

减毒鼠伤寒沙门菌防龋疫苗的免疫防龋效果

胡晓莉, 凌均棨

(中山大学光华口腔医学院, 广东 广州 510060)

摘要: 【目的】采用减毒鼠伤寒沙门菌 *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A) 防龋疫苗经不同途径免疫定菌大鼠, 观察其对变形链球菌在大鼠牙面黏附、龋病发生的影响等免疫防龋效果。【方法】将 50 只大鼠随机分组, 经口服、皮下、黏膜下途径免疫, 接种变形链球菌并给致龋饲料。对各组大鼠口腔中变形链球菌的定居菌落进行计数、黏附率计算, 收集大鼠颌骨标本, 根据 Keyes 评分标准作龋齿计分统计。【结果】口服活菌苗 *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A) 组变形链球菌数为 $(3.4 \pm 1.4) \times 10^4$ CFU; 磨牙龋齿 Keyes 计分总和为 30.7 ± 6.0 , 均明显低于其它组 ($P < 0.05$)。【结论】口服 *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A) 活菌苗可抑制变形链球菌黏附于牙面, 并能减少龋病发生, 具有较好的防龋效果。

关键词: 沙门氏菌, 鼠伤寒/免疫学; 变形链球菌; 疫苗, 减毒; 龋齿

中图分类号: R781.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)04-0257-03

Effect of Recombinant Attenuated *Salmonella Typhimurium* Vaccine on the Colonization of *Streptococcus Mutans* and the Development of Dental Caries in Rats HU Xiao-li, LING Jun-qi. (College of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract 【Objective】To investigate the effect of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine which carries the surface protein of *pac* gene A region on the colonization of rats' teeth by *Streptococcus mutans* and the development of dental caries in gnotobiotic rats. 【Methods】50 Sprague-Dawley rats were immunized with *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A) expressing surface protein of PAc A region of 35ku by oral immunization, subcutaneous injection, and submucous injection respectively. *S. Mutans* were inoculated onto rats teeth and the rats were fed with caries-inducing diet 2000#. The numbers of colonized *S. mutans* were counted and the presence of caries was examined by the procedure of Keyes. 【Results】Mandibular molars from rats immunized with *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A) by oral immunization had lower numbers of recoverable *Streptococci* [$(3.4 \pm 1.4) \times 10^4$ CFU] and carious lesions (30.7 ± 6.0) than those from immunized subcutaneously, submucously and those nonimmunized ($P < 0.05$). 【Conclusion】The recombinant attenuated *S. typhimurium* can parasitize in intestinal tract for a long time and be safe for the rats. The oral vaccine may be an effective way to prevent the colonization of *S. mutans* and can confer protection against dental caries.

Key words: *Salmonella Typhimurium*/ immunology; *Streptococcus Mutans*; vaccines, attenuated; dental caries

龋病是一种细菌感染性疾病。变形链球菌(简称变链菌)是人类龋病的主要致病菌。变形链球菌的表面存在多种毒力因子, 如: 壁相关蛋白、血清特异性抗原、壁脂磷壁酸以及肽聚糖等。其中一种相对分子质量为 190 的细胞表面蛋白 PAc 在介导变形链球菌对牙面获得性膜的黏附及促进变形链球菌之间的聚集方面起重要作用。使用变链菌表面蛋白 *pac* 基因转化活菌载体, 通过减毒活菌表达该蛋白进行主动免疫, 是基因工程防龋疫苗研究的重要内容。本研究利用携带 *pac* 重组基因的减毒鼠伤寒沙门菌 *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A)^[1,2] 免疫定菌 SD 大鼠, 观察其对变形链球菌在大鼠牙面黏附、龋病发生的影响等免疫防龋效果。

1 材料与方法

1.1 制备接种样品

将减毒鼠伤寒沙门菌 *S. typhimurium* SL3261 与基因重组鼠伤寒沙门菌 *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A)^[1,2] 分别接种至 LB 及 LB-Amp 液体培养基中。37 °C, 200 r/min 摇床培养至 $A_{590} = 0.55$, 2 000 r/min, 10 min 离心收菌。菌体用 PBS 稀释至浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液。取浓度为 10^8 CFU/mL 部分重组鼠伤寒沙门菌 *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A) 20 mL 用 5 g/L 甲醛灭活, PBS 洗涤 3 次, 取沉淀细菌, 用生理盐水调整浓度至 10^8 CFU/mL (用于皮下及黏膜下免疫)。将活化变形链球菌 Ingbritt (血清 c 型) 于 3

收稿日期: 2001-10-30

基金项目: 广东省自然科学基金资助课题(编号 970105)

作者简介: 胡晓莉(1973-), 女, 满族, 湖北武汉人, 硕士, 住院医师, 凌均棨, 导师。

mL 牛心脑浸液(BHI)培养基中。取菌液划线培养于BHI固体培养基上,挑取典型单菌落,接种于BHI液体培养基,37℃,按体积比80% N₂、10% CO₂、10% H₂混合气体培养18 h。调整菌浓度为10⁹ CFU/mL。

1.2 免疫方案

将出生22 d雌性SD大鼠50只随机分成5组,每组10只。实验分组为:A, *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A)口服免疫组;B,灭活*S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A)皮下免疫组;C,灭活*S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A)黏膜下免疫组;D, *S. typhimurium* SL3261口服免疫组;E, PBS+1.25 g/m³氟化饮水组。均于出生后22 d断奶,记录体质量,并于出生后23、24 d给予普通饲料和含抗生素的无菌饮水。于鼠龄26 d、27 d、28 d连续3天给幼鼠口腔用无菌棉签接种变形链球菌Ingbritt,每次每只幼鼠口腔中接种量为接种培养液50 μL,立即给予大鼠致龋饲料2000[#]。分别于鼠龄26 d、27 d、33 d、34 d接种减毒鼠伤寒沙门菌疫苗4次。口服组免疫开始前4 h,大鼠禁食、禁水。给予40 μL 100 g/L的碳酸钠溶液5 min后,给予制备好的口服菌液50 μL(10⁸ CFU/mL)。口服接种30 min后恢复饮水、饲料供应。皮下组选择背部皮肤,消毒后,将皮肤提起,注射针头取一钝角穿刺于皮下。黏膜下组选择口腔颊部黏膜进行注射免疫。皮下组、黏膜下组免疫接种量均为50 μL(10⁸ CFU/mL)。

1.3 菌斑样本的采集及菌落计数

于刚断奶(鼠龄22 d)、使用抗生素饮水后(鼠龄25 d)及细菌接种后(鼠龄29 d),采集大鼠口内牙面菌斑样本分析。实验结束前(鼠龄60 d),再次取样接种于MS平皿及BHI平皿,取合适稀释倍数的菌液涂板,体视显微镜下判断变形链球菌落数及总菌落数。

1.4 龋齿计分

鼠龄60 d时,将大白鼠处死,分离颌骨,用0.4 g/L紫脲酸铵染色后切片,参照Keyes(1958)经典评分方法,于体视显微镜下观察磨牙患龋情况。

2 结果

2.1 各实验组大白鼠口腔内变形链球菌的黏附水平

大白鼠断奶后第1次及应用抗生素饮水后,用

棉拭子取大鼠后牙𪚩面及前牙唇面的菌斑,样本经稀释后接种于MS固体培养基,培养结果显示未发现变形链球菌的定居。鼠口腔内接种致龋菌变形链球菌*S. mutans* Ingbritt后(鼠龄29 d),已检测到鼠口腔内已有*S. mutans* Ingbritt的定居。实验结束时(鼠龄60 d)取各组大鼠口腔内的细菌样本,各组变形链球菌的黏附水平见表1。

表1 接种30 d后各实验组变形链球菌黏附水平

Table 1 Colonization of *S. mutans* in the oral cavities of rats 30 days after inoculation ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	<i>S. mutans</i> (× 10 ⁴ CFU)	Total colony (× 10 ⁵ CFU)	Percentage(%)
A	10	3.4 ± 1.4	7.0 ± 0.6	6.1 ± 0.6
B	10	16.1 ± 2.1	13.2 ± 4.6	12.3 ± 2.5
C	10	17.6 ± 3.6	14.1 ± 6.5	14.1 ± 3.2
D	10	26.9 ± 11.2	19.1 ± 5.6	16.2 ± 5.7
E	10	15.9 ± 4.1	13.5 ± 4.1	13.7 ± 2.2

ANOVA analysis: $P < 0.05$; SNK- q test, group A is lower than other groups. $P < 0.05$

2.2 各实验组大白鼠磨牙龋坏情况比较

各实验组定菌鼠磨牙均有不同程度的龋损发生,但龋坏的范围、发生部位和严重部位各不相同(表2)。各实验组均未见邻面龋,仅见𪚩面窝沟釉质龋、轻度牙本质龋、颊舌面釉质龋。

3 讨论

利用减毒鼠伤寒沙门菌作为外源抗原的载体,制备淋病、疟疾、丙型肝炎等疫苗,已证明能有效诱生相应的保护性免疫反应^[3]。本实验室利用减毒株为Stocker^[4]构建*aro*基因突变株SL3261。由于该菌株*aro*基因丧失,芳香族化学合成途径阻断,菌体在得不到外源芳香族化合物的条件下,不能增殖,毒力随之丧失。我们将变形链球菌*pac*基因829至1778位覆盖SBR中心区域的片段通过对SL3261的分子克隆,构建了可表达*pac*基因A区片段的基因重组的减毒鼠伤寒沙门菌SL3261(pET-17b/A)^[1]。给Balb/c小鼠口服免疫证明可以提高小鼠唾液SIgA及血液IgG水平。

本研究将基因重组的减毒鼠伤寒沙门菌SL3261(pET-17b/A)经不同途径免疫定菌大鼠,未观察到大鼠有腹泻、毛松、萎靡等不良反应,实验结束时各组大鼠体质量亦无明显差异。在实验中,皮下、黏膜下免疫时用灭活菌苗,因为活菌苗易引起

表2 各实验组鼠磨牙龋坏 Keyes 计分
Table 2 The Keyes' score of rats molars caries

Group	n	Sulcal surface		Smooth surface	Total ⁴⁾
		Enamel caries ¹⁾	Dentinal slight ²⁾	Enamel caries ³⁾	
A	10	15.7±4.7	4.6±3.6	10.4±3.5	30.7±6.0
B	10	18.0±5.4	10.9±5.0	15.6±3.9	45.7±8.4
C	10	16.3±6.9	10.5±3.5	15.1±2.4	41.9±4.1
D	10	21.4±4.5	17.0±4.4	24.0±4.7	63.7±3.9
E	10	18.4±5.3	3.0±3.1	7.6±1.5	31.3±4.5

1) ANOVA analysis, $P > 0.05$; 2) SNK- q analysis, compare group A, E to group B, C, D, $P < 0.05$; 3) SNK- q analysis, group D is higher than others; 4) SNK- q analysis group D is highest, group B, C followed, and A, E is the lowest

局部皮下脓肿。

经口免疫 *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A) 组其口腔牙面变链菌黏附水平明显低于其它 4 组, 龋齿计分结果表明, 经口免疫 SL3261 (pET-17b/A) 的定菌鼠磨牙龋齿计分明显降低, 而与氟化饮水组的磨牙龋齿计分无显著性差异。研究认为, 防龋疫苗 SL3261 (pET-17b/A) 为减毒活疫苗, 在体内可大量合成目标抗原 SBR, 诱导粘膜免疫, 产生抗 PAc 特异性 SIgA 和 IgG 抗体, 抑制变形链球菌对牙面的黏附, 从而产生防龋效果。口服免疫是一种简单、有效的免疫途径。Redman^[5] 以基因重组的减毒鼠伤寒沙门氏 X4072 (PYA 2905) 经口免疫定菌大鼠, 诱导出较高水平的唾液 SIgA 及血液 IgG 水平, 并发现茸毛链球菌 (*S. Sobrinus*) 菌落数及总菌落黏附数均低于对照组, 与本实验结果相似。目前的研究认为抗体水平、变链菌黏附、龋齿发生之间存在着密切的关系, 即抗体水平高, 变链菌黏附数量低时, 龋齿发生会减少。

值得注意的是, 本次实验中, 氟化饮水组细菌的黏附水平并无减少, 这反映了低浓度氟化饮水并不能抑制细菌黏附。有文献报道, 浓度达到 1 000 g/m³ 氟才会有明显抑制细菌生长的作用。Van Loveren^[6] 认为氟化物对菌斑的影响与其防龋作用关系不大。普通情况下氟化饮水主要是通过牙釉质作用而起到防龋作用^[7]。

本实验证实口服基因重组的减毒鼠伤寒沙门菌 *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A) 免疫定菌鼠后, 在肠道能较持久的定居并能较稳定的携带质粒, 可抑制变形链球菌的黏附、减少龋病的发生。提示重组的减毒鼠伤寒沙门菌作为一种新的基因工程防龋疫苗具有进一步的研究价值。

参考文献:

- [1] 陈 罕, 凌均荣, 杨国平. 变形链球菌表面蛋白 pac 基因 A 区片段在减毒鼠伤寒沙门氏菌的表达[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4S): 68.
- [2] 陈 罕, 凌均荣, 林正梅, 等. 基因重组鼠伤寒沙门氏菌防龋疫苗的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001, 11(1): 5.
- [3] Sirard J C, Niedergang F, Kraehenbuhl J P. Live attenuated Salmonella: a paradigm of mucosal vaccines[J]. Immunol Rev, 1999, 171(1): 5.
- [4] Stocker B A. Aromatic-dependent Salmonella as live vaccine presenters of foreign epitopes as inserts in flagellin[J]. Res Microbiol, 1990, 141(7): 787.
- [5] Redman T K, Harmon C C, Lallone R L, et al. Oral immunization with recombinant Salmonella typhimurium expressing surface protein antigen A of Streptococcus sobonus: dose responses and induction of protective humoral responses in rats[J]. Infect Immun, 1995, 63(5): 2004.
- [6] Van Loveren C. The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition[J]. J Dent Res, 1990, 69 (Spec): 676.
- [7] 岳松龄. 现代龋病学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 178.

(编辑 刘清海)