

文章编号: 1674-8115(2010)09-1090-05

· 论著 ·

## 问号钩端螺旋体胶原酶体内和体外的活性研究

徐 静<sup>1,2</sup>, 陈晓莹<sup>3</sup>, 郭晓奎<sup>4</sup>, 姜叙诚<sup>2</sup>

(1. 上海医药高等专科学校基础部, 上海 201318; 2. 上海交通大学基础医学院病理学教研室, 上海 200025; 3. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016; 4. 上海交通大学基础医学院病原生物学教研室, 上海 200025)

**摘要:** 目的 通过检测致病性钩端螺旋体(钩体)胶原酶在体内、外的活性, 探讨问号钩体黄疸出血群赖型赖株(赖株)假定的胶原酶(LA0872)在钩体病出血中的可能作用。方法 在大肠杆菌中克隆、表达重组赖株 la0872, 并行相关鉴定及蛋白酶学活性检测。比较不同毒力菌株赖株、赖株减毒株和双曲钩体三宝奎群 montevelario 型 Monte Valerio 株钩体胶原酶的基因序列特异性及转录和酶活水平的差异。测定豚鼠和沙鼠赖株感染模型的血清胶原酶活性水平变化。结果 成功构建的重组质粒经酶切和测序鉴定显示位点连接正确, 插入序列与 GenBank 公布的 la0872 序列完全一致, 并证实其具有胶原酶活性; 不同毒力菌株中的钩体胶原酶基因序列一致, 转录和酶活水平均无显著性差异; 豚鼠和沙鼠感染赖株后, 宿主体内血清胶原酶活性水平与未感染赖株动物比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 首次表达和鉴定了有活性的钩体胶原酶, 但其在钩体病出血中的作用尚待证实和探讨。

**关键词:** 钩端螺旋体; 胶原酶; 酶学活性

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2010.09.018

中图分类号: R377.5; R-332

文献标志码: A

### In vivo and in vitro activities of *Leptospira interrogans* collagenase

XU Jing<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-ying<sup>3</sup>, GUO Xiao-kui<sup>4</sup>, JIANG Xu-cheng<sup>2</sup>

(1. Shanghai Institute of Health Sciences, Shanghai 201318, China; 2. Department of Pathology, Basic Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; 3. School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 4. Department of Microbiology and Parasitology, Basic Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** **Objective** To detect *in vivo* and *in vitro* activities of *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) collagenase in order to identify the role of collagenase (LA0872) of *Leptospira interrogans* serovar Lai strain Lai in the pathogenesis of hemorrhage caused by pathogenic *leptospira*. **Methods** Recombinant la0872 was cloned and expressed in *E. coli*, and enzyme activity was detected by gelatin zymography. The differences in collagenase gene, transcription and enzyme activity among three *leptospira* strains with different virulence (*L. interrogans* serovar Lai strain Lai, avirulent variant strain of *L. interrogans* serovar Lai strain Lai and *L. biflexa* serovar montevelario strain Monte Valerio) were compared. Furthermore, the changes of serum collagenase activities of guinea pigs and gerbils infected by *L. interrogans* serovar Lai strain Lai were detected. **Results** Recombinant la0872 was successfully identified with collagenase activity. There was no significant difference in collagenase gene, transcription and enzyme activity among three *leptospira* strains with different virulence. There was no significant difference between the serum activities of collagenase of guinea pigs and gerbils with infection by *L. interrogans* serovar Lai strain Lai and those without infection ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** It is the first time to express *L. interrogans* collagenase and identify its activity, however, its role in leptospirosis hemorrhage still needs to be further studied.

**Key words:** *Leptospira interrogans*; collagenase; enzyme activity

基金项目: 国家自然科学基金(30770820); 上海市教委和上海市教育发展基金会“晨光计划”(2007CGB06); 上海市自然科学基金(06ZR14056) (National Natural Science Foundation of China, 30770820; “Chen Guang” Project from Shanghai Municipal Education Committee and Shanghai Education Development Foundation, 2007CGB06; Natural Science Foundation of Shanghai, 06ZR14056)。

作者简介: 徐 静(1981—), 女, 硕士, 助教; 电子信箱: xujing\_x@126.com。

通讯作者: 姜叙诚, 电子信箱: xjiang@shsmu.edu.cn。

钩端螺旋体(钩体)病作为一种急性传染性疾病,是流行于世界范围的人兽共患病,局部地区不断有疫情爆发,危害严重<sup>[1-3]</sup>。钩体病的临床表现差异较大,轻者表现轻微的流感样症状,严重者临床表现危重,尤其是感染间号钩体黄疸出血群的患者可因急性肺弥漫性出血而死亡<sup>[4-5]</sup>,但出血机制尚未能阐明。2003年,Ren等<sup>[6]</sup>完成了间号钩体黄疸出血群赖型赖株(赖株)基因组的测序工作,筛选出假定的钩体胶原酶(*la0872*)、溶血素、血小板激活因子乙酰水解酶等多种毒素和出凝血相关基因,推测它们可能与钩体病的出血机制相关<sup>[7-11]</sup>。此前,本课题组在赖株感染的豚鼠模型的肺组织出血区检测到LA0872的表达,并且存在于有钩体分布的部位<sup>[8]</sup>。本研究通过在原核系统中构建赖株重组*la0872*表达质粒,并进行基因测序及蛋白酶学活性鉴定,比较不同毒力菌株中假定的钩体胶原酶的基因序列特异性、转录水平和酶活性水平,同时检测豚鼠和沙鼠感染赖株后宿主体内血清中胶原酶的活性水平,探讨LA0872在钩体病出血中的可能作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和载体** 钩体赖株(定期感染豚鼠保持其毒力)、赖株减毒株和双曲钩体三宝垄群 montevaleiro 型 Monte Valerio 株(双曲)均由中疾控中心传染病预防控制所提供的<sup>[12]</sup>。表达载体 pGEX-5X-1 及宿主菌 *E. coli* DH5α 和 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 由本实验室保存。

**1.1.2 动物和试剂** 1月龄雄性豚鼠购自上海生物制品研究所,动物生产许可证号:SCXK(沪)2004-0003;使用许可证号:SYXK(沪)2008-0038。2月龄雄性沙鼠购自浙江省实验动物中心,生产许可证号:SCXK(浙)2003-0001;使用许可证号:SYXK(沪)2008-0038。QIAquick PCR Purification Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen);E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit (Omega);2×Taq Plus PCR MasterMix 和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶及限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I (TaKaRa);IPTG 和 Goat Anti-Mouse IgG-HRP(上海申能博彩生物技术有限公司);细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海华舜生物公司);Trizol、DNase I (Amplification Grade) 和 SuperScript III First-strand Synthesis System for RT-PCR 以及 EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit (Invitrogen)。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计及合成** 根据从 GenBank 获得的

*la0872* 序列自行设计一对引物。基因序列共 2 667 bp,去掉 SignalP 3.0 预测的信号肽(1~75位,25 aa),扩增区段位于 76~2 667 位(2 592 bp)。设计 5' 端引物含 *Bam*H I 酶切位点(见下划线区),3' 端含 *Xho* I 酶切位点,由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物序列: 5'-CGGGATCCCCAAATAAT GGCTCTAAAAAT-3'; 下游引物序列: 5'-CCGCTCGAG TGCGGCCGCAAGTTTAG-3'。

**1.2.2 PCR 扩增目的基因** 在提取赖株基因组 DNA 后,以赖株的全基因组 DNA 为模板,用 PCR 方法扩增 *la0872*。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳割胶后,按 QIAquick Gel Extraction Kit 说明书操作回收,得到目的基因。

**1.2.3 原核表达载体的构建与鉴定** 割胶回收纯化后的 *la0872* 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后连接至表达载体 pGEX-5X-1,转化入宿主菌 *E. coli* DH5α。挑取单克隆转化菌,提取质粒,以 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。经鉴定后有符合大小的片段出现,阳性菌液送 Invitrogen 生物技术有限公司测序。

**1.2.4 重组蛋白的表达和鉴定** 将测序正确的重组质粒转化至表达菌 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL。挑取单菌落少量培养,氨苄青霉素的终浓度为 100 μg/mL,氯霉素为 34 μg/mL,30 ℃过夜培养。按 1:100 转入 7 mL 2×YTA 培养基,培养至 *D*<sub>600 nm</sub>=0.8~1.0,在 20 ℃,分别经 1.0、0.1 和 0.01 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后,收获的全菌经超声裂解破碎后离心,分别收集沉淀和上清,经 10% SDS-PAGE 蛋白电泳和用 Anti-GST 小鼠单克隆抗体 IgG2a (1:4 000) 作为一抗行 Western blotting 鉴定,以确定获得可溶性目的蛋白的最适 IPTG 诱导浓度。另留取上清检测酶活性。

**1.2.5 明胶酶谱分析法检测胶原酶活性**<sup>[13-15]</sup> 采用明胶作为蛋白酶检测的底物<sup>[16]</sup>。配制 10% 分离胶(含明胶 1 mg/mL),5% 浓缩胶和 5×SDS 凝胶上样缓冲液[0.5 mol/L Tri-HCl (pH 6.8) 2 mL,10% SDS 4 mL,1% 溴酚蓝 1 mL,丙三醇 2 mL,4 ℃保存]。样品中加入一定量的 SDS 凝胶上样缓冲液,上样后电泳(4 ℃)。电泳结束后,用 2.5% Triton X-100 振荡洗胶 2 次(摇床 70 转/min),15~20 min/次,去除 SDS。将电泳后的胶放在酶反应缓冲液(50 mmol/L Tri-HCl,10 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 100 mmol/L NaCl,pH 7.5)中,37 ℃条件下孵育 18 h(摇床 75 转/min)。考马斯亮蓝 G-250 染液染色,脱色,直至透明带清楚显现。

**1.2.6 PCR 扩增保守性片段** 利用 LA0872 蛋白和其他微生物胶原酶在一级结构上的保守性,选取

1 439 ~ 1 977 bp 区域为扩增片段。同时,用 Genomic Blast 检测其特异性,发现该片段与钩体全基因组 DNA 中其他基因片段不相匹配。上游引物序列:5'-ATAATGGTGGGATCTACATAGAA-3';下游引物序列:5'-TGGATCTGTAAGATTGTCTACGT-3'。

**1.2.7 RT-PCR 抽提不同毒力钩体菌株的总 RNA,经 DNase I 消化后进行 RT-PCR。上、下游引物序列同 1.2.6。**

**1.2.8 钩体培养基上清制备及胶原酶活性检测** 钩体菌株在体外 EMJH 培养基中,28 ℃需氧培养至对数生长期(菌密度为  $10^8$ /mL)时,取 100 mL 菌液,10 000 × g 离心 15 min 分离菌体和培养基上清液。吸取上清液用 Millipore 超滤离心管浓缩后于 -20 ℃存放备用。不同毒力菌株胶原酶活性检测方法同 1.2.5。

**1.2.9 钩体病动物模型的建立和血清胶原酶活性检测** 豚鼠和沙鼠腹腔内注射赖株 PBS 重悬液 1 mL,浓度  $6 \times 10^8$ /mL。以腹腔注射 1 mL PBS 作为对照动物。观察模型动物发病情况,在濒死前用乙醚麻醉后解剖,取肺组织固定后制备 HE 染色石蜡切片,光学显微镜观察组织学改变。心脏取血,收集血清备用。采用 EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit(Invitrogen)检测血清中的胶原酶,选取明胶作为检测底物,实验操作按照试剂盒说明进行。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 2.0 进行作图和统计学分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外重组质粒酶切、测序及其酶学活性鉴定

构建的重组质粒 pGEX-5X-1-la0872 双酶切鉴定后,经 DNA 测序鉴定表明插入序列与 GenBank 所公布的 la0872 序列完全一致,并且酶切位点连接正确。10% SDS-PAGE 凝胶电泳发现,诱导表达的 GST 融合蛋白的相对分子量与理论预期值一致,约为 101 000(GST 标签由 220 aa 组成)。可溶性分析显示,表达产物主要存在于菌体超声破碎物离心后的沉淀中(图 1A)。但随着 IPTG 诱导浓度的减少,全菌超声裂解产物中上清蛋白的量增多。Western blotting 鉴定证实,表达菌株经 0.01 mmol/L IPTG 诱导后,在上清中可获得部分目的蛋白(图 1B)。同时,分别取 0.1 和 0.01 mmol/L IPTG,诱导 8 h 后的全菌蛋白经超声裂解后取上清做胶原酶活性检测,在 0.01 mmol/L IPTG 诱导条件下的上清中检测到具有胶原酶活性的融合蛋白(图 1C)。因此,该基因被命名为钩体胶原酶(collagenase, colA)。

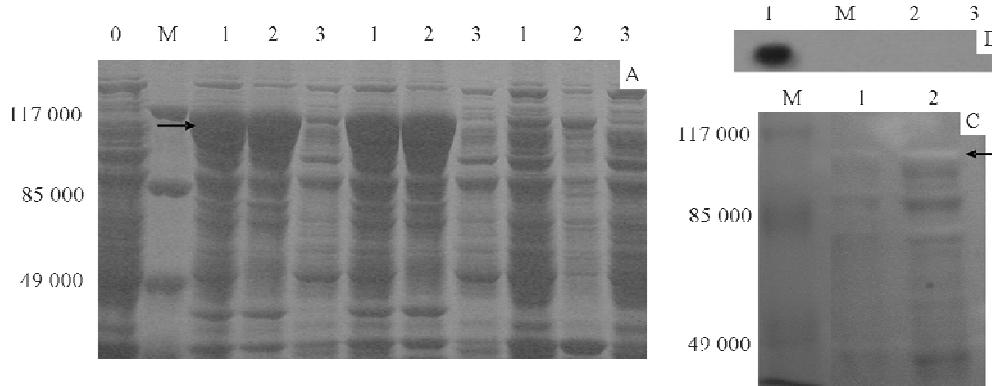


图 1 重组 LA0872 蛋白的表达和鉴定

Fig 1 Expression and identification of recombinant LA0872

A: SDS-PAGE 凝胶电泳分析。0: 阴性对照(未诱导); 1, 2, 3: IPTG (1.0, 0.1, 0.01 mmol/L) 诱导 8 h 后的全菌蛋白、超声后沉淀和上清; M: 蛋白分子 Marker; 箭头: 带 GST 标签的重组表达 LA0872。

B: Western blotting 鉴定。1, 2, 3: IPTG (0.01, 0.1, 1.0 mmol/L) 诱导 8 h 后超声后的上清; M: 蛋白分子 Marker。

C: 胶原酶活性检测。1, 2: IPTG (0.1 和 0.01 mmol/L) 诱导 8 h 后超声后的上清; 箭头: 降解明胶的透明蛋白条带; M: 蛋白分子 Marker。

### 2.2 不同毒力菌株中钩体胶原酶在基因、转录和酶活性水平上的检测

以钩体不同毒力菌株的全基因组 DNA 为模板,用自行设计的引物进行 PCR 扩增钩体胶原酶的保守性(特异性)片段,电泳结果显示,在赖株、赖株减毒株和双曲中所得的特异性条带与目的条带相符。

RT-PCR 结果显示,钩体胶原酶基因在这三株菌株中均有转录。胶原酶活性检测结果发现,三株菌株在 EMJH 培养基的上清中均含有胶原酶活性的蛋白(表 1)。

### 2.3 赖株感染模型动物观察及检测结果

赖株感染动物建模后,第 3 天起出现耸毛、食欲

不振;第4天出现濒死表现,绝大部分动物死于建模后第5天。解剖发现豚鼠皮肤明显变黄,显示有黄疸出现,肺脏出现大小不等的出血点;组织学观察见肺组织内灶状出血(图2)。血清胶原酶活性检测发现,与对照动物比较,赖株感染模型动物血清胶原酶活性水平没有明显改变,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图3)。

表1 不同毒力钩体菌株胶原酶基因特异性及转录和酶活检测结果  
Tab 1 Collagenase gene, transcription and enzyme activity among three *Leptospira* strains with different virulence

菌株	基因特异性	转录水平	酶活性
赖株	+	+	+
赖株减毒株	+	+	+
双曲	+	+	+

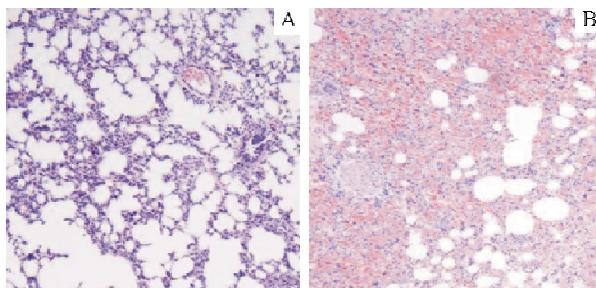


图2 豚鼠肺组织的HE染色  $\times 100$

Fig 2 HE staining of lung tissues of guinea pigs  $\times 100$

A: 对照豚鼠; B: 感染赖株模型豚鼠(4 d)

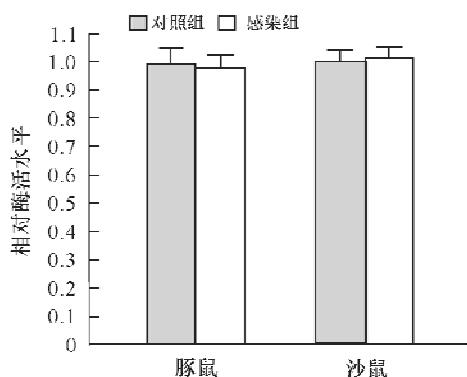


图3 感染模型与对照动物血清中胶原酶活性水平比较

Fig 3 Serum collagenase activities of infection model and control animals

### 3 讨 论

关于钩体病肺出血的机制以前存在两个假说,一是毒素介导,二是宿主免疫应答引起<sup>[17]</sup>,但是都没有得到足够的实验证据支持。本研究在赖株基因组的基础上,以致病性钩体赖株胶原酶为切入点,采用体内和体外的研究方法,为阐明钩体病的致病机制提供新的线索。

在赖株基因组中,生物信息学分析发现钩体大染色体上存在一个编码微生物胶原酶的基因 *colA*,但是一直没有得到实验证。由于假定的 *colA* 序列较长,在体外克隆表达可溶性的重组 ColA 存在一定困难。构建的重组质粒 pET-28b (+)-*colA*,在 *E. coli* Rosetta (DE3) 菌株内可获得高效表达的重组 ColA;但经可溶性分析发现,菌体超声上清中没有目的蛋白的表达<sup>[8]</sup>。通过参考其他微生物胶原酶的重组表达资料<sup>[18-19]</sup>,本课题组更换不同的载体和宿主菌以及摸索不同的诱导条件,最终用表达载体 pGEX-5X-1 和表达菌株 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 第一次获得了有活性的含 GST 标签的融合蛋白。图 1C 显示 GST 标签不影响蛋白的活性,这与文献<sup>[18-19]</sup>报道的 GST 融合的其他微生物胶原酶类似。

通过选取几株不同毒力钩体的代表株,比较钩体胶原酶在 DNA、RNA 和酶活水平上的差异后发现, *colA* 在强毒株(赖株)、弱毒株(赖株减毒株)和无毒株(双曲)中均存在,并转录、表达有活性的蛋白。因此,ColA 可能不是一个关键的致病因子,但是考虑到无毒株双曲钩体不能在宿主体内存活的特性,在致病性钩体进入宿主并逃避宿主免疫反应后,ColA 很可能参与了钩体后续的致病作用,即在宿主的循环血液或钩体存在的脏器中发挥作用。但是,在钩体病动物模型实验中发现,感染赖株后,豚鼠和沙鼠血清中胶原酶活性没有发生明显改变。据此推测,ColA 对感染宿主的全身作用不明显,其在钩体引起的出血中作用尚不明确。

致病性钩体具有较强的侵袭能力,进入血管后随血流或经淋巴管和组织间隙播散至全身多个脏器,在宿主体内侵袭和繁殖,导致钩体病<sup>[4]</sup>。在感染组织中,钩体主要分布于组织间质中,细胞内感染较少<sup>[20]</sup>,但可侵袭细胞而进入细胞质<sup>[21]</sup>。钩体通过表达一系列毒力因子,如 Lsa21<sup>[22]</sup>、Len<sup>[23]</sup>、LipL32<sup>[24-25]</sup>、LipL53<sup>[26]</sup> 和 Lsa63<sup>[27]</sup> 等,与细胞外基质中的层粘连蛋白、IV型胶原和纤维结合素等各种成分有不同程度的结合,发挥黏附和侵袭宿主细胞和组织的作用,并可以逃离宿主的免疫反应<sup>[28]</sup>。本课题组曾在感染赖株的豚鼠肺组织出血区检测到分布的钩体和 ColA 表达<sup>[8]</sup>,说明 ColA 可能在钩体感染的宿主局部组织微环境中起到一定的作用。在本研究的基础上,对于感染组织的微环境中 ColA 的可能致病作用和机制,以及其是否和其他毒力因子有协同作用,将是后续研究需要探讨的问题。

## 参考文献:

- [1] Sethi S, Sharma N, Kakkar N, et al. Increasing trends of leptospirosis in northern India: a clinico-epidemiological study [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(1): e579.
- [2] Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem [J]. *J Biosci*, 2008, 33(4): 557–569.
- [3] Higgins R. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague [J]. *Rev Sci Tech*, 2004, 23(2): 569–581.
- [4] Faine S, Adler B, Bolin C, et al. *Leptospira* and leptospirosis [M]. 2nd ed. Melbourne: MediSci, 1999: 1–8.
- [5] McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, et al. Leptospirosis [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2005, 18(5): 376–386.
- [6] Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing [J]. *Nature*, 2003, 422(6934): 888–893.
- [7] 李文俊, 余慧峰, 杨宏亮, 等. 问号钩端螺旋体胶原酶结构和功能分析 [J]. 世界感染杂志, 2004, 4(1): 9–13.
- [8] 徐静, 李文俊, 杨宏亮, 等. 问号钩端螺旋体胶原酶在钩体病豚鼠模型的肺组织中的表达 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(7): 647–651.
- [9] Zhang YX, Geng Y, Bi B, et al. Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(4): 453–461.
- [10] Carvalho E, Barbosa AS, Gomez RM, et al. Evaluation of the expression and protective potential of Leptospiral sphingomyelinases [J]. *Curr Microbiol*, 2010, 60(2): 134–142.
- [11] Yang J, Zhang Y, Xu J, et al. Serum activity of platelet-activating factor acetylhydrolase is a potential clinical marker for leptospirosis pulmonary hemorrhage [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4181.
- [12] 严杰, 戴保民, 于恩庶. 钩端螺旋体病学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1–4.
- [13] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册, 1999: 33–40.
- [14] McClellan SA, Huang X, Barrett RP, et al. Matrix metalloproteinase-9 amplifies the immune response to *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(1): 256–264.
- [15] Wilson MJ, Strasser M, Vogel MM, et al. Calcium-dependent and calcium-independent gelatinolytic proteinase activities of the rat ventral prostate and its secretion: characterization and effect of castration and testosterone treatment [J]. *Biol Reprod*, 1991, 44(5): 776–785.
- [16] 李文俊, 郭晓奎, 姜叙诚. 微生物胶原酶 [J]. 微生物学杂志, 2004, 24(2): 34–37.
- [17] Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlehem EP, et al. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis [J]. *Braz J Infect Dis*, 2007, 11(1): 142–148.
- [18] Matsushita O, Jung CM, Minami J, et al. A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(6): 3643–3648.
- [19] Rainbow L, Wilkinson MC, Sargent PJ, et al. Identification and expression of a *Burkholderia pseudomallei* collagenase in *Escherichia coli* [J]. *Curr Microbiol*, 2004, 48(4): 300–304.
- [20] Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(12): 6926–6932.
- [21] Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence [J]. *Infect Immun*, 1997, 65(2): 729–738.
- [22] Atzinger MV, Barbosa AS, De Brito T, et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 70.
- [23] Stevenson B, Choy HA, Pinne M, et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement [J]. *PLoS One*, 2007, 2(11): e1188.
- [24] Hauk P, Macedo F, Romero EC, et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(6): 2642–2650.
- [25] Tung JY, Yang CW, Chou SW, et al. Calcium binds to LipL32, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(5): 3245–3252.
- [26] Oliveira TR, Longhi MT, Goncalves AP, et al. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules [J]. *Microbes Infect*, 2010, 12(3): 207–217.
- [27] Vieira ML, de Moraes ZM, Goncalves AP, et al. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV [J]. *J Infect*, 2010, 60(1): 52–64.
- [28] Chirathaworn C, Patarakul K, Saksit V, et al. Binding of *Leptospira* to extracellular matrix proteins [J]. *J Med Assoc Thai*, 2007, 90(10): 2136–2142.

收稿日期: 2010-03-22

本文编辑: 张智康