

实验研究

基因重组乳链球菌防龋疫苗免疫性的实验研究

凌均荣¹, 汪喻忠², 蒋少云¹

(1. 中山医科大学口腔医学院, 广东 广州 510055; 2. 湖北医科大学口腔医学院, 湖北 武汉 430079)

摘要:【目的】测定基因重组乳链球菌防龋疫苗的免疫原性和免疫反应性。【方法】用基因重组乳链球菌(HL 107)、乳链球菌(LM 0230)、变形链球菌 Ingbritt 分别灌胃免疫实验动物 BALB/c 鼠, 与未免疫组作对照, 以酶联免疫吸附实验(ELISA)测定血清及唾液中的抗变形链球菌表面蛋白 PAc 的特异性 IgG 和 IgA。【结果】基因重组乳链球菌组血清中抗 PAc-IgG 水平明显高于乳链球菌组($P < 0.01$)、变形链球菌组($P < 0.05$)和未免疫组($P < 0.01$), 唾液中重组乳链球菌组抗 PAc-IgA 抗体水平明显高于乳链球菌组($P < 0.01$)和未免疫组($P < 0.01$), 与变形链球菌组无差别($P > 0.05$), 血清 IgA 和唾液 IgG 的水平在 4 组中均无差别($P > 0.05$)。【结论】基因重组乳链球菌具有变形链球菌表面蛋白的免疫原性, 能够在 BALB/c 鼠中产生特异性免疫反应。

关键词: DNA, 重组; 乳链球菌; 龋病/预防和控制; 疫苗, 合成

中图分类号: R783.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04-0241-04

Experimental Study on the Immunity of Recombinant *Streptococcus Lactis* Anticaries Vaccine

LING Jun-qi¹, WANG Yu-zhong², JIANG Shao-yun¹

(1. College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510055;

2. College of Stomatology, Hubei Medical University, Wuhan 430079, China)

Abstract: 【Objective】 To test the immunogenicity and immunoreactivity of recombinant *S. lactis*. 【Method】 The intragastric immunization was performed individually with gene recombinant *S. lactis* (HL 107), *S. lactis* (LM 0230) and *S. mutans* Ingbritt in BALB/c mice. Saliva and serum samples were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 【Result】 The recombinant *S. lactis* were more effective in inducing PAc-specific serum IgG antibodies in BALB/c mice than the other groups when given intragastrically ($P < 0.05$). The level of PAc-specific salivary IgA in the group of recombinant *S. lactis* was higher than the other groups ($P < 0.01$) except *S. mutans* Ingbritt ($P > 0.05$). PAc-specific salivary IgG and PAc-specific serum IgA in all groups showed no difference ($P > 0.05$). 【Conclusion】 The gene recombinant *S. lactis* possesses an immunogenicity of *S. mutans* surface protein antigen and induces specific immune response in BALB/c mice.

Key words: DNA, recombination; *streptococcus lactis*; caries/prevention & control; vaccines synthetic

龋病是一种细菌感染性疾病, 变形链球菌是主要的致病因子。目前认为免疫学防治是控制龋病的有效手段之一。应用分子生物学基因工程技

术合成带有变形链球菌表面蛋白(PAc)的抗原结构基因(pac)的重组乳链球菌防龋疫苗, 进行人工自动免疫, 刺激机体产生免疫应答, 从而提高抗龋

收稿日期: 1999-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(39270720)

作者简介: 凌均荣(1953-), 女, 四川宜宾人, 博士, 教授, 长期从事牙体牙髓病学、有关龋病病因及防治的研究工作, 尤其是对变形链球菌等主要致龋菌进行了深入的分子生物学研究, 发表有关研究论文 30 篇。

能力的研究。本研究组已完成基因重组、克隆和重组体的分析鉴定等工作^[1-3]。为观察乳链球菌重组体的免疫原性和免疫反应性,本研究对实验动物 BALB/c 鼠进行了基因重组乳链球菌防龋疫苗的灌胃免疫,并以酶联免疫吸附实验(ELISA)进行抗 PAc 的血清和唾液特异性 IgG 和 IgA 的测定。

1 材料和方法

1.1 菌种与培养基

重组乳链球菌 HL 107(pLF107)接种于含有 5 mg/L 红霉素的 LM 17 培养基中,30 °C 培养 48 h。乳链球菌 LM 0230,接种于 LM 17 培养基中,30 °C 培养 48 h。变形链球菌 Ingbritt,接种于 LM 17 培养基中,37 °C 厌氧培养 48 h。

1.2 主要试剂

变形链球菌表面蛋白抗原 I / II 冻干标准品(美国阿拉巴大学教授 Russell MW 赠送)。羊抗鼠 IgG、IgA,人 IgG,碱性磷酸酶标记抗人 IgG 抗体,碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG 皆为华美生物工程公司产品。

1.3 主要仪器设备

UV-265 紫外分光光度计(日本岛津),516MC 微型 ELISA 自动检测仪(中国上海)。

1.4 聚苯乙烯酶标性能的检测

取 1:100 人 IgG 100 μ L 包被微量板凹孔后,每孔内加入 1:100 碱性磷酸酶(AP)标记抗人 IgG 抗体结合物,37 °C 温育 1 h, PBST 洗涤 5 次,每次 3 min,干燥。加入 100 μ L 4-硝基酚磷酸盐(1 g/L)反应底物显色。分别测得每孔 $\lambda=405$ nm 时的吸光度值 A_{405} ,相邻两孔间 A_{405} 平均值与总平均值之差在 0.007~0.121 之间,即相邻两孔的吸光度值的平均值与总平均值的误差在 0.5%~8.5% 之间,即符合要求(误差在 0%~10% 之间,聚苯乙烯酶标板的性能达到要求),表明此批聚苯乙烯酶标板固相吸附性能良好,误差较小。

1.5 重组乳链球菌的口腔免疫

活化重组乳链球菌 HL 107(pLF107)、乳链球菌 LM 0230,30 °C 培养 48 h。活化变形链球菌 Ingbritt,37 °C 厌氧培养 48 h。使细胞生长约至 8×10^8 /mL ($A_{600}=1.0$)。8 000 r/min(型号 GS-15R,半径 9 cm)离心 10 min,弃上清。用 0.5 mL 0.5% 福尔马林悬浮沉淀细胞,制成细菌悬液。选 8 周龄

雄性鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只,第 1~3 组分别免疫上述 3 种细菌,第 4 组为未免疫对照组。用插管针取细菌悬液对小鼠灌胃,剂量为 0.5 mL/只,于第 1 周连续 3 d,每天 1 次,4 周后用同样的抗原进行加强免疫,第 6 周再免疫 1 次,第 7 周收集唾液和血液样本。每只小鼠腹腔注射 0.5 mL (12.5 g/L) 巴比妥麻醉,同时腹腔注射 0.4 mL 硫酸毛果云香碱(2 g/L),刺激唾液溢出,取唾液和血清标本,-20 °C 保存待测。

取提纯的变形链球菌表面蛋白抗原冻干品溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 9.6)中,将 10 mg/L PAc 抗原溶液加入聚苯乙烯微量酶标板孔中,每孔 100 μ L,置于 4 °C 冰箱过夜,次日弃去孔内抗原包被液,每孔加入 300 μ L PBST 洗涤 5 次,每次 3 min,干燥。每微量孔加入 3% BSA/PBST 200 μ L,37 °C 温育 90 min,弃去封闭液,PBST 洗涤 5 次,每次 3 min,干燥。将待检大白鼠血清、唾液分别按 1:50、1:20 的比例用 PBST 稀释,混匀。每孔加样 10 μ L,每样本一式 3 份,37 °C 温育 2 h,弃去孔内样本液,用 PBST 洗涤 5 次,每次 3 min,干燥。选择好二抗的工作浓度,用 3% BSA/PBST 稀释羊抗鼠 IgG,使其终浓度为 5 mg/L,用 3% BSA/PBST 稀释羊抗鼠 IgA,使其工作浓度 1:1 000。每孔中加入羊抗鼠 IgG、IgA 100 μ L,4 °C 过夜。次日弃去孔内余液,用 300 μ L PBST 洗涤 5 次,每次 5 min,干燥。选择好三抗的工作浓度,用 3% BSA/PBST 稀释碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG,使其终浓度 1:10 000。每孔内加入 100 μ L 的酶标兔抗羊 IgG,37 °C 温育 4 h,用 300 μ L PBST 洗涤 5 次,每次 3 min,干燥。每孔内加入 100 μ L (1 g/L) 4-硝基酚磷酸盐溶液(4-Nitrophenylphosphate),37 °C 温育 30 min,反应呈淡黄色。每孔加入 50 μ L H₂SO₄ (2 mol/L) 终止反应,随后孔内颜色稍有加深。样本于 $\lambda=405$ nm 处测定光吸收值 A_{405} ,计录实验结果,求每个样本三孔平均吸光值。

2 结果

重组乳链球菌 HL 107、乳链球菌 LM 0230、变形链球菌 Ingbritt 免疫 BALB/c 鼠后唾液、血清抗体形成水平的 ELISA 分析,比较各实验组 BALB/c 鼠血清、唾液中抗 PAc-IgG、PAc-IgA 抗体形成水平情况。结果显示各实验组的血清中抗 PAc-IgG

抗体形成水平不同, F 检验有显著性差异 ($F = 18.331, P < 0.01$, 如表 1), q 检验两两比较结果显示: 重组乳链球菌 HL 107 灌胃组血清抗 PAc-IgG 抗体水平明显高于乳链球菌组、变形链球菌组和未免疫组, 有统计学意义 (P 值分别 < 0.01 、 < 0.05 、 < 0.01)。各实验组中血清抗 PAc-IgA 抗体水平有统计学差异 ($F = 2.863, 0.01 < P < 0.05$, 如表 2), 但 q 检验两两比较时重组乳链球菌 HL 107 组与其它 3 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。各实验组唾液中抗 PAc-IgA 抗体水平比较结果显示有统计学差异 ($F = 7.27, P < 0.01$, 如表 3), q 检验两两比较时重组乳链球菌 HL 107 组中抗 PAc-IgA 抗体水平明显高于未免疫组 ($P < 0.01$)、乳链球菌 LM 0230 组 ($P < 0.01$), 但与变形链球菌 Inbrigt 组无差别 ($P > 0.05$)。唾液中抗 PAc-IgG 抗体水平比较 4 组均无差别 ($P > 0.05$, 如表 4)。

表 1 BALB/c 鼠的血清中抗 PAc 特异性 IgG 反应

Table 1 Serum PAc-specific IgG responses

in BALB/c mice ($n = 10$)

Immunogen	A_{405}	F	P
<i>S. lactis</i> HL 107	1.225±0.120		
<i>S. lactis</i> LM 0230	1.091±0.057	18.331	< 0.01
<i>S. mutans</i> Ingbritt	1.339±0.122		
None	1.085±0.043		

表 2 BALB/c 鼠的血清中抗 PAc 特异性 IgA 反应

Table 2 Serum PAc-specific IgA responses

in BALB/c mice ($n = 10$)

Immunogen	A_{405}	F	P
<i>S. lactis</i> HL 107	0.066±0.026		
<i>S. lactis</i> LM 0230	0.066±0.040	2.863	$0.01 < P < 0.05$
<i>S. mutans</i> Ingbritt	0.102±0.033		
None	0.063±0.037		

表 3 BALB/c 鼠的唾液中抗 PAc 特异性 IgA 反应

Table 3 Salivary PAc-specific IgA responses

in BALB/c mice ($n = 10$)

Immunogen	A_{405}	F	P
<i>S. lactis</i> HL 107	0.134±0.034		
<i>S. lactis</i> LM 0230	0.076±0.029	7.27	< 0.01
<i>S. mutans</i> Ingbritt	0.105±0.032		
None	0.074±0.038		

表 4 BALB/c 鼠的唾液中抗 PAc 特异性 IgG 反应

Table 4 Salivary PAc-specific IgG responses

in BALB/c mice ($n = 10$)

Immunogen	A_{405}	F	P
<i>S. lactis</i> HL 107	0.038±0.028		
<i>S. lactis</i> LM 0230	0.036±0.034	0.2557	> 0.05
<i>S. mutans</i> Ingbritt	0.031±0.020		
None	0.040±0.025		

3 讨 论

3.1 龋病的免疫学防治

不论是发展中国家还是发达国家龋病都是最普遍、医疗耗资最高的疾病之一^[4]。Lehner^[5]认为一种有效的免疫应答能够影响龋病过程。由于口腔微环境及牙齿组织的特殊性, 尽管在天然情况下人类本身具有对变形链球菌产生体液免疫和细胞免疫的潜能, 然而这种免疫反应往往是无效的。因此, 加强免疫学反应是目前口腔龋病防治的研究热点。现已普遍认同变形链球菌的表面蛋白介导其粘附牙面和自身聚集过程, 国内外学者应用分子生物学和免疫学的成就开始了变形链球菌的免疫研究, 包括变形链球菌表面蛋白抗原基因的克隆和序列分析、基因重组疫苗、合成肽疫苗和单克隆抗体的研究和应用^[6-9]。基于乳链球菌的安全性, 其已长期被用于生产日常产品如酸奶和奶酪, 因此它是最适合用于生产口服疫苗的宿主菌之一。本课题旨在构建能生产变形链球菌表面蛋白的乳链球菌菌株, 研制基因重组防龋疫苗。现已完成基因重组克隆和重组体的分析鉴定等工作, 本实验利用酶联免疫吸附实验检测基因重组乳链球菌对实验动物的免疫原性和免疫反应性。

3.2 抗 PAc-IgG、抗 PAc-IgA ELISA 检测结果与分析

免疫球蛋白 G (IgG) 是血清 Ig 的主要成分, 占全部 Ig 的 75%, 为抗细菌、抗外毒素、抗病毒和抗真菌的重要抗体。虽然免疫球蛋白 G 在血清 (1.25 g/L)、龈沟液 (0.35 g/L) 和唾液中均占一定比例^[6], 但血液中的免疫球蛋白 G 主要是通过穿过龈沟上皮进入龈沟液中发挥作用来抑制变形链球菌在牙面的定居。在变形链球菌全细胞细胞壁、抗原 I / II 及葡糖基转移酶的人工自动免疫研究中, 人们常以各种方法测定 IgG 的产生量, 对疫苗

的免疫原性及其所引起的免疫应答进行分析和评价^[5,6,10]。分泌型 IgA 是唾液中的一种有效防止龋病的抗体成分,能抑制变形链球菌在牙面的粘附。Hajishengallis 等^[9]研究发现变形链球菌对羟基磷灰石的粘附能力被分泌型 IgA 抑制。Katz 等^[10]报告用抗原 I / II 和 CTB 鼻内免疫普通鼠和定菌鼠产生唾液免疫应答,可以防止变形链球菌的定居及龋病的形成。

本研究以抗体作为指标,测定 BALB/c 鼠血清及唾液中抗 PAc-IgG、抗 PAc-IgA 水平,主要目的是观察基因重组乳链球菌免疫能否引起 BALB/c 鼠对变形链球菌表面蛋白抗原(PAc)的免疫应答反应。结果提示重组乳链球菌 HL107 组血清中 IgG 明显高于乳链球菌组($P < 0.01$)、变形链球菌组($P < 0.05$)和未免疫组($P < 0.01$),同时重组乳链球菌组的唾液中抗 PAc-IgA 的水平明显高于乳链球菌组($P < 0.01$)和未免疫组($P < 0.01$),与变形链球菌组产生同样的免疫反应($P > 0.05$)。而与龋病保护性免疫无关的血清 IgA 和唾液 IgG 的水平在 4 组中均无差别($P > 0.05$)。说明携带变形链球菌表面蛋白抗原基因的重组乳链球菌免疫 BALB/c 鼠后, BALB/c 鼠产生了特异性免疫应答及免疫表达产物血清抗 PAc-IgG 和唾液抗 PAc-IgA,提示重组乳链球菌可以作为一种新的免疫原用于龋病的免疫学预防。

参考文献:

- [1] 凌均荣,樊明文. 基因重组乳链球菌的研究 I: 质粒的提取和纯化[J]. 口腔医学纵横, 1993, 9(4): 195.
- [2] 凌均荣,樊明文. 基因重组乳链球菌防龋疫苗的研究 II: 变形链球菌结构基因重组质粒对乳链球菌的克隆

- []]. 华西口腔医学杂志, 1994, 12(2): 86.
- [3] 凌均荣,樊明文. 变形链球菌 pac 基因在乳链球菌中的表达[J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(4): 241.
- [4] Michalek S M, Childer N K. Development and outlook for caries vaccine[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1990, 1(1): 37.
- [5] Lehner T. Immunology of dental caries in immunology of oral disease[M]. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992. 68.
- [6] Wu H Y, Russell M W. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant[J]. Vaccine, 1998, 16(2-3): 286.
- [7] Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, et al. Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c streptococcus mutans [J]. Mol Microbiol, 1989, 3(2): 221.
- [8] Takahashi T, Matsushita K, Nisizawa T, et al. Genetic control of immune response in mice to synthetic peptides of a streptococcus mutans surface protein antigen [J]. Infect Immun, 1992, 60(2): 623.
- [9] Hajishengallis G, Nikolova E, Russell M W. Inhibition of streptococcus mutans adherence to saline coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to the cell surface protein antigen I / II: reversal by IgA 1 protease cleavage[J]. Infect Immun, 1992, 60(12): 5057.
- [10] Katz J, Harmon C C, Buckner G P, et al. Protective salivary immunoglobulin A response against streptococcus mutans infection after intranasal immunization with S. mutans antigen coupled to the B subunit of cholera toxin [J]. Infect Immun, 1993, 61(5): 1964.

(编辑 关淡庄)

· 书 讯 ·

欢迎订阅《基础分子细胞生物学》

中山医科大学郭晔华教授编著的《基础分子细胞生物学》(Basic Molecular Cell Biology), 承蒙广东优秀科技专著出版基金会推荐, 已由广东科技出版社于今年 5 月份正式出版。该书概括了现代分子细胞生物学的主要内容, 并结合了医学相关知识及反映细胞和分子生物学发展的前沿和研究热点。全书 15 章, 共计 53 万字, 368 页, 书中有大量简明插图。可供高等医药院校、综合性大学生物系、农业院校及畜牧兽医专业的广大师生、科技工作者和研究生阅读参考。欢迎直接向中山医科大学教材科订购, 每本定价 50 元。书款(含邮费 15%)通过邮局汇款或银行转帐均可。购书发票将随书寄出。

邮局汇款地址: 广州市中山二路 74 号中山医科大学教材科 邮编: 510089 电话: (020)87331203 联系人: 古天
银行转帐帐号: 202-2613003-76 开户行: 广州市建行执信办 开户名称: 中山医科大学