

问号钩端螺旋体致病机制和新型疫苗及 细菌耐药性研究进展

严 杰

(浙江大学医学院 病原生物学系, 浙江 杭州 310058)

[摘 要] 钩端螺旋体(简称钩体)病是重要的人兽共患传染病之一,但其致病机制至今不明,目前也无可预防所有问号钩体血清群、型感染的通用型疫苗。细菌耐药性一直是医学微生物学和传染病学关注的重大问题之一,近年发现二元信号传导系统(TCS)与某些细菌耐药性密切相关。根据近年国内外有关研究资料,文中就问号钩体致病物质及其作用机制、相关信号传导通路及其致病意义,以及TCS在肺炎链球菌对青霉素和头孢唑肟耐药性形成、结核分枝杆菌对异烟肼和乙胺丁醇耐药性影响的最新研究进展进行简要介绍。

[关键词] 钩端螺旋体,问号/致病力;致病机制;基因工程疫苗;抗药性,细菌;二元信号传导系统

[中图分类号] R 377.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)06-0537-07

问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*) (简称钩体)可经皮肤或黏膜迅速侵入人和多种动物体内引起感染,人类感染后引起以发热、黄疸、出血为主要症状的钩体病,动物感染后大多症状轻微或无症状。由于问号钩体自然宿主众多,并经污染的水源迅速传播,故钩体病是全球性流行、洪涝和地震等自然灾害时需重点防疫的人兽共患传染病^[1-2]。

钩体病的病理改变与内毒素中毒相似,但早已证实问号钩体内毒素的毒性明显较低^[1]。至今未发现问号钩体能产生外毒素,其基因组中也无外毒素基因^[3-4],有无侵袭性毒力因子也未获证实,故问号钩体致病物质和致病机制不明。问号钩体血清群、型众多,不同地区优势流行的血清群、型可有明显差异,且各血清群之间交叉保护作用较弱或无^[1],故目前仍采用当地主要流行的数种问号钩体血清群制备的多价全菌死疫苗进行免疫接种,但该疫苗副作用很大,且对其它血清群感染无保护作用而导致钩体病暴发流行^[1-2]。因此,研制能预防所有血清群、型感染的通用型问号钩体疫苗具有重要意义。

细菌耐药性一直是困扰细菌性传染病有效

治疗的棘手问题。以往人们认为,细菌产生药物钝化酶、药物作用靶位突变、外膜通透性改变和主动外排是引起耐药性的主要机制。近年来,细菌二元信号传导系统(two-component signal transduction systems, TCS)与耐药性的关系开始受到关注。初步研究结果证实,某些细菌TCS参与甚至主导耐药性的形成。因此,阻断耐药性相关细菌TCS介导的信号传导,有可能成为对抗耐药性细菌感染的有效途径。

1 致病物质与致病机制

1.1 侵入与黏附 侵入宿主并黏附细胞是所有寄生性病原微生物具有的本能,也是其致病

收稿日期:2008-07-31 修回日期:2008-09-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370072, 30570092);卫生部科研基金资助项目(WKJ2007-2-005);浙江省科技厅国际合作重点资助项目(2006C24003);浙江省自然科学基金资助项目(X206956)

作者简介:严 杰(1956—),男,教授,博导,主要从事病原微生物致病机制及基因工程疫苗研究;E-mail: Med_bp@zju.edu.cn

过程的起始阶段。早已发现,问号钩体能迅速穿越人、动物的皮肤或黏膜侵入宿主体内,并引起钩体血症,表明该病原菌有强大的侵袭能力,但相关侵袭因子及其作用机制至今不明。

我们发现,问号钩体奇特地以其菌体一端或两端黏附于小鼠单核-巨噬细胞 J774A. 1、猴肾上皮细胞 Vero 及小鼠成纤维细胞 L929,双曲钩体则否;问号钩体黏附宿主细胞的部位似乎是胞外基质(extracellular matrix, ECM)而非传统观念中的细胞膜^[5-6]。Choy 等报道,问号钩体可通过其外膜中的 LigA 和 LigB 蛋白与 ECM 蛋白分子结合^[7]。ECM 主要蛋白分子有层粘连蛋白(laminin, LN)、纤维纤连蛋白(fibronectin, FN)、核心蛋白多糖(decorin, DEN)和胶原蛋白(collagen, COL)。目前已证实,问号钩体外膜蛋白 Lsa24、endostatin 样蛋白和一种分子量为 36 kMr 的蛋白分别可与 FN 和 LN 结合^[8-10]。除 FN 和 LN 外,问号钩体还可与 DEN、COL1、GOL2 和 GOL4 结合^[6];采用靶基因敲除技术,证实了问号钩体 III 型分泌系统(T3SS)成员 FliR 与黏附细胞密切相关^[11]。上述研究资料提示,问号钩体可能主要通过 ECM 分子黏附细胞,问号钩体 T3SS 可能与其分泌能结合 ECM 分子的黏附分子有关。

问号钩体黏附 J774A. 1 和 Vero 细胞数十分钟后,开始侵入宿主细胞内形成吞噬泡,其中强毒力的黄疸出血群问号钩体能侵入细胞核,弱毒力的波摩那群则否^[6];问号钩体侵入 J774A. 1 细胞时发生微丝为主、微管不参与的细胞骨架重排,PLC/PKC 通路介导了该细胞骨架重排过程的信号传导^[12]。上述研究资料显示,问号钩体可能是一种胞内寄生菌,问号钩体侵入宿主细胞是其与细胞相互作用的结果,能否侵入细胞核可能与问号钩体毒力密切相关,但问号钩体侵入细胞及细胞核相关的毒力因子未明。

1.2 定植与繁殖 问号钩体最主要的自然宿主是黑线姬鼠等野生鼠类,其次是猪、牛等家畜。野鼠感染问号钩体后对其生存无明显影响,可长期肾脏带菌并不断从尿液排菌,由于整个钩体病程中,仅在感染早期出现一次钩体血症^[1-2],提示问号钩体必然在宿主肾脏中繁殖。

在以往的实验中,我们曾发现问号钩体可能能在猴肾成纤维细胞 Cos-7 中有繁殖现象。最近我们发现,问号钩体侵入不同物种的单核-巨噬细胞后,其结局可有明显差异:侵入鼠单核-巨噬细胞 J774A. 1 后形成吞噬泡,继而与溶酶体融合,问号钩体活力和数量明显下降^[12];侵入人单核-巨噬细胞 THP-1 后不出现吞噬泡,也不与溶酶体融合,并随感染时间延长,问号钩体在细胞内繁殖而数量明显增加。上述结果提示,某些肾组织细胞、人单核-巨噬细胞可能是问号钩体繁殖场所。此外,侵入鼠单核-巨噬细胞的问号钩体被杀灭,侵入人单核-巨噬细胞的问号钩体则可存活并繁殖,可部分解释鼠类感染问号钩体后无症状、人感染后发病的现象,可能与不同物种单核-巨噬细胞杀灭问号钩体能力差异有关。

1.3 毒力因子 如前所述,问号钩体无外毒素,其内毒素毒性较低,有关侵袭性毒力因子研究报道也甚少。随着两株黄疸出血型问号钩体全基因序列测定工作的完成^[3,4],给问号钩体毒力因子研究注入了新的动力。

Lee 等报道,问号钩体溶血素 Sph H 对哺乳类细胞有膜成孔毒素的毒性^[13]。Zhang 等的研究结果显示,问号钩体鞘磷脂酶溶血素 SpH2 有细胞毒性,并可诱导某些哺乳类细胞发生细胞凋亡^[14]。有文献报道,结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌 mce 基因产物与侵袭细胞、巨噬细胞内存活密切相关^[15-16],立克次体和沙门菌 invA 基因与其侵入宿主细胞及胞内存活密切相关^[17-18]。问号钩体基因组中有 mce 和 invA 基因^[3-4],但其产物是否具有结核分枝杆菌 Mce 蛋白类似的侵袭功能尚无研究报道。我们的实验结果显示,不同血清群问号钩体株均有 mce 和 invA 基因,不致病的腐生性双曲钩体(*Leptospira biflexa*)则否,感染细胞前 mce 和 invA 基因无表达,其 mRNA 水平也很低,感染细胞后不仅转录水平上调约 4~6 倍且出现明显的产物表达^[19],提示该两个基因与问号钩体毒力密切相关。更令人感兴趣的是,采用基因芯片技术检测问号钩体感染细胞前后表达谱的初步结果显示,问号钩体感染细胞后,其内毒素合成途径中间往后的有关酶类表达水平明显上

调,内毒素定量检测结果表明,问号钩体感染细胞后的内毒素活性明显高于感染前。以往一直认为,作为细胞壁结构成分的内毒素,其含量是稳定不变的,提示存在感染时问号钩体内毒素含量应激性增加的可能性。

1.4 细胞凋亡与坏死 业已发现,不少病原微生物诱导的宿主细胞凋亡,与传染性疾病的发生和发展密切相关。Merien 等及我们的实验结果分别证实,问号钩体可诱导豚鼠体内肝细胞及体外培养的小鼠单核-巨噬样细胞凋亡^[5,12,20],但其机制不明。

众所周知,细胞凋亡通常在胞内半胱天冬氨酸酶(caspase)信号传导通路介导下完成,经 Fas/FasL 激活 caspases 是最为常见的凋亡相关信号通路。研究结果显示,问号钩体诱导的小鼠单核-巨噬样细胞 caspase-3 和-6 活性增高约 10 倍或以上,抑制剂阻断 caspase-3 和-6 后细胞凋亡率明显下降^[21]。令人感兴趣的是,问号钩体感染细胞不仅增强了 Fas 的表达,FasL 表达水平也明显上调,用中和抗体封闭 FasL 后细胞凋亡率明显下降^[22]。令人感到意外的是,我们发现问号钩体感染小鼠单核-巨噬细胞后可导致约 50% 细胞凋亡、另约 50% 细胞坏死,感染人上皮细胞则引起坏死,但感染鼠、猴或人肾上皮或成纤维细胞后既不引起细胞凋亡也不发生细胞坏死,表明问号钩体对不同种类细胞致病性的差异。

已知不同的细胞信号传导通路介导不同的生物学效应。如前所述,问号钩体可能主要通过 ECM 分子黏附细胞,而不同 ECM 分子偶联的细胞信号通路有差异。故我们推测,可能由于不同种类细胞 ECM 分子分布和含量不同,导致细胞感染问号钩体后的结局明显不同。

2 新型问号钩体疫苗研制

2.1 多价外膜疫苗 接种疫苗是预防和控制传染病最为经济和有效的措施。如前所述,现行使用的多价问号钩体全菌死疫苗有一定的免疫预防效果,但副作用很大且无交叉保护作用。本实验室曾以问号钩体外膜为抗原,研制了多价问号钩体外膜疫苗。尽管该多价外膜疫苗无明显副作用且免疫效果更好,但仍无交叉保护

作用。因此,研制新型通用性问号钩体疫苗将对防控钩体病产生重大影响。

2.2 属特异性抗原 研制通用性问号钩体疫苗的先决条件是筛选和确定问号钩体属特异性抗原。有文献报道,外膜脂蛋白 LipL21、LipL32、LipL41 和 OmpL1 仅存在于问号钩体中^[23-25]。我们也曾发现,在我国流行的问号钩体血清群均含上述基因,但 lipL21 基因无基因型区别, lipL32、LipL41 和 OmpL1 基因分别可有 2、3、2 个基因型。上述问号钩体属特异性抗原的研究结果,使得通用性问号钩体基因工程疫苗研制有了可行性。

2.3 通用型基因工程疫苗 基因工程疫苗优点颇多,但存在因抗原单一而免疫效果较差、生产成本较高的缺点。采用构建融合基因表达由柔性肽连接的多个不同蛋白抗原,并以该多价抗原大分子研制基因工程疫苗,已被证明是提高其免疫效果的有效手段。为此,我们根据大肠杆菌偏爱密码子改建了表达量较低的问号钩体 lipL21 基因,构建了 lipL32/1-lipL21-OmpL1/2 人工融合基因及其原核表达系统,优化了表达条件使重组融合抗原产量提高了 3.7 倍;同时采用 Western Blot 证实,不同血清群感染的钩体病患者血清均能与重组融合抗原杂交,为进一步研制通用性多价问号钩体基因工程疫苗奠定了坚实的基础^[26]。

近年来,多抗原肽(multiple antigenic peptide, MAP)疫苗是以人工合成多聚氨基酸高分子与抗原表位肽交联的复合体,具有同时提呈多个抗原表位、抗原提呈作用强、各抗原肽分枝之间能以非共价结合形成构成表位而提高免疫效果等优点^[27]。此外,抗原表位通常是少于 30 个氨基酸的短肽,故可通过串联表达而提高产量。因此,采用 MAP 疫苗研制策略,不失为是一条避免常规基因工程疫苗缺陷的有效途径。确定抗原表位是研制 MAP 疫苗的前提之一,故我们已采用噬菌体展示和 Western Blot 技术,完成了上述问号钩体属特异性外膜蛋白 T 和 B 细胞联合表位的筛选和鉴定,为研制通用性问号钩体 MAP 疫苗提供了基本条件^[28]。

3 TCS 与细菌耐药性

3.1 TCS 任何生物必然与其生存环境发生

相互联系和影响,实现这种相互联系和影响的唯一方式,是通过信号传导系统进行彼此之间的信息应答、交换并作出适应性反应。与哺乳类动物细胞比较,细菌信号传导系统相对简单,一般由两类分工明确的蛋白组成,故称之TCS:①跨膜传感器蛋白(sensor protein);通常是具有信号受体功能的组氨酸激酶;②胞浆内的应答调节蛋白(response regulator protein),通常被传感激酶磷酸化后激活,具有转录因子样作用,通过调节靶基因产物表达水平对环境信号进行适应性反应。目前认为,每种细菌至少有数十个不同的TCS,使细菌能对多种多样的环境信号作出反应。

对于细菌而言,抗菌药物也是外界信号。一个普遍存在的现象是,环境中无抗菌药物时,细菌药物钝化酶表达水平很低,加入抗菌药物可诱导药物钝化酶表达水平明显上调。此外,外膜通透性改变和主动性药物外排也应是细菌获得抗菌药物信号时的适应性反应。因此,某些TCS与细菌耐药性必然有密切关系,但目前相关报道甚少。

3.2 肺炎链球菌 TCS 与耐药性 有文献报道,CiaH/CiaR TCS 相关不能形成感受态的肺炎链球菌可产生对青霉素及头孢胺噻的耐药性^[29]。comD/comE 是调控肺炎链球菌感受态形成的TCS,其中ComE可调节编码感受态刺激肽(competence stimulating peptide, CSP) comC 基因的表达,经CSP作用形成感受态^[30]。因此,CiaH/CiaR 和 comD/comE 两个TCS可能与肺炎链球菌耐药性产生有关。

我们重组表达了上述5个基因产物并制备了其抗血清,并发现CiaH、CiaR被抗血清封闭后,敏感菌株可出现对青霉素和头孢胺噻的耐药性,但对耐药菌株耐药性无明显影响;ComD和/或ComC被抗血清封闭后,头孢胺噻敏感菌株可出现耐药性,但耐药菌株耐药性无明显改变,也不影响各菌株对青霉素的耐药性^[31]。上述结果显示,CiaH/CiaR 和 comD/comE 确为肺炎链球菌对青霉素和头孢胺噻耐药相关的TCS,但是,各TCS深层次的作用机制与相互调控关系对肺炎链球菌耐药性的影响仍有待于进一步研究。

3.3 结核分枝杆菌 TCS 与耐药性 结核病是典型的再发传染病(re-emerging disease)之一,耐药菌株流行是其发病率不断升高的主要原因。已知异烟肼须经结核分枝杆菌过氧化氢酶-过氧化物酶氧化后,才能形成能抑制分枝菌酸合成的活性中间产物,乙胺丁醇抗结核机制是选择性地抑制结核分枝杆菌合成细胞壁组分阿拉伯半乳及甘露聚糖。有文献报道,结核分枝杆菌编码过氧化氢酶-过氧化物酶的katG基因表达上调而非突变,可使结核分枝杆菌对异烟肼高度敏感,编码阿拉伯糖基转移酶的embA/embB基因过度表达,可使细菌持续合成上述阿拉伯聚糖而对乙胺丁醇耐药^[32-33]。任何细菌基因表达必然受其二元信号传导系统调控,结核分枝杆菌katG和embA/embB基因也不例外^[34]。我们初步的实验结果显示,senX3/regX3和pknH/embR分别是调控katG和embA/embB基因的TCS,其对结核分枝杆菌耐受异烟肼和乙胺丁醇药性的影响和作用机制正在研究之中。

4 展 望

接种疫苗是传染性疾病的重要预防手段,但目前使用的疫苗不同程度存在免疫保护效果较差和毒副作用较大的问题,因而必须进行更新换代。此外,有不少病原菌或因血清群、血清型及毒性产物众多,难以从中选择出具有广泛免疫交叉保护的抗原,或因该病原菌主要致病机制是其抗原诱导的病理性免疫反应,结果导致这些病原菌至今仍无疫苗产品。因此,采用新的研究思路和方法,从病原菌表面成分中因筛选和鉴定能诱导正常保护性免疫应答的抗原及其主要表位,在此基础上研发多价基因工程疫苗、表位肽疫苗,将是已有疫苗更新换代、研制出无疫苗病原菌疫苗的有效途径。

如何克服细菌耐药性,永远是临床治疗细菌性传染病面临的棘手课题。如前所述,细菌耐药性与产生药物钝化酶、药物作用靶位突变、外膜通透性改变和主动外排有关,但这些耐药机制均是细菌接受相关信号后引起的表型改变所致。若从切断耐药相关信号的接收和传递,从而阻断细菌耐药性产生的思路出发,将研制出作

用机制完全不同的新型抗细菌耐药性药物。例如,组氨酸激酶是细菌 TCS 中的关键活性成分,哺乳类细胞通常无组氨酸激酶,若能发现能特异性抑制或阻断组氨酸激酶活性的化合物,将有可能进一步发展成为新型抗细菌耐药性药物。

References:

- [1] YAN Jie, DAI Bo-ming, YU En-shu (严杰, 戴保民, 于恩庶). *Leptospirosis* (钩端螺旋体病学) [M]. Third Edition, Beijing: The People's Publication House, 2006. (in Chinese)
- [2] FAINE S, ADLER B, BOLIN C. *Leptospira and Leptospirosis* [M]. Second Edition, Melbourne: MediSci, 1999.
- [3] REN S X, FU G, JIANG X G, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing [J]. *Nature*, 2003, 422: 888-893.
- [4] NASCIMENTO A L, KO A I, MARTINS E A, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*, 2004, 186: 2164-2172.
- [5] LI L W, OJCIUS D M, YAN J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain [J]. *Arch Microbiol*, 2007, 188: 591-598.
- [6] ZHANG Hao, SUN Ai-hua, YAN Jie (张皓, 孙爱华, 严杰). Effect and diversity of *Leptospira interrogans* adhering major extra-cellular matrix molecules [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 579-584. (in Chinese)
- [7] CHOY H, KELLEY M M, CHEN T L, et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen [J]. *Infect Immun*, 2007, 75: 2441-2450.
- [8] BARBOSA A, ABREU P A E, NEVES F O, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin [J]. *Infect Immun*, 2006, 74: 6356-6264.
- [9] MERIEN F, TRUCCO J, BARANTON G, et al. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 185: 17-22.
- [10] STEVENSON B, CHOY H, PINNE M, et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement [J]. *Plos One*, 2007, 2: e 1188.
- [11] RUAN Ping, WANG Xin-ying, SUN Ai-hua, et al (阮萍, 王欣莹, 孙爱华, 等). Study on the functional association among fliR gene of *Leptospira interrogans* and adhering and injuring host cell of the microbe [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 572-578. (in Chinese)
- [12] LIU Y Y, ZHENG W, LI L W, et al. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells [J]. *Med Microbial Immunol*, 2007, 196: 233-239.
- [13] LEE S H, KIM S, PARK S C, et al. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin Sph H as a pore-forming protein on mammalian cells [J]. *Infect Immun*, 2002, 70: 315-322.
- [14] ZHANG Y X, GENG Y, YANG J W, et al. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of SpH2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai [J]. *BMB Reports*, 2008, 41: 119-125.
- [15] WIKER H G, SPIERINGS E, KOLKMAN M A, et al. The mammalian cell entry operon-1 (mce1) of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microb Pathog*, 1999, 27: 173-177.
- [16] TEKAIA F, GORDON S V, GARNIER T, et al. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico [J]. *Tuber Lung Dis*, 1999, 79: 329-342.
- [17] GAYWEE J, XU W, RADULOVIC S, et al. The *Richettsia prowazekii* invasion gene homology (invA) encodes a nudix hydrolase active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine. *Mol Cellular Proteomics*, 2002, 1:

- 179-185.
- [18] COLLAZO C M, GALA U J E. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*—a review [J]. *Gene*, 1997, 192: 51-59.
- [19] ZHANG Lei, XUE Feng, YAN Jie, et al (张磊, 薛峰, 严杰, 等). Sequence analysis of *mce* genes of *Leptospira interrogans* strains belonging to different serogroups and expression pattern of the gene [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 564-571. (in Chinese)
- [20] MERIEN F, BARANTON G, PEROLAT P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophage by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence [J]. *Infect Immun*, 1997, 65: 729-738.
- [21] JIN Dan-dan, DONG Hai-yan, YAN Jie, et al (金丹丹, 董海艳, 严杰, 等). J774A. 1 cell apoptosis induced by *Leptospira interrogans* and effects of caspase-3, -6 activation on the apoptosis [J]. *Journal of Zhejiang University Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 558-563. (in Chinese)
- [22] LI Shi-jun, HU Ye, YAN Jie, et al (李世军, 胡野, 严杰, 等). Upregulation of FasL/Fas expression and FasL/Fas-associated apoptosis in J774A. 1 cell induced by *Leptospira interrogans* [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 551-557. (in Chinese)
- [23] LUO Dong-jiao, YAN Jie, MAO Ya-fei (罗冬娇, 严杰, 毛亚飞, 等), et al. Construction and application of prokaryotic expression system of *Leptospira interrogans* lipL32/1-lipL41/1 fusion gene [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2005, 34(1): 27-32. (in Chinese).
- [24] HAAKE D A, CHAO G, ZUEMER R L, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(4): 2276-2285.
- [25] RUO Dong-jiao, HU Ye, DENNIN R H, et al (罗冬娇, 胡野, Dennin RH, 等). Reconstruction of *Leptospira interrogans* lipL21 gene and characteristics of its expression product [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(5): 458-464. (in Chinese)
- [26] LUO Dong-jiao, QIU Xiao-feng, WANG Jiang, et al (罗冬娇, 邱晓枫, 王江, 等). Prokaryotic expression of trigeminy artificial fusion gene of *Leptospira interrogans* and analysis of the product immunogenicity [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 599-604. (in Chinese)
- [27] WANG L F. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics [J]. *Curr Drug Targets*, 2004, 5: 1-15.
- [28] JIANG Jiu-kun, LIN Xu-ai, YAN Jie, et al (姜久昆, 林旭媛, 严杰, 等). Prediction and immunologic identification of antigenic epitopes in genus-specific outer membrane protein LipL41 of *Leptospira interrogans* [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 585-591. (in Chinese)
- [29] GIAMMARINARO P, SICARD M, GASC A M. Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 1859-1869.
- [30] GUIRAL S, MITCHELL T J, MARTIN B et al. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8710-8715.
- [31] SUN Ai-hua, FAN Huan, XIA Xiao-ping, et al (孙爱华, 樊欢, 肖小萍, 等). Recombinant expression of *Streptococcus pneumoniae* ciaH/R genes and correlation among CiaH/R and β -lactam antibiotic resistance [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(6): 605-611. (in Chinese)

- [32] PYM A S, DOMENECH P, HONORE N, et al. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Microbiol*, 2001, 40: 879-889.
- [33] PAPA VINASASUNDARAM K G, CHAN B, CHUNG J H, et al. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* pknH gene confers a higher bacillary load during the chronic phase of infection in BALB/c mice [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187: 5751-5760.
- [34] RICKMAN L, SALDANHA J W, HUNT D M, et al. A two-component signal transduction system with a PAS domain-containing sensor is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314: 259-267.
- [责任编辑 张荣连]

《浙江大学学报:医学版》征订和征稿启事

《浙江大学学报:医学版》是由国家教育部主管,浙江大学主办的报道医药学等方面研究成果的学术性刊物,从2003年起,正式被医学领域中最权威的美国《医学索引》,即IM/Medline收录,刊物印刷本被美国国立医学图书馆永久收藏。《浙江大学学报:医学版》主要登载医学、药学、生物医学以及相关学科的学术论文。读者对象为医务工作者、医药学教育和科研人员,以及研究生等。

《浙江大学学报:医学版》欢迎广大作者来稿,稿件的取舍以学术质量为标准,一视同仁。投稿须知请查阅网址(<http://www.journals.zju.edu.cn/med>)上所登载的要求。

《浙江大学学报:医学版》编辑部地址:杭州市天目山路148号;邮编:310028;联系电话:0571-88272797;电子信箱:zdxbyxb@zju.edu.cn;国内邮发代号:32-2,国外邮发代号BM 6585;订阅:全国各地邮局。