

布鲁菌蛋白抗原的研究进展

肖林萍 兰英华

摘要 布鲁菌病在世界众多国家中广泛流行,严重威胁人类健康,由于缺乏特异性临床表现和敏感度较高的诊断方法,易造成误诊、漏诊。近年来国内外对布鲁菌蛋白抗原的研究层出不穷,增加对布鲁菌蛋白的认识、寻找免疫原性和免疫反应性更强的抗原,不仅有助于探索可用于人类的有效的布鲁菌疫苗,而且有助于新的、敏感度更高的诊断方法的研发。本文对目前具有诊断意义的布鲁菌蛋白抗原进行综述。

关键词 布鲁菌 蛋白抗原 外膜蛋白 菌体蛋白

中图分类号 R516.7

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.04.034

布鲁菌病是一种人兽共患传染病,有多种临床表现,如波状热、多汗、肝脾肿大、淋巴结肿大、关节炎、睾丸炎等,累及多个系统,由于缺乏特异性表现和敏感度较高的诊断方法,极易造成误诊、漏诊,贻误治疗。目前布鲁菌血清学诊断方法主要应用布鲁菌脂多糖(LPS)作为诊断性抗原,但此抗原与耶尔森菌、志贺菌、霍乱弧菌的成分存在交叉反应,易造成假阳性,而且在患者痊愈后数月甚至数年检验结果仍可能为阳性,不利于区别现症感染与既往感染。因此,为准确诊断布鲁菌病必须找到免疫原性和免疫反应性更强的布鲁菌蛋白抗原。

一、外膜蛋白

布鲁菌的细胞膜由3层膜结构组成,从内向外依次为细胞质膜、外周胞质膜和外膜。布鲁菌的外膜是由脂多糖(LPS)、外膜蛋白(Omp)、孔蛋白共价结合于磷脂双分子层构成的^[1,2]。布鲁菌表面的蛋白最早与宿主细胞相互作用,不仅可以诱导细胞免疫反应,也可以诱导机体产生特异性抗体^[3]。目前已确定的外膜蛋白共有7种,依据相对分子质量将其分为3组。

1. 第1组外膜蛋白:相对分子质量为10、18、19kDa,分别为Omp10、Omp16、Omp19,均为脂蛋白^[2,7]。布鲁菌脂蛋白可激发单核-吞噬细胞和树突状细胞分泌细胞因子,在诱导宿主细胞产生炎症反应过程中发挥着重要作用^[4,5]。韩国的一项研究应

用重组外膜蛋白rOmp10、rOmp19、rOmp28进行实验,体外实验发现经3种蛋白抗原刺激后,RAW-264.7细胞的TNF- α 和IL-6分泌水平明显升高。分组进行小鼠免疫接种后,发现抗体水平在3组免疫小鼠中均有明显升高,而且IgG1和IgG2a水平随着免疫时间延长而逐渐升高,说明免疫反应由Th-1介导转变为Th-2介导^[6]。该研究说明了Omp10、Omp19在体内和体外实验中均具有免疫反应性,其免疫学特性及其应用需进一步探究。

Alizadeh等^[7]应用重组布鲁菌外膜蛋白rOmp16免疫注射小鼠发现IgG水平显著升高,且免疫小鼠离体脾脏细胞经rOmp16再次刺激后,IFN- γ 和IL-4分泌水平升高。免疫4周后,人为造成免疫小鼠布鲁菌感染14天,之后取小鼠脾脏细胞对布鲁菌菌落进行计数,发现经rOmp16免疫小鼠脾脏菌落数平均为0.12 Log CFU,而未经免疫小鼠脾脏菌落数平均为4.93 Log CFU。该研究说明了Omp16是一种潜力抗原,能够激发显著的抗体反应,同时免疫小鼠分泌高水平的IFN- γ ,说明rOmp16能够激发Th1免疫反应。

2. 第2组外膜蛋白:相对分子质量为36~38kDa,主要为Omp2,其本质为孔蛋白。第2组外膜蛋白的编码基因由2个基因组构成,分别为Omp2a和Omp2b,其基因相似性超过85%^[1,2]。Prachi等^[8]研究显示,rOmp2a诊断人类布鲁菌病的敏感度为93.75%,特异性为95.83%,说明Omp2a可以作为人类布鲁菌病血清学诊断抗原应用于临床。

有研究者利用生物信息学方法预测出Omp2b的T-B细胞联合表位,对30例布鲁菌病患者进行ELISPOT实验和ELISA实验。实验结果显示,T-B

基金项目:黑龙江省博士后科研启动基金资助项目(LBH-Q16156)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第一医院

通讯作者:兰英华,教授,硕士生导师,电子信箱:lan_yinghua@

163.com

细胞联合表位能够诱导布鲁菌病患者 T 细胞分泌高水平的 IFN- γ , 并引发布鲁菌病患者产生高水平特异性抗体^[9]。该研究证实了 Omp2b 具有免疫原性, 能够诱导细胞免疫应答, 可以作为布鲁菌病的候选疫苗, 也可以利用其免疫特性作为诊断性抗原。

3. 第 3 组外膜蛋白: 相对分子质量为 31 ~ 34kDa、25 ~ 27kDa, 包括 Omp25、Omp28、Omp31^[1,2]。Yousefi 等^[10]对 Omp25 和 BLS(二氧四氢蝶啶合酶)布鲁菌嵌合体抗原进行免疫评估。BLS 广泛存在于各型布鲁菌细胞质中, 是一种有佐剂性质的免疫原性蛋白, 能够诱导免疫小鼠 Th1 和 Th2 免疫反应^[10,11]。该研究分组进行小鼠免疫实验, 其中 Omp25-BLS 嵌合体抗原组 IgG1、IgG2a 水平均高于其他实验组。细胞免疫方面, Omp25-BLS 嵌合体抗原联合 HSP60 组的淋巴细胞增殖数目和 TNF- α 分泌水平最高, 说明其诱导细胞免疫应答作用较强。

Omp28 又称 Bp26, 广泛存在于各型布鲁菌中, 被认为是最具潜力的血清学诊断性抗原^[12-14]。现有血清学诊断依赖 LPS 或整个细胞提取物, 易造成假阳性, 为突破这一瓶颈, 许多研究应用重组布鲁菌抗原 rOmp28 进行 ELISA 试验检测布鲁菌。其中 Thavaselvam 等^[13]研究发现, rOmp28 iELISA 试验敏感度、特异性分别为 97.50% 和 85.59%, 点印迹 ELISA 试验敏感度、特异性分别为 82.05% 和 92.43%。该方法的敏感度、特异性都比虎红试验和试管凝集试验高。Tiwari 等^[14]应用重组布鲁菌抗原 rOmp28 和 rOmp31 进行 iELISA 试验, rOmp28 诊断敏感度、特异性分别为 91.6% 和 97.6%, rOmp31 诊断敏感度、特异性分别为 62.2% 和 94.7%。以上研究证实了 Omp28 诊断敏感度、特异性更高, 更有潜力应用于临床诊断。

Omp31 存在于除牛种布鲁菌之外的所有布鲁菌菌株中, 具有免疫保护和免疫诊断潜力, 是重要的免疫原性蛋白^[15-17]。Zhang 等^[17]应用生物信息学技术筛选得到了 Omp31 的 T 细胞表位、B 细胞表位和 T-B 细胞联合表位, 经鼻黏膜免疫小鼠。经 Omp31 的 B 细胞表位和 T-B 细胞联合表位免疫后 IgG1、IgG2a 水平显著升高, 经 Omp31 的 T 细胞表位和 T-B 细胞联合表位免疫后呼吸系统淋巴结和脾脏中 IFN- γ 分泌细胞数目增多。人为应用感染经 3 类表位免疫后小鼠, 小鼠体内细菌量明显少于阴性对照组。该研究证实 Omp31 的免疫原性, 既可以诱导体液免疫, 也可以诱导细胞免疫, 保护机体免受布鲁菌感染。因此, 可作为特异性抗原应用于布鲁菌病的诊断和新型

疫苗的开发。

二、菌体蛋白

除了上述布鲁菌外膜蛋白外, 还有一些菌体蛋白同样具有免疫原性, 其中 Cu/Zn 超氧化物歧化酶、二氧四氢蝶啶合酶(BLS)、热休克蛋白(HSP60)已在前文中提及。

1. IV 型分泌系统: 是布鲁菌毒力因子的重要组成部分, 是由 12 种蛋白(VirB1 ~ VirB12)构成的蛋白复合体, 能够帮助布鲁菌躲避宿主的免疫监视, 形成持续性感染, 其效应蛋白能够促进细胞因子产生, 利于布鲁菌在细胞之间扩散^[18]。国外一项研究通过生物信息学技术筛选出可以被布鲁菌病患者血清识别的 50 种蛋白质, 利用免疫表位数据库对 50 种蛋白质进行优势表位预测, 应用优势表位进行酶联免疫斑点试验(ELISPOT)。结果表明经 IV 型分泌系统中的 VirB5 蛋白特定表位刺激后, 急性与复发布鲁菌病患者的 IFN- γ 水平显著升高^[19]。Mirkalantari 等^[20]应用重组布鲁菌抗原 rVirB12 对收录的布鲁菌病患者进行 ELISA 试验, 该方法诊断的特异性、敏感度、准确率分别为 87.8%、94.0% 和 90.0%。以上研究表明布鲁菌 IV 型分泌系统中的 VirB5 蛋白能够激发细胞免疫反应, 通过检测相关细胞因子分泌水平可以诊断布鲁菌病, 并且证实了 VirB12 蛋白具有布鲁菌血清学诊断潜力。

2. L7/L12 蛋白: 是布鲁菌核糖体的重要组成部分, 参与蛋白质的合成过程, 能够介导细胞免疫反应和体液免疫反应, 使得 CD4⁺T 细胞增殖, IFN- γ 分泌增多。Senevirathne 等^[21]应用布鲁菌 L7/L12 抗原设计了一种布鲁菌疫苗。实验结果显示, 沙门菌分泌—转运系统携带 L7/L12 抗原组小鼠 IgA、IgG 产生水平显著升高, 且细胞因子 IFN、IL-4 分泌水平同样显著升高。实验小鼠免疫 21 天后, 人为应用布鲁菌感染小鼠 14 天后, 取小鼠脾脏、肝脏细胞进行布鲁菌菌落计数, 免疫组小鼠的菌落计数明显降低。以上研究说明 L7/L12 具有免疫原性, 经特异性地转运至细胞或组织中, 可以更加高效地诱导机体产生体液免疫反应和细胞免疫反应, 进而应用于新型疫苗研发。

3. P39 蛋白: 是结合蛋白依赖转运系统的一种结合蛋白, 在蛋白质折叠和应激保护中发挥重要作用。Tadepalli 等^[22]应用混合重组布鲁菌抗原 rOmp19 + rP39 进行布鲁菌感染小鼠体内免疫实验, 发现免疫后小鼠体内抗体水平升高, 且以 Th1 免疫反应介导的

亚型 IgG2a 为主。分离免疫小鼠脾脏细胞, rOmp19 + rP39 联合免疫组小鼠 IFN - γ 、IL - 2、IL - 12 分泌水平高于 rOmp19 免疫组和 rP39 免疫组。该研究说明 Omp19 + P39 混合抗原具有高度免疫原性, 能够激发 Th1 为主的抗体产生和 T 细胞介导的免疫保护, 对于疫苗的研发有重要启示作用, 同样依据其免疫原性可以应用于布鲁菌病的血清学诊断中。

综上所述, 本文中提及的外膜蛋白 (Omp) 和菌体蛋白免疫原性较强, 能够激发宿主细胞免疫反应和体液免疫反应, 尤其是能够激发 Th1 细胞产生 INF - γ 、IL - 2、TNF - β 等细胞因子, 为宿主提供免疫保护, 对于研发更高效的、可应用于人类的布鲁菌疫苗有重要意义。也有许多研究利用重组布鲁菌外膜蛋白或重组菌体蛋白进行 ELISA 试验诊断布鲁菌病, 诊断的准确率、敏感度和特异性均较高, 尤其是 Omp28 (Bp26) 被认为是最具潜力的血清学诊断抗原。除此之外, 依据这些蛋白抗原的免疫原性, 也可以通过检测这些蛋白抗原激发细胞免疫释放的高水平的细胞因子, 从而进行布鲁菌血清学的特异性临床诊断。应用本文所述的布鲁菌蛋白抗原, 有望开发更加准确、特异的布鲁菌诊断方法。

参考文献

- 1 Cloeckaert A, Vizaino N, Paquet JY, *et al.* Major outer membrane protein of brucella spp. past, present and future [J]. *Veterin Microbiol*, 2002, 90: 229 - 248
- 2 胡剑飞, 崔步云, 关平原, 等. 布鲁氏菌外膜蛋白的研究进展 [J]. *疾病监测*, 2010, 25(5): 380 - 389
- 3 刘志国, 王妙, 崔步云, 等. 布鲁氏菌重要膜蛋白研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(5): 440 - 446
- 4 Kianmehr Z, Soleimanzahi H, Ardestani SK, *et al.* Influence of Brucella abortus lipopolysaccharide as an adjuvant on the immunogenicity of HPV - 16 L1VLP vaccine in mice [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204(5): 205 - 213
- 5 何作萍, 罗佩芳, 胡飞环, 等. 羊布鲁杆菌外膜蛋白 19(Omp19) 的表达及鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(4): 470 - 473
- 6 Im YB, Park WB, Myunghwan Jung, *et al.* Comparative analysis of immune responses to outer membrane antigens OMP10, OMP19, and OMP28 of brucella abortus [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2018, 71(3): 197 - 204
- 7 Alizadeh H, Dezfulian M, Rahnama M, *et al.* Protection of BALB/c mice against pathogenic Brucella abortus and Brucella melitensis by vaccination with recombinant Omp16 [J]. *Iranian J Basic Med Scie*, 2019, 22(11): 1302 - 1307
- 8 Pathak P, Kumar A, Thavaselvam D. Evaluation of recombinant porin (rOmp2a) protein as a potential antigen candidate for serodiagnosis of Human Brucellosis [J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1): 485 - 494

- 9 Lia Z, Zhang F, Zhang C, *et al.* Immunoinformatics prediction of OMP2b and BCSP31 for designing multiepitope vaccine against Brucella [J]. *Mol Immunol*, 2019, 114: 651 - 660
- 10 Yousefi S, Abbassi - Daloui T, Sekhavati MH, *et al.* Evaluation of immune responses induced by polymeric OMP25 - BLS Brucella antigen [J]. *Microb Pathogen*, 2018, 115: 50 - 56
- 11 Tian M, Song M, Yin H, *et al.* Characterization of the main immunogenic proteins in Brucella infection for their application in diagnosis of brucellosis [J]. *Comparat Immunol, Microbiol Infect Dis*, 2020, 70: 101462
- 12 吕玉金, 李文刚, 张永涛. 布鲁菌 BP26 蛋白的研究进展 [J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(3): 58 - 60
- 13 Thavaselvam D, Kumar A, Tiwari S, *et al.* Cloning and expression of the immunoreactive Brucella melitensis 28 kDa outer - membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis [J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(4): 421 - 428
- 14 Tiwari S, Kumar A, Thavaselvam D, *et al.* Development and comparative evaluation of a plate enzyme - linked immunosorbent assay based on recombinant outer membrane antigens Omp28 and Omp31 for diagnosis of human brucellosis [J]. *Clini Vaccine Immunol*, 2013, 20(8): 1217 - 1222
- 15 徐正中, 杜强, 孟闯, 等. 布鲁菌抗原蛋白的原核表达、纯化与鉴定 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2017, 38(2): 1 - 4
- 16 宫晓炜, 周继章. 布鲁菌病血清学诊断抗原研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2008, 29(12): 48 - 51
- 17 Zhang F, Li Z, Jia B, *et al.* The immunogenicity of OMP31 peptides and its protection against brucella melitensis infection in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3512
- 18 吴同奎, 单晓枫, 康元环, 等. 布鲁菌 IV 型分泌系统效应蛋白的研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(3): 602 - 606
- 19 Cannella AP, Arlehamn CSL, Sidney J, *et al.* Brucella melitensis T cell epitope recognition in humans with Brucellosis in Peru [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(1): 124 - 131
- 20 Mirkalantari S, Zarnani AH, Nazari M, *et al.* Brucella melitensis VirB12 recombinant protein is a potential marker for serodiagnosis of human brucellosis [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2017, 16(1): 8
- 21 Senevirathne A, Hewawaduge C, Lee JH. Live vaccine consisting of attenuated Salmonella secreting and delivering Brucella ribosomal protein L7/L12 induces humoral and cellular immune responses and protects mice against virulent Brucella abortus 544 challenge [J]. *Veterinary Res*, 2020, 51(1): 6
- 22 Tadepalli G, Singh AK, Balakrishna K, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of Brucella abortus recombinant protein cocktail (rOmp19 + rP39) against B. abortus 544 and B. melitensis 16M infection in murine model Ganesh [J]. *Mol Immunol*, 2016, 71: 34 - 41

(收稿日期: 2020 - 10 - 15)

(修回日期: 2020 - 10 - 29)