文章编号:1000-5404(2009)09-0871-02

短篇论著

耻垢分枝杆菌疫苗经灌胃免疫在小鼠体内的分布与安全性研究

徐永柱[1],吕 琳[2] ([1]重庆市卫生信息中心,重庆 400014;[2]重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨携带编码幽门螺杆菌 UreB 基因质粒(pLUB)的重组耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, M.s)经灌胃免疫在小鼠体内的分布和安全性。**方法** 将携带绿色荧光蛋白(GFP)基因质粒(pLUB)的重组耻垢分枝杆菌灌胃 BALB/c 小鼠后 8 周,处死小鼠,观察胃、心、肝、脾、肺和肾组织中荧光蛋白的分布,测定小鼠肌酐及 ALT;处死小鼠,分离出肺、肾、肝并分别测定其重量及 HE 染色。**结果** 在 BALB/c 小鼠胃、脾组织中均检测到绿色荧光蛋白的表达,其他组织及对照组未检测到绿色荧光;小鼠体质量、各脏器质量、各血清肌酐和 ALT 含量与对照组无差异($P>0.05$)。**结论** 携带 GFP 的重组耻垢分枝杆菌可在胃和脾组织分布,对小鼠无系统毒性作用。

关键词: 耻垢分枝杆菌疫苗; 安全性; 绿色荧光蛋白
中图法分类号: R378.91; R392.7; R965.3 **文献标识码:** A

重组活载体疫苗具有无需纯化抗原、无需佐剂、可避免抗原在胃内的降解和变性等优点,被认为是预防和治疗幽门螺杆菌(Hp)最有开发和应用前景的疫苗。本课题组成功构建了 pLUB 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭质粒和重组耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, M.s)疫苗,重组 M.s 疫苗经灌胃接种 BALB/c 小鼠能降低 Hp 定植,减轻胃黏膜的炎症反应,对 Hp 感染有明显的预防保护作用[1-5]。相信随着研究的不断深入,重组活载体疫苗在 Hp 的预防和治疗中能够发挥重要作用。本研究仅以绿色荧光蛋白为报告基因研究重组耻垢分枝杆菌疫苗在小鼠体内的分布及毒性,为幽门螺杆菌重组耻垢分枝杆菌疫苗的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

携带穿梭表达质粒 pLUB 的耻垢分枝杆菌疫苗由本室保存[3]。实验动物雄性 BALB/c 小鼠 21 只,体质量(20±1)g,购于重庆医科大学实验动物中心。培养基 Middle Brook 7H9 Broth (M7H9),M7H9 Enrichment ADC 均购于美国 DIFCO 公司;谷丙转氨酶试剂盒(赖氏法)和肌酐检测试剂盒购于卫生部上海生物制品研究所。

1.2 方法

1.2.1 免疫用分枝杆菌疫苗的制备 取冻存的分枝杆菌,划线接种于 LB 固体培养基平皿中,37 ℃下倒置培养 48 h;挑取平皿内单菌落接种于含 50 ml M7H9 液体培养基的三角烧瓶中,37 ℃剧烈振摇培养 48 h;取上述培养菌液,5 000 r/min 离心 5 min;弃上清液,用 PBS 洗涤 2 次,细菌沉淀重悬于无菌 PBS 液中,调节细胞数为 $1\times10^8 ml^{-1}$[细菌悬液 $D(660)=1$,大约相当于 10^8/ml 来计算浓度]。

1.2.2 重组 M.s 疫苗灌胃免疫 BALB/c 小鼠 21 只雄性 BALB/c 小鼠分为 3 组,每组 7 只。小鼠禁食 1 夜,禁水 4 h,用小鼠灌胃针,每只鼠首先以无菌 3% $NaHCO_3$ 100 μl 灌胃。第 1 组为空白对照组,小鼠用 200 μl PBS 灌胃。第 2 组为空菌组,小鼠用 200 μl M.s 菌液(1×10^8 ml^{-1})灌胃;第 3 组为实验组,小鼠以 200 μl 重组 M.s 菌液(1×10^8 ml^{-1})灌胃。恢复饮食饮水,观察一般情况(精神、活动、进食、体温、腹泻等)。

1.2.3 标本采集 疫苗接种后 8 周,各组处死小鼠,取胃、心、肝、脾、肺、肾分别测定其质量,然后作连续冰冻切片(厚度 50 μm),用多聚甲醛固定 15 min, 在荧光显微镜下检查并拍照。小鼠血清谷丙氨转氨酶和肌酐的测定按照试剂盒说明书操作。

1.2.4 组织病理学检查 10% 福尔马林常规固定后梯度乙醇脱水,石蜡包埋,连续垂直切片(5 μm),HE 染色,高倍镜下观察各组织器官的形态变化。

1.2.5 统计学分析 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 小鼠一般情况

BALB/c 小鼠经 2×10^7 CFU/只灌胃接种后,一般情况无明显异常,小鼠活动度及饮食情况正常。接种后 8 周,小鼠基本情况正常,无死亡,大体解剖及各器官组织切片 HE 染色均未发现各器官异常,说明重组 M.s 疫苗对 BALB/c 小鼠无明显副作用。

2.2 疫苗对小鼠血清转氨酶和肌酐的影响

结果见表 1。3 组小鼠血清谷丙转氨酶和肌酐差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 重组耻垢分枝杆菌疫苗对小鼠血清谷丙转氨酶和肌酐的影响

组别	n	ALT (KarU)	Cr (μm/L)
空白对照组	7	17.13±1.77	47.2±3.3
空菌组	7	16.78±1.53	48.1±4.2
实验组	7	15.98±2.13	46.9±3.7

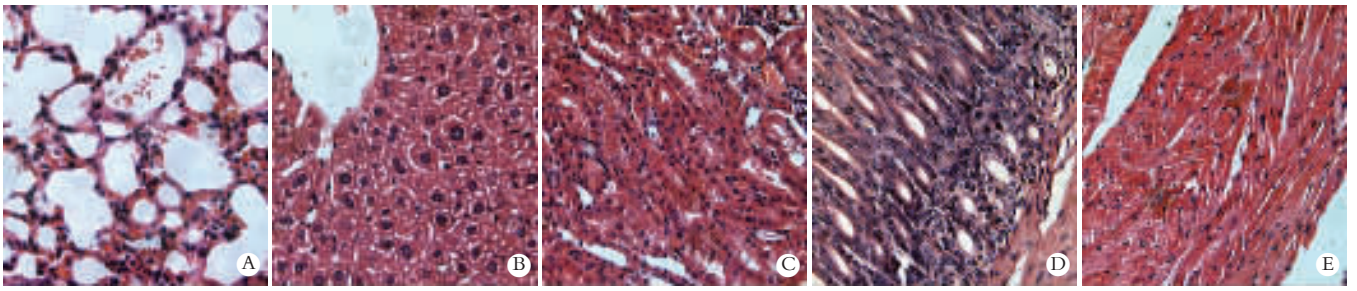
2.3 疫苗对小鼠体质量及各脏器质量的影响

各组小鼠的体质量及各脏器质量均在正常范围之内,各组间差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

基金项目: 国家自然科学基金(30371318);重庆市卫生局重点项目(渝卫教[2007]1 号文 07-1-007)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371318) and the Bureau of Public Health of Chongqing(07-1-007)

作者简介: 徐永柱,男,重庆市人,副研究员,主要从事肿瘤治疗方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)63635355, E-mail: XYZ850901@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-02-13;**修回日期:** 2009-03-09



A:肺; B:肝; C:肾; D:胃;E:心

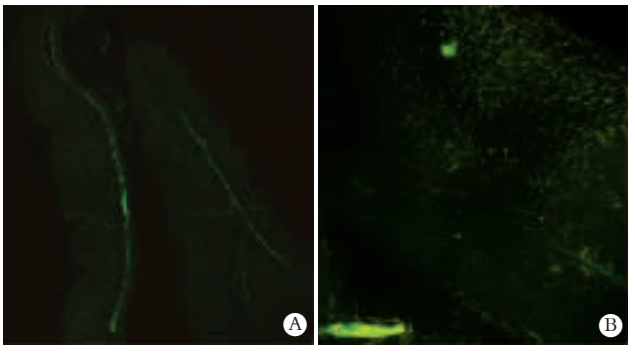
图2 免疫8周后小鼠各脏器组织病理学观察 (HE×200)

表2 重组耻垢分枝杆菌疫苗对小鼠体质量及各脏器质量的影响($g, \bar{x} \pm s$)

组别	n	肝质量	肺质量	肾质量	体质量
空白对照组	7	1.67±0.06	0.30±0.02	0.62±0.04	28.6±1.1
空菌组	7	1.72±0.04	0.32±0.04	0.59±0.03	27.9±1.4
实验组	7	1.64±0.07	0.28±0.02	0.57±0.02	27.6±2.4

2.4 重组耻垢分枝杆菌在胃、脾组织的分布

荧光显微镜观察到胃、脾组织中均有散在的绿色荧光蛋白。见图1。



A:胃;B:脾

图1 灌胃8周后疫苗在胃、脾组织内的表达 (荧光显微镜×200)

2.5 各器官的组织病理学观察

大体解剖无异常。各器官组织切片HE染色显示:肺泡结构清晰,各级支气管、细支气管黏膜完整,未见炎性细胞浸润。肝小叶轮廓清晰,肝细胞未见变性及坏死,中央静脉、肝血窦未见充血及血栓形成。肾结构如常,未见渗出、增生等病理改变。胃壁4层结构完整,腺体排列整齐,未见黏膜上皮脱落、溃疡、炎细胞浸润、增生及出血性病理改变。心组织学结构清晰,心肌纤维排列整齐,未见炎细胞浸润。见图2。

3 讨论

Hp感染作为一种黏膜感染,黏膜免疫在机体的免疫保护中占有非常重要的地位。与非黏膜免疫比较,黏膜免疫可引起机体产生全身(如lgG)和黏膜免疫应答(sIgA),更有可能取得好的免疫效果;同时黏膜免疫途径简便、安全、无创伤、易于接受,抗原无菌程度要求也较低,可大大降低生产成本,从疫苗的科研和社会效应来看,研制Hp口服疫苗具有很好的发展前景。胃内含有胃酸和大量能使抗原降解的蛋白水解酶,是不利于疫苗发挥最佳效果的原因。耻垢分枝杆菌(M.s)是一类快速生长型分枝杆菌, M.s $mc^2$155是其中一种转化效率很高的突变株,生长快,1~3 h繁殖1代。国内外的研究证明M.s的RNA聚合酶可以有效识别BCG的启动子,本身是一种非致病菌和强细胞免疫佐剂,随着研究的深入,很多外源蛋白在M.s中获得表达,获得了较好的免疫效果。而且M.s本身的一些特性(抗酸、胞壁脂质含量高)使其能够穿过全消化道,抵抗不利因素如胃酸和酶的降解。

基于上述机制,我们设计了灌胃免疫来观察重组M.s对Hp的免疫保护效果[1,2]。一个好的疫苗除了有良好的效果外,更重要的是安全性。因此,本研究以GFP为报告基因,重组耻垢分枝杆菌疫苗通过灌胃免疫小鼠,免疫8周后,分别测定小鼠血清谷丙转氨酶和肌酐的含量、小鼠的体质量和各脏器的质量。结果表明:重组耻垢分枝杆菌疫苗对小鼠的肝、肾功能无影响。接受分枝杆菌重组疫苗免疫后的小鼠其体质量及各脏器质量与其他各组无差异,HE染色显示各重要脏器无明显异常。从整个结果分析来看,疫苗对小鼠无系统毒性作用。为进一步开发重组分枝杆菌治疗幽门螺杆菌打下了实验基础。

参考文献:

[1] 向廷秀,谯 敏,姜 政,等. 重组耻垢分枝杆菌制剂预防幽门螺杆菌感染的作用机理的初步探讨[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(11):1032-1036.

[2] 向廷秀,谯 敏,姜 政,等. 表达幽门螺杆菌外膜蛋白的重组耻垢分枝杆菌疫苗菌对小鼠的免疫保护作用[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(9):694-696,722.

[3] 向廷秀,谯 敏,姜 政,等. 共表达EGFP和UreB活载体疫苗的体内外稳定性研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2006,28(6):1011-1015.

[4] 吕 琳,曹红丹,王丕龙,等. 分枝杆菌穿梭表达质粒PJHSP70的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报,2008,30(10):890-893.

[5] Lu L, Cao H D, Zeng H Q, *et al*. Recombinant Mycobacterium smegmatis mc^2 155 vaccine expressing outer membrane protein 26 kDa antigen affords therapeutic protection against Helicobacter pylori infection [J]. Vaccine, 2009, 27(7): 972-978.

(编辑 王 红)