

表达 ETEC F41 重组干酪乳杆菌口服及滴鼻免疫效果的比较

刘建奎¹, 魏春华¹, 侯喜林¹, 王桂华², 余丽芸^{1,2*}

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

摘要 【目的】比较小鼠滴鼻与口服接种 ETEC F41 重组干酪乳杆菌后, 机体所产生的抗 ETEC F41 的黏膜免疫和系统免疫及免疫保护率的差异, 为确定 ETEC 乳酸菌疫苗免疫程序奠定基础。【方法】将构建的重组质粒 pLA-F41 电转化入干酪乳杆菌, 获得阳性重组菌。重组菌在 MRS 培养基中进行表达, 经 Western blot 检测目的蛋白的表达, 间接免疫荧光及流式细胞术检测外源蛋白展示到菌体表面。SPF 级 BALB/c 小鼠随机分成 4 组, 每组 40 只, 将重组菌以滴鼻和口服途径分别接种 2 组小鼠, 对照组分别接种同剂量的空质粒菌株, 免疫 4 次, 初免后不同时间采集血液样品, 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, 并对主动免疫和被动免疫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 IgG 和 sIgA 抗体水平, 口服主动免疫组保护率在 90% 以上, 滴鼻主动免疫组保护率在 85% 以上, 对照组均全部死亡。口服被动免疫组保护率达 90%, 滴鼻被动免疫组保护率达 80%, 对照组保护率均为 5%。【结论】滴鼻免疫和口服免疫重组干酪乳杆菌后能产生相近的抗 ETEC F41 的黏膜免疫和系统免疫并能有效预防 ETEC F41 的感染。

关键词: ETEC F41; 滴鼻免疫; 口服免疫; 干酪乳杆菌; 保护率

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0524-07

乳酸菌是人与动物肠道中常见的菌, 被公认为安全级 (generally recognized as safe, GRAS) 微生物^[1-5], 不仅具有抗酸碱的能力, 而且具有免疫佐剂的功能^[6], 可提高某些免疫活性因子如 IL-2、TNF- α 、INF 的分泌, 吸附黏膜^[7-8], 同时具有使动物肠道黏膜底层细胞增加, 使免疫细胞吞噬功能增强, 加强宿主肠黏膜免疫, 诱导 sIgA 分泌而增强肠道免疫屏障等作用, 本身具有低免疫原性、安全、方便、廉价等特点。以其作为表达外源保护性抗原基因的受体菌株, 就可以将乳酸菌的生物学功能和外源功能抗原基因的特异性免疫相结合^[9]。作为乳酸菌成员之一的干酪乳杆菌在胃肠道、泌尿、生殖系统中等粘膜部

位粘附存活且无病原性等特点, 开展活菌口服疫苗研究, 受到了广泛的重视。

我们采用了一种新型的表面展示系统, 利用多聚谷氨酸跨膜蛋白 pgsA 的锚定机制^[10-12], 将外源蛋白 F41 不经过修饰直接传递到淋巴系统, 刺激机体产生黏膜免疫及其系统免疫。通过口服 (oral) 和滴鼻 (i.n) 两种途径免疫 SPF 级 BALB/c 小鼠, 定期检测血清中特异性 IgG 抗体水平和小鼠肺部、肠道、阴道冲洗液及粪便中 ETEC F41 特异性 sIgA 抗体水平, 并对免疫的小鼠和被动免疫的新生幼仔攻以 F41 标准菌株 C83919, 初步检测其免疫保护力, 为进一步研制乳酸菌活疫苗奠定基础。

基金项目: 国家人事部留学回国人员科技项目; 黑龙江省农垦总局攻关课题 (HNKXLTV-08-06-03, HNKXIV-08-07); 大庆市攻关课题 (SGG2006-011)

* 通信作者。Tel: +86-459-6819292; Fax: +86-459-6819290; E-mail: xly_hou@yahoo.com.cn

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: jkzkz1015@163.com

收稿日期: 2008-11-17; 修回日期: 2008-12-14

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料、菌株和质粒:牛源 ETEC F41 标准菌株 C83919 由黑龙江八一农垦大学基因工程实验室保存;重组质粒 pLA-F41,干酪乳杆菌及兔抗 F41 多克隆抗体(一抗),均由黑龙江八一农垦大学基因工程实验室制备并保存;6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,购自北京维通利华动物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:电穿孔仪,美国 BIO-RAD 公司;荧光显微镜,德国 Lecia 公司;流式细胞仪,法国 BECTON DICKINSON 公司;A-5082 型酶标仪,奥地利 Tecan 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 MRS 培养基, 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 重组质粒的构建

将纯化得到的不含信号肽的 F41 菌毛蛋白基因片段连接到 pHCE1LB-pgsA^[13]上得到的重组质粒命名为 pLA-F41。按照 Aymerich 等^[14]方法制备 *L. casei* 感受态细胞,将重组质粒及空载体对照在 2.2 kV、100 Ω 、25 μ F 的电击条件下转化,电击时间约为 4 ms,将转化子涂布于 MRS 固体培养基(含氯霉素 10 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h,挑选菌落,按照 Ian B. Powell 等^[15]方法从乳酸杆菌中提取质粒 DNA,PCR 鉴定阳性克隆。

1.3 目的蛋白在干酪乳杆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 $^{\circ}$ C 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 3500 \times g 离心 5 min,菌体沉淀用 10 mg/mL 的溶菌酶 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 40 min,3500 \times g 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,通过 Western blot 检测目的蛋白的表达及间接免疫荧光和流式细胞术的检测目的蛋白在乳酸菌表面的锚定^[16]。

间接免疫荧光检测:取表达 6 h 后的阳性重组菌和空载体对照菌液 1 mL,离心去上清后,PBS 洗涤 3 次,重悬于 PBS 中,取适量涂片,95% 冷乙醇室温固定 30 min,5% 脱脂乳室温封闭 1 h,PBS 洗 3 次,于被检标本上滴加兔源抗 F41 血清抗体,置于湿盒中,37 $^{\circ}$ C 感作 1 h,PBS 洗 3 次,滴加 FITC 标记的抗兔荧光二抗(1:100 稀释),置于湿盒中,室温感作 2 h

(避光),PBS 洗 3 次,最后用蒸馏水洗 1 次,甘油缓冲液封片后镜检。

流式细胞检测分析:取表达 6 h 后的阳性重组菌和空载体对照菌,用 300 目筛网过滤,4 $^{\circ}$ C,3500 \times g 离心 5 min 收集菌体,PBS 洗 2 次,重悬于 PBS 中,使菌体数达到 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ CFU/mL,加入 5% BSA 的 PBS 室温封闭 1 h,PBST 洗 3 次,加入兔源抗 F41 血清室温作用 2 h,PBST 洗 3 次,加入 FITC 标记的抗兔荧光二抗 4 $^{\circ}$ C 作用 2 h,PBST 洗 3 次,悬于 PBS 中在流式细胞仪下检测。

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 40 只随机分成 4 组,即含空质粒 pLA 口服对照组和重组菌 pLA-F41 口服试验组,含空质粒 pLA 滴鼻对照组和重组菌 pLA-F41 滴鼻试验组。口服重组菌 40 只小鼠又分为 5 组,A、B 组各 12 只,C、D、E 组各 5~6 只,A、B 两组分别在 75 d(末次免疫后 3 周)和 116 d(末次免疫后 9 周)进行攻毒试验,C、D、E 组在不同时间处死,取样,检测特异性抗体;滴鼻组和对照组同样分组处理。另设被动免疫组小鼠 40 只,再分为 5 组,分别为口服、滴鼻试验组及其对照组及未免疫对照组,每组 8 只,免疫后配对生产幼鼠。口服组分别以每只小鼠 5×10^9 CFU/mL 活菌悬液 100 μ L 经口接种,滴鼻组分别以每只小鼠 2×10^9 CFU/mL 活菌悬液 20 μ L 滴鼻接种。

免疫程序为:在 0~4、7~11、21~25、49~53 d 进行口服免疫。在 0~2、7~9、21、49 d 进行滴鼻免疫^[17]。

1.5 免疫小鼠血清中特异性 IgG 的测定

分别于免疫前、初免后第 14、28、42、56、70 和 84 天采集小鼠血液,4 $^{\circ}$ C 静止过夜,4000 \times g 离心 10 min,收集血清。按照 Jong-Soo Lee^[17]等方法采用间接 ELISA 方法进行检测 ETEC F41 特异性 IgG 抗体效价。

1.6 小鼠肺部冲洗液、肠道冲洗液、阴道冲洗液及粪便 ETEC F41 特异性 sIgA 抗体测定

于初免后 56、70、84 d 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,收集从肺部流出的冲洗液;PBS 反复冲洗小肠,收集从小肠流出的冲洗液。PBS 反复冲洗阴道,收集阴道冲洗液。所有冲洗液 2000 \times g 离心 10 min,收集上清,置 -20 $^{\circ}$ C 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,12000 \times g 离心 10 min,收集

上清。按照 Jong-Soo Lee 等方法采用间接 ELISA 方法进行 ETEC F41 特异性 sIgA 抗体效价。

1.7 攻毒保护性试验

1.7.1 主动免疫攻毒保护性试验 大肠杆菌 C83919 接种于 LB 培养基中, 37℃ 震荡培养 18 h, 离心收集菌体, 用灭菌蒸馏水稀释至不同的剂量分别灌胃攻毒 SPF 级 BALB/c 小鼠, 用 Reed 及 Meunch 法计算该菌液对小白鼠的半数致死量 (LD_{50})。根据 Gábor Nagy^[18] 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 8 组, 每组 12 只。分别于 75 d (末次免疫后 3 周) 和 116 d (末次免疫后 9 周) 对小鼠经口进行攻毒试验, 攻毒的剂量为 6×10^{11} CFU C83919 ($2 \times 10^3 LD_{50}$)。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。

1.7.2 新生小鼠被动免疫攻毒保护性试验 按照 The Duchet-Suchaix neonatal ETEC challenge model^[19-20] 小鼠滴鼻免疫和口服免疫重组乳酸菌 7 周后, 将小鼠配对, 新生小鼠出生后 24h 喂养母乳, 然后经口进行攻毒试验, 剂量是 10^3 CFU 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。

2 结果

2.1 重组干酪乳杆菌 PCR 鉴定及序列分析

以提取的重组质粒作为模板, 分别以 F41 和 pgsA 的 F、R 为引物, 经 PCR 扩增出约 834 bp 和 1116 bp 的基因片段。同时将 F41 PCR 产物连接到 T 载体上邮寄至北京基诺博实有限公司测序, 通过 DNASTAR 软件将所测得的基因序列同 GenBank 中发布的标准序列进行比较, 表明核苷酸序列的一致性达 99.8%, 从而说明重组质粒成功转入干酪乳杆菌。

2.2 目的蛋白在干酪乳杆菌中的诱导表达及鉴定

将重组质粒的单个菌落接种于 5 mL MRS 培养基, 过夜培养活化, 活化菌液按 1:10 接种于 MRS 培养基中, 37℃ 培养 24 h, 取菌液, 溶菌酶裂解, 表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳和 PVDF 膜转印后, 与兔源抗 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 kDa), 与预计大小一致, 而含空质粒 pLA 对照未见目的条带 (图 1), 说明表达的蛋白可被兔源 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

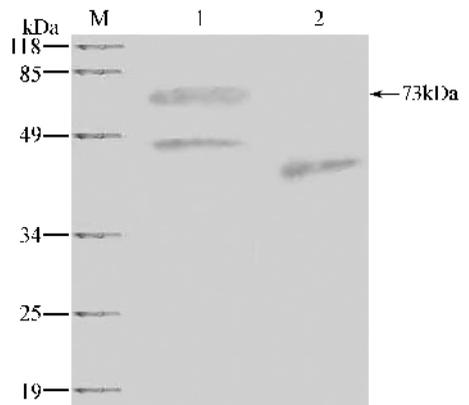


图 1 重组蛋白的 anti-F41 Western blot 检测结果

Fig.1 Western blot analysis of the recombinant protein using anti-F41 Ab. M. Prestained protein molecular weight marker; 1. pLA-F41/*L. casei* at 6 h; 2. pLA/*L. casei* at 6 h.

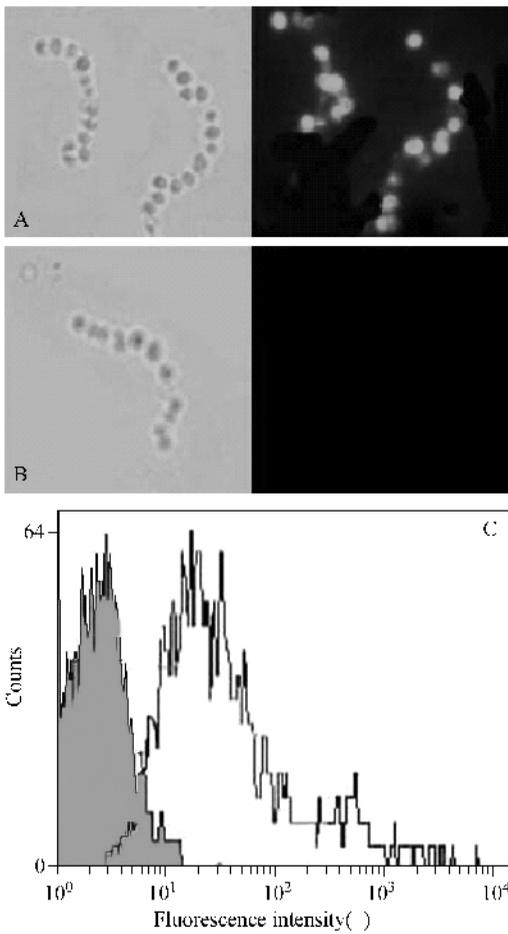
粒的干酪乳杆菌一同进行间接免疫荧光实验, 分别用电子显微镜的明视野和绿色荧光进行检测, 试验结果表明, 重组干酪乳杆菌经荧光显微镜检查可见明显的绿色荧光 (图 2-A), 含空质粒 pLA 的乳杆菌未见绿色荧光 (图 2-B)。明视野下可见到与荧光视野下相同的细菌形态, 由此表明, 重组干酪乳杆菌表达了外源融合蛋白 pgsA-F41, 初步表明表达的重组蛋白锚定于菌体表面。流式细胞检测分析结果表明, 重组干酪乳杆菌的荧光信号强度明显高于含有空质粒 pLA 的干酪乳杆菌阴性对照组 (图 2-C), 结果与免疫荧光检测结果相符, 进一步证明抗原蛋白大量表达在乳杆菌表面。

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

对免疫前和免疫后各时间段断尾采集的血清样品进行间接 ELISA 检测, 观测 IgG 抗体消长规律。试验结果表明, 口服试验组和滴鼻试验组 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, 而对照组抗体效价始终变化不大。由图可见, 口服试验组抗体水平低于滴鼻试验组的抗体水平 (图 3)。

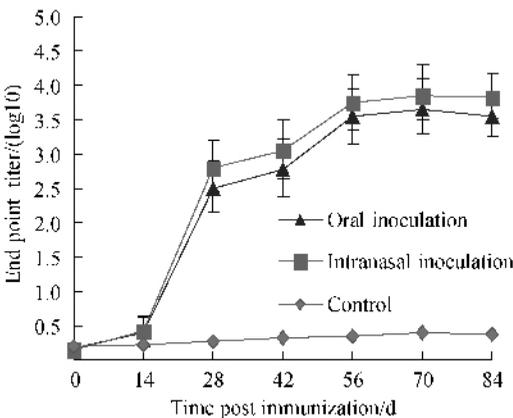
2.4 重组干酪乳杆菌免疫小鼠抗 ETEC F41 特异性 sIgA 测定

分别于初免后第 56、70 和 84 天采集鼠肺部冲洗液, 小肠冲洗液及阴道冲洗液检测 sIgA 抗体水平, 测定结果如图 4 所示, 口服试验组和滴鼻试验组在免疫后 70 d sIgA 抗体水平达至最高, 84 d 略有下降并且肺部冲洗液、阴道冲洗液口服试验组抗体水平低于滴鼻试验组的抗体水平而小肠冲洗液口服试验组抗体水平高于滴鼻试验组的抗体水平。采集



2 免疫荧光和流式细胞仪检测重组蛋白

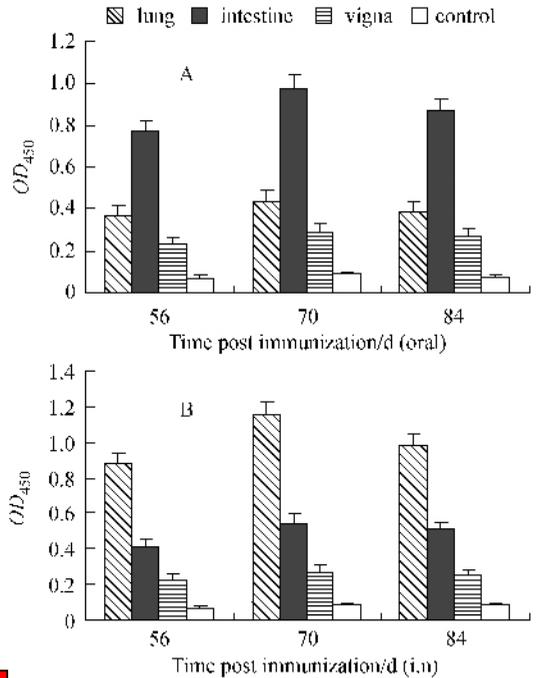
Fig.2 Immunofluorescence microscopy and flow cytometry analysis of the recombinant protein. A, B. Representative immunofluorescence images of pLA/L. casei (control) and pLA-F41/L. casei. Bright-field images are shown on the left. C. Fluorescence-activated cell sorter histograms of pLA/L. casei (filled) 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.



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

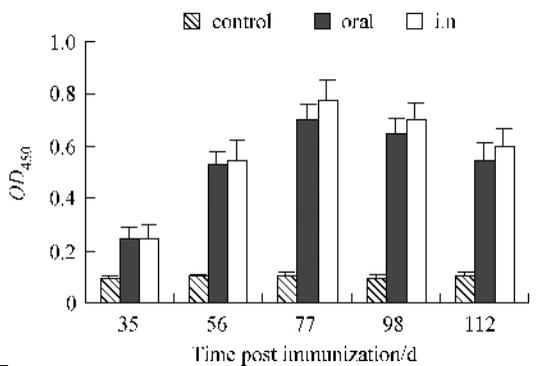
Fig.3 Specific IgG level in serum of mice immunized with intranasal or oral pLA-F41/L. casei recombinant strain.

鼠粪便检测 sIgA 抗体水平,测定结果如图 5 所示,口服试验组和滴鼻试验组 sIgA 抗体水平显著高于相应对照组的抗体效价,112 d 仍能检测出 sIgA 抗体,由图 5 可见,口服试验组抗体水平略低于滴鼻试验组的抗体水平。



4 口服免疫小鼠特异性黏膜 IgA 抗体水平 (A) 和滴鼻免疫小鼠特异性黏膜 IgA 抗体水平 (B)

Fig.4 Mice immunized orally anti-F41 mucosal IgA antibody responses (A) or intranasally anti-F41 mucosal IgA antibody responses (B).



5 口服或滴鼻免疫小鼠粪便中 F41 菌毛特异性 sIgA 水平

Fig.5 F41 fimbria-specific sIgA responses in fecal pellets were induced after oral or intranasal immunization of mice with a single dose of pLA-F41/L. casei and pLA/L. casei vector as control.

2.5 小鼠的攻毒保护结果

2.5.1 主动免疫攻毒保护性试验结果:小鼠分为 4 组,每组 12 只,第一组为口服免疫组,第二组为滴鼻免疫组,第三组为口服免疫空质粒对照组,第四组为

滴鼻免疫空质粒对照组, 分别于 75 d 和 116 d 进行攻毒, 确定的 LD_{50} 为 3×10^8 CFU C83919, 攻毒的剂量 6×10^{11} CFU C83919 ($2 \times 10^3 LD_{50}$) 连续观察 20 d, 如表 1 和表 2 所示, 75 d 口服试验组和滴鼻试验组免疫组的保护率为 100%, 而对照组的死亡率为 100%。116 d 再次以同样的方式攻毒结果显示口服试验组的保护率为 90% 以上, 而滴鼻试验组的保护率为 85%, 与对照组差异均极其显著 ($p < 0.001$)。

表 1 小鼠 75 d 攻毒免疫保护试验结果

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

Group	Number of mice	Number of diarrhea mice	Number of Dead mice	Protection rate/% *
Oral inoculation	12	0	0	100
Oral control	12	12	12	0
i. n inoculation	12	0	0	100
i. n control	12	12	12	0

The " * " of this table showed long rank test

表 2 小鼠 116 d 攻毒免疫保护试验结果

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

Group	Number of mice	Number of diarrhea mice	Number of Dead mice	Protection rate/% *
Oral inoculation	12	1	1	91.7
Oral control	12	12	12	0
i. n inoculation	12	2	1	85
i. n control	12	12	12	0

The " * " of this table showed long rank test

2.5.2 新生小鼠被动免疫攻毒保护性试验结果 新生小鼠分为 5 组, 每组 20 只, 第一组为口服免疫组, 第二组为滴鼻免疫组, 第三组为口服免疫空质粒对照组, 第四组为滴鼻免疫空质粒对照组, 第五组为未免疫对照组, 小鼠出生后 24 h 喂养母乳, 然后按照 10^3 CFU C83919 的剂量进行攻毒, 连续观察 10 d, 结果如表 3 所示来自于口服免疫组新生小鼠免疫保护

表 3 新生小鼠被动免疫攻毒保护性试验结果

Table 3 Oral or intranasal immunization of BALB/c female mice with pLA-F41/*L. casei* provided passive immunity to pups orally challenged with C83919

Group	Number of mice	Number of diarrhea mice	Number of Dead mice	Protection rate/% *
Oral inoculation	20	2	2	90
Oral control	20	19	19	5
i. n inoculation	20	4	4	80
i. n control	20	19	19	5
Unvaccine	20	19	19	5

The " * " of this table showed long rank test

率为 90%, 而滴鼻免疫组的新生小鼠的免疫保护率为 80%, 而对照组新生小鼠保护率仅为 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。

3 讨论

ETEC 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殖于黏膜, 这是 ETEC 引起疾病的先决条件, 因此黏膜免疫是阻止病原菌侵入机体的第一道防线, 研制有效的刺激黏膜免疫系统产生局部免疫应答和全身性系统免疫反应的新型疫苗, 对疾病的防治具有重要意义。

针对 ETEC 经黏膜感染的特点及黏膜免疫的重要性, 以食品级干酪乳杆菌作为递送疫苗抗原的活菌载体, 构建了细胞表面表达 ETEC F41 蛋白的重组干酪乳杆菌系统, 以期利用该系统作为 ETEC F41 口服疫苗, 达到预防的目的。对构建的重组干酪乳杆菌表达的蛋白经 Western blot 免疫学检测表明, 外源重组蛋白能够与 ETEC F41 标准菌株制备的抗血清发生反应, 说明所构建的重组干酪乳杆菌表达系统能够有效的表达外源目的蛋白, 重组蛋白与天然抗原一样具有相同的免疫原性。目前普遍认为, 在宿主细胞表面表达外源抗原是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的最佳方式, 据此, 我们采用了一种基于枯草芽孢杆菌 pgsA 锚定蛋白新型细胞表面表达系统, 在这个系统中, 目的蛋白通过 N 端与 pgsA 相连, 从而使融合蛋白高效表达在细胞表面。诱导表达后的活菌体经间接免疫荧光试验和流式细胞术检测结果表明, 所表达的蛋白能够展示于菌体的表面。存在菌体表面的目的蛋白, 为抗原物质有效刺激免疫系统, 提高机体的免疫水平奠定了基础。

以鼠为动物模型进行口服和滴鼻免疫接种试验, 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和黏膜免疫机制。根据有关报道和预备试验结果^[13, 17], 本试验所采用的口服和滴鼻免疫程序是: 在不同的时间各免疫 4 次, 不同的是口服免疫每次连续免疫 5 d, 而滴鼻免疫前两次连续免疫 3 d, 第三次(21 d)和第四次(49 d)免疫一次, 结果均能刺激机体产生黏膜免疫和系统免疫, 获得了较高水平的特异性 IgG 和 sIgA, 为免疫动物提供了良好的保护力, 这与 Jong-Soo Lee^[17]的研究结果相似。滴鼻免疫后在小鼠肺部、肠道、阴道冲洗液及粪便中均检测到了特异性 sIgA, 可能是由于外源抗原接触鼻黏膜后, 由鼻相关淋巴组织(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^[21]。口服免疫

组初免后第 70 天,检测到较高的血清 IgG 抗体水平和肺部、肠道、阴道冲洗液中较高的 sIgA 抗体水平,这是由于干酪乳杆菌具有较强的肠道定殖能力,定殖于肠道中可不断地刺激肠黏膜产生分泌性 IgA,滴鼻免疫组也得到同样的结果,这是因为在共同黏膜免疫系统(CMIS)作用下,滴鼻免疫不仅能诱导 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,而且小鼠粪便中特异性 sIgA 抗体能够持续到 112 天。动物保护性试验结果证实该重组菌对 C83919 攻击具有良好的保护作用,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,我们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,这与 Miguel 等研究的结果一致^[22]。但是无论是主动免疫还是被动免疫滴鼻免疫组攻毒保护率均低于口服免疫组,这虽然与免疫的剂量和免疫程序有关,但是滴鼻免疫组和口服免疫组的特异性抗体 IgG 和 sIgA 水平相差很小。合理的解释可能与抗原加工递呈方式有关,比如滴鼻免疫途径中由于肺泡巨噬细胞高效的吞噬作用会破坏抗原的完整性,从而降低抗体的中和活性^[16],另外,特异性 sIgA 抗体可通过阻碍黏膜与 F41 的接触从而给黏膜表面提供特殊的免疫屏障,滴鼻免疫组肠液特异性 sIgA 比口服免疫组的低,以致免疫保护率低于口服免疫组。虽然试验动物免疫取得了满意的结果,但是作为疫苗应用到临床必须进行本体动物免疫攻毒试验,还要进行临床中试等。临床免疫程序的最终制定要依照本体动物免疫试验结果来进行。

因为 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殖于黏膜从而引发疾病,因此,以阻断肠道传染性病原感染的第一道防线为目的,利用安全无毒的乳酸菌表达系统在肠道黏膜上粘附、定殖和表达及传递抗原物质,利用 pgsA 的锚定功能,抗原物质不经过修饰而对黏膜的免疫刺激作用更接近于病毒的自然感染途径^[23],因此所产生的黏膜免疫保护效果比较理想,并对比了通过口服和滴鼻两种免疫途径产生的结果,为进一步研究乳酸菌活疫苗的免疫程序和黏膜免疫机制奠定了基础。当然,对重组菌进入动物体内的定殖情况、消长情况、产生抗原物质情况等还一无所知,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Mannam P, Jones KF, and Geller BL. Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity* 2004, 72: 3444 - 3450.
- [2] Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, et al. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 653 - 657.
- [3] Seegers, JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20: 508 - 515.
- [4] Shaw DM, Gaerthe B, Leer RJ, et al. 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.
- [5] Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y, et al. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Immunology* 2003, 102: 223 - 228.
- [6] Tomohiko O, Yasuyuki A, Kenji Y, et al. Oral immunoadjuvant activity of a new symbiotic *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in conjunction with dextran in BALB/c mice. *Nutrition Research*, 2005, 25: 295 - 304.
- [7] Alander M, Satokari R, Korpela R, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 351 - 354.
- [8] Lee YK, Ho PS, Low CS, et al. Permanent colonization by *lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 670 - 674.
- [9] 阿木尔吉日嘎拉. 乳酸菌的免疫调节作用的研究. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2006.
- [10] Ashiuchi M., Soda K, and 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.
- [11] Ashiuchi M, Nawa C, Kamei T, et al. Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* 2001, 268(20): 5321 - 5328.
- [12] Ashiuchi M., and Misono H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59: 9 - 14.
- [13] Hou XL, Yu LY, Liu JZ, et al. Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. *Vaccine* 2007, 26, 24 - 31.
- [14] Aymerich MT, Hugas M, Garriga M, et al. Monfort. Electrotransformation of meat lactobacilli: Effect of several parameters on their efficiency of transformation. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 75: 320 - 325.
- [15] Ian BP, Marc G, Alan J, et al. A simple and rapid method for genetic transformation of *Lactic Streptococci* by Electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(3): 655 - 660.

- [16] Junya N , Kenji O , Tomoe K , et al. 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 ,Jan. p. 269 – 275.
- [17] Lee JS , Poo H , Han DP , et al. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *The Journal of Virology* , 2006 ,80(8) : 4079 – 4087.
- [18] Gábor N , Ulrich D , J rg H , et al. Oral Immunization with an rfaH Mutant Elicits Protection against Salmonellosis in Mice. *Infection and Immunity* 2004 ,72(7) : 4297 – 4301.
- [19] 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.
- [20] Duchet-Suchaux M , Le MC , 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.
- [21] Cawbxaura JK , Jutila MA , Pascual KW. Nasal-associated lymphoid tissue :Phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in native lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site. *The Journal of Immunology* ,1999 ,163 :1382 – 1389.
- [22] Miguel AA , David MH , Nancy W , et al. Oral immunization with a *Salmonella typhimurium* vaccine vector expressing recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbriae elicits elevated antibody titers for protective immunity. *Infection and Immunity* ,1998 ,66(11) : 5470 – 5476.
- [23] Brandtzaeg P. Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulin-producing cells. *Handbook of Immunology* . Boston : Academic Press , 1994 : 251 – 279.

Comparison of immune response after oral and intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC F41

Jiankui Liu¹ , Chunhua Wei¹ , Xilin Hou¹ , Guihua Wang² , Liyun Yu^{1,2*}

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

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

Abstract [Objective] In order to represent a promising strategy for mucosal vaccination , oral or intranasal immunization of Specific Pathogen Free (SPF) BALB/c mice were performed. The mucosal immunity , systemic immune and protective immune responses were compared after immunization with the recombinant *Lactobacillus casei* (*L. casei*) harboring enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) F41. **[Method]** The recombinant fusion proteins were detected by Western blot. Surface localization of the fusion protein was verified by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. Six-week-old female SPF BALB/c mice (160 heads) were divided into 4 groups for immunization and control. Oral and intranasal immunization of mice was performed with the recombinant strain *L. casei* harboring pLA-F41 or pLA. For oral immunization , the mice were inoculated daily on days 0 to 4 , 7 to 11 , 21 to 25 , and 49 to 53. A lighter schedule was used for nasal immunization (days 0 to 2 , 7 to 9 , 21 and 49). 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. The mice orally or intranasally immunized with pLA-F41/*L. casei* and pLA/*L. casei* were challenged with standard-type ETEC F41 (C83919) (2×10^3 LD₅₀). **[Result]** Mice immunized with pLA-F41/*L. casei* could produce remarkable anti-F41 antibody level. More than 90% survived in oral immunization group whereas more than 85% survived in intranasal immunization group after challenged with C83919 , all dead in the control group. Ninety percent of the pups survived in oral immunization group whereas 80% survived in intranasal immunization group after challenged with C83919 , but only a 5% survival rate for pups that were either immunized with a control pLA vector or unimmunized. **[Conclusion]** Oral or intranasal immunization with recombinant *L. casei* displaying ETEC F41 antigens on the surface induced effective and similar systemic and mucosal immune responses against the ETEC F41.

Keywords : ETEC F41 ; intranasal immunization ; oral immunization ; *Lactobacillus casei* ; protection

(本文责编 : 张晓丽)

Supported by the Science and Technology Project for Returned by National Ministry of Personnel ; the Foundation of Key Science and Technology Research of Agricultural Bureau in Heilongjiang Province (HNKXLTV-08-06-03 HNKXIV-08-07) and the Foundation of the Key Science and Technology Research in Daqing (SGG2006-011)

* Corresponding author. Tel : + 86-459-6819292 ; Fax : + 86-459-6819290 ; E-mail : xly_hou@yahoo.com.cn

Received : 17 November 2008 / Revised : 14 December 2008