

表达产肠毒素性大肠杆菌 F41 重组干酪乳杆菌 免疫小鼠的保护性分析

刘建奎¹, 魏春华¹, 侯喜林¹, 余丽芸^{1,2}, 王桂华²

(¹黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江大庆 163319; ²黑龙江八一农垦大学生命科技学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 【目的】利用干酪乳酸菌作为抗原传递系统来刺激机体产生黏膜免疫反应, 从而研制有效的黏膜疫苗预防 ETEC F41 的感染。【方法】重组菌在 MRS 培养基中进行表达, 经 SDS-PAGE、Western blot 检测目的蛋白的表达, 间接免疫荧光分析及流式细胞术检测外源蛋白展示到菌体表面。将重组菌及空质粒菌株分别滴鼻接种 SPF 级 Balb/c 小鼠, 采集血液样品测定小鼠产生抗 F41 的特异性 IgG, 收集小鼠肺部冲洗液、肠道冲洗液、阴道冲洗液及粪便样品测定小鼠产生抗 F41 的特异性 sIgA, 并对小鼠进行攻毒保护性试验。【结果】重组干酪乳杆菌 pLA-F41/*L. casei* 免疫小鼠能够产生明显的抗 F41 的 sIgA 和 IgG 抗体水平, 主动免疫组保护率在 85% 以上, 对照组则全部死亡, 被动免疫组新生幼鼠的保护率达 80%, 对照组保护率仅为 5%。【结论】细胞表面锚定 ETEC F41 菌毛蛋白的重组干酪乳杆菌 pLA-F41/*L. casei* 通过滴鼻途径免疫能够有效预防 F41 型 ETEC 的感染。

关键词: ETEC F41; 干酪乳酸菌; 滴鼻免疫; 保护率

Protection Against ETEC F41 After Intranasal Immunization with Recombinant *Lactobacillus casei*

LIU Jian-kui¹, WEI Chun-hua¹, HOU Xi-lin¹, YU Li-yun^{1,2}, WANG Gui-hua²

(¹College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, Heilongjiang;

²College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, Heilongjiang)

Abstract: 【Objective】 The use of live *Lactobacillus casei* as an antigen delivery system elicit mucosal immunity and thus represents a promising strategy for mucosal vaccination to prevent ETEC F41 infection. 【Method】 The recombinant fusion proteins were detected by SDS-PAGE and Western blot. Surface localization of the fusion protein was verified by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. Intranasal immunization of SPF Balb/c mice was performed with recombinant strain harboring pLA-F41/*L. casei* and pLA/*L. casei*. Specific anti-F41 IgG antibody in the serum and specific anti-F41 secret immunoglobulin A (sIgA) antibody in the lung, intestines, vagina fluid and feces of mice were detected by indirect ELISA after intranasal immunization. The mice intranasally immunized with pLA-F41/*L. casei* and pLA/*L. casei* were challenged with standard-type ETEC F41(C83919). 【Result】 Mice immunized with pLA-F41/*L. casei* could produce remarkable anti-F41 antibody level. More than 80% of mice survived after challenged with C83919 ($2 \times 10^3 LD_{50}$). All the mice immunized with a control *L. casei* harboring pLA vector were died. Eighty-five percent of the pups survived after challenged with C83919, but only a 5% survival rate for pups that were either immunized with a control *L. casei* harboring pLA vector or unimmunized. 【Conclusion】 These results indicate that mucosal immunization with recombinant *L. casei* expressing ETEC F41 fimbriae protein on its surface provides an effective means for eliciting protective immune response against the ETEC F41.

Key words: ETEC F41; *Lactobacillus casei*; intranasal immunization; protection

收稿日期: 2008-11-10; 接受日期: 2009-05-14

基金项目: 大庆市攻关课题 (SGG2006-011)、黑龙江省农垦总局攻关课题 (HNKXLTV-08-06-03, HNKXIV-08-07)

作者简介: 刘建奎 (1982-), 男, 山东聊城人, 硕士, 研究方向为分子病原学。E-mail: kzkz1015@163.com。通信作者余丽芸 (1965-), 女, 江西广丰人, 教授, 研究方向为分子免疫学。Tel: 0459-6819292; E-mail: xly_hou@yahoo.com.cn

0 引言

【研究意义】产肠毒素性大肠杆菌 (*Enterotoxigenic E.coli*, ETEC) 能够引起人及新生幼畜 (初生仔猪、犊牛、羔羊及断奶仔猪) 剧烈水样腹泻和迅速脱水死亡。ETEC 首先通过黏附素性菌毛与小肠黏膜上皮细胞绒毛边缘的特异性受体结合, 然后发挥空间阻遏作用, 不被肠蠕动或分泌物的清洗而排除, 最后大量繁殖, 并分泌肠毒素, 引起水和电解质代谢紊乱, 从而导致腹泻, 甚至死亡。依据 ETEC 经黏膜感染的特点, 选择安全无毒, 无免疫原性, 能表达和传递抗原物质的干酪乳酸菌载体系统, 并利用多聚谷氨酸跨膜蛋白 *pgsA* 的锚定机制将外源蛋白 F41 不经过修饰直接传递到淋巴系统^[1-3], 产生黏膜免疫及其系统免疫, 为 ETEC 的防治和进一步研究黏膜免疫机制提供物质基础。【前人研究进展】产肠毒素性大肠杆菌 (ETEC) 能够引起人及新生幼畜 (初生仔猪、犊牛、羔羊及断奶仔猪) 剧烈水样腹泻和迅速脱水死亡。该病流行面广、危害严重, 给畜禽养殖业造成了巨大的经济损失。目前, 国内外主要采用了灭活疫苗对其进行预防和控制。但灭活疫苗保护期短; 存在不安全因素, 会由于灭活不当造成疾病的传播; 其疫苗只针对某一血清型有效, 但大肠杆菌易变异产生多种血清型而导致免疫失败等等缺陷, 致使灭活疫苗未能大面积推广使用。因此, 安全、有效、实用的新型活载体疫苗是 ETEC 免疫预防研究的主要方向。【本研究切入点】黏附素性菌毛与小肠黏膜上皮细胞的特异性受体结合而定植于黏膜, 这是 ETEC 引起疾病的先决条件, 针对其感染途径和黏膜免疫的重要性, 滴鼻免疫不仅能诱导鼻相关淋巴组织 (NALT) 免疫应答, 而且能诱导全部黏膜相关淋巴组织 (MALT) 部位及系统的有效免疫应答, 进而诱导产生系统免疫应答, 对于黏膜免疫乳酸菌传递载体比其它活疫苗载体 (志贺氏菌属, 沙门氏菌, 李斯特菌等) 更具有吸引力^[4-7], 因为乳酸菌是人与动物肠道中常见的菌群, 被公认为安全级 (generally recognized as safe, GRAS) 微生物^[8-12], 不仅具有抗酸碱的能力, 而且具有免疫佐剂的功能, 可提高某些免疫活性因子如 IL-2, TNF- α , INF 的分泌, 本身具有低免疫原性、安全、方便、廉价等特点, 这对本病的防治具有重要意义。【拟解决的关键问题】本研究以食品级微生物干酪乳酸菌作为递呈疫苗抗原的活菌载体, 利用 *pgsA* 的锚定机制将 F41 展示到菌体表面, 从而使外源抗原递呈到淋巴组织刺激机体产

生黏膜免疫和系统免疫。将构建的表达 F41 蛋白的重组干酪乳酸菌滴鼻免疫小鼠, 测定其诱导黏膜和系统免疫应答所产生的抗体水平, 并进行攻毒试验, 评价该重组乳酸菌表达系统作为 F41 的活疫苗的潜在价值, 同时为进一步研究黏膜免疫机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及主要试剂

重组干酪乳酸菌 pLA-F41/*L.casei* 由黑龙江八一农垦大学基因工程实验室构建并保存; 兔源抗 F41 血清由黑龙江八一农垦大学基因工程实验室制备保存; HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和 MRS 培养基均购自 Sigma 公司; FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物技术有限公司; 其它生化试剂均为国产分析纯产品。

1.2 试验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠, 购自北京维通利华动物技术有限公司, 引入后在一级动物室内饲养繁殖, 饲喂的食物和水都是经过严格灭菌的。

1.3 目的蛋白在干酪乳酸菌中的诱导表达及鉴定

将重组菌 pLA-F41/*L.casei* 接种于 MRS 液体培养基中, 37℃ 培养活化, 取活化菌按 1 : 5 比例接种于 10 ml MRS 培养基中进行诱导表达。诱导表达菌液以 3 500 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀用 10 mg·ml⁻¹ 的溶菌酶 37℃ 水浴作用 40 min, 3 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 SDS-PAGE 样品缓冲液, 混匀, 沸水浴 10 min, 在 10% SDS-PAGE 上进行电泳分析, 同时通过 Western blot, 间接免疫荧光和流式细胞术的检测目的蛋白的表达及在乳酸菌表面的锚定^[13]。

1.4 试验动物分组及免疫

6~8 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠, 将其以每组 60 只随机分成 2 组, 即含空质粒 pLA 对照组和重组菌 pLA-F41 试验组。滴鼻试验组和对照组分别以 2×10^9 CFU/ml 菌悬液 20 μ l/只滴鼻接种。

免疫程序为在 0~2 d、7~9 d、21 d 和 49 d 将小鼠麻醉进行滴鼻免疫。免疫程序及免疫方法的制定参考 Lee 等^[14]方法进行。

1.5 免疫小鼠血清中特异性 IgG 的测定

间接 ELISA 方法进行检测: 分别于滴鼻免疫前、初免后第 14、28、42、56、70 和 84 天采集小鼠血液, 4℃ 静止过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集血清。以纯化的 F41 菌毛蛋白包被 96 孔聚苯乙烯微量板 4℃ 反应过夜; 用含有 5% 脱脂乳的 PBS 37℃ 封闭 1 h; 加

入免疫小鼠血清, 37℃反应 1 h; 加入 1 : 8 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 37℃反应 1 h; 加新鲜配制的 TMB-H₂O₂, 37℃避光显色 10 min, 加终止液, 用酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。

1.6 小鼠肺部冲洗液、肠道冲洗液、阴道冲洗液及粪便 ETEC F41 异性 sIgA 抗体检测

于初免后 56, 70, 84d 处死小鼠, 开胸暴露气管, 从气管中部剪断, 用 PBS 从气管断端反复冲洗肺, 收集肺部冲洗液; PBS 反复冲洗小肠, 收集小肠冲洗液; PBS 反复冲洗阴道, 收集阴道冲洗液。所有冲洗液 2 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 置 -20℃保存待测。免疫前及免疫后每周收集小鼠粪便, 每 0.1 g 粪便加入 0.4 ml 提取液, 置于振荡器上振荡 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。按照 Lee 等^[14]方法采用间接 ELISA 进行检测 ETEC F41 特异性 sIgA 抗体效价。

1.7 血清中 IgG 亚类、IgA 抗体和 IgM 抗体的检测

采集免疫后第 84 天的鼠血清, 通过 ELISA 检测 IgG 抗体亚类、抗体 IgA 和 IgM, 按照 Lee 等^[14]方法进行。

1.8 攻毒保护性试验

1.8.1 主动免疫攻毒保护性试验 根据 Nagy 等^[15]的方法按照不同的时间、不同的剂量对免疫后的小鼠进行攻毒试验。将免疫后的小鼠分成 4 组, 每组 12 只。分别于最后一次免疫后的 3 周 (75 d) 和 9 周 (116 d) 对小鼠进行攻毒试验, 攻毒的剂量为 2×10^3 LD₅₀ (6×10^{11} CFU of C83919)。观察小鼠的发病及死亡情况, 并进行记录, 用 long rank test 统计小鼠保护率。

1.8.2 新生小鼠被动免疫攻毒保护性试验 按照 Duchet-Suchaux neonatal ETEC challenge model^[16-17], 试验组小鼠滴鼻免疫重组乳酸菌 6~7 周后, 将小鼠配对, 新生小鼠划分为 3 组, 每组 20 只, 出生后 24 h 喂养母乳, 然后进行攻毒试验, 剂量是 10^3 C83919/10 μ l。观察小鼠的发病及死亡情况, 并进行记录, 用 long rank test 统计小鼠保护率。

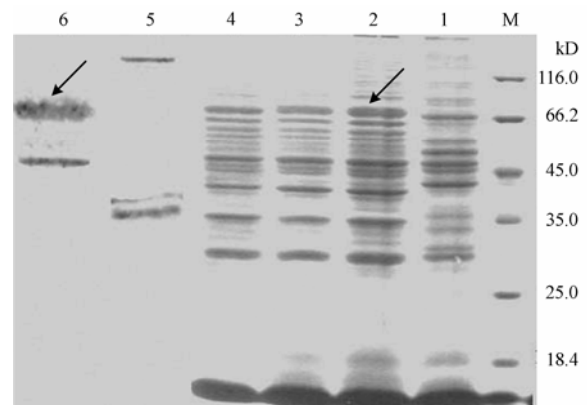
2 结果与分析

2.1 目的蛋白在干酪乳杆菌中的诱导表达及鉴定

重组菌 pLA-F41 在 MRS 液体培养基中培养, 离心收集菌体, 裂解物经 10% SDS-PAGE 鉴定, 结果表明有约 73 kD 的蛋白泳带, 初步证明目的蛋白获得了表达 (图 1)。表达的蛋白转印 PVDF 膜, 与兔源

抗 ETEC F41 血清作用, 再经羊抗兔 IgG/HRP 二抗作用, Western blot 分析, 在预期位置出现明显的条带 (73 kD), 与预计大小一致; 含空质粒 pLA 对照未见此条带, 未见目的条带 (图 1), 说明表达的蛋白可被 F41 抗血清所识别。

以含空质粒 pLA 的乳杆菌为对照, 与含重组质粒的干酪乳杆菌一同进行间接免疫荧光试验, 分别用电子显微镜的明视野和绿色荧光进行检测, 试验结果表明, 重组干酪乳杆菌经荧光显微镜检查可见明显的绿色荧光 (图 2-a), 含空质粒 pLA 的乳杆菌未见绿色荧光 (图 2-b)。明视野下可见到与荧光视野下相同的细菌形态, 由此表明, 重组干酪乳杆菌表达了外源融合蛋白 pLA-F41, 同时也初步表明表达的重组蛋白锚定于菌体表面。



M: 蛋白质 marker; 1: 空质粒 pLA 对照 8 h 表达的样品; 2-4: 重组质粒分别在 4、6、8 h 的表达; 5: anti-F41 Western blot 检测结果: pLA-F41 6 h 取样; 6: anti-F41 Western blot 检测结果: 空质粒 pLA 对照 6 h 取样
M: Protein marker; 1: The expression of pLA at 8 h as control; 2-4: The expression of pLA-F41 at 4 h, 6 h, 8 h respectively; 5: anti-F41 Western blot: pLA / *L.casei* at 6 h; 6: anti-F41 Western blot: pLA-F41 / *L.casei* at 6 h

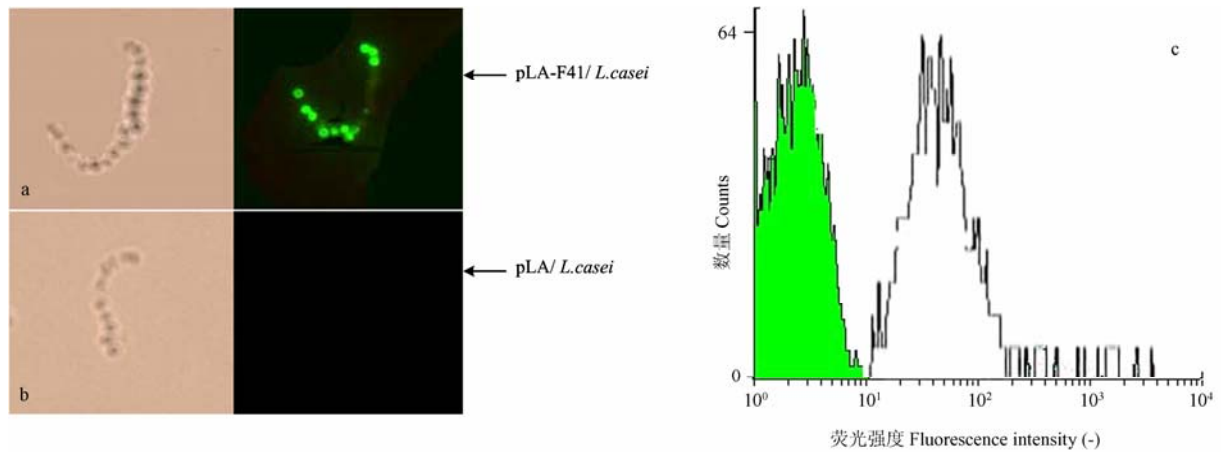
图 1 重组质粒 pLA-F41 在干酪乳杆菌中的表达

Fig. 1 pLA-F41 expression in *L.casei*

流式细胞计量术在数量上分析表面表达的融合蛋白, 含空质粒 pLA 的干酪乳杆菌为与含重组质粒的干酪乳杆菌, 经一抗和二抗标记后进行流式细胞检测分析, 结果表明, 重组干酪乳杆菌的荧光信号强度明显高于含有空质粒 pLA 的干酪乳杆菌阴性对照组 (图 2-c), 结果与免疫荧光检测结果相符, 进一步证明抗原蛋白大量表达在乳杆菌表面。

2.2 重组干酪乳杆菌免疫鼠血清中抗 ETEC F41 特异性 IgG 测定

对滴鼻免疫前和免疫后各时间段断尾采集的血清



a, b 免疫荧光结果, 左边为明视野下的照片, 右边为免疫荧光照片, 在荧光视野下对照组未见绿色荧光而试验组可见明显的绿色菌体形态 (a 右图); c 为流式细胞仪检测直方图, 绿色阴影部分表示 pLA/L. casei 对照的荧光强度, 空白曲线部分为试验组荧光强度, 分别用抗 F41 抗体作为一抗, FITC 标记的抗兔 IgG 作为二抗检测 pLA/L. casei 和 pLA-F41/L. casei
 a, b: Representative immunofluorescence images of standard-type *L. casei* (control) and recombinant *L. casei* cells expressing pLA-F41. Bright-field images are shown on the left. c: Fluorescence-activated cell sorter histograms of *L. casei* (filled) and of the recombinant *L. casei* cells (open). The cells were probed with rabbit anti-F41 polyclonal antibodies, followed by anti-rabbit IgG antibody and fluorescein isothiocyanate-conjugated streptavidin

图 2 免疫荧光和流式细胞仪检测重组蛋白

Fig. 2 Immunofluorescence microscopy and flow cytometry analysis of the recombinant protein

样品进行间接 ELISA 检测, 观测 IgG 抗体消长规律。试验结果表明, 滴鼻实验组 IgG 抗体效价都显著高于相应对照组的抗体效价, 在免疫后的第二周抗体水平呈明显上升趋势 (28 d, $P < 0.01$; 70 d, $P = 0.001$), 而对照组抗体效价始终变化不大 (图 3)。

2.3 重组干酪乳杆菌免疫小鼠抗 ETEC F41 特异性 sIgA 测定

分别于初免后第 56、70 和 84 天采集鼠小肠冲洗液样品, 肺部冲洗液样品及阴道冲洗液样品检测 sIgA

抗体水平, 测定结果如图 4 所示, 在免疫后 70 d sIgA 抗体水平达至最高, 84 d 略有下降。分别于免疫前及初免后每周采集鼠粪便检测 sIgA 抗体水平, 测定结果如图 5 所示, 免疫后的第 14 天即可检出抗体, 与对照组相比呈明显的上升趋势, 随后抗体水平一直升高, 在免疫后 77 d sIgA 抗体水平达至最高, 84 d 略有下降, 但 $P/N > 2.1$ 。

2.4 血清中 ETEC F41 IgA、IgM 和 IgG 抗体亚类的检测

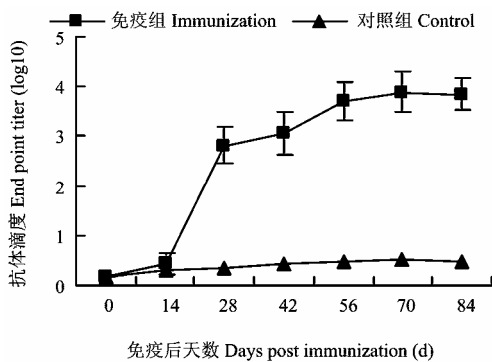


图 3 重组菌 pLA-F41/L. casei 滴鼻免疫小鼠血清中特异性 IgG 水平

Fig. 3 Specific IgG level in serum of mice intranasally immunized with pLA-F4/L. casei recombinant strain

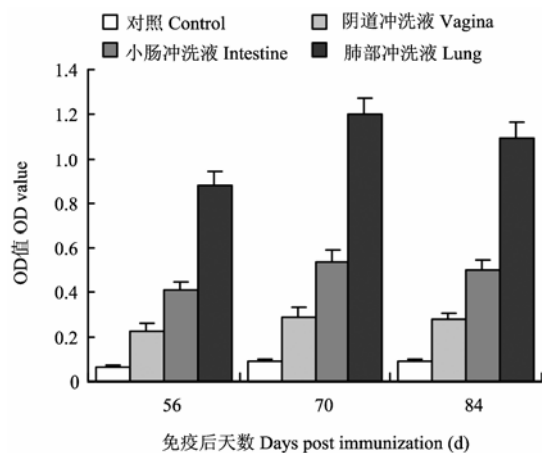


图 4 特异性黏膜 IgA 抗体水平

Fig. 4 Anti-F41 mucosal IgA antibody responses

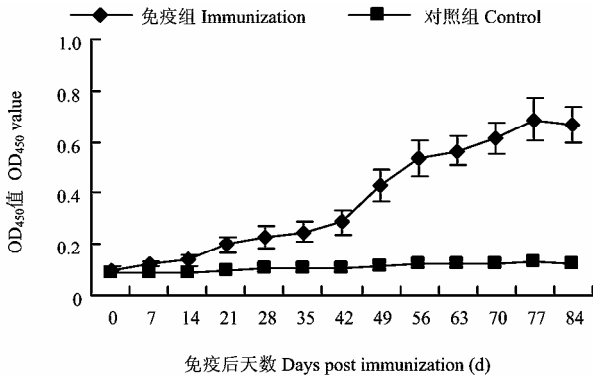


图 5 重组菌 pLA-F41/*L. casei* 滴鼻免疫小鼠，粪便中 F41 菌毛特异性 IgA 水平

Fig. 5 F41 fimbria-specific IgA responses in fecal pellets were induced after intranasal immunization of mice with a single dose of pLA-F41 and pLA vector as control

采集免疫后第 84 天的鼠血清，通过间接 ELISA 检测 IgG 抗体亚类、抗体 IgA 和 IgM，结果表明各实验组产生的 IgG 抗体亚类主要是 IgG1，其次是 IgG2a 和 IgG2b，且各组明显高于对照组。而 IgA 和 IgM 与对照组相比没有明显差别（图 6）。

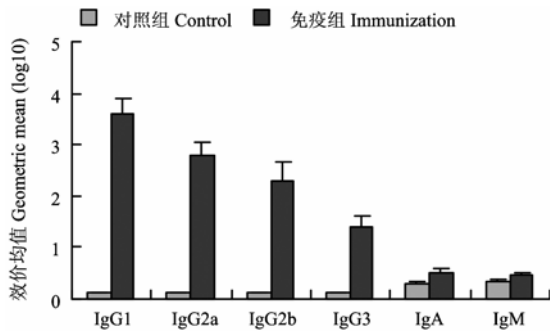


图 6 重组菌 pLA-F4/*L. casei* 免疫小鼠血清中特异性抗 IgG 亚类及 IgA 和 IgM 的检测

Fig. 6 Specific IgA, IgM and IgG subclasses level in serum of mice immunized with pLA-F41/*L.casei* recombinant strain

2.5 小鼠的攻毒保护

2.5.1 主动免疫攻毒保护性试验 分别于末次免疫 3 周和 9 周后进行攻毒，攻毒的剂量 $2 \times 10^3 LD_{50}$ （表 1，表 2），连续观察 20 d，对照组的死亡率为 100%，免疫组的保护率为 100%（末次免疫 3 周后）和 85%

（末次免疫 9 周后），差异均极其显著 ($P < 0.001$)。

2.5.2 新生小鼠被动免疫攻毒保护性试验 小鼠出生后 24 h 喂养母乳，然后按照 $10^3 C83919/10 \mu l$ 的剂量进行攻毒，连续观察 10 d，结果如表 3 所示，来自于免疫组鼠的新生小鼠免疫保护率达 80%，而对照组小鼠保护率为 5%，结果表明 sIgA 能为新生幼鼠预防 ETEC F41 的感染提供被动免疫。

表 1 小鼠 75 d 攻毒免疫保护试验

Table 1 Survival of Balb/c mice immunized with pLA-F41/*L.casei* challenged with C83919 on day 75

	小鼠数量 Number of mice	腹泻小鼠数量 Number of diarrhea mice	死亡小鼠数量 Number of dead mice	保护率 Protection rate (%) *
免疫组 Inoculation	12	0	0	100
对照组 Control	12	12	12	0

“*”用 long rank test 计算保护率。下同

“**”Used long rank test. The same as below

表 2 小鼠 116 d 攻毒免疫保护

Table 2 Survival of Balb/c mice immunized with pLA-F41/*L.casei* challenged with C83919 on day 116

	小鼠数量 Number of mice	腹泻小鼠数量 Number of diarrhea mice	死亡小鼠数量 Number of dead mice	保护率 Protection rate (%)
免疫组 Inoculation	12	2	1	85
对照组 Control	12	12	12	0

表 3 新生小鼠被动免疫攻毒保护性试验

Table 3 Intranasal immunization of Bal b/c female mice with pLA-F41/*L.casei* provided passive immunity to pups orally challenged with C83919

	小鼠数量 Number of mice	腹泻小鼠数量 Number of diarrhea mice	死亡小鼠数量 Number of dead mice	保护率 Protection rate (%)
免疫组 Inoculation	20	4	4	80
对照组 Control	20	19	19	5
未免疫组 Unvaccine	20	19	19	5

3 讨论

产肠毒素性大肠杆菌 (ETEC) 引起的新生幼畜腹泻病，由于其发病范围广、发病率及致死率高，已经严重阻碍了畜牧业的发展，给中国乃至世界的畜禽养

殖业带来了极大的危害,造成了巨大的经济损失。ETEC 通过黏附素性菌毛与小肠黏膜上皮细胞的特异性受体结合而定植于黏膜,这是 ETEC 引起大多数疾病的先决条件。因为 ETEC 的复制主要发生在小肠绒毛上,所以黏膜免疫是本病特异性免疫应答的主要特征,黏膜免疫和其他抗原传输途径相比具有诸如方便、廉价和可以引起局部和系统免疫的优势^[18]。

黏膜是机体抵御病原体的最大门户及首道防线,机体 95%以上的感染发生在黏膜部位,研究细菌、病毒、寄生虫等病原体的黏膜免疫对于防治感染性疾病具有重要意义。黏膜免疫不仅激发产生大量的 sIgA,而且也产生 IgG;在黏膜组织中免疫球蛋白总量的 80%是 IgA,特别是 sIgA,每天随分泌物排泄的 sIgA 可高达 10 g。黏膜抵抗感染的功能主要依赖于 sIgA 的免疫屏障作用。一方面能防止微生物的毒素等小分子的致病因子以扩散或渗透的方式穿越黏膜屏障,另一方面能阻止大分子的致病因子和上皮细胞的受体结合,从而封闭了它们粘附到黏膜上皮细胞、入侵机体的致病途径。黏膜免疫系统是执行局部特异性免疫功能的主要场所。上呼吸道黏膜是机体首先接触大量吸入抗原的部位,鼻黏膜激发的黏膜局部和系统免疫对于防御病原体进入机体至关重要。鼻腔内免疫后除了在上呼吸道黏膜有强免疫应答出现,在下呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道等黏膜也有明显的免疫反应^[19]。目前,口服和鼻内给药是主要的黏膜免疫途径,许多研究也证实这两种摄入途径均能诱导保护性免疫应答。但有研究证实鼻内免疫比口服更有效,因为通过鼻内免疫可提供对多种黏膜致病病原体侵袭的保护,鼻内免疫在降低抗原量、提高使用安全性的同时,又能诱发多部位黏膜及系统免疫反应。鼻黏膜生理环境温和,鼻腔黏膜下层毛细血管丰富,易于抗原的摄取,诱发免疫反应的阈值低^[19],较胃肠道免疫途径更能有效的诱发系统免疫和强而广泛的黏膜免疫^[20-21]。在共同黏膜免疫系统(CMIS)作用下,滴鼻免疫不仅能诱导鼻相关淋巴组织(NALT)免疫应答,而且能诱导全部黏膜相关淋巴组织(MALT)部位及系统的有效免疫应答,因此,滴鼻免疫是更为有效的免疫途径。

由于 ETEC 的免疫保护性是抗体依赖型的^[22],传统的疫苗由于被胃肠道改变了结构而不能提供免疫保护,除非外源抗原(ETEC 菌毛等)不经过修饰直接传递到淋巴系统,才能刺激机体产生黏膜免疫及其系统免疫,本试验利用 pgsA 的锚定机制,将 F41 作为

锚定基展示 F41 来制备基因工程疫苗,从而使目的蛋白 F41 通过 pgsA 展示到干酪乳酸菌表面,把外源抗原不经过修饰直接传递到淋巴系统,产生黏膜免疫及其系统免疫。并且产生了积极的、传统疫苗不可比拟的效果。免疫印迹试验、间接免疫荧光试验和流式细胞术均表明,所表达在乳酸菌表面的外源蛋白能够与 F41 免疫血清发生反应,重组蛋白与 F41 天然抗原一样具有相同的抗原性。

本试验构建的重组干酪乳杆菌,通过建立鼠模型,探讨该重组干酪乳杆菌系统作为活菌疫苗潜在的应用价值。笔者的研究表明,pgsA 膜蛋白能够将外源抗原展示给免疫系统,而且展示在乳杆菌表面的重组融合蛋白滴鼻免疫后,小鼠肺部冲洗液、肠道冲洗液、阴道冲洗液及粪便中均检测到了特异性 sIgA,这可能是由于外源抗原接触鼻黏膜后,由 NALT 部位 M 细胞及树突状细胞加工处理后,激活抗原特异性的 IgA 抗体形成细胞从 NALT 诱导部位迁出,经过血循环或淋巴循环归巢到远处的肠黏膜效应部位或生殖道黏膜,在肠道和生殖道引起特异性免疫应答,与 Cawbxaura 等^[23]的研究结果相符。同时在小鼠血清中也检测到了较高的 IgG 抗体水平,证实活菌疫苗能够诱导试验动物产生明显的系统免疫和黏膜免疫应答。舒翠莉等应用不同免疫途径、不同抗原的试验比较证明,在常规口服剂量 1/20 的小剂量条件下,鼻内免疫既诱发系统 IgA、IgG 免疫反应,又诱导了多部位黏膜的抗体反应^[24-25]。本试验结果同舒翠莉等的结果类似并且支持共同黏膜免疫系统的概念。为了证明攻毒保护性是由于特异性免疫而不是由于宿主器官非特异性细胞免疫反应提供的,末次免疫后 9 周笔者做了同样的攻毒试验,同时被动免疫攻毒结果证明特异性 sIgA 或者 sIgA、IgG 两者能为新生幼鼠提供良好的免疫保护力。在 IgG 亚类的检测中平均生成量 IgG1>IgG2a>IgG2b,初步推测重组菌免疫诱导了偏向 Th2 型免疫反应,确定的话,需要进一步检测外周血中的 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10、IFN- γ 等的浓度,同时血清中 IgA 和 IgM 抗体水平很低,说明免疫保护反应是由胃肠道、肺支气管、生殖系统黏膜部位产生的 sIgA 提供的,这对 ETEC 的防治具有重要的意义^[26-27]。总之,重组干酪乳杆菌滴鼻免疫小鼠获得的黏膜抗体 IgA 和血清抗体 IgG 能为动物机体提供良好的免疫保护力,为抑制 ETEC F41 经肠道黏膜感染进而入侵机体提供了保障。同时为进一步研究黏膜免疫奠定了基础。

4 结论

本研究构建的重组干酪乳杆菌表达系统既可诱导局部黏膜免疫应答, 又可刺激机体产生系统的体液免疫应答, 为 ETEC 的防制和进一步研究黏膜免疫机制奠定了重要的物质基础。

References

- [1] Ashiuchi M, Soda K, Misono H. A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 263: 6-12.
- [2] Ashiuchi M, Nawa C, Kamei T, Song J J, Hong S P, Sung M H. Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *European Journal Biochemistry*, 2001, 268 (20): 5321-5328.
- [3] Ashiuchi M, Misono H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59: 9-14.
- [4] Friedman R S, Frankel F R, Xu Z, Lieberman J. Induction of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8 T-cell responses by *Listeria monocytogenes* and a hyperattenuated *Listeria* strain engineered to express HIV antigens. *The Journal Virology*, 2000, 74: 9987-9993.
- [5] Lee J S, Shin K S, Pan J G, Kim C J. Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 645-648.
- [6] Shata M T, Hone D M. Vaccination with a *Shigella* DNA vaccine vector induces antigen-specific CD8⁺ T cells and antiviral protective immunity. *The Journal Virology*, 2001, 75: 9665-9670.
- [7] Shata M T, Reitz M S, Jr DeVico A L, Lewis G K, Hone D M. Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8⁺ T-cells develop after intragastric vaccination with a *Salmonella* Env DNA vaccine vector. *Vaccine*, 2001, 20: 623-629.
- [8] Mannam P, Jones K F, Geller B L. Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 2004, 72: 3444-3450.
- [9] Robinson K, Chamberlain L M, Schofield K M, Wells J M, Le Page R W F. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 653-657.
- [10] Seegers J F M L. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20: 508-515.
- [11] Shaw D M, Gaerthe B, Leer R J, van der Stap J G M, Smittenaar M C, Heijne den Bak-Glashouwer M J, Thole J E R, Tielen F J, Pouwels P H, Havenith C E G. Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C-expressing lactobacilli. *Immunology*, 2000, 100: 510-518.
- [12] Xin K Q, Hoshino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, Ohba K, Kushiro A, Kiwaki M, Hamajima K, Klinman D, Okuda K. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Immunology*, 2003, 102: 223-228.
- [13] Narita J, Okano K, Kitao T, Ishida S, Sewaki T, Sung M H, Fukuda H, Kondo A. Display of α -amylase on the surface of *Lactobacillus casei* cells by use of the pgsA anchor protein, and production of lactic acid from starch. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 269-275.
- [14] Lee J S, Poo H Y, Han D P, Hong S P, Kim K, Cho M W, Kim E, Sung M H, Kim C J. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *The Journal Virology*, 2006, 80: 4079-4087.
- [15] Nagy G, Dobrindt U, Hacker J, Emödy L. Oral immunization with an rfaH mutant elicits protection against *Salmonellosis* in mice. *Infection and Immunity*, 2004, 72: 4297-4301.
- [16] Duchet-Suchaux M. Protective antigens against enterotoxigenic *Escherichia coli* O101: K99, F41 in the infant mouse diarrhea model. *Infection and Immunity*, 1988, 56: 1364-1370.
- [17] Duchet-Suchaux M, Le Maitre C, Bertin A. Differences in susceptibility of inbred and outbred infant mice to enterotoxigenic *Escherichia coli* of bovine, porcine, and human origin. *Journal of Medical Microbiology*, 1990, 31: 185-190.
- [18] Hou X L, Yu L Y, Liu J Z, Wang G H. Surface displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. *Vaccine*, 2007, 26: 24-31.
- [19] Wu H Y, Russell M W. Induction of mucosal immunity by intranasal application of streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infection and Immunity*, 1993, 61: 314-320.
- [20] Briskin M, Winsor H D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, McEvoy L M, Butcher E C, Kassam N, Mackay C R, Newman W, Ringler D J. Human mucosal addressin cell adhesion molecule is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *American Journal of Pathology*, 1997, 151(1): 97-110.
- [21] Kaspera L, Courretb N, Darchec S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Gatel D B. *Toxoplasma gondii* and mucosal

- immunity. *International Journal for Parasitology*, 2004, 34: 401-409.
- [22] Pascual D W, Hone D M, Hall S, van Ginkel F W, Yamamoto M, Walters N, Fujihashi K, Powell R, Wu S, Vancott J L, Kiyono H, McGhee J R. Expression of recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor antigen I by salmonella typhimurium elicits a biphasic T helper cell response. *Infection and Immunity*, 1999, 67: 6249-6256.
- [23] Cawbxaura J K, Jutila M A, Pascual K W. Nasal-associated lymphoid tissue: Phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naive lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site. *The Journal of Immunology*, 1999, 163: 1382-1389.
- [24] 舒翠莉, 高杰英, 彭虹, 王华, 陈洁, 石辛甫. 双价志贺疫苗滴鼻免疫小鼠后黏膜免疫与系统免疫应答持续时间的观察. *上海免疫学杂志*, 2002, 22(4): 238-240.
- Shu C L, Gao J Y, Peng H, Wang H, Chen J, Shi X F. Observation on the duration of mucosal and systemic immune responses after intranasal immunization of mice with bivalent shigella vaccines. *Shanghai Journal of Immunology*, 2002, 22(4): 238-240. (in Chinese)
- [25] 舒翠莉, 高杰英, 彭虹, 徐辉, 邢丽, 石辛甫. 双价志贺菌苗滴鼻免疫对小鼠 NALT、GALT 和脾淋巴细胞的影响. *上海免疫学杂志*, 2001, 21(4): 199-203.
- Shu C L, Gao Y J, Peng H, Xu H, Xing L, Shi X F. Effect of intranasal immunization with sivalent ahigella vaccine on mouse NALT, GALT and splenic lymphocytes. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2001, 21(4): 199-203. (in Chinese)
- [26] Ada M B A, Marcio O L, Darcy F A, Luis C S F. Immunoglobulin G subclass responses in mice immunized with plasmid DNA encoding the CFA: I fimbria of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Immunology Letters*, 1998, 62: 145-149.
- [27] Murra P D, McKenzie D T, Swain S L, Kagnoff M F. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *The Journal of Immunology*, 1987, 139: 2669-2674.

(责任编辑 林鉴非)