

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(2) 269-273; 4 February 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## $\gamma$ -辐射与常规方法灭活产单核细胞李斯特菌对小鼠免疫原性的比较

董慧, 焦新安\*, 潘志明, 殷月兰, 孙林, 刘松婷

(扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009)

**摘要** 【目的】以产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)为模式菌, 比较 $\gamma$ -辐射及常规的热灭活、甲醛灭活制备的灭活李斯特菌对小鼠的免疫原性。【方法】以 $\gamma$ -辐射、热灭活和甲醛灭活法分别制备灭活的LM; 腹腔注射BALB/c小鼠, ELISA检测各组灭活菌产生的抗体水平, 观察野生型LM攻击后各组的保护效果, 动态监测体内带菌情况, 流式细胞仪分选免疫小鼠T细胞, 以T细胞转移实验评价辐射灭活的LM产生的免疫应答。【结果】辐射灭活组、热灭活组和甲醛灭活组产生的抗体水平分别为: 1:1280, 1:640, 1:160; 野生型细菌攻击后这3种灭活菌产生的保护率分别为: 100%、35%、30%, 其中免疫辐射灭活菌的小鼠能够较快清除攻击的细菌, 辐射灭活李斯特菌能够激发产生T细胞保护性免疫应答。【结论】较之传统的灭活方法, 利用 $\gamma$ -辐射制备的灭活LM免疫小鼠后能够产生较好的保护效果。

**关键词**: 产单核细胞李斯特菌;  $\gamma$ -辐射; 灭活菌

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)02-0269-05

疫苗在预防和控制疫病中发挥着重要作用, 在种类繁多的疫苗中, 灭活苗无疑是最经典、最快捷、最简单的, 也是最有可能获得突破的一种。制备灭活苗的常规方法是: 甲醛灭活和热灭活。通过这两种方法研制出的灭活疫苗不足之处在于: 破坏了病原体表面的一些保护性抗原, 激发的保护性免疫主要以体液免疫为主, 不产生或仅产生较弱的细胞免疫和黏膜免疫应答<sup>[1]</sup>。

辐射灭活是制备灭活苗的一种新理念, 它是指利用强力 $\gamma$ 射线彻底摧毁病原体的遗传因子, 起到杀死病原体但不破坏病原体的抗原组分的作用<sup>[2]</sup>。较之于传统的热灭活和甲醛灭活, 其优点可能在于: 保留了病原体表面的保护性抗原成分, 能够激发T细胞保护性免疫应答<sup>[3]</sup>。这些优点在研制针对某些

胞内病原体的灭活疫苗时显得尤为重要。

产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种革兰氏阳性、兼性胞内寄生的食源性致病菌, 是人兽共患李斯特菌病的病原<sup>[4]</sup>。自1926年Murray等<sup>[5]</sup>首次报道李斯特菌病以来, 此病已陆续在许多国家发生<sup>[6]</sup>。WHO将LM定为20世纪90年代四大食源性病原菌之一, 因此对LM的研究具有重要的公共卫生意义。另外, LM是公认的研究宿主和胞内病原体相互作用的模式菌<sup>[7]</sup>, 对LM感染机制的研究建立了细胞免疫学上的许多里程碑<sup>[8]</sup>。已有研究表明热灭活LM不能够激发T细胞保护性免疫应答<sup>[9]</sup>。因此, 本研究选取LM为模式菌, 探讨辐射灭活法制备灭活疫苗候选株的可行性。

基金项目: 国家973项目(2006CB504404), 国家杰出青年科学基金(30425031), 国家科技支撑计划资助项目(2007BAD40B01)

\* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-7311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: 董慧(1980-), 女, 江苏扬州人, 博士研究生, 主要研究微生物致病。E-mail: manlidong80@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-08-21; 修回日期: 2008-10-24

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和实验动物** :产单核细胞李斯特菌血清型 1/2a 型菌株 LM-4 由江苏省人兽共患病学重点实验室分离保存。6~8W 雌性 BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心。

**1.1.2 主要试剂和仪器** :RPMI1640 购自 GIBCO 公司, Brain Heart Infusion (BHI) 购自 BD 公司。XL-30ESEM 环境扫描电子显微镜为 PHILIPS 公司产品, FACS Aria 流式细胞仪为 BD 公司产品。

### 1.2 细菌准备

LM 于 BHI 中培养至对数生长期, 离心收获菌体, 调整细菌浓度至  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL。

### 1.3 细菌灭活

**1.3.1 辐射灭活** :新鲜制备的细菌样品送扬州大学辐照中心以  $^{60}\text{Co}$  辐射源照射, 剂量为 400 Krad。

**1.3.2 热灭活** :新鲜制备的细菌样品于  $70^\circ\text{C}$  水浴 30 min。

**1.3.3 甲醛灭活** :新鲜制备的细菌样品中加入 0.2% 甲醛溶液,  $37^\circ\text{C}$  作用 24 h, 其间需多次混匀。

**1.3.4 无菌检验** :于灭活后的细菌样品中各取  $100 \mu\text{L}$  (即  $1 \times 10^9$  CFU) 分别接种液体 BHI 培养基, 涂布 LB 平板,  $37^\circ\text{C}$  培养 48 h, 观察有无细菌生长。

### 1.4 扫描电镜观察细菌形态

相同浓度野生型 LM、辐射灭活 LM 以 2.5% 戊二醛固定 2.5 h, PBS 洗涤; 1% 锇酸固定 1 h, 洗涤; 40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇梯度脱水, 共 60 min; 95%、100% 乙醇脱水各 20 min; 100% 乙醇与 100% 丙酮的混合液作用 10 min, 洗涤; 100% 丙酮作用 20 min, 加入 100% 丙酮与 100% 乙酸异戊酯, 充分洗涤后以 100% 乙酸异戊酯保存, 金属离子溅射仪镀膜后, 扫描电镜观察。

### 1.5 动物实验

**1.5.1 动物分组及免疫接种** :将 6~8W 雌性 BALB/c 小鼠随机分成五组, 分别为活菌组、辐射灭活组、热灭活组、甲醛灭活组和阴性对照组, 每组 24 只小鼠。于第 0、7 天时分别腹腔注射野生型 LM、辐射灭活 LM、热灭活 LM、甲醛灭活 LM 及灭菌 PBS。注射剂量分别为  $1 \times 10^3$  CFU/只、 $1 \times 10^9$  CFU/只、 $1 \times 10^9$  CFU/只、 $1 \times 10^9$  CFU/只和 0.1 mL/只。

**1.5.2 血清中抗体效价的测定** :各组小鼠分别在一免后一周, 二免后两周、三周眼眶静脉采血, 制备血清, 间接 ELISA 测定  $OD_{490}$  值。以  $P/N \geq 2.1$  判定阳性, 以能满

足  $P/N \geq 2.1$  的抗体最大稀释倍数的倒数作为抗体的效价, 结果用 SPSS11.5 软件进行统计分析。

**1.5.3 保护性实验** :二免后第 21 天各组小鼠腹腔注射野生型 LM, 剂量为  $2.5 \times 10^6$  CFU/只<sup>[10]</sup>, 连续观察 14 d, 记录攻击后各组小鼠死亡情况, 计算免疫保护率, 结果用 SPSS11.5 软件进行统计分析。

**1.5.4 感染动力学实验** :攻击后 1、3、5、7、9、13 d 每组各扑杀 2 只小鼠, 无菌分离脾脏、肝脏, 称重、研磨。取适当稀释倍数的组织悬液涂布 LB 平板,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h, 计算菌落数。

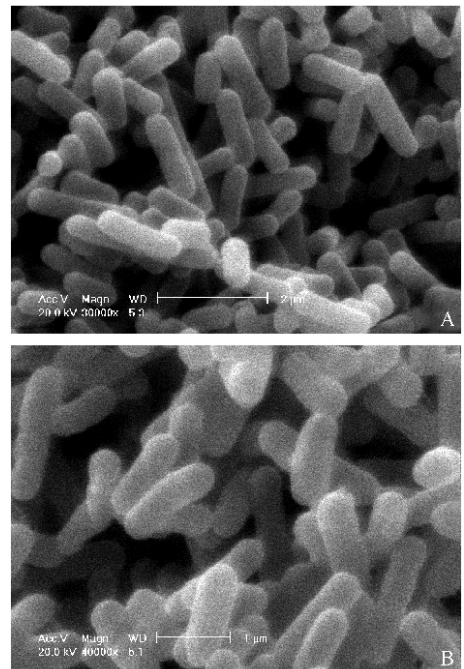
### 1.6 T 细胞转移实验

二免后两周无菌分离 PBS 免疫鼠、辐射灭活 LM 免疫鼠脾脏, 分别制成单细胞悬液, 以荧光标记的 CD3 单抗染色,  $4^\circ\text{C}$  作用 30 min, 流式细胞仪分选其中 T 细胞。受体 BALB/c 小鼠尾静脉注射相同数量 T 细胞。同时腹腔接种  $2.5 \times 10^6$  CFU 野生型 LM。3 d 后扑杀受体小鼠, 无菌分离心脏、肝脏、脾脏, 称重、研磨。取适当稀释倍数的组织悬液涂布 LB 平板,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h, 菌落计数。

## 2 结果

### 2.1 扫描电镜图片

电子扫描显微镜照片如图 1 示。与活菌相比, 经  $^{60}\text{Co}$  辐照后的细菌表面未出现明显的结构损伤。



1 扫描电镜观察活的 LM 形态 (A, 30000 $\times$ ) 和辐射灭活 LM 的形态 (B, 40000 $\times$ )

Fig.1 Scanning electron micrograph of live LM (A, 30000 $\times$ ) and  $\gamma$ -irradiated LM (B, 40000 $\times$ ).

## 2.2 免疫后血清中抗体效价测定

对一免后一周,二免后2、3周各试验组的血清样品进行测定,结果如表1所示。辐射灭活LM免疫BALB/c小鼠后能产生较高的抗体水平,达到1:1280,显著高于其他两种灭活LM产生的抗体水平( $P < 0.05$ ),同时也显著高于活菌免疫后产生的抗体效价( $P < 0.05$ )。由此说明辐射灭活后细菌保留了较好的免疫原性。

表1 各实验组产生的抗体水平

Table 1 The antibody level in different groups

| Group                   | Titers of antibodies in serum |                  |                  |
|-------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
|                         | 1W post-priming               | 2W post-boosting | 3W post-boosting |
| $\gamma$ -irradiated LM | 1:640bc*                      | 1:1280bc         | 1:1280bc         |
| heat-killed LM          | 1:160b                        | 1:640b           | 1:640b           |
| formalin-killed LM      | 1:80a                         | 1:160a           | 1:160a           |
| live LM                 | 1:160b                        | 1:640b           | 1:640b           |
| negative control        | 0                             | 0                | 0                |

\* Different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ , i.e. the titers in the groups marked with b and c were significantly higher than in the groups with a and b, respectively.

## 2.3 保护性实验

野生型细菌攻击后第2天部分小鼠开始出现精神沉郁、活动减少现象,第4天开始除辐射灭活组和活菌组外,其他试验组均有小鼠死亡。其中阴性对照组死亡时间最为集中,高峰期在攻击后第2~7天。活菌组和辐射灭活组部分小鼠攻击后出现发病现象,但迅速耐过恢复正常(图2)。

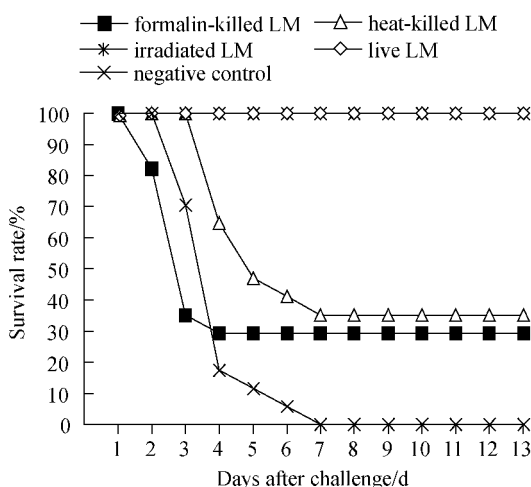


图2 攻击后各组小鼠的存活率

Fig. 2 Survival rate of mice after challenge in different groups.

免疫保护性试验结果如表2所示,不同灭活方法制备的灭活LM免疫小鼠后产生的保护效果存在着较大的差异。其中辐射灭活苗免疫后能够完全抵抗高剂量野生型细菌的攻击,产生的保护率高达

100%,显著高于通过热灭活和甲醛灭活的方法制备的灭活LM产生的保护率(分别为35%、30%)( $P < 0.05$ )。

表2 对BALB/c小鼠的免疫保护结果

Table 2 The protective efficacy for BALB/c mice

| Group                   | Number of mice | Number of survivors | Number of dead | Protective rate/% |
|-------------------------|----------------|---------------------|----------------|-------------------|
| $\gamma$ -irradiated LM | 17             | 17                  | 0              | 100*              |
| heat-killed LM          | 17             | 6                   | 11             | 35                |
| formalin-killed LM      | 17             | 5                   | 12             | 30                |
| live LM                 | 17             | 17                  | 0              | 100*              |
| negative control        | 17             | 0                   | 17             | 0                 |

\* denotes significant difference compared with corresponding heat-killed LM group and formalin-killed LM group ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 感染动力学实验

野生型LM攻击后第1、3、5、7、9、13天每组各扑杀2只小鼠,观察脾脏、肝脏中的细菌携带情况(图3)。各试验组小鼠攻击后脾脏中细菌携带情况:阴性对照组带菌数目最多,活菌组与辐射灭活组带菌数随时间迅速下降,至第5天脾脏中已分离不到细菌。热灭活组和甲醛灭活组排菌速度较慢,分别于第9天、第13天达到无菌状态。各试验组小鼠肝脏中细菌携带情况:阴性对照组带菌数目最多,活菌组带菌数随时间迅速下降,至第5天组

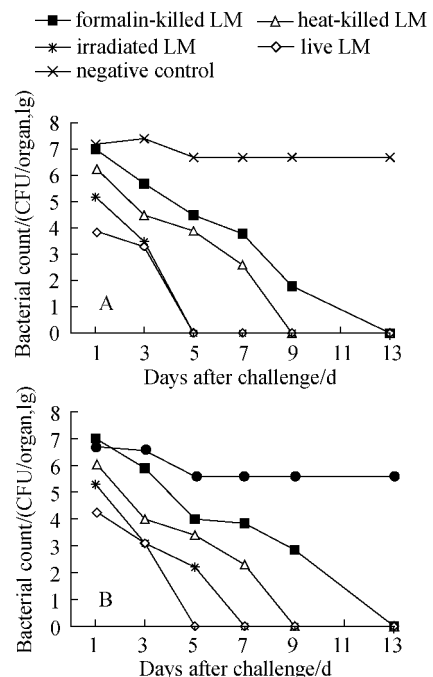


图3 野生型细菌攻击后小鼠脾脏(A)和肝脏(B)中带菌情况

Fig. 3 The CFU burden in the spleen(A) and liver(B) of immunized mice after challenge.

织达到无菌, 辐射灭活组排菌稍慢, 至第 7 天组织达到无菌; 热灭活组和甲醛灭活组分别至第 9 天、第 13 天达到无菌状态。

### 2.5 T 细胞转移实验

较之于对照小鼠, 尾静脉注射了辐射灭活苗免疫鼠 T 细胞的小鼠攻毒后体内细菌携带量明显减少 (图 4)。对照小鼠脾脏、肝脏、心脏中带菌量分别为  $2 \times 10^7$  CFU、 $7.8 \times 10^6$  CFU、 $5.7 \times 10^3$  CFU。实验组小鼠脾脏、肝脏、心脏中带菌量分别为  $5.5 \times 10^5$  CFU、 $6.6 \times 10^4$  CFU、 $2 \times 10^1$  CFU。实验结果表明注入的 T 细胞使小鼠对李斯特菌的攻击产生了一定的抵抗能力, 说明辐射灭活菌能激发 T 细胞保护性免疫应答。

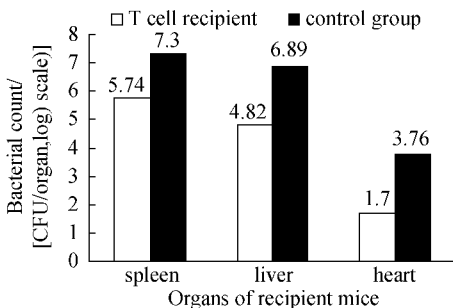


图 4 野生型细菌攻击后受体小鼠体内细菌携带情况

Fig. 4 The CFU burden in the T cell recipients after challenge.

## 3 讨论

利用  $\gamma$ -辐射灭活或减毒病原体制备相关疫苗的报道多见于寄生虫方面<sup>[11-12]</sup>, 应用于细菌等其他病原体的报道较少。本研究以产单核细胞李斯特菌 LM 为模式菌, 从抗体生成水平、保护率水平以及体内细菌清除速度等方面综合评价辐射灭活的优越性。从抗体生成水平来看, 相同剂量的灭活 LM 注射小鼠后, 辐射灭活 LM 产生的抗体水平最高, 是甲醛灭活 LM 的 8 倍、热灭活 LM 的 2 倍, 说明不同灭活方式对细菌抗原组分的破坏程度不同, 辐射灭活的方法可能对细菌表面抗原破坏较少, 从而免疫小鼠后能引发较高水平的体液免疫应答。为进一步提供有力的佐证, 我们利用扫描电子显微镜观察野生型 LM 和辐射灭活 LM 的表面结构, 结果显示辐射灭活 LM 无任何明显的结构损伤。

在免疫保护实验中, 高剂量野生型 LM 攻击后各组小鼠均出现精神沉郁、活动减少、毛发凌乱等现象, 其中甲醛灭活组、热灭活组小鼠大批死亡, 而辐射组小鼠能够迅速耐过、恢复正常状态, 同时表现在体内排菌速度上, 相同时间内辐射组小鼠体内带菌量低于其余灭活组, 从攻击后第 5 天开始, 体内已分离不出细菌。这些结果从一定程度上显示了辐射灭

活法的优越性。甲醛灭活是常规的疫苗灭活方法, 并且广泛使用。但是在本研究中, 甲醛灭活 LM 产生的保护效果远远低于辐射灭活 LM, 这可能是由于甲醛破坏了 LM 细菌表面的一些重要抗原和佐剂分子的结构, 从而影响其免疫原性。

通过 T 细胞转移实验, 我们证实了辐射灭活 LM 能够产生 T 细胞保护性免疫应答。而一直以来, 人们普遍认为, 只有活 LM 通过感染宿主细胞并且利用 LLO 进入到细胞质内, 才能够引起免疫应答<sup>[10]</sup>。目前, 大多数的灭活疫苗通过激发体液免疫应答来发挥作用, 但是针对胞内病原体如: 结核杆菌、HIV 等的有效疫苗, 不仅要能激发体液免疫应答, 更重要的是能够引起持久的细胞免疫应答<sup>[13]</sup>。辐射法制备灭活苗恰恰符合这一要求, 这种方法可能被运用于制备针对胞内病原体的疫苗。

本研究通过动物实验证实, 较之于传统的热灭活、甲醛灭活, 利用  $\gamma$ -辐射制备 LM 灭活菌苗的优越性, 其中具体的免疫机制还需要更多的工作去探讨。 $\gamma$ -辐射灭活法是否适用于其他种类的细菌甚至其他的病原体, 也需要大量的实验去验证。但是不能否认, 如果能够证明辐射灭活法是一种制备全病原体灭活苗的安全有效的策略, 那么将大大减少用于构建、筛选基因减毒疫苗, 或者是寻找亚单位疫苗中抗原表位的时间和资源。尤其是在应对疫病暴发流行、生物恐怖等突发事件时, 辐射法制备灭活苗的方便快捷将发挥重要作用。

## 参考文献

- [1] Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine* 2005, 11(4): S5-S11.
- [2] Eisenberg GH, Osterman JV. Gamma-irradiated scrub typhus immunogens: development and duration of immunity. *Infection and Immunity*, 1978, 22(1): 80-86.
- [3] Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 2004, 126(2): 520-528.
- [4] Fiedler F, Seger J, Schrettenbrunner A, et al. The biochemistry of murein and cell wall teichoic acids in the genus of *Listeria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1984, 3(3): 360-376.
- [5] Murray E, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits of characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 1926, 29: 209-439.

- [ 6 ] Swaminathan B , Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Micobes and Infection* 2007 9( 10 ) :1236 - 1243.
- [ 7 ] Hanhn H , Kaufmann SHE. The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Reviews of Infectious Diseases* ,1981 3 :1221 - 1250.
- [ 8 ] Shen H ,Tato CM ,Fan X. *Listeria monocytogenes* as a probe to study cell-mediated immunity. *Current Opinion in Immunology* ,1998 ,10( 4 ) :450 - 458.
- [ 9 ] Brocke S ,Hahn H. Heat-killed *Listeria monocytogenes* and *L. monocytogenes* soluble antigen induce clonable CD4 + T lymphocytes with protective and chemotactic activities in vivo. *Infection and Immunity* ,1991 ,12( 59 ) :4531 - 4539.
- [ 10 ] Datta SK ,Okamoto S ,Hayashi T ,et al. Vaccination with irradiated *Listeria* induces protective T cell immunity. *Immunity* 2006 25( 1 ) :143 - 152.
- [ 11 ] Ramamoorthy S ,Lindsay DS ,Schurig GG et al. Vaccination with gamma-irradiated *Neospora caninum* tachyzoites protects mice against acute challenge with *N. caninum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 2006 53( 2 ) :151 - 156.
- [ 12 ] Bain RK. Irradiated vaccines for helminth control in livestock. *International Journal for Parasitology* ,1999 ,29 ( 1 ) :185 - 191.
- [ 13 ] Robinson HL , Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nature Medicine* 2005 ,11( 4 ) :S25 - S32.

## Immunogenicity comparison of *Listeria monocytogenes* inactivated by Gamma-irradiation or traditional treatments

Hui Dong ,Xin 'an Jiao\* , Zhiming Pan ,Yuelan Yin ,Lin Sun ,Songting Liu

( Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis ,Yangzhou University ,Yangzhou 225009 ,China )

**Abstract [ Objective ]** *Listeria monocytogenes* ( LM ) is a gram-positive facultative intracellular pathogen that can cause animal and human listeriosis. In order to use killed LM in vaccination ,we compared in a mouse model ,the immunogenicity of LM that were lethally inactivated by  $\gamma$ -irradiation ,traditional heat or formalin treatment. **[ Methods ]** BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with these killed vaccine candidates. We detected the serum antibody titers with indirect enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) and evaluated the protective efficacy of each vaccine candidates by the resistance to lethal dose challenge of homologous live LM and the effect of bacterial elimination in the spleen and liver of immunized mice. Adoptive transfer of Flow Cytometry sorted T splenocytes from immunized mice to naïve recipients ,subsequently challenged with high dose of LM ,we determined the possible role of T cell. **[ Results ]** The serum antibody level of mice inoculated with  $\gamma$ -irradiated LM was the highest up to 1 :1280 as determined by ELISA ,while the level of mice immunized with heat-killed or formalin-killed LM was 1 :640 or 1 :160 ,respectively. The protective efficacy of  $\gamma$ -irradiated ,heat-killed or formalin-killed vaccines candidates were 100% ,35% or 30% . As judged by the bacterial elimination in the organs ,mice inoculated with  $\gamma$ -irradiated LM were the most efficiently protected group. Adoptive T cell transfer assay showed that  $\gamma$ -irradiated LM can trigger T cell protective immune response. **[ Conclusion ]** All the results indicated the superiority of  $\gamma$ -irradiation over traditional heat or formalin treatment in generating LM killed vaccine candidate.  $\gamma$ -irradiation may be applied to numerous bacterial vaccine candidates ,and could have important potential in development of killed vaccines.

**Keywords :** *Listeria monocytogenes* ;  $\gamma$ -irradiation ; killed bacterial

( 本文责编 :王晋芳 )