



研究报告

肠炎沙门氏菌基因工程减毒株的免疫效果及安全性评价

唐正露[△] 韩敏敏[△] 曹堃 李亮 李郁^{*}

安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】相较于灭活疫苗和弱毒疫苗,沙门氏菌(*Salmonella*)基因工程减毒活疫苗具有的优越性逐渐显现,研究也不断深入。【目的】探究肠炎沙门氏菌 G9 菌株的 4 株基因缺失株 G9(Δ hilA)、G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilA)和 G9(Δ ssrABhilAhilD)的免疫效果及生物安全性。【方法】以肠炎沙门氏菌基因缺失菌株 G9(Δ hilA)、G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilA)、G9(Δ ssrABhilAhilD)及其亲本菌株 G9 的最佳免疫剂量接种小鼠后,利用间接 ELISA 法、流式细胞术、MTT 法、小鼠攻毒试验及倾注平板法等对各缺失株的免疫效果和安全性进行评价。【结果】G9(Δ hilD)诱导血清 IgG 抗体效价最高, G9(Δ hilD)和 G9(Δ ssrABhilAhilD)产生肠黏膜 IgA 抗体效价最高,4 株缺失菌诱导 IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- β 、MCP-1 细胞因子的能力与亲本株 G9 差异不显著($P>0.05$),产生的 CD4⁺/CD3⁺、CD8⁺/CD3⁺ T 细胞比率呈上升趋势,而且 G9(Δ ssrABhilA)和 G9(Δ ssrABhilAhilD)最高; G9(Δ ssrABhilAhilD)诱发的脾淋巴细胞增殖指数最高;免疫小鼠后 4 株缺失株对 G9 攻毒提供的保护率为 80%–100%,而且小鼠肝脏、脾脏及小肠绒毛无明显病理变化,对鼠伤寒沙门氏菌攻毒提供的保护率为 50%–80%;接种后 12 d,小鼠肝脏、脾脏及小肠中定殖的菌株能基本清除,而且在体外能连续稳定传代 30 代。【结论】G9(Δ hilA)、G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilA)和 G9(Δ ssrABhilAhilD)对小鼠的免疫效果和生物安全性均良好,有成为肠炎沙门氏菌基因工程减毒活疫苗的可能。

关键词: 肠炎沙门氏菌, 基因工程减毒株, 免疫原性, 免疫保护力, 生物安全性

Evaluation of immunogenicity and safety of genetic engineering attenuated strains for *Salmonella enteritidis*TANG Zhenglu[△] HAN Minmin[△] CAO Kun LI Liang LI Yu^{*}

College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] Compared with inactivated vaccines and attenuated vaccines, the superiority of

Foundation items: Key Project of National Spark Program of China (2014GA710002); Natural Science Foundation of Anhui Province (1508085MC44); Key Research and Development Plan of Anhui Province (201904a06020013); Science and Technology Project of the Yangtze River Delta in Anhui Province (1101c0603065); Pig Industry System Fund of Anhui Province ([2016] 84)

[△]These authors equally contributed to this work

***Corresponding author:** E-mail: liyouer@163.com

Received: 04-03-2021; **Accepted:** 09-03-2021; **Published online:** 13-05-2021

基金项目: 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 安徽省自然科学基金(1508085MC44); 安徽省重点研究与开发计划(面上攻关)项目(201904a06020013); 安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065); 安徽省生猪产业体系基金项目(皖农科[2016] 84 号)

[△]对本文贡献相同

***通信作者:** E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2021-03-04; **接受日期:** 2021-03-09; **网络首发日期:** 2021-05-13

Salmonella genetically engineered live attenuated vaccines has gradually emerged, and research has continued to deepen. **[Objective]** To explore the immunogenicity and biological safety of four gene-deleted strains of *Salmonella enteritidis* G9 strain: G9(Δ hilA), G9(Δ hilD), G9(Δ ssrABhilA) and G9(Δ ssrABhilAhilD). **[Methods]** *Salmonella enteritidis* strain G9 and gene deletion strains G9(Δ hilA), G9(Δ hilD), G9(Δ ssrABhilA) and G9(Δ ssrABhilAhilD) were inoculated with the optimal immunization doses to mice, and then used indirect ELISA and flow cytometry, MTT method, mouse challenge test and pouring plate method to evaluate the immunogenicity and safety of each deletion strain. **[Results]** G9(Δ hilD) induced the highest titer of serum IgG antibody, G9(Δ hilD) and G9(Δ ssrABhilAhilD) produced the highest titer of intestinal mucosal IgA antibody, and 4 strains of deletion bacteria induced IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- β , MCP-1 cytokine capacity was not significantly different from that of the parent strain G9 ($P>0.05$), the ratio of CD4⁺/CD3⁺, CD8⁺/CD3⁺ T cells showed an upward trend, and G9(Δ ssrABhilA) and G9(Δ ssrABhilAhilD) were the highest; G9(Δ ssrABhilAhilD) induced the highest proliferation index of splenic lymphocytes; after immunization of mice, the protection rate of the four deletion strains against G9 challenge was 80%–100%. The structure of the spleen and small intestine villi was relatively complete without obvious pathological changes. The protection rate against *Salmonella typhimurium* challenge is 50% to 80%; 12 days after inoculation, the colonizing strains in the liver, spleen and small intestine of mice could be basically eliminated. And it could be continuously and stably passaged for 30 generations *in vitro*. **[Conclusion]** G9(Δ hilA), G9(Δ hilD), G9(Δ ssrABhilA) and G9(Δ ssrABhilAhilD) had good immune effects and biological safety in mice, and they had the possibility of becoming genetically engineered live attenuated vaccines of *Salmonella enteritidis*.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, genetic engineering attenuated strain, immunogenicity, immune protection, biological safety

沙门氏菌(*Salmonella*)是一类常见的革兰氏阴性肠杆菌,在人和动物细胞内营兼性寄生,可通过空气、水和食物进行传播,造成人食物中毒和鸡白痢、猪霍乱等动物传染病,严重危害人畜健康。全球范围内,每年由沙门氏菌引起的人急性胃肠炎病例可达 9 300 万例,其中肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)占比最大,已成为重要的公共卫生问题^[1]。沙门氏菌疫苗可以有效保护动物和人类健康,提高动物性食品的安全性,同时避免耐药菌株或超级细菌的出现,理想的沙门氏菌疫苗应满足免疫原性高、稳定性好、安全性高且疫苗本身不产生水平或垂直传播等特点。由沙门氏菌突变株研制的基因工程减毒活疫苗能在减弱毒力的同时保持良好的侵袭力,与灭活疫苗和亚单位疫苗相比,刺激机体产生的免疫反应更持久,而且能提供特异性针对侵入细胞内沙门氏菌的保护作用^[2-3]。

沙门氏菌毒力岛(*Salmonella* Pathogenicity Island, SPI)位于染色体上,其中 SPI-1 和 SPI-2 编码的

III 型分泌系统(Type III Secretion System, T3SS)能够将细菌的毒力蛋白转移到宿主细胞中,从而特异性干扰宿主细胞的功能^[4]。hilD 基因位于 SPI-1 上,其编码的 HilD 蛋白是激活 SPI-1 T3SS 表达的主要信号整合点,能与 HilC 和 RtsA 组成一个前馈环激活 SPI-1 的正调控因子 hilA,以启动 SPI-1 T3SS 的表达^[5]。同时 HilD 又诱导 SPI-2 上 ssrAB 操纵子的表达,形成的 SsrA/B 双组分系统不仅能正向调节 SPI-2 上基因的表达,也可控制 SPI-2 外部的许多基因^[6]。此外,ssrAB 的表达也受到负调节剂的控制,如核苷酸相关蛋白 H-NS 具有抑制 ssrA 上游启动子的作用,但在适宜条件下 HilD 能直接置换 H-NS 介导的阻遏作用而诱导 ssrAB 的表达^[7]。

本研究以前期构建的肠炎沙门氏菌基因工程减毒株 G9(Δ hilA)、G9(Δ ssrABhilA)、G9(Δ hilD)和 G9(Δ ssrABhilAhilD)为受试菌株^[8],采用灌胃途径接种小鼠后开展免疫效果和生物安全性的评价工作,以期肠炎沙门氏菌基因工程减毒株的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和实验动物

亲本菌株肠炎沙门氏菌 G9 菌株(对氨苄青霉素敏感, 但对链霉素耐药)由安徽农业大学动物传染病实验室分离培养, 受试菌株 G9($\Delta hilA$)、G9($\Delta ssrABhilA$)、G9($\Delta hilD$)和 G9($\Delta ssrABhilAhilD$)均由安徽农业大学动物传染病实验室构建并保存; 交叉保护试验使用的攻毒菌株鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50115 购自广东省菌种保藏中心。18–22 g 清洁级雌性昆明小鼠购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器

FITC 标记的 CD4 抗体、PE 标记的 CD8 抗体、PerCP-CyTM 5.5 标记的 CD3 抗体, 上海优宁微生物科技股份有限公司; HRP-羊抗鼠 IgG、IgA 二抗, 博士德生物工程有限公司; 小鼠脾淋巴细胞提取试剂盒, 天津灏洋华科生物科技有限公司; IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- β 和 MCP-1 试剂盒, 莱兹生物科技有限公司; 流式细胞抗体试剂盒, BD 公司; 科马嘉沙门氏菌显色培养基, 绍兴天恒生物科技有限公司。流式细胞仪, BD 公司; 全自动酶标仪, 伯腾仪器有限公司; PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; 超声波细胞破碎仪, 南京先欧仪器制造有限公司。

1.3 小鼠分组

取 180 只小鼠随机分为免疫组[G9($\Delta hilA$)、G9($\Delta hilD$)、G9($\Delta ssrABhilA$)、G9($\Delta ssrABhilAhilD$)]及 G9 攻毒组和对照组, 每组 30 只。免疫组和攻毒组每只小鼠分别灌胃接种浓度为 5×10^7 CFU/mL 的菌液各 0.2 mL, 对照组接种同剂量 PBS 缓冲液(pH 7.2), 间隔 2 周以相同剂量二次免疫, 用于肠炎沙门氏菌基因缺失株免疫效果的测定。取 70 只小鼠随机分为免疫组[G9($\Delta hilA$)、G9($\Delta hilD$)、G9($\Delta ssrABhilA$)、G9($\Delta ssrABhilAhilD$)]和 G9 攻毒组, 每组 14 只, 免疫组和攻毒组每只小鼠分别灌胃接种 1×10^6 CFU/mL 的菌液各 0.2 mL, 用于肠炎沙门氏菌基因缺失株的生物安全性评价。

1.4 肠炎沙门氏菌基因缺失株 G9($\Delta hilA$)、G9($\Delta hilD$)、G9($\Delta ssrABhilA$)和 G9($\Delta ssrABhilAhilD$)免疫效果的测定

1.4.1 血清 IgG 抗体效价测定

分别采集一免 1 周、一免 2 周、二免 1 周、二免 2 周后的各组小鼠血清, 每组 2 只, 利用超声裂解后的全菌体蛋白包被的酶标板, 采用间接 ELISA 方法测定血清中 IgG 抗体效价。

1.4.2 肠道黏膜分泌型 IgA 抗体测定

分别取一免 1 周、一免 2 周、二免 1 周、二免 2 周后的各组小鼠的肠道, 每组 2 只, 提取小肠黏膜作为一抗, 采用间接 ELISA 法测定小鼠肠道黏膜 IgA 抗体。

1.4.3 外周血中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群百分比的测定

分别采集一免 2 周、二免 2 周后的各组小鼠的外周血, 每组 3 只, 制备样本单细胞悬液, 加入 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 特异性表面荧光抗体, 利用流式细胞仪进行检测^[9]。

1.4.4 血清中细胞因子水平的测定

分别采集一免 1 周、一免 2 周、二免 1 周、二免 2 周后的各组小鼠血清, 每组 3 只, 按照 IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- β 、MCP-1 细胞因子试剂盒说明书对血清中细胞因子水平进行测定。

1.4.5 小鼠脾淋巴细胞增殖试验

无菌采取二免 2 周后的各组小鼠脾脏, 每组 3 只, 按小鼠脾淋巴细胞提取试剂盒说明制备脾淋巴细胞悬液, 调整细胞浓度至 5×10^6 个/mL 后进行增殖转化试验, 测定 OD₅₇₀, 以计算刺激指数(SI)。SI 值越大, 脾淋巴细胞增殖能力越强(SI=试验孔 OD₅₇₀ 均值/对照孔 OD₅₇₀ 均值)。

1.4.6 对免疫小鼠的攻毒保护及交叉攻毒保护试验

于二免 2 周后, 从每组选取 20 只小鼠, 用 G9 和鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50115 分别对各免疫组小鼠进行灌胃攻毒, 每组 10 只, 攻毒剂量为 10 LD₅₀/0.2 mL, 对照组以同剂量的 PBS 缓冲液(pH 7.2)灌胃, 观察 2 周内小鼠的发病情况。然后处死小鼠, 取肝脏、脾脏和小肠制备石蜡切片, 于

显微镜下观察病理变化。

1.5 肠炎沙门氏菌基因缺失株生物安全性的测定

1.5.1 在小鼠体内定殖情况的测定

从各免疫组和攻毒组分别随机选取接种后第 2、4、6、8、10、12 天的小鼠进行剖杀，每组 2 只，无菌采取每组小鼠的肝脏、脾脏和小肠，加入无菌 PBS 缓冲液进行研磨，10 倍比稀释后，分别涂布于沙门氏菌显色培养基上，37 °C 培养 12 h 后对紫红色菌落计数。比较 G9(Δ hilA)、G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilA)和 G9(Δ ssrABhilAhilD)在小鼠肝脏、脾脏及肠道内定殖情况及清除时间的差异。

1.5.2 遗传稳定性的测定

将 G9(Δ hilA)、G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilA)、G9(Δ ssrABhilAhilD)和亲本株 G9 在 LB 固体培养基上连续传代培养至 30 代，选取第 5、10、15、20、25、30 代单菌落作为模板进行 PCR 扩增验证，引物序列见表 1^[8]。

PCR 反应体系：2×Mix 10 μL，上、下游引物 (10 mmol/L)各 0.5 μL，菌落模板 1 μL，ddH₂O 8 μL。PCR 反应条件：95 °C 3 min；94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 90 s，25 个循环；72 °C 10 min。

1.6 数据统计分析

采用 Graphpad 8.0 软件进行绘图，SPSS 20.0 软件进行试验数据的差异性分析。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
ssrAB-F	GCGGAATTCCGCCGTTTGCCTTGCGTATAG
ssrAB-R	ATACTGCAGACGCCGCTGTTTGCAATGAG
hilA-F	ATAGCGGCCCGCTAGCTTTCTGCCAGGCATAC
hilA-R	GCGCTCGAGCGGGATTACGGAACAATAG
hilD-F	ATAGCGGCCCGCTCCGGGCGAATCAGGATAAG
hilD-R	GCGCTCGAGAAAGGCAGGAGGGTTATGAG

注：引物序列中下划线部分表示限制性内切酶位点

Note: The underlined part of the primer sequence in the table is restriction endonuclease site

2 结果与分析

2.1 肠炎沙门氏菌基因缺失株 G9(Δ hilA)、G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilA)和 G9(Δ ssrABhilAhilD)免疫效果的测定结果

2.1.1 血清 IgG 抗体效价测定结果

免疫后的连续 4 周时间内，各免疫组 IgG 抗体水平逐渐上升，而对照组抗体一直保持在较低水平，而且随时间变化差距逐渐增大。二免 2 周时，G9(Δ hilD)免疫小鼠产生的 IgG 抗体效价最高，为 1:409 600；G9(Δ ssrABhilAhilD)次之，为 1:102 400；G9(Δ hilA)、G9(Δ ssrABhilA)、G9 均为 1:51 200，而 PBS 对照组为 1:400 (表 2)，表明肠炎沙门氏菌基因缺失株均能刺激小鼠产生良好的体液免疫。

2.1.2 肠道黏膜分泌型 IgA 抗体测定结果

随着试验的进行，小鼠肠道黏膜分泌型 IgA

表 2 小鼠血清 IgG 抗体效价的测定结果

Table 2 The results of IgG antibody titer in mice serum

组别 Groups	一免 1 周 One week after the first immunization	一免 2 周 Two weeks after the first immunization	二免 1 周 One week after the second immunization	二免 2 周 Two weeks after the second immunization
G9(Δ hilA)	1:400	1:800	1:1 600	1:51 200
G9(Δ hilD)	1:400	1:3 200	1:3 200	1:409 600
G9(Δ ssrABhilA)	1:400	1:3 200	1:3 200	1:51 200
G9(Δ ssrABhilAhilD)	1:800	1:3 200	1:51 200	1:51 200
G9	1:800	1:1 600	1:12 800	1:102 400
PBS group	1:400	1:400	1:400	1:400

抗体逐渐增加。其中一免 2 周时, G9 组 IgA 抗体效价显著高于各免疫组($P<0.05$); 二免 2 周时各组 IgA 抗体效价均达到最高水平, 从高到低分别为 G9($\Delta hilD$)组、G9($\Delta ssrABhilAhilD$)组、G9($\Delta ssrABhilA$)组、G9 组、G9($\Delta hilA$)组和 PBS 对照组, 而且 G9($\Delta hilD$)和 G9($\Delta ssrABhilAhilD$)的抗体效价显著高于 G9($\Delta ssrABhilA$)、G9 和 G9($\Delta hilA$)组($P<0.05$) (图 1), 表明肠炎沙门氏菌基因缺失株均能刺激小鼠产生良好的黏膜免疫。

2.1.3 外周血中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞亚群百分比测定结果

一免后 G9($\Delta ssrABhilA$)、G9($\Delta ssrABhilAhilD$)及 G9 组的 $CD4^+/CD3^+$ T 细胞比率和 $CD8^+/CD3^+$ T 细胞比率均与对照组存在显著差异($P<0.05$); 二免后, 除对照组 $CD4^+/CD3^+$ T 细胞比率和 $CD8^+/CD3^+$ T 细胞比率无变化, 其他各组均增加, 而且与对照组差异显著($P<0.05$), 其中 G9($\Delta ssrABhilA$)、G9($\Delta ssrABhilAhilD$)及亲本株 G9 的 $CD8^+/CD3^+$ T 细胞比率较 G9($\Delta hilD$)和 G9($\Delta hilA$)组差异显著($P<0.05$), 但 3 组之间差异不显著(图 2), 表明肠炎沙门氏菌基因缺失株能刺激小鼠产生较好的细胞免疫。

2.1.4 血清中细胞因子水平测定结果

在 4 周的免疫期内, 各免疫组小鼠血清中 IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- β 、MCP-1 的含量均显

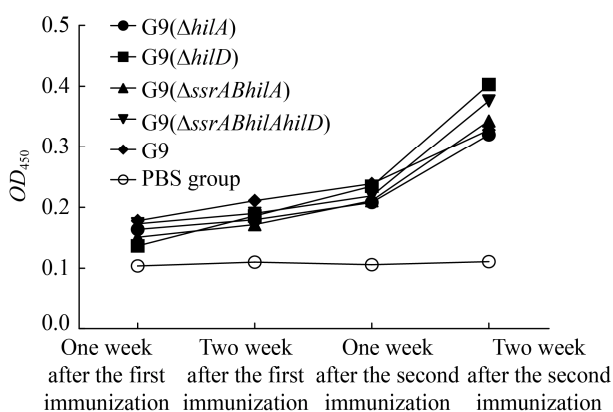


图 1 小鼠肠道黏膜 IgA 抗体的检测结果
Figure 1 The results of IgA antibody in mouse small intestine

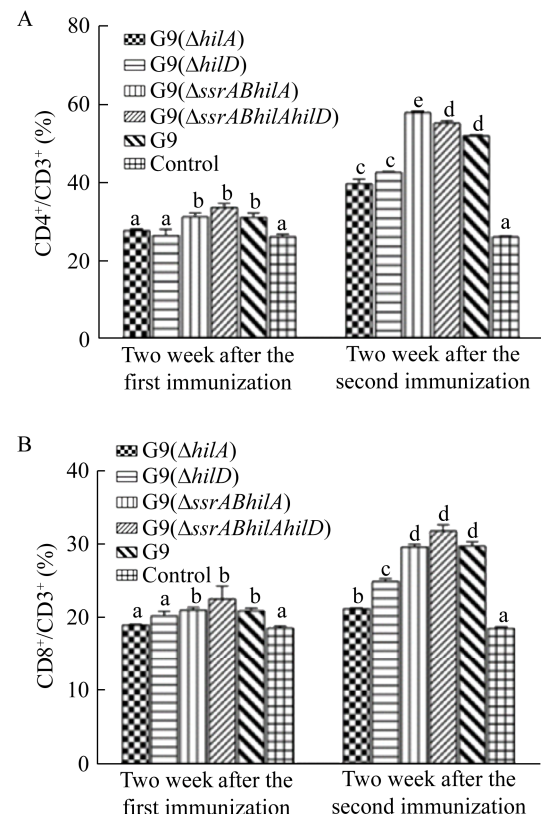


图 2 小鼠外周血中 $CD4^+$ (A)、 $CD8^+$ (B) 细胞亚群在总 T 细胞中所占百分比

Figure 2 The percentage of $CD4^+$ (A), $CD8^+$ (B) subsets in $CD3^+$ T cells in peripheral blood of mice

注: 相同字母表示差异不显著, 反之表示差异显著。下同

Note: Same letter indicates no significant differences, otherwise shows significant differences. The same below

著高于对照组。一免 1 周时, 各免疫组小鼠血清中 IL-4、IFN- γ 、TNF- β 、MCP-1 的含量与亲本株 G9 差异不显著, 但均显著高于对照组($P<0.05$); 二免 1 周时, G9($\Delta ssrABhilA$)组 IL-4 的含量显著增加, 与对照组差异显著($P<0.05$), 而 G9($\Delta ssrABhilA$)组的 IL-10 含量、G9($\Delta hilA$)组的 TNF- β 含量、G9($\Delta hilA$)和 G9($\Delta ssrABhilA$)组的 IFN- γ 含量较其他免疫组无显著增加; 二免 2 周时, 各免疫组及亲本株 G9 的 IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- β 、MCP-1 含量均与对照组差异显著($P<0.05$) (图 3), 表明肠炎沙门氏菌基因缺失株能刺激小鼠产生良好的细胞免疫。

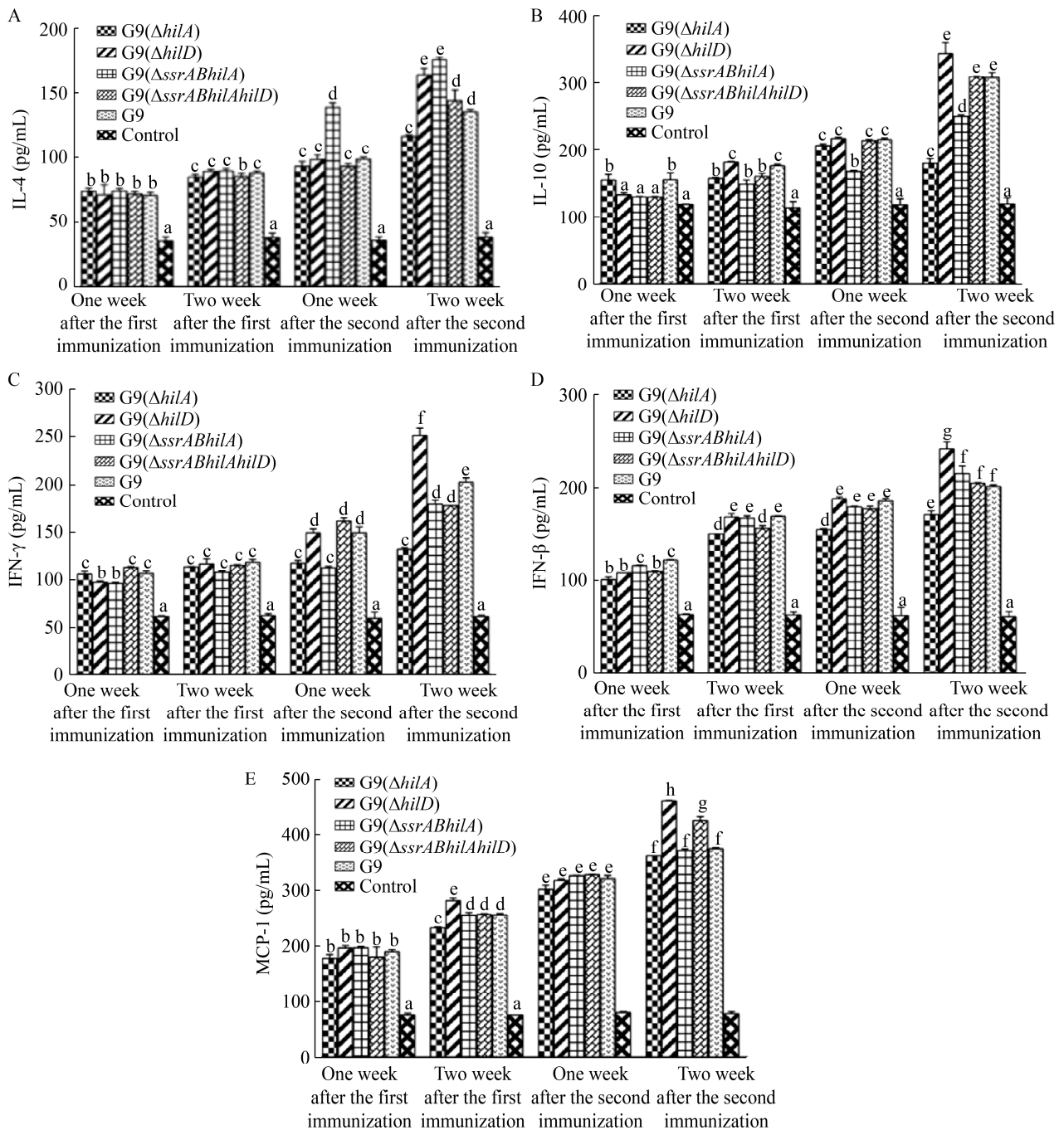


图3 小鼠血清中细胞因子 IL-4 (A)、IL-10 (B)、IFN- γ (C)、TNF- β (D)、MCP-1 (E)的变化

Figure 3 The changes of cytokine IL-4 (A), IL-10 (B), IFN- γ (C), TNF- β (D), MCP-1 (E) in serum of mice

2.1.5 小鼠脾淋巴细胞增殖试验结果

倒置显微镜下观察瑞氏吉姆萨染色后的小鼠脾淋巴细胞，发现细胞核呈圆形深染，核内染色质多，颜色较深，核周围颜色较浅，胞质呈蓝灰色，淋

巴细胞的纯度高，在 99%以上(图 4)。接种小鼠二免 2 周时，SI 值从高到低依次为 G9($\Delta ssrABhilAhilD$)、G9($\Delta ssrABhila$)、G9、G9($\Delta hilD$)、G9($\Delta hila$)和对照组，其中 G9($\Delta ssrABhila$)与 G9($\Delta ssrABhilAhilD$)

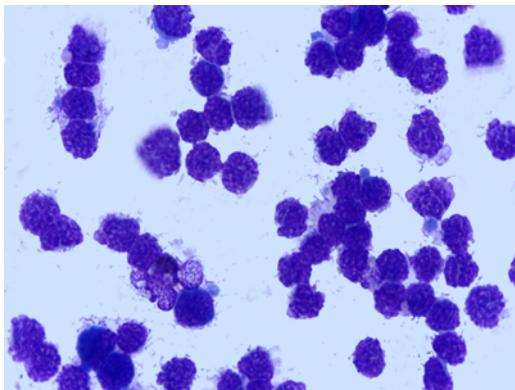


图 4 小鼠脾淋巴细胞染色结果
Figure 4 The result of splenic lymphocytes with Wright-Giemsa stain of mice

免疫组 SI 值较 PBS 对照组差异显著($P<0.05$), 提示该 2 株缺失株能促进脾淋巴细胞的增殖, 诱导细胞免疫应答反应的产生(表 3)。

2.1.6 对免疫小鼠的攻毒保护试验结果

用亲本株 G9 攻毒后, 4 株缺失株均能对小鼠

提供较强保护, 其中, G9(Δ ssrABhilA)、G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilAhilD)对小鼠的保护力高达 100%, 而 G9(Δ hilA)的保护力为 80%, 均显著高于对照组($P<0.05$) (表 4)。

2.1.7 对免疫小鼠的交叉攻毒保护试验结果

用鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50115 攻毒后, 4 株缺失株均能提供一定的保护效力, 其中, G9(Δ ssrABhilAhilD)对小鼠保护力最强, 达 80%; G9(Δ hilD)、G9(Δ ssrABhilA)次之, 保护效力均显著高于对照组($P<0.05$) (表 5)。

2.1.8 对免疫小鼠的病理组织切片观察结果

对各免疫组小鼠肝脏、脾脏、十二指肠、空肠和回肠的病理组织切片进行观察, 对照组无明显变化, 仅回肠肠绒毛有轻微出血; G9(Δ hilA)组小鼠肝脏出血、少量炎性细胞渗出、形成较小炎性病灶, 脾脏充血出血、脾小结肿大、淋巴细胞浸润, 除回肠外小肠肠绒毛充血出血; G9(Δ hilD)组小鼠肝脏

表 3 小鼠脾淋巴细胞增殖试验结果

Table 3 Lymphocyte proliferation experiment in spleen of mice

Strains	OD ₅₇₀			SI			Mean±SD
G9(Δ hilA)	0.185	0.151	0.173	1.637	1.411	1.587	1.545±0.118 7c
G9(Δ hilD)	0.224	0.253	0.187	1.982	2.364	1.716	2.021±0.325 7bc
G9(Δ ssrABhilA)	0.243	0.295	0.276	2.150	2.757	2.532	2.480±0.306 9ab
G9(Δ ssrABhilAhilD)	0.261	0.294	0.277	2.310	2.748	2.541	2.533±0.219 1a
G9	0.182	0.275	0.211	1.611	2.570	1.936	2.039±0.487 7b
PBS group	0.151	0.134	0.119	1.336	1.252	1.092	1.227±0.124 0c

注: 相同字母表明组间毒力差异不显著($P>0.05$); 不同字母表明组间毒力差异显著($P<0.05$)

Note: The same letter indicates that the difference in virulence between groups is not significant ($P>0.05$); The different letter indicates that the difference is significant ($P<0.05$)

表 4 免疫小鼠经 G9 攻毒后的保护试验结果

Table 4 Protective test results of immunized mice after G9 challenge

菌株 Strains	临床症状 Clinical symptoms	死亡数量(只) Number of deaths	存活率 Survival rate (%)
G9(Δ hilA)	2 只死亡, 2 只出现精神萎靡、嗜睡症状 2 died and 2 showed symptoms of lethargy and lethargy	2	80
G9(Δ hilD)	没有死亡, 3 只出现厌食、精神萎靡、扎堆症状 0 died and 3 had symptoms of anorexia, malaise, and crowding together	0	100
G9(Δ ssrABhilA)	没有死亡, 1 只出现精神萎靡症状 0 died and 1 showed symptoms of malaise	0	100
G9(Δ ssrABhilAhilD)	10 只均正常 10 are all fine	0	100
PBS group	10 只全部死亡 All 10 died	10	0

表 5 免疫小鼠经 CMCC50115 攻毒后的交叉保护试验结果

Table 5 Cross-protection test results of immunized mice challenged by CMCC50115

菌株 Strains	临床症状 Clinical symptoms	死亡数量(只) Number of deaths	存活率 Survival rate (%)
G9($\Delta hilA$)	6 只死亡, 3 只出现精神萎靡、嗜睡症状 6 died and 3 showed symptoms of lethargy and lethargy	5	50
G9($\Delta hilD$)	3 只死亡, 2 只出现厌食、精神萎靡、扎堆症状 3 died and 2 showed symptoms of anorexia, malaise, and crowding together	3	70
G9($\Delta ssrABhilA$)	4 只死亡, 1 只出现精神萎靡症状 4 died and 1 showed symptoms of malaise	4	60
G9($\Delta ssrABhilAhilD$)	2 只死亡, 2 只出现精神萎靡症状 2 died and 2 showed symptoms of malaise	2	80
PBS group	9 只死亡, 1 只出现精神萎靡症状 9 died and 1 showed symptoms of malaise	9	10

轻微出血、少量胞质浓缩、炎性细胞渗出, 脾脏充血出血, 红髓和白髓间隙变宽, 小肠各肠段出血, 其中十二指肠和回肠肠绒毛轻微脱落; G9($\Delta ssrABhilA$)组肝脏有少量炎性细胞渗出、形成坏死灶, 脾脏出血、脾小结肿大、淋巴细胞浸润, 除十二指肠外小肠肠段肠绒毛少量充血出血; G9($\Delta ssrABhilAhilD$)组肝脏仅有少量炎性细胞渗出、少量胞质浓缩, 脾脏部分区域有淋巴细胞浸润、脾小结肿大, 小肠各肠段仅轻微出血; 而攻毒组病变最为严重, 小鼠肝脏严重充血出血、大量炎性细胞渗出、肝细胞核溶解、胞质浓缩, 脾脏严重充血出血、大量淋巴细胞渗出、红髓和白髓间隙模糊, 小肠各肠段肠绒毛严重脱落、充血、出血, 十二指肠和回肠还分别出现炎性细胞渗出和集合淋巴小结肿大、淋巴细胞浸润等病变(图 5)。

2.2 肠炎沙门氏菌基因缺失株生物安全性的测定结果

2.2.1 在小鼠体内定殖情况的测定结果

各基因缺失株及亲本株均能在小鼠肝脏、脾脏和小肠内定殖, 而且随时间递增整体载菌量均呈下降趋势。第 4 天时, 肝脏内 G9($\Delta hilA$)和 G9($\Delta ssrABhilAhilD$), 脾脏内 G9($\Delta hilA$)、G9($\Delta hilD$)、G9($\Delta ssrABhilA$)和 G9($\Delta ssrABhilAhilD$), 以及小肠内 G9($\Delta hilD$)和亲本株的载菌量均达到峰值; 第 6 天时, 肝脏内 G9($\Delta hilD$)、G9($\Delta ssrABhilAhilD$)

和亲本株, 脾脏内亲本株, 以及小肠内 G9($\Delta hilA$)、G9($\Delta ssrABhilA$)和 G9($\Delta ssrABhilAhilD$)的载菌量均达到峰值。第 10 天时, 小肠内基因缺失株的载菌量均显著低于亲本株($P<0.05$); 到第 12 天时, 肝脏、脾脏及小肠内基因缺失株均显著低于亲本株($P<0.05$) (图 6)。

2.2.2 遗传稳定性的测定结果

将各基因缺失株在 LB 固体培养基上连续传代后, 分别挑取第 5、10、15、20、25、30 代的菌株单菌落为模板, 利用 *ssrAB*-F/R、*hilA*-F/R 和 *hilD*-F/R 引物对进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分别获得预期的 1 562 bp 和 647 bp、3 039 bp 和 1 713 bp、2 090 bp 和 1 509 bp 大小的目的条带(图 7), 而且测序结果与预期结果一致。表明 4 株肠炎沙门氏菌基因缺失株均能够稳定遗传。

3 讨论与结论

肠炎沙门氏菌广泛存在于自然界中, 主要通过污染的水和食物进行传播, 对人和动物具有很强的感染性, 可引起自限性胃肠道感染甚至全身性败血症, 具有重要的公共卫生学意义^[9]。传统的肠炎沙门氏菌灭活疫苗和亚单位疫苗在预防疾病和控制病原菌传播等方面具有一定作用, 但在使用过程中存在副作用大、接种方式单一、抗原易变性等缺陷, 适用性不强, 然而肠炎沙门氏菌基因工程减毒株在毒力降低的同时还能保持良好的免疫原性, 具有成

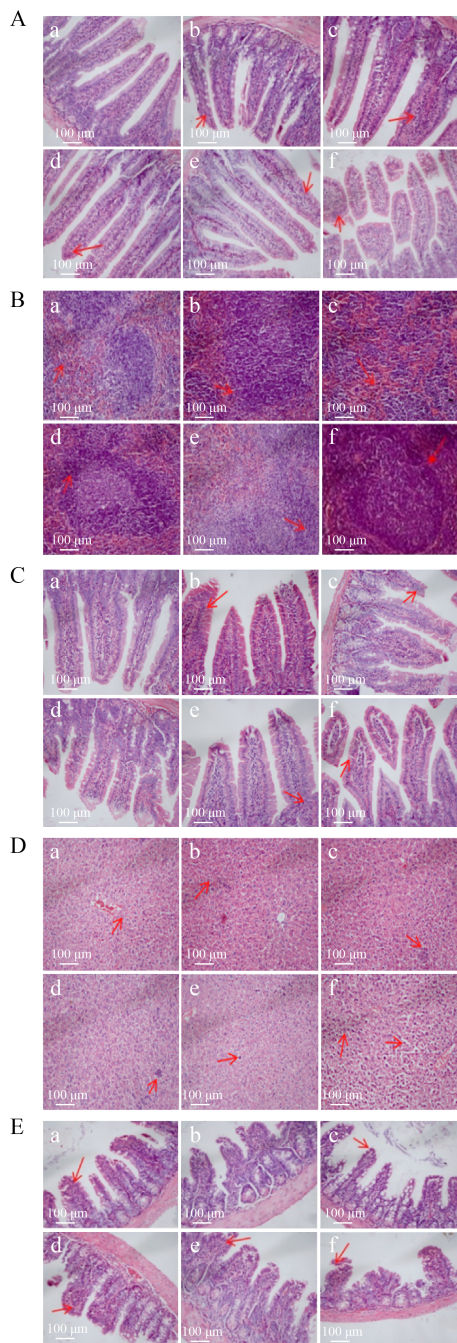


图5 基因缺失株免疫小鼠后各组织病理切片观察(200×)
Figure 5 Histological changes of organizations in mice immunized with gene-deleted strains (200×)

注: A: 肝脏; B: 脾脏; C: 十二指肠; D: 空肠; E: 回肠。
a: 对照组; b: $G9(\Delta hilA)$ 组; c: $G9(\Delta hilD)$ 组; d: $G9(\Delta ssrABhilA)$ 组; e: $G9(\Delta ssrABhilAhilD)$ 组; f: 攻毒组

Note: A: Liver; B: Spleen; C: Duodenum; D: Jejunum; E: Ileum. a: Control group; b: $G9(\Delta hilA)$ group; c: $G9(\Delta hilD)$ group; d: $G9(\Delta ssrABhilA)$ group; e: $G9(\Delta ssrABhilAhilD)$ group; f: Attack group

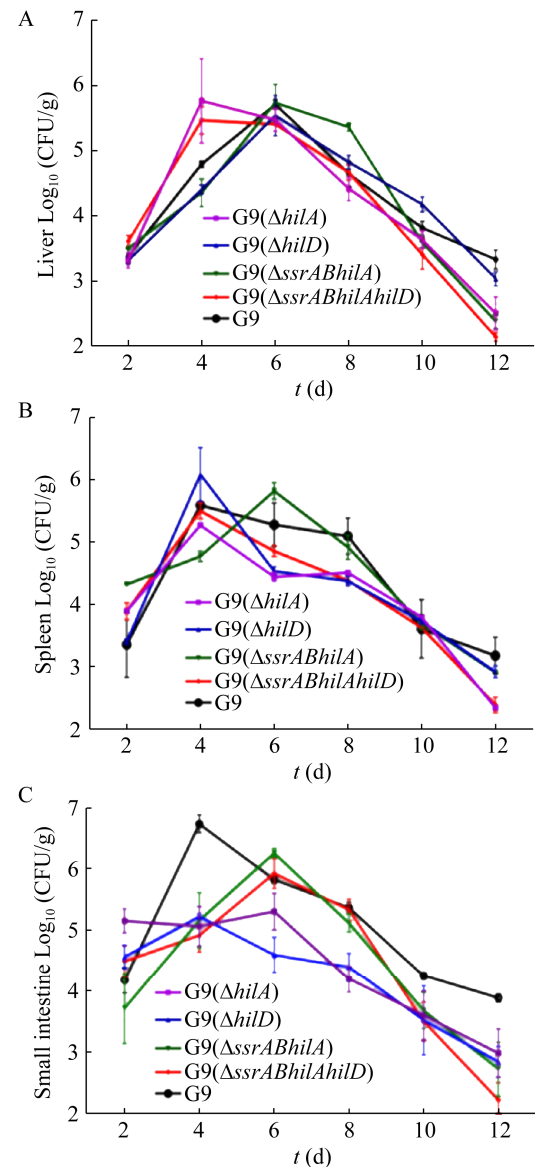


图6 小鼠肝脏(A)、脾脏(B)和小肠(C)内不同时间段的载菌量

Figure 6 Bacterial load in the liver (A), spleen (B), and small intestine (C) at different days in mice

为肠炎沙门氏菌减毒活疫苗的前景,为控制及预防沙门氏菌病提供新思路。

本研究通过小鼠攻毒试验,对前期构建的 $G9(\Delta hilA)$ 、 $G9(\Delta hilD)$ 、 $G9(\Delta ssrABhilA)$ 和 $G9(\Delta ssrABhilAhilD)$ 这4株肠炎沙门氏菌基因缺失株的免疫效果及安全性进行测定。IgG 抗体是机体感染后产生的主要抗体,在体内含量高、持续时间

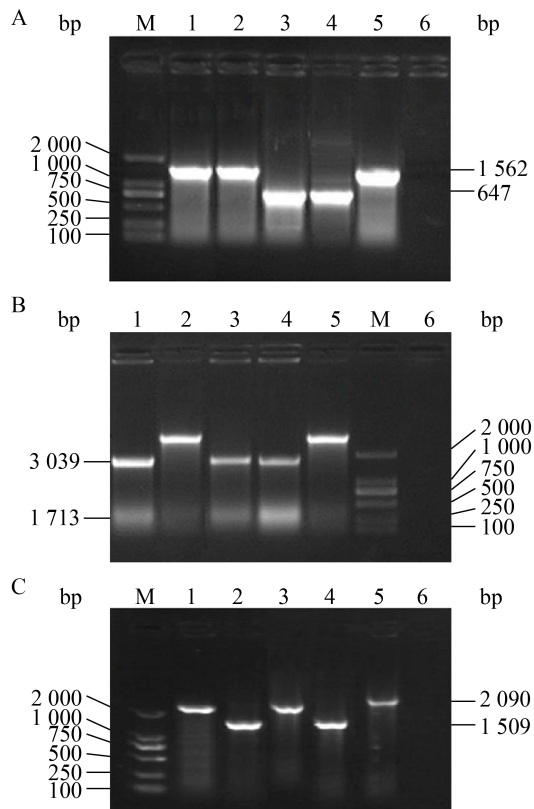


图 7 *ssrAB* (A)、*hilA* (B)和 *hilD* (C)引物 PCR 验证结果

Figure 7 PCR identification with *ssrAB* (A), *hilA* (B) and *hilD* (C) primer sequence

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: G9(Δ *hilA*); 2: G9(Δ *hilD*); 3: G9(Δ *ssrABhilA*); 4: G9(Δ *ssrABhilAhilD*); 5: 亲本株 G9; 6: 阴性对照

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: G9(Δ *hilA*); 2: G9(Δ *hilD*); 3: G9(Δ *ssrABhilA*); 4: G9(Δ *ssrABhilAhilD*); 5: Parent strain G9; 6: Negative control group

长,具有抗菌和抗病毒等活性,是介导体液免疫的主力。肠道黏膜免疫系统作为局部特异性免疫功能的主要场所,其产生的分泌型 IgA 含量多且不易被蛋白酶分解,大量 IgA 排列在一起形成保护层阻止病原微生物的侵入,发挥黏膜免疫作用^[10]。在连续 4 周试验期内,4 株基因缺失株刺激产生的血清中特异性 IgG 抗体和肠道黏膜 IgA 抗体均呈上升趋势且均显著高于对照组;其中二免 2 周时, G9(Δ *hilD*)、G9(Δ *ssrABhilAhilD*)组产生的 IgA 抗体显著高于 G9(Δ *hilA*)、G9(Δ *ssrABhilA*)和亲本株 G9,

表明肠炎沙门氏菌基因缺失株免疫小鼠后能产生良好的体液及肠道黏膜免疫。

T 细胞主要参与细胞免疫,是获得性免疫的中心细胞,在沙门氏菌感染中起着重要的作用^[11]。其中 CD4 分子能与 MHC II 类复合物结合,通过表达细胞因子来调节免疫反应;而 CD8 分子在与 MHC I 类复合物结合后能使呈递非自身抗原的细胞失活,促进 CD8⁺ T 细胞的增殖和成熟^[12]。在本研究的 4 周试验期间,CD4⁺/CD3⁺、CD8⁺/CD3⁺ T 细胞比率随时间增加而逐渐升高,显著高于 PBS 对照组,表明肠炎沙门氏菌基因缺失株免疫小鼠后能刺激机体产生良好的细胞免疫。赵战勤等^[13]发现 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞可通过与 MHC 分子作用,增强 MHC 分子与抗原受体(TCR)的结合力,而且 CD4⁺/CD3⁺、CD8⁺/CD3⁺ T 细胞比率的大小与小鼠的免疫防御强弱之间存在密切联系。

细胞因子是一类由免疫细胞或非免疫细胞释放的小分子多肽、蛋白质或糖蛋白,通过受体发挥作用以调节特定细胞群的生长、成熟和反应能力^[14]。细胞因子种类繁多,其中 IL-4 和 TNF- β 能促进巨噬细胞对抗原的呈递,调节细胞免疫应答水平^[15]; IFN- γ 能诱导巨噬细胞 IgG 受体的表达,促进巨噬细胞对病原微生物的杀伤能力^[16];而 IL-10 和 MCP-1 能同时介导体液和细胞免疫应答,反映机体总体的免疫水平^[17-18]。本研究中的 4 株基因缺失株刺激小鼠机体分泌 IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- β 和 MCP-1 的能力均显著高于 PBS 对照组,具有制备沙门氏菌基因工程减毒活疫苗或载体的潜质。当沙门氏菌侵入宿主时,脾淋巴细胞能够准确识别入侵的病原体,迅速迁移并增殖,产生大量效应淋巴细胞以识别和清除沙门氏菌^[19]。脾淋巴细胞增殖能力直接决定效应淋巴细胞的多少及机体免疫应答水平的强弱,是反映机体细胞免疫的测定指标之一^[20]。本研究通过 MTT 法体外培养脾淋巴细胞并对其增殖指数进行测定,结果显示除 G9(Δ *hilA*)外的 3 株基因缺失株均

能显著提高淋巴细胞的增殖效应, 即 $G9(\Delta hilD)$ 、 $G9(\Delta ssrABhilA)$ 和 $G9(\Delta ssrABhilA hilD)$ 均可引起脾淋巴细胞的大量增殖, 增强机体免疫应答能力。

从保护效力来看, 用亲本株 $G9$ 攻毒时, $G9(\Delta hilD)$ 、 $G9(\Delta ssrABhilA)$ 和 $G9(\Delta ssrABhilA hilD)$ 对小鼠的保护效力高达 100%, $G9(\Delta hilA)$ 为 80%, 均显著高于 PBS 对照组; 而用鼠伤寒沙门氏菌标准株(CMCC50115)攻毒时, 4 株基因缺失株对小鼠的交叉保护效力也均高于对照组。从各菌对小鼠脏器的病理组织损伤程度来看, 以亲本株 $G9$ 最为严重, 小鼠表现肝脏出血、脾脏淋巴细胞浸润及小肠充盈、出血、肠绒毛脱落等病变。综上, $G9(\Delta ssrABhilA hilD)$ 对小鼠的保护效力最高, 对小鼠组织造成的损伤最小, $G9(\Delta ssrABhilA)$ 、 $G9(\Delta hilD)$ 和 $G9(\Delta hilA)$ 次之。

基因工程减毒活疫苗菌株的安全性是其在防治动物疾病中不容忽视的重要因素之一。本研究发现 4 株基因缺失株及亲本株 $G9$ 均能定殖在小鼠肝脏、脾脏及小肠内, 而且定殖数目随时间延长而逐渐减少。第 2 天时, 缺失株与亲本株在小鼠肝脏、脾脏及小肠内的定殖量无差异; 第 4–6 天时, 定殖量均达到峰值; 第 12 天后定殖量显著减少, 与亲本株差异不显著。沙门氏菌的侵袭力与定殖力相互影响^[21], 基因缺失株毒力下降, 不易在宿主体内定殖且已定殖菌株会逐渐被清除, 有制备成肠炎沙门氏菌减毒活疫苗的特性。另外, 4 株基因缺失株在 LB 固体培养基上均能连续传代, 而且第 5、10、15、20、25 和 30 代菌株的琼脂糖凝胶电泳条带均与第 1 代保持一致, 表明肠炎沙门氏菌基因缺失株具有良好的遗传稳定性。

综上所述, $G9(\Delta hilA)$ 、 $G9(\Delta hilD)$ 、 $G9(\Delta ssrABhilA)$ 和 $G9(\Delta ssrABhilA hilD)$ 这 4 株肠炎沙门氏菌基因缺失株具备毒力降低且免疫原性、免疫保护力和交叉保护力良好, 以及在小鼠体内定殖清除率高、体外遗传稳定性良好等特点,

具有制备肠炎沙门氏菌基因工程减毒活疫苗的应用前景。

REFERENCES

- [1] Castro-Vargas RE, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: a global overview[J]. Veterinary World, 2020, 13(10): 2070-2084
- [2] Clark-Curtiss JE, Curtiss R. *Salmonella* vaccines: conduits for protective antigens[J]. Journal of Immunology, 2018, 200(1): 39-48
- [3] Zhi Y, Lin SM, Jang AY, Ahn KB, Ji HJ, Guo HC, Lim S, Seo HS. Effective mucosal live attenuated *Salmonella* vaccine by deleting phosphotransferase system component genes *ptsI* and *crr*[J]. Journal of Microbiology, 2019, 57(1): 64-73
- [4] Figueira R, Holden DW. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors[J]. Microbiology: Reading, England, 2012, 158(Pt 5): 1147-1161
- [5] Saini S, Ellermeier JR, Slauch JM, Rao CV. The role of coupled positive feedback in the expression of the SPI1 type three secretion system in *Salmonella*[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(7): e1001025
- [6] Banda MM, Zavala-Alvarado C, Pérez-Morales D, Bustamante VH. SlyA and HilD counteract H-NS-mediated repression on the *ssrAB* virulence operon of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and thus promote its activation by OmpR[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(8): e00530-18
- [7] Banda MM, Manzo R, Bustamante VH. HilD induces expression of a novel *Salmonella typhimurium* invasion factor, YobH, through a regulatory cascade involving SprB[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 12725
- [8] Tang ZL, Cao K, Zhang L, Han MM, Luo CY, Li Y. Construct of *ssrAB*, *hilA*, *hilD*-deficient in *Salmonella enteritidis* and characteristic of mutants[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1195-1205 (in Chinese)
- [9] 唐正露, 曹堃, 张丽, 韩敏敏, 罗聪玉, 李郁. 肠炎沙门氏菌 *ssrAB*、*hilA*、*hilD* 基因缺失菌株的构建及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1195-1205
- [10] Li ZY, Zhang C, Zhou ZX, Zhang JH, Zhang J, Tian ZG. Small intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 and T cell receptor $\gamma\delta$ are involved in bacterial clearance during *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(2): 565-574
- [11] Chakroun I, Mahdhi A, Morcillo P, Cordero H, Cuesta A, Bakhrouf A, Mahdouani K, Esteban MÁ. Motility, biofilm formation, apoptotic effect and virulence gene expression of atypical *Salmonella typhimurium* outside and inside Caco-2 cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 114: 153-162

- [11] Bernal-Bayard J, Ramos-Morales F. Molecular mechanisms used by *Salmonella* to evade the immune system[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2018, 25: 133-168
- [12] Sekelova Z, Polansky O, Stepanova H, Fedr R, Faldynova M, Rychlik I, Vlasatikova L. Different roles of CD4, CD8 and $\gamma\delta$ T-lymphocytes in naive and vaccinated chickens during *Salmonella* Enteritidis infection[J]. *Proteomics*, 2017, 17(13/14): 1700073
- [13] Zhao ZQ, Xue Y, Wu B, Duan LC, Chen HC, Tang XB, Hu RM, He H, Li ZQ. Protecting mice from fatal *Bordetella bronchiseptica* infection by immunization with recombinant pertactin antigens[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(3): 337-341 (in Chinese)
赵战勤, 薛云, 吴斌, 段龙川, 陈焕春, 汤细彪, 胡睿铭, 何华, 李增强. 重组百日咳杆菌黏附素蛋白免疫小鼠可完全抵抗支气管败血波氏杆菌的致死性感染[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 337-341
- [14] Ramani T, Auletta CS, Weinstock D, Mounho-Zamora B, Ryan PC, Salcedo TW, Bannish G. Cytokines: the good, the bad, and the deadly[J]. *International Journal of Toxicology*, 2015, 34(4): 355-65
- [15] Zheng WP, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells[J]. *Cell*, 1997, 89(4): 587-596
- [16] Coffman RL. The origin of TH2 responses[J]. *Science*, 2010, 328(5982): 1116-1117
- [17] Hermann-Kleiter N, Baier G. NFAT pulls the strings during CD4⁺ T helper cell effector functions[J]. *Blood*, 2010, 115(15): 2989-2997
- [18] Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Lai JH, Dai MS, Jheng HL, Kuo MT, Chen P, Chen A. Antroquinonol differentially modulates T cell activity and reduces interleukin-18 production, but enhances Nrf2 activation, in murine accelerated severe lupus nephritis[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2012, 64(1): 232-242
- [19] Warren A, le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells[J]. *Hepatology*, 2006, 44(5): 1182-1190
- [20] Liang HW, Zhu WY, Feng B, Wang JF, Zhang T, Mu X. Application of MTT method to detecting rat peripheral blood lymphocyte proliferation[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(26): 21-26 (in Chinese)
梁宏伟, 朱雯宇, 冯波, 王建舫, 张涛, 穆祥. MTT 法检测大鼠外周血淋巴细胞增殖反应探讨与应用[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(26): 21-26
- [21] Kuźmińska-Bajor M, Grzymajło K, Ugorski M. Type 1 fimbriae are important factors limiting the dissemination and colonization of mice by *Salmonella* Enteritidis and contribute to the induction of intestinal inflammation during *Salmonella* invasion[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 276