

DOI:10.13350/j.cjpb.220411

• 实验研究 •

粪肠球菌介导的铜绿假单胞菌重组疫苗诱导小鼠的保护力及细胞免疫应答*

欧兴坤, 李文桂**

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆 400016)

【摘要】 目的 研究基于粪肠球菌(Ef)载体的铜绿假单胞菌(Pa)重组疫苗 rEf(pGEX-LasR) 诱导小鼠的保护力及细胞免疫应答。方法 分别将 5×10^9 CFU 的疫苗株、空载体株和 Ef 株菌液口服灌胃免疫 BALB/c 鼠, 每周 3 次, 连续 3 周; 初次免疫后 4 周用 5×10^7 CFU 的 Pa01 株菌液滴鼻攻击小鼠, 2 周后杀鼠剖检; 菌落计数检测小鼠肺细菌负荷, MTT 法检测小鼠脾细胞增殖水平, 荧光激活细胞分选仪(FACS)检测小鼠脾细胞 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞亚群和脾细胞凋亡水平; 采用 PaAg 体外刺激培养小鼠脾细胞 48 h, PCR 扩增 IL-2、IFN- γ 、IL-12、IL-17 和 Fox3⁺ 基因。结果 疫苗组、空载体组和 Ef 对照组小鼠肺细菌负荷分别为 (7.616 ± 0.010) lgCFU/g、 (8.876 ± 0.011) lgCFU/g 和 (8.902 ± 0.010) lgCFU/g, 疫苗组显著降低 ($P < 0.01$); 与空载体组和 Ef 对照组比较, 疫苗组小鼠脾细胞 $CD4^+$ T 细胞亚群显著增加 ($P < 0.01$), 脾细胞增殖活性增强 ($P < 0.01$)、凋亡率减低 ($P < 0.01$); 疫苗组小鼠脾细胞 DNA 可扩增出 IL-2、IFN- γ 、IL-12、IL-17 和 Fox3⁺ 基因条带, 空载体组和对照组未扩增出条带。结论 Pa 重组疫苗 rEf(pGEX-LasR) 可诱导小鼠产生细胞免疫应答, 促进小鼠脾细胞 IL-2、IFN- γ 、IL-12、IL-17 和 Fox3⁺ 基因的表达, 降低 Pa01 攻击小鼠后的肺细菌负荷。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 载体疫苗; LasR 蛋白; 粪肠球菌; 细胞免疫

【中图分类号】 R378.99

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)04-0430-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Apr;17(4):430-434.]

Cellular immune response and immunoprotection induced by *Enterococcus faecalis*-mediated vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* in mice

OU Xing-kun, LI Wen-gui (Institute of Infections and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 **Objective** To study the cell-mediated immunity and protective efficacy induced by *Enterococcus faecalis*-mediated *Pseudomonas aeruginosa* LasR vaccine in mice. **Methods** BALB/c mice, 6-8 weeks old, were divided into 3 groups (7 mice/group), and immunized 3 times a week for 3 weeks with live *E. faecalis* containing pGEX-LasR, *E. faecalis* containing blank vector, and *E. faecalis* at a dose of 5×10^9 CFUs/mouse in a volume of 100 μ l. 4 weeks post first immunization, groups were challenged by nasal drip with 10 μ l of *P. aeruginosa* bacterial suspension at a concentration of 1×10^6 CFU/ μ l. 2 weeks post challenge, mice were sacrificed, then lungs were collected for bacterial loads investigation and spleens were isolated for cytological-testing. The splenocyte $CD4^+/CD8^+$ T cell subsets and splenocyte apoptosis were detected with fluorescence activating cell sorter, splenocyte proliferation was determined with MTT assay. Splenocytes were isolated and stimulated in vitro with PaAg, then the IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-17 and Fox3⁺ genes were amplified using PCR.

Results The bacterial loads of vaccine group, blank vector group and *E. faecalis* group were (7.616 ± 0.010) lgCFU/g, (8.876 ± 0.011) lgCFU/g and (8.902 ± 0.010) lgCFU/g. There was significant reduction in bacterial loads of vaccine group versus control groups ($P < 0.01$). It was observed also that the percentage of $CD4^+$ T cell and proliferative activity of splenocytes in vaccine group increased ($P < 0.01$ for all), and the rate of apoptosis of splenocytes decreased ($P < 0.01$). The IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-17 and Fox3⁺ genes were amplified from genomic DNA of splenocyte in vaccine group.

Conclusion The rEf(pGEX-LasR) vaccine against *P. aeruginosa* can induce protection and cell immune response in mice, it may cause an increase in expression of IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-17 and Fox3⁺ genes.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; vector-based vaccine; LasR; *Enterococcus faecalis*; cell-mediated immunity***

* **【基金项目】** 重庆市科委地方病重大专项基金项目 (No. 2008AB5055, 2008AA5008, 2008AB5054)。

** **【通讯作者】** 李文桂, E-mail: cqliwengui@163.com

【作者简介】 欧兴坤 (1993-), 男, 贵州人, 硕士研究生, 主要从事病原微生物的分子生物学研究。E-mail: ouxkun@163.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)是一种常见的革兰阴性机会致病菌,通过基因调控网络,Pa可以改变代谢途径适应多种生存环境(包括人体体表、口腔、呼吸道和医疗物品表面等)^[1],在感染过程中则表现为毒力因子的多样性和生长状态的改变(如生物膜或小菌落突变体的形成)^[2-4]。Pa还可通过先天性、获得性或适应性机制抵抗多种抗菌药物,造成难治性感染^[2],多重耐药菌株的感染是导致肿瘤、烧伤、手术以及呼吸机支持治疗等患者死亡风险增加的重要危险因素^[6-7]。接种疫苗可以保护危险人群,改善患者预后,是一种有效的Pa防治手段,然而Pa疫苗的研发至今仍面临诸多挑战^[8]。

Pa易突变,即使在同一患者体内也可分离到不同的菌株^[9],体液免疫对机体的保护力不足,开发可激活细胞免疫的抗原呈递策略对Pa疫苗的研发十分重要^[10]。以益生菌为载体递送靶抗原的载体疫苗(vector-based vaccine)是一种重要的新型疫苗开发策略,其优势在于益生菌本身可非特异性刺激人体免疫系统,发挥免疫佐剂作用^[11]。作者前期构建了以粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Ef)为载体的Pa重组疫苗rEf(pGEX-LasR)^[12],本研究以该载体疫苗口服免疫BALB/c小鼠,观察其诱导的细胞免疫应答以及应对Pa01株攻击下的保护作用。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株与实验动物 Pa(Pa01株)、Ef(ATCC470077株)由重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所保存;疫苗株rEf(pGEX-LasR)和空载体株rEf(pGEX-1λT)由本室制备;6~8周龄雌性BALB/c小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,实验操作符合重庆医科大学实验动物伦理委员会要求。

1.2 主要试剂与仪器 Pa抗原(PaAg)和LB培养基由本研究所制备保存;胎牛血清(FBS)为北京鼎今生物科技有限公司;RPMI1640培养基、DNA提取试剂盒和PCR试剂盒为上海生工公司;FITC标记的兔抗大鼠IgG抗体、大鼠抗小鼠CD4⁺/CD8⁺抗体为北京邦定泰克公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒为深圳欣博盛公司;刀豆蛋白A(Concanavalin A, ConA)为美国Sigma公司;酶标仪为美国Scientific Thermo公司;荧光激活细胞分选仪为美国BD公司;PCR仪为美国Bio-Rad公司。

2 方 法

2.1 细菌的培养 疫苗株、空载体株及Ef株用含10% FBS的LB培养基培养,Pa01株用普通LB培养基培养(37℃,200 r/min振荡培养48 h);离心收集菌

体沉淀(3 000 r/min,10 min,离心半径15 cm);制备细菌悬液(疫苗株、空载体株和Ef株菌液浓度为 5×10^7 CFU/ μ l,Pa01株浓度为 5×10^6 CFU/ μ l)。

2.2 小鼠的免疫与攻击试验 21只BALB/c鼠随机分为疫苗组、空载体组和Ef对照组,每组7只,分别以100 μ l的疫苗株、空载体株和Ef株进行灌胃免疫,每周3次,连续3周,初次免疫后4周以10 μ l的Pa菌液进行滴鼻攻击。

2.3 小鼠的肺细菌负荷检测 攻击后2周杀鼠,无菌取小鼠肺组织匀浆,按1:10~10 000稀释,分别取10 μ l涂布接种于LB平板,37℃培养48 h计数菌落。

2.4 小鼠脾细胞增殖检测 参照文献^[13]制备浓度为 5×10^6 /ml的脾细胞悬液(用含10% FBS的RPMI1640培养基悬浮脾细胞),并加入100 μ l的青霉素(10 U/ μ l)和链霉素(10 μ g/ μ l)。取1 ml脾细胞悬液加入24孔板,每个样本加3孔(分别为原液组、PaAg组和ConA组),PaAg组和ConA组分别加入10 μ g/孔的PaAg和ConA刺激细胞;然后每孔分别加入10 μ l的MTT(5 mg/ml),置于CO₂培养箱(CO₂浓度5%,37℃培养4 h);弃上清,加入DMSO 150 μ l/孔,混匀后于570 nm处测定吸光值。

2.5 小鼠脾细胞凋亡检测 按2.4分组方法分别加入脾细胞悬液、PaAg和ConA,置于CO₂培养箱中培养18 h后,每孔收集 1×10^6 个细胞,加1 ml的4℃预冷的PBS洗涤,然后分别加入1:4稀释的结合缓冲液100 μ l/孔、Annexin V-FITC 5 μ l/孔和PI 10 μ l/孔,混匀后室温避光反应15 min;FACS检测细胞凋亡。

2.6 小鼠脾细胞CD4⁺/CD8⁺亚群检测 取200 μ l脾细胞悬液,加1 ml的PBS洗涤,3 000 r/min(离心半径15 cm)离心3 min,弃上清;加入1%阻断液100 μ l,37℃孵育1 h;PBS洗涤后分别加入大鼠抗小鼠CD4⁺/CD8⁺单抗5 μ l,4℃反应30 min;PBS洗涤,加入FITC标记的兔抗大鼠IgG抗体5 μ l,4℃反应30 min;PBS洗涤,然后用FACS检测脾细胞CD4⁺/CD8⁺亚群。

2.7 脾细胞体外刺激与基因扩增 取1 ml脾细胞悬液加入24孔板,再加入PaAg 10 μ g/孔,刺激培养48 h,收集脾细胞提取DNA,PCR扩增IL-2(95℃ 5 min;94℃ 30 s,59℃ 90 s,72℃ 1 min,共35个循环;72℃ 10 min)、IFN- γ (95℃ 2 min;95℃ 30 s,55℃ 1 min,72℃ 30 s,共循环40次;72℃ 2 min)、IL-12(95℃ 2 min;95℃ 20 s,56℃ 20 s,72℃ 20 s,共40个循环;72℃ 5 min)、IL-17(95℃ 5 min;95℃ 10 s,56.3℃ 30 s,72℃ 30 s,共45个循环;72℃ 10 min)和Foxp3⁺基因(95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,

72 °C 30 s,共 40 个循环;72 °C 10 min),引物见表 1。扩增产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.8 统计学分析 采用 SPSS26.0 分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,肺细菌计数转化为对数值进行分析,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR primer sequence

引物 Primers	序列(5'-3') Sequences	PCR 产物(bp) PCR products
IL-2-F	AACAGCGCACCACTTCAA	453
IL-2-R	TTGAGATGATGCTTTGACA	
IFN- γ -F	ATGAACGCTACACACTGCATCT	399
IFN- γ -R	GAGCTCATTGAATGCTTGG	
IL-12-F	GCGGATTCCCGGTCCAGCATGTGTC	300
IL-12-R	GCGAATTCAGGTTTCGGGACTGGCTAA	
IL-17-F	GCGGATTTCGAATGTAATCAACCT	380
IL-17-R	GCGAATTCCTCCAGATCACAGAGG	
Fox3 ⁺ -F	GATATCTGCGGATTCTCTTGCCAAGCTGGAAGACT	250
Fox3 ⁺ -R	GCGAATTCAGTGATGCAGCATGAAGT	
	GTGG	

表 2 免疫及攻击后小鼠肺组织细菌菌落计数
Table 2 The number of colony-forming units of bacteria in the lung of immunized and challenged mice

分组	例数	免疫菌株	菌落计数 lg(CFU/g)
疫苗组	7	rEf(pGEX-LasR)	7.616 ± 0.010 [*]
空载体组	7	rEf(pGEX-1 λ T)	8.876 ± 0.011
Ef 对照组	7	Ef(ATCC470077)	8.902 ± 0.010

注(Notes):^{*}与空载体组和 Ef 对照组比较, $P < 0.01$ (Compared with blank vector group and Ef group $P < 0.01$)。

结 果

1 肺细菌负荷

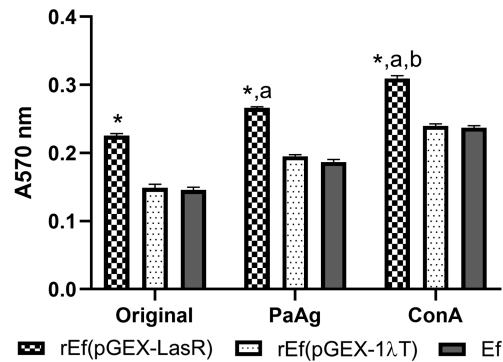
疫苗组小鼠的肺细菌负荷相比于空载体组和 Ef 对照组减少了约 1.2 lg(CFU/g),比较差异有统计学意义($F = 36621.974, P < 0.01$),疫苗组肺细菌负荷低于空载体组和 Ef 对照组($t = 232.288$ 和 $237.085, P_{均} < 0.01$) (表 1)。

2 脾细胞增殖

在不同培养条件下,疫苗组小鼠的脾细胞增殖水平均显著高于空载体组和 Ef 对照组($F = 1915.240, 1406.373$ 和 $802.485, P_{均} < 0.01$)。不同刺激原之间比较,脾细胞增殖水平 ConA 组 > PaAg 组 > 原液组 ($F = 1316.895, P < 0.01$,图 1)。

3 脾细胞凋亡

疫苗组小鼠脾细胞凋亡率在 PaAg/ConA 刺激下以及原液中均显著低于空载体组和 Ef 对照组($F = 89.225, 48.528$ 和 $83.740, P_{均} < 0.01$)。不同刺激原间比较,脾细胞凋亡率最高为 ConA 组,最低为原液组,比较差异有统计学意义($F = 7554.170, P < 0.01$) (图 2)。

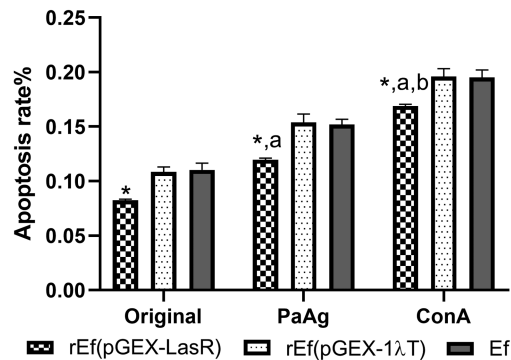


注:^{*}与空载体组和 Ef 对照组比较, $P < 0.01$;^a与原液组比较, $P < 0.01$;^b与 PaAg 刺激组相比, $P < 0.01$ 。

图 1 免疫及攻击后小鼠脾细胞增殖检测

Notes:^{*} Compared with blank vector group and Ef group, $P < 0.01$.^a Compared with original group, $P < 0.01$.^b Compared with PaAg group, $P < 0.01$.

Fig. 1 Detection of splenocyte proliferation in immunized and challenged mice



注:^{*}与空载体组和 Ef 对照组比较, $P < 0.01$;^a与原液组比较, $P < 0.01$;^b与 PaAg 刺激组相比, $P < 0.01$ 。

图 2 免疫及攻击后小鼠脾细胞凋亡检测

Notes:^{*} Compared with blank vector group and Ef group, $P < 0.01$.^a Compared with original group, $P < 0.01$.^b Compared with PaAg group, $P < 0.01$.

Fig. 2 Detection of splenocyte apoptosis in immunized and challenged mice

4 脾细胞 CD4⁺/CD8⁺ 亚群

疫苗组小鼠脾 CD4⁺ 细胞比例较空载体组和 Ef 对照组显著升高($F = 577.143, P < 0.01$),CD8⁺ 细胞比例无明显差异($F = 1.161, P > 0.05$) (图 3)。

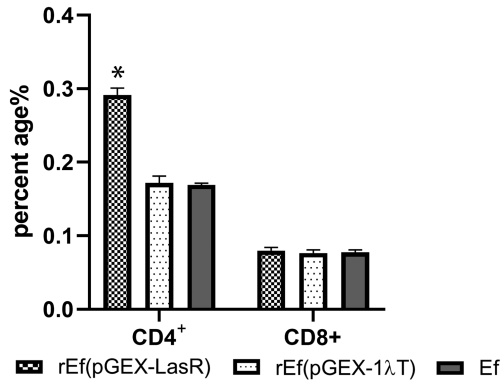
5 细胞因子和 Fox3⁺ 基因的 PCR 检测

体外刺激培养经疫苗免疫及 Pa01 株攻击后的小鼠脾细胞,提取 DNA 进行 PCR,可从疫苗组小鼠脾细胞扩增出 453、399、300、380 和 250 bp 的 IL-2、IFN- γ 、IL-12、IL-17 和 Fox3⁺ 基因条带(图 4)。空载体组和 Ef 对照组未扩增出相应基因片段。

讨 论

LasR 是 LuxR 家族的蛋白,参与调节 Pa 的多种生物合成与代谢途径,是一种与 Pa 生长代谢密切相关的蛋白质^[15-16]。LasR 在细菌生长早期即可表达,氧

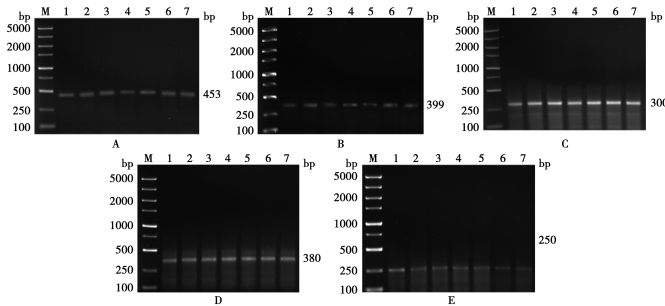
化应激、铁限制和种群密度等多种因素可刺激其表达水平升高^[15-16]。研究显示纯化的 LasR 蛋白可诱导小鼠免疫系统抵抗 Pa 攻击,可作为 Pa 疫苗的一种候选抗原^[17]。本研究以 Ef 作为活菌载体表达 LasR 抗原,口服灌胃 BALB/c 鼠,发现疫苗组小鼠在 Pa01 株攻击后的肺细菌负荷显著低于对照组,提示以 Ef 为载体构建活菌重组疫苗可诱导小鼠产生免疫保护力。



注: *与空载体组和 Ef 对照组比较(Compared with blank vector group and Ef group), $P < 0.01$ 。

图 3 免疫及攻击后小鼠脾细胞亚群检测

Fig. 3 The percentage of CD4⁺/CD8⁺ T cells of splenocytes in immunized and challenged mice



M DNA 标志物 1~7 细胞因子及 Fox3⁺ 基因扩增产物 A~E 分别为 IL-2、IFN-γ、IL-12、IL-17 和 Fox3⁺ 电泳图

图 4 免疫及攻击后小鼠脾细胞因子及 Fox3⁺ 基因变化

M DNA marker 1-7 PCR products of cytokines and Fox3⁺ A-E the electrophoresis detection of PCR products of IL-2, IFN-γ, IL-12, IL-17 and Fox3⁺ genes

Fig. 4 The changes of cytokines gene and Fox3⁺ gene of splenocytes in immunized and challenged mice

Ef 是一种乳酸菌,具有良好的耐酸、耐胆盐以及肠道上皮黏附特性,肠道中的 Ef 可被 M 细胞摄取,在甘露糖受体的介导下被肠道固有层和淋巴结中的巨噬细胞吞噬,进而在在不引起炎症反应的同时刺激宿主免疫系统^[18]。Diaz 等^[19]采用 Ef(CECT7121 株)联合针对牛呼吸系统疾病(bovine respiratory disease, BRD)的疫苗免疫 BALB/c 鼠,发现口服 Ef 制剂可增强小鼠对 BRD 疫苗的免疫应答,提高特异性抗体滴度、抗体亲和力以及脾细胞培养上清液中 IFN-γ 水平。Chen 等^[20]以 Ef(MDXEF-1 株)为载体构建了表达 3-1E 抗

原的艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)载体疫苗,将该疫苗口服免疫仔鸡,可刺激仔鸡产生高水平血清特异性 IgG 和盲肠分泌性 IgA,外周血单核细胞 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞比例增加,脾细胞 IL-2 和 IFN-γ 表达水平升高。本研究采用以 Ef(ATCC47077 株)为载体的 Pa 疫苗口服灌胃免疫 BALB/c 鼠,免疫后 2 周采用 Pa01 株进行滴鼻攻击,发现疫苗组小鼠的脾细胞增殖活性显著升高,且在 PaAg 刺激下脾细胞增殖活性进一步增强;FACS 检测脾细胞亚群显示 CD4⁺ T 细胞比例显著增加,但 CD8⁺ T 细胞无明显差异。CD4⁺ T 细胞在调节机体对各种病原体的适应性免疫应答中发挥重要作用,可强化或抑制机体免疫反应、调节多种免疫细胞功能和辅助 CD8⁺ T 细胞应答。研究表明 Pa 疫苗诱导的 Th 细胞可在中性粒细胞减少的小鼠模型中产生保护力^[21];Th17 型 CD4⁺ T 细胞可通过募集中性粒细胞提供针对多种血清型 Pa 的保护作用^[10];Treg 细胞的免疫调节功能可抑制过度的免疫反应,减少 Pa 感染患者的组织损伤^[21]。在本研究中,采用 PaAg 体外刺激经免疫及 PA01 株攻击后的小鼠脾细胞,发现疫苗组小鼠脾细胞 IL-2、IFN-γ、IL-12、IL-17 和 Fox3⁺ 基因表达升高,推测口服 rEf(pEGX-LasR)疫苗可通过肠道黏膜相关淋巴组织(MALT)呈递 LasR 抗原,刺激小鼠免疫系统,促进脾脏的初始 T 细胞增殖分化为 Th1、Th17 和 Treg 细胞,从而发挥免疫保护作用。

细胞凋亡是机体维持稳态和清除病原体感染的重要手段之一,但过度的凋亡会导致机体免疫屏障破坏,引起严重的病理性改变。Pa 感染可通过多种途径诱导机体免疫细胞凋亡,从而抵抗宿主免疫系统的杀伤作用。Pa 的群体感应信号分子 3-O-C12-HSL 可特异性促进巨噬细胞凋亡,减弱其吞噬活性,抑制宿主 CD4⁺ T 细胞向 Th1 和 Th2 细胞分化^[23]。Pa 还可通过死亡受体和线粒体途径诱导淋巴细胞的广泛凋亡,预防细胞凋亡的策略能够改善机体的免疫功能,从而增强机体的抗感染能力^[24]。本研究中,疫苗组小鼠在 Pa01 株攻击后,脾细胞凋亡率较空载体组和对照组明显降低,说明口服该疫苗具有抑制淋巴细胞凋亡的潜力。

综上所述,本研究采用 Ef(ATCC47077 株)表达 LasR 蛋白作为抗原递送载体,口服免疫可刺激小鼠脾细胞增殖,抑制脾细胞凋亡,诱导小鼠产生细胞免疫应答,并有效降低了 Pa01 株攻击后小鼠的肺部细菌负荷。

【参考文献】

[1] Mielko KA, Jabłonski SJ, Milczewska J, et al. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. World J Microbiol Biotechnol,

- 2019,35(11):178.
- [2] Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses[J]. Pathog Dis, 2013, 67(3): 159-173.
- [3] Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 58(4): 428-439.
- [4] Malone JG. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs [J]. Infect Drug Resist, 2015, 8(2): 237-247.
- [5] Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies [J]. Biotechnol Adv, 2019, 37(1): 177-192.
- [6] Restrepo MI, Babu BL, Reyes LF, et al. Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients [J]. Eur Respir J, 2018, 52(2): 1701190.
- [7] Raman G, Avendano EE, Chan J, et al. Risk factors for hospitalised patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2018(7): 79.
- [8] Horcajada JP, Montero M, Oliver A, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4): e00031-19.
- [9] Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(5): 331-342.
- [10] Baker SM, McLachlan JB, Morici LA. Immunological considerations in the development of *Pseudomonas aeruginosa* vaccines [J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 16(2): 412-418.
- [11] Mojgani N, Shahali Y, Dadar M. Immune modulatory capacity of probiotic lactic acid bacteria and applications in vaccine development [J]. Benef Microbes, 2020, 11(3): 213-226.
- [12] 欧兴坤,李文桂. 铜绿假单胞菌重组 Ef-LasR 疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(6): 630-633, 638.
- [13] 张丽,李文桂,谭建蓉. 日本血吸虫重组 Bb(pGEX-Sj26GST) 疫苗免疫 BALB/c 小鼠脾细胞动态观察 [J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(10): 1028-1032, 1038.
- [14] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Protein Cell, 2015, 6(1): 26-41.
- [15] Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, et al. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Bacteriol, 1997, 179(10): 3127-3132.
- [16] Duan K, Surette MG. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems [J]. J Bacteriol, 2007, 189(13): 4827-4836.
- [17] 欧兴坤,李文桂. 铜绿假单胞菌群体感应系统 las/rhl 蛋白的研制现状 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(8): 988-992.
- [18] Castro MS, Molina MA, Azpiroz MB, et al. Probiotic activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121: effects on mucosal immunity and intestinal epithelial cells [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(4): 1117-1129.
- [19] Diaz AM, Almozni B, Molina MA, et al. Potentiation of the humoral immune response elicited by a commercial vaccine against bovine respiratory disease by *Enterococcus faecalis* CECT7121 [J]. Benef Microbes, 2018, 9(4): 553-562.
- [20] Chen W, Ma C, Wang D, et al. Immune response and protective efficacy of recombinant *Enterococcus faecalis* displaying dendritic cell-targeting peptide fused with *Eimeria tenella* 3-1E protein [J]. Poult Sci, 2020, 99(6): 2967-2975.
- [21] Kamei A, Wu W, Traficante DC, et al. Collaboration between macrophages and vaccine-induced CD4+ T cells confers protection against lethal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during neutropenia [J]. J Infect Dis, 2013, 207(1): 39-49.
- [22] Hector A, Schafer H, Poschel S, et al. Regulatory T-cell impairment in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas* infection [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(8): 914-923.
- [23] 丁凤鸣,张杏怡. 铜绿假单胞菌 Las 系统的免疫干预机制研究进展 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2017, 16(5): 529-532.
- [24] Schreiber T, Swanson PE, Chang KC, et al. Both gram-negative and gram-positive experimental pneumonia induce profound lymphocyte but not respiratory epithelial cell apoptosis [J]. Shock, 2006, 26(3): 271-276.
- 【收稿日期】 2021-12-28 【修回日期】 2022-02-16
-
- (上接 429 页)
- [13] Sun Y, Xiong X, Wang X. The miR-590-3p/VEGFA axis modulates secretion of VEGFA from adipose-derived stem cells, which acts as a paracrine regulator of human dermal microvascular endothelial cell angiogenesis [J]. Hum Cell, 2020, 33(3): 479-489.
- [14] 毕晓娟,张传山,李亮,等. 泡球蚴组织蛋白处理对人肝星状细胞 α -SMA 和 COL1A1 表达及 TGF- β /Smad 信号通路的影响 [J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(10): 956-960.
- [15] 马文梅,毕晓娟,杨宁,等. 泡球蚴蛋白对脂肪间充质干细胞迁移和分化的影响 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(3): 282-286.
- [16] Lin RY, Wang JH, Lu XM, et al. Components of the mitogen-activated protein kinase cascade are activated in hepatic cells by *Echinococcus multilocularis* metacystode [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(17): 2116-2124.
- [17] Lin R, Lu G, Wang J, et al. Time course of gene expression profiling in the liver of experimental mice infected with *Echinococcus multilocularis* [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14557.
- [18] Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control [J]. Science, 2014, 346(6205): 1248012.
- [19] Li Y, Fu H, Wang H, et al. GLP-1 promotes osteogenic differentiation of human ADSCs via the Wnt/GSK-3 β /beta-catenin pathway [J]. Mol Cell Endocrinol, 2020(515): 110921.
- 【收稿日期】 2021-12-22 【修回日期】 2022-02-01