

炎症信号通路激活与细胞焦亡介导大肠杆菌热不稳定肠毒素亚基黏膜佐剂效应

刘地^{1,2*}, 王前程¹, 乔宏萍^{1,2}, 武晓英^{1,2*}

1 太原师范学院 生物科学与技术学院, 天然生物活性成分创制兽药工程中心, 山西 晋中

2 山西省中兽药技术创新中心, 山西 太原

刘地, 王前程, 乔宏萍, 武晓英. 炎症信号通路激活与细胞焦亡介导大肠杆菌热不稳定肠毒素亚基黏膜佐剂效应[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4076-4096.

LIU Di, WANG Qiancheng, QIAO Hongping, WU Xiaoying. Inflammatory signaling and pyroptosis mediate the mucosal adjuvant effect of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin subunits[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 4076-4096.

摘要: 【目的】热不稳定肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)是公认的强效黏膜免疫佐剂, 但其与宿主上皮细胞的相互作用机制尚不明确, 导致毒性与佐剂性难以拆分, 严重限制了其临床应用。本研究致力于阐明 LT 及其 LTA、LTB 亚基对人上皮细胞的差异性调控, 旨在揭示其初始佐剂活性的引发机制。【方法】通过原核表达技术制备具有生物活性的 LTB、LTA 及其突变体 LTA(R192G)。以人小肠上皮细胞系 FHs 74 Int 和小鼠空肠离体肠段为研究模型, 检测细胞活力与凋亡水平, 分析炎症因子的表达差异, 并探究 NF- κ B 及 NLRP3 炎症小体通路的变化。【结果】本研究制备的 3 种蛋白均具备生物活性, 可被细胞有效内化。LTB 主要诱导早期凋亡, 显著上调 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 的表达, 并激活 NF- κ B 通路。LTA 则显著引发细胞焦亡, 特异性上调 IL-18、IL-1 β , 并激活 NLRP3 炎症小体通路。突变体 LTA(R192G)作用减弱, 但仍可激活 NLRP3 通路。【结论】LT 的佐剂活性源于其亚基经差异化通路激活上皮细胞免疫应答, LTB 主要经由 NF- κ B 通路诱导促炎因子产生; LTA 则主要依赖 NLRP3 通路诱导 IL-1 β /18 分泌及细胞焦亡。该发现不仅揭示了 LT 启动黏膜免疫的初始分子事件, 更为定向改造 LTA 与 LTB 亚基, 研发新一代安全、高效的黏膜疫苗佐剂奠定了坚实的理论基础。

关键词: 热不稳定肠毒素; 上皮细胞; 炎症信号通路; 细胞焦亡

资助项目: 山西省基础研究计划(20210302123317); 山西省现代农业产业技术研究体系专项资金(2025CYJSTX18)

This work was supported by the Fundamental Research Program of Shanxi Province (20210302123317) and the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System of Shanxi Province (2025CYJSTX18).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Di, diliu@tynu.edu.cn; WU Xiaoying, wuxy@tynu.edu.cn

Received: 2026-03-24; Accepted: 2026-05-08; Published online: 2026-05-29

Inflammatory signaling and pyroptosis mediate the mucosal adjuvant effect of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin subunits

LIU Di^{1,2*}, WANG Qiancheng¹, QIAO Hongping^{1,2}, WU Xiaoying^{1,2*}

1 Center for Veterinary Medicine, College of Biological Sciences and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong, Shanxi, China

2 Traditional Chinese Veterinary Medicine Technology Innovation Center of Shanxi Province, Taiyuan, Shanxi, China

Abstract: [Objective] The heat-labile enterotoxin (LT) is widely recognized as a potent mucosal immunoadjuvant. However, the mechanisms underlying its interaction with host epithelial cells remain incompletely understood, which makes it difficult to separate its toxicity from its adjuvant activity. This limitation has severely hampered its clinical application. Therefore, this study aims to elucidate the differential regulatory effects of LT and its A (LTA) and B (LTB) subunits on epithelial cells, as well as the mechanism underlying the initiation of their initial adjuvant activity. **[Methods]** The biologically active LTB, LTA, and its mutant LTA(R192G) were prepared *via* prokaryotic expression. Using the human small intestinal epithelial cell line FHs 74 Int and a mouse jejunal *ex vivo* intestinal segment model, we examined cell viability and apoptosis, analyzed inflammatory cytokine expression, and investigated changes in the NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways. **[Results]** The three prepared proteins all possessed biological activity and could be effectively internalized by cells. LTB primarily induced early apoptosis, significantly up-regulated the expression of IL-6, IL-8, IL-1 β , and TNF- α , and activated the NF- κ B pathway. LTA triggered significant pyroptosis, specifically up-regulated the expression of IL-18 and IL-1 β , and activated the NLRP3 inflammasome pathway. The mutant LTA(R192G) exerted weakened effects but could still activate the NLRP3 pathway. **[Conclusion]** The adjuvant activity of LT stems from its subunits activating immune responses in epithelial cells through different mechanisms: LTB primarily promotes pro-inflammatory cytokine production *via* the NF- κ B pathway, while LTA mainly relies on the NLRP3 pathway to induce IL-1 β /IL-18 secretion and pyroptosis. This discovery not only reveals the initial molecular events of LT-initiated mucosal immunity, but more importantly, lays a solid theoretical foundation for developing novel, safe, and efficient mucosal vaccine adjuvants through targeted modification of LTA and LTB subunits.

Keywords: heat-labile enterotoxin; epithelial cell; inflammatory signaling pathway; pyroptosis

热不稳定肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)是产肠毒素大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)分泌的一种对热敏感的关键毒力因子,为引起婴幼儿腹泻、旅行者腹泻以及多种家畜腹泻的主要病原物质之一^[1]。LT分子量约

为 87.0 kDa,呈典型六聚体结构,由 1 个具有催化活性的 A 亚基(LTA,约 27.5 kDa)和 1 个负责受体结合的 B 亚基五聚体(LTB,每个单体约 11.6 kDa)构成^[2]。除具有毒性外,LT还表现出较强的免疫原性及优异的黏膜佐剂活性^[3]。多年

来, 针对 LT 及其突变体佐剂机制的研究已积累丰富证据, 表明 LT 及其衍生物具有广泛的免疫调节功能, 可有效激活抗原呈递细胞, 诱导机体产生抗原特异性黏膜免疫关键效应因子 sIgA, 以及系统性 IgG1 与 IgG2 抗体^[4]。更重要的是, 它们能够调控 Th1、Th2、Th17 以及调节性 T 细胞等多种免疫应答途径的平衡^[5]。近期研究进一步揭示, LTA 与 LTB 亚基各自拥有独特的免疫调节潜力, 即便脱离完整毒素结构仍可独立发挥佐剂效应^[6]。研究表明, 单独的 LTB 亚基不能引起腹泻, 其通过与细胞表面特异性糖脂类受体结合, 一方面直接激活 B 细胞、巨噬细胞、CD4⁺ T 细胞及 CD8⁺ T 细胞, 并促进树突状细胞成熟; 另一方面则可激活 Th1 和 Th2 辅助 T 细胞应答, 诱导相应细胞因子的产生, 从而间接调节免疫反应^[7]。与 LTB 亚基不同, LT 的毒性作用主要来源于 LTA 亚基; 除毒性效应外, LTA 亚基及其 A1 结构域在诱导机体产生特异性 IgG 及黏膜 sIgA 抗体的同时, 还可激活 Th17 辅助 T 细胞途径, 促进炎性细胞因子的生成^[8]。

目前, 对 LT 佐剂机制的研究主要依赖动物模型, 通过将其与特定模式抗原联合免疫, 进而分析所诱导的特异性抗体谱、细胞因子谱, 阐释其作用方式^[9]。此外, 部分研究集中于 LT 蛋白对专职抗原呈递细胞的直接调控作用^[8]。然而, 黏膜组织微环境的构成是一个关键却常被忽视的层面^[10]。在黏膜表面, 上皮细胞构成主要的物理与免疫屏障, 而专职抗原呈递细胞数量相对稀少^[11]。尤其值得注意的是, LTB 五聚体与细胞表面受体的结合能力并不局限于抗原呈递细胞, 其对上皮细胞同样具有高亲和力靶向作用^[12]。因此, 当 LT 作为佐剂经黏膜途径给药时, 其与上皮细胞发生相互作用的几率显著高于与专职抗原呈递细胞的接触^[5]。上皮细胞在摄取 LT 佐剂蛋白后如何参与后续黏膜免疫应答的诱导过程, 其机制尚未得到充分解析。鉴于此, 深入揭示上皮细胞内由 LT 亚基激活的关键分子事件及相关信号通路, 对于阐明 LT 黏膜佐

剂作用的核心机制具有决定性意义。

动物实验分析表明, LT 可能通过诱导局部炎症发挥其佐剂作用。已有证据显示, NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体的激活及其介导的细胞焦亡途径, 以及核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)信号通路, 是最为重要的下游炎症信号传导路径^[13]。在 NLRP3 炎症小体通路中, 其活化可促使 Pro-Caspase-1 发生剪切, 生成具有酶活性的 Caspase-1, 进而引发消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)蛋白裂解, 并刺激白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)等促炎因子的释放, 最终导致细胞焦亡^[14]。在 NF- κ B 通路中, 细胞在感知外界刺激后可激活上游信号, 引起 κ B 抑制因子激酶(inhibitor of κ B kinase, IKK)复合体的活化。活化的 IKK 能够磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B), 促使 I κ B 泛素化并降解, 从而释放 NF- κ B 二聚体。后者随后易位至细胞核内, 启动多种炎症相关因子的转录表达^[13]。

本研究在现有 LT 佐剂研究框架下, 从细胞与分子水平系统探讨 LT 及其亚基在黏膜界面发挥功能的作用机制。通过分析不同 LT 亚基单独刺激后上皮细胞炎症相关信号通路的活化状态, 以及免疫应答相关效应分子表达的变化规律, 系统阐释各亚基对上皮细胞固有免疫应答的差异化调控模式, 旨在为开发基于 LT 亚基的新型、高效、安全黏膜疫苗佐剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株和质粒

工程菌株大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)购置于 Invitrogen 公司。人小肠上皮细胞系 FHs 74 Int 购自中国科学院

典型培养物保藏委员会细胞库。表达载体 pET24a(+) 购置于 Novagen 公司。重组质粒 pET24a(+)-*eltA*、pET24a(+)-*eltAm* 和 pET24a(+)-*eltB* 由本实验室构建保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

卡那霉素(kanamycin, Kan)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethylrhodamine isothiocyanate, TRITC)、GM1 神经节苷脂, Sigma-Aldrich 公司; LANCE cAMP 384 kit, Perkin Elmer 公司; 杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)细胞培养基、胎牛血清、胰酶、青链霉素混合液, ThermoFisher Scientific 公司; 吡咯烷二硫代氨基甲酸铵(ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC)、MCC950、细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、末端标记法(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒、人源和鼠源白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、IL-18、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司; RNA 提取试剂盒、定量 PCR 反转录试剂盒、嵌合荧光法定量检测试剂, TaKaRa 公司; 鼠源 LTB、鼠抗人 NLRP3、Caspase-1、Pro-IL-18、Pro-IL-1 β 、NF- κ B、p65、p-p65、p-I κ B α 、I κ B α 、GSDMD、GSDMD-N 段抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗鼠 IgG 二抗, Santa Cruz 公司。

蛋白电泳系统、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 多功能酶标仪, BioTek 公司; 研究级倒置荧光显微镜, Olympus 公司; 流式细胞仪, BD 公司; 荧光定量 PCR 仪, ABI 公司。

1.2 蛋白表达与纯化

将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)中, 从 Kan 抗性平板上挑取单克隆, 接种到含抗生素的 LB 培养基试管中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。

取 1 mL 过夜培养物转接至含 100 mL LB 培养基的锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 培养约 2.5 h。菌液 OD_{600} 达到约 0.6 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 30 °C 诱导表达 10 h。诱导结束后, 于 4 °C、8 000 $\times$ g 离心 15 min 收集菌体。采用 PBS (pH 7.4)重悬菌体并进行超声裂解(冰水浴, 功率 300 W, 超声 3 s、间隔 2 s, 共 10 min), 表达的重组蛋白包涵体沉淀在含 8.0 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液中溶解。通过 Ni-NTA 亲和和介质纯化获得目标蛋白, 将纯化的蛋白置于不含尿素的 PBS 缓冲液中 4 °C 透析 12 h, 其间更换 2-3 次透析液, 缓慢除去溶液中的尿素并完成蛋白复性, 通过测定复性前后蛋白浓度计算蛋白复性效率。采用 Bradford 法测定可溶性蛋白的浓度, 并通过 SDS-PAGE 与非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE)分析蛋白表达水平及纯化效果。

1.3 酶联免疫吸附试验测定蛋白与 GM1 神经节苷脂的结合

将 GM1 神经节苷脂用包被缓冲液稀释至 10 μ g/mL, 加入 96 孔酶标板中, 每孔 100 μ L, 4 °C 包被过夜。次日, 弃去孔内液体, 用磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with Tween-20, PBST)洗涤 2 次。向反应孔中加入 300 μ L 封闭液, 37 °C 恒温封闭 2 h。弃去封闭液, PBST 洗涤 2 次, 向样品孔中加入梯度稀释的 LTB 蛋白溶液(0、0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0 μ g/mL), 每孔 100 μ L, 设 3 个复孔; 以 PBS 缓冲液代替蛋白作为对照孔, 每个浓度设 3 个复孔, 37 °C 恒温孵育 2 h。弃去蛋白液, PBST 洗涤 3 次。向反应孔中加入 1:4 000 稀释的鼠源 LTB-IgG 抗体 100 μ L, 37 °C 恒温孵育 1 h。弃去一抗溶液, PBST 洗涤 3 次。每孔加入 1:8 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 抗体 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h, 弃去二抗溶液, PBST 洗涤 5 次。每孔加入新鲜配制的邻苯二胺

(*O*-phenylenediamine, OPD)底物显色液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。随后加入 100 μL 终止液终止反应, 立即于酶标仪上测定 492 nm 波长处的吸光度。

1.4 细胞内 cAMP 含量的测定

收集对数生长期的细胞, 使用 Versene 溶液消化并制备单细胞悬液, 经 1 000 $\times g$ 离心 10 min 收集细胞。细胞用 Hank's 平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)洗涤 1 次后, 使用 Stimulation buffer 重悬细胞, 调整细胞密度约为 2×10^5 个/100 μL 。向细胞悬液中加入 Alexa Fluor[®] 647 标记的检测抗体 1 μL , 室温孵育 60 min。取 10 μL 上述抗体标记的细胞悬液与 10 μL 待测 LT 亚基蛋白溶液依次加入 96 孔板中, 设 3 个复孔, 室温孵育 60 min。随后加入 Detection Mix 混合液 20 μL , 室温避光孵育 60 min, 最后使用荧光酶标仪检测荧光信号强度, 并根据标准曲线计算细胞内 cAMP 浓度。

1.5 蛋白质的荧光素标记

分别使用 FITC 标记 LTB 蛋白, 使用 TRITC 标记 LTA 和 LTA(R192G)蛋白。称取 0.5 mg 荧光素溶于 0.5 mL 二甲基亚砜中, 混匀使荧光素充分溶解, 配制成 1 mg/mL 染料溶液。按照标记蛋白质与荧光素质量比为 1 000 μg :150 μg 的比例, 将荧光素溶液缓慢加入蛋白质溶液中, 吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光反应 8 h。随后加入适量 5 mol/L NH_4Cl 溶液至终浓度为 50 mmol/L, 继续于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 2 h 以终止标记反应。最后将交联产物在 PBS 溶液中透析 3–4 次, 直至透析液澄清且几乎无色为止, -20°C 避光保存。

1.6 融合蛋白细胞内化检测

将处于对数生长期的 FHs 74 Int 细胞经胰酶消化后, 用完全培养基重悬并调整细胞浓度。按每孔 1×10^4 个细胞的密度均匀接种于 6 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。加入荧光素标记的蛋白, 终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。孵育结束后, 弃去含蛋白的培养液, 用

PBS 溶液洗涤细胞 3 次。随后在荧光显微镜下分别用蓝光(激发波长 460–495 nm)和绿光(激发波长 530–550 nm)激发, 观察并记录细胞内荧光的分布情况, 最后使用 ImageJ 软件(<https://imagej.net/ij>)分析细胞平均荧光强度。

1.7 细胞增殖活力测定

将消化后的 FHs 74 Int 细胞, 以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种至 96 孔板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。向细胞中加入不同终浓度(0、5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LTA、LTA(R192G)、LTB 蛋白, 每组设 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 12 h 或 24 h。孵育结束后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 继续于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度值, 评估细胞增殖活力。

1.8 细胞凋亡检测

细胞经目的蛋白处理后, 用胰蛋白酶消化收集, 制备单细胞悬液, 1 000 $\times g$ 离心 10 min 收集细胞。使用 PBS 溶液洗涤细胞 2 次, 弃去上清, 加入结合缓冲液 100 μL 重悬细胞。向细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 试剂 5 μL , 混合均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min。随后加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)溶液 5 μL , 避光孵育 5 min。最后, 加入结合缓冲液 400 μL 稀释细胞, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 每组实验独立重复 3 次。

1.9 荧光定量 PCR 检测细胞内炎症因子转录水平

细胞经目的蛋白处理后, 用胰蛋白酶消化收集, 制备单细胞悬液, 1 000 $\times g$ 离心 10 min 收集细胞, 使用 PBS 溶液洗涤细胞 2 次。细胞沉淀中加入 350 μL 细胞裂解液, 充分涡旋振荡以裂解细胞, 用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。提取的总 RNA 立即使用反转录试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 按照表 1 的引物序列, 使用嵌合荧光法定量检测试剂进行实时荧光定量 PCR 反应。反应体系(25 μL): cDNA

表1 炎症因子荧光定量PCR引物序列

Table 1 Fluorescence quantitative PCR primer sequences for inflammatory factors

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Amplification length/bp	References
<i>IL-1β</i>	F	AGGCTGCTCTGGGATTCTCT	236	[15]
	R	CCCTTGCTGTAGTGGTGGTC		
<i>IL-6</i>	F	GTGTGAAAGCAGCAAAGAGGC	234	[16]
	R	TGCAGGAACCTGGATCAGGACT		
<i>IL-8</i>	F	CTGCGCCAACACAGAAATTA	234	[15]
	R	CATCTGGCAACCCTACAACA		
<i>IL-18</i>	F	CAAGGAAATCGGCCTCTATT	255	[17]
	R	TCCTGGGACACTTCTCTGAA		
<i>TNF-α</i>	F	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC	217	[18]
	R	GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC		
<i>β-actin</i>	F	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250	[19]
	R	CTCCTTAATGTCACGCACGAT		

模板 1 μL, 特异性上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 酶预混液 12.5 μL, 无 RNase 水 10.5 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 40 个循环。实验独立重复 3 次, 采用 *β-actin* 作为内参基因进行标准化, 目标基因的相对 mRNA 表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

1.10 ELISA 检测细胞因子含量

收集蛋白处理后的细胞培养上清液, 4 °C、12 000×g 离心 10 min 除去细胞碎片。取出预包被抗体的 96 孔板, 室温平衡 30 min。分别将不同浓度的标准品及待测样品加入相应孔中, 每孔 100 μL, 设 3 个复孔, 37 °C 孵育 2 h。弃去上清液, 每孔加入洗涤液 300 μL, 洗涤 3 次。随后加入生物素标记的检测抗体 100 μL, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 3 次。加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体 100 μL, 避光 37 °C 孵育 1 h, 弃去二抗溶液, 洗涤 3 次。最后加入 100 μL OPD 显色液, 37 °C 避光孵育 20 min, 加入 100 μL 终止液, 于酶标仪上检测 492 nm 处的吸光度。

1.11 Western blotting 检测

将亚基蛋白组(20、40 μg/mL)或亚基蛋白

(40 μg/mL)与抑制剂预处理组(PDTC 50 μmol/L, MCC950 10 μmol/L)作用后的细胞用 PBS 清洗 3 次, 加入适量细胞裂解液并于冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000×g 离心 15 min, 收集上清液。通过 SDS-PAGE 分离蛋白样品, 随后将蛋白转印至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。转印后的 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉溶液中, 室温封闭 1 h。封闭后, 加入稀释好的一抗工作液, 4 °C 孵育过夜。孵育结束后, 取出 PVDF 膜, 使用 Tris 盐吐温缓冲液(Tris-buffered saline with Tween, TBST)漂洗 3 次。随后将膜转移至稀释后的二抗溶液中, 室温孵育 1 h。最后用 TBST 缓冲液漂洗膜 3 次, 加入 ECL 试剂, 暗处避光孵育 5 min, 使用凝胶成像系统进行显影与成像分析。

1.12 离体肠段结扎模型评估蛋白的免疫效应

参照文献[20]所述方法, 采用 6–8 周龄雌性 BALB/c 小鼠构建离体肠段结扎模型。实验方案如图 4A 所示, 随机分为 4 组, 每组 5 只小鼠。小鼠经麻醉后, 打开腹腔, 显露从十二指肠至远端结肠的整个肠道, 随后对空肠进行结扎, 每组小鼠结扎肠腔内分别注射含 25 μg LTB、

25 μg LTA、25 μg LTA(R192G)的蛋白溶液或对照试剂。小鼠在麻醉状态下维持 3 h, 之后通过颈椎脱臼法实施安乐死, 收集各结扎肠段并测量其长度。将肠段纵向剪开, 用无菌 PBS 冲洗后, 置于含 1 mL 细胞培养液的 24 孔板中培养。24 h 后, 收集细胞培养上清液, 采用鼠源细胞因子 ELISA 试剂盒检测相关细胞因子水平。空肠组织以 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 所有检测结果均按肠段长度进行标准化处理。研究涉及的动物实验方案已获得生物科学与技术学院动物伦理委员会的批准, 审批号为 TYNUS-SKY-2026-001。

1.13 苏木精-伊红染色

将石蜡包埋的空肠组织样本切成 4 μm 厚的切片, 经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化后, 进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 5–10 min。水洗后, 经 1% 盐酸乙醇分化、流水蓝化, 随后用伊红复染 1–3 min。染色切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后封片。显微镜下观察, 细胞核呈蓝色, 细胞质呈红色。

1.14 TUNEL 组织染色

石蜡包埋的组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后, 置于柠檬酸盐缓冲液中进行微波抗原修复, 自然冷却至室温。用含 3% H_2O_2 的甲醇溶液室温孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶, PBS 洗涤后, 滴加含 0.1% Triton X-100 的透化液冰上孵育 2 min。随后, 使用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒染色, 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒避光孵育 60 min。反应终止后, PBS 洗涤, 封片后于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.15 统计学分析

采用 SPSS 统计软件(v25.0)进行实验数据分析。数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 每个实验结果独立重复 3 次。检测数据是否符合正

态分布, 对于符合正态分布且方差齐性的数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。统计显著性水平设定为 $P<0.05$, 差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 佐剂蛋白的高效表达、纯化与多聚体复性

在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 经 IPTG 诱导 10 h 后 3 种目标蛋白均实现了高效表达, 并主要以包涵体形式存在于细胞破碎后的沉淀中。通过包涵体洗涤、亲和纯化以及透析复性等一系列步骤成功获得了高纯度的目标蛋白, 蛋白复性率约为 40%, 且几乎无杂蛋白残留。SDS-PAGE 结果显示(图 1A), 所得蛋白分子量与预测值一致, 具体为 LTA (28.9 kDa)、LTA(R192G) (28.9 kDa) 与 LTB (12.9 kDa)。Native-PAGE 分析进一步表明(图 1B), LTB 在复性过程中可自发组装, 复性后主要以五聚体形式存在, 仅观察到少量单体。

2.2 佐剂蛋白的特异性生物学活性得以保持

通过 GM1 结合实验与细胞内 cAMP 含量测定对 LT 亚基佐剂蛋白的生物学活性进行验证。GM1-ELISA 结果显示, 随着 LTB 浓度升高底物吸光度相应增强, 呈现明显的浓度依赖性(图 1C), 说明纯化复性后的 LTB 仍具备与神经节苷脂 GM1 结合的能力。cAMP 含量测定结果(图 1D)显示, 经佐剂蛋白处理 3 h 后 LTB 未引起细胞内 cAMP 水平的显著变化($P>0.05$)。相比之下, 具备 ADP-核糖基化酶活性及 ARF 结合能力的 LTA 则能够显著提高细胞内 cAMP 含量($P<0.001$), 达到 (86.20 ± 6.88) pmol/mL。突变体 LTA(R192G)也能引起细胞内 cAMP 的轻度升高 (30.40 ± 5.42) pmol/mL, 与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。

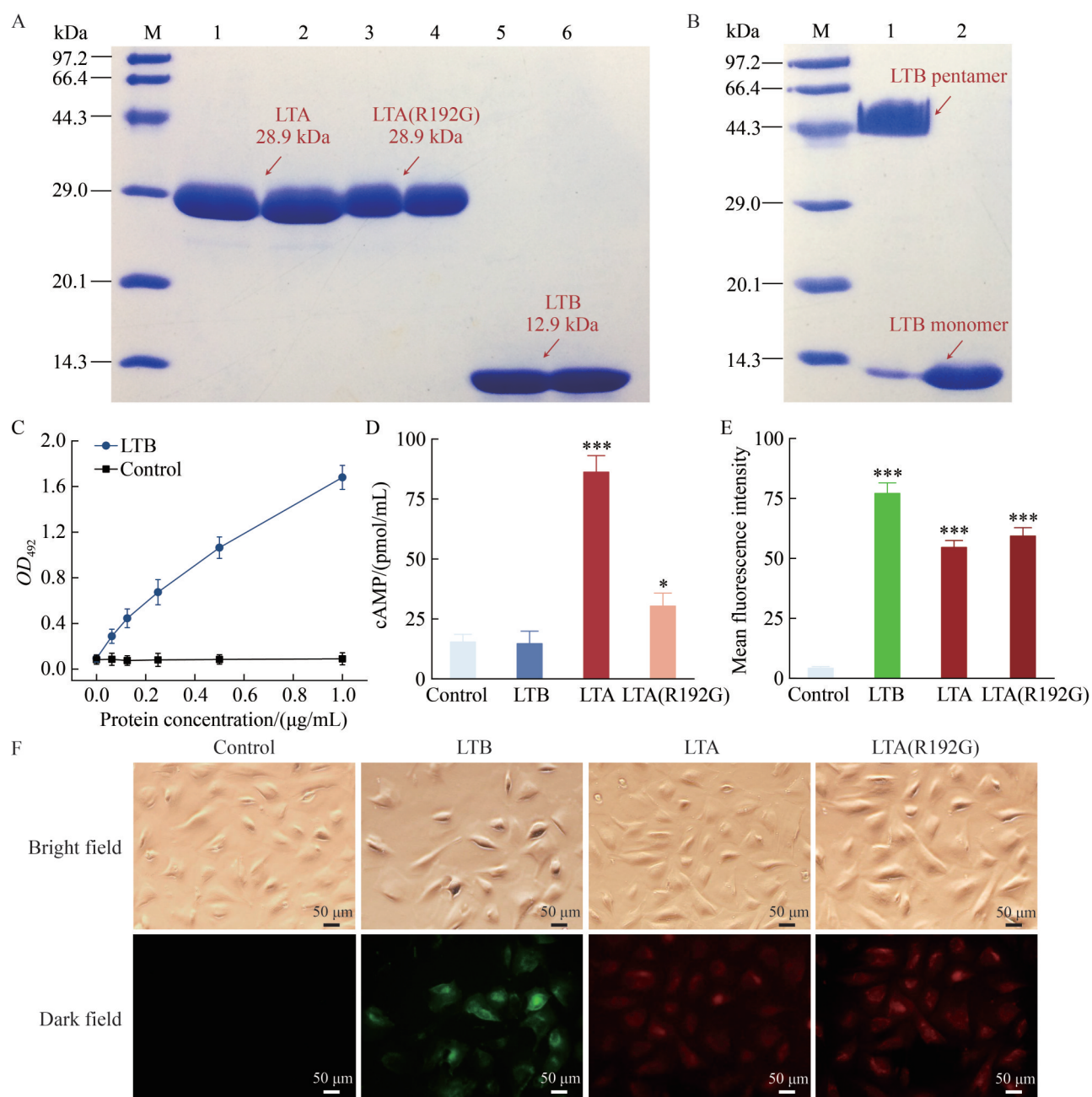


图1 LT亚基蛋白的纯化与生物活性表征

Figure 1 Purification and bioactivity characterization of LT subunit proteins. A: SDS-PAGE analysis of purified LTA, LTA(R192G), and LTB proteins [Lane M: Protein molecular weight marker; Lanes 1, 2: LTA protein; Lanes 3, 4: LTA(R192G) protein; Lanes 5, 6: LTB protein]; B: Native-PAGE analysis of LTB protein (Lane 1: Protein under non-denaturing conditions; Lane 2: Protein under heat-denaturing conditions); C: ELISA results for the binding of LTB protein to the GM1 receptor; D: Changes in intracellular cAMP levels after treatment of cells with LTA, LTA(R192G), and LTB proteins; E: Statistical analysis of mean intracellular fluorescence intensity; F: Cellular uptake of fluorescently labeled LTA, LTA(R192G), and LTB proteins (magnification: 200 $\times$). Data are presented as mean $\pm$ SD, and significance is determined relative to the control group. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$.

2.3 荧光标记佐剂蛋白在 FHs 74 Int 细胞中的摄取情况

经 3 h 佐剂蛋白处理后,明视野观察显示各实验组细胞形态与对照组相比均未见显著改变,在暗视野下所有蛋白处理组细胞内均可见明显的荧光信号(图 1F)。具体而言,FITC 标记的 LTB 蛋白激发后呈黄绿色荧光,而 TRITC 标记的 LTA 与 LTA(R192G)蛋白激发后显示红色荧光。ImageJ 软件分析结果表明(图 1E),细胞内平均荧光强度分别为 77.1、54.6、59.3,LTB 蛋白的细胞内化效率略高于 LTA 与 LTA(R192G)蛋白。上述结果表明,3 种佐剂蛋白均能够被 FHs 74 Int 细胞有效摄取并进入胞内。

2.4 佐剂蛋白对 FHs 74 Int 细胞形态的影响

为评估佐剂蛋白对细胞形态的影响,以 20 $\mu\text{g/mL}$ 无荧光素标记的 LTB、LTA 及 LTA(R192G)蛋白处理 FHs 74 Int 细胞 12 h。结果表明,与对照组相比,各实验组细胞形态均呈现不同程度的改变(图 2A)。LTB 处理组细胞边缘趋于平滑,形态由梭形转变为圆形或椭圆形;LTA 处理组则表现为细胞膜向外延伸,边缘粗糙,并出现触角状结构;LTA(R192G)处理组细胞形态未见显著变化,仍维持正常的梭形结构。

2.5 佐剂蛋白对 FHs 74 Int 细胞活力的差异抑制效应

CCK-8 结果显示(图 2B),LTB 蛋白处理 12 h 后 5–20 $\mu\text{g/mL}$ 实验组对细胞活力无显著影响($P>0.05$);当浓度升高至 40 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活力出现下降($P<0.05$),但抑制幅度低于 10.0%。处理 24 h 后,10 $\mu\text{g/mL}$ 及以上浓度均表现出明显的抑制作用,细胞活力分别降至对照组的 88.1%、83.4% 和 77.5%,降幅均超过 10.0%。LTA 蛋白在 12 h 处理条件下低浓度($\leq 10 \mu\text{g/mL}$)仅引起细胞活力的轻微抑制,而浓度 $>10 \mu\text{g/mL}$ 时抑制效果显著增强($P<0.01$),20 $\mu\text{g/mL}$ 与 40 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞活力分别为 86.3% 和 79.9%。

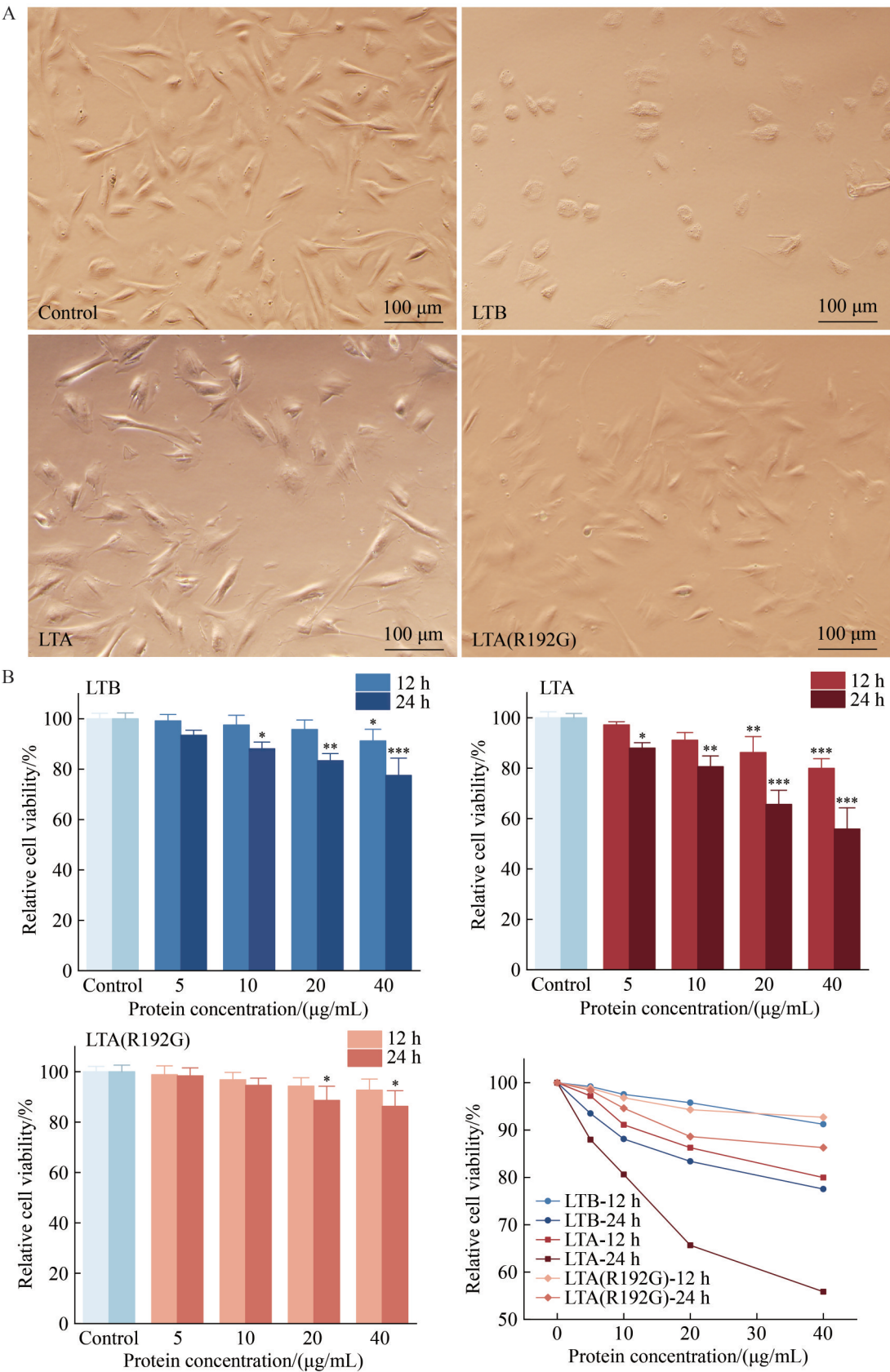
延长处理时间至 24 h 后所有浓度组均呈现显著抑制作用($P<0.05$),5–40 $\mu\text{g/mL}$ 各组的细胞活力依次为 87.9%、80.6%、65.6% 和 55.8%,表明其抑制作用具有浓度与时间依赖性。LTA(R192G)蛋白在 12 h 处理时对各浓度组细胞活力均无显著影响;处理 24 h 后,仅在 20 $\mu\text{g/mL}$ 和 40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下出现轻度抑制($P<0.05$),细胞活力下降幅度均未超过 15.0%。

2.6 佐剂蛋白对 FHs 74 Int 细胞凋亡的差异诱导作用

如图 2C、2D 所示,采用 20 $\mu\text{g/mL}$ 佐剂蛋白分别处理 FHs 74 Int 细胞 12 h 和 24 h 后,各蛋白对细胞凋亡表现出明显不同的效应。与空白对照组相比,LTB 蛋白主要诱发早期凋亡,处理 12 h 和 24 h 后早期凋亡率分别约为 8% 和 15%,而晚期凋亡率始终维持在较低水平(低于 2%)。LTA 蛋白则同时显著诱导早期和晚期凋亡,处理 12 h 后,早期凋亡率约为 15%,晚期凋亡率约为 6%,总凋亡率约为 20%;处理 24 h 后,早期凋亡率进一步上升至约 35%,晚期凋亡率也超过 10%,总凋亡率接近 50%;相比之下,LTA(R192G)蛋白对细胞凋亡的诱导作用较弱,处理 12 h 后早期凋亡率低于 3%,24 h 后仅增至约 6%,未引起显著的细胞凋亡($P>0.05$)。Western blotting 检测及灰度分析结果显示(图 2E、2F),LTB 与 LTA 蛋白均可显著上调细胞内 GSDMD 蛋白的表达水平($P<0.01$),而 LTA(R192G)的作用弱于 LTA,但仍可在一定程度上促进 GSDMD 表达($P<0.05$)。GSDMD-N 含量的变化更为明显,经 LTB 与 LTA 处理后,GSDMD-N 含量分别提高了 8.7 倍和 9.2 倍,差异极显著($P<0.01$);LTA(R192G)处理后也使 GSDMD-N 含量提高 4.5 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.7 佐剂蛋白对炎性细胞因子基因表达的差异性诱导

荧光定量 PCR 结果显示(图 3A),LTB 蛋



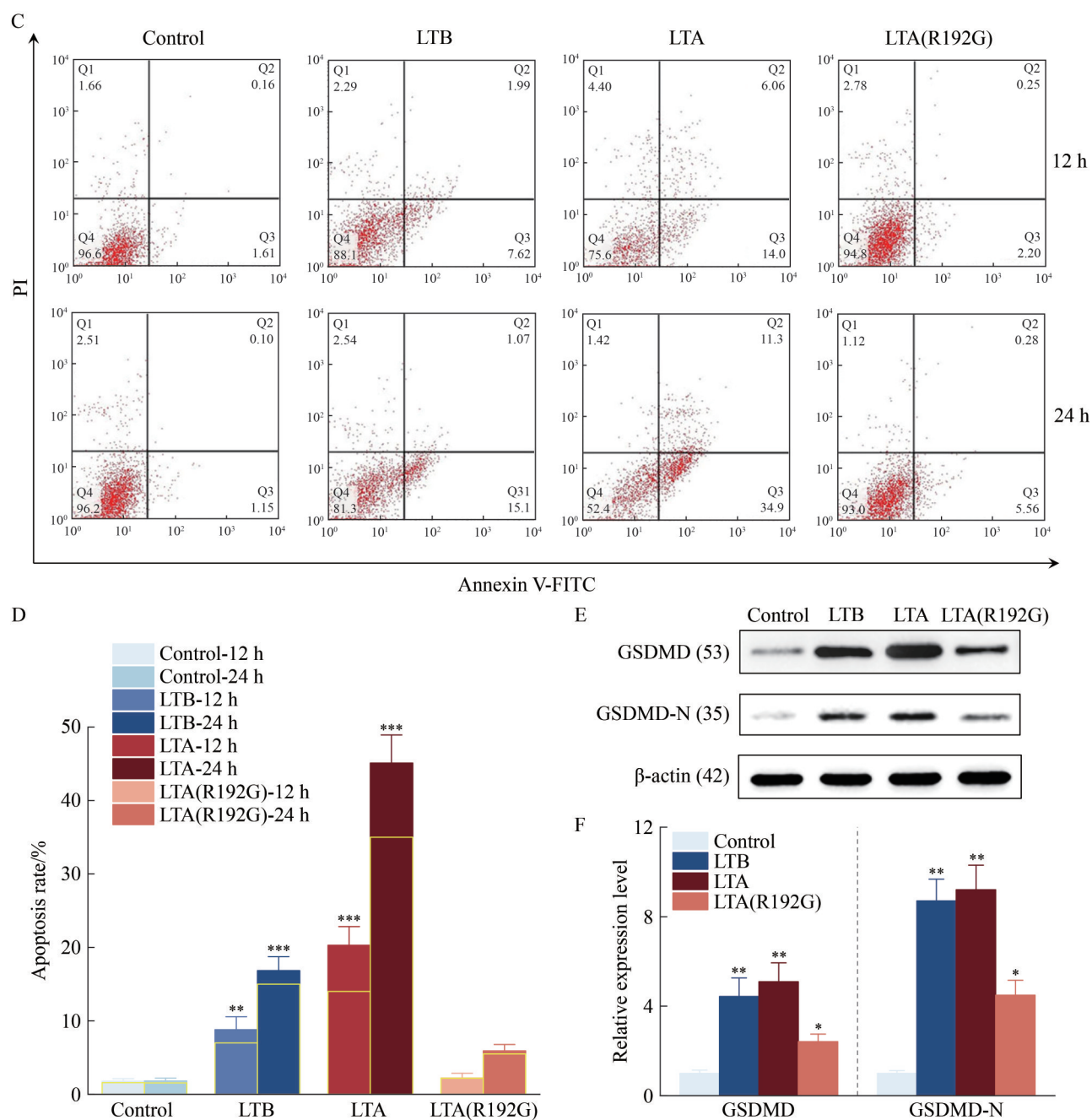


图2 LT亚基蛋白处理对细胞形态、活力及凋亡的影响

Figure 2 Effects of LT subunit protein treatment on cell morphology, viability, and apoptosis. A: Effects of LT subunit protein treatment on cell morphology (magnification: 200 $\times$); B: Effects of LT subunit protein treatment on cell viability; C: Effects of LT subunit protein treatment on cell apoptosis; D: Statistical analysis of apoptosis rate (Sum of early and late apoptosis; Yellow boxes indicate the percentage of early apoptosis); E: Western blotting analysis of GSDMD-related proteins in apoptosis; F: Statistical analysis of Western blotting band gray values. Data are presented as mean $\pm$ SD, and significance is determined relative to the control group. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

白处理后细胞内 *IL-6*、*IL-8*、*IL-1 β* 和 *TNF- α* 的基因表达水平均出现显著上调($P<0.001$), 分别为对照组的(2.70 ± 0.25)倍、(4.10 ± 0.33)倍、(5.90 ± 0.27)倍和(4.60 ± 0.29)倍。相比之下, LTA 与 LTA(R192G)蛋白仅能诱导 *IL-18* 和 *IL-1 β* 的基因表达上调。LTA 蛋白作用后细胞内 *IL-18* 与 *IL-1 β* 基因表达量分别提升至原来的(6.90 ± 0.41)倍和(8.20 ± 0.67)倍, 上调幅度均达到统计学显著水平($P<0.001$)。LTA(R192G)蛋白虽也可促进 *IL-18* 和 *IL-1 β* 的基因表达, 但其诱导能力相对较弱, 2 种细胞因子的表达量分别为对照组的(3.50 ± 0.48)倍和(4.00 ± 0.31)倍。

2.8 佐剂蛋白显著促进炎性细胞因子的释放

ELISA 检测结果(图 3B–3F)显示, 佐剂蛋白处理后在细胞培养上清中均可检测到相应的炎性细胞因子, 其蛋白水平变化与基因表达趋势一致。在 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ LTB 蛋白刺激下, *IL-6*、*IL-8* 和 *TNF- α* 的含量分别上升至(380.6 ± 41.9)、(348.8 ± 58.7)、(587.8 ± 52.7) pg/mL , 差异具有显著性($P<0.01$)。当浓度提高至 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时上述细胞因子的释放进一步增加, 分别达到(565.3 ± 70.4)、(726.8 ± 64.8)、(736.6 ± 66.5) pg/mL , 效果极为显著($P<0.001$)。LTA 与 LTA(R192G)蛋白均能诱导细胞产生 *IL-18*。 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ LTA 蛋白处理组中, *IL-18* 的分泌量分别为(908.3 ± 77.9)、($1\,243.6\pm89.4$) pg/mL , 效应极为显著($P<0.001$)。LTA(R192G)蛋白也表现出诱导能力, 2 个浓度下 *IL-18* 分泌量分别为(366.6 ± 40.5) pg/mL 和(453.9 ± 56.3) pg/mL , 均具有统计学意义($P<0.05$)。值得注意的是, 3 种佐剂蛋白均能够引起 *IL-1 β* 的分泌。在 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度下, LTB、LTA 及 LTA(R192G)诱导的 *IL-1 β* 含量分别为(801.9 ± 115.2)、(919.7 ± 138.8)、(767.7 ± 105.1) pg/mL ; 浓度增至 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 其含量进一步升高至(962.1 ± 120.6)、($1\,321.8\pm163.1$)、(940.4 ± 63.3) pg/mL , 各实验组均呈现极显著诱

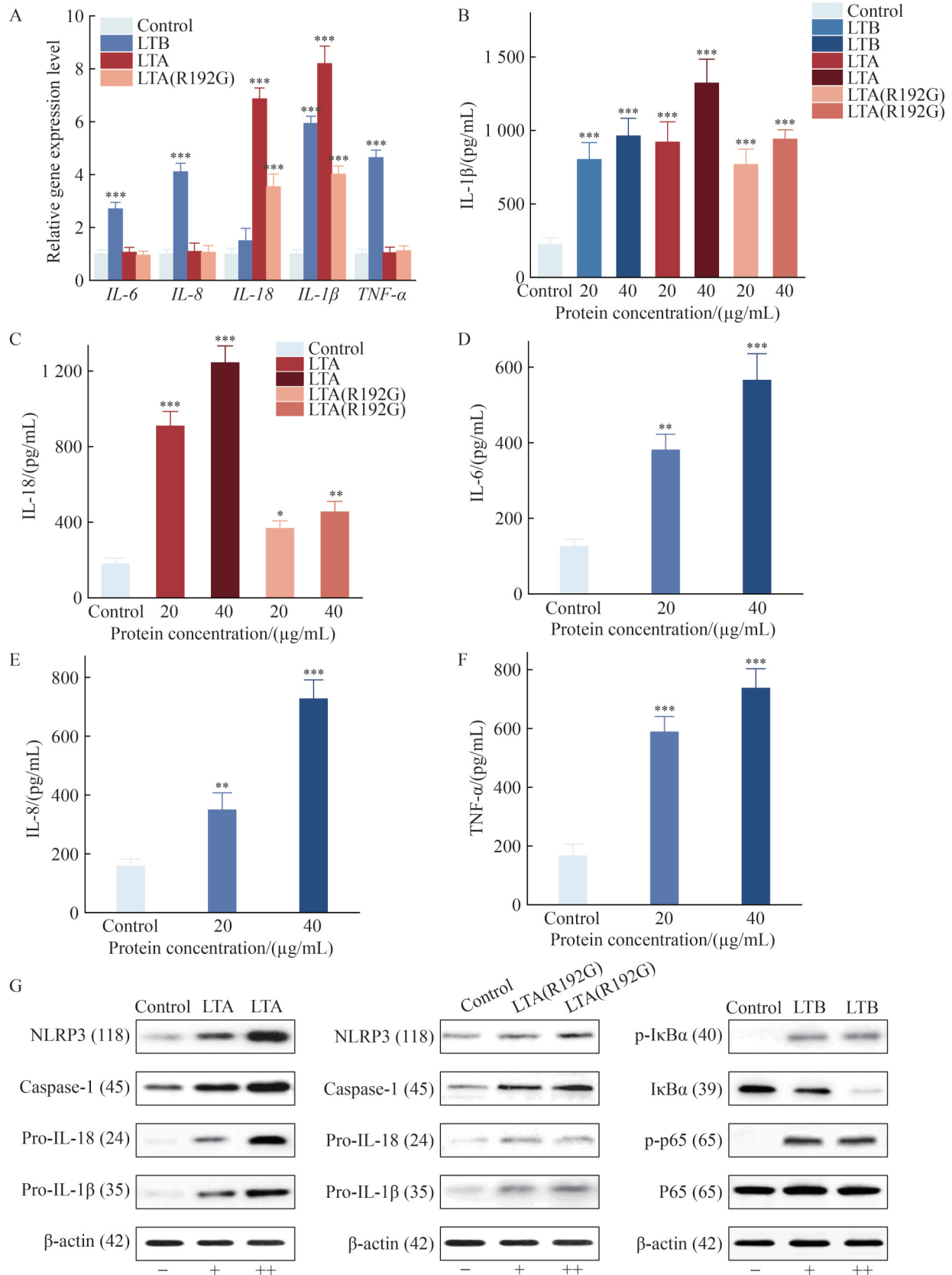
导效果($P<0.001$)。

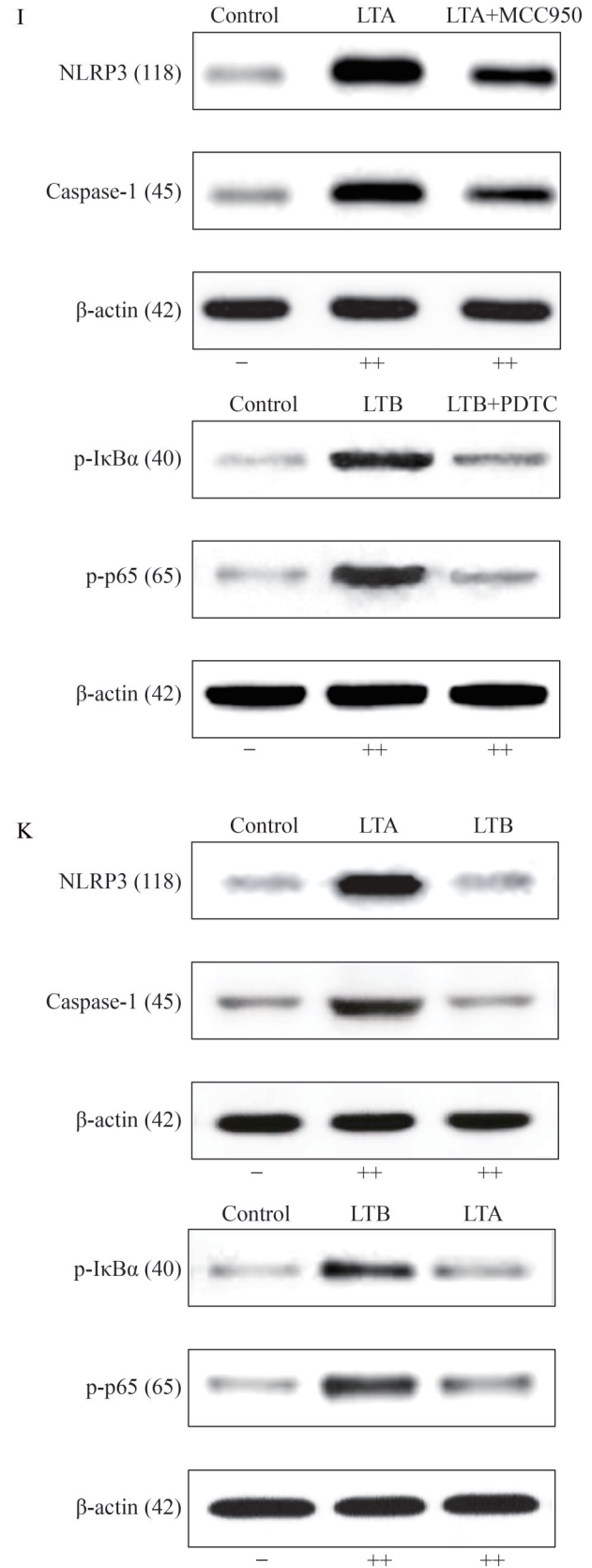
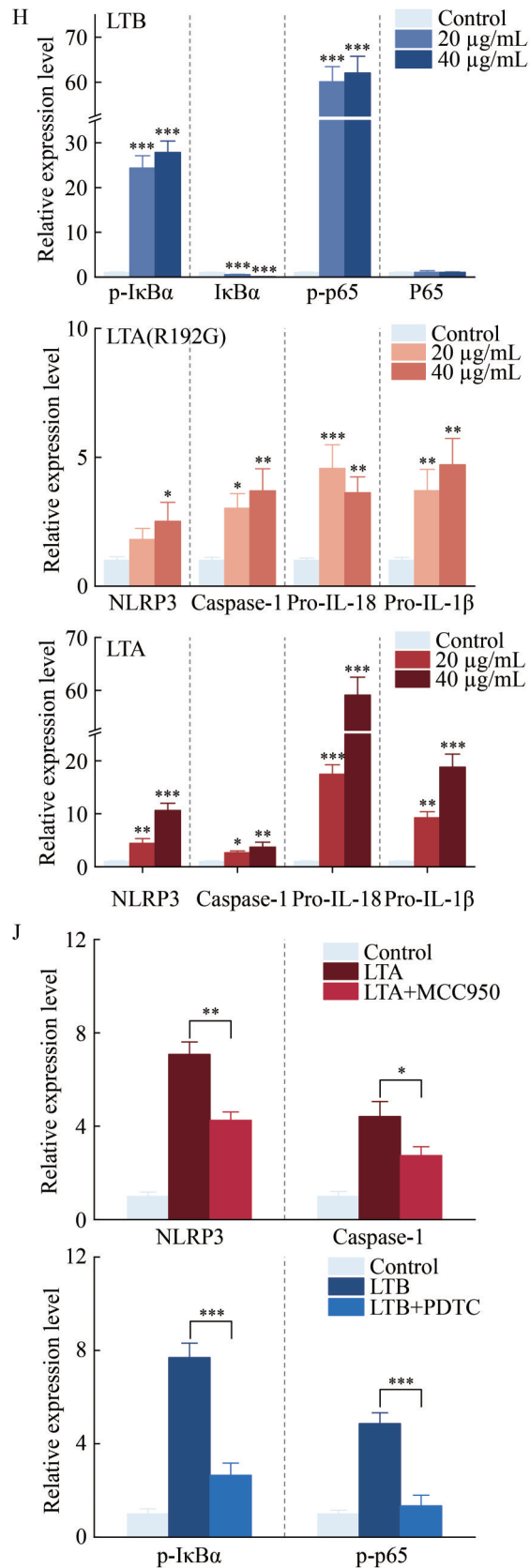
2.9 LTB 与 LTA 蛋白对 NF- κ B 及 NLRP3 炎症小体通路的差异性激活作用

Western blotting 检测及灰度分析结果显示(图 3G–3L), LTB 蛋白能够显著促进细胞内 I κ B α 蛋白的降解($P<0.001$), 同时提高 p-I κ B α 和 p-p65 蛋白的表达水平($P<0.001$); 而使用 PDTC 抑制剂可有效逆转由 LTB 诱导的 p-I κ B α 与 p-p65 表达上调($P<0.001$)。与之相比, 相同浓度的 LTA 亚基未引起 p-I κ B α 及 p-p65 水平的显著变化($P>0.05$)。上述结果表明, LTB 能够激活 NF- κ B 信号通路。另一方面, LTA 蛋白则显著上调 NLRP3 炎症小体通路关键蛋白 NLRP3 和 Caspase-1 的表达($P<0.001$), 并促进前体炎症因子 pro-*IL-18* 和 pro-*IL-1 β* 的生成($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。MCC950 抑制剂能有效阻断 LTA 所诱导的 NLRP3 与 Caspase-1 的产生($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 而相同浓度的 LTB 亚基则未引起上述蛋白含量的显著变化($P>0.05$), 说明 LTA 主要激活 NLRP3 炎症小体通路。此外, LTA(R192G)蛋白虽作用弱于 LTA, 但也显著提升 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并诱导 pro-*IL-18* 和 pro-*IL-1 β* 的产生($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 表明该突变体同样具备激活 NLRP3 炎症小体通路的能力。

2.10 佐剂蛋白诱导空肠组织细胞凋亡及炎性细胞因子分泌

HE 染色组织切片结果显示(图 4B), 与空白对照组相比, 佐剂蛋白处理后空肠组织中小肠绒毛形态未见明显改变。TUNEL 染色结果显示(图 4C), 3 种佐剂蛋白处理后小肠绒毛中均出现绿色亮斑, 表明细胞核 DNA 断裂及细胞凋亡; 其中, LTA 与 LTB 蛋白诱导的阳性细胞数量显著多于 LTA(R192G)蛋白。ELISA 检测结果显示(图 4D–4H), 佐剂蛋白处理后的空肠组织培养上清中均检测到相应炎性细胞因子。在 $25\text{ }\mu\text{g}$ LTB 蛋白作用后, *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8* 和 *TNF- α* 的含





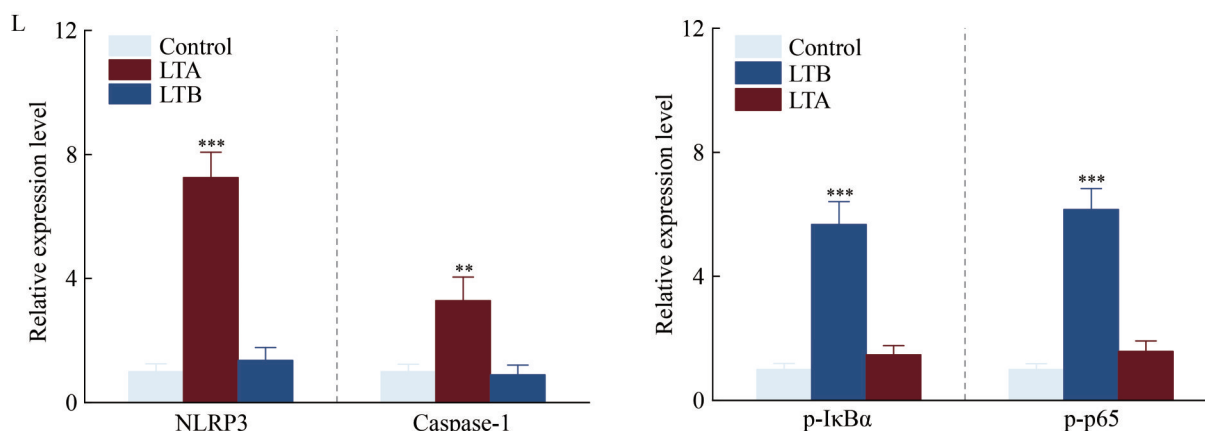


图3 LT亚基蛋白处理对细胞内炎症因子表达及相关信号通路的影响

Figure 3 Effects of LT subunit proteins on the expression of intracellular inflammatory cytokines and related signaling pathways. A: mRNA expression levels of inflammatory cytokine genes after treatment with LT subunit proteins; B: Changes in intracellular IL-1 β content after treatment with LT subunit proteins; C: Changes in intracellular IL-18 content after treatment with LTA and LTA(R192G) proteins; D–F: Changes in intracellular IL-6, IL-8, and TNF- α content after treatment with LTB protein; G: Western blotting detection of key proteins in the signaling pathway after treatment with the subunit protein; H: Statistical analysis of band gray values for Figure G; I: Western blotting detection of key proteins in the signaling pathway after inhibitor treatment; J: Statistical analysis of band gray values for Figure I; K: Western blotting detection of key proteins in the signaling pathway after swapping the proteins; L: Statistical analysis of band gray values for Figure K. Data are presented as mean $\pm$ SD. In significance analysis, Figure J represents comparisons among experimental groups, while all other comparisons are relative to the blank control group. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; -: No target protein; +: Low amount; ++: High amount.

量分别上升至(994.9 $\pm$ 185.2)、(1 406.8 $\pm$ 134.2)、(1 180.1 $\pm$ 105.8)、(746.9 $\pm$ 145.2) pg/mL, 差异极显著($P<0.001$)。LTA 与 LTA(R192G)蛋白均能诱导细胞产生 IL-18 和 IL-1 β ; 25 μ g 蛋白处理后, IL-1 β 的分泌量分别为(1 347.1 $\pm$ 228.8) pg/mL 和 (832.2 $\pm$ 160.6) pg/mL, 差异显著($P<0.001$); IL-18 的分泌量分别为(1 047.1 $\pm$ 188.8) pg/mL 和 (517.6 $\pm$ 123.5) pg/mL, 差异均具有统计学意义($P<0.001$ 或 $P<0.05$)。

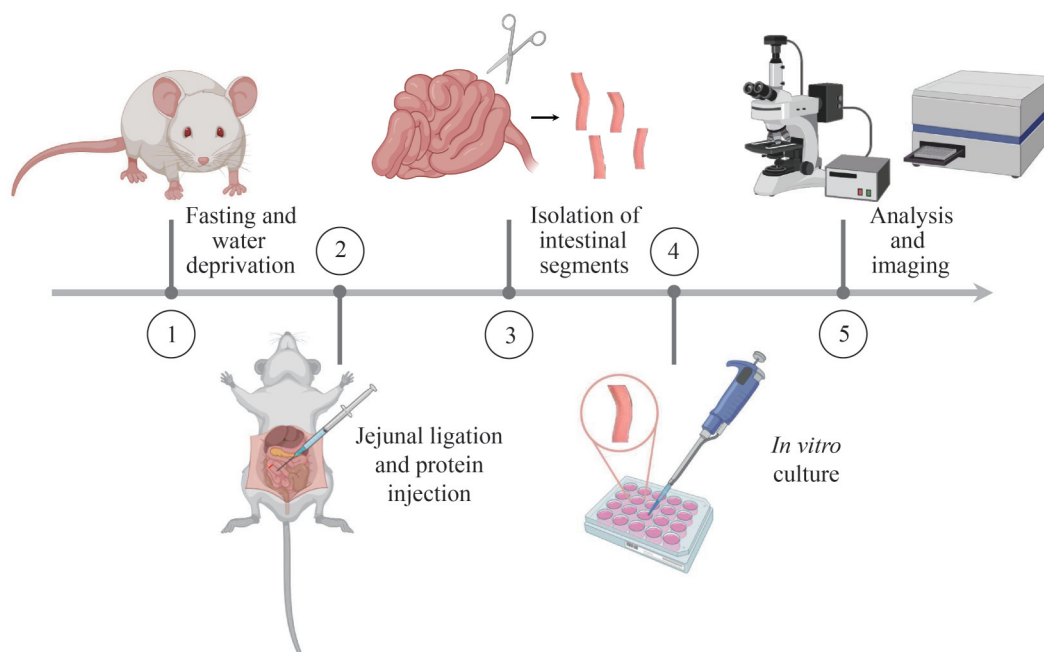
3 讨论与结论

当前广泛应用于人或动物的大部分佐剂通常是经验性的, 其细胞与分子水平的作用机制尚未得到系统阐明, LT 类佐剂也存在同样的问

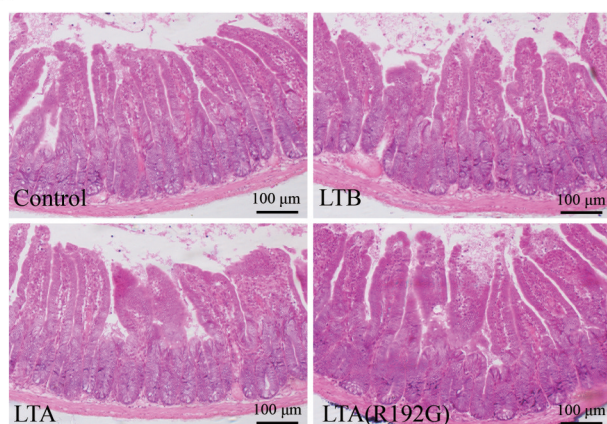
题^[21]。由于不同研究采用的抗原类型及黏膜给药途径存在差异, 导致诸多研究结果难以统一, 不仅阻碍了对佐剂作用机制的全面解析, 也为其临床转化带来潜在风险^[22]。典型案例为 Berna 公司开发的 LT 佐剂鼻喷流感疫苗 Nasalflu, 虽曾在瑞士获批上市, 却在应用过程中引发贝尔麻痹(Bell's palsy)等不良反应, 该事件严重制约了 LT 佐剂的进一步应用^[23]。因此, 深入揭示其分子机制对于明确其适用条件、降低不良反应、支撑基础研究与应用具有重要意义。

上皮细胞作为微生物与宿主互作的第一道防线, 不仅是关键的物理屏障, 还积极参与免疫识别与应答的启动。它们通过细胞因子释放介导黏膜免疫调节, 并与固有免疫细胞进行信

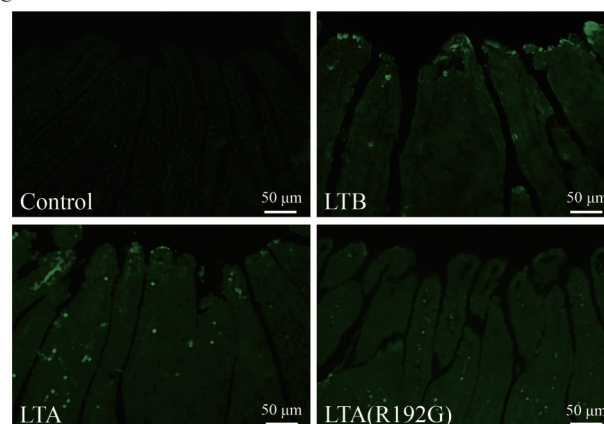
A



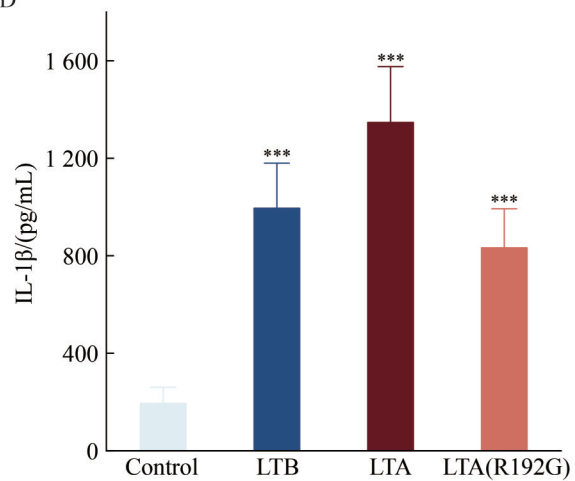
B



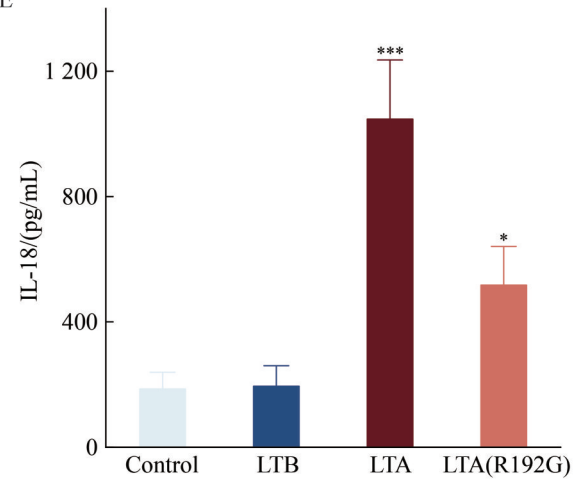
C



D



E



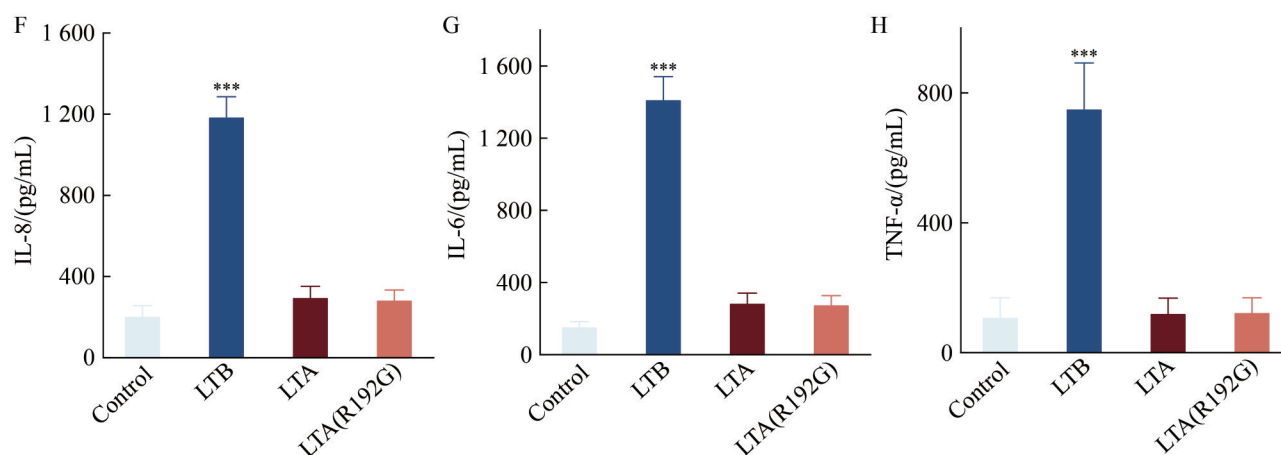


图4 LT亚基蛋白处理对小鼠空肠组织形态及炎症因子分泌的影响

Figure 4 Effects of LT subunit protein treatment on jejunal tissue morphology and inflammatory cytokine secretion in mice. A: Schematic diagram of the experimental protocol for the mouse *ex vivo* intestinal loop ligation model and LT subunit protein treatment; B: HE staining of jejunal tissue sections (magnification: 200×); C: TUNEL staining of jejunal tissue sections (magnification: 200×); D–H: Changes in IL-1β, IL-18, IL-8, IL-6, and TNF-α levels in jejunal tissue following LT subunit protein treatment. Data are presented as mean±SD, and significance is determined relative to the control group. *: $P<0.05$, ***: $P<0.001$.

号沟通, 协调后续免疫分子与细胞的募集与活化^[24]。研究表明, 上皮细胞可响应微生物信号, 分泌包括 IL-6、IL-8、IL-18、IL-1β 以及 TNF-α 和 TNF-β 在内的多种炎性细胞因子, 进而激活免疫细胞, 参与抗感染免疫过程^[25-26]。此外, 上皮细胞具备多途径抗原呈递能力: 通过分泌巨噬细胞炎性蛋白 3α 招募树突细胞至炎症部位, 使其穿越上皮摄取抗原^[26]; 借助 MHC-I 与 MHC-II 分子加工可溶性抗原, 并通过外泌体以接触依赖方式呈递抗原^[27]; 由特化的 M 细胞通过胞吞作用摄取抗原并转运至邻近树突状细胞或 B 细胞, 从而高效启动免疫应答^[28]。

本研究从细胞与离体组织水平出发, 探讨了 LT 亚基佐剂蛋白对正常肠上皮细胞的作用, 重点分析了 LT 亚基蛋白与上皮细胞相互作用后引发的细胞变化及初始佐剂活性的触发机制, 并进一步在分子层面揭示了 LT 蛋白佐剂活性的作用机理。已有文献表明, 完整 LT 毒素或其突变体的佐剂效果通常强于单独的 LTA 或 LTB 亚基, 且在抗体产生与细胞因子分泌方面略高于

2 种亚基联合使用的效果^[29], 表明亚基联合应用确实存在协同佐剂效应。值得注意的是, 完整 LT 在极低浓度下即可对多种细胞系产生显著的细胞毒性, 导致细胞活力大幅下降; 而 LTA 与 LTB 亚基组合在相同浓度下几乎不表现直接细胞毒性, 因此更易通过疫苗佐剂的安全性评估。此外, 相较于完整毒素, LTA 和 LTB 亚基更易于重组表达与纯化, 在实际生产中具备明显优势。鉴于 LTA 与 LTB 2 种亚基功能不同, 可能具有差异化的佐剂作用机制, 且突变型 LTA 亚基同样具备佐剂活性^[29], 因此有必要分别研究每种亚基的独立作用。此前关于 LTA 亚基 A2 结构域介导穿膜机制的发现也为 LTA 与 LTB 可能拥有独立的佐剂作用途径提供了理论依据^[30]。

本研究通过基因工程手段成功制备了高纯度的 LTB、LTA 及其酶活缺失突变体 LTA (R192G), 其中 LTB 以五聚体形式存在。体外实验证实了 LTB 的 GM1 结合能力及 LTA 对 cAMP 水平的调控作用, 表明工程化的 LTB、LTA 具备相应的生物活性。荧光素标记实验

证了 3 种蛋白均能够进入细胞, 其中 LTB 亚基以五聚体形式与细胞表面的 GM1 神经节苷脂结合形成膜小泡, 通过细胞膜翻转进入细胞; 而 LTA 与 LTA(R192G)蛋白的摄入则通过 A2 结构域介导的穿膜途径进入细胞内^[31]。蛋白长时间作用于细胞后, LTA 与 LTB 蛋白会对细胞形态产生肉眼可见的影响, 细胞活力检测与凋亡结果佐证了这一现象。高浓度 LTB 蛋白长时间作用会对细胞活力产生一定的抑制作用, 同时引发细胞早期凋亡。LTA 蛋白对细胞活力有明显的抑制作用, 同时引发细胞显著的早期及晚期凋亡。对 LTA(R192G)蛋白而言, 192 位的氨基酸由 Arg 替换为 Gly 后, LTA 亚基无法被蛋白酶识别并切割为 A1 和 A2 2 个片段; 构象的改变导致 A1 结构域无法有效发挥其催化功能, 从而使其毒性显著降低^[32]。因此其对细胞活力影响较弱, 未能诱导显著的细胞凋亡, 细胞形态学观察结果与上述结论一致。荧光定量 PCR 和细胞因子 ELISA 测定结果相互佐证: LTB 蛋白主要诱导上皮细胞 *IL-6*、*IL-8*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 炎症因子基因表达, 并产生相应的炎症因子; LTA 与 LTA(R192G)蛋白主要诱导肠上皮细胞 *IL-18*、*IL-1 β* 炎症因子的基因表达, 并产生相应的炎症因子。离体空肠组织模型中的炎症因子分泌趋势与细胞水平结果一致。然而, 在组织水平未观察到明显的细胞形态变化, 这可能是因为相较于细胞水平中因接触抑制而呈松散排列的细胞, 组织中的细胞排列紧密, 有限的空间限制了其形态改变。TUNEL 染色结果进一步证实, 佐剂蛋白已诱导细胞发生凋亡。虽然突变体 LTA(R192G)的毒性显著降低, 但其佐剂活性仍得到较好保留。体外实验与动物模型研究均表明, 该突变体能够有效诱导 Th1 和 Th2 型细胞因子的产生, 并促进特异性抗体应答^[33], 这也是其仍能激活炎症信号通路的原因。炎症因子是信号通路终端的表达产物, 对应着不同的信号通路^[34]。Western blotting 分析显示, LTB 蛋白促进 I κ B α 蛋白的降解, 以及 p-I κ B α 和 p-p65

蛋白表达增加, 而 NF- κ B 通路抑制剂 PDTC 能有效阻断这些变化, 表明 NF- κ B 信号通路被激活^[35]。此外, LTA 和 LTA(R192G)蛋白通过上调 NLRP3、Caspase-1 蛋白的表达, 诱导炎症因子前体 pro-IL-18、pro-IL-1 β 的产生, 进而激活 NLRP3 炎症小体信号通路^[36], 而 NLRP3 抑制剂 MCC950 可有效阻断该激活作用。已有文献表明, LTA 亚基的佐剂活性并不依赖于其 ADP-核糖基转移酶活性^[37]。单氨基酸突变对 LTA 蛋白的整体构象影响微弱, 因此 LTA (R192G)仍保留了通过 A2 结构域介导的膜插入或膜成孔能力。这一能力可诱导细胞内钾离子外流或溶酶体损伤, 而这 2 个信号均为 NLRP3 炎症小体激活的经典上游事件。因此, LTA (R192G)突变体仍能在特定细胞类型中触发 NLRP3 活化。此外, 野生型 LTA 的佐剂效果通常强于 LTA(R192G)突变体, 这是因为野生型 LTA 除通过膜成孔作用激活 NLRP3 外, 其完整的 ADP-核糖基转移酶活性还能引起更严重的细胞损伤并释放更多损伤相关分子, 从而进一步增强免疫应答的强度与广度。

基于炎症因子 ELISA 与信号通路 Western blotting 实验数据, 本研究绘制了 LTA 和 LTB 亚基调控上皮细胞免疫应答的机制示意图(图 5)。结合细胞凋亡、炎症因子 ELISA 及信号通路 Western blotting 结果, LT 亚基佐剂蛋白所引发的细胞死亡并非单纯的细胞凋亡, 而是伴随大量炎症因子释放的细胞焦亡。随着这些细胞逐步发生焦亡, 其释放的 IL-6、IL-8、IL-18、IL-1 β 及 TNF- α 等多种炎性细胞因子可激活免疫细胞, 该过程与 LT 亚基的佐剂效应密切相关。其中, 经 LTB 亚基诱导产生的 IL-6 能够促进 B 细胞分化为浆细胞, 并促进 T 细胞增殖和分化; 而 LTA 亚基诱导产生的 IL-18 则主要诱导 Th1 细胞和自然杀伤细胞产生干扰素- γ , 增强细胞免疫应答, 这反映了 LT 增强体液与细胞免疫应答的佐剂能力。此外, LTB 亚基诱导产生的 TNF- α

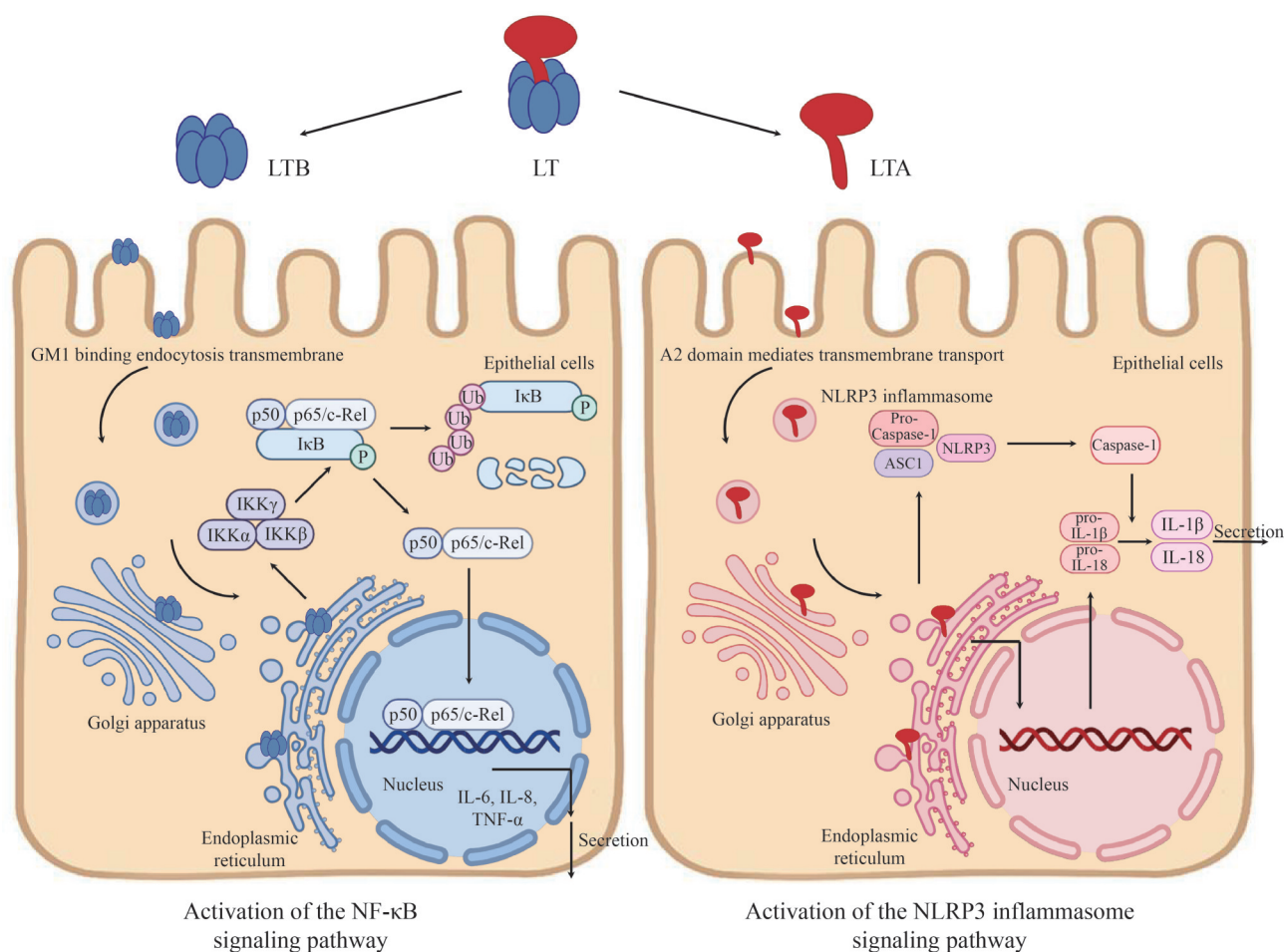


图5 LTA与LTB亚基调节上皮细胞免疫作用的机制示意图

Figure 5 Schematic diagram of the mechanism by which LTA and LTB subunits regulate epithelial cell immunity. In the epithelial immune response, the LTB subunit functions by modulating the NF- κ B signaling pathway, while the LTA subunit acts through the regulation of the NLRP3 inflammasome pathway.

可激活炎症细胞并诱导下游细胞因子的级联释放, IL-8 趋化中性粒细胞迁移、介导炎性细胞浸润; LTA 亚基诱导产生的 IL-1 β 则介导炎症反应, 促进炎性介质释放、协同刺激 T 细胞活化, 并诱导其他细胞因子的产生。上述结果反映了 LT 在局部炎症环境中发挥关键作用, 具备启动免疫微环境重塑的重要佐剂能力。通过 LT 亚基引发的局部炎症反应可有效招募 M 细胞、树突状细胞及 B 细胞等免疫细胞到达病灶区域, 这些细胞能够处理并呈递与 LT 亚基共同给药的抗原物质, 由此启动并增强初始免疫应答。

综上所述, LT 及其亚基蛋白通过诱导上皮细胞的局部炎症反应分别激活 NLRP3 炎症信号通路与 NF- κ B 炎症信号通路, 诱导上皮细胞分泌炎症因子并引发细胞焦亡, 从而发挥初始的佐剂活性。本研究为阐明 LT 及其衍生物的佐剂机制提供了理论依据, 对推动其在呼吸道、消化道感染性疾病及大流行传染病黏膜疫苗的研发具有重要参考价值。

作者贡献声明

刘地: 研究构思、设计、论文撰写和修改; 王前

程: 数据收集和处理; 乔宏萍: 论文撰写和修改; 武晓英: 实验设施与经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Lu X, Zhang MX, Ma YZ, Li GH, Zhao X, Qian WS. Protective effect of *Limosilactobacillus reuteri*-fermented yogurt on mouse intestinal barrier injury induced by enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(15): 7494-7505.
- [2] Liu D, Zhan YF, Wu XY, Qiao HP, Zhang YL, Li B. Design, preparation and characterization of octopus-like self-releasing intracellular protein transporter LEB5 based on *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 237: 124172.
- [3] Crothers JW, Norton EB. Recent advances in enterotoxin vaccine adjuvants[J]. Current Opinion in Immunology, 2023, 85: 102398.
- [4] Ou BM, Yang Y, Lv HH, Lin X, Zhang MY. Current progress and challenges in the study of adjuvants for oral vaccines[J]. BioDrugs, 2023, 37(2): 143-180.
- [5] Verma SK, Mahajan P, Singh NK, Gupta A, Aggarwal R, Rappuoli R, Johri AK. New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1043109.
- [6] Knapp MA, Johnson TA, Ritter MK, Rainer RO, Fiester SE, Grier JT, Connell TD, Arce S. Immunomodulatory regulation by heat-labile enterotoxins and potential therapeutic applications[J]. Expert Review of Vaccines, 2021, 20(8): 975-987.
- [7] Mudrak B, Kuehn MJ. Heat-labile enterotoxin: beyond GM1 binding[J]. Toxins, 2010, 2(6): 1445-1470.
- [8] Valli E, Baudier RL, Harriett AJ, Norton EB. LTA1 and dmLT enterotoxin-based proteins activate antigen-presenting cells independent of PKA and despite distinct cell entry mechanisms[J]. PLoS One, 2020, 15(1): e0227047.
- [9] Zhao TM, Cai YL, Jiang YJ, He XM, Wei YQ, Yu YF, Tian XH. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8: 283.
- [10] Cartwright IM, Colgan SP. The hypoxic tissue microenvironment as a driver of mucosal inflammatory resolution[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1124774.
- [11] Constant DA, Nice TJ, Rauch I. Innate immune sensing by epithelial barriers[J]. Current Opinion in Immunology, 2021, 73: 1-8.
- [12] Salvador-Erro J, Pastor Y, Gamazo C. Targeting enterotoxins: advancing vaccine development for enterotoxigenic *Escherichia coli* ETEC[J]. Toxins, 2025, 17(2): 71.
- [13] Huo MM, Guo WY, Ding LQ. Benidipine hydrochloride inhibits NLRP3 inflammasome activation by inhibiting LPS-induced NF- κ B signaling in THP-1 macrophages[J]. Journal of Inflammation Research, 2024, 17: 6307-6316.
- [14] Fu JN, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Annual Review of Immunology, 2023, 41: 301-316.
- [15] Chaturmohta A, Dixit R, Narayan G, Gupta P, Prasad SB, Ss Y, Shukla VK. Do expression profiles of cytokines VEGF, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 correlate with gallbladder cancer? [J]. Journal of Cancer Science and Clinical Oncology, 2015, 2(2): 202.
- [16] Huang YH, Chou MH, Du YY, Huang CC, Wu CL, Chen CL, Chuang JH. Expression of toll-like receptors and type 1 interferon specific protein MxA in biliary atresia[J]. Laboratory Investigation, 2007, 87(1): 66-74.
- [17] Medina L, Rabinovich A, Piura B, Dyomin V, Shaco Levy R, Huleihel M. Expression of IL-18, IL-18 binding protein, and IL-18 receptor by normal and cancerous human ovarian tissues: possible implication of IL-18 in the pathogenesis of ovarian carcinoma[J]. Mediators of Inflammation, 2014, 2014: 914954.
- [18] Rajput S, Volk-Draper LD, Ran S. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2013, 12(8): 1676-1687.
- [19] Yang XF, He X, He J, Zhang LH, Su XJ, Dong ZY, Xu YJ, Li Y, Li YL. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. Journal of Biomedical Science, 2011, 18: 59.
- [20] Read LT, Hahn RW, Thompson CC, Bauer DL, Norton EB, Clements JD. Simultaneous exposure to *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins increases fluid secretion and alters cyclic nucleotide and cytokine production by intestinal epithelial cells[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(12): 5308-5316.
- [21] Cui Y, Ho M, Hu YJ, Shi Y. Vaccine adjuvants: current status, research and development, licensing, and future opportunities[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2024, 12(17): 4118-4137.
- [22] Ma YP. Recent advances in nontoxic *Escherichia coli* heat-labile toxin and its derivative adjuvants[J]. Expert Review of Vaccines, 2016, 15(11): 1361-1371.
- [23] Valli E, Harriett AJ, Nowakowska MK, Baudier RL, Provosty WB, McSween Z, Lawson LB, Nakanishi Y, Norton EB. LTA1 is a safe, intranasal enterotoxin-based adjuvant that improves vaccine protection against influenza in young, old and B-cell-depleted (μ MT) mice[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 15128.
- [24] Didriksen BJ, Eshleman EM, Alenghat T. Epithelial regulation of microbiota-immune cell dynamics[J]. Mucosal Immunology, 2024, 17(2): 303-313.
- [25] Emanuel E, Arifuzzaman M, Artis D. Epithelial-neuronal-

- immune cell interactions: Implications for immunity, inflammation, and tissue homeostasis at mucosal sites[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2024, 153(5): 1169-1180.
- [26] Mahapatro M, Erkert L, Becker C. Cytokine-mediated crosstalk between immune cells and epithelial cells in the gut[J]. *Cells*, 2021, 10(1): 111.
- [27] Hargrave KE, MacLeod MKL, Worrell JC. Antigen presenting cells: professionals, amateurs, and spectators in the 'long game' of lung immunity[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2022, 153: 106331.
- [28] Ma BJ, Tao MX, Li ZL, Zheng QF, Wu HG, Chen PR. Mucosal vaccines for viral diseases: Status and prospects[J]. *Virology*, 2024, 593: 110026.
- [29] Norton EB, Lawson LB, Mahdi Z, Freytag LC, Clements JD. The A subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin functions as a mucosal adjuvant and promotes IgG2a, IgA, and Th17 responses to vaccine antigens[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(7): 2426-2435.
- [30] Liu D, Zhan YF, Qu JQ, Qiao HP, Li N, Zhang YL, Wu XY. Engineered Prx-LCA2 fusion protein restores oxidative skin damage via enhanced intracellular peroxidase delivery[J]. *AMB Express*, 2025, 15: 94.
- [31] Liu D, Guo H, Zheng WY, Zhang N, Wang TW, Wang P, Ma XY. Discovery of the cell-penetrating function of A2 domain derived from LTA subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(11): 5079-5088.
- [32] Grant CC, Messer RJ, Cieplak W Jr. Role of trypsin-like cleavage at arginine 192 in the enzymatic and cytotoxic activities of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. *Infection and Immunity*, 1994, 62(10): 4270-4278.
- [33] Clements JD, Norton EB. The mucosal vaccine adjuvant LT(R192G/L211A) or dmLT[J]. *mSphere*, 2018, 3(4): e00215-18.
- [34] Zhao HK, Wu L, Yan GF, Chen Y, Zhou MY, Wu YZ, Li YS. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 263.
- [35] Mukherjee T, Kumar N, Chawla M, Philpott DJ, Basak S. The NF- κ B signaling system in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Science Signaling*, 2024, 17(818): eadh1641.
- [36] Xu J, Núñez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2023, 48(4): 331-344.
- [37] De HA, Holtrop, Verweij, Agsteribbe, Wilschut. Mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the recombinant A subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. *Immunology*, 1999, 97(4): 706-713.