

陆江,武俊海,朱道仙,等. 雌激素缺乏对猫血液中脂质代谢、脂肪细胞因子及炎症因子表达的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):183-185,192.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.045

雌激素缺乏对猫血液中脂质代谢、脂肪细胞因子及炎症因子表达的影响

陆江¹, 武俊海², 朱道仙¹, 卢劲晔¹, 刘静¹, 卢炜¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 山西省畜牧兽医学校, 山西太原 030000)

摘要:为研究雌激素缺乏对猫脂肪代谢的影响,将 21 只体质量相近的成年中华田园猫随机等分为对照组(C 组)、去卵巢组(OVX 组)和去卵巢雌激素代替组(OVX + E2 组),其中 OVX + E2 组动物按 200 μg /只经肌肉注射苯甲酸雌激素,注射频率为 2 次/周,试验周期 10 周。结果显示,OVX 组的增质量较快,明显高于 C 组和 OVX + E2 组。与 C 组比较,OVX 组的甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白 B 100(apoB 100)及游离脂肪酸(FFA)含量升高幅度极大($P < 0.01$),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)与载脂蛋白(apoA I)含量显著降低($P < 0.01$),总胆固醇(TC)含量无明显变化($P > 0.05$),血清瘦素水平提高 27.1% ($P < 0.05$),脂联素水平降低 17.8% ($P < 0.05$),抵抗素水平变化不大;促炎因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 的水平显著提高($P < 0.05$),抗炎因子 IL-2、IL-10 水平显著降低($P < 0.05$),去卵巢雌激素代替治疗后,能明显改善上述各指标变化。E2 水平与 TG、FFA 含量呈强的负相关($r = -0.865, P < 0.01$; $r = -0.878, P < 0.01$),与 LDL-C、apoB 100 含量呈负相关($r = -0.599, P < 0.01$; $r = -0.642, P < 0.01$),与 HDL-C、apoA I 呈正相关($r = 0.780, P < 0.01$; $r = 0.792, P < 0.01$),而与 TC 含量无相关性;与脂肪细胞因子瘦素呈强的负相关($r = -0.908, P < 0.01$),与脂联素水平呈强的正相关($r = 0.930, P < 0.01$),与抵抗素水平无相关;与促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平呈明显负相关,与抗炎因子 IL-2、IL-10 水平呈明显正相关,说明缺乏雌激素可导致猫高脂血症、高瘦素血症及低脂联素血症的发生,并诱发低炎症反应。

关键词:雌激素;中华田园猫;去卵巢;血脂指标;脂肪细胞因子;炎症因子

中图分类号:S829.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)17-0183-03

近年来,由于宠物猫的饲养量增加、饲养条件改善及生长环境的改变(运动减少、绝育等)等因素,导致猫脂肪代谢紊乱性疾病时有发生,包括肥胖、脂肪肝和 2 型糖尿病等^[1]。临床调查发现,绝育后的雌性猫的发病率更高,而绝育会导致雌激素急剧降低,两者之间是否存在关联,却鲜有报道。人类中绝经期和更年期的妇女,体质量往往高于绝经前的妇女,易出现脂代谢紊乱,而采用雌激素药物治疗后,其脂肪代谢逐渐趋于正常,表明雌激素在人类脂肪代谢与脂肪沉积过程中起到重要的作用^[2]。为了解雌激素对雌性猫脂代谢的影响,本研究主要采用绝育法观察猫血液中脂质代谢、脂肪细胞因子及炎症因子表达的变化情况,为猫脂肪代谢紊乱性疾病,特别是脂肪肝的预防和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

21 只健康成年雌性宠物猫,由江苏宠物繁育中心提供,体质量约 2.5 kg。

收稿日期:2018-05-28

基金项目:江苏高校品牌专业建设工程(编号:PPZY2015C230);江苏农牧科技职业学院第三批“335 教改教研工程”培养项目(编号:10434714001)。

作者简介:陆江(1982—),男,江苏新沂人,硕士,讲师,主要从事动物疾病诊治与营养干预研究。E-mail:vetlj@163.com。

1.2 试验设计

将试验动物随机等分成 3 组:对照组(C 组)、去卵巢组(OVX 组)和去卵巢雌激素代替组(OVX + E2 组),其中 OVX 组与 OVX + E2 组的动物麻醉后摘除卵巢,康复 15 d 后,用于动物试验。试验期间,3 组动物均饲喂相同的商业化猫粮(上海比瑞吉宠物用品股份公司产生),自由饮食,C 组与 OVX 组不作任何处理,OVX + E2 组动物按 200 μg /只经肌肉注射给予苯甲酸雌激素,注射频率为 2 次/周,试验周期 10 周。

1.3 体质量变化

每周测量受试动物的体质量,观察其变化。

1.4 血液指标观察

1.4.1 血液采集与保存 试验结束后,经前臂头静脉采血 3 mL 装入试管中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中静置,待分层后吸取上清液于离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,取上清液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。

1.4.2 血脂指标测定 采用日立-7600 全自动分析仪测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、载脂蛋白 B 100(apoB 100)和载脂蛋白 A I(apoA I)的含量,使用分光光度法检测游离脂肪酸(FFA)的含量。

1.4.3 血中脂肪细胞因子检测 采用酶联免疫吸附法试剂盒(ELISA),按照试剂盒说明书操作步骤分别检测血清瘦素、脂联素及抵抗素水平。

1.4.4 血中炎症因子检测 采用 Luminex 液相芯片技术检

测血中白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、白细胞介素 10(IL-10)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。

1.4.5 血液中雌激素检测 用放射免疫方法按试剂盒测定血清中雌激素 E2 水平。

1.5 数据处理

用 SPSS 20.0 软件单因素分析方法进行组间差异统计学检验,结果采用“平均值 \pm 标准差”表示, $P < 0.05$ 表示显著差异,并运用 Person 分析法分析血中 E2 水平与其他指标的

相关性。

2 结果与分析

2.1 受试动物的一般表现及体质量变化

整个试验过程中,各组猫的精神状态良好,食欲正常,未出现明显不良反应,体质量变化结果见图 1,OVX 组体质量随时间的推移逐步升高,第 7 周后变化较为明显,试验结束时体质量比第 1 周时增高了 47.4%,高于 C 组与 OVX + E2 组,C 组体质量试验前后变化不明显,OVX + E2 组略有升高。

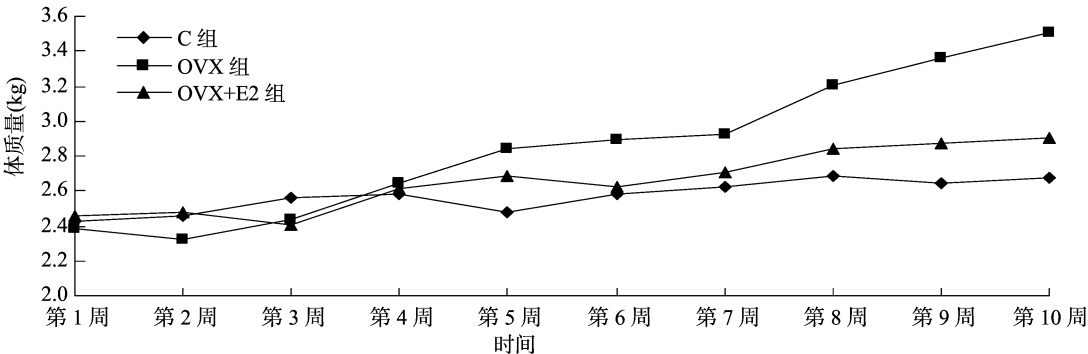


图1 各组动物试验期间体质量变化

2.2 血脂指标检测结果

由表 1 可知,与 C 组比较,OVX 组的 TG、LDL-C、apoB 100 及 FFA 含量极显著升高 ($P < 0.01$),HDL-C 与 apoA I 含量极显著降低 ($P < 0.01$),TC 含量无明显变化 ($P > 0.05$);与 OVX + E2 组比较,OVX 组的 TG 与 FFA 含量极显著升高

($P < 0.01$),apoB 100 含量显著升高 ($P < 0.05$),HDL-C 与 apoA I 含量显著或极显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),LDL-C 与 TC 含量无变化 ($P > 0.05$);OVX + E2 组的 TG、TC、apoA I、FFA、apoB 100 含量与 C 组无差异 ($P > 0.05$),LDL-C 显著高于 C 组 ($P < 0.05$),HDL-C 极显著低于 C 组 ($P < 0.01$)。

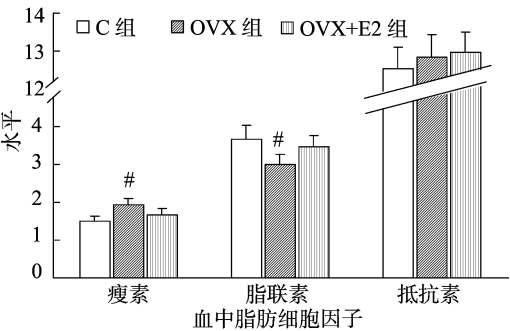
表 1 各组血脂代谢指标检测结果比较

组别	TG 含量 (mmol/L)	TC 含量 (mmol/L)	LDL-C 含量 (mmol/L)	HDL-C 含量 (mmol/L)	apoB 100 含量 (g/L)	apoA I 含量 (g/L)	FFA 含量 (mmol/L)
C 组	0.71 \pm 0.08Aa	3.63 \pm 0.31Aa	0.62 \pm 0.08Aa	1.85 \pm 0.21Aa	0.56 \pm 0.06Aa	1.31 \pm 0.14Aa	0.44 \pm 0.06Aa
OVX 组	0.95 \pm 0.12Bb	3.77 \pm 0.35Aa	0.77 \pm 0.10Bb	1.61 \pm 0.15Bc	0.68 \pm 0.08Bb	1.12 \pm 0.11Bb	0.65 \pm 0.10Bb
OVX + E2 组	0.78 \pm 0.09Aa	3.74 \pm 0.36Aa	0.72 \pm 0.07ABb	1.73 \pm 0.17Bb	0.61 \pm 0.06ABa	1.27 \pm 0.13Aa	0.51 \pm 0.05Aa

注:同列数据后不同大写、小写表示差异极显著 ($P < 0.01$)、显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.3 血中脂肪细胞因子检测结果

由图 2 可知,去卵巢后血清瘦素水平比 C 组显著高 27.2% ($P < 0.05$),脂联素水平比 C 组显著低 17.8% ($P < 0.05$);与 OVX 组比较,去卵巢后补充雌激素可以显著降低机体血清中瘦素水平 ($P < 0.05$),并可以显著提升脂联素水平 ($P < 0.05$);而 3 组的抵抗素无明显变化 ($P > 0.05$)。



表示与其他 2 组比较差异显著 ($P < 0.05$)
图2 各组血中瘦素、脂联素及抵抗素水平

2.4 血中炎症因子检测结果

由表 2 可知,去卵巢后血液中促炎因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 的水平显著高于 C 组 ($P < 0.05$),抗炎因子 IL-2、IL-10 显著低于 C 组 ($P < 0.05$),去卵巢后补充 E2 可以降低 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 的水平,同时提高 IL-2、IL-10 水平,且 OVX + E2 组与 OVX 组比较差异显著 ($P < 0.05$),与 C 组无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.5 血中 E2 检测结果

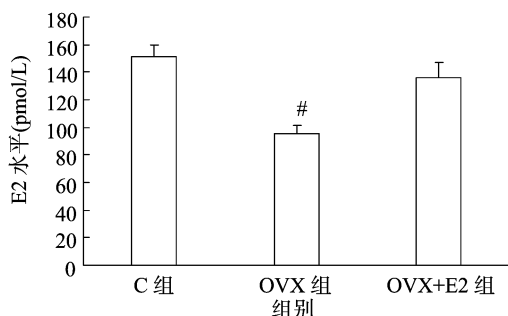
由图 3 可知,去卵巢后血液中 E2 水平下降明显,极显著低于 C 组和 OVX + E2 组 ($P < 0.01$),OVX + E2 组的 E2 虽然低于 C 组,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.6 血液中 E2 水平与各指标水平之间的相关性分析

通过 SPSS 20.0 运用 Pearson 分析法进行 E2 水平与各指标水平的相关性分析,由表 3 可知,E2 水平与血脂指标 TG、FFA 含量呈强的负相关,与 LDL-C、apoB 100 含量呈负相关,与 HDL-C、apoA I 含量呈正相关,而与 TC 含量无相关关系;与脂肪细胞因子瘦素水平呈强的负相关,与脂联素水平呈强的正相关,与抵抗素水平无相关;与促炎因子 TNF- α 、

表 2 各组血中炎症因子检测结果比较

组别	TNF- α 水平	IL-6 水平	IL-8 水平	IL-2 水平	IL-10 水平
C 组	19.56 \pm 1.43a	3.13 \pm 0.38a	15.20 \pm 1.21a	1.34 \pm 0.19a	5.42 \pm 0.61a
OVX 组	24.71 \pm 1.85b	4.27 \pm 0.52b	18.41 \pm 1.39b	0.98 \pm 0.15b	4.47 \pm 0.54b
OVX + E2 组	20.94 \pm 1.56a	3.43 \pm 0.44a	16.39 \pm 1.55a	1.23 \pm 0.19a	5.15 \pm 0.47a



表示与其他 2 组比较差异极显著 ($P < 0.01$)
图 3 各组血液中 E2 水平的比较

表 3 血液中 E2 水平与各指标的 Pearson 相关系数 ($n = 21$)

指标	相关系数	P 值
瘦素水平	-0.908	0.000
脂联素水平	0.930	0.000
抵抗素水平	-0.014	0.953
TNF- α 水平	-0.898	0.000
IL-6 水平	-0.836	0.000
IL-8 水平	-0.824	0.000
IL-2 水平	0.855	0.000
IL-10 水平	0.804	0.000
TG 含量	-0.865	0.004
TC 含量	-0.344	0.127
LDL-C 含量	-0.599	0.001
HDL-C 含量	0.780	0.000
apoB 100 含量	-0.642	0.002
apoA I 含量	0.792	0.000
FFA 含量	-0.878	0.000

IL-6、IL-8 水平呈明显负相关,抗炎因子 IL-2、IL-10 水平呈明显正相关。

3 讨论

3.1 雌激素对猫血脂代谢的影响

近年宠物临床研究发现,绝育(去卵巢)后的猫容易发生肥胖症和脂肪肝,说明雌激素在猫的脂肪代谢中发挥重要作用。在人医和动物试验中研究发现,雌激素分泌减少后,血脂水平发生了明显的变化。杜贵永以绝经后妇女 56 例为观察组研究对象,另选择 50 例正常行经妇女和 45 例围绝经期妇女作为对照组,对所有受试者进行血清雌二醇及血脂水平测定,发现绝经后妇女血清 E2 水平远低于其他 2 组,E2 水平与 TC、TG、LDL-C 含量呈负相关,与 HDL-C 含量呈正相关^[3];陆江等在研究绝育手术对雌性 Beagle 犬血脂代谢及抗氧化能力的影响发现,绝育后犬血中 TG、总胆固醇(Chol)、LDL-C 含量逐渐升高,HDL-C 含量逐渐降低^[4]。本研究发现,猫去卵巢后血液中 E2 水平急剧降低,TG、LDL-C、apoB 100、FFA 的含量升高,与 E2 水平呈负相关,HDL-C、apoA I 含量升高且与 E2 水平呈正相关,体质量增质量明显,增加肥胖症

等脂质代谢紊乱性疾病的发生风险,而 TC 含量变化不明显,与啮齿类动物和人不同,这可能与猫饲料中高水平牛磺酸有关,牛磺酸可通过多种途径发挥降 TC 作用^[5]。由此可见,雌激素可作为猫脂质代谢的一个调节因子,研究其作用机制将为猫肥胖症、脂肪肝等疾病的预防与治疗提供更加广阔的空间。

3.2 雌激素对脂肪细胞因子的影响

脂肪细胞因子也是影响机体脂质代谢较直接的因素,正常情况下,脂肪组织产生瘦素和脂联素等细胞因子的生理作用处于平衡状态;若过多的脂肪堆积和脂肪细胞功能异常,可导致脂肪细胞因子表达的调节异常、脂质代谢紊乱,引发多种疾病。研究证实高瘦素血症是胰岛素抵抗发生的重要原因^[6],而胰岛素抵抗又是糖尿病、脂肪肝等疾病发生的重要机制^[7]。本研究显示,OVX 组出现瘦素升高和脂联素降低的显著变化,与 E2 水平分别呈负相关、正相关,而补充 E2 后可明显改善这一现象,且改变雌激素对抵抗素无明显改变,因此雌激素缺乏可直接引起脂肪细胞因子的代谢障碍,从而间接导致脂肪代谢紊乱,补充 E2 可起到缓解代谢障碍的作用。然而雌激素作用于脂肪组织的靶点及机制尚须进一步研究。

3.3 雌激素对炎症因子的影响

在正常生理情况下,机体血液中含有一定水平的 TNF- α 、IL-6、IL-8 等促炎因子,具有增强免疫功能与抗感染作用,但是与抗炎因子 IL-2、IL-10 等关系失调或者机体持续性分泌释放过多 IL-6、TNF- α 、IL-8 等因子后,则会使机体处于低炎症状态,引起机体物质能量代谢障碍,甚至组织损伤,如已证实 TNF- α 是非乙醇性脂肪肝发生的独立危险因素^[8]。本研究发现,血中 E2 水平与 TNF- α 、IL-6、IL-8 等促炎因子水平呈负相关,与抗炎因子 IL-2、IL-10 水平等呈正相关,表明雌激素缺乏可以提高促炎因子的表达,抑制抗炎因子的表达,补充 E2 后可使促炎因子和抗炎因子趋于正常,这可能与雌激素和其受体结合后,可激活过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)等信号通路,从而抑制 TNF- α 等促炎因子的 mRNA 表达有关^[9]。

4 结论

雌激素缺乏可导致猫的高脂血症、高瘦素血症、低脂联素血症,促进促炎因子释放,从而导致脂质在体内堆积、体质量增加,补充雌激素后可缓解上述症状。同时也证明,雌激素及其作用机制可作为新的研究靶点,为猫脂肪代谢紊乱性疾病防治提供新的思路与方法。

参考文献:

- [1] 林 芝. 一例猫脂肪肝的诊治[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015(10): 71-72.

(下转第 192 页)

彭小兵,杜吉革,彭国瑞,等.含腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素基因的重组大肠杆菌的高密度发酵和免疫效果[J].江苏农业科学,2019,47(17):186-189.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.046

含腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素基因的重组大肠杆菌的高密度发酵和免疫效果

彭小兵¹,杜吉革¹,彭国瑞¹,李旭妮¹,董令赢¹,冯丽芳²,蒋玉文¹

(1.中国兽医药品监察所,北京 100081;2.北京中海生物科技有限公司,北京 100081)

摘要:为确定含腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素重组蛋白的生产效率并评价其作为抗原的免疫效果,用生物反应器对重组大肠杆菌 DE3-pET-AE 进行高密度发酵,并将其制苗后以不同抗原剂量分别接种家兔和绵羊,间隔 21 d 进行二免,分别测定一免、二免动物混合血清的中和效价。发酵结果显示,培养物菌体密度 $D_{600\text{ nm}}$ 达 20.3,相对表达量为 27.6%, $D_{600\text{ nm}}$ 与相对表达量的乘积为摇瓶培养的 6.5 倍,菌体湿质量为 37.2 g/L;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示,目的蛋白以可溶形式表达。动物免疫效果评价结果显示,在家兔和绵羊上,抗原含量与免疫效果在一定的范围内均呈正相关,当接种量为 300 μg /只时,免疫效果均最好;对腐败梭菌毒素与 D 型产气荚膜梭菌毒素的血清中和效价,在家兔上一免、二免分别达 4 与 30、15 与 200,在绵羊上一免、二免分别达 2 与 30、12 与 250。结果表明,DE3-pET-AE 菌高密度发酵可获得高产量蛋白抗原,且抗原的免疫效果明显优于《中华人民共和国兽药典》合格标准。

关键词:腐败梭菌 α 毒素;产气荚膜梭菌 ϵ 毒素;大肠杆菌高密度发酵;免疫效果;抗原含量;家兔;绵羊

中图分类号:S852.4⁺3

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2019)17-0186-03

羊快疫和肠毒血症是分别由腐败梭菌和 D 型产气荚膜梭菌引起绵羊和山羊发生急性死亡的 2 种重要梭菌性疾病^[1],因发病急导致无法及时治疗,给养羊业造成重大损失,故免疫接种是预防该病的最有效途径。然而,国内现有用于预防该病的疫苗(如羊快疫、黑疫二联灭活疫苗与羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症三联四防灭活疫苗及羊梭菌病多联干粉灭活疫苗等)的检验合格率并不高^[2]。因此,一方面通过研制产毒培养基配方、改善发酵工艺进而提高抗原含量是提高传统疫苗免疫效果的有效途径之一;另一方面,通过基因工程方法研制亚单位疫苗也成为解决现有疫苗质量不高的另一重要候选途径。腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素分别是腐败梭菌和 D 型产气荚膜梭菌最主要的致死性毒力因子和保护性抗原,通过大肠杆菌表达系统分别获得这 2 种重组毒素蛋白,经制苗后免疫动物均可产生有效的免疫保护^[3-5]。

鉴于此,本试验对已构建的同时含有腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素基因的重组大肠杆菌进行高密度发酵,以检测重组蛋白的生产效率。随后,将发酵产物制苗后免疫接种家兔和绵羊并检测血清中和效价,以评价发酵抗原的免疫效果,进而为研发亚单位疫苗积累数据。

收稿日期:2018-05-22

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0500905);中国兽医药品监察所所级课题(编号:201701)。

作者简介:彭小兵(1983—),男,江苏泗洪人,硕士,副研究员,主要从事细菌类生物制品的研究。Tel:(010)62106555;E-mail:pengxiaobing@ivdc.org.cn。

通信作者:蒋玉文,博士,研究员,主要从事细菌类生物制品的研究。E-mail:jiangyuwen@ivdc.org.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 含腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素基因的重组大肠杆菌 DE3-pET-AE,由笔者所在实验室构建并保存。

1.1.2 试验用动物 绵羊,5~6 月龄,品种为小尾寒羊,购自河北保定满城区诚信养殖场。CD-1(ICR)小鼠,16~20 g,SPF(无特定病原)级;日本大耳白家兔,1.5~2.0 kg,清洁级。小鼠和家兔均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 主要仪器有恒温摇床(培英,THZ-D 型)、电子天平(METTLER TOLEDO,PB203-N 型)、紫外分光光度计(SPECTRA max,384 plus)、台式高速冷冻离心机(KUBOTA,3500 型)、生物反应器(Applicon,ez-control & 7 L Autoclavable Bioreactor)等。

1.1.4 主要试剂 腐败梭菌菌株 C55-1 株(CVCC60021)外毒素和 D 型产气荚膜梭菌 C60-3 株(CVCC82)外毒素,由笔者所在实验室制备并保存。 α -乳糖,SIGMA 公司;酪蛋白胨、酵母浸出物,北京奥博星生物技术有限公司;葡萄糖、无机盐、甘油,北京化学试剂公司;生理盐水、明胶缓冲液、葡萄糖溶液等参照《中国兽用生物制品规程》^[6]配制。

1.2 方法

1.2.1 重组菌的复苏 将重组菌 DE3-pET-AE 划线接种于 LB 平板上[添加氨苄青霉素(简称 Amp⁺)],37℃培养 12 h。

1.2.2 摇瓶振荡培养 挑取重组菌单菌落,接种于 2 mL

MDG^[7] (Amp⁺) 非诱导培养基中, 37 ℃、260 r/min 振摇培养 10 h; 将全部培养物接种于 100 mL ZYM-5052^[7] (Amp⁺) 自诱导培养基中, 30 ℃、260 r/min 振摇培养 24 h。收获培养物, 测定 $D_{600\text{ nm}}$, 并进行蛋白电泳, 用 Quantity One 软件分析靶蛋白的相对表达量。

1.2.3 生物反应器高密度发酵 挑取重组菌单菌落, 接种于 4 mL MDG (Amp⁺) 非诱导培养基中, 37 ℃、260 r/min 振摇培养 16 h; 将全部培养物接种于 200 mL MDG (Amp⁺) 非诱导培养基中, 37 ℃、260 r/min 振摇培养 10 h。将培养物接种于含 4 L 基础培养基 (Amp⁺) 的生物反应器中进行发酵培养, 接种量为 4%, 发酵温度为 30 ℃, 通气量为 10 L/min, 搅拌速度为 500 r/min, 控制 pH 值为 7.0 (补碱管接 5 mol/L NaOH, 补酸管接补料培养基), 共培养 24 h。在基础培养基中, C 源组分用葡萄糖替换 5052 (即甘油、葡萄糖和乳糖的混合液), 其他组分与 ZYM-5052 相同。补料培养基包括 10.0% 酪蛋白胨、5.0% 酵母浸出物、33.3% 甘油、13.3% 乳糖、0.8% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。培养结束后收获培养物, 测定 $D_{600\text{ nm}}$ 。对发酵后菌液进行 10 倍稀释, 再经超声波裂解处理后对全菌、菌体破碎上清和包涵体进行蛋白质电泳, 用 Quantity One 软件分析靶蛋白的相对表达量。

1.2.4 制苗 取生物反应器培养物, 按总体积的 0.4% 加入甲醛溶液 (含 40% 甲醛), 37 ℃ 灭活 48 h。经灭活脱毒检验合格后, 以抗原、铝胶比例为 4:1 来制备疫苗, 使靶蛋白的终浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.5 疫苗在家兔上的免疫效果研究 免疫前在每只家兔耳中动脉采血 5 mL, 分离血清, 按《中华人民共和国兽药典》^[8] 的方法测定血清对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。血清效价是指“0.1 mL 血清能中和的小鼠 MLD (最小致死量) 数”。将疫苗用 20% 铝胶盐水 (含 200 g 氢氧化铝胶和 800 mL 0.85% NaCl) 稀释后, 分别以 300、150、75、37.5 μg 的剂量皮下注射家兔各 5 只, 免疫后 21 d 进行第 2 次免疫 (免疫剂量及接种方式同首免), 首免后 21、35 d 对每只家兔进行耳中动脉采血 5 mL, 分离血清, 测定每组 5 只家兔混合血清分别对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。

1.2.6 疫苗在绵羊上的免疫效果研究 免疫前在每只绵羊颈静脉采血 5 mL, 分离血清, 按《中华人民共和国兽药典》^[8] 的方法测定血清对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。将疫苗用 20% 铝胶盐水稀释后, 分别以 300、150、75、37.5 μg 的剂量皮下注射绵羊各 5 只, 免疫后 21 d 进行第 2 次免疫 (免疫剂量及接种方式同首免), 首免后 21、35 d 对每只绵羊进行颈静脉采血 5 mL, 分离血清, 测定每组 5 只绵羊混合血清分别对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。

2 结果与分析

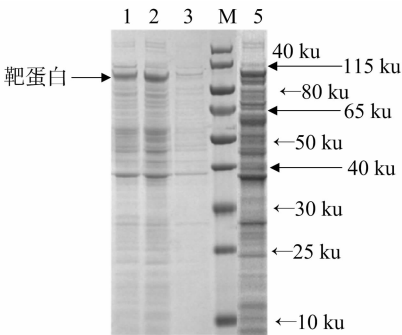
2.1 摇瓶振荡培养结果

采用摇瓶振荡培养重组大肠杆菌 DE3-pET-AE, 30 ℃、260 r/min 培养 24 h, 结果菌体密度 $D_{600\text{ nm}}$ 为 4.81, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后用软件测算得到目的蛋白相对表达量为 17.9%, C 值 ($C = D_{600\text{ nm}} \times$

相对表达量) 为 0.86。

2.2 高密度发酵结果

采用生物反应器高密度发酵重组大肠杆菌 DE3-pET-AE, 30 ℃ 培养 24 h, 结果菌体密度 $D_{600\text{ nm}}$ 达 20.3, 相对表达量为 27.6%, C 值为 5.60, 菌体湿质量为 37.2 g/L。SDS-PAGE 结果见图 1, 可见目的蛋白以可溶形式表达。



1~3—生物反应器高密度发酵后的全菌、超声裂解上清和超声裂解沉淀; M—蛋白 marker; 5—摇瓶振荡培养后的全菌

图1 重组菌 DE3-pET-AE 的诱导表达结果

2.3 疫苗在家兔上的免疫效果

对免疫前家兔血清进行测定, 结果对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价均小于 1, 均为抗体阴性兔。将不同抗原剂量的疫苗分别免疫家兔后, 测定每组 5 只家兔混合血清对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。由表 1 可知, 在一定范围内抗原剂量与免疫效果呈正相关; 一免、二免血清中和效价均达到或显著高于《中华人民共和国兽药典》相关产品合格的标准 (即血清中和效价对腐败梭菌毒素应达到 1 MLOs/0.1 mL, 对 D 型产气荚膜梭菌毒素应达到 3 MLOs/0.1 mL)^[8]。对于腐败梭菌毒素组分, 一免血清效价为《中华人民共和国兽药典》合格标准的 1~4 倍, 二免血清效价大幅提高为《中华人民共和国兽药典》合格标准的 3~15 倍, 增至一免效价的 2~5 倍。对于 D 型产气荚膜梭菌毒素组分, 一免血清效价为《中华人民共和国兽药典》合格标准的 10 倍, 二免血清效价大幅提高为《中华人民共和国兽药典》合格标准的 17~67 倍, 增至一免效价的 1.7~6.7 倍。提示免疫剂量为 300 μg /只时, 家兔免疫效果最好, 一免血清效价对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素分别可达到《中华人民共和国兽药典》合格标准的 4、10 倍, 而二免效价则分别可达到《中华人民共和国兽药典》合格标准的 15、67 倍。

表 1 疫苗在家兔上的血清效价测定结果

免疫剂量 (μg /只)	对不同毒素的混合血清中和效价 (MLDs/0.1 mL)			
	一免		二免	
	腐败 梭菌毒素	D 型产气荚膜 梭菌毒素	腐败 梭菌毒素	D 型产气荚膜 梭菌毒素
300.0	4	30	15	200
150.0	4	30	8	100
75.0	2	30	10	100
37.5	1	30	3	50

2.4 疫苗在绵羊上的免疫效果

对免疫前绵羊血清进行测定, 结果对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价均小于 1, 均为抗体阴性绵

羊。将不同抗原剂量的疫苗分别免疫绵羊后,测定每组 5 只绵羊混合血清分别对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。由表 2 可知,在一定范围内抗原剂量与免疫效果呈正相关;一免、二免血清中和效价均达到或显著高于《中华人民共和国兽药典》相关产品合格的标准(即血清中和效价对腐败梭菌毒素应达到 1 MLDs/0.1 mL,对 D 型产气荚膜梭菌毒素应达到 3 MLDs/0.1 mL)^[8]。对于腐败梭菌毒素组分,一免血清效价为《中华人民共和国兽药典》合格标准的 1~4 倍,二免血清效价大幅提高为《中华人民共和国兽药典》

合格标准的 2~12 倍,增至一免效价的 2~6 倍。对于 D 型产气荚膜梭菌毒素组分,一免血清效价为《中华人民共和国兽药典》合格标准的 1.7~10.0 倍,二免血清效价大幅提高为《中华人民共和国兽药典》合格标准的 16.7~83.3 倍,增至一免效价的 5~10 倍。提示免疫剂量为 300 μg/只时,绵羊免疫效果最好,一免血清效价对腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素分别可达到《中华人民共和国兽药典》合格标准的 2、6 倍,而二免效价则分别可达到《中华人民共和国兽药典》标准的 12、83.3 倍。

表 2 疫苗在绵羊上的血清效价测定结果

免疫剂量 (μg/只)	对不同毒素的混合血清中和效价 (MLDs/0.1 mL)			
	一免		二免	
	腐败梭菌毒素	D 型产气荚膜梭菌毒素	腐败梭菌毒素	D 型产气荚膜梭菌毒素
300.0	2	30	12	250
150.0	2	10	12	75
75.0	4	10	10	50
37.5	1	5	2	50

3 讨论

自诱导培养基的原理在于碳源,即大肠杆菌优先使用葡萄糖生长至饱和,当葡萄糖被消耗殆尽时开始使用乳糖(既作为碳源,又作为诱导剂),进而表达目的蛋白^[7]。自诱导系统的优点在于重组菌可生长至较高密度,无需人为添加诱导剂,并且用乳糖替代异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)具有无毒且价廉的特点。本研究用自诱导系统进行摇瓶培养,菌体密度 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 4.81 时,远高于以 LB 培养至 $D_{560\text{ nm}}$ 为 0.5~1.0 再加入 IPTG 诱导的培养方式。影响重组大肠杆菌高密度发酵的主要因素包括宿主菌、接种量、培养基成分、培养方式、培养条件、诱导剂的选择、补料方式等^[9-10]。本研究在借鉴前人经验和自诱导原理的基础上,采用生物反应器进行高密度发酵,即先以葡萄糖作为碳源使细菌生长到高密度,再以流加含甘油和乳糖组合的方式诱导目的蛋白表达,结果菌体密度 $D_{600\text{ nm}}$ 达到摇瓶培养的 4.2 倍,相对表达量达到摇瓶培养的 1.5 倍,菌体密度和相对表达量的乘积达到摇瓶培养的 6.5 倍。本研究所采用的高密度发酵策略使重组蛋白产率大大提高,并且其后的动物试验也证明发酵产物具有良好的免疫效果,此策略可供其他研究者借鉴参考。另外,本研究的发酵产物以可溶性形式表达,将有利于蛋白折叠成天然构象进而露出抗原表位,可能有助于抗原获得可靠的免疫效果。

本研究首次报道了同时含有腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ε 毒素基因重组大肠杆菌的高密度发酵工艺,及其产物在家兔和绵羊上的免疫效果。同时表达 2 种毒素蛋白的优势在于仅发酵 1 株大肠杆菌即可达到预防 2 种疾病的目的。家兔和绵羊试验结果也表明,重组蛋白免疫效果良好,其诱发病体产生的较好的血清中和效价显著高于现有《中华人民共和国兽药典》合格标准^[8],即使低至“每只动物予 37.5 μg”的抗原免疫量仍可达到标准。笔者曾报道现有疫苗检验合格率不高^[2],并且田间绵羊效价检测合格率也偏低(数据未报道)。由此推知,靶动物免疫持续期的抗体效价将更难达到合格标准。值得一提的是,国际上羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症类疫苗无论在田间使用还是在替代动物效力检

验^[11-12]上均采用 2 次免疫。故本研究对二免家兔和绵羊的血清效价均进行了评估,结果显示 2 种组分的二免效价均获得大幅增长,分别提升为《中华人民共和国兽药典》合格标准的至少 12 倍和 67 倍,此结果为我国此类疫病的防控及制品质量评价标准与方法的改进提供了参考依据。综合一免、二免数据来看,家兔和绵羊获得最佳效价的抗原剂量相同,且各剂量的家兔效果普遍好于绵羊,推测其原因可能是绵羊体质质量相对较大,故需要接种的抗原量更多。

随着基因工程技术的日益成熟,亚单位疫苗的发展速度也越来越快,本研究结果为羊快疫和肠毒血症的预防提供了基础性数据。此外,国内外常将不同的梭菌组分相互联合或与其他非梭菌组分相联合制备多联苗,以达到“一针多防”的目的^[8,11-12]。本研究所制备的发酵产物经动物试验表明,可用于同时预防羊快疫和肠毒血症,至于将其进一步联合其他组分制备更多联疫苗的可行性及组分间的兼容性,仍有待于进一步研究验证。

参考文献:

[1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,2007:194-196.
[2] 彭小兵,李旭妮,蒋玉文,等. 腐败梭菌类毒素抗原含量与免疫效果之间的关系研究[J]. 中国兽医杂志,2016,52(4):6-8.
[3] Amimoto K, Ohgitani T, Sasaki O, et al. Protective effect of *Clostridium septicum* alpha - toxoid vaccine against challenge with spores in Guinea pigs[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2002,64(1):67-69.
[4] Lancto C A, Foster L K, Kromm M M, et al. A noncytolytic alpha toxin recombinant protein protects turkeys against *Clostridium septicum* challenge[J]. Avian Diseases,2014,58(4):566-571.
[5] Ferreira M R, Moreira G M, Da Cunha C E, et al. Recombinant alpha,beta, and epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: production strategies and applications as veterinary vaccines[J]. Toxins,2016,8(11):1-24.
[6] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程[S]. 北京:化学工业出版社,2000:41-51.

何小丽,李凡飞,王文佳,等.牛传染性鼻气管炎病毒部分 gB 蛋白的原核表达及抗原性分析[J].江苏农业科学,2019,47(17):189-192.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.047

牛传染性鼻气管炎病毒部分 gB 蛋白的原核表达及抗原性分析

何小丽,李凡飞,王文佳,张 凯,程 成,许立华

(宁夏大学农学院,宁夏银川 750021)

摘要:为对牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)gB 基因进行原核表达,并对表达产物进行抗原性分析,利用笔者所在实验室已构建好的 gB-BL21 重组阳性菌落,进行异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,并对培养及诱导表达条件(IPTG 最佳浓度、作用时间)等影响表达的因素进行优化,然后将表达的 gB 重组蛋白进行亲和层析纯化。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明,gB 蛋白在大肠杆菌中高效表达,表达蛋白的相对分子量约为 32.4 ku,与预期的蛋白大小一致。经 BCA(聚氨基丙氨酸正丁酯)蛋白含量测定试剂盒测定,gB 重组蛋白浓度为 1.84 mg/mL。Western Blot 结果显示,纯化后的 gB 重组蛋白能被标准 IBR 阳性血清识别,说明表达的目的蛋白具有良好的反应原性,可作为 IBRV 检测的特异性抗原。试验为建立牛传染性鼻气管炎诊断及研究 gB 蛋白的功能特性提供了材料和技术理论支持。

关键词:牛传染性鼻气管炎;gB 蛋白;原核表达;纯化;抗原性分析

中图分类号:S852.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)17-0189-04

牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis,简称 IBR)是由牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus,简称 IBRV)[又称为牛疱疹病毒 1 型(BHV-1)]感染所引起的高度接触性传染病。该病具有广泛的嗜组织性,在临床上表现为呼吸道型、生殖道感染型、脑膜脑炎型和流产型 4 种类型。该病呈世界性广泛分布,世界动物卫生组织将其列为二类动物传染病,每年都给全球的养牛业带来了不可估量的经济损失^[1]。BHV-1 基因组中已被编码为蛋白的共有 73 个开放阅读框^[2]。BHV-1 编码的结构蛋白有 33 种,其中 13 种蛋白与核衣壳有关,10 种编码糖蛋白^[3]。gB 是在病毒吸附、进入细胞及胞间扩散和融合中起着重要作用的主要膜蛋白,也是主要的抗原蛋白,是 BHV-1 中最保守的蛋白^[4]。

我国于 1980 年从国外进口的奶牛中检测到了引起该病的病毒,自此许多学者开始对该病的流行病学进行调查,结果表明我国国内大部分省份已存在较为广泛的牛传染性鼻气管炎病毒的感染且呈现逐年上升的现象。目前,并没有特效的药物治此病,我国主要采取以预防为主措施防控此病。本试验通过对 IBRV gB 蛋白的诱导表达,旨在获得 IBR 高效表达蛋白,为 IBR 的检测方法提供原材料和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 血清与菌株

IBR 标准阳性血清,购自美国 IDEEX 公司;牛传染性鼻气管炎 gB-BL21 阳性重组菌株,由笔者所在实验室前期构建保存。

1.2 主要试剂盒

His 标签蛋白纯化试剂盒,购自北京康为世纪生物科技有限公司;AEC 底物显色试剂盒,购自索莱宝公司;AEC 蛋白纯化试剂盒,购自凯基生物公司。

1.3 主要试剂

主要试剂如下:琼脂糖,购自西班牙;异丙基硫代- α -D 半乳糖苷(IPTG),Thermo Fisher;氨苄青霉素(AMP),Amresco;琼脂粉,OXOID;蛋白彩虹 marker,Thermo Fisher;十

收稿日期:2018-05-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560687、31760722);宁夏“优质高产奶牛遗传改良与选育”专项(编号:2013NYZ0501)。

作者简介:何小丽(1991—),女,宁夏固原人,硕士研究生,研究方向为预防兽医学。E-mail:764502729@qq.com。

通信作者:许立华,博士,教授,硕士生导师,主要从事兽医微生物学与免疫学、动物疫病诊断与防控技术的研究。E-mail:littlezhe99@163.com。

[7] Studier F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(1): 207-234.

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(三部)[S]. 北京:中国农业出版社, 2016: 44-49.

[9] 陈 理,俞昌喜. 重组大肠杆菌高密度发酵工艺进展[J]. 海峡药学, 2011, 23(3): 15-18.

[10] 张建新,张 吨,胡文波,等. 重组大肠杆菌高细胞密度发酵研究进展[J]. 中国酿造, 2011, 227(2): 5-8.

[11] Animal and plant health inspection service, USDA. 9 CFR Ch. I (1-1-07 Edition)[M]. Washington: U. S. Government Printing Office, 2007: 688-698.

[12] British pharmacopoeia (Veterinary)[M]. London: the Stationery Office, 2005: 192-199.

二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液(2×),SDS 购自西安国安生物科技有限公司;考马斯亮蓝 G-250,Thermo Fisher;过硫酸铵,Biotopped;10% SDS;四甲基乙二胺(TEMED),Biotopped;1 mol/L pH 值为 6.8 的 Tris-HCl,Tris 购自 Biotopped;1.5 mol/L pH 值为 8.8 的 Tris-HCl;29:1 的丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺蛋白电泳缓冲液(5×),Biotopped;聚偏氟乙烯(PVDF)膜,Thermo Fisher;滤纸,沈阳市长城过滤纸板有限公司;甘氨酸,西安国安生物科技有限公司;脱脂奶粉,完达山乳业;Tween20,Biotopped;磷酸缓冲盐溶液(PBS);无水乙醇,天津市福晨化学试剂厂;0.22 μm 滤膜,Sigma;Rabbit Anti-Bov IgG/HRP[辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG],Sigma。其他化学试剂均购自天津市化学大茂化学试剂厂。此外,聚羧基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白纯化试剂盒,购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 重组蛋白 gB 的诱导表达及条件优化 取 1 μL 连接好的重组质粒 PET32a-gB,涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,于 37℃ 培养 12~15 h。然后用无菌接种棒挑取单个重组菌落,接种于 5 mL 液体培养基中,37℃ 摇床上于 220 r/min 培养 12~15 h。取培养的菌液按 1:50 的比例接种于新鲜的 LB(AMP⁺)液体培养基中,继续培养 2~3 h,直至 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.6~0.8,取 1.0 mL 菌液保存,作为 IPTG 诱导前样品,将剩余的菌液分成 6 管,分别向其中加入不同浓度的 IPTG,使其终浓度依次为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、2.0 mmol/L,然后置于 37℃ 摇床上培养,分别于 1、2、3、4、5 h 后从 5 管中各取 1 mL 诱导菌液,室温下于 8 000 r/min 离心 2 min,去上清,采用 PBS 重悬沉淀,重复离心,最后弃尽上清,用 PBS 重悬沉淀,混匀,然后向其中加入 2×SDS 上样缓冲液,置于沸水中煮沸 5 min,取出后迅速放入冰浴中,适当时间后,放入-20℃ 冰箱中保存备用。

1.4.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的检测 按照说明配制分离胶与浓缩胶,在分离胶上面插入梳子,静置约 30 min,使凝胶完全聚合。然后将玻璃制胶板放入电泳槽中,在电泳槽中加入适量的电泳液,缓慢垂直拔出梳子,用移液器冲洗加样孔。向第 1 个加样孔中加入蛋白彩虹 marker,在相邻的泳道中依次加入样品。接通电源,起始电压为 80 V,当染料进入分离胶后,提高电压至 120 V,电泳 1 h。待溴酚蓝到达电泳槽的底部时,关闭电源,小心地从玻璃板上剥下凝胶,切掉浓缩胶,并对分离胶进行标记,然后将其放入考马斯亮蓝染色液中,染色 1 h。结束后,取出分离胶,将其转入脱色液中脱色,观察结果。

1.4.3 重组蛋白的可溶性分析 参照“1.4.1”节的方法,分别利用蛋白的最优表达条件对重组蛋白进行诱导表达,离心,弃上清,在沉淀中加入 PBS 重悬菌体,混匀。然后超声裂解菌体细胞,待菌液变清后,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清,并向沉淀物中加入 8 mol/L 尿素,充分裂解。然后分别向收集好的上清和沉淀中加入蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min,快速放入冰浴中,适当时间后,进行 SDS-PAGE 分析。

1.4.4 重组蛋白的纯化分析 参照“1.4.1”节的方法,分别利用蛋白的最优表达条件对重组蛋白表达至最优的时间,取 50 mL 离心管,称量空管的质量并作记录,倒入诱导的菌液,

离心,弃上清,加入去离子水重悬沉淀,再次以同样的条件离心,倒掉上清,称量离心管质量,得到菌体湿质量,每 100 mg 菌体(湿质量)中加入 2 mL 细菌裂解液(每毫升细菌裂解液中预先加入 10 μL 蛋白酶抑制剂混合物),超声破碎 20 min,10 000 g 低温离心 15 min,收集沉淀,将沉淀重悬于 Binding Buffer 中,尽量混匀使包涵体充分溶解。20℃ 静置过夜,次日取出后,使用 His(组氨酸)标签蛋白纯化试剂盒进行相关步骤纯化,然后对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

1.4.5 纯化蛋白浓度的测定 使用 BCA 蛋白纯化试剂盒对重组蛋白含量进行测定,具体步骤如下:

(1)按照表 1 依次向 96 孔板中加入相应试剂;

表 1 试剂添加顺序			
孔号	蛋白标准溶液用量(μL)	去离子水用量(μL)	对应蛋白的量(μg)
0	0	20	0
1	1	19	0.5
2	2	18	1
3	4	16	2
4	8	12	4
5	12	8	6
6	16	4	8
7	20	0	10

注:蛋白标准溶液主成分为牛血清白蛋白(BSA)。

(2)将试剂盒中的 A 试剂与 B 试剂按照 1:50 的比例配制 BCA 工作液,充分混匀;

(3)依次加入 200 μL BCA 工作液;

(4)将 96 孔板放在振荡器上振荡数秒,37℃ 孵育 30 min;

(5)在酶标仪上读取 $D_{562\text{ nm}}$,以蛋白含量(μL)为横坐标、吸光度为纵坐标,绘制标准曲线图;

(6)选取合适的浓度稀释 gB 蛋白,使其总体积为 20 μL,加入 BCA 工作液 200 μL,混匀,37℃ 放置 30 min,以标准曲线 0 号管作参比,记录 562 nm 下的吸光度;

(7)根据所得样品的吸光度,在标准曲线上找出对应的蛋白含量,换算到原体积中,记录蛋白的浓度。

1.4.6 纯化蛋白的 Western Blot 分析 按照上述方法进行 SDS-PAGE,电泳结束后,取出凝胶切下分离胶,标记方向,按照标准步骤进行蛋白质分子的转印,150 mA 恒流,4℃ 3 h,将凝胶上的蛋白质转印到 PVDF 膜上。接着取出转有蛋白质分子的 PVDF 膜,采用 5%脱脂乳封闭 2 h,一抗(IBR 标准阳性血清)4℃ 杂交过夜,次日取出后使用 PBST(加了吐温的磷酸盐缓冲液)洗涤 5 次,加入二抗(Rabbit Anti-Bov IgG/HRP)杂交 1 h,去除非特异性结合,再次洗涤,条件同上。洗涤结束后,使用 AEC(3-氨基-9-乙基咔唑)底物显色试剂盒显色 15 min,之后用蒸馏水终止反应,观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白 gB 的诱导表达及条件优化

将连接好的重组菌落接种于培养基上,利用 IPTG 初步探索诱导表达,经过 SDS-PAGE 分析,结果表明,未经 IPTG 诱导的重组菌并没有出现特异性的条带,而经 IPTG 于 37℃

诱导后的重组菌落出现了特异性的条带,经分析其大小为 32.4 ku,与预期的蛋白分子质量大小相符。为提高重组蛋白的表达效率,为以后大量制备蛋白奠定基础,分别以不同时间和不同 IPTG 浓度进行诱导条件的优化。最后通过 SDS - PAGE 蛋白凝胶电泳检测,由图 1、图 2 显示,蛋白的表达量在 37 °C 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 时达到最大值。

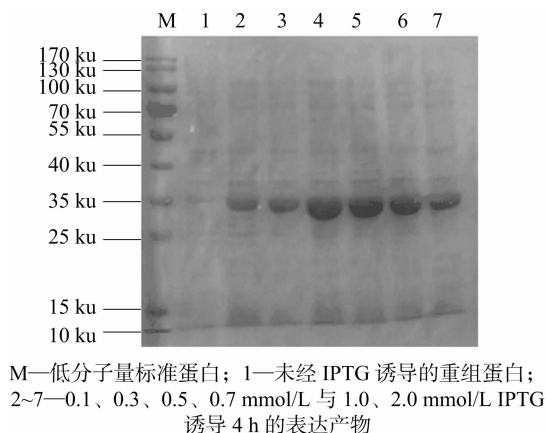


图1 gB 蛋白诱导表达浓度的优化

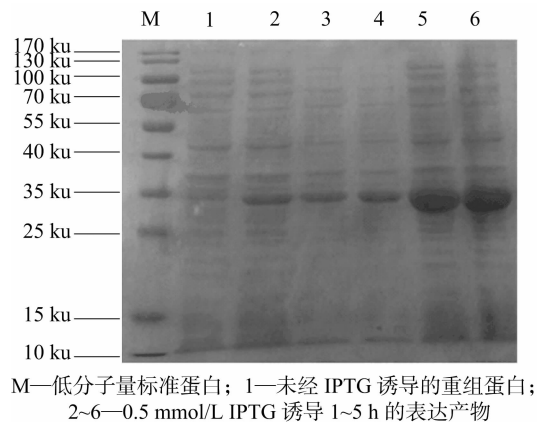


图2 gB 蛋白的诱导表达时间的优化

2.2 重组蛋白的可溶性分析

分别将重组菌落经过最优的表达条件表达,离心收集沉淀后超声破碎,再次离心后对沉淀加尿素溶解,经 SDS - PAGE 分析,由图 3 可见,表达 gB 蛋白以包涵体的形式存在。

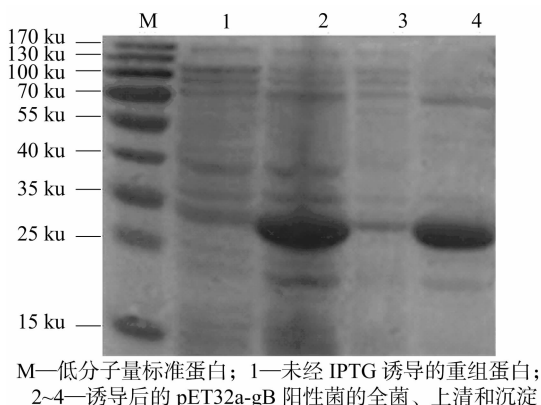


图3 gB 重组蛋白的可溶性分析

2.3 重组蛋白的纯化分析

由图 4 可知,根据 gB 蛋白的表达特性和最佳诱导条件进

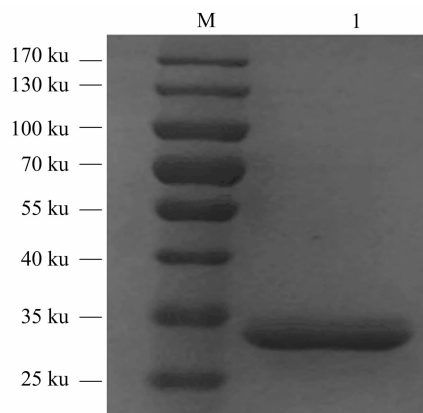


图4 gB 重组蛋白的分离纯化

行表达纯化,得到 1 条约为 32.4 ku 的纯度较高的条带。

2.4 纯化蛋白浓度的测定

以 BSA 标准蛋白浓度为横坐标、吸光度 $D_{562\text{ nm}}$ 为纵坐标,制作标准曲线,见图 5。根据 BSA 浓度与 $D_{562\text{ nm}}$ 的线性关系,得到了拟合曲线方程: $y = 0.0786x + 0.0656$, $r^2 = 0.9989$ 。经测定,gB 重组蛋白的浓度为 1.84 mg/mL。

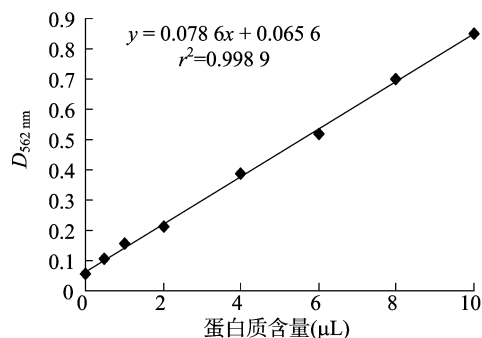


图5 BSA 蛋白的标准曲线

2.5 重组蛋白的 Western Blot 检测

纯化的 gB 蛋白经蛋白转印、一抗二抗杂交,再经 AEC 显色之后,出现了 1 条纯度较高的目的条带(图 6),提示表达的重组蛋白具有良好的反应原性。

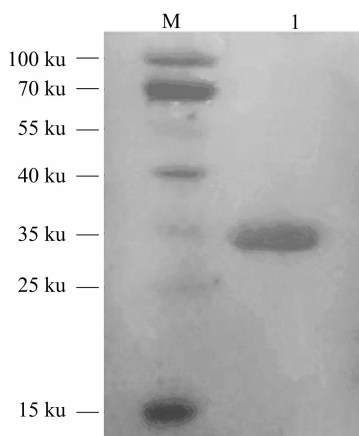


图6 gB 重组蛋白的 Western Blot 检测

3 结论与讨论

IBR 近年来已经成为影响牧业发展的主要病原,对于我国而言它属于外来病原,首次发现该病在 1980 年,2005 年我国在澳大利亚进口种牛中成功分离到该病毒^[5]。2006 年检测了来自内蒙古等 11 个省份的疑似感染 IBR 血清样本,结果显示抗体阳性率为 46.0%^[6]。2015 年北疆 4 个规模化奶牛场 IBR 感染性抗体的平均阳性率为 87.4%^[7]。2016 年笔者所在团队对宁夏地区进行 IBR 的抗体检测,平均阳性率高达 85.1%^[8]。我国作为奶牛养殖业大国,但由于我国整体的养牛水平不太高,每年都要从一些养牛水平高的国家进口大批的牛,2015 年 Moore 等的研究表明,澳大利亚出口的活牛 IBR 血清阳性率为 39.0%^[9],这些数据均表明 IBR 感染的普遍性和严重性,我们应提高警惕避免该病发生大面积暴发。

gB 蛋白是 IBRV 主要的抗原蛋白,在机体的免疫保护中起着至关重要的作用^[10]。目前,IBRV 的诊断试剂大多数均针对 gB 抗原表位。本研究采用笔者所在实验室构建好的 gB 重组菌株,使用大肠杆菌的表达系统,大肠杆菌的表达系统以其高效表达的优点成为近些年来首选的表达系统^[11]。相对于全基因表达,gB 部分基因表达克服了蛋白表达量低、抗原性弱等缺点,目的蛋白在大肠杆菌表达系统中获得了大量高效的表达。在选择蛋白纯化方法时,采用镍柱亲和层析法,方法简便、利于操作及实验室蛋白的大量纯化,分离纯化效果好,纯化后的蛋白经免疫印迹检测,能与 IBR 标准阳性血清发生特异性反应,说明表达的 gB 蛋白具有良好的反应活性,可被用来作为 IBRV 检测的特异性抗原。

本研究成功获得了 IBRV gB 蛋白,为应用建立 IBR 诊断方法和制备 gB 蛋白多抗和单抗,作为抗原免疫动物提供了重要的物质基础和技术支持。

参考文献:

- [1] Crook T, Benavides J, Russell G, et al. Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of

hematogenous spread within the fetus in natural cases[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(4): 662–670.

- [2] Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe[J]. *Veterinary Journal*, 2014, 201(3): 249–256.
- [3] Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, et al. Bovine herpesvirus – 1 (BHV – 1) – a re – emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis [J]. *Veterinary Quarterly*, 2013, 33(2): 68–81.
- [4] Woodbine K A, Medley G F, Moore S J, et al. A four year longitudinal sero – epidemiological study of bovine herpesvirus type – 1 (BHV – 1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in southwest England[J]. *BMC Veterinary Research*, 2009, 5(1): 1–12.
- [5] 王洪梅, 侯佩莉, 宋玲玲, 等. 国内外奶牛主要病毒病的流行现状及防控技术研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2014(10): 42–49.
- [6] 王延涛, 李国军, 周玉龙, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒分离鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(5): 30–31.
- [7] 罗玉江. 北疆部分规模化牛场奶牛 BVD、IBR、BPI 和 Brucellosis 的流行病学调查[D]. 石河子: 石河子大学, 2015.
- [8] 何小丽, 赵世媛, 李永琴, 等. 宁夏地区奶牛病毒性腹泻及牛传染性鼻气管炎的流行病学调查[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(11): 100–102.
- [9] Moore S J, O’dea M A, Perkins N, et al. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2015, 27(1): 6–17.
- [10] Manoj S, Babiuk L A, Littel – Van Den Hurk S V. Immunization with a dicistronic plasmid expressing a truncated form of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein D and the amino – terminal subunit of glycoprotein B results in reduced gB – specific immune responses [J]. *Virology*, 2003, 313(1): 296–307.
- [11] Julian, Ruiz – Saenz R, Jairo, et al. Molecular and *in vitro* characterization of field isolates of bovine herpesvirus – 1 [J]. *Virologica Sinica*, 2012, 27(1): 26–37.

(上接第 185 页)

- [2] Salpeter S R, Walsh J M, Ormiston T M, et al. Meta – analysis: effect of hormone – replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women [J]. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 2006, 8(5): 538–554.
- [3] 杜贵永. 绝经后妇女血清雌二醇浓度与血脂水平的关系[J]. *中外医疗*, 2017(5): 31–33.
- [4] 陆江, 朱道仙, 刘静, 等. 绝育手术对雌性 Beagle 犬血脂代谢及抗氧化能力的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(2): 179–181.
- [5] 张珊, 郭俊霞, 陈文. 牛磺酸影响胆固醇代谢的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014(7): 1985–1989.

- [6] Crujeiras A B, Carreira M C, Cabia B, et al. Leptin resistance in obesity: an epigenetic landscape [J]. *Life Sciences*, 2015 (140): 57–63.
- [7] Sah S P, Singh B, Choudhary S A. Animal models of insulin resistance: a review [J]. *Pharmacological Reports*, 2016, 68(6): 1165–1177.
- [8] 王瑞峰, 王小兵. 血清 TNF – α 与 IL – 6 检测在非酒精性脂肪肝诊断中的意义[J]. *川北医学院学报*, 2017(5): 698–700.
- [9] 崔红旺, 孟志斌, 王挺锐, 等. 雌激素缺乏上调 TNF – α 促发卵巢切除大鼠骨细胞程序性坏死[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017(11): 1431–1437.

王婷婷, 胡 萍, 张顺利. 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 193–196.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.048

内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的影响

王婷婷¹, 胡 萍², 张顺利³

(1. 漯河职业技术学院食品工程系, 河南漯河 462002; 2. 许昌职业技术学院园林与食品工程学院, 河南许昌 461000;

3. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要:研究了内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的数量和分布的影响,以探讨巨噬细胞对胚胎的着床和维持的作用。采用昆明系妊娠小鼠分为对照组和试验组,在小鼠妊娠 6 d(D₆)对照组腹腔注射生理盐水,试验组分为 I、II、III 组,分别注射 1、2、4 μg 剂量的内毒素,用酶组织化学染色的方法显示出子宫内巨噬细胞的数量和分布。结果显示,与对照组相比较,试验 I、III 组子宫内巨噬细胞的数量明显增多,差异极显著,而试验 II 组与对照组没有显著差异。巨噬细胞在子宫环肌外层、环肌内层和内膜上的分布与对照组相比较,环肌外层巨噬细胞数量减少,而环肌内层和内膜的巨噬细胞数量明显增多,差异显著。提示内毒素使妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量增多,细胞向子宫内膜迁移,而不利

于胚胎着床和维持,可能对母胎免疫耐受产生影响。

关键词:内毒素;妊娠小鼠;酶组织化学;巨噬细胞;免疫耐受

中图分类号:S852.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)17-0193-03

妊娠是一个复杂的生理过程,从免疫学上来看类似于器官移植。胚胎对母体来说是一个移植物,母体免疫系统对此进行识别,并产生免疫应答^[1]。巨噬细胞是子宫内的一种重要免疫细胞,有多种表面标志和标记酶,具有抗感染、抗肿瘤、呈递抗原和免疫调节等作用。巨噬细胞的数量和在子宫内的分布在胚胎的着床和维持中起到一定的作用^[2-3]。

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁上的一种脂多糖和微量蛋白的复合物,可刺激机体对多糖成分产生抗体^[4]。内毒素作为外源性致热原(热原质),作用于中性白细胞、单核细胞、巨噬细胞等。内毒素能够激活妊娠小鼠子宫内的巨噬细胞,从而对胚胎的着床和维持产生影响^[5],也对母胎免疫耐受产生一定的影响。

本试验通过给妊娠期小鼠注射不同剂量的内毒素,通过酶组织化学染色方法,研究内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的影响,探讨巨噬细胞在胚胎的着床和维持中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物^[6] 成年雌性昆明种小鼠 40 只,由河南师范大学生命科学学院实验动物繁育中心提供,体质量(25 ± 2) g,自由饮水取食。分成对照组与试验 I、II、III 组,雌、雄鼠按 2:1 合笼,次日晨查见阴栓者为妊娠 1 d,到妊娠 6 d(D₆)时,对照组腹腔注射生理盐水,试验 I、II、III 组分别注射 1、2、4 μg 剂量的内毒素,8 d(D₈)观察流产情况并取材。

1.1.2 主要化学药品和试剂 内毒素,购自 Sigma 公司;

α-醋酸萘酯(α-NAE),购自上海试剂一厂;固蓝 B 盐购自德国 Chroma-gesellschaft 公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 冰冻切片机(美国 Reichert Histo Stat Microtome Cryostat),柯达 DC 290 数码相机。

1.2 方法

1.2.1 小鼠子宫材料的获取 小鼠脱颈椎处死,沿腹中线剪开腹腔,取其子宫,在预冷的生理盐水中快速去除脂肪,迅速放入液氮中冷冻 30 s。标记好材料放入 -20 ℃ 冰箱中保存。

1.2.2 冰冻切片的制备 -20 ℃ 下冰水包埋材料,修块,切片,切片的厚度 8 μm,材料平铺在载玻片上,凉干后 -20 ℃ 冰箱冷冻保藏。

1.2.3 0.2 mol/L PBS 盐溶液配制 A 液:NaH₂PO₄ · 2H₂O 3.12 g 加 100 mL 蒸馏水;B 液:Na₂HPO₄ · 12H₂O 7.16 g 加 100 mL 蒸馏水;取 A 液 13 mL 加 B 液 87 mL,混合均匀,调 pH 值至 7.4。

1.2.4 孵育液配制 0.03 g α-醋酸萘酯 + 5 mL 丙酮充分溶解 + 5 mL 蒸馏水混匀 + 20 mL PBS 盐溶液(要边加边摇晃防止生成沉淀) + 固蓝 B 盐。充分搅拌溶解混匀。注意孵育液要即配即用。

1.2.5 酶组织化学染色 (1)把冰冻切片室温下充分干燥。(2)放入纯丙酮液中固定 10 min。(3)取出固定好的切片用 0.2 mol/L 的 PBS 盐溶液冲洗 3 次,每次 5 min。(4)把冲洗好的切片放入配制好的孵育液中,37 ℃ 温浴锅孵育 50 min。(5)从孵育液中取出切片,用 0.2 mol/L PBS 盐溶液冲洗 1 次,5 min。放入 0.2 mol/L PBS 盐溶液中浸泡 5 min,再放入蒸馏水中浸泡 2 min,取出后甘油明胶封片。(6)镜检、拍照、统计分析。

1.2.6 统计方法 采用 χ^2 检验,α = 0.05,结果大于 α 差异不显著,小于 α 差异显著。

收稿日期:2019-03-12

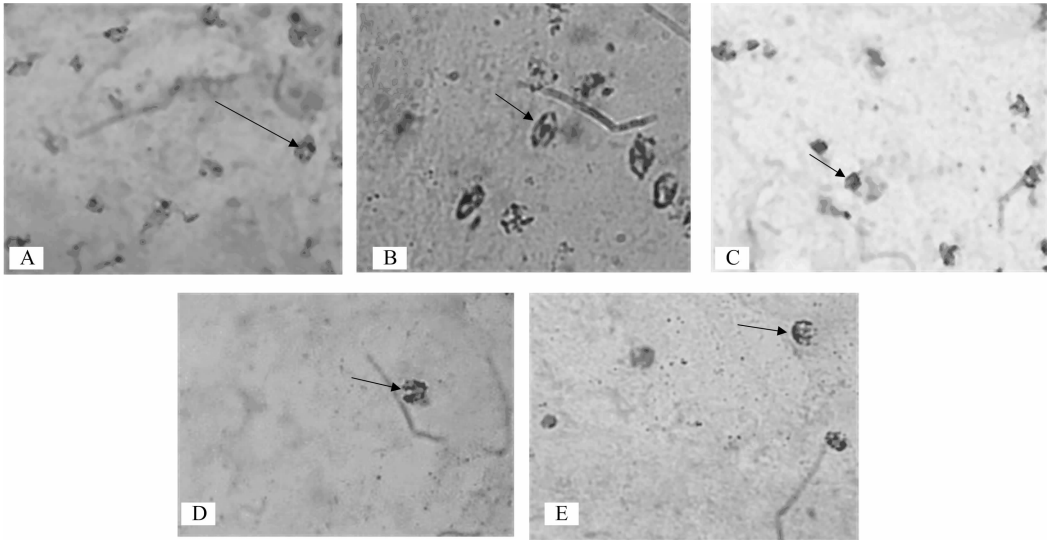
作者简介:王婷婷(1981—),女,河南漯河人,硕士,讲师,主要从事食品和生物技术研究。E-mail:541144845@qq.com。

通信作者:张顺利,教授,主要从事免疫方面研究。E-mail:zsl369@sina.com。

2 结果与分析

2.1 酶组织化学染色巨噬细胞的结果

镜检观察子宫内巨噬细胞,发现巨噬细胞多为不规则形状,也有呈椭圆形、圆形的,染色结果细胞质呈紫色,而细胞核为无色(图 1)。



A—试验Ⅱ组子宫环肌外层巨噬细胞(400×); B—对照组子宫环肌内层巨噬细胞(400×); C—试验Ⅰ组子宫环肌内层巨噬细胞增多(400×); D—对照组子宫内层巨噬细胞(400×); E—试验Ⅰ组子宫内层巨噬细胞显著增多(400×)

图1 不同处理巨噬细胞染色结果

2.2 内毒素对妊娠小鼠胚胎着床的影响

正常小鼠的胚胎为粉红色,透明度较高。注射内毒素后能诱使胚胎流产,先出现阴道出血,然后出现胚胎吸收。对照组未观察到流产,胚胎为粉红色;试验Ⅰ组小鼠未见流产,但发现子宫内有黑红色的瘀血;试验Ⅱ、Ⅲ组流产率分别为 75% 和 100%,胚胎已经模糊不清,出现吸收现象(表 1)。

表 1 内毒素对妊娠小鼠胚胎着床的影响

注射剂量 (μg)	妊娠小鼠 (只)	胎鼠个数 (个)	流产率 (%)
生理盐水	4	13、11、10、10	0
1	4	8、10、14、8	0
2	4	12、2、1、2	75
4	4	0、1、0、0	100

2.3 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量的影响

注射不同剂量的内毒素使妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的总数呈波动性变化,注射 1 μg 内毒素巨噬细胞数量较正常对照组明显增加,2 μg 时数量又下降到正常水平,4 μg 时数量又增加(图 2)。

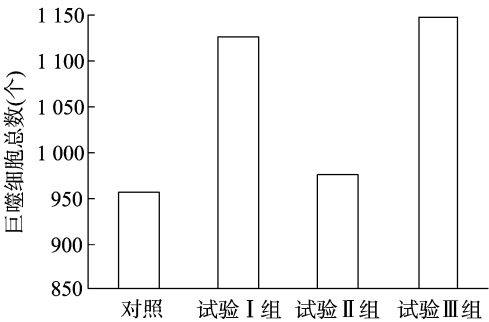


图2 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量的影响

妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的总体数量变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异不显著(表 2)。

表 2 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量的影响

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	955	a	A
试验Ⅰ组	1 125	b	B
试验Ⅱ组	974	a	A
试验Ⅲ组	1 146	b	B

2.4 内毒素对妊娠小鼠子宫内巨噬细胞分布的影响

妊娠小鼠子宫内巨噬细胞数量分布的变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异不显著(表 3)。

表 3 子宫内巨噬细胞数量的变化

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	3.960 ± 1.37	a	A
试验Ⅰ组	8.240 ± 2.90	b	B
试验Ⅱ组	2.768.24 ± 1.77	a	A
试验Ⅲ组	6.200 ± 3.07	b	B

妊娠小鼠子宫内环肌层巨噬细胞的数量分布变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异显著(表 4)。

妊娠小鼠子宫内环肌外层巨噬细胞的数量分布变化,试验Ⅰ、Ⅲ组与对照组相比差异极显著,而试验Ⅱ组与对照组相比差异显著(表 5)。

注射不同剂量的内毒素使妊娠小鼠子宫内巨噬细胞的数

表 4 子宫环肌内层巨噬细胞的数量变化

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	9.12 ± 3.35	a	A
试验 I 组	19.88 ± 4.89	b	B
试验 II 组	15.12 ± 5.71	ab	AB
试验 III 组	18.16 ± 10.07	b	B

表 5 子宫环肌外层巨噬细胞的数量变化

组别	巨噬细胞总数 (个)	差异显著性	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	25.12 ± 9.08	a	A
试验 I 组	16.88 ± 5.74	b	B
试验 II 组	21.08 ± 7.02	ab	AB
试验 III 组	21.48 ± 7.21	b	B

量分布发生变化。随着注射内毒素剂量的逐渐增加,环肌内层和内膜的细胞数量增加,环肌外层细胞数量减少。正常情况下,巨噬细胞大多数分布于子宫外膜,注射内毒素刺激环肌内层和内膜的巨噬细胞数量增加。虽然试验 II 组妊娠小鼠子宫内巨噬细胞总数量没有变化,但巨噬细胞在子宫内的分布与对照组相比环肌内层的数量明显增多(图 3)。

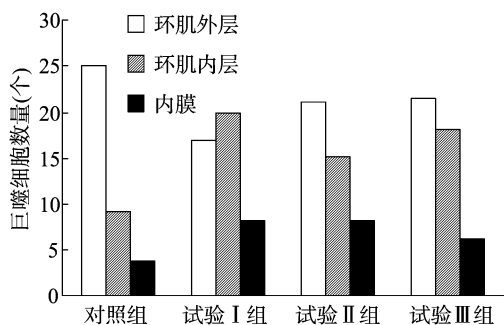


图 3 不同剂量内毒素对子宫内各组织巨噬细胞分布的影响

3 讨论

文献报道非特异性酯酶 α -NAE 存在于单核细胞、粒细胞系统中,而子宫内的其他细胞几乎不含此物质^[7],本研究观察子宫内巨噬细胞,发现巨噬细胞多为不规则形状,也有呈椭圆形、梭形。 α -NAE 主要存在于巨噬细胞的细胞质内,染色结果细胞质呈紫色,而细胞核为无色。用此方法可以很简便很快速地显示阳性巨噬细胞,与组化染色相比很经济,但也有一定的缺点,比如染色很容易褪色、不易长时间保存。

有文献报道在妊娠期 D8 肌层中几乎没有巨噬细胞^[8],本研究也观察到相同的结果,所以在对巨噬细胞进行统计计数时把子宫结构分为环肌外层、环肌内层和内膜进行统计分析。

研究发现,1 μ g 内毒素能使小鼠巨噬细胞数量增加,使小鼠子宫内膜、肌层的巨噬细胞都与对照有显著性差异,但是随着内毒素剂量的增加,到 2 μ g 时,子宫总的巨噬细胞基本没有变化,但是肌层巨噬细胞和对照相比有了显著性差异。4 μ g 时,全部的孕鼠均发生了流产,但总的子宫巨噬细胞数量和 1 μ g 没有显著性差异。但是同样,流产小鼠子宫内膜和肌层的巨噬细胞都与对照有显著性差异。由此,推测子宫内

巨噬细胞数量的多少和 LPS 的用量有关。在一定的 LPS 范围内,巨噬细胞的数量随 LPS 剂量增加而减少到一定水平,但是当 LPS 量继续增大时,巨噬细胞的数量将会增多。

小鼠在正常妊娠期间子宫内巨噬细胞的数量分布随时间不断地发生动态变化,在小鼠妊娠 D8 子宫内的巨噬细胞主要集中在子宫的环肌外层,而环肌内层和内膜中几乎没有巨噬细胞,有利于胚胎着床和维持。妊娠期子宫内巨噬细胞过多存在对于妊娠不利^[9]。本研究也观察到了这种现象,但是试验还观察到了 2 μ g 剂量巨噬细胞总数基本没有变化,但是在子宫内部的分布却发生了变化,也就是说巨噬细胞在子宫内发生了迁移,从而导致流产。

但内毒素是如何调节巨噬细胞的迁移呢?试验组与对照组相比巨噬细胞的数量明显增加,而且巨噬细胞在子宫环肌内层和内膜的分布数量也明显增加,试验 II 组虽然巨噬细胞数量又降到正常的水平,但巨噬细胞分布在环肌内层的数量也明显增加。

内毒素并不干扰孕鼠的正常内分泌功能,也不能穿越胎盘进入胎儿体内。内毒素诱导流产的一个重要机制是引起预致敏的(primed)巨噬细胞释放 $\text{TNF}-\alpha$ ^[10-12]。 $\text{TNF}-\alpha$ 导致流产已被动物试验所证实,内毒素诱导小鼠流产与子宫内 $\text{TNF}-\alpha$ 的产生有直接关系,本试验中内毒素能诱导巨噬细胞由子宫外膜向子宫内膜发生迁移,使子宫内膜巨噬细胞数量增加,推测迁移到内膜的巨噬细胞释放 $\text{TNF}-\alpha$ 。它可直接引起胎盘滋养层细胞的凋亡,因滋养层前祖细胞在未成熟阶段发生程序性死亡而耗竭,导致子宫内胎儿缺乏营养而死亡^[13]。使妊娠小鼠子宫内的胚胎不能正常着床和维持,可能不利于母鼠免疫耐受,使母鼠对胚胎产生排斥而流产,所以内毒素能激活巨噬细胞,使巨噬细胞数量增加,并诱导巨噬细胞向子宫内发生迁移,影响胚胎的着床和维持,导致妊娠小鼠流产。

参考文献:

- [1] 郝苏平. 中药对动物噪音应激诱导流产的安胎作用及机理[D]. 保定:河北农业大学,2012.
- [2] Baines M G, Duclos A J, Anteck A E, et al. Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss[J]. American Journal of Reproductive Immunology, 1997, 37(6): 471-477.
- [3] 肖云山, 林其德. 妊娠早期蜕膜组织巨噬细胞分泌 IL-10/IFN- γ 功能的特征[J]. 现代妇产科进展, 2005, 14(3): 218-221.
- [4] 张喜平, 周田美, 董晓勤, 等. 黄芩苷注射液体外抗菌作用实验研究[J]. 医学研究杂志, 2006(8): 39-41.
- [5] 钟秀会, 周占祥, 孙秉贵, 等. 黄芩白术对 LPS 诱导小鼠流产的对抗作用及子宫内 IL-2 含量的影响[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(2): 51-53.
- [6] 闫坤. 前列腺素 E1 对小鼠子宫巨噬细胞表型和功能活性的影响[D]. 河南师范大学, 2011.
- [7] 王永才. 血液骨髓细胞检查[M]. 大连科技文献出版社, 1994.
- [8] 周占祥, 邓泽沛, 孙秉贵, 等. 生殖周期中小鼠子宫巨噬细胞的分布[J]. 解剖学报, 1998, 29(2): 96-101.
- [9] 田兴辉, 邓泽沛, 钟秀会, 等. 孕酮拮抗剂 RU486 对妊娠小鼠子宫巨噬细胞的影响及与妊娠相关性的研究[J]. 解剖学报, 2002, 33(1): 97-101.
- [10] 张青, 徐剑铖, 毛宝龄, 等. 内毒素致伤大鼠肺组织 $\text{TNF}-\alpha$ 、

3 结论与讨论

IBR 近年来已经成为影响牧业发展的主要病原,对于我国而言它属于外来病原,首次发现该病在 1980 年,2005 年我国在澳大利亚进口种牛中成功分离到该病毒^[5]。2006 年检测了来自内蒙古等 11 个省份的疑似感染 IBR 血清样本,结果显示抗体阳性率为 46.0%^[6]。2015 年北疆 4 个规模化奶牛场 IBR 感染性抗体的平均阳性率为 87.4%^[7]。2016 年笔者所在团队对宁夏地区进行 IBR 的抗体检测,平均阳性率高达 85.1%^[8]。我国作为奶牛养殖业大国,但由于我国整体的养牛水平不太高,每年都要从一些养牛水平高的国家进口大批的牛,2015 年 Moore 等的研究表明,澳大利亚出口的活牛 IBR 血清阳性率为 39.0%^[9],这些数据均表明 IBR 感染的普遍性和严重性,我们应提高警惕避免该病发生大面积暴发。

gB 蛋白是 IBRV 主要的抗原蛋白,在机体的免疫保护中起着至关重要的作用^[10]。目前,IBRV 的诊断试剂大多数均针对 gB 抗原表位。本研究采用笔者所在实验室构建好的 gB 重组菌株,使用大肠杆菌的表达系统,大肠杆菌的表达系统以其高效表达的优点成为近些年来首选的表达系统^[11]。相对于全基因表达,gB 部分基因表达克服了蛋白表达量低、抗原性弱等缺点,目的蛋白在大肠杆菌表达系统中获得了大量高效的表达。在选择蛋白纯化方法时,采用镍柱亲和层析法,方法简便、利于操作及实验室蛋白的大量纯化,分离纯化效果好,纯化后的蛋白经免疫印迹检测,能与 IBR 标准阳性血清发生特异性反应,说明表达的 gB 蛋白具有良好的反应活性,可被用来作为 IBRV 检测的特异性抗原。

本研究成功获得了 IBRV gB 蛋白,为应用建立 IBR 诊断方法和制备 gB 蛋白多抗和单抗,作为抗原免疫动物提供了重要的物质基础和技术支持。

参考文献:

- [1] Crook T, Benavides J, Russell G, et al. Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of

hematogenous spread within the fetus in natural cases[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(4): 662–670.

- [2] Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe[J]. *Veterinary Journal*, 2014, 201(3): 249–256.
- [3] Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, et al. Bovine herpesvirus – 1 (BHV – 1) – a re – emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis [J]. *Veterinary Quarterly*, 2013, 33(2): 68–81.
- [4] Woodbine K A, Medley G F, Moore S J, et al. A four year longitudinal sero – epidemiological study of bovine herpesvirus type – 1 (BHV – 1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in southwest England[J]. *BMC Veterinary Research*, 2009, 5(1): 1–12.
- [5] 王洪梅, 侯佩莉, 宋玲玲, 等. 国内外奶牛主要病毒病的流行现状及防控技术研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2014(10): 42–49.
- [6] 王延涛, 李国军, 周玉龙, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒分离鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(5): 30–31.
- [7] 罗玉江. 北疆部分规模化牛场奶牛 BVD、IBR、BPI 和 Brucellosis 的流行病学调查[D]. 石河子: 石河子大学, 2015.
- [8] 何小丽, 赵世媛, 李永琴, 等. 宁夏地区奶牛病毒性腹泻及牛传染性鼻气管炎的流行病学调查[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(11): 100–102.
- [9] Moore S J, O’dea M A, Perkins N, et al. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2015, 27(1): 6–17.
- [10] Manoj S, Babiuk L A, Littel – Van Den Hurk S V. Immunization with a dicistronic plasmid expressing a truncated form of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein D and the amino – terminal subunit of glycoprotein B results in reduced gB – specific immune responses [J]. *Virology*, 2003, 313(1): 296–307.
- [11] Julian, Ruiz – Saenz R, Jairo, et al. Molecular and *in vitro* characterization of field isolates of bovine herpesvirus – 1 [J]. *Virologica Sinica*, 2012, 27(1): 26–37.

(上接第 185 页)

- [2] Salpeter S R, Walsh J M, Ormiston T M, et al. Meta – analysis: effect of hormone – replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women [J]. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 2006, 8(5): 538–554.
- [3] 杜贵永. 绝经后妇女血清雌二醇浓度与血脂水平的关系[J]. *中外医疗*, 2017(5): 31–33.
- [4] 陆江, 朱道仙, 刘静, 等. 绝育手术对雌性 Beagle 犬血脂代谢及抗氧化能力的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(2): 179–181.
- [5] 张珊, 郭俊霞, 陈文. 牛磺酸影响胆固醇代谢的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014(7): 1985–1989.

- [6] Crujeiras A B, Carreira M C, Cabia B, et al. Leptin resistance in obesity: an epigenetic landscape [J]. *Life Sciences*, 2015 (140): 57–63.
- [7] Sah S P, Singh B, Choudhary S A. Animal models of insulin resistance: a review [J]. *Pharmacological Reports*, 2016, 68(6): 1165–1177.
- [8] 王瑞峰, 王小兵. 血清 TNF – α 与 IL – 6 检测在非酒精性脂肪肝诊断中的意义[J]. *川北医学院学报*, 2017(5): 698–700.
- [9] 崔红旺, 孟志斌, 王挺锐, 等. 雌激素缺乏上调 TNF – α 促发卵巢切除大鼠骨细胞程序性坏死[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017(11): 1431–1437.