

· 短篇论著 ·

铜绿假单胞菌外膜蛋白疫苗的制备

廖立新 曹郁生 李国辉 陈燕

铜绿假单胞菌是一种常见的重要条件致病菌,当机体抵抗力下降、免疫缺陷、代谢性疾病、恶性肿瘤以及烧伤后,均容易引起感染,导致威胁生命的感染性休克。近年来,外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)备受关注^[1]。OMP 疫苗不仅具有良好的免疫原性,还有很好的交叉保护作用^[2,3],对严重烧伤患者也具有保护作用,并能产生高滴度的抗体^[4]。本研究拟通过实验证实铜绿假单胞菌 OMP 的免疫效果。

一、材料与与方法

1. 菌种:铜绿假单胞菌(CMCC 10104)菌株由中国药品生物制品鉴定所提供。

2. OMP 抗原的制备:将文献[5]的方法略加改进后用上述菌株来制备 OMP 抗原。

3. 动物的免疫:将 4 只日本大耳白兔(江西省实验动物中心)随机分成 50 μg/kg(A 组)、250 μg/kg(B 组)两个 OMP 抗原免疫剂量组,每组 2 只。免疫部位包括兔背部、腹股沟、足底皮下等处,行多点注射。共免疫 3 次,第 1 天免疫接种有完全福氏佐剂的 OMP 抗原,第 4、7 天接种不完全福氏佐剂的 OMP 抗原。

4. 抗体的分离:首次免疫后第 7 天起,每隔 7 d 采集兔血清分离血清 1 次,至第 56 天。

5. 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测抗体效价:包被 OMP 浓度为 1 mg/L,一抗为 1:200 稀释的抗血清,二抗为标记有辣根过氧化物酶的羊抗兔 IgG(1:2 000)。以空白对照调零,波长 492 nm 下测定吸光度(A)值。以抗血清 A 值的两倍为阴性血清的 A 值时,其最大稀释倍数作为抗体效价。

6. 玻片凝集试验:将浓度为 9.2×10^{11} 集落形成单位(CFU)/L 铜绿假单胞菌的等渗盐水悬液与用等渗盐水倍比稀释的抗血清在微量滴定板上混匀,室温放置 10 min,按常规判定效价。

7. 保护实验:(1)半数致死量(LD₅₀)的确定:用细胞计数板在显微镜下测定细菌浓度,设计 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 5 个稀释度^[2]。根据文献[3]的方法,本研究用 5~6 周雄性小鼠(江西省实验动物中心)30 只,体重 20~25 g,设 5 个稀释组和等渗盐水对照组,每组 5 只。在各组小鼠腹腔内注射 1 ml 菌液,观察 4 d。计算 LD₅₀(lgLD₅₀ = 高于 50% 死亡的稀释度对数 + 距离比例 × 稀释系数的对数)。(2)半保护剂量(PD₅₀, 用 A 组兔免疫后 56 d 的血清)的测

定:另取 30 只小鼠,取其中 25 只小鼠作为 5 个稀释组,腹腔内注射 1 ml 原血清或 2 倍稀释梯度的血清,余下 5 只小鼠注射等量空白血清作为等渗盐水对照组。2 h 后注射 30~40 倍 LD₅₀ 的菌液 1 ml,观察 4 d,计算其死亡数及 PD₅₀。

二、结果

1. 抗体效价:用 OMP 免疫后 7 d 大耳兔即有抗体产生,且 >1:1 000;B 组免疫后 7~14 d 效价略高于 A 组,但 21 d 明显低于 A 组,42 d 效价达顶峰,并维持至 56 d。见表 1。

2. 玻片凝集试验:抗体能与铜绿假单胞菌产生凝集,并产生较高的效价(表 2)。

表 2 两组兔抗体玻片凝集试验的效价比较

组别	兔数 (只)	免疫后时间(d)							
		7	14	21	28	35	42	49	56
A 组	2	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
B 组	2	1:1	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16

注:A 组注射 OMP 抗原 50 μg/kg, B 组注射 OMP 抗原 250 μg/kg

3. 保护实验:LD₅₀ 为 6.3×10^9 CFU/L。等渗盐水对照组 5 只小鼠均死亡,LD₅₀ 测定存活小鼠共 17 只(表 3)。PD₅₀ 测定存活小鼠 19 只(表 4)。半保护血清稀释度为 1:21,相当于 0.05 ml 血清。

表 3 LD₅₀测定结果

菌液稀释度	接种鼠(只)	存活鼠(只)	死亡率(%)
1×10^{-1}	5	0	100
1×10^{-2}	5	2	60
1×10^{-3}	5	5	0
1×10^{-5}	5	5	0
1×10^{-6}	5	5	0

表 4 PD₅₀测定结果

菌液稀释度	接种鼠(只)	存活鼠(只)	死亡率(%)
1×2^{-1}	5	5	0
1×2^{-2}	5	5	0
1×2^{-3}	5	5	0
1×2^{-4}	5	4	20
1×2^{-5}	5	0	100

三、讨论

OMP 是嵌合在脂多糖和磷脂层外膜上的蛋白,其参与微

表 1 两组兔抗体效价比较

组别	兔数 (只)	免疫后时间(d)							
		7	14	21	28	35	42	49	56
A 组	2	1:1 280	1:5 120	1:20 480	1:40 960	1:40 960	1:163 840	1:163 840	1:163 840
B 组	2	1:2 560	1:10 240	1:10 240	1:10 240	1:20 480	1:81 920	1:81 920	1:81 920

注:A 组注射 OMP 抗原 50 μg/kg, B 组注射 OMP 抗原 250 μg/kg

作者单位:330006 南昌,江西医学院附属第一医院烧伤科(廖立新、李国辉);江西中德联合研究院(曹郁生、陈燕)

孔及其他结构的形成,并具有不同功能。细菌外膜与宿主免疫活性细胞的相应膜受体相互作用,刺激细胞和体液免疫的形成,可作为细菌疫苗的候选蛋白。陈洁等^[1]证实 OMP 疫苗对幽门螺杆菌感染具有免疫保护作用。

铜绿假单胞菌是一种导致院内感染最常见的重要条件致病菌,易引起威胁生命的感染性休克。因此寻找有效的防治方法极为重要。本研究制备的铜绿假单胞菌 OMP 具有较强的免疫原性,注射后 1 周即产生较高的抗体效价,而且还有较强的免疫保护作用。保护实验结果表明,A 组兔免疫后 56 d 血清的半保护剂量为 0.05 ml,这将为临床防治铜绿假单胞菌提供一条新思路。

参 考 文 献

1 陈洁,陈旻湖,朱森林,等. 外膜蛋白疫苗对幽门螺杆菌感染的免

疫保护作用. 胃肠病学,2001,6:75-77.

2 Park WJ, Cho YJ, Kim YG, et al. Active and passive protective effect of CFC-101 (Pseudomonas vaccine) in mice. J Appl Pharmacol, 1994, 2: 326-330.
 3 Lee NG, Bhn BY, Jung SB, et al. Human anti-Pseudomonas aeruginosa outer membrane proteins IgG cross-protective against infection with heterologous Immunotype strains of P. Aeruginosa. FEMS Immunol And Med Microbiol, 1999, 25: 339-347.
 4 Lee NG, Jung SB, Ahn BY, et al. Immunization of burn-patients with a pseudomonas aeruginosa outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. Vaccine, 2000, 18: 1952-1961.
 5 廖立新,曹郁生,李国辉,等. 一种快速粗提铜绿假单胞菌外膜蛋白的简便方法. 江西医学院学报, 2003, 43: 60-61.

(收稿日期:2003-09-06)

(本文编辑:苟学萍)

兔角膜碱烧伤后早期尿激酶型纤溶酶原激活剂及其受体的表达

严军 杨恬 曾益军 杨进

作为纤溶酶原激活剂/纤溶酶原激活剂抑制剂(plasminogen activator /plasminogen activator inhibitor, PA/PAI)级联的重要因子,尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase type PA, uPA)及其受体 uPA-R 具有高效的分解细胞外环境蛋白酶的作用。研究表明, uPA 和 uPA-R 在角质形成细胞的迁移、增殖、分化以及重建上皮组织等方面发挥着十分重要的作用^[1],但有关它们在角膜碱烧伤中的作用鲜见报道。本实验对兔角膜碱烧伤后早期 uPA 和 uPA-R 的表达进行了研究。

一、材料与方 法

1. 角膜上皮细胞的分离和培养:空气注射法处死健康新西兰大白兔(第三军医大学实验动物中心),分离角膜上皮细胞,组织块法常规培养。

2. 体外实验分组、碱烧伤模型建立和免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)研究:原代角膜上皮细胞随机分为实验组(20 瓶)和对照组(5 瓶)。实验组细胞待长满瓶壁后用 0.1 mol/L NaOH(25 ml 培养瓶加入 0.2 ml NaOH)处理 1.5 min 模拟碱烧伤。伤后 6、12、24、48 h 在 4℃ 条件下用丙酮固定(每个时相点 5 瓶),以备后续实验。对照组细胞用无菌等渗盐水处理,48 h 后固定,方法同实验组。利用 uPA 和 uPA-R 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)和 ICC 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)检测体外条件下 uPA 和 uPA-R 的表达^[2]。采用 TIGERTM 细胞图像仪和分析软件 Version 3.3(重庆大学信息通信技术中心)检测阳性结果的平均吸光度(A)值。

3. 体内实验分组、碱烧伤模型建立和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)研究:健康新西兰大白兔 35 只,随机分为实验组(30 只)和对照组(5 只)。实验组兔用 20 g/L

异戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg)麻醉,0.1 mol/L NaOH 处理角膜以达到 IV 级烧伤标准^[3]。实验组兔在碱烧伤后 6、12、24、48、96、192 h 处死,每时相点 5 只,取角膜固定后包埋切片,行 HE、二氨基联苯胺(DAB)染色并作镜下观察^[4]。对照组兔用等渗盐水处理角膜,处理后 192 h 取角膜,同上切片并观察。利用 uPA 和 uPA-R 单克隆抗体和 IHC 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)检测体内条件下 uPA 和 uPA-R 的表达^[2],并同前进行图像分析。

4. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 student t 检验对结果行显著性差异分析。

二、结果

1. 体外研究中 uPA 和 uPA-R 的表达:uPA 和 uPA-R 在碱烧伤后 6 h 的表达均较低且稳定;碱烧伤后 12 h,二者的表达量明显升高($P < 0.05$),至伤后 24 h 达到最大值;伤后 24—48 h, uPA 和 uPA-R 的表达又迅速下降。见表 1。

表 1 体外研究中兔角膜上皮细胞碱烧伤后 uPA 和 uPA-R 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(瓶)	uPA	uPA-R
对照组	5	0.51 ± 0.11	0.45 ± 0.08
实验组			
伤后 6 h	5	0.57 ± 0.15 [#]	0.57 ± 0.13 [#]
伤后 12 h	5	0.68 ± 0.15 ^{**}	0.73 ± 0.13 ^{**}
伤后 24 h	5	2.67 ± 0.69 [*]	2.78 ± 0.40 [*]
伤后 48 h	5	1.09 ± 0.21 ^{**}	1.36 ± 0.29 ^{**}

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与伤后 24 h 比较, # $P < 0.01$

2. 体内研究中 uPA 和 uPA-R 的表达:病理切片显示,碱烧伤 12 h 时,上皮细胞的最外侧发生不同程度的凹陷,上皮细胞收缩、胞核拉长,细胞排列无序,并有向基底面聚集的趋势(图 1)。uPA 和 uPA-R 在体内的表达规律与体外表达相似,但表达量明显低于体外研究结果。碱烧伤 48 h 以后,二

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054204)
 作者单位:400038 重庆,第三军医大学基础部细胞生物学教研室
 通信(讯)作者:杨恬, Email: tiany@163.net, 电话: 023-68752260