

猪表皮生长因子在植物乳杆菌中的表达及其活性检测

钟泽民^{1*}, 赖强^{1*}, 余希尧¹, 刘德辉², 黄毓茂¹

1 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642

2 广州沃德生物科技有限公司, 广东 广州 510663

钟泽民, 赖强, 余希尧, 等. 猪表皮生长因子在植物乳杆菌中的表达及其活性检测. 生物工程学报, 2015, 31(9): 1325-1334.

Zhong ZM, Lai Q, Yu XY, et al. Expression and characterization of porcine epidermal growth factor in *Lactobacillus plantarum*. Chin J Biotech, 2015, 31(9): 1325-1334.

摘要: 为获得一株高效表达猪表皮生长因子 (pEGF) 的重组植物乳杆菌, 并检测其生物活性, 从仔猪肠道内容物中分离植物乳杆菌, 选择其中生物活性最强的一株 (Lp-1) 为宿主。以商品化乳杆菌表达载体 pIA β 8 为骨架, 干酪乳杆菌超强组成型启动子 SCP、M6 前体蛋白信号肽 SP、猪表皮生长因子 pEGF 等为元件, 构建表达 pEGF 的植物乳杆菌重组表达载体 pSCPSE。用电转化方法 (2.0 kV, 2 000 Ω , 25 μ F, 4.0 ms) 将重组载体 pSCPSE 转化入宿主菌 Lp-1 中获得重组植物乳杆菌 Lp-pSCPSE。以 Tricine-SDS-PAGE 法和 pEGF ELISA 特异性检测试剂盒检测目的蛋白的表达; 用培养 12 h 的阳性转化子菌体给刚断奶的 BALB/c 小鼠灌胃, 2 次/d, 连续 10 d, 以断奶小鼠的体重、肠绒毛长度和隐窝深度的变化为指标, 检测目的蛋白的生物活性。Tricine-SDS-PAGE 检测和小鼠实验结果显示, 重组植物乳杆菌的培养上清中出现 6 kDa 左右 pEGF 的特异性条带, 且表达 pEGF 的重组植物乳杆菌能显著增加 ($P<0.05$) 断奶小鼠的体重、肠绒毛高度和肠隐窝深度。结果表明, pEGF 在植物乳杆菌中成功表达, 且具有良好的生物学活性。

关键词: 猪源乳酸杆菌, 猪表皮生长因子 (pEGF), 断奶小鼠, 绒毛高度, 隐窝深度

Received: November 11, 2014; **Accepted:** March 25, 2015

Corresponding author: Yumao Huang. E-mail: ymaohuang@scau.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

Expression and characterization of porcine epidermal growth factor in *Lactobacillus plantarum*

Zemin Zhong^{1*}, Qiang Lai^{1*}, Xiyao Yu¹, Dehui Liu², and Yumao Huang¹

¹ College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

² Guangzhou Well Biotechnology Co. LTD, Guangzhou 510663, Guangdong, China

Abstract: Epidermal growth factor (EGF) is an epithelial cell growth factor that can stimulate intestinal development, repair the damage of epidermal cells as well as reduce the incidence of pathogen infection and diarrhea. In order to produce a recombinant *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) expressing porcine epidermal growth factor (pEGF), we constructed a recombinant vector stably expressing pEGF in *L. plantarum* strains. First, *L. plantarum* strain Lp-1 was isolated from intestinal contents of piglets. Then the functional domain of pEGF, M6 precursor protein signal peptide (SP) and super strong constitutive promoter (SCP) were connected with the backbone plasmid pIA β 8 to construct the recombinant vector that was transformed into Lp-1 by electroporation. Afterwards, pEGF was expressed in Lp-1 and detected by Tricine-SDS-PAGE and ELISA. After orally irrigated early-weaned BALB/c mice with the recombinant *L. plantarum* every morning and late afternoon for 10 consecutive days, body weight, villous height and crypt depth in the intestine were measured to examine the influence of the recombinant bacteria on the intestinal development of early-weaned mice *in vivo*. Finally, the results of our experiments demonstrated that pEGF was successfully expressed in Lp-1 and the molecular weight of pEGF was 6 kDa. In addition, the recombinant pEGF can enhanced the daily gain and exerted significance influence ($P < 0.05$) to the small intestinal morphology of early-weaned BALB/c mice. In conclusion, pEGF could be expressed in *L. plantarum* and the recombinant pEGF possesses good biological activity.

Keywords: *Lactobacillus planetarium*, porcine epidermal growth factor (pEGF), early-weaned mice, villus height, crypt depth

表皮生长因子 (Epidermal growth factor, EGF) 是一种高效的有丝分裂原,能刺激细胞增殖、分化,促进离子交换和细胞外基质合成,是哺乳动物乳中含量最高的生长因子之一。研究表明,猪表皮生长因子 (pEGF) 不仅能刺激初生仔猪的肠上皮发育^[1],而且有利于猪早期胚胎的发育,提高仔猪的成活率^[2]。Lee 等的研究表明,pEGF 能有效地刺激早期断奶仔猪的肠道发育及修复受损的肠道上皮细胞^[3]。Chuang 等发现,pEGF 不仅能促进早期断奶仔猪的肠道发育,而且能促进空肠消化酶基因的表达和增强消化酶的活性^[4]。为缩短母猪生育周期,生产中一般对仔猪进行早期断奶,而断奶应激是影响

早期断奶仔猪的生产性能的主要原因之一。通过在日粮中添加适量的 pEGF 可有效缓解早期断奶仔猪的断奶应激,有利于仔猪生产性能的提高^[5]。

植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 作为肠道正常菌群,能粘附于消化道上皮细胞^[6],产生各种抑菌活性物质^[7-8],改善肠道环境。由于其安全性和多种益生特点,近年来,乳杆菌作为外源蛋白的表达宿主,已被国内外研究人员广泛用于各项研究。庾庆华等^[9]分离鸡源乳杆菌,并以其为载体宿主,成功表达了绿色荧光蛋白;李一经等^[10]利用短乳杆菌 S 层启动子构建乳酸杆菌表达系统成功表达了 TGEV 的 N 蛋白;

Sasikumar 等^[11]在植物乳杆菌中表达草酸脱羧酶,能有效降解小鼠的肾结石。

基于乳杆菌的诸多优点,若以乳杆菌为表达宿主表达 pEGF,并将其应用到临床上,则可能对断奶仔猪的生产性能的提高具有重大意义。本研究为获得高效表达 pEGF 的重组乳杆菌,分离鉴定了一株具有较广谱抑菌活性的植物乳杆菌为宿主,以 pIA β 8 为载体骨架构建表达载体,成功表达了 pEGF,为生产上缓解仔猪断奶应激、促进断奶仔猪生长提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

新鲜仔猪肠道内容物于中山市某农场采集;SPF 级 BALB/c 小鼠购自南方医科大学实验动物中心;MRS 培养基为海博公司产品;乳杆菌鉴定试剂盒为环凯公司产品;质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司;各种基因克隆试剂购于 TaKaRa 公司;载体质粒购于 Biovector 公司;指示菌株为本实验室保存;其他试剂为国产分析纯。

1.2 植物乳杆菌的初步分离

取 28 日龄新鲜断奶仔猪肠道内容物 0.5 g 置于 4.5 mL 灭菌生理盐水中,摇匀。进行梯度稀释,稀释至第 7 个梯度,吸取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度稀释液 100 μ L 于固体 MRS 培养基平板上均匀涂布。将上述平板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 48 h,挑选形状规则、活性高的单菌落 10 株,反复划线纯化获得纯菌株。分别将单菌落接入 MRS 液体培养基中标号 L₁–L₁₀,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,分别取各菌株的 10^{-7} 梯度稀释液 100 μ L,置于无菌平皿中,倾入已经融化并冷却至 45 $^{\circ}$ C 左右的 MC 培养基 13–15 mL,立即混匀,待凝

固后倒置培养。溶钙检测后,将分离纯化出来的菌株接种于冻存液中,编号后收存于–80 $^{\circ}$ C 冰箱。对产溶钙环的菌株进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察其菌体特征。

1.3 植物乳杆菌的初步鉴定

参照乳杆菌生化鉴定试剂盒说明,对镜检为革兰氏阳性杆菌的菌株进行鉴定。对鉴定阳性的菌株进行编号保存,并以 Excel 2010 软件绘制其菌液 OD 值和 pH 值随时间的变化曲线(图 1)。

1.4 抑菌活性菌株的筛选

将鉴定为乳杆菌阳性的菌株分别接种到 MRS 液体培养基中,培养 24 h 后,取菌液 20 mL,5 000 \times g 离心 10 min,取其上清液,以管-碟法测试菌液上清对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性。挑选抑菌活性最强的一株乳杆菌,命名为 Lp-1。

1.5 16S rRNA 鉴定

根据乳杆菌的 16S rRNA 基因序列的保守区域,设计 16S rRNA 扩增引物 P1、P2(表 1),对

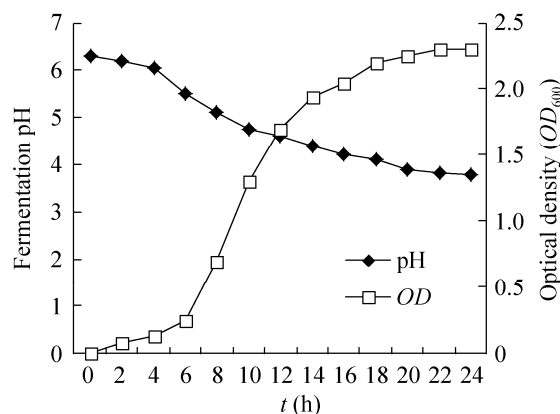


图 1 宿主菌 Lp-1 菌液在 24 h 内 OD 值和 pH 值的变化趋势

Fig. 1 OD value and pH change of Lp-1 culture in 24 h.

表 1 本研究所用 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences used in this study

Primers	Sequences(5'-3')
P1	AGAGTTT <u>GATCCTGGCTCAG</u>
P2	CTACGGCTACCTTGT <u>ACGA</u>
P3	AAAATCTAGAAAGCTTAATACCCACTT ATTGC
P4	GCGGATCCGCGGCCATGTAG TATC
P5	AAGCTTATGGCTAAGAACAACAC
P6	TTAACGCAATTCCCACCACTTCAAA

Primers utilized in this study. Underlined regions of the primer sequences represent the restriction endonuclease sites.

Lp-1 进行 16S rRNA 鉴定。PCR 反应条件为：94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 55 °C 50 s, 72 °C 2 min, 30 个循环；72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物送 Invitrogen 公司测序，测序结果与 GenBank 中同源序列 (Accession No. NC_004567.2) 进行比对后确定 Lp-1 的种属。

1.6 重组表达载体的构建

从 GenBank 中获得超强启动子序列 (Accession No. FW501695) SCP，根据其序列用软件 Primer premier 6.0 设计 PCR 引物 P3、P4，并在 P3 的 5'端引入酶切位点 *Xba* I，在 P4 的 5'端引入酶切位点 *Bam*H I。以干酪乳杆菌 *L. casei* CETC5276 的基因组为模板，P3、P4 为引物扩增出超强启动子 SCP，将其克隆入 pMD-19T 载体中构建克隆载体 pT-SCP。利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 对 pT-SCP 进行双酶切后，回收目的片段 SCP，转而克隆入经过相同酶切处理的表达载体 pIA β 8 中^[12]，成功构建载体 pSCP。

从文献[13]中获得 M6 前体蛋白信号肽序列 (SP)，该信号肽由 141 个碱基组成，能有效地将目的蛋白转移到胞外。从 GenBank 中获取猪表

皮生长因子 (pEGF) 的基因序列 (Accession No. X59516)。在片段 SP 的 5'端和 3'端分别引入酶切位点 *Kpn* I 和 *Sac* I，在片段 pEGF 的 5'端和 3'端分别引入酶切位点 *Sac* I 和 *Eco*R I，然后根据植物乳杆菌的密码子偏嗜性对上述两段序列进行密码子优化后送 Invitrogen 公司合成。

将合成片段通过常规的基因克隆方法依次克隆入表达载体 pSCP 中，然后将连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞中，挑取阳性转化子，进行酶切鉴定和测序鉴定，最后获得表达 pEGF 的重组载体 pSCPSE，用于植物乳杆菌的电转化。

1.7 植物乳杆菌感受态细胞的制备及电转化

植物乳杆菌 Lp-1 的感受态细胞的制备参考 Mason^[14]和 Luchansky^[15]的方法，并改进如下：挑取新鲜培养 Lp-1 的单菌落，接种于 5 mL 的 MRS 培养液中，37 °C 培养过夜；吸取 1 mL 过夜培养的菌液，接种于含 2%甘氨酸 (W/V) 的 99 mL 的 MRS 液中，37 °C 培养至 OD_{590} 为 0.6 左右，再冰浴 10 min，使细菌停止生长。4 °C、8 000 \times g 离心 5 min 收集菌体，然后以冰冷的 SMEB (1 mol/L 蔗糖、25 mmol/L MgCl₂) 缓冲液洗涤菌体 3 次，最后用 SMEB 缓冲液将菌体重悬至原菌液浓度的 50 倍，每管 100 μ L 分装置冰中备用。

将 7 μ L (10 ng/ μ L) 重组载体 pSCPSE 与 100 μ L 上述感受态细胞混匀，转移至预冷的 2 mm 电转杯 (Bio-Rad) 中，静置 30 min，然后以 Bio-Rad 电转仪进行电击转化。电转参数为 2.0 kV, 2 000 Ω , 25 μ F^[16]，脉冲时间约为 4.0 ms。电转后以 900 μ L 预冷的 MRS 液重悬，冰浴 20 min 后置 37 °C 孵育 3 h。

1.8 阳性转化子的筛选及表达产物的鉴定

取适量的电转-孵育后菌液涂布于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素抗性 MRS 平板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24–48 h, 参照庾庆华等^[9]的方法挑取单菌落, 以 P5、P6 (表 1) 为引物做菌落 PCR 鉴定。鉴定为阳性的菌株命名为 Lp-pSCPSE。将转化了空载体 EV 和重组载体 pSCPSE 的植物乳杆菌分别接种于含氯霉素抗性的 MRS 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日将上述过夜培养的菌液按 2% 的比例接种于适量 MRS 液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后取其上清。用截留分子量为 10 kDa 的超滤离心管过滤上清后取 10 kDa 的滤过液, 置于真空干燥箱中浓缩 20 倍。以 Tricine-SDS-PAGE 法对上述浓缩液中的目的蛋白进行检测, 同时设立相应浓度的空载体组和标准品阳性对照组。

以猪表皮生长因子 (pEGF) ELISA 特异性检测试剂盒 (环凯公司) 分别检测 Lp-pSCPSE 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12、24、36、48 h 后上清中 pEGF 的含量。用曲线拟合软件 Cruver Expert 1.3 选择拟合度最高的浓度-OD 值曲线, 得出拟合方程, 然后计算出相应样品浓度。

1.9 目的蛋白生物活性的检测

将 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 的重组植物乳杆菌 Lp-pSCPSE 菌液离心取菌体, 以无菌 PBS 洗涤 2 次后重悬至浓度约为 2.0×10^9 CFU/mL 备用, 以相同方法制备空载体重组植物乳杆菌 Lp-EV 备用。19–21 日龄 BALB/c 断奶小鼠随机分为 PBS、空载体 (EV)、重组 pEGF 植物乳杆菌 (pEGF)、重组人源 EGF (rhEGF) 4 组, 每组 10 只, 并记录各组每只小鼠的体重。

每组灌胃给药量如下: PBS 组、EV 组和 EGF 组各 300 $\mu\text{L}/\text{只}$, rhEGF 标准品对照组按 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[17] 给药, 2 次/d, 持续 10 d。实验第 10

天处死所有实验小鼠, 称重后分别在距小肠各段 (十二指肠、空肠、回肠) 起始处 1–2 cm 间各取 0.5 cm 肠道为样品, 以无菌 PBS 冲洗后置于 10% 甲醛溶液中固定过夜。固定后的组织以石蜡包埋后切片 (5 μm), 再以苏木精和伊红 (HE) 染色做组织学检查, 测定各实验组肠绒毛高度和隐窝深度^[17]。

2 结果

2.1 有抑菌活性的植物乳杆菌的分离和鉴定

生化鉴定结果显示, 本研究分离的革兰氏阳性杆菌菌株对七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露糖、水杨苷、山梨醇、蔗糖、棉籽糖等均呈阳性反应, 初步鉴定为植物乳杆菌 *L. plantarum*。管-碟法检测该菌 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 上清对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果分别为 19 mm 和 20 mm 抑菌圈 (牛津杯外径为 8 mm) (图 2)。

Lp-1 的 16S rRNA 测序结果经 Blast 序列比对后显示, 该菌株与 *L. plantarum* WCFS1 株同源性最高, 即本研究分离的菌株属于植物乳杆菌。16S rRNA 测序结果略。

2.2 重组表达载体的构建

经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 超强启动子 SCP 的 PCR 产物长度约为 400 bp, M6 前体蛋白信号肽 SP 的基因片段长度约为 150 bp, 猪表皮生长因子 pEGF 的基因片段长度约为 170 bp, 均与预期片段长度相符。将上述各片段分别通过相应的酶切位点克隆到骨架质粒中构建重组载体, 再对重组载体进行双酶切鉴定, 结果在 750 bp 左右出现条带, 与插入的目的条带 SCP、SP 和 pEGF 总长一致 (图 3)。测序鉴定结果与实验设计序列完全一致, 证明表达 pEGF 的重组表达载体 pSCPSE 构建成功。

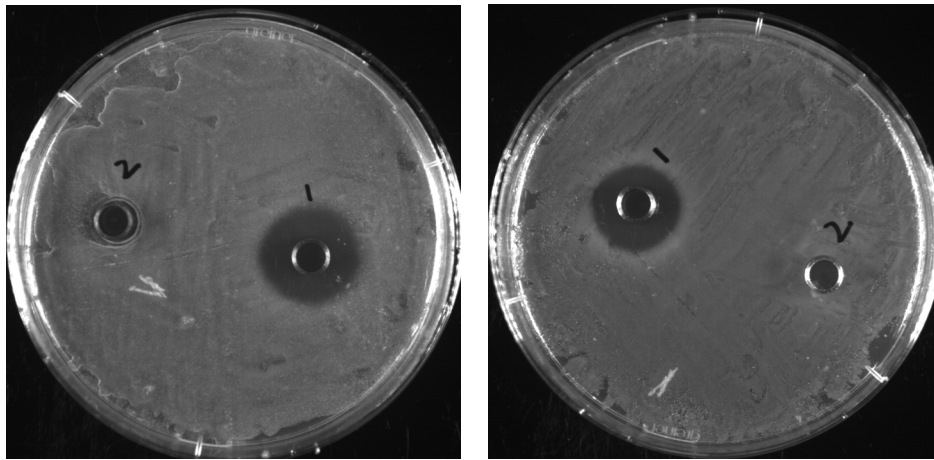


图2 管-碟法检测 Lp-1 37 °C 培养 24 h 的菌液上清对大肠杆菌 K99 和金黄色葡萄球菌 ATCC29213 的抑菌效果
Fig. 2 Antimicrobial activity of Lp-1 supernatant against *E. coli* K99 and *S. aureus* ATCC29213. (A) *E. coli*. (B) *S. aureus*. 1: Lp-1 supernatant; 2: sterilized MRS broth.

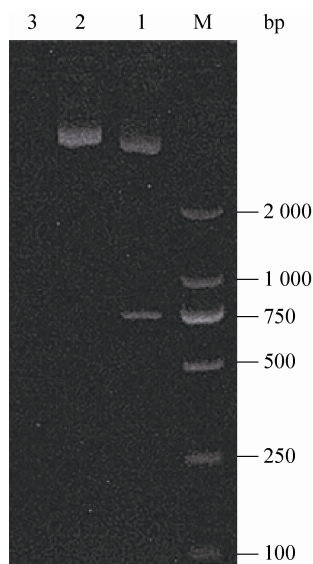


图3 重组载体 pSCPSE 的双酶切鉴定
Fig. 3 Identification of pSCPSE by restriction enzyme digestion. 1: double digestion product of pSCPSE vector; 2: pSCPSE vector; 3: blank control; M: DNA marker.

2.3 电转后阳性转化子的筛选

用 pSCPSE 电转 Lp-1 的感受态, 涂布于氯霉素抗性 MRS 平板培养, 获得多个单菌落。以

溶菌液^[9]预先处理单菌落后取之为模板, 以 P5、P6 为引物做菌落 PCR 鉴定, PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定与预期条带大小相符 (结果未显示)。表明重组载体成功电转入宿主菌 Lp-1 中。

2.4 阳性转化子培养上清表达产物的分析

在阳性转化子 Lp-pSCPSE 的培养上清中检测到特异性条带, 大小约为 6 kDa 左右, 与标准品阳性对照组大小相同, 而空载体组的培养上清未检测到特异性条带 (图 4)。表明重组载体 pSCPSE 成功电转化入植物乳杆菌 Lp-1 中, 且在信号肽 SP 的引导下, 目的蛋白成功分泌到胞外。用猪表皮生长因子 (pEGF) ELISA 特异性检测试剂盒检测 Lp-pSCPSE 在 37 °C 培养 12、24、36、48 h 后上清中的 pEGF (表 2)。以曲线拟合软件 Curve Expert 1.3 分析 ELISA 数据后得到拟合度最高的浓度-OD 值曲线, 拟合方程为 $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ (a、b、c、d 为拟合方程常数, x 为样品 OD 值, y 为样品浓度)。经计算, 重组植物乳杆菌 Lp-pSCPSE 培养 24 h 后上清中

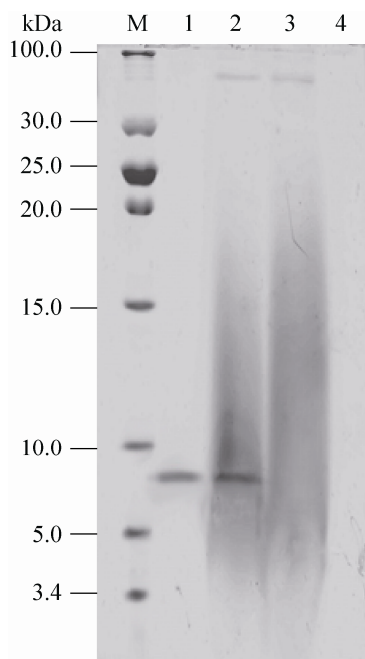


图 4 重组植物乳杆菌培养上清浓缩液的 Tricine-SDS-PAGE 鉴定

Fig. 4 Tricine-SDS-PAGE detection of recombinant *L. plantarum* concentrated supernatant. M: protein marker; 1: rhEGF standard sample; 2: Lp-pSCPSE concentrated supernatant; 3: Lp-EV concentrated supernatant; 4: blank control.

表 2 重组植物乳杆菌菌液 ELISA 检测结果

Table 2 ELISA assay data (OD_{450}) of Lp-pSCPSE culture

Time (h)	1:1	1:5	1:10	1:100
12	0.155	0.106	0.102	0.091
24	0.245	0.225	0.147	0.121
36	0.237	0.196	0.108	0.096
48	0.197	0.166	0.114	0.091

pEGF 的浓度达最大值为 280 ng/mL。

2.5 重组植物乳杆菌生物活性的检测

以表达 pEGF 的重组植物乳杆菌 Lp-pSCPSE、电转化空载体质粒的植物乳杆菌

Lp-EV、rhEGF 标准品和 PBS 分别对断奶的 BALB/c 小鼠进行灌胃实验。结果表明重组乳杆菌 Lp-pSCPSE 能有效促进断奶小鼠体重的增加, 数据统计结果显示, 与 Lp-EV 组和 PBS 组相比, Lp-pSCPSE 组和 rhEGF 组增重差异显著 (字母不同表示差异显著) (图 5)。

石蜡切片后, 参考 Cheung 等^[17]的方法, 用 Leica LAS Extended Annotation 显微图像分析软件对各实验组小鼠的十二指肠、空肠、回肠进行组织学检查及数据测量, 统计分析结果显示 Lp-pSCPSE 组和 rhEGF 组的各肠段肠绒毛长度和隐窝深度与 Lp-EV 组和 PBS 组相比差异显著 (字母不同表示差异显著) (图 6)。

3 讨论

pEGF 作为一种活性小肽, 在促使肠道上皮细胞的正常分裂增殖过程中的作用不可或缺^[18-19]。其在畜牧业生产, 尤其是在提高断奶仔猪生产性能中有良好的应用前景。近年来, 随着国内

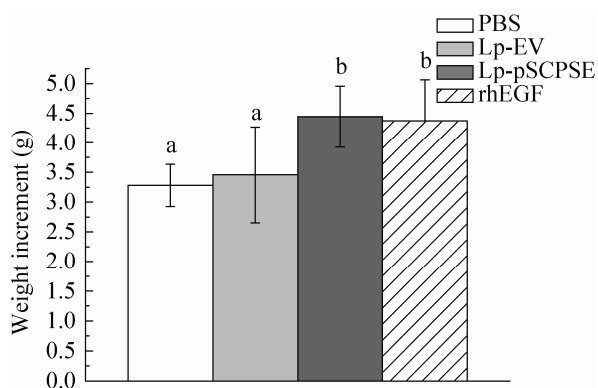


图 5 不同处理组 10 d 后实验小鼠增重的对比 (字母不同表示差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 5 Comparison of mean body weight changes after treatment for 10 d. Different letters indicate one-way ANOVA significant differences ($P < 0.05$).

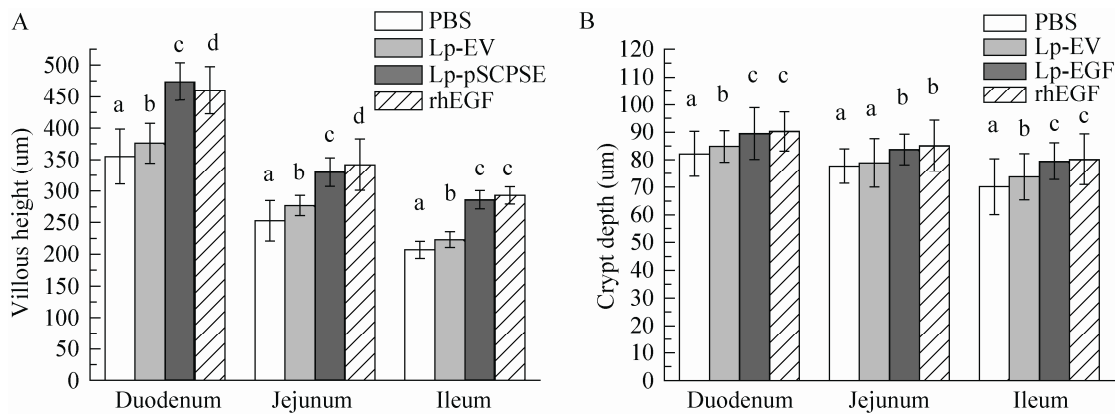


图6 表达 pEGF 的重组植物乳杆菌 Lp-pSCPSE 对 BALB/c 早期断奶小鼠肠绒毛高度 (A) 及肠隐窝深度 (B) 的影响

Fig. 6 Enhancement of intestinal villous height (A) and crypt depth (B) of early-weaned BALB/c mice by the EGF expressing *L. plantarum*. Different letters indicate one-way ANOVA significant differences ($P < 0.05$).

外研究的深入, 已经实现了 pEGF 在大肠杆菌、酵母菌、乳酸乳球菌等多种宿主菌中的表达和应用^[3,5]。但 pEGF 在这些宿主中表达存在各自的不足之处: 大肠杆菌表达系统表达小肽易形成包涵体, 且产物中内毒素的去除过程繁复; 酵母表达系统表达 pEGF 后虽纯化过程相对简易, 但酵母菌不是猪肠道正常定殖菌, 无法持续为断奶仔猪提供 pEGF, 给实际生产操作带来不便; 乳酸乳球菌虽为猪肠道内正常菌群, 但其对猪肠道黏膜的粘附性和产乳酸能力不佳。为克服上述表达系统的不足, 本研究以分离的仔猪源植物乳杆菌为宿主表达 pEGF; 该菌分离自仔猪肠道, 对猪肠道黏膜有很强的粘附性, 其发酵液中乳酸浓度高, pH 值可达 3.8, 在降低仔猪消化道 pH 值, 限制肠道内嗜碱性细菌数量起重要作用。此外, Park 等^[20]研究发现, 以植物乳杆菌喂养小鼠能有效缓解小鼠因高脂食物而导致的肥胖症状; 将植物乳杆菌与多重耐药的铜绿假单胞菌共培养时, 能降低铜绿假单胞菌的毒性^[21]; 还有研究表明植物乳杆菌能对

内毒素引起的肝损伤和小鼠急性镉中毒起保护作用^[22]。

pEGF 作为一种生长因子, 仅需微量便可在机体内产生相应的生物学功能。Cheung 等^[17]研究发现, 1 ng/mL 浓度的 EGF 与 25 ng/mL 浓度的 EGF 对小鼠的肠绒毛的促生长作用无显著差异。而本研究构建的重组植物乳杆菌表达的 pEGF 可达 280 ng/mL, 满足机体对该生长因子的需要。Wang 等^[23]研究发现, 与传统的抗生素相比, 表达 EGF 的乳酸菌不仅能有效地控制猪肠道内的大肠杆菌、肠球菌等有害菌的数量, 而且能促进肠道内其他益生菌的生长, 从而改善肠道菌群。以本研究构建的重组植物乳杆菌饲喂小鼠, 小鼠的肠绒毛高度和隐窝深度与对照组相比都有明显差别, 说明重组植物乳杆菌进入小鼠消化道后能在消化道内正常生长并分泌表达 pEGF, 有效促进肠上皮细胞的增生。在停止饲喂重组乳杆菌后的第 10 天, 仍能从小鼠粪便分离的植物乳杆菌中检测到 pEGF 目的基因存在, 证明本研究构建的重组植物乳杆菌能

有效地在小鼠消化道内定殖,且持续性地产生 pEGF,有助于修复肠道损伤,促进肠道发育。因此,表达 pEGF 的植物乳杆菌作为一种减缓仔猪断奶应激的微生物制剂,具有重大的临床推广意义。传统的抗仔猪断奶应激剂主要由微量元素、微量元素氨基酸螯合物及各种稀释剂和载体物质组成,对仔猪的生长发育存在一定影响,且抗应激效果不理想。本研究采用益生型植物乳杆菌为宿主表达 pEGF,不仅有利于猪肠道内菌群稳态的维持,而且能有效抗仔猪断奶应激。本研究的开展对益生型植物乳杆菌的临床应用及其潜力开发提供相应的理论依据。

REFERENCES

- [1] Abud HE, Watson N, Heath JK. Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signaling. *Exp Cell Res*, 2005, 303(2): 252–262.
- [2] Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, et al. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51(4): 395–401.
- [3] Lee DN, Kuo TY, Chen MC, et al. Expression of porcine epidermal growth factor in *Pichia pastoris* and its biology activity in early-weaned piglets. *Life Sci*, 2006, 78(6): 649–654.
- [4] Lee DN, Chuang YS, Chiou HY, et al. Oral administration recombinant porcine epidermal growth factor enhances the jejunal digestive enzyme genes expression and activity of early-weaned piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2008, 92(4): 463–470.
- [5] Kang P, Toms D, Yin YL, et al. Epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* enhances intestinal development of early-weaned pigs. *J Nutr*, 2010, 140(4): 806–811.
- [6] Van Tassell ML, Miller MJ. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 2011, 3(12): 613–636.
- [7] Drider D, Fimland G, Hechard Y, et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(2): 564–582.
- [8] Peng X, Jiang Y. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 against lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1599–1607.
- [9] Yu QH. The expression of GFP in the chicken's *Lactobacilli* and distribution of the recombinant bacterium after oral administration in the small intestine of chicken [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006 (in Chinese).
庾庆华. 绿色荧光蛋白在鸡源乳酸杆菌中的表达及该重组菌口服后在小肠中的分布[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [10] Li YJ, Qin S, Tang LJ, et al. Construction of constitutive expression system based on *Lactobacillus brevis* S layer promoter. *J Northeast Agri Univ*, 2013, 44(6): 125–130 (in Chinese).
李一经, 秦思, 唐丽杰, 等. 基于短乳杆菌 S 层启动子组成型乳酸杆菌表达系统的构建. *东北农业大学学报*, 2013, 44(6): 125–130.
- [11] Sasikumar P, Gomathi S, Anbazhagan K, et al. Recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats. *J Biomed Sci*, 2014, 21: 86.
- [12] Zuo RY, Chang J, Yin QQ, et al. Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. *Microbiol Res*, 2010, 165(4): 329–335.
- [13] Dieye Y, Usai S, Clier F, et al. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, 2001, 183(14): 4157–4166.
- [14] Mason CK, Collins MA, Thompson K. Modified electroporation protocol for *Lactobacilli* isolated from the chicken crop facilitates transformation and the use of a genetic tool. *J Microbiol Meth*, 2005, 60(3): 353–363.
- [15] Luchansky JB, Kleeman EG, Raya RR, et al.

- Genetic transfer systems for delivery of plasmid deoxyribonucleic acid to *Lactobacillus acidophilus* ADH conjugation, electroporation, and transduction. *J Dairy Sci*, 1989, 72(6): 1408–1417.
- [16] Alegre MT, Rodriguez MC, Mesas JM. Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with *in vitro* modified plasmid DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 241(1): 73–77.
- [17] Cheung QCK, Yuan ZF, Dyce PW, et al. Generation of epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* and its enhancement on intestinal development and growth of early-weaned mice. *Amer Soc Nutr*, 2009(89): 871–879.
- [18] Bedford A, Huynh E, Fu M, et al. Growth performance of early-weaned pigs is enhanced by feeding epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* fermentation product. *J Biotechnol*, 2014, 173: 47–52.
- [19] Bashir O, Fitzgerald AJ, Berlanga-Acosta J, et al. Effect of epidermal growth factor administration on intestinal cell proliferation, crypt fission and polyp formation in multiple intestinal neoplasia (Min) mice. *Clin Sci (Lond)*, 2003, 105(3): 323–330.
- [20] Park JE, Oh SH, Cha YS. *Lactobacillus plantarum* LG42 isolated from gajami sik-hae decreases body and fat pad weights in diet-induced obese mice. *J Appl Microbiol*, 2014, 116(1): 145–156.
- [21] Joshi S, Kaur A, Sharma P, et al. Lactonase-expressing *Lactobacillus plantarum* NC8 attenuates the virulence factors of multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in co-culturing environment. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(8): 2241–2249.
- [22] Zhai Q, Wang G, Zhao J, et al. Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl Environ Microb*, 2013, 79(5): 1508–1515.
- [23] Wang D, Xu S, Lin Y, et al. Recombinant porcine epidermal growth factor-secreting *Lactococcus lactis* promotes the growth performance of early-weaned piglets. *BMC Vet Res*, 2014, 171(10): 1–12.

(本文责编 郝丽芳)