

研究报告

可诱导驯化免疫的屎肠球菌分离筛选及其抗感染效果评价

初红¹, 王贺², 贾秀文¹, 李娜¹, 李丰阳^{*1}, 雷连成^{*1}

1 吉林大学 动物医学学院 人畜共患传染病重症诊治全国重点实验室, 吉林 长春 130062

2 吉林大学第二医院康复医学中心, 吉林 长春 130062

初红, 王贺, 贾秀文, 李娜, 李丰阳, 雷连成. 可诱导驯化免疫的屎肠球菌分离筛选及其抗感染效果评价[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 785-798.

CHU Hong, WANG He, JIA Xiuwen, LI Na, LI Fengyang, LEI Liancheng. Isolation, screening, and anti-infectious evaluation of *Enterococcus faecium* capable of inducing trained immunity[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 785-798.

摘要:【背景】天然免疫应答作为机体的第一道免疫防御屏障, 在动物抵抗病原微生物感染的初始阶段发挥着关键作用。从驯化免疫的角度, 增强动物天然免疫, 提高动物抗病能力是预防控制疾病的有效措施。【目的】从猪肠道菌群中筛选分离具有潜在驯化免疫作用的细菌, 为挖掘新的免疫刺激物奠定基础。【方法】从健康猪粪便中分离纯化细菌, 选择大蜡螟(*Galleria mellonella*)幼虫驯化免疫模型用于筛选肠道共生菌, 对有潜在驯化免疫功能的细菌进行 16S rRNA 基因序列鉴定和生长曲线的测定, 并利用小鼠模型对细菌进行体内驯化效果评价。【结果】通过使用大蜡螟幼虫模型, 我们筛选出了一株具有诱导驯化免疫能力的屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) SC-2; 通过小鼠模型进一步证实菌株 SC-2 预刺激可以提高小鼠外周血与肺脏中的中性粒细胞和巨噬细胞占比, 显著降低猪链球菌(*Streptococcus suis*)感染后其主要脏器中的菌载量, 显著提高小鼠存活率。【结论】屎肠球菌 SC-2 具有诱导驯化免疫的作用, 该菌株的分离鉴定为免疫调控新成分的挖掘提供了基础。

关键词: 屎肠球菌; 驯化免疫; 大蜡螟; 分离鉴定

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800905)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800905).

*Corresponding authors. E-mail: LEI Liancheng, leiliancheng@163.com; LI Fengyang, fengyangli@jlu.edu.cn

Received: 2024-09-13; Accepted: 2024-11-02; Published online: 2024-12-06

Isolation, screening, and anti-infectious evaluation of *Enterococcus faecium* capable of inducing trained immunity

CHU Hong¹, WANG He², JIA Xiuwen¹, LI Na¹, LI Fengyang^{*1}, LEI Liancheng^{*1}

1 State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Severe Zoonotic Infectious Diseases, Key Laboratory for Zoonosis Research of the Ministry of Education, Institute of Zoonosis, and College of Veterinary Medicine, Changchun 130062, Jilin, China

2 Department of Rehabilitation Medicine, The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] The innate immune system is the first defense line and plays a key role in the host defense against microbial early infection. Enhancing the innate immunity from trained immunity is an effective way to improve the resistance of animals to diseases. [Objective] To isolate the bacteria capable of inducing trained immunity from healthy porcine intestinal flora and thus provide new insights for the prevention and control of microbial diseases by trained immunity. [Methods] Bacteria were isolated from healthy pig feces, and the strains capable of inducing trained immunity were screened with *Galleria mellonella*, a well-established model. The strain screened out was identified by 16S rRNA gene sequencing and characterized by growth curve. Its capability of inducing trained immunity was then evaluated in a mouse model. [Results] A strain SC-2 capable of inducing trained immunity in *G. mellonella* was identified as *Enterococcus faecium*. Administration of SC-2 significantly increased the percentages of neutrophils and macrophages in the peripheral blood and lung, decreased the bacteria loads in main organs, and increased the survival rate of mice infected by *Streptococcus suis*. [Conclusion] SC-2 had the effect of inducing trained immunity in mice. Our study provides new insights for immune regulation and disease treatment from the perspective of trained immunity.

Keywords: *Enterococcus faecium*; trained immunity; *Galleria mellonella*; isolation and identification

脊椎动物的免疫应答分为天然免疫应答和适应性免疫应答，后者在感染或接种疫苗后表现出抗原特异性免疫记忆。近年研究表明，天然免疫应答也表现出适应性特征，那些没有适应性免疫的植物和无脊椎动物，在首次刺激后，可能会产生对同源或异源再次刺激的强烈免疫应答^[1]。随后，天然免疫介导的免疫记忆现象也在人类、小鼠、家禽等脊椎动物的模型中被观察到^[2]。Netea 等^[3]的研究指出，哺乳动物的天然免疫系统同样具备免疫记忆的功能。这一

特性被命名为驯化免疫：即抗原首次刺激天然免疫细胞后，它们会产生免疫记忆，而当这些细胞再次受到刺激时，它们的免疫反应会变得更加强烈。

天然免疫应答在动物抵御病原菌入侵的早期发挥了非常关键的作用，它作为生物体的首选免疫防护机制，具有极其重要的作用和意义。从天然免疫记忆特别是驯化免疫的新视角，增强动物天然免疫，提高动物抗病能力是预防控制疾病的有效措施。早期临床研究表明，减毒

的口服脊髓灰质炎疫苗除了预防脊髓灰质炎和显著降低婴儿死亡率外,还可以提供针对流感病毒感染的异源保护,降低呼吸道感染导致的死亡风险^[4-5]。近年来,研究者还开发了一种针对造血干细胞的“驯化免疫”增强疫苗,并在动物模型中证明了其作为癌症治疗佐剂具有良好功效^[6]。徐文龙^[7]研究发现 PepO 作为一种新的驯化诱导剂,诱导巨噬细胞的驯化免疫,可增强巨噬细胞的数量和吞噬杀伤功能,为驯化诱导剂的发现提供新思路。肠道中的共生微生物在驯化免疫过程中起到了至关重要的调控作用,它们通过分泌物或自身来调控生物体整体的免疫响应,维持免疫平衡^[8]。

本研究旨在通过建立大蜡螟幼虫驯化免疫模型,筛选可诱导驯化免疫的肠道共生菌,同时对菌株进行 16S rRNA 基因测序,随后通过小鼠模型进一步评价其驯化免疫效果,这对于增强动物天然免疫、提高动物抗病能力、挖掘免疫调控新成分具有重要科学意义。

1 材料与方 法

1.1 样 品

250–300 mg 大蜡螟幼虫,天津惠裕德生物科技有限公司。幼虫在 16 °C 避光环境中保存,并在购买后的 14 d 内全部使用完毕;ICR 小鼠,辽宁长生生物技术股份有限公司。动物实验遵守吉林大学及国家对于实验动物伦理福利的要求,通过了吉林大学动物伦理福利委员会伦理审查(编号为 SY202201009)。

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2) CVCC 606 菌株,本实验室保藏。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

脑心浸出液(brain heart infusion, BHI)肉汤,广东环凯微生物科技有限公司。高保真 PrimeSTAR DNA 聚合酶, TaKaRa 公司;抗鼠

CD45、CD11b、F4/80、Ly6G, Biolegend (北京) 生物科技有限公司;红细胞裂解液,索莱宝公司。流式细胞仪, Thermo Fisher 公司;紫外分光光度计, Eppendorf 公司。

1.3 菌株的分离纯化

分批在吉林大学农业试验基地采集健康猪的新鲜粪便样本共 50 份,放入干冰中 2 h 内运至实验室。将采集的样本置于超净工作台内,分别称取 0.2–0.3 g 粪便样品浸没于 5 mL 灭菌 PBS 溶液中,涡旋振荡后使用无菌纱布过滤并移除固态物质。对过滤后的粪便悬液进行稀释处理,然后将 10^{-5} – 10^{-7} 梯度的粪便稀释液混合均匀后吸取 100 μ L 涂布在 BHI 固体培养基上,37 °C 倒置培养。分别培养 12、24、36、48、72 h 后挑取不同形态的单菌落,再次划线于 BHI 固体培养基进行纯化培养。纯化 3 代后的单菌落分别接种于 BHI 液体培养基中,37 °C、180 r/min 进行扩大增菌培养 12 h,取一部分菌液与等体积 50% 甘油混匀,标号并置于–80 °C 冰箱长期保存。

1.4 大蜡螟模型的建立

(1) 大蜡螟幼虫的注射:参考 Velikova 等^[9]注射大蜡螟幼虫的方法。

(2) 虫体孵育环境:将大蜡螟幼虫置于 37 °C 的恒温培养箱中孵育。

(3) 大蜡螟幼虫评价指标:参考 Tsai 等^[10]大蜡螟幼虫评价指标。

1.5 大蜡螟幼虫 SS2 感染模型建立

使用菌株 CVCC 606 二次感染大蜡螟幼虫。菌株 CVCC 606 在 BHI 固体培养基上划线,37 °C 培养过夜,挑取单菌落接种于 BHI 液体培养基,37 °C、180 r/min 振荡培养 7 h 至对数生长期(OD_{600} 约为 1),取细菌培养物以 3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用灭菌 PBS 洗涤 2 次并重悬,将菌悬液稀释为 4 个不同浓度,分别为 1×10^4 、

1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 CFU/10 μ L, 于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。将 50 只大蜡螟幼虫随机分为 5 组, 每组 10 只幼虫, 各试验组分别注射上述不同浓度的 CVCC 606 菌液, 每只幼虫于左后腹足注射 10 μ L, 对照组注射相同体积的无菌 PBS 溶液。置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱黑暗环境培养, 监测 5 d, 每天记录大蜡螟幼虫存活情况。

1.6 肠道共生菌毒力的测定与驯化免疫菌株的初筛

在 BHI 固体培养基上对纯化后的菌株进行划线处理, 然后 37 $^{\circ}$ C 培养至单一的菌落出现, 挑取单菌落于 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 16 h, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 菌体用无菌 PBS 溶液重悬后稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} , 于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。将不同浓度的共生菌菌体分别注射于各组大蜡螟幼虫, 每组 10 只, 每只于左后腹足注射 10 μ L, 以空白 BHI 培养基为阴性对照。大蜡螟幼虫于 37 $^{\circ}$ C 培养箱黑暗环境培养, 监测 4 d, 每天记录大蜡螟存活情况。随后选取弱毒肠道分离菌初次刺激大蜡螟幼虫, 经过 4 d 的间隔期, 待虫体度过急性感染期恢复正常后, 注射一定浓度(方法 1.5 所确定的浓度)的 CVCC 606 菌液 10 μ L 进行第二次刺激, 每隔 24 h 记录大蜡螟幼虫的存活率, 监测 4 d, 最终选取存活率高的菌株作为潜在诱导驯化免疫菌株。

1.7 生长曲线的测定

采用浊度测定法测定分离菌的生长曲线, 菌液 OD_{600} 为 1.0 后, 以 2% 接种量转接至新的培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养, 每小时吸取 200 μ L 菌液, 测定菌液的 OD_{600} 值。使用 GraphPad Prism 9.5 软件绘制菌株生长曲线。

1.8 二次攻菌后大蜡螟评分及存活率

使用肠道分离菌 SC-2 初次刺激大蜡螟幼虫, 待虫体度过急性感染期恢复正常后, 注射

一定量的 CVCC 606 进行再次刺激(同方法 1.6), 每隔 24 h 记录大蜡螟幼虫的死亡情况、虫体颜色变化及整体活跃程度。

1.9 16S rRNA 基因的鉴定及系统发育树分析

选取具有驯化效果的分离菌培养, 培养方法同 1.5, 将分离菌菌液作为模板, 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCT ACCTTGTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times PrimeSTAR Premix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 7.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 100 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。阳性 PCR 扩增产物送至库美生物公司测序, 将测得结果上传至 NCBI 和 GenBank 数据库, 对比细菌同源性, 使用 MEGA 11 软件建立菌株发育树模型。

1.10 小鼠体内驯化免疫程序与驯化免疫方式的优化

(1) 驯化免疫程序的优化: 15 只 ICR 小鼠随机分成 3 组, 每组 5 只。设置单次驯化免疫组、两次驯化免疫组和对照组。单次驯化免疫组每只小鼠腹腔注射 1.8×10^8 CFU 的 SC-2 菌液 200 μ L, 经过 4 d 间隔期, 每只小鼠腹腔注射 $2 \times LD_{50}$ 的 CVCC 606; 两次驯化免疫组每只小鼠腹腔注射 1.8×10^8 CFU 的 SC-2 菌液 200 μ L 后, 经过 4 d 的间隔期, 加强驯化免疫为每只小鼠腹腔注射 1.8×10^7 CFU 的 SC-2 菌液 200 μ L, 加强驯化免疫 4 d 后, 每只小鼠腹腔注射 $2 \times LD_{50}$ 的 CVCC 606; 对照组处理方式同两次驯化免疫组, 将 SC-2 菌液更换为无菌 PBS 溶液。每隔 12 h 记录小鼠存活率。

(2) 驯化免疫方式的优化: 15 只 ICR 小鼠随机分成 3 组, 每组 5 只。一组小鼠进行 2 次

腹腔注射 SC-2 株驯化免疫,同上述方法;一组小鼠进行口服驯化免疫,每只小鼠每天灌胃 1.8×10^8 CFU 的 SC-2 菌液 200 μ L,连续灌胃 5 d,经过 2 d 间隔期后,每只小鼠腹腔注射 $2 \times LD_{50}$ 的 SS2 CVCC 606;对照组处理方式同口服驯化免疫组,将 SC-2 菌液更换为无菌 PBS 溶液。每隔 12 h 记录小鼠存活率。

1.11 小鼠体内驯化效果的评价

(1) 菌株安全性评价:将 20 只 ICR 小鼠随机分成 5 组,每组 4 只。分别腹腔注射 200 μ L 不同浓度的分离菌菌液,同时设置对照组,腹腔注射 200 μ L 无菌 PBS 溶液,每隔 24 h 记录小鼠存活率。

(2) 存活率及组织菌载量评价:初次驯化免疫为每只小鼠腹腔注射 1.8×10^8 CFU 的分离菌或 200 μ L 菌液上清,同时设置阴性对照组(PBS),经过 4 d 的间隔期,加强驯化免疫为每只小鼠腹腔注射 1.8×10^7 CFU 的分离菌或 200 μ L 菌液上清,驯化免疫期间观察记录小鼠体重变化。加强驯化免疫后 3 d,每只小鼠腹腔注射 $2 \times LD_{50}$ 的 SS2 CVCC 606,每隔 12 h 记录小鼠存活率,72 h 后每组取 3 只小鼠安乐死,取血液以及肝、脾、肺、肾组织加入无菌 PBS 溶液制成匀浆,梯度稀释,涂板计数,比较各组小鼠组织脏器的细菌载量。

(3) 流式细胞术检测小鼠外周血、肺脏中性粒细胞与巨噬细胞变化:驯化免疫完成后第 3 天,取未驯化免疫组(blank)和驯化免疫未攻菌组(trained)小鼠进行流式细胞术检测。每组小鼠各取 200 μ L 外周血,随后颈椎脱臼处死小鼠,将肺脏取出后进行研磨和过筛。制备单细胞悬液并对其进行抗体的标记。样品中加入相应抗体 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后,用 PBS 缓冲液进行清洗悬浮细胞,利用流式细胞仪检测小鼠外周血、肺脏中的中性粒细胞和巨噬细胞含量。

1.12 统计学分析

试验数据均使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行分析,以平均值 \pm 标准差表示(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 SS2 感染大蜡螟幼虫的最佳浓度筛选

对大蜡螟幼虫注射不同浓度的 SS2 CVCC 606 菌悬液,注射等体积的 PBS 作为对照。如图 1 所示,注射 1×10^7 CFU 的 SS2 CVCC 606 会导致大蜡螟幼虫 24 h 内迅速死亡,考虑到观察的方便性,不能让幼虫的死亡速度太快,因此 SS2 CVCC 606 对大蜡螟幼虫的最低致死量定为 1×10^6 CFU。

2.2 大蜡螟幼虫检测肠道共生菌毒力及初筛驯化免疫菌株

本研究共从 50 份健康猪粪便样本中分离获得 536 株菌,将其中 200 株肠道分离菌培养稀释一定倍数后分别注射大蜡螟幼虫。部分筛选结果如图 2A 所示,图 2A 中展示了大蜡螟幼虫存活率高于 80% 的分离菌,接下来使用分离菌进行大蜡螟驯化免疫初筛,初筛结果如图 2B

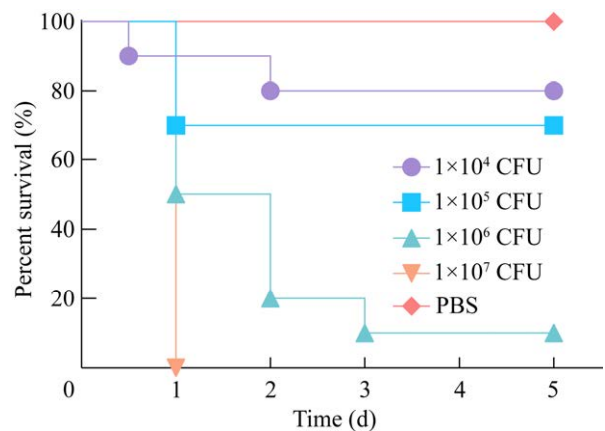


图 1 不同浓度 SS2 感染的大蜡螟幼虫存活率
Figure 1 Survival of *Galleria mellonella* with different concentrations of SS2.

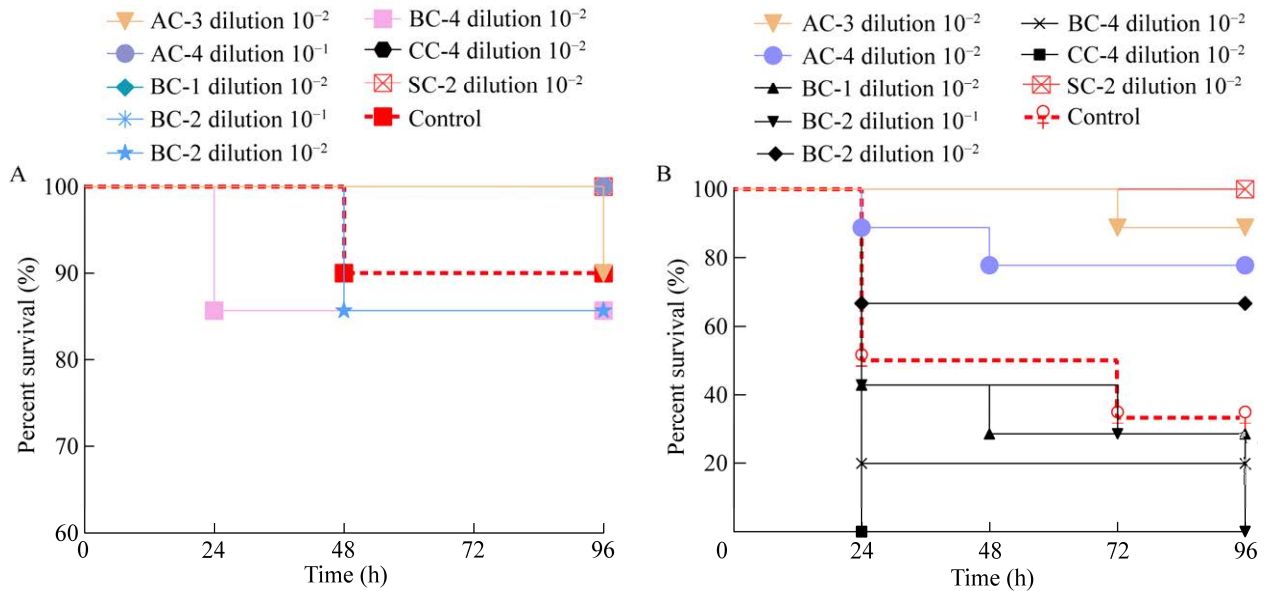


图2 分离菌株 SC-2 毒力测定结果和驯化免疫筛选结果 A: 利用大蜡螟模型筛选低毒力肠道分离菌; B: 利用大蜡螟幼虫模型初步筛选可诱导驯化免疫菌株。

Figure 2 Results of virulence assay and trained immune screening of the isolate SC-2. A: Screening for low virulence intestinal isolates using the *Galleria mellonella* larvae; B: Preliminary screening of inducible trained immune strains using the *Galleria mellonella* larvae.

所示, 相较于其他弱毒肠道分离菌, 注射一定浓度的 SC-2、AC-3、AC-4 菌株培养液进行预先的刺激, 大蜡螟幼虫对抗猪链球菌感染的生存率得到了明显的提升。因此选择保护效果最好的分离菌 SC-2 弱毒株用于后续试验。

2.3 生长曲线

菌株 SC-2 生长曲线如图 3 所示。1-6 h 时, 菌株生长迅速, 代谢旺盛, 为对数生长期; 8-16 h 时, 处于平坦阶段, 为稳定期, 菌体数量变化缓慢。因此, 在后续的实验中, 为了更好地控制实验变量, 选择了 37 °C、180 r/min 的振荡培养时间为 16 h。

2.4 共生菌 SC-2 对大蜡螟幼虫的驯化免疫作用

为了验证共生菌 SC-2 潜在的诱导驯化免疫作用, 使用 SC-2 菌体刺激大蜡螟幼虫, 经过 4 d 的间隔期, 再使用 1×10^6 CFU 的 SS2

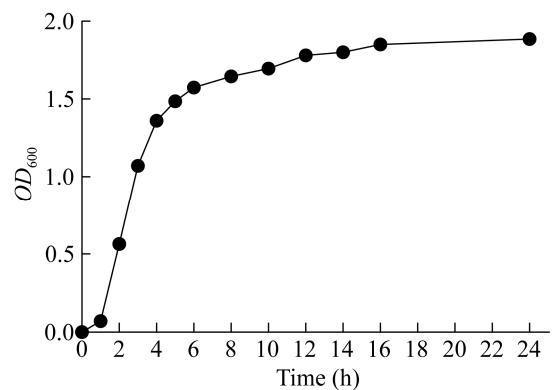


图3 分离菌株 SC-2 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of isolated strain SC-2.

CVCC 606 对大蜡螟幼虫进行第二次刺激后, 每 24 h 对大蜡螟的存活率、体表黑化程度和活动性进行评分记录(图 4, 表 1)。结果如图 4C 所示, 相较于对照组, 注射一定浓度的菌株 SC-2 进行预刺激均可显著提高大蜡螟幼虫抵抗猪链球菌感染的存活率, 大蜡螟幼虫存活率由 50%

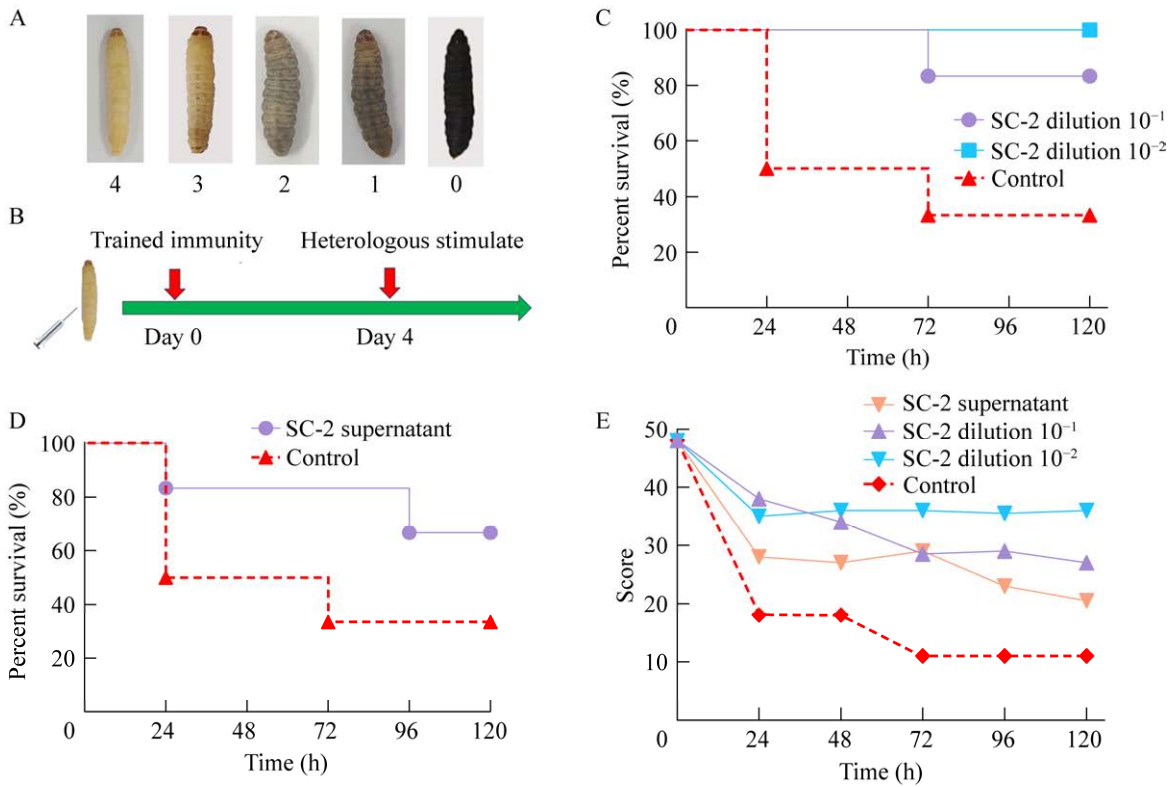


图 4 大蜡螟幼虫的体表颜色评分及共生菌 SC-2 对大蜡螟幼虫的驯化免疫作用 A: 大蜡螟幼虫体表黑化程度, 评价标准见表 1; B: 大蜡螟幼虫驯化免疫程序; C: SC-2 菌体驯化免疫存活情况; D: SC-2 培养上清驯化免疫存活情况; E: 虫体颜色变化与活动性得分。

Figure 4 Body color score and establishment of trained immunity model of *Galleria mellonella*. A: Evaluation criteria for the degree of blackening on the body surface of the larvae of *Galleria mellonella*, see Table 1; B: Training in immunization procedures; C: SC-2 trained immunization survival analysis; D: SC-2 supernatant trained immunization survival analysis; E: Color change and activity score of insect body.

表 1 大蜡螟幼虫活动性评价标准

Table 1 Activity score of *Galleria mellonella* larvae

分类	描述	得分
Category	Description	Score
黑化程度 Melanization	虫体为黑色 Black larvae	0
	虫体为棕色带有黑点 Black spots on brown	1
	虫体为米色且黑点≥3个 ≥3 spots on beige larvae	2
	虫体为米色且黑点≤3个 ≤3 spots on beige larvae	3
	虫体未黑化 No melanization	4
活动性 Activity	不移动 No movement	0
	刺激后微弱移动 Weak movement after stimulation	1
	刺激时移动 Move when stimulated	2
	无刺激地运动 Move without stimulation	4

黑化程度的对应颜色变化见图 4A。

The corresponding color changes for the degree of melanization are shown in figure 4A.

提高至 100%，体现了 SC-2 对大蜡螟幼虫的保护作用。同时 SC-2 的培养上清液也能有效地提高大蜡螟幼虫对猪链球菌感染的抵抗力(图 4D)。皮肤黑化程度(图 4A)和活动性评价(图 4E)显示，在受到猪链球菌感染后，相较于未经驯化的组别，预先注射 SC-2 作为刺激手段能显著提升大蜡螟幼虫体表黑化程度和活跃度的评分。研究结果揭示，共生菌 SC-2 及其培养的上清显示出潜在的驯化诱导能力，并且这种诱导驯化的活性物质由该菌分泌出来。

2.5 16S rRNA 基因的鉴定及系统发育树分析结果

将菌株 SC-2 的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 中已知的菌株序列进行细菌同源性比对，研究结果表明，该菌株与屎肠球菌(*Enterococcus*

faecium)的基因序列具有高达 99%以上的相似程度。使用 MEGA 11 软件的邻接法构建系统发育树，并通过亲缘关系进一步确定分离的菌株 SC-2 是屎肠球菌(图 5)。

2.6 屎肠球菌 SC-2 在小鼠体内驯化免疫程序与驯化免疫方式的选择

为了探究屎肠球菌 SC-2 在小鼠模型上的最佳驯化诱导方式，建立了单次驯化免疫组和两次驯化免疫组(图 6A)，相较于单次驯化免疫组，两次驯化免疫组的小鼠可以更好地抵抗致死量猪链球菌感染(图 6B)。同时，我们还建立了腹腔驯化免疫组和口服驯化免疫组(图 6C)，结果如图 6D 所示，相较于口服驯化免疫组，腹腔注射 SC-2 株驯化免疫组可显著提高小鼠遭受致死量猪链球菌感染后的存活率。

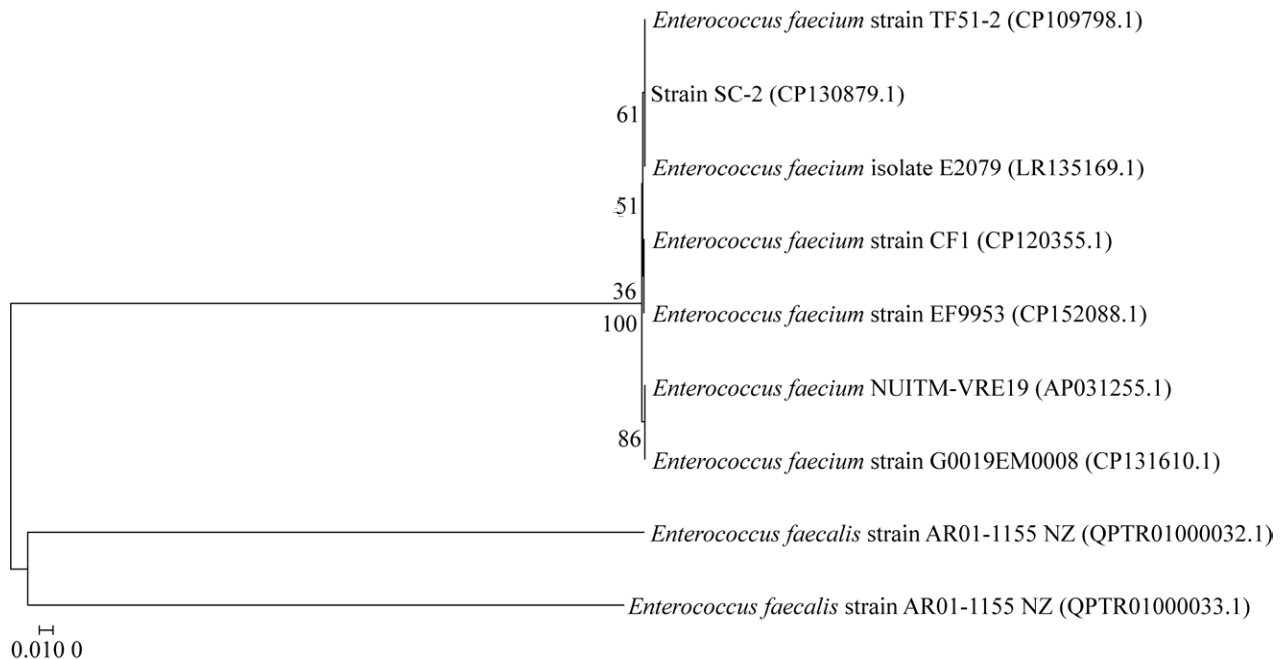


图 5 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 SC-2 的系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号；分支点上的数字表示分支的置信程度；标尺代表进化距离。

Figure 5 Phylogenetic tree of strain SC-2 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses is the GenBank accession number; The number on the branch point indicates the confidence of the branch; The scale represents evolutionary distance.

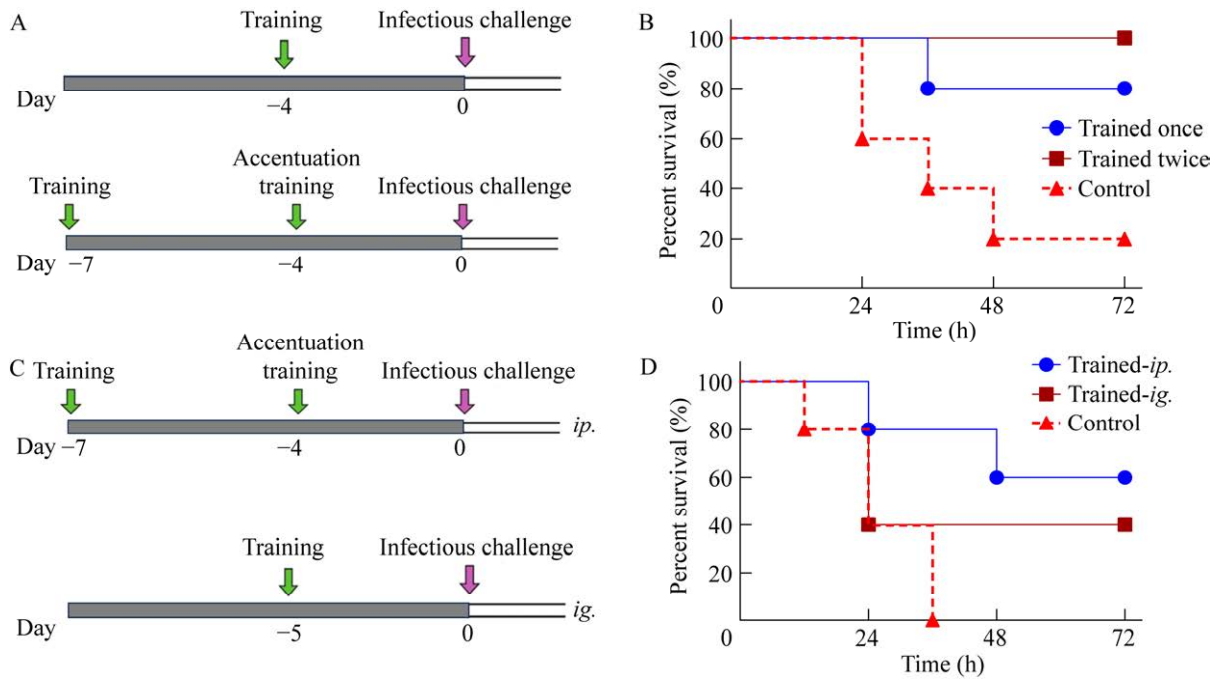


图 6 屎肠球菌 SC-2 在小鼠体内驯化免疫程序与驯化免疫方式的选择 A: 小鼠驯化免疫程序(单次驯化免疫和两次驯化免疫)。绿色箭头表示驯化免疫, 紫色箭头表示攻菌 SS2。B: 不同驯化免疫程序攻菌 SS2 的存活率。C: 小鼠驯化免疫方式[腹腔注射(*ip.*)和灌胃(*ig.*)]。绿色箭头表示驯化免疫, 紫色箭头表示攻菌 SS2。D: 不同驯化免疫方式攻菌 SS2 的存活率。

Figure 6 Selection of the number of *in vivo* domestication immunizations and the mode of domestication immunization of *Enterococcus faecium* SC-2 in mice. A: The number of *in vivo* domestication immunizations: Trained once or twice. The green arrow represents trained immunity and the purple arrow represents attack SS2. B: Survival rate of different number of domestication immunizations to attack bacteria SS2. C: The mode of *in vivo* domestication immunizations [intraperitoneal injection (*ip.*), and intragastric administration (*ig.*)]. The green arrow represents trained immunity and the purple arrow represents attack SS2. D: Survival rate of different mode of domestication immunizations to attack bacteria SS2.

2.7 共生菌 SC-2 对小鼠驯化免疫效果评价

为了进一步验证屎肠球菌 SC-2 在小鼠模型上的驯化诱导作用, 我们对小鼠模型进行体内诱导驯化免疫(图 7A)。通过分析屎肠球菌对小鼠的最小致死量发现, 注射 1.8×10^9 CFU 的屎肠球菌会导致小鼠死亡, 而注射 1.8×10^8 、 1.8×10^7 、 1.8×10^6 CFU 的屎肠球菌不会影响小鼠的存活和体重变化(图 7B 和 7C), 最终选择 1.8×10^8 CFU 作为屎肠球菌驯化免疫量。从图 7D 可以看出, 相较于未经驯化的组别, 首次使用

屎肠球菌进行了 1.8×10^8 CFU 的驯化注射, 间隔 4 d 加强驯化免疫注射 1.8×10^7 CFU 的屎肠球菌, 该方法能有效地提升小鼠对致死量猪链球菌感染的抵抗能力和生存率。在感染猪链球菌 72 h 后, 对每组小鼠进行剖检, 分别检测血、肝、脾、肺、肾组织的菌载量, 结果如图 7E 和 7F 所示, 注射屎肠球菌可有效减少组织中细菌含量。同时通过流式细胞术检测驯化免疫前后小鼠外周血、肺脏中的中性粒细胞与巨噬细胞变化发现(图 8A–8D), 注射 SC-2 进行预刺激可以显著提高小鼠血液、肺脏中的中性粒细胞和

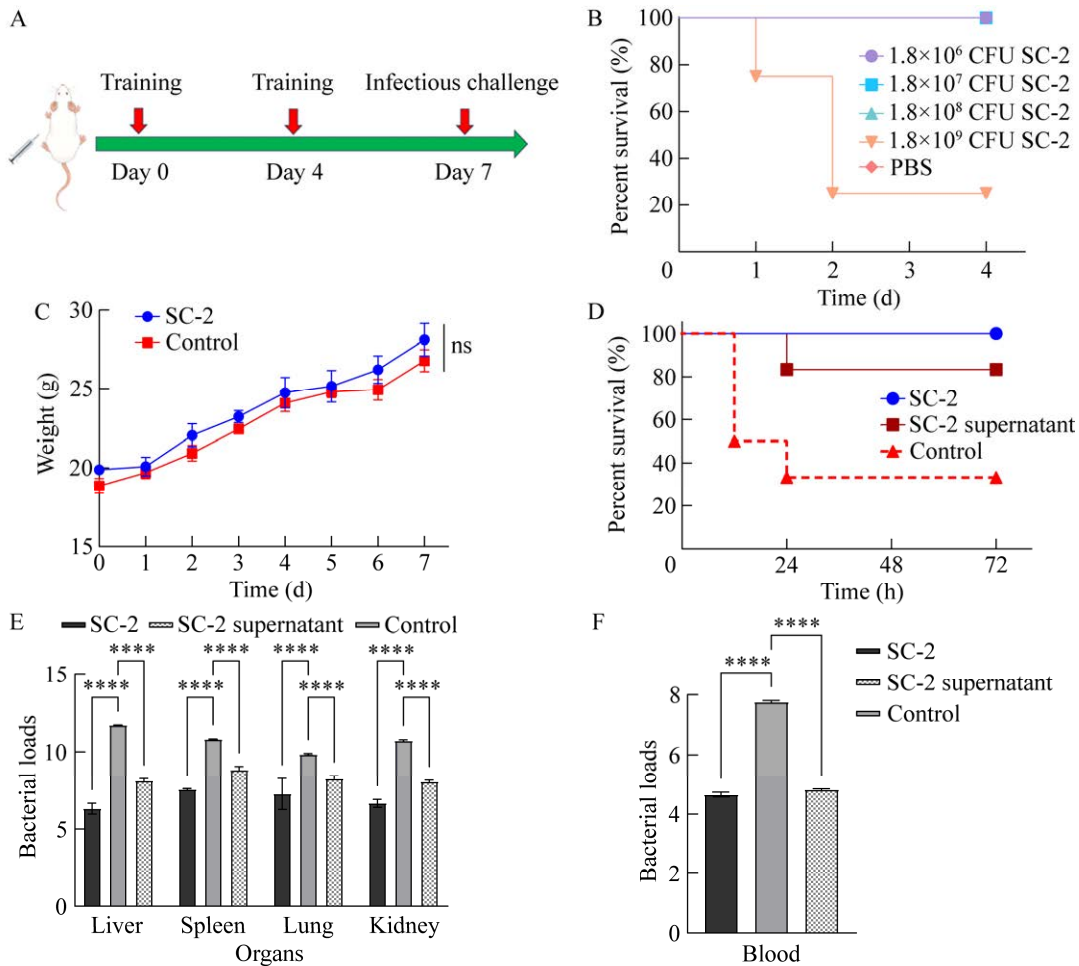


图 7 屎肠球菌 SC-2 对小鼠的驯化免疫效果评价 A: 小鼠驯化免疫模型程序; B: 屎肠球菌 SC-2 安全性评价(存活率分析); C: 驯化免疫期间小鼠体重变化(ns: 无显著差异); D: 小鼠驯化免疫模型的存活率分析; E: 攻菌 SS2 72 h 小鼠肝、脾、肺、肾组织菌载量(****: $P < 0.0001$); F: 攻菌 SS2 72 h 小鼠血液菌载量(****: $P < 0.0001$)。

Figure 7 Evaluation of the immunization effect of *Enterococcus faecium* SC-2 on mice by trained. A: Mouse domestication immunization model program; B: Safety evaluation of *Enterococcus faecium* SC-2: Survival analysis; C: Changes in body weight of mice during training immunization (ns: No significant difference); D: Survival rate analysis of trained immunity model of mice; E: Bacterial load in liver, spleen, lung and kidney tissues of mice attacked with SS2 for 72 h (****: $P < 0.0001$); F: Bacterial load in blood of mice attacked with SS2 for 72 h (****: $P < 0.0001$).

巨噬细胞占比, 增强天然免疫反应, 从而保护小鼠免受猪链球菌感染。

3 讨论

驯化免疫这一概念的出现打破了人们对传

统免疫记忆的认知, 天然免疫细胞受到初次刺激后进行功能性重编程, 从而增强对二次刺激的免疫应答。研究表明接种卡介苗可诱导造血干细胞分化, 进而诱导驯化免疫^[11]。此外, 许多类型细胞都可以被诱导驯化免疫, Chaumond

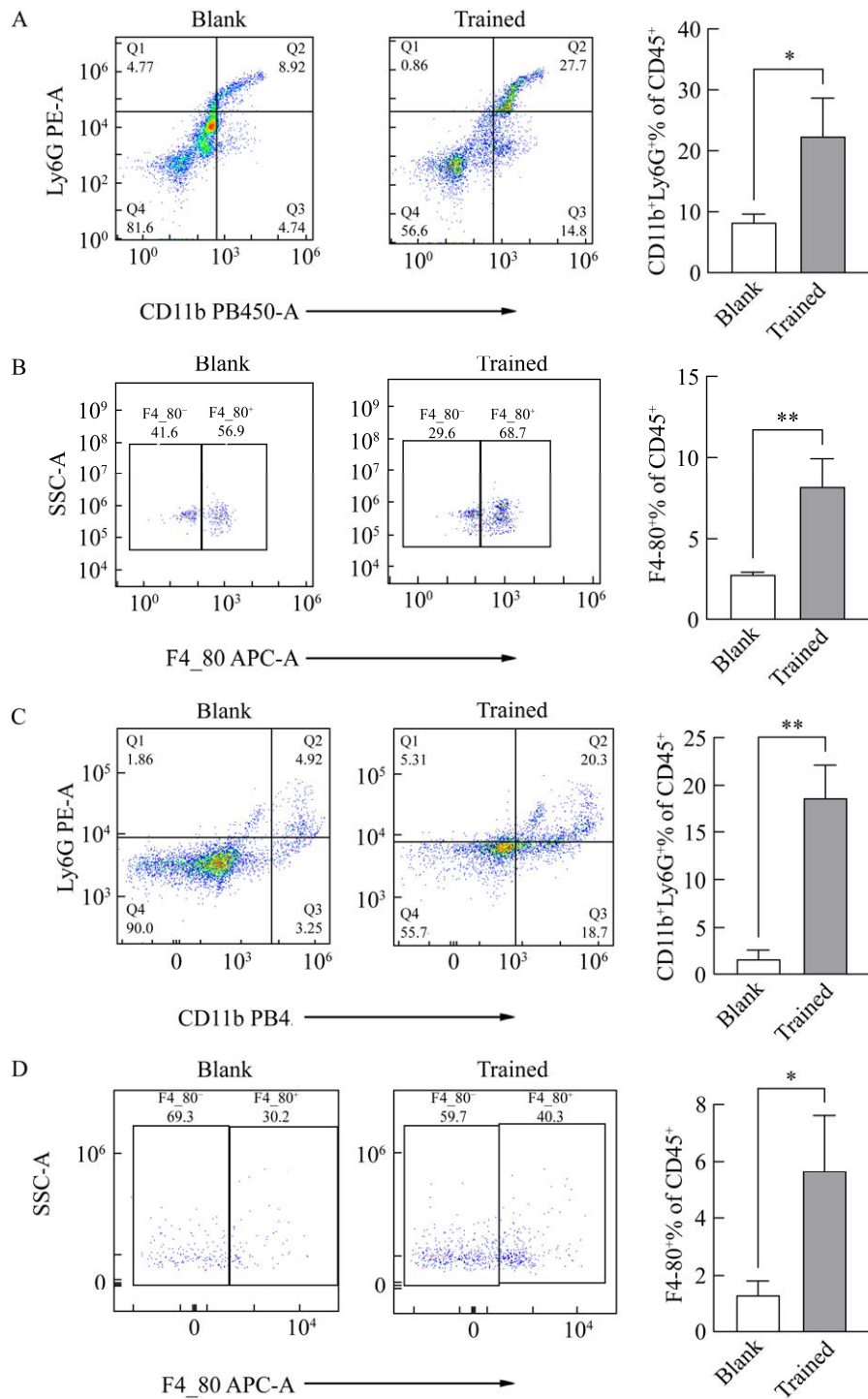


图 8 驯化免疫后小鼠外周血、肺脏中中性粒细胞与巨噬细胞变化情况 A: 小鼠外周血中性粒细胞变化; B: 小鼠外周血巨噬细胞变化; C: 小鼠肺脏中性粒细胞变化; D: 小鼠肺脏巨噬细胞变化。

Figure 8 Changes in neutrophils and macrophages in peripheral blood and lungs of mice after training immunity. A: Neutrophil changes in peripheral blood of mice; B: Macrophage changes in peripheral blood of mice; C: Neutrophil changes in the lung of mice; D: Macrophage changes in the lung of mice. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

等^[12]证明了非免疫细胞,如成骨样细胞也可以产生天然免疫记忆,改善金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)引起的感染。驯化免疫作为一种新型免疫调控方式,其对于疾病治疗的潜力得到了广泛的关注。已有研究发现多动物链球菌(*Streptococcus pyogenes*)可诱导巨噬细胞免疫驯化,调节宿主免疫反应^[13]。而我们研究发现,屎肠球菌同样可以诱导机体产生驯化免疫,驯化免疫后显著提高小鼠血液、肺脏中的天然免疫细胞占比,增强固有免疫反应,加速清除猪链球菌感染,降低感染后组织菌载负荷,提高小鼠抵抗猪链球菌感染后的存活率,表明宿主通过驯化免疫提前获得免疫记忆并在后续感染中获得更强更迅速的免疫反应,是一种全新的抗感染手段。同时在我们的研究中,观察到经过2次SC-2株驯化的小鼠能够更好地抵抗猪链球菌感染。不同的研究表明 β -葡聚糖驯化诱导的保护效应可以是一次驯化诱导^[14],也可以是两次驯化诱导^[11],造成这种差异诱导的原因可能是即使是同一种病原体,不同的驯化次数也会导致宿主从病原体感染中恢复所需要的免疫系统激活程度不一致。

驯化免疫模型的建立对研究驯化免疫有着不可或缺的作用。大蜡螟是一种研究微生物感染的替代模型^[15]。截至目前,在PubMed平台上已经发布了超过3 639篇关于大蜡螟幼虫的研究论文,这表明大蜡螟幼虫的感染模型已经得到广泛的社会认可(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Galleria+mellonella>)。另外,虽然大蜡螟缺乏适应性免疫应答,但它的天然免疫应答与脊椎动物的免疫应答具有显著相似性,幼虫可在37℃环境下与哺乳动物体温相当,适合检测和分析多种病原体^[16-17]。大蜡螟幼虫的黑化过程及其速度会因病原体的毒性和接种量的差异而有所不同。此外,大蜡螟幼虫还具有

售价低、使用简单、生命周期短等优势,这些明显的优点使其成为研究驯化免疫模型的最佳选择。在本项研究中借鉴了大蜡螟评分标准,并以大蜡螟幼虫的死亡情况、虫体颜色变化和活跃度作为评估驯化免疫模型的关键指标,从而成功地构建了一个驯化免疫的大蜡螟模型,为进一步研究驯化免疫奠定基础。

屎肠球菌是肠球菌属的一种革兰氏阳性菌,呈短链、成对或单球分布,属于人和动物胃肠道的共生菌^[18]。屎肠球菌可分泌细菌素、酶和多种次级代谢产物,具有很强的抗菌活性和免疫调节能力,同时也是相关部门批准使用的益生菌菌种之一^[19]。作为一种抗逆性较强的益生菌,屎肠球菌在胃肠道中也能有较高的存活率,不仅在饲料使用中能提高仔猪的免疫力和生长性能,还能减轻仔猪肠道损伤,对哺乳动物及家禽养殖方面有重要意义^[20-22]。研究人员发现屎肠球菌预处理的小鼠腹腔巨噬细胞可以通过分泌更高水平的炎症因子来提高对某些微生物的免疫应答^[23-24],此外,近年研究表明,屎肠球菌的细胞壁提取物也可以刺激促炎和抗炎细胞因子的产生^[25]。同时,程万鹏等^[26]从猪粪便中分离出一株产抗猪链球菌细菌素产生菌屎肠球菌,这些研究表明细菌及其某些成分在免疫调节方面具有重要作用,为后续屎肠球菌SC-2诱导驯化免疫活性物质的筛选提供了帮助。我们利用大蜡螟模型从猪肠道菌群中筛选出一株具有驯化免疫作用的屎肠球菌,然而仍不清楚具有驯化免疫功能的具体物质。因此,未来的研究应进一步鉴定屎肠球菌SC-2诱导驯化免疫的具体物质并揭示其作用机制。

4 结论

本研究利用大蜡螟幼虫筛选肠道菌群中的弱毒株,随后建立大蜡螟驯化免疫模型,成功

筛选出一株可诱导驯化免疫的尿肠球菌 SC-2, 并通过小鼠模型进一步证明其对小鼠抵抗猪链球菌感染的保护效果。本研究为从驯化免疫角度为免疫调控新成分的挖掘提供了基础。

REFERENCES

- [1] ZHOU X, AFKHAMI S, BAVANANTHASIVAM J, FRITZ DK, D'AGOSTINO MR, VASEGHISHANJANI M, YAO YS, JEYANATHAN M. Innate immune memory of tissue-resident macrophages and trained innate immunity: re-vamping vaccine concept and strategies[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 108(3): 825-834.
- [2] COVIÁN C, FERNÁNDEZ-FIERRO A, RETAMALDÍAZ A, DÍAZ FE, VASQUEZ AE, LAY MK, RIEDEL CA, GONZÁLEZ PA, BUENO SM, KALERGIS AM. BCG-induced cross-protection and development of trained immunity: implication for vaccine design[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2806.
- [3] NETEA MG, QUINTIN J, van der MEER JWM. Trained immunity: a memory for innate host defense[J]. *Cell Host & Microbe*, 2011, 9(5): 355-361.
- [4] GOODRIDGE HS, AHMED SS, CURTIS N, KOLLMANN TR, LEVY O, NETEA MG, POLLARD AJ, van CREVEL R, WILSON CB. Harnessing the beneficial heterologous effects of vaccination[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(6): 392-400.
- [5] TSILIKA M, TAKS E, DOLIANITIS K, KOTSAKI A, LEVENTOGIANNIS K, DAMOULARI C, KOSTOULA M, PANETA M, ADAMIS G, PAPANIKOLAOU I, STAMATELOPOULOS K, BOLANOU A, KATSAROS K, DELAVINIA C, PERDIOS I, PANDI A, TSIAKOS K, PROIOS N, KALOGIANNI E, DELIS I, et al. ACTIVATE-2: a double-blind randomized trial of BCG vaccination against COVID-19 in individuals at risk[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 873067.
- [6] RODRIGUEZ D, GOULART C, PAGLIARONE AC, SILVA EP, CUNEGUNDES PS, NASCIMENTO IP, BORRA RC, DIAS WO, TAGLIABUE A, BORASCHI D, LEITE LCC. *In vitro* evidence of human immune responsiveness shows the improved potential of a recombinant BCG strain for bladder cancer treatment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1460.
- [7] 徐文龙. PepO 蛋白诱导宿主保护性训练免疫的效应及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学博士学位论文, 2024.
XU WL. Study on the effect and mechanism of PepO protein inducing host protective training immunity[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Chongqing Medical University, 2024 (in Chinese).
- [8] NEGI S, DAS DK, PAHARI S, NADEEM S, AGREWALA JN. Potential role of gut microbiota in induction and regulation of innate immune memory[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2441.
- [9] VELIKOVA N, KAVANAGH K, WELLS JM. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Streptococcus suis*[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 291.
- [10] TSAI CJY, LOH JMS, PROFT T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing[J]. *Virulence*, 2016, 7(3): 214-229.
- [11] MITROULIS I, RUPPOVA K, WANG BM, CHEN LS, GRZYBEK M, GRINENKO T, EUGSTER A, TROULLINAKI M, PALLADINI A, KOURTZELIS I, CHATZIGEORGIOU A, SCHLITZER A, BEYER M, JOOSTEN LAB, ISERMANN B, LESCHE M, PETZOLD A, SIMONS K, HENRY I, DAHL A, et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity[J]. *Cell*, 2018, 172(1/2): 147-161.e12.
- [12] CHAUMOND E, PERON S, DANIEL N, Le GOUAR Y, GUÉDON É, WILLIAMS DL, Le LOIR Y, JAN G, BERKOVA N. Development of innate immune memory by non-immune cells during *Staphylococcus aureus* infection depends on reactive oxygen species[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1138539.
- [13] BRANDI P, CONEJERO L, CUETO FJ, MARTÍNEZ-CANO S, DUNPHY G, GÓMEZ MJ, RELAÑO C, SAZ-LEAL P, ENAMORADO M, QUINTAS A, DOPAZO A, AMORES-INIESTA J, del FRESNO C, NISTAL-VILLÁN E, ARDAVÍN C, NIETO A, CASANOVAS M, SUBIZA JL, SANCHO D. Trained immunity induction by the inactivated mucosal vaccine MV130 protects against experimental viral respiratory infections[J]. *Cell Reports*, 2022, 38(1): 110184.
- [14] CHENG SC, QUINTIN J, CRAMER RA, SHEPARDSON KM, SAEED S, KUMAR V, GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ, MARTENS JHA, RAO NA, AGHAJANIREFAH A, MANJERI GR, LI Y, IFRIM DC, ARTS RJW, van der VEER BMJW, DEEN PMT, LOGIE C, O'NEILL LA, WILLEMS P, van de VEERDONK FL, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity[J]. *Science*, 2014, 345(6204): 1250684.
- [15] 都心怡, 高宇, 骆雪月, 杨勇军, 刘真真. 多动物链球菌诱导巨噬细胞驯化免疫活性的研究[J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(8): 1645-1650.
DU XY, GAO Y, LUO XY, YANG YJ, LIU ZZ. The study on the immunomodulatory activity of macrophage trained induced by *Streptococcus pluranimalium*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2024, 44(8): 1645-1650 (in Chinese).
- [16] ASAI M, LI YW, NEWTON SM, ROBERTSON BD, LANGFORD PR. *Galleria mellonella*-intracellular bacteria pathogen infection models: the ins and outs[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2023, 47(2): fuad011.
- [17] MÉNARD G, ROUILLON A, CATTOIR V, DONNIO PY. *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: past, present and future[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 782733.
- [18] CUTULI MA, PETRONIO PETRONIO G, VERGALITO F, MAGNIFICO I, PIETRANGELO L,

- VENDITTI N, Di MARCO R. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model hosts: new developments in antibacterial strategies and novel drug testing[J]. *Virulence*, 2019, 10(1): 527-541.
- [19] ANJUM J, ZAIDI A, BARRETT K, TARIQ M. A potentially probiotic strain of *Enterococcus faecalis* from human milk that is avirulent, antibiotic sensitive, and nonbreaching of the gut barrier[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(2): 158.
- [20] HUSSAIN A, AKRAM S, AHMAD D, REHMAN M, AHMED A, ALI SA. Molecular assessment and validation of the selected enterococcal strains as probiotics[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10163-6>.
- [21] MISHRA AK, GHOSH AR. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* AG5 isolated from wistar rat, demonstrating adherence to HCT 116 cells and gastrointestinal survivability[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(3): 435-445.
- [22] BOEDER AM, SPILLER F, CARLSTROM M, IZÍDIO GS. *Enterococcus faecalis*: implications for host health[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2024, 40(6): 190.
- [23] MOLINA MA, DÍAZ AM, HESSE C, GINTER W, GENTILINI MV, NUÑEZ GG, CANELLADA AM, SPARWASSER T, BEROD L, CASTRO MS, MANGHI MA. Immunostimulatory effects triggered by *Enterococcus faecalis* CECT7121 probiotic strain involve activation of dendritic cells and interferon-gamma production[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127262.
- [24] CASTRO MS, MOLINA MA, Di SCIULLO P, AZPIROZ MB, LEOCATA NIETO F, STERÍN-SPEZIALE NB, MONGINI C, MANGHI MA. Beneficial activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121 in the anti-lymphoma protective response[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4): 1234-1243.
- [25] SPARO M, DELPECH G, BATISTTELLI S, BASUALDO JÁ. Immunomodulatory properties of cell wall extract from *Enterococcus faecalis* CECT7121[J]. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2014, 18(5): 551-555.
- [26] 程万鹏, 尚楠, 张金兰, 郝林. 一种抗猪链球菌细菌素的生物学特性研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(7): 215-219.
- CHENG WP, SHANG N, ZHANG JL, HAO L. Biological characteristics of bacteriocin against *Streptococcus suis* produced by *Enterococcus faecium* isolated from fresh feces of pig[J]. *Food Science*, 2009, 30(7): 215-219 (in Chinese).