文章编号:1000-5404(2007)23-2223-03

论著

*neu*B1 失活空肠弯曲菌 O:19 突变株感染致病力的初步研究

向淑利[1],蔡方成[2],张晓萍[2] ([1]泸州医学院附属医院神经内科,泸州 646000;[2]重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,重庆 400014)

提 要:目的 探讨 *neu*B1 失活空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, CJ)O:19 突变株的感染致病力。**方法** 由 CJ O:19 野生株构建 *neu*B1 灭活的突变株,检测其对正常人血清杀菌活性的敏感性、运动力和自身凝集(AAG)活性,并与野生株进行比较。**结果** 突变株对 10% 正常成人血清(normal human serum, NHS)杀菌活性的敏感性高于同源的野生株($P<0.05$),孵育 15 min 和 60 min 后突变株存活率分别为(20.6±7.4)%和(9.6±3.6)%,而野生株分别为(36.9±5.9)%和(15.5±4.3)%,但突变株的运动力和 AAG 活性与野生株比较却没有显著性差异($P>0.05$)。**结论** *neu*B1 失活 CJ O:19 突变株仍具有较强的感染致病力,因而应考虑灭活后突变菌株疫苗的开发研究。

关键词: 空肠弯曲菌;感染致病力;运动力;自身凝集活性;突变株
中图法分类号: R378; R392.7; R517.902 **文献标识码:** A

Pathogenicity of a mutant from *Campylobacter jejuni* O:19 by deleting *neu*B1

XIANG Shu-li[1], CAI Fang-cheng[2], ZHANG Xiao-ping[2] ([1]Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000; [2]Pediatric Institute, The Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the pathogenicity of *Campylobacter jejuni* (CJ) O:19 strain after deletion of *neu*B1. **Methods** The mutant of CJ O:19 by deleting *neu*B1, which LPS is deficient in sialic acid, was compared with the homologous wild strain by assaying their sensitivity to bactericidal activity, motility and autoagglutination of 10% normal human serum (NHS). **Results** The sensitivity of the mutant strain to bactericidal activity of serum was superior to that of the wild strain. The survival rate of the mutant strain was (20.6±7.4)% and (9.6±3.6)% after incubation with 10% NHS for 15 min and 60 min, that of wild strain was (36.9±5.9)% and (15.5±4.3)% respectively. The wild and mutant strains showed no significant difference in sensitivity to motility and autoagglutination of NHS. **Conclusion** The mutant strain possesses remarkable pathogenicity so that an inactivated vaccine from the mutant strain should be first considered.

Key words: *Campylobacter jejuni*; pathogenicity; motility; autoagglutination; mutant

通过分子克隆技术和同源重组原理,由格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)相关的空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*, CJ) O:19 野生株构建出 *neu*B1 失活的 CJ O:19 突变株,该突变菌株的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)外核心寡糖中唾液酸(NANA)缺失,使其 LPS 外核心寡糖与神经节苷脂 GM1 之间的分子模拟特性受到破坏,该突变株 LPS 和菌体裂解物都不再具有导致周围神经受到免疫性损伤的潜在危险[1,2],可望成为有效预防 CJ 感染且无神经免疫损伤潜在危险的 CJ 疫苗候选菌株。

本研究主要观察该突变株的感染致病力,初步探讨该菌株作为 CJ 活疫苗菌种的可能性。

1 材料与方法

1.1 CJ 菌株

CJ O:19 野生株购自北京医科大学第一附属医院临床病毒室,同源的 *neu*B1 失活的 CJ O:19 突变株[1,2]为重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所构建保存。

1.2 对正常人血清杀菌活性的敏感性

参照 Blaser 等[3]的方法,测定 CJ 野生株和突变株对 10% 正常成人血清(normal human sera, NHS)杀菌活性的敏感性。

基金项目: 国家自然科学基金(30170990)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170990)
作者简介: 向淑利(1970-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事周围神经疾病方面的研究。电话:(0830)3165661, E-mail: xiangshuli@163.com
通讯作者: 蔡方成, E-mail: caifangc@126.com
收稿日期: 2007-01-22; **修回日期:** 2007-05-28

1.2.1 制备 NHS 采集5个健康成年男性(16~45岁)和5个健康成年女性(17~44岁)血液各3 ml,分离血清,等量混合,用0.45 μm孔径的滤膜过滤除菌,分装,置于-70 ℃备用。

1.2.2 制备 CJ 细菌悬液 分别将 CJ 野生株和突变株于5%羊血的 Camp-BAP 培养基上培养过夜,使其生长至融合,用无菌 PBS(pH 7.4)收集和洗涤细菌,并制成细菌悬液,$D(600)=0.1$(浓度大约为 2×10^4 CFU/ml)。

1.2.3 CJ 菌株对 NHS 杀菌活性敏感性的测定 在无菌、底部呈 U 形的微量离心管(Ep 管)中,加入 100 μl CJ 细菌悬液和 100 μl 20% NHS(用 PBS 稀释),混匀,置于 37 ℃孵育。孵育前,从测试管中取样 50 μl 细菌悬液,用布氏肉汤稀释 10 倍,取 50 μl 铺到5%羊血的 Camp-BAP 培养基上,42 ℃微氧条件下培养 48 h,计算生长的菌落数(CFU)。分别在孵育 15 min 和 60 min 时取样 50 μl,如前所述进行铺板、孵育和菌落计数。用经 56 ℃水浴 30 min 的热灭活血清(inactivated NHS,iNHS),PBS 稀释作对照,来确定 NHS 对 CJ 的杀菌活性是否依赖于补体。根据公式分别计算细菌在 NHS 和 iNHS 中的存活率:NHS 中细菌存活率(%)=细菌存活的克隆数/对照细菌存活的克隆数×100%;iNHS 中细菌存活率(%)=细菌存活的克隆数/对照细菌存活的克隆数×100%。在不同时间、相同条件下测定4次。

1.3 运动力

运动力是 CJ 侵袭能力的一个主要的毒力指标,是 CJ 在肠道内定植能力的一个标志。将 CJ O:19 野生株和 *neu*B1 缺失的突变株分别在 Camp-BAP 培养基上划线接种,培养 48 h 后,再次划线接种培养 16 h。用 PBS 收集细菌,8 000 r/min×10 min,重悬到 MH 肉汤至 $D(600)=0.7$。无菌吸头的微量移液器吸取 1 μl 细菌悬液,直接滴到含 0.4% 琼脂的 Camp-BAP 半固体培养基上,42 ℃微氧环境下培养 48 h。测量菌落繁殖扩散范围的最大直径。在不同时间、相同条件下测定4次。

1.4 自身凝集活性(autoagglutination,AAG)

AAG 活性是 CJ 毒力的一个标志,与该菌对小肠上皮细胞侵袭力有关。根据 Misawa 等[4]的方法,分别测定野生株和突变株 CJ 的 AAG 活性。将 CJ 在 Camp-BAP 培养基上 37 ℃微氧环境中培养 24 h,收集到无菌的 PBS 中,配制成 $D(600)=1.0$ 的细菌悬液。取 4 ml 悬液到无菌的玻璃管中,室温静置 24 h。从上清液的上部分中取出 1 ml,仔细抽吸,充分混匀后,测定 $D(600)$ 值。具有强 AAG 活性的 CJ 菌体将不会保留在上清液的上部分中,导致 $D(600)$ 值降低。在不同时间、相同条件下测量4次。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两均数间两两比较用 t 检验,单因素多均数间比较用方差分析,多均数间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 CJ 突变株对 NHS 杀菌活力的敏感性的检测

野生株和突变株分别与 10% NHS 孵育,孵育 0、15 min 和 60 min 时进行菌落计数,计算细菌存活率。

在与 10% NHS 孵育后的各个时相点中,突变株的存活率均明显低于野生株($P<0.05$)。说明 LPS 外核心寡糖缺乏 NANA 的突变株,对 NHS 杀菌活性更为敏感(表1)。

表1 CJ 在10% NHS 中孵育后存活率($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	0 min	15 min	60 min
野生株	4	97.4±10.5	36.9±5.9	15.5±4.3
突变株	4	98.3±4.8	20.6±7.4[a]	9.6±3.6[a]

a:$P<0.05$,与同时相点野生株组比较

为确定补体在 NHS 杀菌活性中的作用,将野生株和突变株分别与 iNHS 和 PBS 孵育,并计算孵育 0、15 min 和 60 min 时的存活率(表2),显示两菌株各个时间点的存活率没有显著性差异($P>0.05$),表明 NHS 对 CJ 的杀灭是补体依赖性的。

表2 CJ 在10% iNHS 中孵育后存活率($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	0 min	15 min	60 min
野生株	4	99.4±8.5	99.6±8.4	99.7±9.4
突变株	4	98.5±7.2	98.8±6.8	99.1±5.2

2.2 CJ 突变株的运动力的检测

突变株和野生株在培养皿中菌落繁殖扩散直径分别为(1.42±0.17)cm 和(1.55±0.20)cm,两者比较无显著性差异($P>0.05$),表明突变株与野生株在肠道内具有同等定植能力。

2.3 CJ 突变株的 AAG 活性检测

突变株和野生株静置24 h 后的 $D(600)$ 反映两菌株细菌的 AAG 活性,分别为(0.262±0.011)和(0.254±0.005),两组间无显著性差异($P>0.05$),表明突变株具有与野生株同等入侵小肠上皮细胞的能力。

3 讨论

CJ 是细菌性腹泻的最常见病原菌之一。据报道全球每年约有 40 亿 CJ 性腹泻病例。在发达国家,CJ 肠炎的发病率甚至超过志贺菌和沙门菌,仅次于致病性大肠杆菌引起的腹泻。而在发展中国家,小于5岁的儿童中 CJ 肠炎的年发病率高达40%。CJ 肠炎主要呈散在发病,但也可引起暴发性流行和食物中毒。孕妇感染 CJ 可引起流产或早产,若孕前3个月内感染 CJ,胎儿和新生儿的病死率可高达 80%[5]。

同样重要的是,某些血清型的 CJ 感染,还易诱发免疫性周围神经病 GBS。自脊髓灰质炎在全世界基本消灭以来,GBS 已成为小儿最常见的急性迟缓性瘫痪性疾病。流行病学资料显示,3/4 的 GBS 患者病前有胃肠道或呼吸道前驱感染史,其中以 CJ 前驱感染最为常见。我国 76% 轴索型 GBS 和 42% 脱髓鞘型 GBS 患者有 CJ 前驱感染证据。McCarthy 等[6]报道 CJ 感染后2个月内发生 GBS 的危险性是一般人群的 100 倍。20% GBS 患者需机械通气,15%~22% GBS 患者留下

不同程度瘫痪后遗症。即使现代医疗技术条件下，病死率仍在 2% ~10%[7]，且与 CJ 相关的 GBS 多以轴索型为主，预后比其他类型更为严重。

因此，研究怎样更有效控制 CJ 感染及其相关疾病，具重要现实意义，受到国内外关注。在发展中国家，CJ 感染主要发生在幼儿。人群中血清特异性抗体滴度往往随年龄增大而逐渐增高，但 CJ 感染率逐渐下降。志愿者试验发现口服低量 CJ 菌液可明显减少 CJ 再次感染致病概率。这些资料均显示研制抗 CJ 感染的有效疫苗，尤其是全菌体疫苗，将是减少 CJ 感染流行的可行措施。

目前研制的 CJ 疫苗有减毒活疫苗、灭活全菌体疫苗和亚单位疫苗[8-10]。它们均能诱导机体产生 CJ 特异性抗体，并在 CJ 攻击试验中表现出减轻疾病症状和/或降低 CJ 在肠道定植的能力。CJ 的抗原性变异大，目前主要存在两大分类系统，包括 108 种血清型的 Lior 系统和超过 60 种血清型的 Penner 或者 O 血清分型系统。然而，对这些系统中确切的保护性抗原还不十分清楚，因此，预防 CJ 感染，最好应用全菌苗，后者含多种抗原成分，比抗原性单一的亚单位疫苗具有更大的优越性。减毒活疫苗和全菌体灭活疫苗均含有 CJ 菌体脂多糖成分。如前所述，由于分子模拟机制，全菌疫苗均不能排除疫苗本身引发 GBS 的可能性。本研究通过基因克隆和同源重组，构建出 *neu*B1 缺失、LPS 外核心寡糖中缺乏 NANA 的 CJ O:19 突变株，该菌株没有 GM1 分子模拟性的结构，并经动物实验证实没有诱发 GBS 的潜在危险。因此，此菌株具有 CJ 疫苗候选菌种的研究价值。

全菌体疫苗有减毒活疫苗与灭活全菌疫苗之分，本研究初步探讨该突变株作为活疫苗的可能性。将突变株活菌对 NHS 杀菌作用的敏感性、细菌运动力和 AAG 活性等进行对比观察，发现 LPS 核心寡糖中缺失 NANA 的突变株，对补体介导的血清杀菌作用敏感性增加，由于该作用能部分反映细菌在体内突破血清杀菌防线，入侵血流，向体内扩散的能力，因而提示该突变株在这方面的致病力可能比野生株弱，似有被作为活菌苗的可能性。然而，进一步研究却发现，该突变株的运动力和 AGG 活性却与野毒株相似。本实验中的突变株之所以仍保持和野生株相似的运动力，主要是因为 *neu*B1 失活并不影响菌体的鞭毛蛋白和趋化蛋白等结构，而这些结构是细菌黏附与运动力的决定因素[11]。AGG 活性也反映某些革兰阴性致病菌对小肠上皮细胞的侵袭力，研究[4]表明它与 CJ 的鞭毛蛋白表达能力密切相关。由此可见，活体突变株对宿主肠道细胞仍有较强侵袭力，不宜直接用该突变株研制预防 CJ 感染的活疫苗。

更值得强调的是，由于本实验中突变株 *neu*B1 的失活，丧失了与 GM1 分子结构相模拟的 NANA 基团，从而在较全面保留野生 CJ 菌株免疫性能的前提下，消除了诱发免疫性周围神经损伤的潜在危险。因此，*neu*B1 失活的 CJ 突变株应被列入当前 CJ 全菌疫苗理想的候选菌株。

参考文献：

[1] 向淑利，蔡方成，邓　兵，等. *neu*B1 基因失活空肠弯曲菌突变株的构建及其临床意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2005，25(7)：538-543.

[2] Xiang S L, Zhong M, Cai F C, *et al*. The sialic acid residue is a crucial component of *C. jejuni* lipooligosaccharide ganglioside mimicry in the induction Guillain-Barre syndrome[J]. J Neuroimmunol, 2006, 174(1-2): 126-132.

[3] Blaser M J, Smith P F, Kohler P F. Susceptibility of Campylobacter isolates to the bactericidal activity of human serum[J]. J Infect Dis, 1985, 151(2): 227-235.

[4] Misawa N, Blaser M J. Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*[J]. Infect Immun, 2000, 68(11): 6168-6175.

[5] Crushell E, Harty S, Sharif F, *et al*. Enteric Campylobacter: purging its secrets? [J]. Pediatr Res, 2004, 55(1): 3-12.

[6] McCarthy N, Giesecke J. Incidence of Guillain-Barre syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*[J]. Am J Epidemiol, 2001, 153(6): 610-614.

[7] Kuwabara S. Guillain-Barre syndrome: epidemiology, pathophysiology and management[J]. Drugs, 2004, 64(6): 597-610.

[8] Lee L H, Burg E, 3rd., Baqar S, *et al*. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*[J]. Infect Immun, 1999, 67(11): 5799-5805.

[9] 冯永嘉，蔡方成，刘　杞，等. 空肠弯曲菌粘附蛋白 PEB1 的克隆表达及免疫保护性初步探索[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2003，23(8)：640-641.

[10] 郑　惠，蔡方成，邓　兵，等. 空肠弯曲菌 Pen:19 peblA 基因序列分析及其真核表达重组质粒的构建[J]. 第三军医大学学报，2006，28(7)：644-647.

[11] Golden N J, Acheson D W. Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis[J]. Infect Immun, 2002, 70(4): 1761-1771.

（编辑　陈聪连）