

减毒沙门氏菌在疫苗和疫苗载体方面的研究进展

李正,程相朝

(河南科技大学动物科技学院,河南洛阳 471003)

摘要:沙门氏菌不仅可以用作疫苗,也是理想的疫苗载体,已受到医学与兽医学的广泛重视。沙门氏菌可以经黏膜途径免疫(口服或鼻内),操作方便,对接种对象刺激小;此外,沙门氏菌为胞内侵袭细菌,能有效递呈抗原,激发抗沙门氏菌和诱导外源蛋白的特异性体液免疫反应与细胞免疫反应,并能同时诱导黏膜免疫与全身免疫。文章对沙门氏菌的入侵机制、免疫机理及其在疫苗中的应用状况进行了综述,为新型疫苗的研究提供参考。

关键词:沙门氏菌;疫苗;载体

中图分类号:S852.61

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0040-05

沙门氏菌是重要的人兽共患病病原,在医学、兽医学和公共卫生学上均具有十分重要的意义(蔡宝祥等,2001)。减毒沙门氏菌是通过物理、化学或基因工程等方法,使沙门氏菌某些特定的基因发生不可逆的突变而降低其毒力(Shata等,2000)。现代医学中,疫苗接种是预防传染病最有效的方法,减毒沙门氏菌不但能作为疫苗,而且已被证实是理想的

疫苗载体,减毒沙门氏菌作为载体可激发强烈的体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫,在研制基因工程疫苗方面显现了独特的优越性。近年来,应用各种基因工程方法构建沙门氏菌减毒株、研究毒力基因的功能和表达调控以及利用减毒沙门氏菌作为活载体表达外源抗原,研制多价疫苗等已成为该领域的研究热点。

1 减毒沙门氏菌基因缺失疫苗

沙门氏菌的基因缺失大体上可分为两种,代谢性途径和营养缺陷性途径(訾占超等,2009),在疫苗研究中,最广泛用来减毒的沙门氏菌毒力基因有10种之多(表1)。通过各种方法减毒后的沙门氏菌对人和动物的致病力显著降低,但仍然保持良好的侵袭力和免疫原性。

修回日期:2011-08-01

作者简介:李正(1987—),男,河南人,硕士生,研究方向:动物疫病发生的分子与免疫学机制。

通信作者:程相朝(1966—),男,教授,硕士生导师,主要从事动物疫病发生的分子与免疫学机制研究。E-mail: chenxch@126.com

基金项目:河南省自然科学基金项目(0711032300)。

Construction of Eukaryotic Expression Vector of Laoshan Dairy Goat Myostatin and its Expression in the Fibroblast Cells

TANG Da-yun^{1,2,3}, CHEN Xiao-liang^{1,2}, WU Jian-min³, ZHU Hua-bin¹, DU Wei-hua¹,
WANG Dong¹, ZHAO Xue-ming¹, CHEN Han-zhong², LIN Xiu-kun¹

(1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: This study aimed to clone cDNA of Myostatin of Laoshan dairy goat, and to construct Myostatin eukaryotic expression vector, analyzing its expression in the fibroblast cells. RNA was extracted from skeletal muscle and then reverse transcribed into cDNA. Myostatin was amplified by nested PCR. Myostatin was cloned into pcDNA3.1 to synthesize an eukaryotic expression vector, pcDNA-MSTN and its expression was detected by RT-PCR after transfected into the fibroblast cells. The results showed that the sequence of the full length cDNA of *Myostatin* gene of Laoshan dairy goat was similar with other species of goats and GenBank accession number was GU377303.1. The expression of Myostatin was significantly increased as detected by RT-PCR in fibroblast cells transfected with the expression vector. The study provided a basis for further study of the biological function of Myostatin and transgenic goat.

Key words: Laoshan dairy goat; Myostatin; eukaryotic expression vector; fibroblast; nested PCR

1.1 减毒沙门氏菌的侵入机制 减毒沙门氏菌可通过两种方式侵入机体:①通过以扁平细胞(M细胞)为代表的上皮细胞侵入;②通过非上皮细胞侵入。具有侵袭力的沙门氏菌能够选择性地侵入动物肠道黏膜表面派伊尔氏结(PP)的 M 细胞并破坏 M 细胞进入皮下组织,也可通过包围 M 细胞的具有吸收能力的上皮细胞进入皮下组织,然后可被位于上皮皮下穹隆区(SED)的抗原递呈细胞(APCs)所捕获,进而通过 MHC I 类和 MHC II 类两种途径进行抗原递呈激发机体产生细胞免疫和体液免疫应答(Vazquez 等,2000)。缺乏侵袭力的沙门氏菌可通过吞噬细胞直接吞噬而侵入机体,再被运送至淋巴器官(Vazquez 等,1999)。

表 1 沙门氏菌毒力基因及功能

基因	功能
<i>galE</i>	脂多糖的生物合成
<i>aro</i>	氨基酸的生物合成
<i>pur</i>	嘌呤的生物合成
<i>cya</i> 和 <i>crp</i>	环腺苷酸调节途径
<i>phoP</i> 和 <i>phoQ</i>	酸性磷酸酶的合成
<i>htrA</i>	热休克蛋白
<i>ompR</i>	外膜蛋白 R
<i>poxA</i>	丙酮酸氧化酶
<i>surA</i>	肽酰脯氨酸顺反异构酶
<i>waaP</i>	庚糖磷酸化

1.2 可作为疫苗的沙门氏菌减毒株 随着对沙门氏菌毒力基因以及重组 DNA 技术的研究不断深入,现在已经研制出许多遗传稳定的减毒株作为口服活疫苗的候选菌株。

1.2.1 *cya/crp* 基因缺失株 *cya* 和 *crp* 作为沙门氏菌的毒力调节基因已经被研究得非常深入。*cya* 基因编码环化腺苷酸合成酶,*crp* 基因编码环化腺苷酸受体蛋白。该两种基因调节多种功能,包括碳水化合物及氨基酸的利用,细菌代谢过程中某些基因的转录,营养物质的运送和分解,一些氨基酸渗透酶的合成,鞭毛、菌毛的合成,外膜蛋白的合成以及多种基因表达等。Roy Curtiss III 用 Tn10 转座得到含有或不含有毒力质粒 pStSR100 的具有镰孢菌抗性的鼠伤寒沙门氏菌 SR-11 株的 *crp* 与 *cya* 突变株(Curtiss 等,1987),这些突变株对小鼠无毒性,但有良好的免疫原性。之后的几年里 Roy Curtiss III 和 Hassan 对 Roy Curtiss III 构建的突变株进行系统研究,他们发现鼠伤寒沙门氏菌 *cya/crp* 的缺失突变体对 1 日龄鸡的半数致死量大于 3×10^9 CFU,可保护 1 日龄、2 周龄以及成年鸡抵抗野生型鼠伤寒沙

门氏菌攻击感染(Hassan 等,1990)。覃宗华等(2003)从国外引进了鼠伤寒沙门氏菌 X4550*cya/crp* 双突变减毒株,并研究了该菌株对鸡的致病力及其在鸡体所诱导的特异性免疫保护效果,结果表明鼠伤寒沙门氏菌的 *cya/crp* 突变株不仅毒力大大降低,而且保留了良好的免疫原性。郁川等(2010)构建了猪霍乱沙门氏菌 C78-1 株的 *crp* 基因缺失株,并对其生物学特性进行了初步研究,研究结果表明,缺失株的血清型与亲本菌株 C78-1 一致,且能够稳定遗传缺失的 *crp* 基因,但其生化特性和生长速度与 C78-1 相比发生明显改变,小鼠致死性试验结果表明其毒力较 C78-1 降低约 750 倍。

1.2.2 *asd* 基因缺失株 *asd* 基因编码天冬氨酸 β 半乳糖脱氢酶,该酶是细菌合成二氨基庚二酸(DAP)的生物途径里的必需酶。DAP 为革兰氏阴性菌细胞壁主要化学成分肽聚糖中四肽侧链的一个组分,DAP 的缺乏直接影响到细菌细胞壁的合成,并最终导致细菌死亡。Nakayama 等(1988)在沙门氏菌 *cya/crp* 基因缺失的基础上进一步缺失了 *asd* 基因构建出平衡致死系统,一方面使得沙门氏菌毒力进一步降低,另一方面大大提高了沙门氏菌携带质粒的稳定性。徐引弟等(2008)构建了猪霍乱沙门氏菌 C500 株 $\Delta crp \Delta asd$ 双缺失株平衡致死载体系统并成功表达了外源基因。陈晓娟构建了减毒鸡伤寒沙门氏菌 97A Δasd 缺失株并表达了新城疫 F 蛋白基因部分片段,为研制新型载体疫苗奠定了基础。

1.2.3 *aro* 基因缺失株 *aroA*、*aroC*、*aroD* 等基因分别编码 3-磷酸莽草酸 1-羧乙烯基转移酶、分支酸合酶、3-脱氢奎宁酸脱水酶,它们控制着细菌体内色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、2,3-二羟基苯甲酸、对氨基苯甲酸等芳香族氨基酸的生物合成,这些芳香族氨基酸对于细菌的生长起着重要作用。而哺乳动物不具备该合成途径,所以 *aroA* 单基因缺失以及 *aroA*、*aroC* 或 *aroC*、*aroD* 双基因缺失均可导致细菌只能在体内有限增殖,从而起到减毒的作用(Chattfield 等,1992)。Hone(1991)构建了智利分离伤寒株 ISP1820 和实验室株 Ty2 的 *aroC* 和 *aroD* 的双缺失株 CVD906 和 CVD908,突变株在低营养的培养基中不能复制,腹腔接种小鼠,*aro* 单突变株和双突变株毒力均减弱。

1.2.4 *phoP/phoQ* 基因缺失株 *phoP* 和 *phoQ* 基因分别编码转录激活因子和传感器激酶,主要功能是调控酸性磷酸酶的合成。当沙门氏菌被巨噬细

胞吞噬后,自身有一系列措施可以逃避宿主的杀灭,但其中一些适应措施都受控于 *phoP/phoQ* 双基因的调节。缺失 *phoP/phoQ* 基因后导致细菌在巨噬细胞中的存活能力下降从而达到减毒的目的。伤寒沙门氏菌 Ty2 的 *phoP/phoQ* 缺失株 Ty800 作为伤寒弱毒活疫苗在志愿者上进行了测试,结果证明 Ty800 是安全的,单剂量口服对人有很高的免疫原性;将 Ty2 的 *aroA* 缺失株进一步缺失 *phoP/phoQ* 后构建 Ty445,缺失后的毒力明显降低(Hohmann 等,1996)。

1.2.5 其他基因缺失株 沙门氏菌的全基因组已经被不断深入认知,越来越多的基因也都已应用到基因工程减毒上来。

htrA 基因编码沙门氏菌的 *htrA* 热休克应激蛋白,该蛋白控制细菌在面临压力环境中相应基因的转录,*htrA* 基因缺失导致沙门氏菌对巨噬细胞中氧化环境的抵抗力降低,从而得到减毒。如果在 *aroA* 缺失株基础上进一步缺失与大肠埃希菌编码热激蛋白基因同源的 *htrA* 基因,将影响细菌抵抗巨噬细胞的氧化杀灭能力。*htrA* 缺失结合 *aroA* 缺失,对小鼠是极好的口服疫苗且对小鼠的毒力不增强,缺陷是只有中等免疫力。因此,*htrA* 和 *htrAaroA* 突变株可以作为抗沙门氏菌病很有潜力的口服疫苗(Chatfield 等,1992)。

ompR 基因编码外膜蛋白 R。用 p22 转座突变鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 的外膜蛋白 *ompR*,突变株经口服或静脉免疫小鼠后表明已减毒,LD₅₀ 降低 10⁵,能很好地保护 SL1344 的攻击(Dorman,1989)。

poxA 基因编码丙酮酸氧化酶。*poxA* 突变株表现为多效应表型,鼠伤寒沙门氏菌 UK-1 的 *poxA* 突变株口服小鼠毒力比 UK-1 降低 10⁴ 倍,静脉接种毒力降低 10³ 倍,但仍能在脾、肠系膜淋巴结和 PP 结中定居,能诱导强烈的体液免疫反应,能对致死量的野毒攻击提供保护(Kaniga 等,1998)。

1.3 理想的减毒疫苗 与灭活疫苗、亚单位疫苗相比,减毒活疫苗具有高效、花费低、使用方便等优点。理想的活疫苗应具备下列条件(徐引弟等,2008):①完全减毒;②高度免疫原性;③不能回复突变,限定性多重性缺失突变可防止回复突变的发生;④不对环境造成污染,疫苗应在体内存留特定的时间,诱导免疫反应后被某种机制清除并不滞留于环境;⑤对后代无害,疫苗所诱导的保护性免疫能传给下一代,而疫苗本身不应垂直传播;⑥经济且使用方便,

如口服、滴鼻途径较肌肉注射简单、方便。

2 减毒沙门氏菌载体

为了能激起有效的黏膜免疫,使用疫苗载体将抗原运送到黏膜表面已是很成功的策略。能够作为黏膜免疫抗原的载体有很多种,减毒沙门氏菌是最好的选择之一。

2.1 减毒沙门氏菌载体递呈外源抗原的优点 减毒沙门氏菌作为载体递呈外源抗原具有很多的优点:①减毒沙门氏菌既可携带原核表达质粒也可携带真核表达质粒(Chen 等,2007);②减毒沙门氏菌可入侵至淋巴系统,运送抗原效率高,能更有效地激发体液免疫和细胞免疫;③接种简便,可通过自然感染途径(如口服或滴鼻)(Vecino 等,2002),即可激发系统和黏膜免疫反应,同时阻止了病原在黏膜表面定居和繁殖;④减毒沙门氏菌具有免疫佐剂作用。近年来研究最多的沙门氏菌脂多糖(LPS)是其内在佐剂,LPS 的刺激可以增强树突状细胞(DCs)捕获和加工 MHC I 类抗原的能力,有利于将重组沙门氏菌的抗原呈递给特异性的 B、T 细胞;⑤免疫具有持续性,减毒沙门氏菌作为载体侵入宿主体内后在一段时间内有限增殖,其表达的外源蛋白可对宿主持续刺激,不需要反复加强免疫;⑥重组减毒沙门氏菌疫苗生产工艺简单,疫苗易于储存和运输,因此疫苗的成本相对较低。

2.2 减毒沙门氏菌作为载体存在的问题 减毒沙门氏菌进入分化活跃的淋巴细胞后,将异源质粒 DNA 递呈给宿主细胞,很可能与宿主的基因组发生整合,使原癌基因和抑癌基因的表达失控而导致细胞癌变;作为载体的减毒沙门氏菌如果遗传背景不清楚可能会出现毒力返强的危险;重组减毒沙门氏菌的表达产物与天然蛋白存在差异,表达产物是否会对疫苗或宿主有害无法确定;部分重组减毒沙门氏菌可能会出现外源抗原表达量低而不能激发免疫反应的现象;除了表达量低外,常常遇到的另外一个问题是外源基因表达不稳定,特别是在体内,会出现表达质粒丢失的现象。

2.3 减毒沙门氏菌载体在疫苗中的应用

2.3.1 应用于细菌疫苗 减毒沙门氏菌载体已被广泛应用于链球菌、结核杆菌、百日咳杆菌、产单核细胞李斯特菌、鼠疫耶尔森菌、土拉弗郎西斯菌、铜绿假单胞菌、淋病奈瑟菌、牛布氏杆菌、破伤风梭菌、炭疽芽孢杆菌、沙眼衣原体和猪肺炎支原体等细菌疫苗的研制。研究结果表明,将含有幽门螺杆菌

ureB 和 IL-2 的融合表达载体转化到减毒沙门菌内后所构建的重组疫苗可以有效地保护细菌对小鼠的攻击(Xu 等,2007)。将链球菌溶血素(SLY)克隆到原核表达载体 pBV220 上构成 pBV220/SLY 重组质粒,再导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SV4089 株,用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)可见 pBV220/SLY 能在 SV4089 疫苗菌中稳定存在进行表达(马有智等,2005)。Parid 等(2005)构建了携带结核杆菌(TB)的 Ag85A 基因的重组减毒菌疫苗,该疫苗组比肌注 DNA 疫苗组对强毒株攻击的保护率高,该研究为进一步深入研制抗结核的减毒沙门氏菌核酸疫苗提供了依据。

2.3.2 应用于病毒疫苗 减毒沙门氏菌载体在病毒疫苗研制方面应用广泛,已被用于乙型肝炎病毒(HBV)、鸡传染性法氏囊病毒、艾滋病病毒(HIV)、单纯疱疹病毒(HSV)、新城疫病毒(NDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)及呼吸道合胞体病毒(RSV)等病毒疫苗的研究。李龙等(2004)用减毒鼠伤寒沙门氏菌 ZJ111 株携带克隆有传染性法氏囊病病毒 ZJ2000 株多聚蛋白基因 VP2 的重组质粒而后转染 Vero 细胞,SDS-PAGE 和 Western blotting 均可检测到与 VP2 蛋白分子质量一致的 41 ku 蛋白条带,表明减毒沙门氏菌可将外源基因 VP2 导入 Vero 细胞,并进行转录和表达。唐丽华等(2007)构建了禽流感 H5 亚型的 SL7207 (pmcDNA3.1-HA) 和 SL7207 (pcDNA3.1-HA) 两种减毒沙门氏菌疫苗,体内外试验结果表明,质粒 pmcDNA3.1-HA 比 pcDNA3.1-HA 更稳定,两种 DNA 疫苗均能诱导明显的黏膜免疫。

2.3.3 应用于寄生虫疫苗 Qu 等(2008)将编码鼠弓形虫表面抗原蛋白 SAG1 的真核表达质粒转入减毒沙门氏菌 ZJ111 中,以不同剂量口服接种小鼠。结果显示,重组沙门氏菌有效诱导了小鼠产生 SAG1 抗体,且抗体水平与免疫剂量相关, 10^7 CFU 接种量诱导的抗体水平显著高于 10^6 CFU 与 10^8 CFU;免疫小鼠体内检测到了高水平的 INF- γ ,表明诱导了 Th1 型免疫应答;攻毒试验显示将小鼠的死亡率有效减少了 20%。

覃宗华等(2005)将堆型艾美耳球虫广东株孢子表面抗原基因 cSZ1 的阅读框架,连接载体 pYA3342 质粒,并将该质粒电转化进入减毒鼠伤寒沙门氏菌 X4550,将重组的减毒沙门氏菌 X4550/pYA3342-cSZ1 分别以 10^8 或 10^9 CFU 经口免疫 4

日龄岭南黄肉鸡,免疫后 2 周血清中可以检测到 cSZ1 特异性 IgG,3 周时抗体水平达到峰值;同时 25 日龄在肠道可以检测到特异性 IgA。免疫后 3 周, 10^8 及 10^9 CFU 两个免疫组分别经口攻击 500 个孢子化卵囊,计数感染后 3~10 d 卵囊总产量,分别降低 25.1% 和 46.4% 的卵囊产生。

2.3.4 应用于肿瘤疫苗 减毒沙门氏菌具有众多作为抗肿瘤理想基因传递载体的特征(廖成水等,2010),目前有关专家已将减毒沙门氏菌作为基因转移载体应用于实体瘤、深部肿瘤及转移瘤基因治疗方面,在体外试验及动物模型试验中均取得了较满意的治疗效果,比如 VNP20009 是临床上研究较深入的减毒沙门氏菌菌株。在临床 I 期试验证实其具有较高的肿瘤靶向性和安全性。并且 VNP20009 可以抑制多种鼠源及人源移植瘤的生长。包括鼠、人黑色素瘤、人结肠癌、肺癌和乳腺癌等。部分成果已初步应用于临床,显示出了强大的发展前景(Low 等,2004)。

3 展望

减毒沙门氏菌无论作为疫苗还是作为异源抗原和核酸疫苗的载体都有着无可比拟的优势。国内外都已将其广泛应用于细菌、病毒、寄生虫、肿瘤等疫苗的研制并展示了良好的应用前景。但正如文中所指出,其仍然存在一些不可避免的问题,相信随着对沙门氏菌研究的不断深入,尤其是基因工程改造技术的不断完善和发展,减毒沙门氏菌在疫苗和载体的应用中将体现出巨大的价值。

参 考 文 献

- 1 马有智,戴贤君,李肖梁,等.表达猪链球菌溶血素基因的减毒沙门氏菌的构建及鉴定[J].中国兽医学报,2005,25(5):478~479.
- 2 李龙,方维焕,樊拥军,等.减毒沙门氏菌为载体在 Vero 细胞中表达传染性法氏囊病病毒多聚蛋白基因[J].生物工程学报,2004,20(3):437~440.
- 3 安芳兰,刘学荣,宋玉霞,等.沙门氏菌载体在疫苗应用中的研究进展[J].中国畜牧兽医,2010,37(6):145~150.
- 4 郁川,程朝朝,赵战勤,等.猪霍乱沙门氏菌 C78-1 株 Δ crp 缺失株的构建及其生物学特性初步研究[J].畜牧兽医学报,2010,41(5):587~593.
- 5 唐丽华,潘志明,程宁宁,等.稳定携带 H5 亚型禽流感病毒候选 DNA 疫苗减毒沙门氏菌的构建及其免疫原性[J].微生物学报,2007,47(4):662~666.
- 6 徐引弟,郭爱珍,陈焕春.减毒沙门氏菌疫苗研究进展[J].动物医学进展,2008,29(8):52~56.
- 7 覃宗华,艾哈迈德,谢明权,等.鸡体内减毒鼠伤寒沙门氏菌的繁殖和免疫反应[J].中国预防兽医学报,2003,25(9):378~383.

- 8 覃宗华,谢明权,蔡建平,等.堆型艾美耳球虫 *cSZ1* 基因在减毒沙门氏菌的表达及免疫保护效果研究[J].寄生虫与医学昆虫学报,2005,12(1):6~13.
- 9 瞿占超,石佩,陈瑞,等.减毒鼠伤寒沙门氏菌载体在兽用疫苗中的运用[J].中国兽药杂志,2009,43(5):33~39.
- 10 廖成水,程相朝.减毒沙门氏菌作为抗肿瘤及肿瘤基因治疗载体的研究进展[J].生物学通报,2010,45(11):1~4.
- 11 蔡宝祥,陈溥言,沈正达.家畜传染病学[M].第4版.北京:中国农业出版社,2001,52~59.
- 12 Chatfield S N, Fairweather N, Charles I, et al. Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 aroA, aroC mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine[J]. Vaccine, 1992, 10(1): 53~60.
- 13 Chatfield S N, Strahan K, Pickard D, et al. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model[J]. Microb Pathog, 1992, 12(2): 145~151.
- 14 Chen Z H, Zhao P, Wu S M, et al. Comparison of immune responses induced by recombinant attenuated *Salmonella typhi* carrying eukaryotic expression plasmid or prokaryotic expression plasmid of HCV core protein[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2007, 23(5): 862~866.
- 15 Curtiss R, Kelly S A. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic[J]. Infect Immun, 1987, 55: 3035~3043.
- 16 Dorman C J, Chatfield S, Higgins C F. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated *in vivo* [J]. Infect Immun, 1989, 57(7): 2136~2140.
- 17 Hassan J O, Curtiss R III. Control of colonization by virulent *Salmonella typhimurium* by oral immunization of chickens with avirulent Δ crp Δ cya *S. typhimurium* [J]. Res Microbiol, 1990, 141: 839~850.
- 18 Hohmann E L, Oletta C A, Miller S I. Evaluation of a *phoP*/*phoQ*-deleted, *aroA*-deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers[J]. Vaccine, 1996, 14(1): 19~24.
- 19 Hone D M, Hams A M, Chatfield S, et al. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi* [J]. Vaccine, 1991, 9(11): 810~816.
- 20 Kaniga K, Compton M S, Curtiss R. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection[J]. Infect Immun, 1998, 66(12): 5599~5606.
- 21 Low K B, Ittensohn M, Luo X, et al. Construction of VNP 2009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting *Salmonella* for parenteral administration in humans[J]. Methods Mol Med, 2004, 90: 47~60.
- 22 Nakayama K, Kelly S M, Curtiss R III. Construction of an *asd*⁺ expression-cloning vector stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain[J]. Biotechnol, 1988, 6: 693~697.
- 23 Parida S K, Huygen K, Ruyffel B, et al. Novel bacterial delivery system with attenuated *Salmonella typhimurium* carrying plasmid encoding Mtb antigen 85A for mucosal immunization: establishment of proof of principle in TB mouse model[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1056: 366~378.
- 24 Qu D, Wang S, Ca W, et al. Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice[J]. Vaccine, 2008, 26: 4541~4548.
- 25 Shata M T, Stevceva L, Agwale S, et al. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors[J]. Mol Med Today, 2000, 6(2): 66~71.
- 26 Vazquez T A, Fang F C. Cellular routes of invasion by enteropathogens[J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(1): 54~59.
- 27 Vazquez T A, Jones C J, Baumler A J, et al. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes[J]. Nature, 1999, 401(6755): 804~808.
- 28 Vecino W H, Morin P M, Agha R, et al. Mucosal DNA vaccination with highly attenuated *Shigella* is superior to attenuated *Salmonella* and comparable to intramuscular DNA vaccination for T cells against HIV[J]. Immunol Lett, 2002, 82(3): 197~204.
- 29 Xu C, Li Z S, Du Y Q, et al. Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* DNA vaccine expressing H pylori ureB and IL-2[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(6): 939~944.

Progress in Attenuated *Salmonella* Vaccines and Vaccine Carrier

LI Zheng, CHENG Xiang-chao

(College of Animal Science, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: *Salmonella* can not only be used as vaccines but also an ideal vaccine vector, it has been a wide range of medical and veterinary importance. *Salmonella* can be made by means of mucosal immune (oral or nasal), easy operation and little irritation of the vaccination. In addition, *Salmonella* is an invasion of intracellular, effectively presenting antigens to stimulate anti-*Salmonella* and induce foreign protein specific humoral immune response and cellular immune response, and can also induce mucosal immunity and systemic immunity. As new vaccines to provide a reference, this review mechanism of *Salmonella* invasion, the immune mechanism and its application status in vaccine.

Key words: *Salmonella*; vaccine; carrier