

布鲁氏菌 BP26 蛋白迟发型变态反应的研究*

刘景福¹, 李恪梅^{2**}, 王国治²

(1. 福建医科大学基础医学院病原生物学系, 福州 350004; 2 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 研究布氏菌(简称 Br.) BP26 蛋白在不同抗原免疫豚鼠模型上的迟发型变态反应。方法: 分别用 BP26 重组蛋白、布氏菌纯蛋白衍生物(Br-PPD)、布氏菌 M16 种纯蛋白衍生物(Br. M16-PPD)、布氏菌 RM6 种纯蛋白衍生物(Br. RM6-PPD)、布氏菌 5K/33 种纯蛋白衍生物(Br. 5K/33-PPD) 5 种变态反应原, 在 BP26 和不同种布氏菌免疫豚鼠模型上分别进行皮肤试验。结果: 变态反应原 BP26 蛋白在 BP26 免疫模型上能够形成明显的迟发型变态反应, 在不同种布氏菌免疫的模型上均为阴性; 各种布氏菌纯蛋白衍生物变态反应原在其相应菌种的免疫模型上形成明显的变态反应, 在 BP26 免疫模型上均为阴性结果。结论: 布氏菌 BP26 具有变态反应原性, 其变应原性具有较强的特异性。

关键词: 布氏菌; 重组蛋白; 蛋白衍生物; 变态反应

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)07-1224-04

Research on delayed-type hypersensitivity of Brucella BP26*

LIU Jing-fu¹, LI Ke-mei^{2**}, WANG Guo-zhi²

(1. Department of Pathogenic Biology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China;

2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To research the delayed-type hypersensitivity of Brucella BP26 by skin tests in guinea pigs immunized with various Brucella antigens. **Methods:** Guinea pigs were immunized with BP26 and various brucella species respectively. The above-mentioned immunized guinea pigs were injected i. d. with purified protein derivative of Brucella, purified protein derivative of Br. M16, purified protein derivative of Br. RM6, purified protein derivative of Br. 5K/33. **Results:** The results of skin tests on BP26 allergen in BP26 immunized guinea pigs were positive, and those in the guinea pigs sensitized with Brucella species were negative. Nevertheless, the results of skin tests on PPD allergen was reversed. **Conclusion:** Brucella BP26 showed its high specific allergenicity.

Key words: Brucella; recombinant protein; protein derivative; delayed-type hypersensitivity

布鲁氏菌是革兰氏阴性短小无动力球杆菌, 布氏菌病是人畜共患变态反应性传染病。布氏菌为胞内寄生菌, 其主要特征是在吞噬细胞内生存和复制, 这也是布氏菌能逃逸宿主的防御长期感染不易被杀灭的主要原因。布氏菌的免疫以细胞免疫为主, 体液免疫为辅。1985 年 WHO 将布氏菌属分为 6 个种: 羊种布氏菌(*Br. melitensis*)、牛种布氏菌(*Br. abortus*)、猪种布氏菌(*Br. suis*)、犬种布氏菌(*Br. canis*)、绵羊种布氏菌(*Br. ovis*) 和沙林鼠种(*Br. neotomae*)。近年来有学者从海洋生物中发现了其他种的布氏菌, 但是目前仍没有给出命名^[1]。

布氏菌 BP26 蛋白, 又称 CP28 或 OMP28 蛋白,

存在于菌体表面和细菌外周浆中, 是 1 种布氏菌由胞内向胞外分泌的可溶性蛋白。它具有非常强的布氏菌属特异性, 并易于检测^[2,3]。目前国内外对 BP26 的研究较为广泛^[4~6], 利用其属特异性强的特点, 被一些学者运用于布氏菌病的诊断^[7,8]。另外, 研究表明 BP26 蛋白与疫苗的保护有很大关系, 如 BP26 蛋白对羊种布氏菌减毒活疫苗 M5 的免疫应答和保护效果有一定影响^[9]; BP26 核酸疫苗对布氏菌感染小鼠有保护力^[10]。本实验主要研究 BP26 蛋白的迟发型变态反应, 目的是为新型布氏菌疫苗及诊断制剂的研究提供实验依据。

* 传染病防控相关产品评价技术平台(2009ZX10608)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095405; E-mail: brtestlab@126.com

1 材料

1.1 动物 SPF 级豚鼠, 体重 400 g, 白色雌性, 共 45 只, 由中国药品生物制品检定所动物中心提供 (实验动物生产许可证号: SCXK(京) 2009-0017), 并由中国药品生物制品检定所动物室饲养。

1.2 菌种 Br. 104M, Br. M16, Br. RM6, Br. 5K/33 均由中国医学细菌保藏管理中心布氏菌专业实验室提供。

1.3 变应原 布氏菌 BP26 蛋白、Br - PPD、Br. M. 16 - PPD、Br. RM6 - PPD、Br. 5K/33 - PPD 均由中国药品生物制品检定所细菌一室制备, 制备方法见参考文献 [1]。

1.4 免疫佐剂 氢氧化铝, 为中国药品生物制品检定所细菌一室保存。BCG - CpG - DNA, 以下简称 CpG, 为中国药品生物制品检定所细菌一室制备。

1.5 菌液制备 收集新鲜培养的菌种, 经中国细菌浊度标准比浊浓度, 其中 Br. 104M 部分菌液经比浊, 调整浓度为 $4 \text{ 亿} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其余菌种 80°C , 2 h 灭活, 调整浓度为 $160 \text{ 亿} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 方法

2.1 豚鼠免疫

致敏原的注射剂量: BP26 蛋白、Br - PPD、M. 16 - PPD、RM6 - PPD、5K/33 - PPD 均 $30 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$, 氢氧化铝 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{只}^{-1}$, CpG $75 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$, 于豚鼠后退肌肉注射 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$, 每组 5 只豚

鼠。

2.1.1 BP26 蛋白免疫豚鼠模型 BP26 蛋白组、BP26 蛋白 + 氢氧化铝组、BP26 蛋白 + CpG 组、生理盐水 (NS) 组共 4 组, 每组 5 只豚鼠。分别于 0 和 14 d 各免疫 1 针。于第 2 次免疫 4 周、8 周后分别做皮肤试验。

2.1.2 不同种布鲁氏菌免疫豚鼠模型 Br. 104M (活) 组、Br. 104M 组、Br. M16 组、Br. 5K/33 组、Br. RM6 组共 5 组。Br. 104M (活) 组免疫剂量为 $2 \text{ 亿} \cdot \text{只}^{-1}$, 其余死菌组均为 $80 \text{ 亿} \cdot \text{只}^{-1}$ 。各组均免疫 1 次, 免疫 8 周后进行皮肤试验。

2.2 豚鼠皮肤试验 免疫后的豚鼠背部脱毛, 皮内注射变态反应原, 各种变态反应原的注射剂量均为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$, $0.2 \text{ mL} \cdot \text{点}^{-1}$ 。

2.3 记录结果 豚鼠注射变态反应原 24 和 48 h 后分别观察注射部位出现红肿反应, 并测量其直径, 记录结果。

2.4 结果统计 所有结果均以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 用 SPSS18.0 进行统计学分析。

3 实验结果

3.1 BP26 免疫模型的实验结果 用 BP26 和 Br. PPD 2 种变态反应原, 分别在 BP26、BP26 + 氢氧化铝、BP26 + CpG 和 NS 4 组免疫豚鼠中进行皮肤试验, 免疫 4 周后结果见表 1, 免疫 8 周后结果见表 2。

表 1 BP26 免疫 4 周后皮肤试验结果 ($\bar{X} \pm S, \text{mm}$)

Tab 1 Skin tests in guinea pigs immunized with BP26 after 4 weeks

组别 (groups)	变应原 (allergens)			
	BP26		Br - PPD	
	24 h	48 h	24 h	48 h
NS	—	—	—	—
BP26	$13.1 \pm 4.5^*$	—	—	—
BP26 + Al	$12.2 \pm 2.7^*$	$9.2 \pm 3.2^*$	—	—
BP26 + CpG	$12.2 \pm 2.0^*$	$5.5 \pm 3.8^*$	—	—

注: (note) “—”表示阴性结果 (none), * 表示与 NS 组比较, $p < 0.05$, ($p < 0.05$ compared with NS group)

表 2 BP26 免疫 8 周后皮肤试验结果 ($\bar{X} \pm S, \text{mm}$)

Tab 2 Skin tests in guinea pigs immunized with BP26 after 8 weeks

组别 (groups)	变应原 (allergens)			
	BP26		Br. PPD	
	24 h	48 h	24 h	48 h
NS	—	—	—	—
BP26	$16.6 \pm 2.5^*$	$11.7 \pm 3.7^*$	—	—
BP26 + Al	$17.2 \pm 2.2^*$	$14.1 \pm 1.8^*$	—	—
BP26 + CpG	$14.2 \pm 2.8^*$	$10.1 \pm 3.4^*$	—	—

注: (note) “—”表示阴性结果 (none), * 表示与 NS 组比较, $p < 0.05$ ($p < 0.05$ compared with NS group)

3.2 不同种布氏菌免疫模型的皮肤试验结果 用 BP26 蛋白、Br - PPD、Br. M. 16 - PPD、Br. RM6 - PPD 和 Br. 5K/33 - PPD 5 种变态反应原,分别在

Br. 104M (活)、Br. 104M、Br. M16、Br. 5K/33 和 Br. RM6 各种菌免疫组中进行皮肤试验。24 和 48 h 试验结果见表 3、表 4。

表 3 不同种布氏菌免疫模型豚鼠皮肤试验结果 (24 h) ($\bar{X} \pm S, \text{mm}$)

Tab 3 Skin tests in guinea pigs immunized with Brucella species (24 h) ($\bar{X} \pm S, \text{mm}$)

组别(groups)	变应原(allergens)				
	BP26	Br - PPD	Br. M. 16 - PPD	Br. 5K/33 - PPD	Br. RM6 - PPD
Br. 104M(live)	9.1 $\pm$ 3.32	20.1 $\pm$ 3.71*	19.7 $\pm$ 3.27*	18.0 $\pm$ 1.83*	15.1 $\pm$ 1.64*
Br. 104M	—	14.4 $\pm$ 2.82*	15.3 $\pm$ 0.45*	13.8 $\pm$ 2.17*	7.5 $\pm$ 2.15*
Br. M16	—	10.1 $\pm$ 3.80*	11.8 $\pm$ 0.36*	8.0 $\pm$ 4.38*	5.8 $\pm$ 2.28*
Br. 5K/33	—	15.1 $\pm$ 4.59*	13.6 $\pm$ 4.61*	15.4 $\pm$ 2.61*	8.7 $\pm$ 2.93*
Br. RM6	—	9.0 $\pm$ 2.75*	12.5 $\pm$ 2.37*	10.4 $\pm$ 1.08*	10.1 $\pm$ 1.75*

注(note) “—”表示阴性结果(none), * 与变应原 BP26 比较, $p < 0.05$ ($p < 0.05$ compared with BP26 allergen)

表 4 不同种布氏菌免疫模型豚鼠皮肤试验结果 (48 h) ($\bar{X} \pm S, \text{mm}$)

Tab 4 Skin tests in guinea pigs immunized with Brucella species (48 h) ($\bar{X} \pm S, \text{mm}$)

组别(groups)	变应原(allergens)				
	BP26	Br - PPD	Br. M. 16 - PPD	Br. 5K/33 - PPD	Br. RM6 - PPD
Br. 104M(live)	—	16.1 $\pm$ 2.84*	16.4 $\pm$ 1.78	16.0 $\pm$ 1.41*	14.8 $\pm$ 1.03*
Br. 104M	—	11.6 $\pm$ 1.39*	11.4 $\pm$ 1.52	10.8 $\pm$ 1.82*	—
Br. M16	—	5.8 $\pm$ 3.82	9.5 $\pm$ 1.68*	—	—
Br. 5K/33	—	7.7 $\pm$ 3.75*	10.8 $\pm$ 4.38*	10.1 $\pm$ 3.73*	—
Br. RM6	—	—	7.8 $\pm$ 3.45*	7.3 $\pm$ 3.09*	6.1 $\pm$ 2.92*

注(note) “—”表示阴性结果, * 与变应原 BP26 比较, $p < 0.05$ ($p < 0.05$ compared with BP26 allergen)

4 讨论

布氏菌皮肤变态反应属于 IV 型超敏反应, 又称迟发型变态反应。其效应细胞包括 CD4⁺ Th1 细胞, CD8⁺ 或 CD4⁺ CTL, 和一部分巨噬细胞及中性粒细胞等^[12], 最早 Mcfady - Can 等人于 1913 年发现布氏菌抗原可引起致敏动物的变态反应, 1922 年 Bu - met 首先以皮肤试验诊断人群布氏菌病。

从表 1 和表 2 中可得出以下几点, ①布氏菌 BP26 蛋白具有变态反应原性。②BP26 变应原在各含不同佐剂 BP26 蛋白免疫组中都能形成明显的红肿反应, NS 组均为阴性。③Br - PPD 变应原在各种含 BP26 的免疫组中结果均为阴性, 2 种变应原有明显不同 ($p < 0.05$)。④豚鼠免疫 8 周与免疫 4 周后的皮肤试验结果无明显差异 ($p > 0.05$)。在含 BP26 蛋白各免疫组中, 不同佐剂间试验结果无明显差异 ($p > 0.05$)。

从表 3 和表 4 中总结如下: 在 Br. 104M(活)、Br. 104M、Br. M16、Br. 5K/33、Br. RM6 各免疫组中, 变应原 Br - PPD、Br. M. 16 - PPD、Br. RM6 - PPD 和 Br. 5K/33 - PPD 的皮肤试验红肿直径明显大于 BP26 的皮试结果, 表明 BP26 蛋白在不同种布氏菌

免疫各组中引起的变态反应与其他变应原引起的反应有所不同 ($p < 0.05$)。

据报道, 在感染了布氏菌的人、牛和羊中均可检测到 BP26 蛋白的抗体存在, 并证实 BP26 蛋白可作为诊断抗原^[13]。国内就构建 BP26 缺失的 M5 菌株, 实验结果证明 BP26 对 M5 菌株的免疫应答和保护力有一定的影响。Xinghong Yang 等学者也经试验证明 BP26 核酸疫苗注射组与空质粒组的脾菌数具有明显的减少。

本实验表明, BP26 蛋白在布氏菌皮肤变态反应实验中具有很强的特异性。同时用 BP26 蛋白免疫豚鼠, 证明 BP26 能够在豚鼠体内形成迟发型变态反应, 而迟发型变态反应的效应细胞为一种保护性 T 细胞, 这是细胞内寄生菌疫苗在机体内产生免疫保护的必要条件。

参考文献

- JIN Ning - yi(金宁一), HU Zhong - ming(胡仲明), FENG Shu - zhang(冯书章), et al. New Zoonoses(新编人兽共患病学). Beijing (北京): Science Press(科学出版社), 2007. 493
- Cloekaert A, Vizcaino N, Paquet JY, et al. Major outer membrane proteins of Brucella spp: past, present and future. Vet Microbiol,

- 2002, 90(1-4): 229
- 3 WANG Wen-jing(王文敬), WANG Ping(王萍), RUI Yong-yu(芮勇宇), et al. Polymorphism of Brucella OMP28 analyzed by PCR-SSCP(中国布鲁杆菌 OMP28 基因 PCR-SSCP 多态性分析). *Chin J Endemiol*(中国地方病学杂志), 2006, 25(2): 142
- 4 Wang Z, Zhen Q, Qiao F, et al. Construction of BP26 tagged vaccine strain and development of discriminating PCR for Brucella. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2009, 49(3): 405
- 5 Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, et al. Efficacy of bp26 and bp26/omp31 B. melitensis Rev. 1 deletion mutants against Brucella ovis in rams. *Vaccine*, 2009, 27(2): 187
- 6 Sabio Y, García JV, Bigi F, et al. Expression of MPB83 from Mycobacterium bovis in Brucella abortus S19 induces specific cellular immune response against the recombinant antigen in BALB/c mice. *Microbes Infect*, 2010, 12(14-15): 1236
- 7 Kumar S, Tuteja U, Kumar A, et al. Expression and purification of the 26 kDa periplasmic protein of Brucella abortus: a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 49(3): 213
- 8 Yang X, Waiters N, Robison A, et al. Nasal immunization with recombinant Brucella melitensis bp26 and trigger factor with cholera toxin reduces B. melitensis colonization. *Vaccine*, 2007, 25(12): 2261
- 9 QU Qing(曲勍), WANG Zhou-jia(汪舟佳), ZENG Qing(甄清), et al. Effect of bp26 on immune response and protective efficacy of M5 against brucella melitensis in mice(bp26 对布鲁氏菌疫苗株 M5 免疫应答和免疫保护性的影响). *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), 2009, 31(4): 438, 446
- 10 Yang XH, Mary H, Nancy W, et al. Selection of protective epitopes for brucella melitensis by DNA Vaccination. *Infect Immun*, 2005, 73(11): 7297
- 11 LI Ke-mei(李格梅), WANG Guo-zhi(王国治), HUANG Jian(黄健), et al. Study and preparation of the brucellin purified protein derivative(布氏菌素纯蛋白衍生物的研制). *Chin J Control Endem Dis*(中国地方病防治杂志), 1995, 10(5): 268
- 12 GONG Fei-li(龚非力). Medical Immunology(医学免疫学). 3rd Ed(第3版). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2009. 229
- 13 Arese AI, Cravero SL, Rossetti OL, et al. Use of a recombinant protein from Brucella abortus for the diagnosis of brucellosis in different animal species. *Rev Argent Microbiol*, 1999, 7(31): 36

(本文于 2010 年 11 月 1 日收到)

《俞永新论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《俞永新论文集》由中国人口出版社于 2010 年 9 月出版。2010 年中国药品生物制品检定所(中检所)迎来了她 60 华诞。在中检所 60 华诞之际,编辑出版老一代中检人的论著文集,让人们了解中国药检人的奋斗历程,从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业,前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富,系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作,以体现专业特性为主线,反映团队成就为宗旨,并以年代代表人物冠以书名编辑成册。

《俞永新论文集》以俞永新院士为核心,收集俞永新院士及与其他作者合著论文 244 篇,包括乙型肝炎病毒和疫苗类 87 篇,出血热病毒和疫苗类 91 篇,狂犬病病毒和疫苗类 18 篇,虫媒病毒和疫苗类 25 篇,综述 23 篇。此外还收集了俞永新院士主编及参与编辑的书籍 10 部。论文以全文收载并尊重原文,著作收载前言或序、著者、目录或书名摘要。对论文有贡献的中检所的专家作者还有李河民、王太江、敖坚、吴慧英、郎书惠、朱荫耕、严子林、聂子林、李雪东、罗惠蓉等。对书籍有贡献的中检所前辈们还有李河民、李德富、袁曾麟、聂子林、周国安、黄建、张华远、辜清吾等。本论著集的编辑出版亦蕴涵了对所有参与工作的老专家们为中检所发展所作贡献的敬重。

本书定价 298.00 元。联系人:刘小帅;电话:010-67095201;地址:100050 北京市东城区天坛西里 2 号 中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部