

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

鈎端螺旋體造成腎小管間質腎炎之機制及台灣人畜鈎端螺旋體症流行病學

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-295

執行期限：88年8月1日至91年7月31日

主持人：潘 銘 正

國立台灣大學獸醫學系

計畫參與人員：謝旺儒、黃雅惠 國立台灣大學獸醫學研究所

一、中文摘要

本計劃的目的為調查鈎端螺旋體在台灣地區豬及軍犬之流行病學及研究鈎端螺旋體造成腎小管間質腎炎之機制。利用顯微凝集反應檢驗 659 頭豬血清和 127 頭軍犬血清，並以血清型 *shermani* 外膜蛋白萃取物及重組表現之 LipL32 蛋白處理腎小管細胞。利用 RNA 差異展示法及相減雜交法尋找可能的病原性因子。台灣地區豬的鈎端螺旋體抗體陽性率達 57.7%，軍犬抗體陽性率為 77.2%。外膜蛋白萃取物及 LipL32 皆可使鼠腎小管細胞的 iNOS 表現、MCP-1 及 TNF- α 的 mRNA 表現量增加。以 RNA 差異展示法所得到的 *prx* 基因及相減雜交法所得到的基因需進一步研究，才能清楚與致病基因的關係。由本計畫結果得知台灣地區的鈎端螺旋體在動物中有很高的盛行率，而外膜蛋白引起腎小管的炎症反應因子表現量增加。

關鍵詞：鈎端螺旋體、流行病學、外膜蛋白、RNA 差異展示法、相減雜交法

Abstract

The purpose of the plan is to investigate the epidemiology of leptospirosis in pigs, and military dogs and studies the mechanism of tubulointerstitial nephritis by pathogenic leptospira. A total of 659 pigs and 127 military dogs were examined by using standard microscopic agglutination test (MAT). The pathogenic *Leptospira shermani* outer membrane extract and recombinant LipL32 protein were administered to cultured mouse tubule cells. We use the RNA differential display technology and subtracted hybridization technology to search the

possible pathogenic factors. The seroprevalence of leptospira in Taiwan were 57.7% in pigs and 77.2% in military dogs. We found that outer membrane extract and recombinant LipL32 protein could cause the increase of iNOS, mRNA of MCP-1 and TNF- α of mouse tubule cells. The prospective study of *prx* gene from the RNA differential display technology and genes from subtracted hybridization technology can help to understand the relationship of the genes and pathogenic mechanism. The results of the plan were high prevalence in animal in Taiwan and the inflammation factors expression increase of tubule cells causing by outer membrane proteins.

Keywords: leptospira, epidemiology, outer membrane protein, RNA differential display, subtracted hybridization

二、緣由與目的

鈎端螺旋體病長久以來一直是重要人畜共通傳染病，藉由老鼠、狗、豬、牛等動物的尿液可傳染給人。凡是接觸動物或動物尿液污染環境者例如環保人員、傳統肉品零售商、下水道、屠宰廠、肉類加工廠等工作人員、農民（水稻、甘蔗等）等均屬高危險群，其職業危險性早已被確認^[6]。有鑑於近年來國內多起鈎端螺旋體病病例之報導^[7]，如果無法及時確診可能造成國人民生命威脅。近年來，國內少有關於鈎端螺旋體的調查研究，由於其在人畜共同傳染病上的潛力，有必要對其在動物中血清流行病學有所了解，以助此症的防疫。

鈎端螺旋體易引起腎小管間質性腎炎^[5]，近年來的研究顯示鈎端螺旋體的致病機制與其外膜蛋白有相當的關係。具有病原性的鈎端螺旋體在實驗室培養階段常會隨著繼代的代數增加漸漸失去毒力(virulence)，但其毒力可藉由再次接種於感受性動物體內而重新獲得。令人好奇的是若將培養液變更為血液或組織，則毒力可保持續保持。利用細胞實驗比較毒力株(virulent leptospires)和失毒株(avirulent leptospires)可發現，前者與細胞培養三小時後能夠吸附在細胞表面，後者則失去吸附的能力，這些觀察暗示兩者外膜(outer membrane)成份很可能已有改變，以電子顯微鏡解析之，可發現外膜為3-5層的層狀結構，由蛋白質、脂肪和脂多醣類(lipopolysaccharide)所組成，已知蛋白質和脂多醣類都是良好的免疫抗原，研究報告指出，從毒性株萃出的脂多醣類可造成血小板凝集，並促其釋出ATP和serotonin，而外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)的功能也可以由許多革蘭氏陰性菌的研究中歸納出下列四點(1)對宿主的吸附能力。(2)作為抗體的標的。(3)作為porin。(4)作為水溶性分子如siderophores、補體蛋白、heme、hemoglobin的接受體。部份的外膜蛋白基因已被選殖研究，如OmpL1^[4]為porin分子，LipL41^[4]、LipL32^[2]會吸附在腎小管細胞上，LipL36^[3]為早期試管內培養時豐富表現。LipL48^[1]、LipL31^[1]則為今年剛發表的lipoprotein的外膜蛋白。近年來的一些研究致病機制的技術被相繼報導如RNA差異展示法(difference display)，相減雜交法(subtraction hybridization)來研究單一環境變化所導致基因表現的改變或基因關係相近之病原及非病原性微生物其基因的差異，尋找可能的相關致病基因，這些研究的方法也是本計劃中用來研究鈎端螺旋體造成腎小管間質性腎炎機轉的主要方向。

三、結果與討論

台灣人畜鈎端螺旋體症之流行病學

利用顯微凝集試驗(microscopic agglutination test; MAT)檢測自台灣地區收集的659個豬血清，127隻軍犬血清進行鈎

端螺旋體抗體力價之檢測，所檢測的抗原有8種血清型(*bratislava*, *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *kennewicki*, *balcanica*, *autumnalis*, *shermani*)抗體力價大於等於100倍判定為陽性，豬的陽性率為57.7% (380/659)、軍犬的陽性率為77.2 (98/127)。豬中陽性率最高的血清型 *shermani* (55.7%)，其它依次為血清型 *bratislava* (13.5%)，*autumnalis* (7.4%)及 *icterohaemorrhagiae* (7.3%)。六種非疫苗血清型的鈎端螺旋體陽性血清在種犬及複訓犬中的比率為68.2和33.3%。而陽性率最高的血清型為 *shermani*。在豬及軍犬中並未發現血清型 *grippotyphosa* 陽性的動物。五個養豬場工人中有四個人至少對一種血清型有陽性抗體反應，二個人的血清個別對血清型 *shermani*與 *kennewicki*有陽性反應。顯示工人的陽性抗體的範圍與豬具有相當程度的關係。由於鈎端螺旋體症為一人畜共同傳染病，台灣地區豬隻與軍犬如此高的感染率，無疑的提高了養豬從業人員與軍犬飼養官兵的職業危險性，因此鈎端螺旋體對人畜可能造成的影響不容忽視。以上有關動物鈎端螺旋體症血清流行病學的結果，已在2000年1月國際衛生組織(WHO)西太平洋暨東南亞地區鈎端螺旋體病研討會(Regional Seminar/workshop on Leptospirosis in the Western Pacific and South-East Asia)中口頭報告。

鈎端螺旋體造成腎小管間質腎炎之機制

和國內長庚大學腎臟科合作的部分，以分離純化的外膜蛋白加入培養的髓質厚上行枝腎小管細胞(medullary thick ascending limb cell)，已確知會活化NF- κ B及其下游如iNOS(inducible nitric oxide)增加4.2倍、MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)增加3倍、及TNF- α (tumor necrosis factor- α)增加2.4倍^[8]。其作用經加熱或添加特異性抗體而消失，其引發作用的物質可能為蛋白質。以0.2 g/ml蛋白外膜萃取物處理近端腎小管細胞可增加MCP-1 mRNA表現量3倍，nitric oxide synthase (iNOS) 9.4倍，RANTES 2.5倍及TNF- α mRNA表現量2.5倍^[9]。目前已被發表的外膜蛋白中以LipL32可黏附在腎小管細胞上且表現量也非常豐富，可引發大量病患的抗體，而此基因在

非病原鈎端螺旋體中並無發現。利用 pRSET 原核表現載體大量表現鈎端螺旋體血清型 *shermani* 的 LipL32 並利用 Ni-column 純化表現的蛋白，再將此蛋白用以處理近端腎小管細胞，可引發如外膜蛋白萃取物對近端腎小管所產生 MCP-1 與 iNOS mRNAs 的反應相似。顯示 LipL32 為外膜蛋白中引間質性腎炎的重要物質^[9]。

利用 RNA 差異展示法研究鈎端螺旋體在模擬腎小管高滲透壓的環境下其基因表現的狀況，希望可找到在高滲透壓下所誘導的基因，這樣的基因可能與鈎端螺旋體在宿主體內時存活於腎小管內有關，亦或由此特別環境下所引發的毒力基因有關。本實驗實驗菌種為 *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Hond Utrecht Iv 在無蛋白培養基 28°C 培養 3-4 日至細菌密度 10⁸/mL 後，以甘露醇或氯化鈉配合無蛋白培養基來調配 600 mOsm/kg 的高滲透壓環境，在 28°C 處理 3 小時，而對照組不以高滲透壓處理。抽取細菌 RNA 並以隨機六核甘酸引子及反轉錄酵素成為 cDNA，再以數組 arbitrarily 引子及 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP 進行聚合酵素鏈反應，將此反應物進行 6% 變性聚丙醯凝膠電泳，以 X-光底片感光，分析實驗組與對照組在不同組合的 arbitrarily 引子其 PCR 產物的變化中有差異者將其差異的條帶回收再以該組引子進行增幅並選殖到 pCRII-TOPO 質體上，共得 11 個 clones，將些 11 個 clones 進行 DNA 定序，並以 DIG DNA 標示系統標示成為探針，用來偵測在高滲透壓下鈎端螺旋體的 mRNA 的表現，經北方雜合反應的結果得知 mc1 clone 的片段在高滲透壓環境下可增加其 mRNA 生成量，為 upregulated，而其他的 clone 在經北方雜合反應檢驗時並無與一般培養下有明顯差異。以 Blast 軟體搜尋 DNA 及蛋白質的資料庫中發現，mc1 clone 的嵌入片段有 273 bp 其序列與其他細菌的磷酸核糖焦磷酸合成酵素基因 (phosphoribodylpyrophosphate synthetase; *prs*) 75% 的相似性，比較鈎端螺旋體 *prs* 基因與其他細菌 *prs* 的相以區域設計 primers 並由鈎端螺旋體中再以 PCR 增幅選殖，得到 507 bp 的 clone 分析其 DNA 序列與 mc1 的 273 bp 比對完成相同，再以 Blast 軟體比對基因庫顯示 DNA 序列與

Escherichia coli 的 *prs* 有 60.3% 相同，*Corynebacterium ammoniagenes* 有 64.5% 相同，*Bacillus caldolyticus* 有 58.9% 相同，*Listeria monocytogenes* 有 58.9% 相同，而胺基酸序列相似性分別為 70.2%、71.4%、71.4% 及 68.5%。磷酸核糖焦磷酸 (phosphoribosyl pyrophosphate; PRPP) 對所有的生物而言，都是很重要的代謝中間產物，為合成嘌呤、嘧啶核酸及組胺酸、色胺酸的前趨物。在細菌約有十種酵素是以 PRPP 為受質 PRPP 的合成由磷酸核糖焦磷酸合成酵素 (PRS) 所催化。而 *Listeria monocytogenes* 的 *prs* 基因位於毒力基因組 (virulence gene cluster) 的一端，與 N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase 的基因 *tms* 同時轉譯；枯草桿菌及 *Bacillus caldolyticus* 的 *prs* 基因 N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase 的基因 *gsd* 及未知功能的 *ctc* 基因同時轉譯形成一個的含有三個基因的操縱組。鈎端螺旋體的 *prs* 基因在生理及致病機制上所扮演的角色目前並不清楚，需有更多的實驗資料才能釐清。

利用 PCR-select subtracted hybridization 的方法，以病原性鈎端螺旋體血清型 *shermani* 為 tester，以非病原性鈎端螺旋體血清型 *patoc* 為 driver，tester 的基因體 DNA 經以辨認四個核甘酸序列的限制酵素切割，再分別黏接上兩種 linkers，將接上 linker 的 tester DNA 與 driver DNA 片段利用高溫變性後混合，讓 tester 與 driver 具互補序列的片段可 annealing，再利用 linkers 上的引子進行聚合連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，將含有不同 linker 的 tester 片段增幅，而與 driver 結合的 tester 片段將不被增幅。再將增幅的片段選殖入 pCRII[®]-TOPO[®] 的載體，轉形至大腸桿菌 TOP 10 中，挑選菌落抽取質體，將 tester 及 driver 的基因體分別以 Dig labeling 做成 random priming probe，再進行 dot hybridization 來進行確認，經此步驟所得的陽性質體再做成 probe，對 tester 及 driver 的基因體 DNA 進行 Southern hybridization 做更進一步的確認。將這些陽性質體共 29 個經核酸定序，並以 BLASTP 程式比對基因庫，Transposase: a18、b25、b29、b50、b60、c5、c23、c34、c47 及 c93 clones；

Typtophan-tRNA ligase: b28 clone ;
Ribosome-binding factor A: b62 clone ;
Transcriptional regulator: c15 clone ;
Penicillin-binding protein: c97 clone ; para
amidobenzoate synthase: c103 clone ; Inner
membrane protein: b14 clone ; Flagellar
motor switch protein: b25 clone ;
Transcription regulator NtrC family: c15
clone ; Outer membrane: c67 clone ; Unknow:
a15, a25, c2, c33, C49, c59, c66, c72, c79,
c95 and c107 clones。這些 clones 中以
transposase 為最多，與前人所觀察的結果相
吻合，病原性的鈎端螺旋體中具有許多的
transposase 相關序列，而在非病原性的鈎端
螺旋體上並未發現此類相關基因，而這些
transposase 在病原性上所扮演的何種角色
也是目前鈎端螺旋體病原性研究的熱門項
目。其它的基因由於在鈎端螺旋體上的研
究並不多，是否與病原性相關目前並不清
楚，需更進一步進行研究方可釐清。

近來鈎端螺旋體的基因體計劃已有快
速進展，本實驗室與澳洲墨爾本 Monash 大
學微生物學系合作，取得鈎端螺旋體血清
型 *harjovovis* 的基因體資料，進行與
subtracted hybridization 所得陽性質體的 DNA
序列比對，並將其附近的基因以電腦軟體
進行轉譯，利用 prediction of protein
localization sites (PSORT) 軟體分析這些序
列，得到數個具有外膜蛋白特性的 DNA 序
列，現在正在選殖血清型 *shermani* 中的該類
基因。冀望可利用此方式尋找到更多鈎端
螺旋體病原性的相關基因，以利能更進一
步幫助了解鈎端螺旋體的整個致病機制的
全貌。

四·計畫成果自評

本計劃所提鈎端螺旋體之流行病學調
查中發現在豬隻及軍犬中鈎端螺旋之陽性
抗體率較以往台灣地區所做調查高出甚
多，可能由於所使用抗原的血清型較以往
調查更為完備，如血清型 *shermani* 在前人的
調查中並未使用，而本次調查中發現該血
清型在陽性抗體率中佔有大多數(豬隻
55.7%)，此次調查中發現鈎端螺旋體在台
灣地區中存在，但並未引起注意，而忽視
它的防疫。鈎端螺旋體造成腎小管間質腎

炎之機制研究上得知 LipL32 可引發腎小管
細胞的 iNOS、MCP-1 及 TNF- α 增加。而
利用 RNA 差異展示法而得到在高滲透壓下
引發 *pru* 基因表現量增加，利用相減雜交法
而得到病原性鈎端螺旋體的基因，這些基
因與病原性的關係仍需更進一步分析研
究。鈎端螺旋體基因體計劃所得的基因序
列資料對於分析上述所得的基因大有幫
助，而從基因體的序列資料中更可找尋更
多的致病性基因，這對研究鈎端螺旋體
的致病機制大有幫助，對往後的研究有很
大的助益。

五、參考文獻

1. Haake DA and Matsunaga J: Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 70: 4936-4945, 2000
2. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA: The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 68: 2276-2285, 2000
3. Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy AM, Mazel MK, Bolin CA: Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* 66: 1579-1587, 1998
4. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA: Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 67: 6572-6582, 1999
5. Lin CL, Wu MS, Yang CW, Huang CC: Leptospirosis associated with hypokalemia and thick ascending limb dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 14: 193-195, 1999
6. Pan MJ, Yang CW, Li CL: Leptospirosis. *Infect Dis Rep* 12: 389-394, 1996
7. Yang CW, Pan MJ, Wu MS, Chen YM, Tsen YT, Lin CL, Wu CH, Huang CC: Leptospirosis: An ignored cause of acute renal failure in Taiwan. *Am J Kidney Dis* 30: 840-845, 1997
8. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hong JJ, Yu CC, Vandewalle A, Huang CC: Leptospira outer membrane protein activates NF- κ B and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 2017-2026, 2000
9. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC: The leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2037-2045, 2002

