

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質誘發細胞分化機制及其應
用於下痢防治之研究(1/2)

Mechanism and Application of *Escherichia coli* Heat-labile
Enterotoxin B Subunit in Cell Differentiation and Diarrhea
Prevention

計畫編號：NSC90-2313-B-039-002

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：侯庭鏞 中國醫藥學院中醫所

共同主持人：蔡忠昌 中國醫藥學院生理學科

計畫參與人員：項千芸 中國醫藥學院微生物學科

吳世祿 中國醫藥學院生化學科

一、中文摘要

大腸桿菌下痢症主要是由大腸桿菌產生的忌熱性腸毒素 (heat-labile enterotoxin; LT) 所造成的。LT 由 A 及 B 次單位蛋白質 (LTA; LTB) 組成，LTB 與腸上皮受體 GM1 ganglioside 結合後，LTA 方插入細胞膜中，干擾 G 蛋白質，使水及離子流失，造成下痢，所以 LTB 能否與腸上皮特定受體結合，為大腸桿菌下痢症最主要的致病步驟。因此本計畫以大腸桿菌 LTB 為基礎，設計一預防及有效治療腸毒素下痢的疫苗及藥物，並進而探討毒素與細胞之關係，以拓展 LTB 在其他生物醫學之應用。經由聚合鈣連鎖反應，我們可增殖出長約 1147 bp 的 LT 基因，並在選殖至表現載體後，於三小時內，自 1 公升的菌液中，純化出 1.3 公克具功能性的重組型 LT 及 LTB。LT 先經 GM1 酵素連結免疫吸附試驗及西方墨點法分析，證實重組型 LT 仍具有與 ganglioside 結合的能力及仍保有其抗原性。進一步將重組型 LTB 應用在下列三部份的實驗中：一、LTB 作為大腸桿菌疫苗可行性之探討。LTB 已利用口服及注射方式免疫老鼠，擬於免疫流程結束後收集血清、肺洗液及腸洗液，再藉由酵素連結免疫吸附試驗偵測 IgA 及 IgG 的濃度，以評估 LTB 引發黏膜性及全身性免疫反應的

效果；二、抗腸毒素下痢分子模式之建立及其應用於藥物搜尋之研究。我們利用 LTB 與 GM1 接合為基礎，設計 competitive binding assay，已初步搜尋 101 種中藥，發現目前應用在治療下痢的大黃，具有顯著抑制 LTB 與 GM1 結合的能力，進一步我們擬以此模式搜尋其他具有抗下痢潛能的中藥；三、LT 與細胞相互關係之研究。我們利用實驗室已構築好的重組細胞株，觀察 LT 及 LTB 對轉錄因子 activator protein 1 (AP-1) 及 nuclease factor- κ B (NF- κ B) 活性的影響，初步的結果顯示，LTB 似乎可以藉著調控 NF- κ B 的活性，影響免疫反應的發生。進一步，我們擬探討 LT 及 LTB 影響轉錄因子活性的訊息傳導路徑，並探討這些調控機制所代表的生物意義。本計畫的執行，除了探討利用 LTB 作為疫苗的可行性外，也發展出以 LTB 與 GM1 接合為基礎的抗下痢藥物篩選模式，並藉助 LT 對轉錄因子的影響，瞭解毒素與細胞的相互作用。

關鍵詞：忌熱性腸毒素、下痢、疫苗、藥物、訊息傳導

Abstract

Heat-labile enterotoxin (LT) from enterotoxigenic *Escherichia coli* is the major

virulence factor of piglet's diarrhea. LT is composed of a single A subunit (LTA) and five identical B subunits (LTB). After being released into the jejunum by the bacteria, the LTB recognizes the oligosaccharide portion of G_{M1} ganglioside molecules on the surface of epithelial cells, LTA sequentially ADP-ribosylated the Gs protein and subsequently results in a massive efflux of fluids from intestinal cells. Thus, the binding of G_{M1} by LTB is the initial step of pathogenesis. In order to develop the anti-enterotoxic diarrhea drug and vaccine, the LT gene was amplified by polymerase chain reaction. LT was further expressed by prokaryotic expression system and purified by immobilized D-galactose resin. The amount of purified protein was recovered approximately 1.3 g from 1 L culture in a 3-h operation. The recombinant LT exhibited a similar antigenicity and G_{M1} -binding ability as wild-type LT did. The recombinant LTB was further immunized to mice by an oral route. In order to screen the anti-diarrhea drugs, the LTB/ G_{M1} -based competitive assay was developed. Our results showed that *Rheum officinale*, which was used to treat diarrhea in traditional Chinese medicine, exhibited the competitive effect with LTB. Further study showed that LT and LTB activated the nuclear factor- κ B (NF- κ B), which played an important role in inflammation. Taken together, the better understanding of the LTB could provide a better way in developing the vaccine, bioadjuvant, immune modulator, and drug delivery system in the future.

Keywords: Heat-labile Enterotoxin, Diarrhea, Vaccine, Drug, Signal Transduction

二、緣由與目的

豬隻的下痢症是養豬業界一種相當重要的疾病，其中大腸桿菌是造成新生仔豬及哺乳期仔豬下痢最重要的病因。腸毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*) 在吸附到小腸黏膜上皮後，可產生腸毒素，導致小腸上皮細胞內水份及電解質的

流失，最後造成下痢。腸毒性大腸桿菌所產生的腸毒素主要為熱不穩定性腸毒素 (heat-labile enterotoxin; LT)，LT 是一個高分子量的複合物，由一個 A 次單位 (LTA) 及五個 B 次單位 (LTB) 以非共價鍵結的方式組成，其中 LTB 對存在於所有細胞表面的 glycosphingolipid— G_{M1} ganglioside (Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3))Gal(β 1-4)Glc(β 1-1)ceramide) 具有親合性 [1]，而 LTA 具有 ribosyltransferase 的活性，在進入腸細胞質後，會將 Gs α ribosylation，使 Gs α 失去 GTPase 的活性，進而活化 adenylate cyclase，使得 cyclic AMP (cAMP) 增加。增加的 cAMP 會活化 protein kinase A，將 Cl⁻ channel 磷酸化，而使得氯離子及水分子由腸細胞中流出，造成下痢的發生 [2]。

LT 除了具有作為大腸桿菌疫苗的潛能外，另外一個重要的生物功能是可充當口服疫苗的重要佐劑成份。LTB 調節免疫反應的機制，可能是 LTB 與接受器結合後，會導致白血球不同的效應。LTB 與接受器結合後，會誘發巨噬細胞及淋巴球 CD25(IL-2R α) 的表現，這種誘發與 CD8⁺ T 細胞的 apoptosis、B 細胞表面 MHC class II 及 CD4⁺ T 細胞 CD40L (gp39) 的大量表現有關。CD8⁺ T 細胞數量的下降，會造成 IFN- γ 減少，而抑制 Th1-type cytokine 的釋放，至於 T 與 B 細胞之間的作用，會導致 B 細胞 B7、CD4、ICAM-1 及 CD4⁺ T 細胞 CD40L 的增加，因而增加 Th2-type cytokine 的產生 [3]。

為了能有效控制下痢症，同時為了研究細菌毒素與細胞之相互關係，本計畫以基因工程方法選殖大腸桿菌 LT 基因、大量產製並純化其蛋白質，進一步進行蛋白質特性分析及免疫反應的研究。因為 LTB 能否與腸上皮特定受體結合，為大腸桿菌下痢症最主要的致病步驟，因此本計畫以大腸桿菌 LTB 為基礎，設計一預防及有效治療腸毒素下痢的疫苗及藥物，並進而探討毒素與細胞之關係，以拓展 LTB 在其他生物醫學之應用。

三、結果與討論

(一) 大腸桿菌 LT 基因及其次單位基因之

選殖、表現及功能性分析

取腸毒性大腸桿菌於 37°C 增殖培養後，萃取其質體 DNA，並以位於 LT 基因 5' 端及 3' 端的一對引子（5'-CGCGGATCCCGATGAAAAATATAAC-3'；5'-ACTGCAGCTAGTTTTTCATACTGATTGCC-3'），進行聚合鏈鎖反應。經增殖後的片段，利用設計於引子上的酵素 *Bam*HI 及 *Xho*I 切割，選殖到原核表現載體 pET-28(+) 中，成為 pET-LT。為了取得大量而且純度很高的 LT，我們利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的大量產製。將 pET-LT 送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 中，這一株大腸桿菌內帶有一個嵌在染色體上的 T7 RNA 聚合鏈基因，其表現受 lacUV5 啟動子控制，因此可以用異丙基-β-D-硫代半乳糖二（isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside；IPTG）誘導 T7 RNA 聚合鏈的表現，進而大量轉錄 LT 基因，產生 RNA 及進一步製造蛋白質。在經 IPTG 誘導的狀況下，我們可以將細菌打破，取含有忌熱性腸毒素的上清液，利用 immobilized D-galactose 親合性色層分析樹脂加以純化。在三小時的操作時間內，可自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之 LT，其純度至少 99%。

進一步為了瞭解重組型 LT 的抗原性及功能方面是否與野外型相同，我們進行西方墨點法及 GM1 酵素連結免疫吸附試驗分析。將野外型與重組型 LT 利用蛋白質電泳分析後，轉移至濾紙上，以野外型 LT 所產製的抗體偵測，再利用標示酵素的二次抗體及受質加以呈色，結果發現抗體可以成功地偵測到野生型及重組型 LT，顯示重組型 LT 仍保持其抗原性。另外，利用 GM1 酵素連結免疫吸附試驗測定並比較野外型與重組型 LT 結合 GM1 的能力，結果顯示隨著蛋白質濃度的增加，吸光值也隨之增加，顯示野外型與重組型 LT 都具備與 GM1 結合的能力，而且結合的動力學也非常相似。因此，利用大腸桿菌大量產製的重組型 LT 具備與野外型 LT 相同的特性，並具有容易生產、容易純化的特性，可以應用於以下的研究。

(二) LTB 作為大腸桿菌疫苗可行性之探

討

因為 LTB 能否與腸上皮特定受體結合，為大腸桿菌下痢症最主要的致病步驟，因此我們將 LTB 以口服及注射方式免疫小白鼠，觀察是否可以誘發小白鼠產生黏膜性或全身性免疫反應，並產生良好的保護性。在本項研究中，我們已將小白鼠區分為三組進行免疫注射，實驗組為 LTB 口服組、陽性對照組為 LTB 經傳統油質佐劑混合後之針劑注射組、陰性對照組為生理食鹽水口服組。實驗組每隻小白鼠給予 12 μg (約 50 μl) LTB；陰性對照組，每隻小白鼠給予約 50 μl 生理食鹽水；陽性對照組，每隻小白鼠注射 10 μg (約 100 μl) LTB 與油質佐劑混合之膠體粒子。每組共免疫兩次，間隔為 2 週，擬在最後一次免疫後 2 週，將動物犧牲，收集血清、肺洗液及腸洗液，再藉由酵素連結免疫吸附試驗偵測 IgA 及 IgG 的濃度，以評估 LTB 引發黏膜性及全身性免疫反應的效果。

(三) 腸毒素下痢分子模式之建立及其應用於藥物搜尋之研究

因為 LTB 能否與腸上皮特定受體結合，為大腸桿菌下痢症最主要的致病步驟，因此我們利用 LTB 與 GM1 接合為基礎，設計 competitive binding assay，搜尋可能抑制下痢之中藥。在我們初步搜尋的 101 種自順天堂分讓的中藥後，發現芍藥、山茱萸、烏梅、大黃等中藥材具有可以阻斷 LTB 與 GM1 結合的能力。因為大黃為中醫治療下痢的首選用藥，因此證明本項實驗模式確實可以作為抗下痢藥物的篩選系統，此外也可以提供傳統藥材分子作用機制上合理的解釋。進一步我們擬將此模式大規模應用在抗下痢中藥的篩選方面，探討中藥結構與具抗下痢潛能的相關性，以提供抗下痢藥物開發的結構雛形，並將搜尋出來的藥物，利用動物試驗加以驗證，以提供臨床用藥的參考。

(四) 大腸桿菌 LT 與細胞相互關係之研究

目前認為 LTB 調節免疫反應的機制，可能是 LTB 與接受器結合後，導致不同白血球的增殖或 apoptosis，而引發 Th1 或 Th2-type cytokine 的釋放。當細胞受到外界刺激時，可藉由 mitogen-activated protein

kinase (MAPK) signal transduction pathway 活化轉錄因子 activator protein 1 (AP-1)，進而調控細胞的生長 [4]，此外，MAPK 也可以活化另外一類的轉錄因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B)，而導致發炎的產生 [5]。因此，我們利用實驗室已構築好的重組細胞株，觀察 LT 及 LTB 對 AP-1 及 NF- κ B 活性的影響。結果顯示，LT 及 LTB 僅會些微的影響 AP-1 的活性，但兩者皆會活化 NF- κ B 的活性，其中又以 LTB 活化的效果最為顯著。此外，LTB 活化 NF- κ B 的能力隨濃度增加而增加，因此由這些初步的結果顯示，LTB 似乎可以藉著調控 NF- κ B 的活性，影響免疫反應的發生。進一步，我們擬探討 LT 及 LTB 影響轉錄因子活性的訊息傳導路徑，並探討這些調控機制所代表的生物意義。

四、計畫成果自評

(一) 研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況

本年度計畫已達成預期進度，並已完成下列四項預定目標：

(1) 大腸桿菌 LT 基因及其單位基因之選殖、表現及功能性分析

我們已選殖大腸桿菌 LT 基因，並利用原核表現系統，在三小時的操作時間內，自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之 LT，其純度至少 99%。重組型 LT 進一步利用西方墨點法及 GM1 酵素連結免疫吸附試驗與野外型 LT 互相比較，發現我們所產製的重組型 LT 具備與野外型 LT 相同的抗原性及功能，並具有容易生產、容易純化的特性，可以應用於以下的研究。

(2) LTB 作為大腸桿菌疫苗可行性之探討

我們已將小白鼠區分為三組進行免疫注射，實驗組為 LTB 口服組、陽性對照組為 LTB 經傳統油質佐劑混合後之針劑注射組、陰性對照組為生理食鹽水口服組。每組共免疫兩次，間隔為 2 週，擬在最後一次免疫後 2 週，將動物犧牲，收集血清、肺洗液及腸洗液，再藉由酵素連結免疫吸附試驗偵測 IgA 及 IgG 的濃度，以評估 LTB 引發黏膜性及全身性免疫反應的效果。

(3) 腸毒素下痢分子模式之建立及其應用於藥物搜尋之研究

我們利用 LTB 與 GM1 接合為基礎，設計 competitive binding assay，搜尋可能抑制下痢之中藥。在我們初步搜尋的 101 種自順天堂分讓的中藥後，發現芍藥、山茱萸、烏梅、大黃等中藥材具有可以阻斷 LTB 與 GM1 結合的能力。因為大黃為中醫治療下痢的首選用藥，因此證明本項實驗模式確實可以作為抗下痢藥物的篩選系統，此外也可以提供傳統藥材分子作用機制上合理的解釋。

(4) 大腸桿菌 LT 與細胞相互關係之研究

我們利用實驗室已構築好的重組細胞株，觀察 LT 及 LTB 對 AP-1 及 NF- κ B 活性的影響。由初步的結果顯示，LTB 似乎可以藉著調控 NF- κ B 的活性，影響免疫反應的發生。進一步，我們擬探討 LT 及 LTB 影響轉錄因子活性的訊息傳導路徑，並探討這些調控機制所代表的生物意義。

(二) 研究成果的學術或應用價值

本計畫的研究成果，在學術及醫學應用上，可成功開發腸毒素疫苗及抗腸毒素下痢藥物，並建立抗下痢藥物篩選技術平台，快速進行抗下痢藥物的大量篩選，從中尋找有效抑制下痢的藥物。對於參與本計畫的人員，將可獲得良好的分子生物學方面的知識，並且獲得實務的遺傳工程技術方面的操作經驗，為國家未來生物科技的發展培育不可多得的人才。

(三) 是否適合在學術期刊發表或申請專利

本研究相關成果已投稿至 Vaccine [6]。

五、參考文獻

- [1] Holmgren, J., Lycke, N., and Czerkinsky, C. 1993. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. Vaccine 11: 1179-1184.
- [2] Hirst, T.R. 1995. In "Bacterial Toxins and Virulence Factors in Disease", Moss, J., Iglewski, B., Vaughan, M., and Tu, A.T., eds, pp.123-184, Marcel Dekker.
- [3] Williams, N.A., Hirst, T.R., and Nashar, T.O. 1999.

Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immun. Today* 20: 95-101.

- [4] Lewis, T.S., Shapiro, P.S., and Ahn, N.G. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74: 49-139.
- [5] Baeuerle, P.A., and Baichwal, V.R. 1997. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* 65: 111-137.
- [6] Hsiang, CY, Lai, IL, and Ho, TY. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin induced the humoral response of *Actinobacillus pleuropneumonia* vaccine in pig. Submitted.

