DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.015
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0687-03

论著

两种表达鼠精子受精素β蛋白的减毒沙门氏菌疫苗株的稳定性分析

李彦锋[1],靳风烁[1],何 畏[2],江 军[1],王洛夫[1],靳文生[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042;[2]附属西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 了解表达鼠精子抗原受精素β亚单位(Fertilinβ subunit, Fβ)的两种重组减毒沙门氏菌疫苗株X4632(pFEC)和X4550(pFEC)的生长特性和体内外携带重组质粒的稳定性。方法 将两种重组沙门氏菌疫苗株X4632(pFEC)和X4550(pFEC)体外传代培养,观察比较其生长特性和所含重组质粒的稳定性;将该两种重组菌口服免疫BALB/c雄性小鼠,观察重组菌侵入小鼠Peyer结、肠系膜淋巴结和脾脏等组织内繁殖生长情况和所回收重组菌携带质粒的阳性率。结果 该两种无抗药性的重组菌株在体内、外营养选择压力下均可较稳定携带重组质粒传代繁殖,X4550(pCFL)在体内可较稳定地定植于Peyer结、肠系膜淋巴结和脾脏;X4632(pCFL)可较稳定地定植于Peyer结,均可稳定表达被Fβ单抗识别的重组Fβ蛋白。结论 X4632(pFEC)、X4550(pFEC)疫苗株可作为递呈精子抗原的活菌载体。

关键词:沙门氏菌;疫苗;精子抗原;避孕
中图法分类号:R378.22;R392.11;R392.7 文献标识码:A

Comparison of the stabilities of two recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* strains expressing extracellular domain of mouse sperm fertilizin beta subunit

LI Yan-feng, JIN Feng-shuo, HE Wei, JIANG Jun, WANG Luo-fu, JIN Wen-sheng (Department of Urology, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To determine the stabilities of two recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* strains expressing extracellular domain of mouse sperm fertilizin beta subunit and their growth properties *in vitro* and *in vivo*. Methods The two recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* strains X4632(pFEC) and X4550(pFEC) were cultured for generations *in vitro*. Their stabilities bearing recombinant plasmids and the growth properties were observed and compared. BALB/c male mice were orally immunized with the two recombinant strains respectively. The number of *Salmonella* present in the Peyer patch, mesenteric lymph nodes and spleen and their positive rate of bacteria having recombinant plasmids were determined. Results The recombinant plasmid pFEC was stable in the strains under *in vitro* and *in vivo* condition. The recombinant strain X4550(pFEC) could be colonized in Peyer patches, mesenteric lymph nodes and spleen of BALB/c mice stably, but X4632(pFEC) could only be colonized in Peyer patches stably. Both could express recombinant extracellular domain of mouse sperm fertilizin protein recognized by the anti-fertilizin beta subunit monoclonal antibody. Conclusions Recombinant strains X4632(pFEC) and X4550(pFEC) are worthy to be studied to serve as live vaccine delivery vehicle for sperm antigen.

Key words: sperm antigen; *Salmonella typhimurium*; contraception; vaccine

应用沙门氏菌疫苗株表达精子受精素β蛋白构建口服避孕疫苗的研究国内外均未见报道。前期我们首次将受精素β蛋白作为靶抗原,将编码鼠精子受精素β胞外区蛋白的cDNA序列插入表达载体pYA3149,在大肠杆菌中成功构建了含有受精素β胞外区蛋白cDNA序列的重组质粒pFEC,并通过两次转化将重组质粒转入鼠沙门氏伤寒杆菌减毒疫苗株X4632、X4550中,获得两种重组沙门氏菌疫苗株X4550(pFEC)、X4632(pFEC)[1]。本研究将探讨该类重组菌作为递呈精子抗原活菌载体系统的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

含空载体菌X4632(pYA3149)、重组沙门氏菌株X4632(pFEC)、X4550(pFEC)均由本实验室构建;二氨基庚二酸(DAP)购自Sigma公司;F_β单抗购自Chemicon公司;Western blot试剂

基金项目:中国博士后科研基金资助项目(2002)
作者简介:李彦锋(1968-),男,山西省长子县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事前列腺增生、避孕疫苗方面的研究,发表论文17篇,现在北京大学第一医院泌尿外科研究所从事博士后科研工作。电话:(023)68757344
收稿日期:2001-12-06;修回日期:2002-03-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

盒购自 Roche 公司; BALB/c 雄鼠购自本校实验动物中心。

1.2 重组菌的生长特性分析

取含空质粒及重组质粒之 X4632、X4550 菌, 划线接种于 LB 固体培养基中, 37 ℃下培养 24 h 后分别挑取单菌落接种于 LB 液体培养基内, 37 ℃、180 r/min 下振摇培养过夜, 第 3 天各取 1 ml 菌液加入含 100 ml LB 培养基之烧瓶内, 37 ℃下剧烈振摇培养, 每 1 h 取菌液测 *A* 值, 绘制细菌生长曲线。

1.3 重组沙门氏菌疫苗株的体外稳定性试验

分别挑选重组菌 X4632(pFEC)及 X4550(pFEC)单菌落, 在不含和含有 DAP 的 LB 培养基中培养; 次日, 分别用不含 DAP 和含有 DAP 的 LB 培养基稀释 1 000 倍, 再培养, 重复 10 次; 最后分别取少量菌液均铺于含 DAP 的 LB 平皿上培养, 次日分别挑取 100 个菌落, 点种于不含 DAP 的 LB 平皿上培养, 观察其中菌落数量(CFU), 同时在每个不含 DAP 的平皿中随机各挑取 20 个菌落提取质粒。

1.4 重组沙门氏菌疫苗株在小鼠体内的定植特性及稳定性分析

取 BALB/c 小鼠 27 只, 随机分为 3 组, 口服接种两种重组菌及含空载体菌, 接种菌数为 2×10^9 CFU/只。以后每周每组分别取 3 只, 处死后取脾脏、Peyer 结(8~10 个)和肠系膜淋巴结行组织内活菌计数, 并各挑取 20 个菌落提取质粒。

1.5 SDS-PAGE 电泳和蛋白质免疫印迹分析

从小鼠脾脏、Peyer 结和肠系膜淋巴结组织中获得的重组菌 X4632(pFEC)及 X4550(pFEC)挑取单菌落接种培养至对数生长期。取 1 ml 菌液离心后常规法提取菌体蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 并按 Western blot 试剂盒操作说明进行免疫印迹分析。

1.6 重组菌的毒性试验

取 BALB/c 小鼠 30 只, 分为 5 组, 其中 4 组分别口服两种重组菌 1×10^{10}、1×10^{11}CFU, 阴性对照组口服等体积 PBS 溶液, 观察小鼠服菌后反应及存活率。

1.7 统计学处理

χ^2 检验。

2 结果

2.1 重组菌的生长特性

含空质粒菌及两种重组菌的时间/吸光度曲线见图 1。3 种菌株均生长良好, 并于 10~12 h 后达到最大细胞密度。

2.2 重组沙门氏菌疫苗株的体外稳定性分析

体外稳定性分析显示: X4632(pYA3149), X4632(pFEC)和 X4550(pFEC), 3 种菌在有选择压力条件下, 传代后生长于含 DAP 平皿上的各 100 个菌落在不含 DAB 的平皿上生长菌落数分别为 100、98 和 99 个, DAP 非依赖性细菌分别为 100%、98%和 99%; 各随机挑取 20 个菌落提取质粒, 显示 95%以上均含有空质粒或重组质粒。在无选择压力条件下, 生长于含 DAP 平皿上的各 100 个菌落在不含 DAP 的平皿上仅分别生长 90、84、87 个菌落, DAP 非依赖性细菌分别为 90%、84%和 87%; 随机挑取 20 个菌落提取质粒, 显示分别有 16、14、15 个含有空质粒或重组质粒, DAP 非依赖性细菌重组质粒的阳性率分别为 80%、70%和 75%。

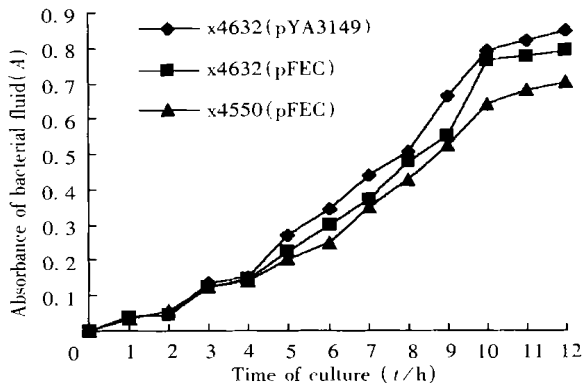


图1 两种重组菌及含空载体菌的生长曲线

Fig 1 Growth curves of recombinant strains

2.3 重组沙门氏菌疫苗株的体内稳定性分析

3 种菌口服接种小鼠后, 脾脏、Peyer 结和肠系膜淋巴结中定植的细菌计数结果见表 1; 两种重组菌均可成功定植于 Peyer 结, 随着接种时间的延长, 重组菌在 Peyer 结定植和存留的数量呈明显下降趋势; 空载体菌 X4632(pYA3149)和重组菌 X4632(pFEC)在肠系膜淋巴结定植的数量明显低于 X4550(pFEC)菌, 且随着时间延长, 其在肠系膜淋巴结定植的数量迅速下降甚至无阳性菌落形成; 这两种菌株在脾脏定植的数量更为低下, 在大部分小鼠脾脏中未观察到明显菌落形成; 而 X4550(pFEC)菌在肠系膜淋巴结和脾脏组织中的活菌计数与在 Peyer 结中相似。接种 1 周后, X4632(pYA3149)、X4632(pFEC)和 X4550(pFEC)组小鼠组织内活菌质粒阳性率分别为 100%, 95%和 100%; 2 周后质粒阳性率分别为 85%, 85%和 95%; 3 周后质粒阳性率分别为 80%, 75%和 90%; 可见两种重组菌所携带的质粒稳定性呈缓慢下降趋势, 但与空载菌相比, 它们的稳定性无显著性差别($P>0.05$)。

表1 小鼠脾脏、Peyer 结和肠系膜淋巴结的活菌计数($\log_{10}$, $\bar{x}\pm s$)

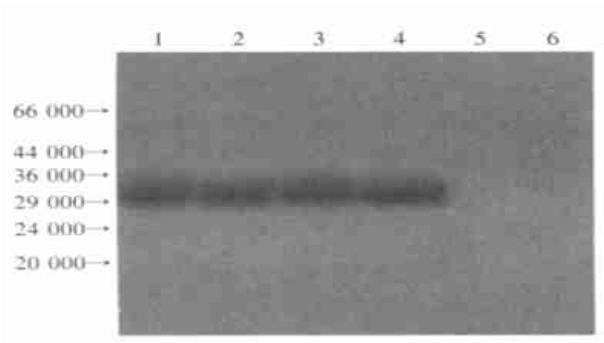
Tab 1 Bacterial counts(log10) of spleen, Peyer patches and mesenteric lymph nodes in mice infected with recombinant *S. typhimurium* ($\log_{10}$, $\bar{x}\pm s$)

Strains	Spleen			Peyer patches			Mesenteric lymph nodes		
	1 week	2 weeks	3 weeks	1 week	2 weeks	3 weeks	1 week	2 weeks	3 weeks
X4632(pYA3149)	1.10±0.14	—	—	3.94±0.21	3.29±0.04	2.63±0.12	3.05±0.09	2.26±0.21	1.35±0.13
X4632(pFEC)	—	—	—	3.99±0.29	3.28±0.11	2.68±0.17	2.90±0.50	2.06±0.16	1.56±0.31
X4550(pFEC)	4.01±0.14	3.11±0.10	2.59±0.13	4.09±0.25	3.00±0.07	2.69±0.10	3.94±0.09	3.04±0.27	2.55±0.13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　组织内回收重组菌的蛋白表达和免疫学分析

组织内回收重组菌的菌体蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 免疫印迹分析显示该类组织回收重组菌所表达的重组 F_β 胞外区蛋白与原冻存重组菌的免疫印迹条带完全一致, 约为 30 000 大小。同法回收含空载体的重组菌 X4632(pYA3149)未见阳性免疫条带, 见图 2。



1: Stock X4632 (pFEC); 2: X4632 (pFEC) recovered from tissue; 3: Stock X4550 (pFEC); 4: X4550 (pEFEC) recovered from tissue; 5: Stock X4632 (pYA3149); 6: X4632 (pYA3149) recovered from tissue

图 2　重组菌 **X4632(pFEC)**, **X4550(pFEC)**的 **Western blot** 分析

Fig 2　The Western blot result of the recombinant strains X4632 (pFEC), X4550 (pFEC)

2.5　重组菌的安全性

BALB/c 小鼠口服不同剂量重组菌 X4632(pFEC)、X4550(pFEC)疫苗株 30 d 后, 与对照组相比, 体质量无明显差别, 无活动异常等不良反应, 全部存活。

3　讨论

应用减毒沙门氏菌疫苗株表达原核基因开发针对特定性病原感染的疫苗研究已取得了令人瞩目的进展[2,3], 但在表达真核抗原尤其是生殖相关抗原方面的研究为数不多[4,5]。

受精素是一种顶体膜抗原, 定位于精子赤道节段和顶体内膜。表达含鼠 F_β 解离素结构域的重组蛋白可与鼠卵微绒毛区域结合[6], 而该区域正是精卵结合的部位。受精前, 在重组 F_β 中孵育鼠卵子或在抗解离素结构域抗体中孵育精子均可抑制体外受精时的精卵结合和融合。F_β 基因敲除小鼠的精子与透明带结合能力降低, 显示 F_β 可能亦参与了精子与卵透明带的结合。因而, F_β 可能成为免疫性避孕疫苗的潜在靶抗原。不过, 目前 F_β 的功能决定簇尚未完全确定, 现有的功能性研究多限于动物。本研究选用编码鼠 F_β 胞外区基因片段构建了重组沙门菌疫苗株 X4632(pFEC)、X4550(pFEC), 以了解该重组菌株用于诱导动物免疫避孕效应的可能性。

重组菌所携带的重组质粒的稳定性是保证其所编码基因稳定表达外源重组蛋白的关键。本研究表明: 在有选择压力下传代后的两种重组菌, 98%～100%均维持了对 DAP 的非依赖性, 且这些 DAP 非依赖性菌落所含重组质粒均保持较高稳定性, 95%以上均无重组质粒的丢失。而在无选择压力下传代后, 84%～91%的重组菌仍保持了其对 DAP 的非依赖性, 在保持了对 DAP 非依赖性特征的菌落中, 有 20%～30%的菌落已丢失了重组质粒, 而代之以在电泳下观察到的弥漫性染色。重组质粒丢失的原因可能是: ①无选择压力的存在, 使重组质粒从细胞内脱出; ②重组菌可能容易出现某种突变或质粒基因和细菌染色体基因之间易于发生重组而使其既保持了对 DAP 的非依赖性特征, 又丧失了其所携带的重组质粒。可见, 沙门菌疫苗株的平衡致死系统和选择压力的存在, 对该类菌株携带的外源重组质粒的稳定性起至关重要的作用。

重组菌在体内传代稳定性及在免疫组织定植研究显示: 重组菌 X4550(pFEC)可大量定植于 Peyer 结和脾脏, 尤其以定植于 Peyer 结的细菌数量最多。与应用表达原核基因的重组沙门菌株进行的研究结果相似[7]。随着时间的延长, 定植于免疫组织的细菌量呈逐渐下降趋势, 同时所含重组质粒的比例略有下降。提示: ①在诱导免疫动物时, 需适时应用已鉴定的重组菌进行必要的强化免疫; ②其侵袭于深部组织并传代繁殖的能力是有限的。因而, 该类疫苗株既可激发有效的特异性免疫反应, 又具有良好的安全性; 终止免疫后, 随着疫苗株在体内居留的数量减少, 抗重组抗原免疫反应将逐渐消退, 其诱导的免疫性避孕效应存在可逆性。

X4632 是 X4550 的新一代衍生株, 该类菌株除存在 *cya*、*crp* 基因的缺失突变而减毒外, 还存在 *cdt* 基因的缺失。该基因是调控菌株在深部组织的克隆形成, 其缺失对沙门氏伤寒杆菌定植肠道的能力无明显影响, 而使其侵入和存留于深部组织和器官如脾脏的能力明显降低[8]。

本实验显示该类重组菌在 Peyer 结定植的情况与 X4550 无显著差别, 但定植脾脏的能力显著降低, 与 Kelly 等[8] 的研究结果相似。X4632 侵袭于深部组织能力的降低表明该疫苗株比 X4550 具有更高的使用安全性。如果 X4632 在深部组织内定植能力的降低不影响其诱导免疫效应的能力, 那么该疫苗株将具有更好潜在应用价值。

参考文献:

[1] 李彦锋, 靳风烁, 何　畏, 等. 表达鼠精子抗原受精素β 胞外区的减毒沙门氏菌疫苗株的构建[J]. 中华男科学杂志, 2001, 7(4): 215－

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

219.

[2] Jagusztyn-Krynicka E K, Clark-curtiss J E, Curtiss R. Escherichia coli heat-labile toxin subunit B fusion with streptococcus sobrinus antigen expressed by salmonella typhimurium oral vaccine: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins[J]. Infect Immun, 1993, 61(3): 1004—1015.

[3] Redman T K, harmon C C, Lallone R L, *et al*. Oral immunization with recombinant salmonella typhimurium expressing surface protein antigen A of streptococcus sobrinus: dose response and induction of protective humoral response in rats[J]. Infect Immun, 1995, 63(5): 2 004—2 011.

[4] Sirinivasan J, Tinge S, Wright R, *et al*. Oral immunization with attenuated Salmonella expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract[J]. Biol Reprod, 1995, 53(2): 462—471.

[5] Kuang Y, Yan Y C, Gao A W, *et al*. Immune responses in rats following oral immunization with attenuated Salmonella typhimurium expressing human sperm antigen[J]. Arch Androl, 2000, 45(3): 169—180.

[6] Bigler D, Takahashi Y, Chen M S, *et al*. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit[J]. J Biol Chem, 2000, 275(16): 11 576—11584.

[7] Dunstan S J, Simmons C P, Strugnell R A. Comparison of the abilities of different attenuated Salmonella typhimurium strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen[J]. Infect Immun, 1998, 66(2): 732—740.

[8] Kelly S M, Bosecker B A, Curtiss R III. Characterization and protective properties of attenuated mutants of salmonella choleraesuis[J]. Infect Immun, 1992, 60(11): 4881—4890.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)08-0690-02

食管内支架治疗食管疾病10例疗效

Efficacy of stenting for esophaged diseases in 10 patients

赵俊胜，陈虎平，张先觉 （解放军324医院心胸外科，重庆 400020）

自1998年7月至2001年1月我院采用在透视下覆膜Ni-Ti记忆合金支架治疗食管疾病10例，现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组10例，男9例，女1例，年龄36～82岁，平均(65.4±15.2)岁。食管癌晚期8例，均经病理检查确诊，上段3例，中段4例，下段1例，狭窄长度3～8 cm，平均5 cm，其中能进半流3例，流汁1例，不能进水1例，合并食管气管瘘1例。外伤性食管破裂1例。食管良性狭窄1例。本组患者均有不同程度消瘦，尤以不能进水及食管良性狭窄患者出现恶病质；并发肺部、纵隔感染，发热2例。

1.2 器械

本组采用Savery锥形硅胶扩张器，支架置入器，覆膜Ni-Ti合金网状食管支架均由北京鑫泉记忆合金有限公司提供。支架直径1.8～2.0 cm，单喇叭口直径2.2 cm，长度6～12 cm，变相温度37～55 ℃，在0 ℃可任意变形。

1.3 治疗方法

食管良、恶性狭窄病人均先吞碘水，透视下了解狭窄部位、长度、程度、有无气管瘘或纵隔瘘等。再经口送入导引钢丝通过狭窄段，然后将球囊导管经导丝送入狭窄段，行球囊扩张，依次选用1.2～1.8 cm球囊予以扩张。完成扩张后，选择支架装入置入器，沿导丝送入支架输送系统，准确定位后，释放支架，使支架置留于狭窄段或瘘口处。术后先进半流饮食，两天后行普通饮食，禁饮食冰凉、质硬、含纤维较多食物。如有感染，给予有效抗生素治疗。如出现疼痛，出血等予对症处理。恶性肿瘤病人待体质恢复，营养改善后配合放、化疗及其它抗肿瘤综合治疗。

2 结果

本组10例病人均一次性放置成功，患者术后24 h均能顺利进食半流、普食，随访半年至3年，1例上段食管癌病变长3 cm，能进流汁，伴声音嘶哑，颈部淋巴结肿大，不能手术，行支架植入后长期疼痛，经对症治疗，效果不佳，未行放、化疗，3个月后因脑转移死亡。死亡前仍能进食半流食物。余患者6例能进普食，3例能进半流饮食，生存时间半年至3年。食管气管瘘患者术后再未出现呛咳现象。外伤性食管破裂患者两周后经胃镜取出支架，治愈。有1例82岁食管良性狭窄病患者置管2年，生活能自理，能进普通饮食。现有患者体质量增加，营养状况改善，生活质量明显提高。术后患者疼痛5例，4例经对症治疗缓解，1例长期疼痛。术后出血4例，对症治疗后治愈。1例食管穿孔，患者食管完全梗阻，不能进水，在置入导丝时，在肿瘤部位稍用力，不慎穿破食管(造影剂外溢)迅速退出导丝，沿狭窄开口，缓慢旋转导丝，通过狭窄段，选用0.6～1.2 cm球囊扩张，再置入支架，术后食管穿孔自行愈合。

3 讨论

晚期食管癌患者几乎无一例外面临吞咽困难，以前常用减

（下转694页）

作者简介：赵俊胜(1968—)，男，安徽省相城市人，主治医师，主要从事食管疾病临床方面的研究，发表论文5篇。电话：(023)68762061

收稿日期：2002-04-12；修回日期：2002-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net