

鼠伤寒沙门氏菌外膜蛋白诱导 BALB / C 小鼠免疫保护的实验研究

赵跃武¹ 赵凤兰² 徐友梅² 胡 军²

(¹ 河南省人民医院生物治疗研究中心 郑州 450003, ² 河南医科大学微生物学教研室 郑州 450052)

摘要 本实验采用超声破碎、Triton X-100 处理和超速离心技术提取了鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, STM) 的外膜蛋白 (Outer membrane proteins, OMPs), 其中脂多糖 (LPS) 的含量约为 5%。OMP 经 SDS-PAGE 显示 10 余条蛋白带。对 OMPs 诱发 BALB / C 小鼠产生典型的迟发型变态反应 (DTH) 进行了检测。经腹腔免疫的 BALB / C 小鼠用 500LD₅₀ 鼠伤寒沙门氏菌 (50115) 攻击, 100% 可得到保护; 用 500LD₅₀ 伤寒杆菌 (E686) 攻击, 33.3% 可得到交叉保护。免疫 BALB / C 小鼠的 T 淋巴细胞经尾静脉注射至非免疫小鼠, 被动免疫保护率为 85.7%。上述结果说明 STM-OMPs 能诱发 BALB / C 小鼠保护免疫, 是一良好的保护性抗原。

关键词 鼠伤寒沙门氏菌, 外膜蛋白, SDS-PAGE, 免疫保护

鼠伤寒沙门氏菌 (STM) 感染是一公共卫生性问题, 人畜普遍易感, 目前尚无理想的疫苗有效地控制其发生与流行。现用的细胞疫苗, 因内毒素的存在引起的毒副作用和免疫保护不持久等, 使其应用受到了限制^[1]。革兰氏阴性菌外膜蛋白 (OMPs) 是暴露于细菌表面的蛋白成分, 作为致病菌与宿主间的分界面, 在决定宿主免疫反应的特异上起着重要的作用。近年来, 国外研究表明: 沙门氏菌、绿脓杆菌、布氏杆菌 OMPs 确为保护性抗原^[2]。为此, 本文为使 STM-OMPs 成为分子疫苗, 对 OMPs 诱发 BALB / C 小鼠免疫保护的能力进行了研究, 并可望使 STM 作为基因工程菌苗受体菌的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种培养

鼠伤寒沙门氏菌标准株 (50115)、伤寒沙门氏菌标准株 (E686) 购自中国药品生物制品检定所。LB 培养基培养 16~18h, 用 10mmol / L Tris-HCl 缓冲液收集细菌, 冲洗 2 次, 4℃ 保存。

1.2 供试动物

日本大耳白兔, 体重 2~3kg; BALB / C 小鼠, 雄性, 体重 15~20g, 河南省医科大学实验动物中心提供。

1.3 OMPs 的制备

根据文献[3]方法。

1.4 OMPs 中内毒素 (LPS) 的测定

采用鲎变形细胞溶解试验^[4], 鼠伤寒沙门氏菌 LPS (Sigma) 作对照。

1.5 SDS-PAGE

参照 Lameli 方法^[5], 解离非连续缓冲系统垂直平板电泳。丙烯酰胺浓度: 分离胶 10%、浓缩胶 3%, 含 SDS 的聚丙烯酰胺, 电泳结束, 采用考马斯亮蓝 R250 染色, 以标准低蛋白分子量的对数值和电泳迁移率绘制标准曲线, 求出各蛋白分子量。

1.6 迟发型变态反应 (DTH)

参照文献[6]方法, 不同免疫小鼠左足垫用 1×10^7 细菌 (uv 致死) 攻击, 右足垫用同体积的 PBS 对照, 24h 后, 测左右两足垫的厚度之差。

1.7 主动及交叉免疫保护

LD₅₀ 按文献[1]方法, 分别用 OMPs (50 μ g)、LPS (10 μ g) 免疫小鼠, 三周后用 500LD₅₀ 鼠伤寒沙门氏菌和伤寒沙门氏菌攻击, 两周后计算免疫保护率。

1.8 T 淋巴细胞被动转移保护试验

按文献[1,7]方法, 制备免疫小鼠脾细胞悬液 $1 \times 10^7 / 0.5\text{ml}$, 取 0.5ml 悬液, 垂直加入尼龙毛柱中, 将该柱水平横卧, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45min, 再用预温的 5%FCS-PBS 洗脱液洗脱, 收集洗脱液中的 T 淋巴细胞。取收集的 T 淋巴细胞悬液, 加入培养板内, 再加入同等体积的抗 BALB/C 小鼠的 T 淋巴细胞单克隆抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30min, 加入补体后温育 45min, 测定 T 淋巴细胞百分率达 86%并调至 $1 \times 10^8 / \text{ml}$, 每只小鼠 0.2ml 以尾静脉注射, 18h 后, 用 500LD₅₀ 鼠伤寒沙门氏菌攻击, 计算免疫保护率。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 图谱分析

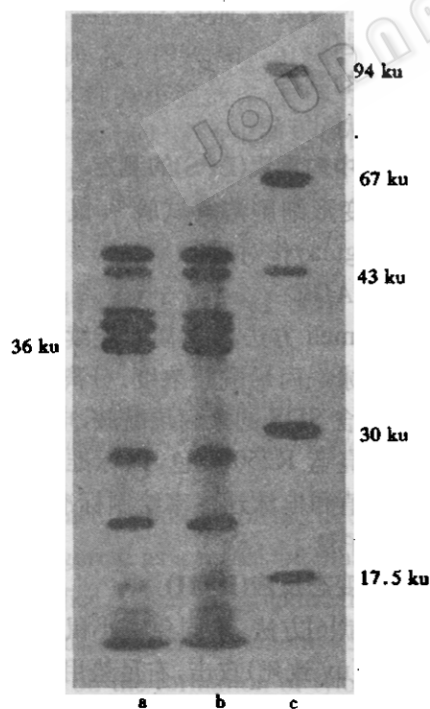


图1 鼠伤寒沙门氏菌 OMPs SDS-PAGE 图谱分析

a 和 b: OMPs; c: 标准蛋白

提取的 OMPs, 经 SDS-PAGE 后, 显示出 10 余条带, 其中以 36ku 染色最深(图 1), 与国外学者报道相似^[8]。似说明 36ku 带可能为 OMPs 中的主要保护性抗原^[9]。

2.2 OMPs 中的 LPS 含量

经鲎试验测定, 每 100 μ g 蛋白中约含 5 μ g LPS。

2.3 DTH

从表 1 可以看出, BALB/C 小鼠足垫肿胀程度, OMPs (7.6 ± 0.3) 免疫组显著大于 LPS (1.3 ± 0.6) 免疫组和对照组 (0.8 ± 0.3), $P < 0.01$, 间接地反应了 OMPs 诱发 CMI 的能力。

表 1 不同免疫组 BALB/C 小鼠的足垫肿胀程度

抗原类型	足垫肿胀程度($\times 0.1\text{mm}$)	
对照组	0.8 ± 0.3	
LPS	1.3 ± 0.6	
OMPs	7.6 ± 0.3	$P < 0.01$

2.4 主动和交叉免疫保护

经测定鼠伤寒沙门氏菌、伤寒杆菌的 LD₅₀ 分别为 1×10^4 、 1×10^3 , 用 500LD₅₀ 细菌经腹腔内攻击, OMPs 免疫组主动及交叉免疫保护率分别为 100% 和 33.3% (表 2 和表 3), 相反, LPS 组保护较差。

表 2 不同免疫组小鼠主动免疫保护率

抗原类型	存活 / 总数	%
对照组	0 / 10	0
LPS	2 / 10	20
OMPs	10 / 10	100

表 3 不同免疫组小鼠交叉免疫保护率

抗原类型	存活 / 总数	%
对照组	0 / 9	0
LPS	0 / 9	0
OMPs	3 / 9	33.3

2.5 T 淋巴细胞被动转移免疫保护作用

取免疫 BALB/C 小鼠的 T 淋巴细胞转移至非免疫小鼠体内, OMPs 免疫组可使

85.7%的小鼠得到保护,见表4。

表4 不同免疫组小鼠T淋巴细胞
被动转移免疫保护率

T 细胞来源	存活 / 总数	%
normal mouse	0 / 7	0
LPS-immunized mouse	0 / 7	0
OMPs-immunized mouse	6 / 7	85.7

3 讨论

据报道^[8],鼠伤寒沙门氏菌 OMPs 是良好的免疫原,能引起 BALB/C 小鼠细胞免疫和免疫保护作用。本文用 50 μ g OMPs 经腹腔免疫小鼠,三周后用 1×10^7 细菌(uv 致死)攻击,可产生典型的 DTH,明显高于 LPS 免疫组。间接地反应 OMPs 引起较强 CMI 的能力。Matusi 等^[9]通过对 DTH、IL-1、IL-2 和 INF- γ 的检测也证明了 OMPs 刺激 BALB/C 小鼠产生 CMI 和参与免疫调节的作用。

用 OMPs 免疫的 BALB/C 小鼠可保护 500LD₅₀ 鼠伤寒沙门氏菌(100%)和伤寒沙门氏菌(33.3%)。Isibasi 等^[10]推测交叉免疫保护现象,可能与沙门氏菌属间 OMPs 的一些基因序列具有一定的共同抗原表位有关。本实验也证明了 OMPs 免疫的 BALB/C 小鼠 T 淋巴细胞被动免疫保护作用,进一步证实了鼠伤寒沙门氏菌感染引起的免疫保护是以细胞免疫保

护为主。

据国外学者推测,LPS 可能作为佐剂加强抗原的免疫应答;或以 LPS-蛋白复合物的形式维护蛋白抗原的天然构型;或可以改变抗原构型而使其成为一较强的免疫原构型^[10]。因 OMPs 与 LPS 呈特殊的非共价联合,本文提取 OMPs 的方法没有完全去除 LPS 和一些次要 OMPs,就难以解释 OMPs 中的最主要保护性抗原及正确估价 LPS、次要 OMPs 的作用。因此,STM-OMPs、STM 要想早日成为理想的分子疫苗及基因工程菌的受体菌,以控制鼠伤寒沙门氏菌引起的感染,还需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Matusi K, Arai T. Microbiol Immunol, 1989, 33(9): 699.
- [2] Gilleand HE. Eur J Clin Microbio, 1987, 55(30): 816.
- [3] Schraitman CA. J Bacteriol, 1971, 108: 454.
- [4] Weinberg JB. Academic press, Inc. New York, 1968, 342.
- [5] Laemmli UK. Nature, 1970, 227: 680.
- [6] Collins FM, Backanness GB. J Immunol. 1968, 101: 830.
- [7] 郑秀娟,董玮,何球藻.上海免疫学杂志. 1989, 9(4): 203.
- [8] Udhayakumar V, Muthukkaruppan VR. Infect Immun, 1987, 55(3): 816.
- [9] Matusi K, Arai T. Microbiol Immunol. 1992, 36(3): 269—278.
- [10] Isibasi A, Ortit V, Vargas M. Infect Immun. 1988, 56(11): 2953.

STUDY ON PROTECTIVE IMMUNITY INDUCED BALB / C BY OUTER MEMBRANE PROTEINS OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Zhao Yuewu¹ Zhao Fenglan² Xu Youmei² Hu Jun²

(1 Bio-therapy Research Center of Henan People's Hospital, Zhengzhou 450003; 2 Department of Microbiology, Henan Medical University, Zhengzhou 450052)

Abstract outer membrane proteins from *Salmonella typhimurium* were extracted by using super sonication, TritonX-100 and super speed centrifugation, found to be contain with 5% lipopolysaccharide (LPS) approximately. OMPs were shown 10 more bands by SDS-PAGE. In OMPs immunized BALB / C mice significant level of delayed-type hypersensitivity (DTH) response was de-

tected. Their abilities of inducing protective immunity against challenge with the bacteria were studied in BALB / C mice. Active immunization with OMPs induced 100% protection to a intraperitoneally (i.p.) challenge with 500 LD₅₀ of *Salmonella typhimurium* in BABL / C mice. In addition, 33.3% crossed-protection against challenge with up to 500 LD₅₀ of *Salmonella typhi* was also achieved. Furthermore, We found that T cells from the OMPs-immunized mice could transfer the protection (85.7%). Above results indicate that STM-OMPs can induce more powerful and protective immunity, is good protective antigen.

Key words *Salmonella typhimurium*, outer membrane proteins, SDS-PAGE, protective immunity