

重组百日咳杆菌黏附素蛋白免疫小鼠可完全抵抗支气管败血波氏杆菌的致死性感染

赵战勤, 薛云, 吴斌*, 段龙川, 陈焕春, 汤细彪, 胡睿铭, 何华, 李增强

(华中农业大学动物医学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要:【目的】通过建立的小鼠呼吸道感染模型评价重组百日咳杆菌黏附素蛋白(GST-PRN)对小鼠的免疫保护效力。【方法和结果】在主动免疫保护试验中, GST-PRN 免疫组小鼠能产生较高的 PRN 抗体水平, 在使用 $3 \times LD_{50}$ 的支气管败血波氏杆菌 HH0809 株进行呼吸道气雾攻毒后, 其保护率为 100% (20/20), 但载体蛋白 GST 和 PBS 对照组小鼠的存活率仅为 15% (3/20)和 20% (4/20)。在被动免疫保护试验中, 腹腔免疫 GST-PRN 兔抗血清能 100% (10/10)保护小鼠抵抗 $10 \times LD_{50}$ 的 HH0809 株的腹腔攻击, 但 GST 兔抗血清和 PBS 免疫组小鼠的存活率均为 0 (0/10 和 0/9)。【结论】研究结果表明重组 PRN 蛋白具有良好的免疫学活性, 可作为亚单位疫苗或疫苗添加成分。

关键词: 支气管败血波氏杆菌; 百日咳杆菌黏附素; 免疫原性

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0337-05

支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, *Bb*)可广泛感染多种哺乳动物, 偶尔也感染人, 表现为呼吸道的急慢性炎症, 统称为波氏菌病(Bordetellosis)^[1]。在猪群中, *Bb*可引起猪发生非进行性萎缩性鼻炎(Non-progressive atrophic rhinitis, NPAR)和支气管肺炎, 也是猪呼吸道综合征(Porcine respiratory disease complex, PRDC)的重要致病因子之一^[2]。更重要的是, *Bb*的早期感染易于导致其它多种细菌性和病毒性病原的继发感染, 从而提高猪群呼吸道疾病的发病率和严重程度^[3]。猪波氏菌病现已遍布养猪业发达国家, 世界猪群约有 25%~50%受感染, 已成为重要传染病之一^[4]。在我国, 随着集约化养猪业的发展及猪的频繁引种和调动, 由 *Bb*引起的 NPAR、PRDC 等疾病也随之扩散蔓延, 造成较大经济损失^[4]。临床调查结果表明, 多种猪波氏菌病疫苗(主要是佐剂灭活苗)已在世界范围内广泛应用^[5, 6], 但免疫效果普遍较差, 该病的发生仍然十分普遍^[5, 7]。因

此, 开发新型、经济、免疫效力更好的 *Bb* 疫苗是世界养猪业的迫切需要。

Bb 具有 O、K 和 H 抗原, 其毒力因子包括粘附素和毒素两大类。百日咳杆菌黏附素(pertactin, PRN)是由 *Bb prn* 基因编码的一种具有抗原保护性的外膜蛋白成分, 是 *Bb* 感染的重要黏附因子^[1, 8]。在猪的感染试验中, 不产生 PRN 的 *Bb* 菌株不能导致猪发生波氏菌病^[9, 10], 且猪群的保护率与 PRN 抗体水平呈线性关系, 被认为是 *Bb* 最主要的保护性抗原^[8~11]。本研究中, 经过重组 PRN 蛋白^[12]或者 PRN 兔抗血清免疫的 BALB/c 小鼠均能抵抗猪源 *Bb* 的致死性感染, 表明重组 PRN 蛋白具有良好的保护力, 可以作为亚单位疫苗或疫苗添加成分, 显示了良好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和试验动物: 猪源 *Bb* HH0809 株、表达

基金项目: 国家自然科学基金(30471292); 国家“863计划”(2006AA10A206)

*通讯作者。Tel: +86-27-87286974; 传真: +86-27-87281795; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 赵战勤(1980 -), 男, 河南开封人, 博士研究生, 研究方向为细菌分子生物学和基因工程疫苗。E-mail: zhaozhanqin@126.com

收稿日期: 2007-07-06; 修回日期: 2007-12-19

PRN 蛋白的重组大肠杆菌(BL21/pGEX-PRN)^[12]由本实验室保存。新西兰大白兔、3~4 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠购自湖北省疾病控制中心。

1.1.2 抗原蛋白的提取与纯化:重组蛋白 GST-PRN 和载体蛋白 GST 的提取分别按照参考文献[12,13]进行。

1.2 小鼠呼吸道感染模型的建立

按文献[14]进行。将 *Bb* HH0809 株接种到含 15% 脱纤维羊血的鲍-姜氏平板培养 44~48 h, 含有 1% 酪蛋白的无菌 PBS 洗脱菌苔, 菌液浓度调整至约 1×10^{10} CFU/mL。无菌转移到雾化器内, 将雾化器(402AI 型, 由江苏鱼跃医疗设备有限公司生产)放置在装有 50 只 BALB/c 小鼠的密闭箱子(体积 = 长 \times 宽 \times 高 = 0.7 m \times 0.7 m \times 1.0 m)中央, 强度调至“中”, 分别在开启后 7.5 min、15 min、30 min、45 min 和 60 min 取出 10 只, 其中 5 只解剖取肺, 匀浆器匀浆并溶于 2 mL 无菌 PBS, 以平板表面涂布法进行活菌计数, 计算小鼠肺的 *Bb* 含量, 确定小鼠肺脏 *Bb* 菌含量随气雾攻毒时间的变化关系。另外 5 只隔离饲养, 观察 30 d, 按 Karber 法计算 *Bb* 对 BALB/c 小鼠的半数致死剂量(50% lethal dose, LD₅₀)。

1.3 小鼠主动免疫保护试验

取 3~4 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 共 81 只, 随机分成 3 组(27 只/组)。第一组每只皮下免疫 GST-PRN 蛋白 25 μ g (与等体积弗氏完全佐剂混合), 14 d 后加强免疫 1 次(使用弗氏不完全佐剂)。第二组(载体蛋白对照组)采取同样方法免疫 GST 蛋白。第三组(空白对照组)注射相同体积的无菌 PBS。首免前后每 10 天对每组中 5 只小鼠(不攻毒)进行断尾采血到 60 d。将 5 只小鼠血清等量混合, 采用间接 ELISA 法^[12]检测该组平均抗体水平。首免后 31 d, 按 1.2 中所建立的模型使用 *Bb* 强毒株 HH0809 对每组 20 只小鼠进行呼吸道气雾攻毒 45 min, 攻毒剂量约 $3 \times \text{LD}_{50}$ (4.2×10^5 CFU)。攻毒 2 h 后每组取 2 只, 解剖取肺, 匀浆器匀浆并溶于 2 mL 无菌 PBS, 以平板表面涂布法进行活菌计数, 计算小鼠肺的 *Bb* 含量, 即实际攻毒剂量。攻毒后第 10、20、30 天, 每组小鼠选取 3~5 只继续采血并检测血清抗体水平。小鼠攻毒后观察 30 d, 死亡者立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

1.4 小鼠被动免疫保护试验

将表达产物 GST-PRN 150 μ g 与等体积弗氏完全佐剂(购自美国 Sigma 公司)均匀混合, 皮下注射新西

兰大白兔, 分别在 3 周、5 周和 7 周后各加强免疫 1 次(使用弗氏不完全佐剂)。在 4 免后 10 d 进行心脏采血, 提取血清, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, -20°C 保存备用。按同样方法制备 GST 蛋白兔抗血清。29 只 3~4 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 3 组。第一组 10 只小鼠腹腔注射 0.5 mL 重组蛋白 GST-PRN 的兔抗血清; 第二组 10 只小鼠腹腔注射 0.5 mL 载体蛋白 GST 的兔抗血清; 第三组 9 只小鼠腹腔注射 0.5 mL 无菌 PBS。注射后 3 h, 所有小鼠使用 $10 \times \text{LD}_{50}$ (4.4×10^6 CFU) *Bb* HH0809 进行腹腔攻毒。小鼠攻毒后观察发病及死亡情况 30 d, 死亡小鼠立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

2 结果

2.1 小鼠呼吸道感染模型的建立

从呼吸道感染小鼠的肺脏活菌计数的曲线可以看出(图 1), 气雾攻毒 7.5 min 后, 小鼠肺脏活菌含量随暴露于 *Bb* 气雾时间的增加而缓慢上升。在 7.5 min、15 min、30 min、45 min 和 60 min 时间肺脏的平均活菌含量分别达到 2.54×10^4 CFU、 1.02×10^5 CFU、 2.64×10^5 CFU、 5.0×10^5 CFU 和 6.56×10^5 CFU。按 Karber 法公式计算 *Bb* 通过呼吸道感染 BALB/c 小鼠的 LD₅₀ 为 1.4×10^5 CFU。

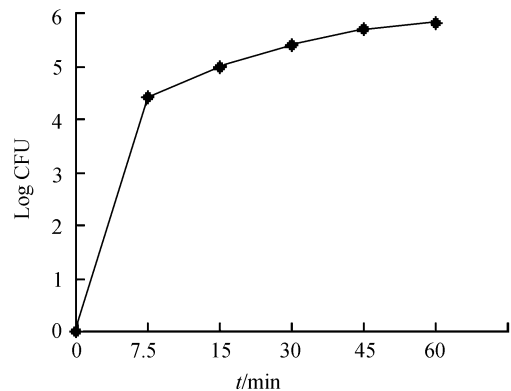


图 1 小鼠肺脏的 *Bb* 活菌含量(CFU)随气雾攻毒时间(min)的变化曲线

Fig. 1 Time course of increases in numbers of CFU in lungs of BALB/c mice after infection with *Bb*.

2.2 GST-PRN 免疫小鼠的抗体消长规律

利用以 PRN 蛋白片段(不含 GST 载体蛋白)为包被抗原的 ELISA 方法^[12]检测血清样品抗体消长规律。结果表明(图 2), PBS 空白对照组小鼠在整个试验期间

针对 PRN 的 ELISA 抗体水平为阴性。有趣的是, GST 蛋白对照组能够检测到有微弱的抗体水平升高。分析认为, 可能与 ELISA 检测方法中的包被抗原 PRN 仍然含有极少量的 GST 载体蛋白有关, 因为包被抗原 PRN 来源于融合蛋白 GST-PRN, 而凝血酶 Thrombin 对 GST-PRN 的酶切效率等因素会影响 PRN 的回收纯度。GST-PRN 免疫组血清抗体水平于首免后迅速升高, 在第 10 d 时, OD_{630} 平均值就已达 0.538; 二次免疫后抗体水平升高到 1.117; 在第 30 天达到最高值 1.242; 然后出现逐渐下降趋势。但是, 当 GST-PRN 免疫组小鼠在首免后 31 d 进行 *Bb* 强毒株 HH0809 气雾攻毒后, PRN 抗体水平则再次迅速升高, 在攻毒后 10 d 达到最高值 1.559。

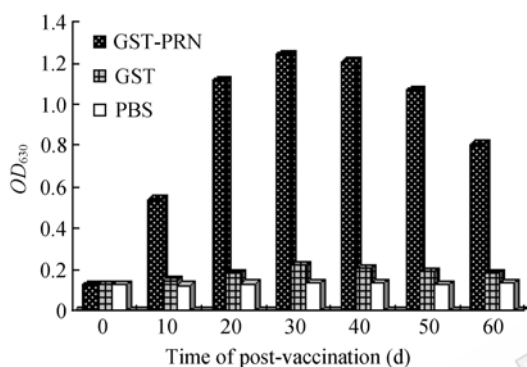


图 2 免疫后不同时间小鼠体内的 PRN ELISA 抗体水平
Fig. 2 Antibody titers against PRN by ELISA at different time points post-vaccination in mice Series 1, 2 and 3, immunization by GST-PRN, GST and PBS, respectively.

2.3 小鼠主动免疫的保护性试验结果

根据小鼠肺脏 *Bb* 菌含量随气雾攻毒时间的变化关系, 在首免后 31 天, 试验组和对照组进行攻毒 45 min。攻毒后经过测定可知, 攻毒剂量实际为 4.4×10^5 CFU/肺, 稍高于 $3 \times LD_{50}$ (4.2×10^5 CFU/肺)。GST 蛋白对照组和 PBS 空白对照组小鼠攻毒后均表现精神萎靡, 不食, 8h 后开始出现死亡, 死亡高峰出现在 3~4 d 和 7 d 后死亡停止。死亡小鼠剖检可见肺有明显的坏死、出血, 渗出液增多、变稠; 肝、坏死, 表面多附有一层伪膜, 易剥离; 从死亡小鼠心血、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏均能分离到感染菌。GST-PRN 免疫组 20 只小鼠全部存活, 且在攻毒后没有出现任何发病症状, 保护率为 100% (20/20)。而 GST 蛋白对照组(20 只)和 PBS 空白对照组(20 只)分别存活 3 只和 4 只。

2.4 小鼠被动免疫的保护性试验结果

GST 抗血清对照组和 PBS 空白对照组小鼠攻毒后均表现精神萎靡, 不食, 均有不同程度的拉稀现象, 12 h 后开始出现死亡, 死亡高峰出现在 24~36 h, 两组小鼠在第 4 d 内全部死亡。死亡小鼠剖检病变情况与呼吸道气雾攻毒病变情况相似, 但是肺脏病变较轻, 而出现严重的肠道病变, 有出血和轻微糜烂。从死亡小鼠心血、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏均能分离到感染菌。GST-PRN 抗血清免疫组小鼠攻毒后表现精神沉郁, 不食, 活动明显减少, 个别小鼠离群独处, 但攻毒 24 h 后基本恢复正常。10 只小鼠全部存活, 保护率为 100% (10/10)。

3 讨论

在波氏菌病的小鼠感染模型中, 已经报道的方法有静脉注射、脑接种、腹腔接种和呼吸道气雾感染法。脑注射法对动物损伤较重, 容易导致小鼠死亡, 而静脉途径攻毒不能客观反应免疫原的保护效果。由于 *Bb* 是呼吸道病原菌, 其发生黏附和感染的位置也是上呼吸道和肺脏。采用呼吸道气雾感染途径与天然感染途径相一致, 相信该攻毒途径较静脉、腹腔和脑接种途径的感染方式更加可靠。另外, 本试验采用了 3~4 w 的幼龄鼠。这是因为自然状态下幼龄动物对 *Bb* 更有易感性。本研究曾使用过大龄的 BALB/c 小鼠和昆明鼠, 发现大龄鼠由于不易感而不能客观反应表达抗原的保护效力, 这与已有报道相一致^[8]。小鼠呼吸道感染模型的建立为进一步开展 *Bb* 的致病机理研究、疫苗的效力检测等奠定基础。

Bb PRN 是由 *prn* 基因编码的重要黏附因子和保护性外膜蛋白成分^[1, 8]。在猪的感染试验中, 猪群的保护率与 PRN 抗体水平呈线性关系, PRN 被认为是 *Bb* 最重要的保护性抗原^[8, 9, 11]。在另一个研究中, 我们利用本实验室分离的猪源 *Bb* 强毒菌株 HH0809 的基因组为模板, 克隆了 PRN 除去 N 端信号肽的 *prn* 基因, 在大肠杆菌中实现了高效表达^[12]。分析结果表明, PRN 蛋白质属于稳定型蛋白质、氨基酸序列保守、表达量高且易于纯化, 具备了作为基因工程抗原的理化条件^[12]。本研究中, 我们使用重组 PRN 蛋白 GST-PRN 经过弗氏佐剂乳化制成亚单位疫苗, 免疫小鼠后攻毒结果表明, 该重组蛋白能够完全保护小鼠抵抗致死剂量的猪源 *Bb* 强毒株 HH0809 的攻击。

这表明该重组蛋白 GST-PRN 具有良好的免疫原性,且单个蛋白就可以提供完全的免疫保护。有趣的是, GST-PRN 免疫组小鼠在攻毒后没有出现任何发病症状;攻毒 10 d 后, PRN 抗体水平又有显著提高。这表明免疫小鼠依赖攻毒前针对 PRN 的抗体优势就能抵抗 *Bb* 强毒株的攻击,并能产生强烈的再次免疫应答反应,也预示着 PRN 在 *Bb* 的感染机制中可能扮演着非常重要的角色。

Bb 具有粘附素和毒素两大类毒力因子。这些毒力因子的表达与病原所处的环境具有紧密的相关性,均由 BvgA/S 双因子调节系统调节表达^[1]。其致病机理是, *Bb* 通过 PRN 等黏附因子固着在呼吸道黏膜上皮细胞纤毛上,进行增殖后,分泌 DNT 等毒素因子,引起黏膜上皮细胞的发炎、增生和纤毛脱落等退行性变化。鼻腔或者肺脏黏膜受损伤后,便给其它病原的寄居和增殖创造了条件^[3, 4]。在被动免疫试验中,表达产物 GST-PRN 的兔抗血清经过腹腔免疫也能够完全保护小鼠抵抗致死剂量($10 \times LD_{50}$)的 *Bb* 强毒株 HH0809 的攻击,这可能是天然 PRN 作为 *Bb* 定植过程中的重要黏附因子,是 *Bb* 定植过程的关键,针对该蛋白的抗血清与天然 PRN 结合后,封闭或抑制该蛋白的活性,导致天然 PRN 失去黏附功能,并最终导致 *Bb* 丧失定植到黏膜上皮细胞的能力。在另外一个试验中,Western blot 分析显示表达产物能与 PRN 猪波氏菌阳性血清发生很强的反应^[12]。两个试验的结果说明重组 PRN 蛋白不但具有良好的免疫原性,而且具有良好的反应原性。这也进一步解释了在主动免疫试验中单个重组 PRN 蛋白就能够完全保护小鼠抵抗致死剂量 *Bb* 攻击的原因。同时,也预示着,在预防猪 *Bb* 感染中,阻断其感染机制的关键环节也许就能够起到完全预防波氏菌病的目的,而针对菌体其它组分的抗体虽然也可能具有一定作用,但并非是必不可少的。

总之,本研究首次检测了重组 PRN 蛋白的免疫原性及其免疫效力,证实单个重组 PRN 蛋白就能给予小鼠足够的免疫保护,这为研制猪波氏菌病的新疫苗奠定了基础,也为其它动物波氏菌病的防制提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 8(2): 326–382.
- [2] Baysinger A. PRDC: is it new or déjà vu?. *Pork*, 1999, 19: 64.
- [3] De Jong MF. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In: Straw BE, d'Allaire S, Mengeling WL, et al. (eds.). Diseases of swine. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999.
- [4] 蔡宝祥. 家畜传染病学. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [5] Backstrom L. Present uses of and experiences with swine vaccines. *Adv Vet Med*, 1999, 41: 419–428.
- [6] United States Department of Agriculture. Part I: reference of swine health and management in the United States, 2000. *National Animal Health Monitoring System*, 2001, 338: 39–48.
- [7] United States Department of Agriculture. Part : reference of swine health and management in the United States, 2000. *National Animal Health Monitoring System*, 2002, 355: 29–36.
- [8] Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*, 1985, 47: 744–751.
- [9] Novotny P, Kobisch M, Cownley K, et al. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun*, 1985, 50: 190–198.
- [10] Novotny P, Chubb AP, Cownley K, et al. Adenylate cyclase activity of a 68,000-molecular-weight protein isolated from the outer membrane of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*, 1985, 50(1): 352–357.
- [11] Kobisch M, Novotny P. Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect Immun*, 1990, 58: 352–357.
- [12] 赵战勤, 薛云, 吴斌, 等. 猪源支气管败血波氏杆菌百日咳杆菌黏附素基因的原核表达及其抗体检测 ELISA 方法研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48 (2): 330–336.
- [13] 赵战勤, 卢顺, 吴斌, 等. 猪水肿毒素 A 亚基基因表达产物的生物学特性及抗体检测 ELISA 方法的建立. *农业生物技术学报 (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 2007, 15 (3): 378–382.
- [14] Watanabe M, Komatsu E, Abe K, et al. Efficacy of pertussis components in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory infection and a murine intracerebral challenge model. *Vaccine*. 2002, 31(9): 1429–1434.

Protecting mice from fatal *Bordetella bronchiseptica* infection by immunization with recombinant pertactin antigens

Zhanqin Zhao, Yun Xue, Bin Wu^{*}, Longchuan Duan, Huanchun Chen, Xibiao Tang,
Ruiming Hu, Hua He, Zengqiang Li

(State Key Laboratory of Agriculture Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] We evaluated the efficacy of the recombinant pertactin (PRN)-specific active or passive immunization against *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*) in an aerosol challenge model established by using BALB/c mice. [Methods and results] Mice, immunized subcutaneously with two doses of purified glutathione S-transferase (GST)-PRN protein mixed with an equal volume of Freund's adjuvant, produced robust PRN-specific IgG antibody activity. All 20 mice vaccinated with GST-PRN protein survived aerosol challenge with three times the 50% lethal dose (LD₅₀) of virulent *Bb* HH0809 compared with 3 of 20 GST protein-treated controls and 4 of 20 PBS-treated controls that survived. Furthermore, we observed complete protection against intraperitoneal challenge with ten times the LD₅₀ of virulent HH0809 strain in mice that were injected intraperitoneally with 0.5 ml rabbit anti-GST-PRN serum. No survivors were observed in mice that received either rabbit anti-GST serum or PBS alone. [Conclusion] The recombinant PRN protein had strong immunogenicity against *Bb* infection.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*; pertactin; immunogenicity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471292) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A206)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

Received: 6 July 2007 /Revised: 19 December 2007

审阅和查询 2007 年稿件的方法

2008 年 1 月 3 日

自 2006 年本刊开通了“稿件远程处理系统”后，先后使用了两套编辑软件，这两套编辑软件是分别在两个不同的网页下操作的，审阅和查询不同年代所投稿件的方法也是不同的，具体如下：

1. 两套网页的页眉采用的颜色不同，新网页是黄色，旧版网页是绿色。
2. 新网址为 <http://journals.im.ac.cn>，如果您使用的还是原网址(<http://journal.im.ac.cn/xuebao>)，看到的也应该是新的网页。但是旧版网页内容在 2008 年 2 月 19 日已损坏，原网址无法再被使用，专家和作者只得从新版网页中进入旧版网页进行审稿、查询。
3. 在新网页首页的右上角处设置了“旧版入口”，2007 年 12 月 31 日之前的来稿(即：稿号为 xb2007-xxx 的稿件)，依然使用原网页进行投稿、查询和审稿，直到稿件处理终结为止。
4. 2008 年 1 月 1 日后的投稿(即：稿号为 xb2008xxx 的稿件)，在新的网页中查询和审稿。

由此会给作者和专家带来不便，敬请谅解！