

周俊明, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 铁离子限制下猪胸膜肺炎放线杆菌外膜囊泡的制备及其抗原性分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33( 1 ): 119-123.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.019

## 铁离子限制下猪胸膜肺炎放线杆菌外膜囊泡的制备及其抗原性分析

周俊明, 何孔旺, 倪艳秀, 祝昊丹, 温立斌, 俞正玉, 茅爱华, 吕立新

(江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为评估猪胸膜肺炎放线杆菌外膜囊泡对小鼠免疫系统的刺激水平, 以铁离子限制下体外培养猪胸膜肺炎放线杆菌 shope 菌株, 经离心、0.22  $\mu\text{m}$  过滤处理后获取无细胞培养上清, 继而超速离心制备细菌释放的外膜囊泡(Outer membrane vesicles, OMV), 以 OMV 作为亚单位疫苗 2 次鼻腔免疫小鼠。结果表明, 通过透射电镜观察可见大部分 OMV 直径在 50 nm 至 100 nm 之间, OMV 免疫小鼠长期增质量与 PBS 免疫组无显著差异, 同时 OMV 不仅能够刺激小鼠血清产生高水平的 IgG, 而且在小鼠肺脏中产生高水平的 IgA。可见, OMV 是一种高效免疫刺激物, 能有效地刺激小鼠肺脏黏膜产生免疫反应。

**关键词:** 猪胸膜肺炎放线杆菌; 外膜囊泡; IgA; 黏膜免疫

中图分类号: S859.79<sup>+</sup>6 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)01-0119-05

## Preparation of out membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions and evaluation of their antigenicity in a murine model

ZHOU Jun-ming, HE Kong-wang, NI Yan-xiu, ZHU Hao-dan, WEN Li-bin, YU Zheng-yu, MAO Ai-hua, LÜ Li-xin

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Engineering Research of Veterinary Bio-products, Ministry of Agriculture/ National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In order to investigate the contribution of outer membrane vesicles (OMV) to adaptive immune responses in mice, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 (shope) was grown under iron restriction with respect to its immunogenic and protective potential. OMV released by shope were concentrated by ultracentrifugation and analyzed by electron microscopy, and OMVs were injected intranasally into Balb/c mice twice with 21 d intervals. The result showed the majority of OMVs' size ranged from 50–100 nm. There was no significant differences between OMV immunized animals and the PBS treated group. The OMV induced a higher IgG response in serum and a higher IgA response in mice lungs. In conclusion, OMV was efficient immunostimulant and could stimulate mice lungs to produce mucosal immune.

**Key words:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*; outer membrane vesicle; IgA; mucosal immune

收稿日期: 2016-03-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303034);

江苏省自主创新探索性研究项目[CX(11)2060]

作者简介: 周俊明(1983-), 男, 江苏东台人, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为动物细菌疫病防治。(Tel) 025-84390988; (E-mail) zhoujm075@163.com

猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)是一种革兰氏阴性菌, 能够引发猪肺炎病,

急性感染猪临床表现严重的呼吸困难、肺部出血和纤维性胸膜炎,病死率高,慢性耐过猪生长迟缓,往往成为隐性病原携带者,该病被公认为危害现代养猪业的重要传染病之一<sup>[1]</sup>。*A. pleuropneumoniae* 主要侵袭呼吸道,而正常呼吸道重要的防御免疫球蛋白为分泌型 IgA, IgA 可以中和黏液中细菌,阻止细菌与黏膜表面粘附,起到免疫清除作用,因此增强机体黏膜免疫反应的免疫策略可提高免疫保护效果<sup>[2-3]</sup>。目前国内外可获得针对 *A. pleuropneumoniae* 的疫苗包括全菌灭活疫苗和 Apx 毒素、蛋白质组合的亚单位疫苗,而大多数灭活全菌疫苗采用肌肉注射<sup>[4-6]</sup>,理论上不能够有效诱发黏膜免疫<sup>[7]</sup>,此外全菌灭活疫苗仅提供血清型特异性的免疫保护,对于不同血清型 *A. pleuropneumoniae* 菌株无交叉保护效果<sup>[4,8]</sup>,使得灭活疫苗的应用存在一定的限制。相比较于灭活疫苗和减毒活疫苗,亚单位疫苗具有更好的安全性,但由于亚单位疫苗仅含有一种或某几种抗原物,单独免疫动物时往往不能在体内诱发较高水平的免疫反应,因此需要通过配合佐剂、偶联多糖或抗原控释等方式改善亚单位疫苗的免疫原性<sup>[9-12]</sup>。通过抗原控释技术处理获得的整合有抗原物的极微小颗粒<sup>[11,13]</sup>,可以较好地刺激机体免疫系统,该技术显现出诱人的应用前景,但需要对抗原进行纯化及包埋,大大增加了产品成本,阻碍了该技术在畜禽疫苗制剂上的应用<sup>[14]</sup>。

革兰氏阴性菌体外培养时能够向培养液中释放一种被称为外膜囊泡 (Out membrane vesicles, OMV) 的膜结合小囊泡, OMV 大小从 20 nm 到 250 nm 不等,其组成包含毒素、酶、黏附素、DNA、部分外膜蛋白和胞质成分。尽管目前对于 OMV 生物合成的途径还不清楚,但是 OMV 能够刺激免疫系统<sup>[15]</sup>,并且具有类似于控释技术处理的抗原效果,在许多病原菌研究中将其列为疫苗候选物进行评估<sup>[16]</sup>。2013 年欧洲药品管理局 (EMA) 批准的 B 群脑膜炎疫苗 Bexsero,其中即含有 OMV 成分<sup>[17]</sup>。另外,病原菌进入机体后,将会受到新环境的信号刺激,产生一系列因子,譬如 *A. pleuropneumoniae* 仅在铁离子限制的生长环境下,才能表达转铁结合蛋白 (Transferrin binding protein B, TbpB), 而 TbpB 业已被证实为一种较好的免疫保护物<sup>[18]</sup>。OMV 的形成同样会受到环境因素的影响,研究发现以 EDTA 螯合培养基中细菌生长所需的离子物

质后,刺激了恶臭假单胞菌的 OMV 的释放<sup>[19]</sup>。本研究拟制备 *A. pleuropneumoniae* 在铁离子限制下释放的 OMV,并以小鼠为模型,评估制备的 OMV 对动物免疫系统的刺激能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌菌株及培养

猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型 shope 菌株购自中国兽医药品监察所,培养基为含有终浓度 100  $\mu\text{g/ml}$  烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD, 南京生兴生物技术有限公司产品) 的 Todd Hewitt Broth (THB, 美国 BD 公司产品)。

将 shope 菌株的冻干菌种划线接种于 THB (含 NAD) 固体培养基, 5%~10%  $\text{CO}_2$  条件下 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16~18 h。将固体培养基上 5~8 个单菌落接种至 6 ml THB (含 NAD) 液体培养基, 180 r/min 振荡培养 6~8 h。随后将培养物以 1% 比例接种至 400 ml THB (含 NAD) 液体培养基, 180 r/min 振荡培养。参照文献<sup>[20]</sup>,待细菌培养至对数生长期 ( $OD_{600}$  约为 0.2) 时,在培养基中添加终浓度 150  $\mu\text{mol/L}$  二乙烯三胺五乙酸钙三钠盐合物 (Sigma 公司产品),形成铁离子限制环境,继续 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养约 14~16 h。

### 1.2 外膜囊泡 (OMV) 的分离

参照文献<sup>[21]</sup>略作修改,对 shope 菌株释放的外膜囊泡进行分离。首先收集细菌培养物, 4  $^{\circ}\text{C}$  8 819 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,0.22  $\mu\text{m}$  过滤上清,获得无细胞上清物; 4  $^{\circ}\text{C}$  35 000 r/min 超速离心 3 h (Ti 45 型转头, Beckman 离心机),弃去上清,沉淀以适量 9.5 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 重悬;再次 4  $^{\circ}\text{C}$  35 000 r/min 超速离心 3 h,弃去上清,沉淀重悬于 3 ml PBS 缓冲液,即为制备的细菌外膜囊泡, -70  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 OMV 蛋白质定量及电镜观察

参照 RC DC protein assay 试剂盒 (Bio-rad 公司产品) 说明书,以牛血清白蛋白为蛋白质标准品,测定制备的外膜囊泡蛋白质浓度。以 PBS 缓冲液稀释外膜囊泡蛋白质浓度至 0.02 mg/ml,取该浓度下外膜囊泡 5  $\mu\text{l}$ ,吸附于碳涂层的铜载网 15 s,弃去溢出液,样品以 2% 乙酸双氧铀负染 15 s,弃去溢出液。用透射电镜 (JEOL-1010, 日本电子株式会社产品) 观察外膜囊泡负染下的形态。

### 1.4 小鼠免疫及体质量监测

购买5周龄清洁级雌性 BALB/c 小鼠(扬州大学比较医学中心)20只,随机分为2组,每组10只,其中1组鼻腔注射20  $\mu$ l PBS 缓冲液,另1组鼻腔注射20  $\mu$ l 制备的外膜囊泡。首次免疫后21 d,同法再进行1次加强免疫。小鼠免疫后42 d内,每周监测小鼠的体质量,对2组间小鼠体质量的差异进行非匹配双尾  $t$  检验。

### 1.5 样品采集及 ELISA 测定

首次免疫后21 d、42 d,随机采集各组5只小鼠的血液,血液37  $^{\circ}$ C静置1 h后,4  $^{\circ}$ C静置过夜,4  $^{\circ}$ C 4 600 r/min 离心10 min,收集上清制备小鼠血清。另外于首次免疫后42 d,每组随机各选3只小鼠,无菌分离小鼠肺脏,通过气管将1 ml PBS 缓冲液注入肺脏中,令肺脏充盈,制备肺泡盥洗液(Respiratory tract washings, RTW),肺泡盥洗液于4  $^{\circ}$ C 4 600 r/min离心10 min,弃去细胞碎片,收集上清。

用碳酸盐缓冲液(100 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 46 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.6)稀释 OMVs 至蛋白质浓度0.35  $\mu$ g/ml,以每孔100  $\mu$ l加入酶标板中,4  $^{\circ}$ C反应16~18 h,倾去包被液,酶标板中加入200  $\mu$ l PBST 洗液,室温反应5 min,倾去洗液,同法再次洗涤,共计3次,于酶标板中加入封闭液(1%的明胶),每孔200  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C反应1 h,倾去封闭液,同上以 PBST 洗涤,酶标板中加入一抗,即1%脱脂奶粉和100倍稀释的小鼠血清或4倍稀释的小鼠肺泡盥洗液(经过系列倍比稀释摸索最佳稀释度),每孔100  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C反应1 h,倾去一抗,同上以 PBST 洗涤,酶标板中加入用 PBST 洗液2 000倍稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG(南京诺维赞生物科技有限公司产品)或400倍稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgA 二抗(Abcam 公司产品)(经过系列倍比稀释摸索最佳稀释度),每孔100  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C反应1 h,倾去二抗,同上以 PBST 洗涤,酶标板中加入 TMB 底物显色液,每孔100  $\mu$ l,室温显色15 min,于酶标板中加入2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,每孔50  $\mu$ l,终止显色,酶标仪读取酶标板各孔  $OD_{450}$  值。

### 1.6 统计分析

对 ELISA 数据进行统计分析,数值以平均值 $\pm$ 标准误差显示,组间差异比较运用非匹配双尾  $t$  检验,当  $P<0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 外膜囊泡蛋白质定量及电子显微结构

制备铁离子限制下 shope 菌株释放的外膜囊泡,RC DC protein assay 试剂盒检测显示,该外膜囊泡的蛋白质浓度为0.035 mg/ml。以乙酸双氧铀负染后,用透射电镜观察外膜囊泡形态,可见多数囊泡颗粒物直径介于50 nm至100 nm之间(图1)。

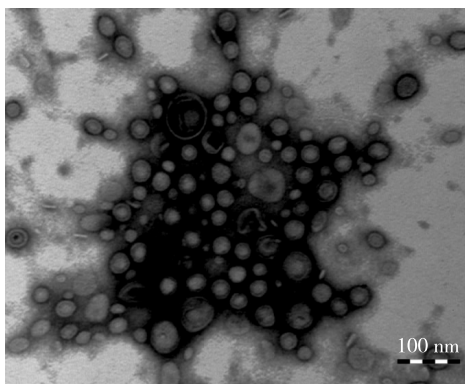


图1 猪胸膜肺炎放线杆菌外膜囊泡的透射电镜观察

Fig.1 Transmission electronic microscopy image of negatively stained outer membrane vesicles obtained from *Actinobacillus pleuropneumoniae*

### 2.2 外膜囊泡免疫小鼠的体质量比较

监测小鼠免疫后42 d内每周体质量,结果显示初次免疫及二次免疫后7 d,外膜囊泡免疫组小鼠体质量显著低于 PBS 免疫组,其他时间点两个免疫组之间体质量无显著差异(图2)。说明外膜囊泡仅于免疫后较短时间内影响小鼠的体质量,后期小鼠体质量能够恢复正常水平。

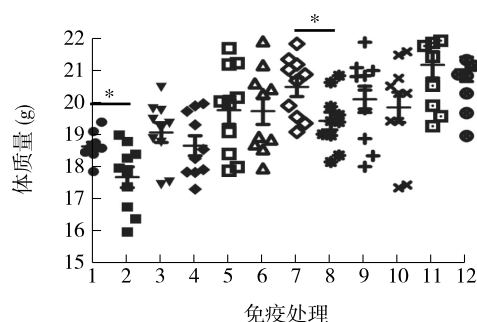
### 2.3 免疫小鼠诱发的 OMV 特异性抗体反应

比较 PBS 与 OMV 免疫小鼠血清或肺泡盥洗液中 OMV 特异性抗体的产生情况,结果显示,OMV 免疫小鼠血清及肺泡盥洗液中 IgG 及 IgA 抗体水平均显著提高表达(图3、图4)。说明 OMV 是1种高效免疫刺激物,不仅能够刺激小鼠血清产生高水平的 IgG,而且在小鼠肺脏中也能产生高水平的 IgA。

## 3 讨论

铁离子调控多种病原细菌毒力因子的表达,在猪胸膜肺炎放线杆菌的研究中,即有学者<sup>[22]</sup>提出通过铁离子限制的培养方式获取更可靠的保护性抗

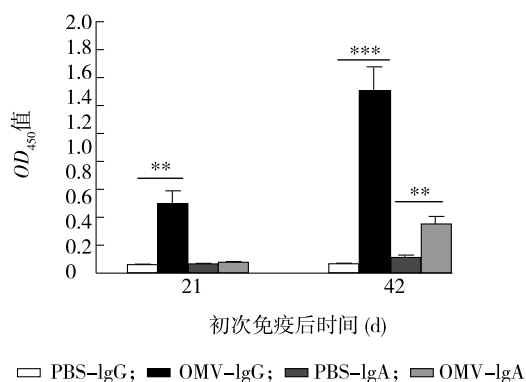




1:PBS 首免后 7 d;2:OMV 首免后 7 d;3:PBS 首免后 14 d;4:OMV 首免后 14 d;5:PBS 首免后 21 d;6:OMV 首免后 21 d;7:PBS 首免后 28 d;8:OMV 首免后 28 d;9:PBS 首免后 35 d;10:OMV 首免后 35 d;11:PBS 首免后 42 d;12:OMV 首免后 42 d。  
\* 表示两组间差异达到 0.05 显著水平。

图 2 小鼠免疫外膜囊泡后体重变化

Fig.2 Changes of body weight in mice after being immunized by outer membrane vesicles

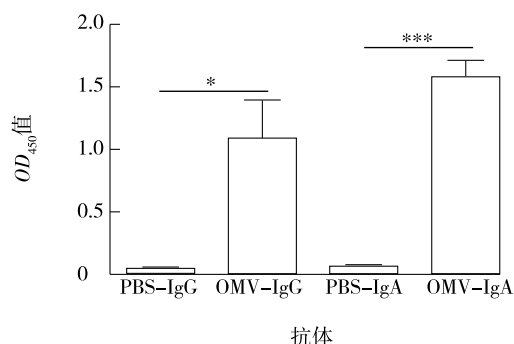


\*\*、\*\*\* 分别表示两组间差异达到 0.01 和 0.001 显著水平。

图 3 小鼠血清外膜囊泡 ELISA 抗体检测

Fig.3 Serum ELISA reactivity in control and immunized mice against OMV

原,并且通过动物实验证实铁离子限制下培养该菌后,经去垢剂处理获取的无细胞上清物为有效的保护性抗原。本研究制备了铁离子限制下 *shope* 菌株释放的外膜囊泡,囊泡直径大部分介于 50 nm 至 100 nm 之间,这使其能够进入淋巴管并被抗原递呈细胞所识别<sup>[23]</sup>,囊泡内含有刺激体液或细胞免疫的天然物质,以该囊泡鼻内免疫小鼠,不仅能够刺激小鼠血清产生高水平的 IgG,而且在小鼠肺脏中产生高水平的 IgA,有效地诱发小鼠肺脏的黏膜免疫,而黏膜免疫正是目前灭活疫苗及亚单位疫苗应用掣肘的重要因素。



\*、\*\*\* 分别表示两组间差异达到 0.05 和 0.001 显著水平。

图 4 初次免疫后 42 d 小鼠肺泡盥洗液外膜囊泡抗体水平

Fig.4 Respiratory tract washings antibody levels in immunized mice against OMV on 42 d after primary immunization

有研究结果显示以霍乱弧 dOMV<sub>C</sub> 和伤寒沙门氏菌多糖 Vi(PsVi)联合经鼻腔免疫小鼠后,能够诱发机体黏膜免疫,同时小鼠能够产生等同于抗伤寒菌苗 vax-TyVi<sup>®</sup> (Finlay Institute) 免疫小鼠的特异性抗 PsVi 的 IgG,而 vax-TyVi<sup>®</sup> 不能诱发黏膜免疫,提示 dOMV<sub>C</sub>可作为黏膜佐剂,增强类似于 PsVi 的多糖抗原的免疫反应<sup>[24]</sup>。另外将肺炎链球菌表面蛋白 PspA 表达于肠道沙门氏菌胞质内,该沙门氏菌形成的 OMV 能够捕获细菌胞质蛋白质中的 PspA,以此 OMV 鼻内免疫小鼠后,受免小鼠能够产生针对肺炎链球菌的抵抗力,而单独 PspA 或不含 PspA 的肠道沙门氏菌外膜囊泡免疫小鼠不能够受到保护<sup>[25]</sup>。同样,本研究结果表明铁离子限制下的猪胸膜肺炎放线杆菌外膜囊泡为一种高效免疫刺激物,这为其进一步应用研究奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] SEBUNYA T N, SAUNDERS J R. Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine: a review [J]. J Am Vet Med Assoc, 1983, 182: 1331-1337.
- [2] PILETTE C, OUADRHIRI Y, GODDING V, et al. Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited [J]. European Respiratory Journal, 2001, 18: 571-588.
- [3] WOOF J M, KERR M A. The function of immunoglobulin A in immunity [J]. Journal of Pathology, 2006, 208: 270-282.
- [4] JOLIE R A V, MULKS M H, THACKER B J. Cross-protection experiments in pigs vaccinated with actinobacillus-pleuropneumoniae subtypes 1a and 1b [J]. Vet Microbiol, 1995, 45: 383-391.
- [5] FURESZ S E, MALLARD B A, BOSSE J T, et al. Antibody- and cell-mediated immune responses of Actinobacillus pleuropneumoniae-infected and bacterin-vaccinated pigs [J]. Infect Immun,

- 1997, 65: 358-365.
- [6] VAN DEN BOSCH H, FREY J. Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs [J]. Vaccine, 2003, 21: 3601-3607.
- [7] HENSEL A, STOCKHOFEZURWIEDEN N, PETZOLDT K, et al. Oral Immunization of pigs with viable or inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype-9 induces pulmonary and systemic antibodies and protects against homologous aerosol challenge [J]. Infect Immun, 1995, 63: 3048-3053.
- [8] FENWICK B, HENRY S. Porcine pleuropneumonia [J]. J Am Vet Med Assoc, 1994, 204: 1334-1340.
- [9] O'HAGAN D T, VALIANTE N M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2: 727-735.
- [10] KOSER M L, MCGETTIGAN J P, TAN G S, et al. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 9405-9410.
- [11] SINGH M, CHAKRAPANI A, O'HAGAN D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems [J]. Expert Review of Vaccines, 2007, 6: 797-808.
- [12] GUY B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research [J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5: 505-517.
- [13] JABBAL-GILL I, LIN W, KISTNER O, et al. Polymeric lamellar substrate particles for intranasal vaccination [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 51: 97-111.
- [14] CHABALGOITY J A. Paving the way for the introduction of new vaccines into developing countries [J]. Expert Review of Vaccines, 2005, 4: 147-150.
- [15] ELLIS T N, KUEHN M J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010, 74: 81-94.
- [16] VAN DER POL L, STORK M, VAN DER LEY P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology [J]. Biotechnology Journal, 2015, 10: 1689-1706.
- [17] O'RYAN M, STODDARD J, TONEATTO D, et al. A multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): The clinical development program [J]. Drugs, 2014, 74: 15-30.
- [18] GERLACH G F, ANDERSON C, POTTER A A, et al. Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Infection and Immunity, 1992, 60: 892-898.
- [19] BAUMGARTEN T, SPERLING S, SEIFERT J, et al. Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E Cell surface hydrophobicity and biofilm formation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 17: 6217-6224.
- [20] BUETTNER F F R, KONZE S A, MAAS A, et al. Proteomic and immunoproteomic characterization of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Proteome Science, 2011, 9: 23.
- [21] NEGRETE-ABASCAL E, GARCIA R M, REYES M E, et al. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 191: 109-113.
- [22] GOTHE R, GONZÁLES O F, LINDNER T, et al. A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction [J]. Vaccine, 2001, 19: 966-975.
- [23] BACHMANN M F, JENNINGS G T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns [J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10: 787-796.
- [24] ACEVEDO R, CALLICÓ A, ARANGUREN Y, et al. Immune adjuvant effect of *V. cholerae* O1 derived proteoliposome coadministered by intranasal route with Vi polysaccharide from *Salmonella* Typhi [J]. BMC Immunology, 2013, 14: 10.
- [25] MURALINATH M, KUEHN M J, ROLAND K L, et al. Immunization with *Salmonella enterica* serovar typhimurium-derived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae* [J]. Infection and Immunity, 2011, 79: 887-894.

(责任编辑:张震林)