 2~6 nm^[13],长度可超过 1.5 μm^[14],呈柔韧毛发样,直接与细胞壁表面肽聚糖连接。I 型菌毛主要由 *rrgA*、*rrgB* 和 *rrgC* 构成,其中 RrgA 和 RrgC 为辅助蛋白, RrgB 是主要的骨架蛋白。RrgB 共包含 4 个结构域,空间构型呈鼻样凸起,具有极性;蛋白亚基首尾连接组成蛋白原丝,2 条蛋白原丝相互缠绕,构成 *S. pn* I 型菌毛的主体结构^[15]。由于 PI-1 的序列变异性,目前发现有 3 种亚型(RrgB clade I、RrgB clade II、RrgB clade III),不同亚型的蛋白同源性的 48%~60%,不同菌株的相同亚型之间蛋白同源性大于 99%^[16],相同亚型间序列高度保守。

RrgA 主要分布在 I 型菌毛远侧端,成簇排列,为菌毛顶端蛋白,属于黏附分子,介导菌毛的黏附功能,可与胶原蛋白、纤维连接蛋白和层黏连蛋白等连接。与其他革兰阳性细菌相似,顶端蛋白 RrgA 不是 *S. pn* I 型菌毛初始生成所必需的。RrgA 蛋白包含 4 个结构域,包括 1 个整合素 I 胶原识别结构域,这一区域由 2 条插入的“胳膊”折叠为 1 个带正电的摇篮结构,以及 3 个茎形成结构域组成^[17]。由于 PI-1 中编码 RrgA clade I 与 clade III 同源性大于 99%,RrgA 仅

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81301399);四川省科技计划项目(2016SZ0021);四川省科技厅重点研发项目(2017SZ0122)。

作者简介:颜子乙(1992-),硕士,主要从事肺炎链球菌蛋白疫苗方向研究。△ 通信作者,E-mail:810961566@qq.com。

分为两种亚型;且两种亚型间的变异主要集中在蛋白头部,细长的茎部仍然保守^[18]。RrgC 主要分布在 S. pn I 型菌毛近菌体端,呈单个蛋白排列,包含 3 个结构域,由 2 个异肽键连接,结构呈弯曲杆状。在亚基的聚合过程中,RrgC 不依赖 PI-1 编码的分选酶,而是由管家分选酶 SrtA 催化,将 S. pn I 型菌毛锚定在菌体表面^[19]。与 RrgA 和 RrgB 不同,S. pn 菌株中 RrgC 蛋白亚基高度同源(>98%)。

1.2 II 型菌毛结构特征 编码 S. pn II 型菌毛的 PI-2 共包括 5 个基因,分别是信号肽样蛋白基因 sipA、结构蛋白基因 pitA、pitB 和分选酶基因 srtG1、srtG2,整个基因岛位于蛋白酶 T 基因(PepT)和亚铁螯合酶基因(HemH)之间^[20-21]。近年来,S. pn II 型菌毛流行率增加,约为 20%,主要与血清 1 型,2 型,7F 型,19A 型和 19F 型相关^[22]。II 型菌毛主要由结构蛋白 PitB 的重复单元组成,其共价聚合由同源分选酶 SrtG1 和信号肽样蛋白基因 SipA 催化。PitB 包含 2 个结构域,不同分子间的 D1-D2 结构域表达 VTPTG 基序,由 SrtG1 识别并首尾连接,而 PitA 和 SrtG2 并不是 II 型菌毛形成所必须的^[20]。作为新发现的 S. pn 菌毛类型,目前对 S. pn II 型菌毛结构和功能的相关研究尚不深入。

2 S. pn 菌毛的生物学功能

菌毛虽不是 S. pn 生存的必需结构,但作为介导菌体黏附宿主细胞的结构基础和毒力因子,在 S. pn 侵袭性感染的初始阶段发挥重要作用。

局部侵袭性感染是造成菌血症的基础,针对 S. pn 的呼吸系统感染,在 S. pn I 型菌毛的黏附功能研究中,NELSON 等^[23]使用人肺泡上皮 A549 细胞作为宿主细胞,发现敲除 rrgA 的菌体,虽然形成菌毛结构,但黏附能力明显降低;敲除 rrgB 和 rrgC 的菌体,虽未形成菌毛结构,但黏附能力与野生菌毛型相似。这一发现表明 S. pn I 型菌毛的黏附功能由 RrgA 介导,而非菌毛主链。后续 NELSON 等^[23]在对 S. pn I 型菌毛免疫机制的初步探究中发现,与无菌毛株相比,菌毛株不仅在定植、致病和引发败血症方面更具优势,还能有效诱发肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 6(IL-6)的释放,提升宿主的炎症反应水平。在 S. pn I 型菌毛蛋白亚基 RrgA 与宿主免疫损害机制的研究中,ORRSKOG 等^[24]分别使用敲除和未敲除 rrgA 的菌株,通过鼻内和腹腔攻毒实验,发现表达 RrgA 的菌株在野生型小鼠中,比使用补体受体 3(CR3)抗体和 CR3 缺陷鼠更早出现败血症并有更快速的疾病进展,表明 RrgA 可通过与 CR3 的相互作用,影响巨噬细胞功能和全身感染状态,RrgA-CR3 介导的吞噬作用可促进局部感染向全身性感染扩散。同时,BASSET 等^[25]的研究表明,RrgA 可通过活化 Toll 样受体 2(TLR2),增强菌株的毒力和宿主的炎症反应。

S. pn 引起的呼吸系统以外的感染,多由病原菌呼吸道侵袭后形成的菌血症发展而来。针对 S. pn 所致的脑膜感染,IOVINO 等^[26]通过静脉攻毒实验,发现菌毛株与无菌毛株相比,在脑中具有更高的菌体载量;当 rrgA 敲除后,菌毛株在脑中的载量下降。同时,表达 RrgA 的菌株更易分散形成单一球菌,对菌体通过血脑屏障起到促进作用。通过对黏附配体的进一步研究发现,RrgA 可与血脑屏障上皮细胞表面的聚合免疫球蛋白受体(pIgR)和血小板内皮细胞黏附分子(PECAM-1)结合^[27],这两种受体的下调具有预防 S. pn 脑膜炎的潜力。

针对 S. pn 所致的中耳感染,FIGUEIRA 等^[28]通过鼻腔攻毒制造中耳感染模型,并分析中耳液。结果发现,虽然 S. pn I 型菌毛并非 S. pn 感染中耳的必要因素,但菌毛株与无菌毛株相比,有着更高的菌体载量,提示 S. pn I 型菌毛对中耳感染也具有促进作用。以上研究表明,S. pn I 型菌毛在细菌黏附、侵袭性感染与宿主免疫损伤,以及感染灶转移中均起到重要作用,RrgA 蛋白亚基是其主要的黏附因子和免疫介导因子。上述研究均表明,S. pn I 型菌毛的主要功能蛋白为 RrgA,主要骨架蛋白为 RrgB,S. pn I 型菌毛不仅具有黏附功能,还具有毒力作用,诱导宿主产生更严重的炎症损伤,在宿主局部性和全身性免疫应答中起重要作用。

与 S. pn I 型菌毛不同,BAGNOLI 等^[20]通过对 A549 细胞的黏附实验发现,S. pn II 型菌毛通过 PitB 蛋白亚基和主链的结构构型,由骨架蛋白本身产生黏附效应,其黏附能力弱于 RrgA。胶原蛋白、纤维连接蛋白和层黏连蛋白是 S. pn I 型菌毛和 S. pn II 型菌毛共同的黏附配体。综上所述,S. pn 菌毛具有介导菌体黏附、组织定植、屏障侵袭,诱导机体炎症损伤等功能,在感染过程中发挥重要作用。

3 S. pn 菌毛蛋白作为疫苗候选蛋白的潜力

目前,传统的 S. pn 多糖疫苗(pneumococcal polysaccharide vaccine,PPV)和结合疫苗(pneumococcal conjugate vaccine,PCV)已在部分国家和地区纳入为计划免疫范围。但由于幼儿免疫系统发育未完全成熟,PPV 所使用的多糖抗原不能在 2 岁以下儿童中产生有效的免疫保护^[29];PCV 虽能引起有效的免疫应答,但覆盖血清型有限,且制造成本高,价格昂贵。有文献报道^[30],在计划免疫 PCV7 后,人群 S. pn 患病率未出现明显改变,而在 S. pn 流行株中非疫苗型菌株比例逐渐增加。此结果提示,在大规模使用血清型依赖疫苗后,S. pn 流行株出现了血清型置换,降低了疫苗对人群的保护效果。

大量研究表明,多种 S. pn 毒力因子可作为新型蛋白疫苗的候选抗原,为 S. pn 感染提供广谱的保护效果,如胆碱结合蛋白(choline-binding protein,CBPs)、S. pn 表面蛋白 A 和 C(pneumococcal surface

protein, PspA/PspC)、S. pn 热休克蛋白(heat shock proteins, Hsp40/DnaJ)、S. pn 表面黏附素(pneumococcal surface adhesin A, PsaA)及溶血素(pneumolysin, Ply)等^[31-36]。然而,目前还没有商品化的蛋白疫苗能够 100% 抵抗 S. pn 感染,继续寻找新的蛋白抗原位点不仅能有效促进蛋白疫苗的发展,还能通过免疫保护机制的研究,为药物作用靶点及保护效果更好的疫苗研发提供理论依据。

有研究表明,在传统 S. pn 疫苗免疫人群的初始阶段,由于疫苗型菌株的迅速减少,S. pn I 型菌毛在流行株中的表达短时间内急剧下降;但随后 S. pn I 型菌毛的表达呈逐年上升态势,甚至超过传统疫苗普及前水平^[37],特别是在疫苗型菌株和耐药型菌株中,说明 S. pn 的 PI 具有可移动遗传元件特征,S. pn I 型菌毛对流行株的致病力和抵抗力有重要作用,可作为蛋白疫苗发展的候选抗原靶位进行深入研究。

现阶段 S. pn 菌毛蛋白疫苗的初步研究也主要针对 S. pn I 型菌毛,其细小丝状的结构,可以很好地暴露在宿主免疫系统之下。GIANFALDONI 等^[38]使用重组 S. pn I 型菌毛蛋白,评估免疫不同蛋白后,对避免小鼠发生 S. pn 菌血症的保护作用,发现 RrgA、RrgB 和 RrgC 均可刺激机体产生特异性抗体,其中 RrgA 和 RrgB 具有免疫保护作用,可明显延长受致死性 S. pn 剂量攻击小鼠的生存时间,而单一 RrgC 抗原蛋白免疫小鼠的保护作用欠佳。有研究发现,RrgA 的两种亚型之间存在交叉免疫,RrgA clade II 型抗原免疫可保护小鼠免受 RrgA clade I 型菌株的致死剂量攻击^[18,39],表明 RrgA 不仅具有免疫原性,还具有很好的保守性,是理想的菌毛疫苗候选蛋白。但 RrgB 的 3 种亚型之间无法形成交叉保护效果,针对 RrgB 的这一问题,研究人员使用 S. pn TIGR4(RrgB clade I), S. pn 6BSPEC(RrgB clade II) 和 S. pn 35BSME15(RrgB clade III)的 rrgB 基因,构建出包含 3 种 RrgB 亚型的融合蛋白 RrgB321,不同亚型的亚基之间使用 Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly 连接,使融合蛋白能够正常折叠。新构建的融合蛋白抗原 RrgB321 在主动免疫实验和被动免疫实验中,对避免小鼠产生 S. pn 菌血症具有较好的保护效果,其中在菌毛菌株中的抗血清介导的补体依赖性细菌吞噬作用水平与 PCV7 相当,表明 RrgB321 组分疫苗能成功形成针对 S. pn I 型菌毛菌株的免疫保护作用,可覆盖总体 S. pn 菌株的 30% 以上。

目前,诺华公司研发的 RrgB 融合蛋白疫苗正处于临床前研究中^[39],通过鼻内黏膜免疫的途径,可在小鼠实验性 S. pn 中耳炎的病程初期降低中耳液中菌体载量。而菌毛蛋白疫苗由于抗原靶位的限制,仅针对菌毛株产生免疫保护作用,无法避免无菌毛株对宿主的侵袭性感染;在有菌毛蛋白抗体的环境中,菌体也可选择性不表达菌毛,逃避免疫攻击。为突破菌毛

蛋白这一局限性,在进一步研究中,可与菌体保守蛋白联合制备多价疫苗,加强疫苗的免疫覆盖范围。例如,在 S. pn 胆碱结合蛋白 A(PcpA)、S. pn 组氨酸三聚体蛋白 D(PhtD)、S. pn 溶血素(dPly)组成的三联蛋白疫苗和由流感嗜血杆菌蛋白 D、dPly、PhtD 组成的三联蛋白疫苗已进入临床 II 期试验的阶段^[40],可将菌毛蛋白与这些较为成熟的蛋白疫苗组分进行配伍,发挥菌体蛋白保守性高和菌毛蛋白易被免疫系统识别的双重优势。同时,不同的免疫剂量、免疫途径和免疫佐剂也可极大地影响菌毛蛋白疫苗的免疫效果,调整联合疫苗不同抗原间蛋白配伍比例,尝试多种免疫途径,选用新型免疫佐剂,可使菌毛蛋白疫苗达到更好的保护效果^[41]。

4 展 望

时至今日,人们对 S. pn 菌毛结构和生物学功能的研究已经逐渐深入,但对其作为蛋白疫苗的保护作用及发挥作用的机制还有待进一步研究。在 PPV 和 PCV 普及之后,面对 S. pn 出现的流行株变换、菌毛表达反弹等趋势,人们对 S. pn 疫苗将抱有更多期待。菌毛不仅在 S. pn 致病过程中起到重要作用,同时在生物学功能、免疫原性、胞外表达、诱导抗体生成等方面均符合疫苗候选蛋白的选择指标,在疫苗设计与研发中具有很大潜力。然而,对重组 S. pn 菌毛蛋白疫苗的保护效果评估,大多还处于单一组分、单一模型阶段,缺乏同其他黏附蛋白或互补蛋白的联合评价,以及多器官、与病毒共感染模型的构建。继续寻找新的蛋白抗原靶位,评估新的蛋白疫苗联合模式,仍将是 S. pn 蛋白疫苗的发展方向。

参考文献

- [1] O'BRIEN K L, WOLFSON L J, WATT J P, et al. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates[J]. Lancet, 2009, 374(9693):893-902.
- [2] DELORIA KNOLL M, PARK D E, JOHNSON T S, et al. Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on immunogenicity[J]. Pediatr Infect Dis J, 2014, 33 Suppl 2:S119-129.
- [3] BRYCE J, BOSCHI-PINTO C, SHIBUYA K, et al. WHO estimates of the causes of death in children[J]. Lancet, 2005, 365(9465):1147-1152.
- [4] LI L, COUSENS S, LAWN J E, et al. Global regional and National causes of child mortality-Authors' reply[J]. Lancet, 2012, 380(9853):1556-1557.
- [5] BAROCCHI M A, RIES J, ZOGAJ X, et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(8):2857-2862.
- [6] BITTAYE M, CASH P. Streptococcus pneumoniae proteomics: determinants of pathogenesis and vaccine development[J]. Expert Rev Proteomics, 2015, 12(6):607-

- 621.
- [7] ENGHOLM D H, KILIAN M, GOODSELL D S, et al. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(6):854-879.
- [8] AHMED M S, DERBYSHIRE S, FLANAGAN B, et al. Immune responses to pneumococcal pilus RrgA and RrgB antigens and their relationship with pneumococcal carriage in humans[J]. *J Infect*, 2014, 68(6):562-571.
- [9] NAZIGA E B, WERESZCZYNSKI J. Molecular mechanisms of the binding and specificity of streptococcus pneumoniae sortase C enzymes for pilin subunits[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13119.
- [10] GHOLAMHOSSEINI-MOGHADDAM T, RAD M, MOUSAVI S F, et al. Detection of *lytA*, *pspC*, and *rgaA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children[J]. *Iran J Microbiol*, 2015, 7(3):156-160.
- [11] MAYANSKIY N, SAVINOVA T, ALYABIEVA N, et al. Antimicrobial resistance, penicillin-binding protein sequences, and pilus islet carriage in relation to clonal evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Russia, 2002–2013[J]. *Epidemiol Infect*, 2017, 145(8):1708-1719.
- [12] DRAMSI S, TRIEU-CUOT P, BIERNE H. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria[J]. *Res Microbiol*, 2005, 156(3):289-297.
- [13] FÄLKER S, NELSON A L, MORFELDT E, et al. Sortase-mediated assembly and surface topology of adhesive pneumococcal pili[J]. *Mol Microbiol*, 2008, 70(3):595-607.
- [14] HILLERLINGMANN M, RINGLER P, MOLLER S A, et al. Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 pili[J]. *EMBO J*, 2009, 28(24):3921-3930.
- [15] HILLERLINGMANN M, GIUSTI F, BAUDNER B C, et al. Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of RrgA[J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(3):e1000026.
- [16] MOSCHIONI M, DONATI C, MUZZI A, et al. *Streptococcus pneumoniae* contains 3 *rlrA* pilus variants that are clonally related[J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(6):888-896.
- [17] IZORÉ T, CONTRERAS-MARTEL C, EL MORTAJI L, et al. Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Structure*, 2010, 18(1):106-115.
- [18] MOSCHIONI M, EMOLO C, BIAGINI M, et al. The two variants of the *Streptococcus pneumoniae* pilus 1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(12):5033-5042.
- [19] SHAIK M M, MACCAGNI A, TOURCIER G, et al. Structural basis of pilus anchoring by the ancillary pilin RrgC of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(24):16988-16997.
- [20] BAGNOLI F, MOSCHIONI M, DONATI C, et al. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(15):5480-5492.
- [21] SHAIK M M, LOMBARDI C, MARAGNO TRINDADE D, et al. A structural snapshot of type II pilus formation in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(37):22581-22592.
- [22] HJÁLMAUSDÓTTIR M Á, PÉTURSDÓTTIR B, ERLENDSDÓTTIR H, et al. Prevalence of pilus genes in pneumococci isolated from healthy preschool children in Iceland: association with vaccine serotypes and antibiotic resistance[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(8):2203-2208.
- [23] NELSON A L, RIES J, BAGNOLI F, et al. RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Mol Microbiol*, 2007, 66(2):329-340.
- [24] ORRSKOG S, ROUNIOJA S, SPADAFINA T, et al. Pilus adhesin RrgA interacts with complement receptor 3, thereby affecting macrophage function and systemic pneumococcal disease[J]. *MBio*, 2012, 4(1):e00512-00535.
- [25] BASSET A, ZHANG FAN, BENES C, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 mediates inflammatory responses to oligomerized RrgA pneumococcal pilus type 1 protein[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(4):2665-2675.
- [26] IOVINO F, HAMMARLOF D L, GARRISS G, et al. Pneumococcal meningitis is promoted by single cocci expressing pilus adhesin RrgA[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8):2821-2826.
- [27] IOVINO F, ENGELEN-LEE J Y, BROUWER M, et al. pIgR and PECAM-1 bind to pneumococcal adhesins RrgA and PspC mediating bacterial brain invasion[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(6):1619-1630.
- [28] FIGUEIRA M, MOSCHIONI M, DE ANGELIS G, et al. Variation of pneumococcal Pilus-1 expression results in vaccine escape during experimental otitis media EOM[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e83798.
- [29] KADIOGLU A, WEISER J N, PATON J C, et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(4):288-301.
- [30] REGEV-YOCHAY G, JABER H, HAMDAN A, et al. Vaccine escape of pilated *Streptococcus pneumoniae* strains[J]. *Vaccine*, 2016, 34(25):2787-2792.
- [31] KIM G L, SEON S H, RHEE D K. Pneumonia and streptococcus pneumoniae vaccine[J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(8):885-893.
- [32] TOSTES R O, RODRIGUES T C, DA SILVA J B, et al. Protection elicited by nasal immunization with recombinant pneumococcal surface protein a (rPspA) adjuvanted with Whole-Cell pertussis vaccine (wP) against Co-Colonization of mice with streptococcus pneumoniae[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0170157.
- [33] XU Q, PRYHARSKI K, PICHICHERO M E. Trivalent pneumococcal protein vaccine protects against experimental acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* in an infant murine model[J]. *Vaccine*, 2017, 35(2):337-344.

- normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 33 (2): 243-257.
- [20] 刘雪聪, 刘福林, 李志林, 等. 氢气对大鼠离体心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. *山东医药*, 2015, 55(6): 1-3.
- [21] 李敏. 富氢水对社区代谢综合征患者血脂及高密度脂蛋白功能的影响[D]. 泰安: 泰山医学院, 2013.
- [22] KAJIYAMA S, HASEGAWA G, MAI A, et al. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance[J]. *Nutrition Research*, 2008, 28 (3): 137-143.
- [23] 薛乾. 分子氢对心肌缺血再灌注损伤保护的膜分子机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [24] LUO H, FAN Z, XIANG D, et al. The protective effect of umbelliferone ameliorates myocardial injury following ischemia? reperfusion in the rat through suppression NLRP3 inflammasome and upregulating the PPAR- γ [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3404-3410.
- [25] 马敏, 张娜娜, 师磊, 等. SDG 对去卵巢大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用[J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(6): 825-828.
- [26] 骆莹莹. 氢分子对正常饮食 C57BL/6 小鼠脂肪组织脂代谢及脂代谢相关基因表达的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [27] NAKAO A, TOYODA Y, SHARMA P, et al. Effectiveness of Hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2010, 46(2): 140-149.
- [28] SANSBURY B E, DEMARTINO A M, XIE Z, et al. Metabolomic analysis of pressure-overloaded and infarcted mouse hearts[J]. *Circ Heart Fail*, 2014, 7(4): 634-642.
- [29] BIBLI S I, ZHOU Z, ZUKUNFT S, et al. Tyrosine phosphorylation of eNOS regulates myocardial survival after an ischaemic insult; role of PYK2 [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(8): 926-937.
- [30] 刘艳涛. 氢气盐溶液在肝脏缺血再灌注损伤中保护作用的机制[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [31] 瞿勇强, 李桢, 李树华, 等. 缺血心肌早期超微结构观察[J]. *昆明医学院学报*, 2011, 32(3): 118-119.
- [32] 孙安会. 冠心病血症证病因病势对心肌细胞能量代谢及病证网络模型的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [33] NICOLAOU P, RODRIGUEZ P, REN X, et al. Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury[J]. *Circ Res*, 2009, 104(8): 1012-1020.
- [34] HAN L, TIAN R, YAN H, et al. Hydrogen-rich water protects against ischemic brain injury in rats by regulating calcium buffering proteins [J]. *Brain Res*, 2015, 1615: 129-138.
- [35] JING L, WANG Y, ZHAO XM, et al. Cardioprotective effect of hydrogen-rich saline on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. *Heart Lung Circ*, 2015, 24(6): 602-610.
- [36] BALESTRINO M, SAROCCHI M, ADRIANO E A. Potential of creatine or phosphocreatine supplementation in cerebrovascular disease and in ischemic heart disease[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(8): 1955-1967.
- [37] 张泉三, 巩霞, 王滨, 等. 吸入氢气对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *中国当代医药*, 2015, 8(27): 7-9, 21.

(收稿日期: 2018-06-18 修回日期: 2018-08-16)

(上接第 4414 页)

- [34] CUI Y, ZHANG X, GONG Y, et al. Immunization with DnaJ (hsp40) could elicit protection against nasopharyngeal colonization and invasive infection caused by different strains of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Vaccine*, 2011, 29(9): 1736-1744.
- [35] BROOKS W A, CHANG L J, SHENG XIAOHUA, et al. Safety and immunogenicity of a trivalent recombinant PcpA, PhtD, and PlyD1 pneumococcal protein vaccine in adults, toddlers, and infants; A phase I randomized controlled study[J]. *Vaccine*, 2015, 33(36): 4610-4617.
- [36] CONVERSO T R, GOULART C, DARRIEUX M, et al. A protein chimera including PspA in fusion with PotD is protective against invasive pneumococcal infection and reduces nasopharyngeal colonization in mice[J]. *Vaccine*, 2017, 35(38): 5140-5147.
- [37] MOSCHIONI M, DE ANGELIS G, MELCHIORRE S, et al. Prevalence of pilus-encoding islets among acute otitis media *Streptococcus pneumoniae* isolates from Israel[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(9): 1501-1504.
- [38] GIANFALDONI C, CENSINI S, HILLERINGMANN M, et al. *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(2): 1059-1062.
- [39] HARFOUCHE C, FILIPPINI S, GIANFALDONI C, et al. RrgB321, a fusion protein of the three variants of the pneumococcal pilus backbone RrgB, is protective in vivo and elicits opsonic antibodies[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(1): 451-460.
- [40] FELDMAN C, ANDERSON R. Review: current and new Generation pneumococcal vaccines [J]. *J Infect*, 2014, 69(4): 309-325.
- [41] PRINCIPI N, ESPOSITO S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18(1): 7-17.

(收稿日期: 2018-06-11 修回日期: 2018-08-16)