

重组乳酸乳球菌滴鼻免疫小鼠后 粘膜免疫特性及耐受性的研究

刘平, 王振华

(成都农业科技职业学院, 四川成都 611130)

摘要: 乳酸菌 NICE (乳链菌肽控制表达 nisin controlled expression, NICE) 系统可将治疗性蛋白或保护性抗原蛋白表达于细胞外或锚定于菌体的肽聚糖上, 递呈抗原蛋白并激活粘膜免疫系统, 刺激特异性 s-IgA 的产生使其作为粘膜免疫原递呈的活载体成为可能。本试验将构建的重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 鼻腔免疫 BALB/c 小鼠, 检测呼吸道粘膜中抗体 s-IgA 和血清中特异性抗体 IgG 含量, 评价其动态变化情况, 同时检测脾脏细胞因子 IL-4 和 IL-10 的活性。结果重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 免疫小鼠后, 在测定时间内重组菌试验组小鼠呼吸道粘膜中特异性 s-IgA 水平高于对照组, 差异极显著 ($P < 0.01$); 血清中特异性抗体 IgG 水显著高于对照组 ($P < 0.01$); 脾脏细胞悬液中的 IL-10 和 IL-4 含量与对照组无差异性 ($p > 0.05$), 结果表明重组菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 经粘膜途径免疫小鼠后能刺激小鼠粘膜特异性抗体 s-IgA 和血清中特异性抗体 IgG 的分泌, 且能避免粘膜免疫耐受的产生, 为该重组疫苗的进一步应用奠定了理论基础。

关键词: 乳酸乳球菌; 粘膜抗体; 免疫耐受

文章编号: 1673-9078(2012)7-787-791

Mucosal Immune Response and Immune Tolerance of Recombinant

Lactococcus lactis in Mice by Intranasal Immunization

LIU Ping, WANG Zhen-hua

(Department of Animal and Veterinary science, Chengdu Vocational College of Agricultural Science and Technology
Chengdu 611130, China)

Abstract: The food-grade Nisin controlled expression (NICE) system of *Lactococcus lactis* (*L.lacti*) was studied emphatically as a vector of recombinant protein expression. The therapeutic proteins or protective antigen protein expressed can secrete and anchor in the cell envelope or bacterial peptidoglycans and thus the NICE system of *L.lacti* can present the vaccine antigen to the mucosal surface and result in a specific s-IgA response. Using recombinant *L.lacti* that present antigens as live mucosal vaccines provides an effective way to prevent microorganisms invading and shows a promising future. In this study, BALB/c mice were immunized with the bacterial supernatant to evaluate the mucosal immune response and immune tolerance of recombinant *L.lacti* PNZ8149/NZ3900-M/PRRS strain that expresses ORF6 gene of PRRSV. IgG in serum and s-IgA in lung lavage fluid and intestinal washes were analyzed by using a similar enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For evaluating changes in cytokines IL-4 and IL-10, the spleen collected was analyzed. The results clearly showed that mice immunized with recombinant strain PNZ8149/NZ3900-M/PRRS could induce remarkable special s-IgA in lung lavage fluid, at the whole experimental session, compared with the control group I and II. The level of special s-IgA and IgG showed significantly increase ($P < 0.01$) and IL-4 and IL-10 contents of cytokines showed little difference to those of the control groups. All the results indicated that mice immunized by the recombinant *L.lactis* expressing ORF6 gene of PRRSV can significantly induce mucosal immune responses and avoid producing the phenomenon of mucosal immune tolerance. The study was expected to lay a theoretical foundation on developing of the gene engineering *L.lactis* mucosal vaccines.

Key words: *Lactococcus lactis*; mucosal antibody; immune tolerance

粘膜免疫是机体的第一道防御屏障, 阻止经口腔、呼吸道、生殖道等粘膜途径感染的病原微生物入侵, 理想的粘膜免疫疫苗既即要求产生分泌型 IgA (Secretory immunoglobulin A, s-IgA), 又要求激发机体

收稿日期: 2012-05-16

特异性免疫应答。随着分子生物学技术的不断发展和乳酸乳球菌外源蛋白表达系统的成功开发, 利用乳酸乳球菌表达外源蛋白, 并向粘膜免疫系统提呈抗原, 使所表达的外源抗原与免疫系统充分接触继而诱导有效免疫应答是目前该领域研究的热点。

免疫耐受是粘膜对抗原的另一种病理性免疫反应过程,此种免疫反应使抗原不能激活 T 和 B 细胞完成特异性免疫应答,尽管使用大剂量抗原,机体产生的特异性抗体 IgG 或粘膜产生的抗原特异性 s-IgA 水平却很低,对相应抗原的微生物感染几乎没有免疫防御能力或很弱。粘膜耐受与 PP 结及小肠上皮的 T 细胞受体(TCR)表达 $\gamma\delta$ 的 T 细胞亚群的功能活化有关,它是介导粘膜免疫耐受及 IgA 生成的基本调节细胞。它主要通过 IL4 和 IL-10 的免疫调节来参与小剂量抗原刺激引起的免疫耐受^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

BALB/c 小鼠,雌性,体重 18~22 g, 6~8 周龄,购自华西试验动物中心。

1.1.2 免疫原

重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS, 本实验室构建并保存。

1.1.3 主要试剂

HRP-羊抗大鼠 IgA 购自美国 Sigma 公司; 细胞因子检测试剂盒为基因美公司产品; 96 孔酶标板购自 Corning 公司; 脱脂奶粉购自 BD 公司。

1.1.4 主要溶液配制

1.1.4.1 间接 ELISA 主要试剂

包被缓冲溶液 (0.05 M pH 9.6 碳酸盐缓冲溶液): Na_2CO_3 0.75 g、 NaHCO_3 1.46 g、去离子水 500 mL。

底物缓冲溶液 (pH 5.0 磷酸盐柠檬酸): 0.2 M Na_2HPO_4 (28.4 g/L) 25.7 mL、0.1 M 柠檬酸 (19.2 g/L) 24.3 mL、去离子水 50 mL。

洗涤缓冲溶液 PBST (0.15 M pH 7.4 的 PBS): KH_2PO_4 0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、0.05% 的 Tween-20 0.5 mL、去离子水至 1000 mL。

TMB 工作液: 2 mg/mL TMB 0.5 mL、底物缓冲溶液 9.5 mL、0.75% H_2O_2 32 mL。

终止液 (2 M H_2SO_4): 蒸馏水 178.3 mL, 逐滴加入 98% 的浓硫酸 21.7 mL。

封闭液: 5% 的脱脂奶粉。

1.1.4.2 细胞因子检测主要试剂

红细胞裂解液: NH_4Cl 8.29 g、 KHCO_3 1 g、 Na_4EDTA 0.037 g、去离子水定容至 1000 mL, 调 pH 7.2~7.4, 高压灭菌后备用。

ConA (1 mg/mL): 25 mg ConA 溶于 25 mL 完全 R/MINI-1640 培养液中, 分装, -20°C 保存备用。

1.1.5 主要仪器设备

酶标仪 Synergy HT (Bio-TEK)

1.2 方法

1.2.1 试验动物选择及处理

试验选取健康雌性 BALB/c 小鼠 45 只 (6~8 周龄, 体重 18~22 g), 随机分为 3 组 (n=15), 组 I 鼻腔免疫 PBS 缓冲溶液, 为 PBS 对照组; 组 II 鼻腔免疫空载体菌株培养液, 为载体对照组; 组 III 鼻腔免疫重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS, 为鼻腔免疫实验组, 具体见表 1。免疫剂量为 100 μL , 悬浮菌液细菌含量为 1×10^{11} CFU/mL, 各组试验动物被连续免疫三次, 间隔 7 天, 每次连续免疫三天 (即: 1 d、2 d、3 d、11 d、12 d、13 d、21 d、22 d、23 d)^[2]。试验动物在第三次免疫后 0 d、7 d、14 d、21 d、28 d 分别被处死, 每次每组处死三只, 取血液、肺脏冲洗液检测抗体, 采用间接 ELISA 方法检测血清中特异性抗体 IgG 和粘膜中 s-IgA 抗体含量评价其动态变化情况, 并在第三次免疫后 14 d 取脾脏进行细胞因子 IL-4 和 IL-10 活性检测。

表 1 试验动物分组及处理

Table 1 Four groups of BALB/c mice

组别/(n=15)	免疫材料	接种途径	接种量/(μL /只)
组 I PBS 对照组	PBS 缓冲溶液	intranasally	100
组 II 载体对照组	载体	intranasally	100
组 II 滴鼻实验组	重组菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS	intranasally	100

1.2.2 免疫用试验材料的制备

1.2.2.1 免疫原制备

将重组菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 诱导后离心收集菌体, 用 0.01 mol/L 无菌 PBS 溶液洗涤一次, 再用 PBS 缓冲液悬浮, 使细菌含量为 1×10^{11} CFU/mL。

1.2.2.2 PNZ8149/NZ3900 空载体菌液制备

将空载体乳酸乳球菌 PNZ3900 接种在 M17 培养基上进行培养至 $\text{OD}_{600}=1$ 左右, 离心收集菌体, 用 PBS 溶液洗涤一次, 再用 PBS 悬浮细菌, 使细菌含量为 1×10^{11} CFU/mL。

1.2.3 样品采集及指标检测方法

1.2.3.1 免疫鼠肺粘膜中 s-IgA 检测

分别于第三次免疫后 0 d、7 d、14 d、21 d、28 d 处死小鼠三只, 取肺脏, 将尼龙管固定在肺气管内, 用注射器吸取 0.5 mL PBS 缓冲溶液注射到肺气管内冲洗, 反复冲洗三次, 收集冲洗液, 4°C 6000 r/min

离心 10 min, 收集上清液, -20 °C 保存以备采用间接 ELISA 方法检测肺粘膜中 s-IgA 水平。

1.2.3.2 免疫鼠血清中特异抗体 IgG 检测

(1) 样品采集: 分别于第三次免疫后 0 d、7 d、14 d、21 d、28 d 眼眶静脉采集三只大鼠血液, 37 °C 恒温箱中静置 30 min, 然后放入 4 °C 冰箱中 60 min, 3000 r/min 离心 10 min, 收集血清, -20 °C 保存备用。

(2) 检测方法: 采用间接 ELISA 方法检测

1.2.3.3 细胞因子 (Cytokines) 检测

采用试剂盒检测 IL-4 和 IL-10 的活性, 分别于第三次免疫后 14 d, 处死后取鼠脾脏, 制备脾脏淋巴细胞悬液:

① 试验中用到的所用物品均需提前灭菌。

② 脱臼处死小鼠, 采用 70% 的乙醇浸泡 15 min, 无菌条件下取出脾脏于提前盛有 4 mL R/MINI-1640 培养液和铜网的培养皿中, 利用无菌注射器将脾脏研磨碎, 制成细胞悬浮液, 采用 200 目尼龙筛过滤到 10 mL 离心管中, 将离心管用封口膜封好, 2000 r/min 离

心 10 min。

③ 弃上层培养液, 加入 4~6 mL 红细胞裂解液, 悬浮细胞, 室温静置裂解 5 min, 将离心管用封口膜封好, 2000 r/min 离心 10 min。

④ 弃上层培养液, 加入 4~6 mL R/MINI 1640 培养液悬浮洗涤细胞两次, 用血球计数板进行细胞计数。

⑤ 采用 R/MINI 1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 备用。

⑥ 取 100 μ L 制备的淋巴细胞悬液加入 96 孔培养板内, 以终浓度为 2.5 μ g/mL 的 Con A 作为刺激物, 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 96 h。

⑦ 5000 r/min 离心 5 min, 收集细胞培养上清, 用 ELISA 试剂盒检测细胞因子 IL-4 和 IL-10 的活性。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 呼吸道粘膜 s-IgA 的测定

表 2 重组乳酸乳球菌免疫小鼠后肠粘膜特异性 s-IgA 检测结果

Table 2 The contents of specific s-IgA from intestinal mucosa of mice immunized with gene engineering *Lacidophilus*

组别	0d	7d	14d	21d	28d
组 I PBS 对照组	0.032±0.0019Aa	0.037±0.0018Aa	0.034±0.0028Aa	0.045±0.0023Aa	0.039±0.0012Aa
组 II 载体对照组	0.037±0.0033Aa	0.037±0.0010Aa	0.041±0.0016Aa	0.033±0.0012Aa	0.030±0.0036Aa
组 III 滴鼻实验组	0.456±0.0356B	0.463±0.0254B	0.497±0.0120B	0.491±0.0247B	0.491±0.0294B

注: 同列肩标不同字母表示组间差异显著, 相同字母表示组间差异不显著; 大写字母表示 0.01 水平, 小写字母表示 0.05 水平。

表 3 重组菌免疫小鼠后血清中特异性抗体 IgG 检测结果

Table 3 The contents of specific IgG from serum of mice immunized with gene engineering *Lacidophilus*

组别	0d	7d	14d	21d	28d
组 I PBS 对照组	0.055±0.0036Aa	0.040±0.0792SAa	0.040 ±0.0013Aa	0.041 ±0.0014Aa	0.040 ±0.0019Aa
组 II 载体对照组	0.058 ±0.0047Aa	0.047±0.0019Ab	0.042 ±0.0023Aa	0.043 ±0.0031Aa	0.043 ±0.0019Aa
组 III 口服实验组	0.441 ±0.0347Bb	0.511±0.0288Bc	0.516 ±0.0465Bb	0.594±0.1256Bb	0.544 ±0.0223Bb

注: 同列肩标不同字母表示组间差异显著, 相同字母表示组间差异不显著; 大写字母表示 0.01 水平, 小写字母表示 0.05 水平。

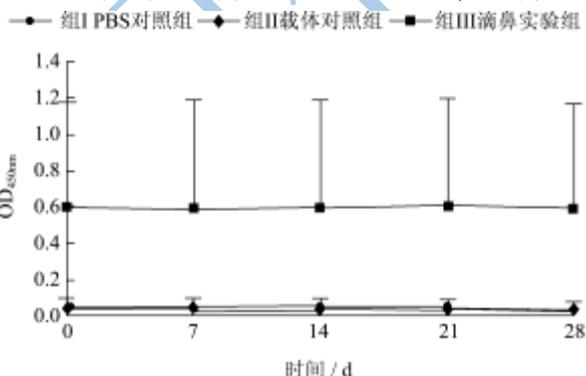


图 1 重组菌免疫小鼠后呼吸道粘膜特异性 s-IgA 抗体变化

Fig.1 Variation of specific s-IgA from respiratory of mice immunized with gene engineering *Lacidophilus*

由表 2 得出, 重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900

-M/PRRS 免疫小鼠后, 在测定时间内重组菌试验组小鼠呼吸道粘膜中特异性 s-IgA 水平高于对照组, 差异极显著 ($P < 0.01$)。由图 1 得出, 重组菌试验组特异性 s-IgA 水平在整个测定期间内都保持较高水平, 且无显著变化趋势。PBS 对照组和载体对照组在整个测定期间处在同一水平, 无变化趋势。结果表明, 该重组阳性菌对小鼠具有较好的粘膜免疫原性, 能刺激呼吸道粘膜特异性 s-IgA 的分泌。

2.1.2 血清特异性抗体 IgG

重组菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 免疫小鼠后, 在第三次免疫后 0 d 即可检测出血清抗体 IgG, 在免疫后的测定时间内重组菌试验组血清中特异性 IgG 抗体水显著高于 PBS 对照组 (组 I) 和载体对照组 (组

II), 差异极显著 ($P < 0.01$); 重组菌试验组抗体水平在第三次免疫后 7 d 达到最高, 在整个测定时间内维持在高水平 (表 3、图 2)。结果表明该重组乳酸乳球菌经粘膜途径接种后能刺激小鼠产生血清特异性 IgG 抗体。

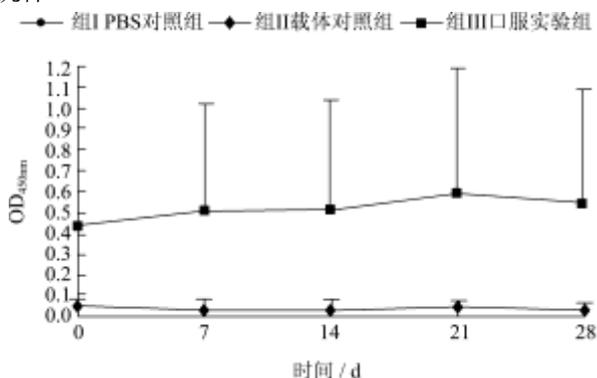


图 2 重组菌免疫小鼠后血清中特异 IgG 抗体水平变化

Fig.2 Variation of specific IgG from serum of mice immunized with gene engineering *Lacidophilus*

2.1.3 粘膜免疫耐受因子 IL-10 和 IL-4

表 4 重组菌免疫小鼠后脾细胞悬液分泌的细胞因子检测结果 (pg/mL)

Table 4 The levels of production of the cytokines from splenocytes of mice immunized with gene engineering

<i>Lacidophilus</i>		
组别	IL-4	IL-10
组 I PBS 对照组	17.261±1.4739a	97.219±3.4745a
组 II 载体对照组	17.998±1.4377a	97.371±3.3271a
组 III 滴鼻实验组	21.466±0.9893a	96.235±6.4714a

注: 同列肩标不同字母表示组间差异显著, 相同字母表示组间差异不显著; 大写字母表示 0.01 水平, 小写字母表示 0.05 水平。

由表 4 得出, 重组菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 免疫小鼠后, 脾脏细胞悬液中的 IL-10 和 IL-4 含量与对照组无差异性 ($p > 0.05$), 结果表明重组菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 经粘膜途径免疫小鼠后能避免粘膜免疫耐受的产生, 为该重组疫苗的进一步应用奠定了理论基础。

2.2 讨论

2.2.1 粘膜免疫应答

s-IgA 是粘膜免疫的主要效应因子, 是粘膜免疫特有的, 由 2 个多聚 Ig 受体单位和 2 个外加的多聚多肽链和分泌片段组成, 其分泌后释放到分泌液中与上皮细胞紧密连接在一起, 分布于粘或浆膜表面而发挥免疫作用, s-IgA 主要通过抑制粘附、免疫排除、溶解细菌、中和病毒、介导 ADCC 等机制来行使其多种生物功能, 从而在没有发生系统免疫应答的情况下就

起到清除病原体及毒素的作用。

Grangette 等构建了表达破伤风毒素片段 C(TTFC) 的乳酸杆菌, 经鼻腔免疫小鼠后成功地诱导了特异性 s-IgA 和 IgG 的产生^[3]; 唐丽杰等将表达猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) S 蛋白的重组乳酸乳球菌 pNZ8112-Sa/NZ9000 经口服免疫 BALB/c 小鼠, 在免疫后的不同时间检测粪便及血清中的 s-IgA 和 IgG 抗体, 结果重组菌 pNZ8112-Sa/NZ9000 在免疫后的第 18 d 在粪便中即可检出 s-IgA 抗体, 在免疫后的第 38 d 即第 3 次免疫后抗体达到最高, 而血清中未检测出 s-IgA 抗体, 血清中 IgG 抗体也在第 3 次免疫后的 1 周抗体水平达最高, 重组菌产生的 IgG 抗体水平与空白对照组比较, 呈现出明显的阳性反应^[4]; 徐义刚等将构建的细胞表面表达和分泌细小病毒 (Porcine parvovirus virus, PPV) 的 VP2 蛋白的重组干酪乳酸菌口服免疫小鼠, 结果小鼠产生抗猪 PPV 的特异性 s-IgA 和 IgG^[5]; 李晓静等构建产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*) α 毒素基因的重组干酪乳杆菌, 口服免疫 BALB/c 小鼠, 结果在小鼠粪便、眼冲洗液及外生殖道粘液样本中均检测出抗 α 毒素的特异性 s-IgA 抗体, 在小鼠血清中检测出抗 α 毒素的特异性 IgG 抗体, 且攻毒后能起到完全保护作用, 表明产气荚膜梭菌 α 毒素免疫保护性抗原的重组乳酸乳杆菌口服免疫动物能够产生良好的粘膜免疫、体液免疫应答及免疫中和效力^[6]。本研究以小鼠为动物模型, 采用滴鼻免疫接种方法, 探讨重组乳酸菌活菌疫苗 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 诱导的粘膜免疫保护力和潜在的应用价值, 结果鼻腔免疫能刺激机体产生较高水平的特异性 s-IgA 和血清特异性抗体 IgG。

2.2.2 粘膜免疫耐受

乳酸乳球菌长期在粘膜表面表达的抗原蛋白能否引起机体免疫耐受? 这成为制约乳酸乳球菌基因工程发展的瓶颈, 也有资料显示乳酸乳球菌不属于人和动物的正常微生物群, 不会长期定植于呼吸道、消化道及泌尿生殖道的粘膜表面, 在一定程度上避免了长期刺激形成的粘膜免疫耐受。粘膜耐受主要通过 IL-4 和 IL-10 的免疫调节来参与抗原刺激引起的免疫耐受, 呈现机体对抗原刺激“免疫不应答”的现象。IL-4 和 IL-10 在粘膜免疫耐受的维持中起重要作用^[7]。本研究采用 NICE 表达系统, 以乳酸乳球菌为受体菌, 初步构建了抵抗 PRRSV 的粘膜免疫疫苗 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS, 鼻腔免疫小鼠后通过 ELISA 检测脾脏细胞悬液中 IL-10 和 IL-4 活性, 结果 PBS 对照组和空载体对照组小鼠脾脏细胞悬液中的 IL-10 和 IL-4 活性与重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS

免疫实验组无显著差异 ($p>0.05$), 初步表明重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS 经粘膜途径免疫小鼠后能避免粘膜免疫耐受的产生, 因此, 乳酸乳球菌可以作为该重组活载体疫苗的理想受体菌种, 为该重组疫苗的进一步应用奠定了基础。

3 结论

3.1 采用 NICE 表达系统构建重组乳酸乳球菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRRS, 经鼻腔免疫小鼠后, 结果在小鼠呼吸道粘膜能检测到显著高于对照组的特异性 s-IgA, 血清中特异性 IgG 含量也明显高于对照组 ($P<0.01$)。表明重组乳酸乳球菌经鼻腔免疫小鼠后能诱导粘膜免疫应答和体液免疫应答, 为传染病的预防控制提供新的思路。

3.2 重组菌 PNZ8149/NZ3900-M/PRR 低剂量多次口服及滴鼻免疫小鼠后, 未产生粘膜免疫耐受现象, 为粘膜免疫疫苗的接种途径提供了基础资料。

参考文献

[1] 李理, 综述, 徐军, 等. 口服免疫机制及口服疫苗的研究进展 [J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(5): 316-319

- [2] Quigley BR, Hatkoff M, Thanassi DG et al. A foreign protein incorporated on the Tip of T3 pili in *Lactococcus lactis* elicits systemic and mucosal immunity [J]. *Infection and immunity*. 2010, 78(3): 1294-1303
- [3] Grangette C, Müller-Alouf H, Goudercourt D, et al. Mucosal Immune Responses and Protection against Tetanus Toxin after Intranasal Immunization with Recombinant *Lactobacillus plantarum* [J]. *Infection and Immunity*. 2001, 69(3): 1547-1553
- [4] 唐丽杰, 欧笛, 葛俊伟, 等. 表达猪传染性胃肠炎病毒 S 基因的重组乳酸乳球菌的构建及免疫原性分析 [J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 340-344
- [5] 徐义刚, 崔丽春, 葛俊伟, 等. 表达猪细小病毒 VP2 蛋白的重组干酪乳杆菌诱导小鼠产生特异性抗体 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 846-851
- [6] 李晓静, 夏春丽, 李一经, 产气荚膜梭菌 α 毒素在干酪乳杆菌中的诱导表达及其小鼠口服免疫力 [J]. 微生物学报, 2009, 8: 1115-1120
- [7] Stumbles PA, Upham JW, Holt PG. Airway dendritic cells: Coordinators of immunological homeostasis and immunity in the respiratory tract [J]. *Apmis*. 2003, 111(7-8): 741-755