

减毒鼠伤寒沙门菌体内定位分析

张辉¹, 胡茂志^{1,2}, 顾志强¹, 焦新安^{1*}, 耿士忠¹, 张晓明¹, 潘志明¹

(扬州大学,¹江苏省人兽共患病学重点实验室,²测试中心, 扬州 225009)

摘要: 分析减毒鼠伤寒沙门菌口服感染后在小鼠体内定位的情况。将构建的红色荧光蛋白(RFP)原核质粒 pYA33-DsRed, 以电穿孔法转化减毒鼠伤寒沙门菌 X4550, 重组菌命名为 X4550(33-DsRed)。重组菌分别感染巨噬细胞 RAW264.7 和骨髓源树突状细胞(BMDC), 并用流式细胞术检测红色荧光细胞荧光强度。此外, 以不同剂量重组菌口服免疫 BALB/c 小鼠, 并于免疫后 1d、2d、3d、5d、7d 取小鼠脾、肝、肠系膜淋巴结(MLN)、派伊尔氏结(PP)、腹股沟淋巴结(ILN)细胞, 检测各组织器官中的红色荧光阳性细胞百分率。重组菌对 RAW264.7 细胞和 BMDC 均具有良好的侵袭力。口服小鼠后, 第 1d, 仅在 MLN 及 PP 中检测到 RFP 阳性细胞, 其中 PP 中阳性细胞达到 1.4%; 第 2 d, 在 ILN 中达到 0.4%; 第 3 d, 各个组织器官中 RFP 阳性细胞均有上升趋势, 此时在脾、肝中也检测到 RFP 阳性细胞。第 5 d, RFP 阳性细胞均减少, 第 7 d 则未检测到任何 RFP 阳性细胞。减毒鼠伤寒沙门菌具有良好的侵袭力, 其黏膜移行方式以及对免疫组织器官靶向定位性, 在优化黏膜疫苗以及提高疫苗免疫效力等方面都具有重要作用。

关键词: 减毒鼠伤寒沙门菌; 红色荧光蛋白; 定位; 黏膜免疫

中图分类号: Q93, S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0080-05

减毒细菌作为疫苗运送载体的研究已有一定的历史, 其中减毒沙门菌在运送异源抗原的活疫苗载体研究中应用较为广泛。减毒沙门菌作为载体的研究源于伤寒疫苗 Ty21a, 该疫苗株是用于预防人类伤寒病的唯一的注册活疫苗^[1]。在此基础上又对其它伤寒疫苗的候选株进行了进一步的应用, 如伤寒沙门菌 CVD908-htr A 株、Ty800 株、ZH9 株^[2]以及减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207^[3,4]、X4550^[4]等。然而, 减毒沙门菌的侵袭性、定位、到达各免疫器官或组织的时间、以及一些诱导免疫应答的早期事件等都不完全清楚, 而这些因素往往都会影响疫苗的免疫效力。因此, 本文以减毒鼠伤寒沙门菌 X4550 为研究对象, 在体外感染实验中, 证实其对巨噬细胞及 BMDC 具有一定的感染效力; 并进一步在体内实验中, 对其在体内各组织器官中的移行定位进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 原核质粒 pYA3333 (*asd*⁺)、营养缺陷型大肠埃希氏菌 X6212(*asd*⁻)及鼠伤寒沙门菌 X4550(*cya*⁻, *crp*⁻, *asd*⁻, R⁺, M⁺)为华盛顿大学 Dr.Curtiss 博士惠赠^[5]; 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7^[6] (ATCC TIB71)由法国巴斯德研究所的 Dr. Leclerc 惠赠; 质粒 pDsRed 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: DMEM 培养基、DAP (DL-2,6-Diaminoheptanedioic acid)购自 Sigma 公司; RPMI 1640 购自 GBICO 公司。限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自大连 Takara 公司; 重组 GM-CSF 购自 Proptech 公司。BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心。

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30425031); 国家“863 计划”(2006AA10A206); 全国优秀博士学位论文作者专项资(FANEDD200358)

*通讯作者。Tel: +86-514-7979091; Fax: +86-514-7311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: 张辉(1978-), 女, 新疆吐鲁番人, 博士研究生, 主要从事沙门菌免疫学研究。Email: HZ581200@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-05-14; 修回日期: 2007-10-11

1.2 原核表达质粒 pYA33-DsRed 的构建

经 *Nco* 和 *Sal* 从表达 RFP 的原核质粒 pDsRed 中切下编码红色荧光蛋白(简称 RFP)基因, 并用 T4 连接酶将该片段与相应位点酶切的 pYA3333 载体(16 过夜)连接。大肠杆菌 X6212 为 *asd* 基因缺陷性细菌, 培养时需添加 DAP(50mg/L)。重组质粒以 CaCl_2 法转化大肠杆菌 X6212 感受态^[7], 将阳性转化子提取质粒酶切鉴定。

1.3 重组菌的构建

用电穿孔法将重组质粒 pYA33-DsRed 及空载体 pYA3333 导入鼠伤寒沙门菌 X4550, 酶切鉴定, 并经 FACS 检测其红色荧光表达情况, 筛选出阳性转化子, 重组菌分别命名为 X4550(33-DsRed)和 X4550(pYA33)。

1.4 重组菌的准备

挑取新鲜培养的单个菌落接种于 5mL LB 液体培养基中, 置于 37 培养箱中静置培养 12~14h。于次日将细菌经 4 4500 × g 离心 10 min, 弃上清, 用灭菌生理盐水洗涤菌体 2 次, 测定细菌的 OD_{600} 值, 计算出细菌的菌落形成单位(cfu), 4 备用。

1.5 重组菌感染 RAW264.7 细胞系及骨髓源树突状细胞(BMDC)试验

1.5.1 BMDC 的制备: 无菌手术取出小鼠的股骨和胫骨, 用消毒手术剪去除股骨和胫骨两端的关节; 用注射器将完全 RPMI 1640 培养基 [简称 CM, RPMI 1640 中添加 10% 胎牛血清(FCS)、100U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素, 5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇] 注入骨内, 以冲洗出骨髓细胞, 如此重复 3~5 次; 将骨髓细胞移至 15mL 的无菌锥形离心管中, 4 800 × g 离心 10min, 弃上清, 以 CM 悬浮骨髓细胞, 台盼兰染色, 计数活细胞; 用 CM(含 4 μg/L GM-CSF)调节骨髓细胞浓度至 2×10^5 /mL 后, 分装于灭菌培养皿中; 37 , 6% CO_2 全湿润培养; 第 3 天, 向平皿中添加 5mL 新鲜 CM(4 μg/L GM-CSF); 第 6 或第 7 天, 用 10mL 含有 5mmol/L 的 EDTA 的 PBS 作用 5min, 收获 BMDC。将细胞悬液 4 , 800g 离心 10min, 弃上清, 用不含抗生素的 10%FCS RPMI 1640 悬浮细胞, 经台盼兰染色后计数活细胞, 用 10%FCS 不含抗生素 RPMI 1640 调节细胞悬液至适宜浓度, 冰浴, 备用。

1.5.2 重组菌感染 RAW264.7 细胞与 BMDC: 将预先准备好的 BMDC 细胞和 RAW264.7 分别用新鲜的含 10% FCS 的 RPMI 1640 和 DMEM(不含抗生素)悬浮, 并以 2×10^5 /mL 分装于 24 孔板中。将预先准备好的细菌分别添加于 BMDC 和 RAW264.7 细胞中, 感染复数(multiplicity of infection, MOI)分别为 50、

100、200, 同时设立 X4550(pYA33)阴性对照, 37 , 6% CO_2 全湿润培养 1h。吸干培养上清, 用含 100mg/L 庆大霉素的 10% FCS RPMI 1640 和 DMEM 分别洗涤细胞 3 次, 以充分去除胞外细菌, 加入新鲜的上述培养基(含 100μg/mL 庆大霉素), 37 , 6% CO_2 全湿润培养 1h; 弃上清, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 用 0.25%胰酶消化细胞, 并将细胞悬液置于灭菌指形管中, 4 800 × g 离心 10min, 去上清。用 0.1%BSA-PBS 悬浮细胞, 4 800 × g 离心 10min, 洗涤 3 次; 最后用 300 μL 0.1%BSA-PBS 悬浮, 用 400 目铜网过滤细胞, FCM 分析感染后细胞荧光强度。

1.6 重组菌口服免疫体内定位分析

按方法 1.3 制备重组沙门菌 X4550(33-DsRed), 调整细菌浓度至 1×10^{10} cfu/mL, 以 100 μL/只口服免疫 25 只 BALB/c 小鼠; 同时用 X4550(pYA33)作为对照组以相同剂量免疫 25 只 BALB/c 小鼠。在免疫后 1d、2d、3d、5d、7d 分别取小鼠肠系膜淋巴结(Mesenteric lymph node, MLN)、派伊尔氏结(Peyer's patch, PP)及腹股沟淋巴结(Inguinal lymph node, ILN)、脾脏和肝脏, 研磨后过滤(45 μm 筛网), 取各组细胞台盼兰染色后计数细胞, 用 CM 洗涤细胞 3 次, 最终用 0.5%BSA-PBS 将各组细胞调整至 1×10^5 个/200 μL, FACS 检测各组织器官中的 RFP 阳性细胞。

2 结果

2.1 表达质粒 pYA33-DsRed 构建及重组菌的鉴定

将连接产物转化 X6212, 提取质粒酶切鉴定。将鉴定正确的质粒电穿孔转化 X4550, 再次提取质粒酶切鉴定。酶切结果如图 1, 与预期相符, 表明构建正确。

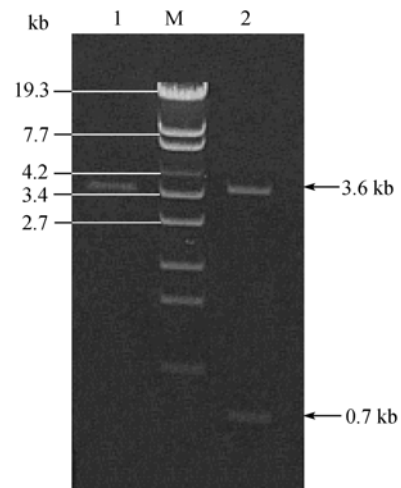


图 1 质粒 pYA33-DsRed 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of plasmid: pYA33-DsRed by restriction endonucleases digestion. M. EcoT14 Marker; 1. pYA33 vector *Nco* ; 2. pYA33-DsRed *Nco* /*Sal* .

2.2 重组菌红色荧光强度检测

将重组菌 X4550(33-DsRed)与 X4550(pYA33) 分别培养过夜, 测定其 OD_{600} 值后, 以相同浓度经 FACS 测定 RFP 表达情况。结果显示, X4550(33-DsRed) RFP 表达良好, 且荧光强度较高 (图 2)。

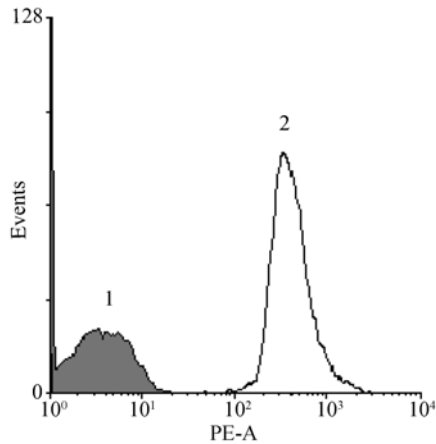


图 2 流式细胞仪测定重组菌荧光强度

Fig. 2 The fluorescence strength of recombinant *Salmonella* strains detected by flow cytometer. 1. X4550(pYA33); 2. X4550(33-DsRed).

2.3 重组菌感染 RAW264.7 细胞、BMDC 结果

重组菌分别以不同 MOI 感染 RAW264.7 细胞 1h 后, 测定感染后 RAW264.7 细胞的红色荧光强度, 红色荧光的强度与重组菌的数量成正比。结果如图 3, 重组菌 X4550(33-DsRed)在以不同 MOI 感染细胞的情况下, 感染率有所不同, MOI 越高, 红色荧光越强, 即感染率与重组菌数成正比。在感染 BMDC 的实验中, 感染趋势与感染 RAW264.7 细胞一致。将重组菌感染两种细胞的结果进行比较, 对于 BMDC 的感染率较 RAW264.7 细胞高。此外, 在 MOI 为 200 时, 对于 BMDC 的感染率达到了 80% 以上。

2.4 重组菌口服小鼠后的体内定位分析

减毒沙门菌能够诱导有效的免疫应答, 但其在体内的移行方式目前还不清楚。本实验中, 将重组菌 X4550(33-DsRed)与 X4550(pYA33) 分别口服感染 BALB/c 小鼠, 并于感染后不同时间分别取脾细胞、肝细胞、MLN 细胞、PP 细胞、ILN 细胞, 通过 PE 通道检测不同来源细胞中的 RFP 阳性细胞。结果如图 4, 第 1d, 仅在 MLN 细胞及 PP 细胞中检测到 RFP 阳性细胞, 其中 PP 中 RFP 阳性细胞达到 1.4%, 而在对照组中未检测到 RFP 细胞。第 2d, 在 ILN 中也检测到 RFP 细胞, 达到 0.4%。在第 3d 的实验中, 各个组织器官中 RFP 阳性细胞均有上升趋势。然而在第 5d, 以上组织、器官中 RFP 阳性细胞

数均减少。至第 7d, 各组织器官中未能检测到任何 RFP 阳性细胞。在实验中, X4550(pYA33)对照组中均未能检测到 RFP 阳性细胞。

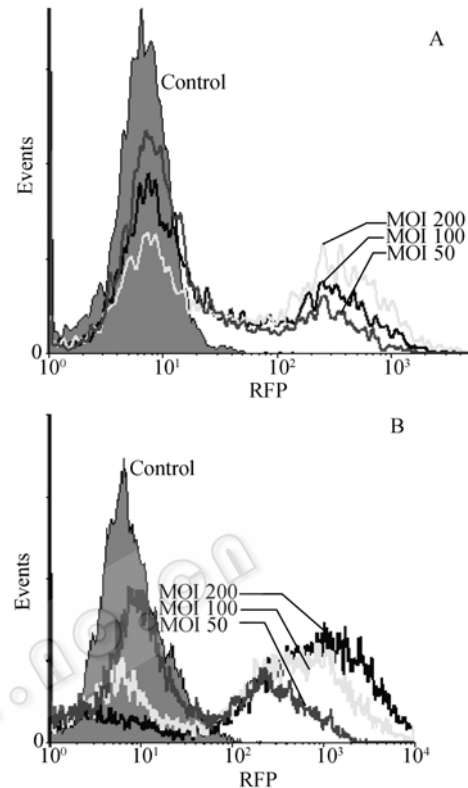


图 3 重组菌以不同 MOI 感染 RAW264.7 细胞和 BMDC 的荧光强度检测结果

Fig. 3 Infection of recombinant *Salmonella* for RAW264.7 cell and BMDC with different MOI. A: RAW264.7 cell infected with X4550(33-DsRed) in different MOI(50, 100, 200); B: BMDC infected with X4550(33-DsRed) in different MOI(50, 100, 200).

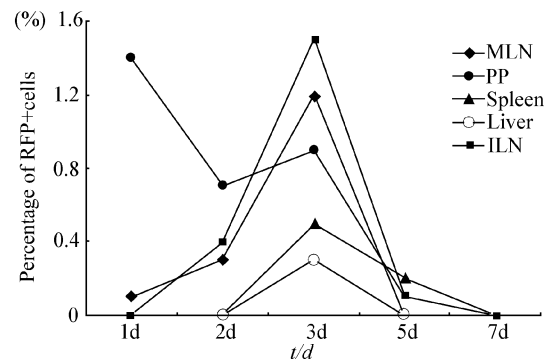


图 4 FACS 检测体内各器官、组织中 RFP 阳性细胞
Fig. 4 Detection of RFP positive cells *in vivo* by FACS.

3 讨论

减毒沙门菌作为口服疫苗载体已为诸多研究者们所青睐, 它不仅能够表达外源的蛋白抗原也可以作为 DNA 疫苗的运送载体, 并诱导以 Th1 型为主的特异性免疫应答, 被认为是最有希望的口服疫苗

载体之一, 因而在众多的候选疫苗载体中具有潜在的应用价值^[9]。然而目前针对减毒菌作为疫苗载体的设想及其优化过程还仅仅处在实验阶段, 因为许多因素往往会影响到运送载体的效率, 如抗原的表达量、重组菌的定位、到达各免疫器官或组织的时间、以及一些诱导免疫应答的早期事件等都不完全清楚, 而这些因素往往都会影响疫苗的免疫效力。

减毒鼠伤寒沙门菌 X4550 为 *asd* 基因缺失型减毒菌, 该基因的缺失可导致细菌的细胞壁合成受阻, 从而使细菌不能生存。当 X4550 与携带 *asd* 基因的原核载体 pYA3333 重组后, 编码天冬氨酸- α -半醛脱氢酶(EC 1.2.1.11)的 *asd* 基因, 可以与缺失型 X4550 互补, 使细菌生长, 这就是 Curtiss 提出的致死平衡系统^[5]。该系统具有良好的诱导体液免疫和细胞免疫应答的能力。本研究以该细菌为研究对象, 构建了表达 RFP 的重组减毒沙门菌, 并以红色荧光来分析重组菌的定位情况以及外源抗原的表达情况。在研究中将重组菌感染了巨噬细胞系 RAW264.7, 经 FACS 检测, 红色荧光强度因 MOI 的升高而增强。此外, 在感染 BMDC 的试验中, 侵袭性也随重组菌数量的上升而增加, 且荧光强度高于相同 MOI 感染的 RAW264.7 细胞的荧光强度, 从而说明减毒沙门菌经重组后仍具有良好的侵袭性。良好的侵袭力不仅可以使重组菌具靶向性, 可以快速被 APC 所识别, 也会提高特异性免疫应答水平。此外, 具有侵袭力的减毒菌还可以避免在体内引起耐受等免疫无应答的产生^[10]。

体内感染实验中, 口服重组菌后, 淋巴细胞、巨噬细胞(M ϕ)、DC 都可能成为重组菌的聚集点和储存库。结果表明, 重组菌可经黏膜到达肠道相关淋巴组织及器官。首先在肠道 PP、MLN 中检测到 RFP 阳性细胞; 至第 3d, 各组织器官中都检测到 RFP 阳性细胞且达到最高值。但随着时间的推移, 重组菌逐渐消失。这一结果说明, 沙门菌经肠道感染后, 其在体内移行过程是经肠道屏障后渗透至周边淋巴组织, 最终到达脾脏及肝脏的。实验中也可能低估重组菌的水平, 因为在沙门菌进入体内后, 往往有部分重组菌会被巨噬细胞、APC 所吞噬而死亡, 从而低估重组菌在体内的数量。

免疫器官、免疫细胞与免疫应答的类型息息相关, 因而了解细菌在体内移行途径对于新型疫苗的研制是非常有利的。鼠伤寒沙门菌为兼性胞内寄生菌, 经口感染后能够穿过肠道上皮细胞屏障, 定植于肠相关淋巴结及肠道黏膜相关组织的细胞中, 而聚集在此的 M ϕ 、DC、单核细胞都能够主动吞噬或

内化沙门菌, 起到抵御作用。然而, 在这些细胞内, 沙门菌也可能通过其自身防御机制抵抗这些细胞的消化作用而存活, 这都是疫苗研究中不可忽略的前提。黏膜疫苗的研究一直以来为众人所关注, 而沙门菌经口感染后移行经多个免疫器官及组织, 并能激发有效的体液、细胞及黏膜免疫应答。沙门菌不同的侵入途径也给我们新的提示, 缺乏侵袭力的沙门菌可诱生全身免疫而不产生黏膜免疫^[11], 因而减毒沙门菌侵袭力的强弱在研究中仍有重要作用。在不同部位, 细菌数量都受到移行中种种因素的影响, 如肠道的正常菌群、胃酸、移行过程中 M ϕ 、淋巴细胞对其的攻击等。因此, 在设计新型疫苗过程中必须考虑如何能够更好的、有效的使外源抗原得以加工、提呈, 诱导有效的保护性免疫应答。定位研究同时也提示, 免疫组织是一个有机体, 需要各个免疫器官的共同作用, 才能产生预期的免疫效果。减毒沙门菌的黏膜移行方式提示, 黏膜接种疫苗将成为一种简单、高效的免疫通道, 然而从目前的研究来看, 单一的免疫途径往往很难达到令人满意的免疫效果, 口服携带保护性抗原的沙门菌一般不能同时活化体内相关免疫通路, 更强的免疫应答需要其它免疫方法的联合使用^[12,13]。因此, 今后的研究必将放在优化重组减毒沙门氏菌疫苗和/或组合几种免疫途径以充分激活体内免疫通路, 从而取得高效、持久的免疫应答。

参 考 文 献

- [1] Marcela FP, Rosangela SG, Marcelo BS. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines delivered intranasally elicit regional and systemic specific CD8⁺ major histocompatibility class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun*, 2002, 70(8): 4009-4018.
- [2] Tacker CO, Sztein MB, Wasserman SS, et al. Phase 2 clinical trial of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi oral live vector vaccine CVD908-htrA in US volunteers. *Infect Immun*, 2000, 68(3): 1196-1201.
- [3] 张辉, 焦新安, 潘志明, 等. 减毒鼠伤寒沙门菌运送 CD8⁺ T 细胞表位的细胞免疫应答. *细胞与分子免疫学杂志 (Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology)*, 2006, 22(2): 137-140.
- [4] 焦凤超, 焦新安, 潘志明, 等. 减毒鼠伤寒沙门氏菌介导的 H5 亚型禽流感病毒 DNA 疫苗的实验免疫效果研究. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 2006, 22(1): 7-10.
- [5] Galan JE, Nakayama K, Curtiss R III. Cloning and molecular characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium* and its use of the stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene*, 1990, 94:

- 29–35.
- [6] Raschke WC, Baird S, Ralph P, *et al.* Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 1978,15(1): 261–267.
- [7] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] Woo PC, Wong LP, Zheng BJ, *et al.* Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, 2001, 19: 2945–2954.
- [9] Sims K, Kevin P, Una S, *et al.* Advances in the development of bacterial vector technology. *Exp Rev Vaccines*, 2003, 2(1): 31–43.
- [10] Darji A, Lage SZ, Garbe A, *et al.* Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 27(4): 341–349
- [11] Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, *et al.* Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 1999,401(6755): 804–808.
- [12] Xiang R, Silletti S, Lode HN, *et al.* Protective immunity against human carcinoembryonic antigen (CEA) induced by an oral DNA vaccine in CEA-transgenic mice. *Clin Cancer Res*, 2001,7(3 Suppl): 856–864.
- [13] Niethammer AG, Primus FJ, Xiang R, *et al.* An oral DNA vaccine against human carcinoembryonic antigen (CEA) prevents growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in CEA transgenic mice. *Vaccine*, 2002, 20(3-4): 421–429.

Localization Analysis of attenuated *Salmonella typhimurium* with oral immunization

Hui Zhang¹, Maozhi Hu^{1,2}, Zhiqiang Gu¹, Xin an Jiao^{1*}, Shizhong Geng¹, Xiaoming Zhang¹, Zhiming Pan¹

(¹Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, ²Testing Center of Yangzhou University, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: To analyze the localization of attenuated *Salmonella typhimurium* after oral immunization. Prokaryotic expression plasmid pYA33-DsRed, carrying the RFP gene, was constructed and electro-transformed into an attenuated strain X4550 of *Salmonella typhimurium*, the recombinant bacteria were named as X4550(33-DsRed). The macrophage cell line RAW264.7 and bone marrow dendritic cell (BMDC) were invaded by X4550(33-DsRed) *in vitro*. Furthermore, BALB/c mice were immunized with recombinant bacteria orally. RFP positive cells (RFP⁺ cells) were detected by Flow Cytometry (FCM) from spleen, liver, Mesenteric lymph node (MLN), Peyer's patch (PP), Inguinal lymph node (ILN). The invasion rate increased when the multiplicity of infection(MOI) were improved in this two kinds of cells respectively. After oral immunization with X4550(33-DsRed), RFP⁺ cells were detected by FCM on 1d, 2d, 3d, 5d, 7d in spleen, liver, MLN, PP, ILN cells. The first day, RFP⁺ cells were detected in MLN and PP, and in PP at a higher rate of 1.4% than that of MLN. 0.4% RFP⁺ cells were detected the next day in ILN. On 3th day, the rates of RFP⁺ cells were increased in all of above tissues or organs and decreased on the 5th day. At the 7th day, RFP⁺ cells couldn't be detected in all tissues or organs tested. It is suggested that the invasion ability and the transfer through mucosal pathway and targeting to recognize immune tissue or organs are favor of the research in mucosal vaccine and the vaccine efficiency.

Keywords: Attenuated *Salmonella typhimurium*; RFP; immunity