doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.04.01

# L929 细胞无血清悬浮驯化及其在流产衣原体 灭活疫苗中的应用研究

刘东慧<sup>1</sup>,李兆才<sup>1</sup>,梁林<sup>1</sup>,谭书敏<sup>1</sup>,闫海全<sup>2</sup>,白天俊<sup>2</sup>,王淑芳<sup>2</sup>,闫文军<sup>2</sup>,周继章<sup>1\*</sup> (1. 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室 甘肃省病原生物学基础 科学研究中心,兰州 730046;2. 天祝县动物疫病预防控制中心,甘肃武威 733000)

[收稿日期] 2023-11-20 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2024) 04-0001-13 [中图分类号]8859.797

[摘 要] 为通过悬浮细胞培养方法规模化生产流产衣原体抗原,采用逐步降血清悬浮驯化法使贴壁 L929 细胞逐步适应悬浮培养环境,最终获得了一株可无血清悬浮培养的 L929 细胞株。将流产衣原体接种于 L929 悬浮细胞上,研究不同的促感染试剂以提高收菌量,并选择出最佳的培养方法制备流产衣原体灭活疫苗。以 25 μL、50 μL、100 μL 的剂量免疫 Balb/c 小鼠,攻毒后检测其免疫保护效果。结果显示,当该 L929 悬浮细胞初始接种密度为 5×10<sup>5</sup>/mL 时,培养 72 h 后细胞浓度可达到约 7×10<sup>6</sup>/mL,细胞活力在 95%以上;在细胞密度为 6×10<sup>6</sup>/mL,接菌量为 5.5×10<sup>4</sup> IFU/mL,加入脂质体 2000 的量为 1.7 μL/mL、放线菌酮浓度为 0.4 μg/mL 时,菌量增殖倍数最大,48 h 内约扩增了 52 倍。经流产衣原体悬浮培养细胞灭活疫苗免疫后,小鼠产生的抗体水平随免疫剂量的增加而提升;接种 50 μL、100 μL 疫苗组小鼠的脾淋巴细胞增殖水平、IFN - γ、IL - 2 的含量远高于接种25 μL 疫苗和注射 PBS 组的小鼠;对免疫后的小鼠进行攻毒,接种疫苗组小鼠的脾脏、十二指肠、子宫中的流产衣原体基因组含量远低于未接种疫苗组小鼠。注射 PBS 组及接种 25 μL 疫苗组的小鼠子宫出现了不同程度的坏死及炎症,而其余两组小鼠的子宫无异常变化。结果表明,本试验成功驯化出1 株L929 悬浮培养细胞株,并且通过悬浮培养工艺制备的流产衣原体灭活疫苗免疫效果良好,接种 50 μL、100 μL 该灭活疫苗可以有效抑制流产衣原体的感染,该 L929 细胞全悬浮培养株的成功驯化为疫苗规模化生产提供了技术支持。

[关键词] L929 贴壁细胞;悬浮培养驯化;流产衣原体;灭活疫苗;免疫评价

# Research on Serum – free Suspension Domestication of L929 Cells and its Application in *Chlamydia abortus* Inactivated Vaccine

$$\label{eq:liu_def} \begin{split} & \text{LIU Dong-hui}^1 \text{, LI Zhao-cai}^1 \text{, LIANG Lin}^1 \text{, TAN Shu-min}^1 \text{, YAN Hai-quan}^2 \text{,} \\ & \text{BAI Tian-jun}^2 \text{, WANG Shu-fang}^2 \text{, YAN Wen-jun}^2 \text{, ZHOU Ji-zhang}^{1*} \end{split}$$

基金项目:甘肃省重点研发项目(21YF5FA152);中国农业科学院兰州兽医研究所基本科研业务专项项目(1610312021012)

作者简介: 刘东慧,博士研究生,从事细菌病防控技术研究。

通讯作者: 周继章。E - mail: zhoujizhang@ caas. cn

(1. State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Animal Medicine and Biosafety, Lanzhou University,

Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, China; 2. Center for Animal disease Control of Tianzhu County, Wuwei, Gansu 733000, China)

Corresponding author: ZHOU Ji - zhang, E - mail: zhoujizhang@caas.cn

**Abstract:** In order to provide a suspension cell culture method for large – scale production of *Chlamydia abortus*, this study decreasing serum concentrations, adherent L929 cells adapted to suspension culture gradually, and became completed suspended, finally we get a L929 cell lines can cultured in serum - free suspension. Chlamydia abortus was inoculated on L929 suspension cells, and the best culture method was selected by adding different infection - promoting agents to increase the amount of Chlamydia abortus. Chlamydia abortus inactivated vaccine was prepared, and Balb/c mice were immunized with the vaccine at doses of 25 μL, 50 μL and 100 μL, and the immunoprotective effect was detected after challenge. The results showed that when the inoculation density of the suspension cells was  $5 \times 10^5$  cells/mL, after 72 hours of culture, the cell concentration reached about  $7 \times$  $10^6$  cells/mL, and the cell viability was more than 95%. When the cell density was  $6 \times 10^6$  cells/mL, the infection amount of pathogens was  $5.5 \times 10^4$  IFU/mL, the addition of lipofectamine 2000 was  $1.7 \mu L/mL$  and the concentration of actinomycetone was 0.4 µg/mL, the amount of pathogens was amplified by 52 times. After immunized with the suspended cell Chlamydia abortus inactivated vaccine, the antibody level in the mice was increased with the increase of immunization dose, and the level of splenic lymphocyte proliferation and the content of IFN - γ and IL - 2 in 50 μL and 100 μL vaccine groups were much higher than those in 25 μL vaccine group and PBS group. The immunized mice were challenged, the genome content of Chlamydia abortus in spleen, duodenum and uterus of mice inoculated with vaccine was much lower than that of mice without vaccination. The uterus of mice injected with PBS and 25 µL of vaccine showed different degrees of necrosis and inflammation, while the uterus of the remaining two groups of mice had no abnormal changes. The results showed that a L929 suspension culture cell line was successfully acclimated in this experiment, and the inactivated Chlamydia abortus vaccine prepared from L929 suspension culture had strong immune effect. Inoculating 50 µL and 100 µL of the inactivated vaccine can have a protective effect on mice to a certain extent. The successful domestication of the L929 cell suspension culture strain provides a scientific basis for the large - scale preparation of vaccines.

**Key words**: adherent L929 cell; suspension culture and acclimation; *Chlamydia abortus*; inactivated vaccine; immunological evaluation

衣原体(Chlamydia)是革兰氏阴性、具有一个独特的双相发育周期且细胞内专性寄生的微生物。流产衣原体(Chlamydia abortus)属于衣原体科(Chlamydia),会引起母羊地方性流产(Enzootic abortion of ewes, EAE)<sup>[1]</sup>。母羊感染流产衣原体后会导致化脓性胎盘炎、早产、产出死胎或虚弱的羊羔,并且母羊成为病原体携带者,在孕期通过胎盘、流产胎儿或阴道分泌物

排出大量病原体,感染其他动物或人类<sup>[2-3]</sup>,也可导致孕妇流产<sup>[4]</sup>,公畜感染后会引起睾丸炎、尿道炎等。除新西兰和澳大利亚外,该病原体在全球广泛分布,其引起的大规模流产给全球大多数地区造成了巨大的经济损失<sup>[5]</sup>。从文献中公布的数据来看,我国的动物衣原体病流行严重,至少有 10 个省发生过禽类衣原体病,13 个省发生过绵羊和山羊的衣原体病,17 个省发生过猪的衣原体病,13 个省

发生过牛衣原体病,5个省发生过牦牛衣原体病, 对我国动物健康造成严重威胁<sup>[6]</sup>。

为防治动物流产衣原体病,国外于 20 世纪 50 年代研制出流产衣原体组织灭活疫苗,国内于 20 世纪 70 年代由中国农业科学院兰州兽医研究所研制出羊流产衣原体鸡胚卵黄囊膜甲醛灭活疫苗<sup>[7]</sup>,而后研究出猪流产衣原体灭活疫苗<sup>[8]</sup>和奶牛流产衣原体灭活疫苗<sup>[9]</sup>。这些组织灭活疫苗为控制我国动物衣原体病的流行发挥了巨大作用。但由于传统的鸡胚疫苗生产工艺落后、周期长、成本高,鸡胚中本身的抗原可能会对动物产生一定影响,这些因素制约着组织疫苗的应用发展<sup>[10]</sup>。与鸡胚疫苗相比,细胞疫苗具有很多优点,不仅工艺简单、周期短、成本低,还能提高抗原产量获得较纯的抗原,但用悬浮细胞培养流产衣原体的方法至今未见报道。

本研究旨在驯化出一种全悬浮无血清培养的 L929 细胞株,在此基础上用于规模化生产流产衣 原体,制备流产衣原体灭活疫苗,并在小鼠上进行 疫苗的免疫保护效果初步评价,为流产衣原体灭活 疫苗的规模化生产应用奠定基础。

## 1 材料与方法

#### 1.1 材料

- 1.1.1 细胞与细菌 L929 贴壁细胞(小鼠上皮样成纤维细胞)和 Hela 细胞购自 ATCC;流产衣原体标准株 GN-6 由中国农业科学院兰州兽医研究所畜禽重要人兽共患病团队细菌病组保存。
- 1.1.2 试验动物 4~6 周龄的 SPF Balb/c 裸鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司;8 周龄的 SPF Balb/c 小鼠购买于中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。
- 1.1.3 主要试剂 胎牛血清购自 Biological Industries 公司;RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶 EDTA 溶液购自 Gibco 公司;815 悬浮细胞培养基为中国农业科学院兰州兽医研究所畜禽重要人兽共患病团队细菌病组保存; DEAE dextran、放线菌酮、脂质体2000,均购于 Sigma 公司;2000 Montanide ISA 206 佐剂购自 Seppic 公司;流产农原体抗体 ELISA 检测试剂盒(适用于反刍动物、牛马等动物)购自 ID vet

公司;小鼠细胞因子 IFN  $-\gamma$ 、IL -2、IL -4、IL -17定量 ELSIA 检测试剂盒购自 R&D 公司; HRP 标记的兔抗鼠 IgG 抗体购自 Abcam 公司。

- 1.1.4 仪器设备 细胞培养瓶和三角形细胞摇瓶购自 Corning 公司;二氧化碳恒温培养箱购于 Thermo公司;摇床购于美国 SCILOGEX 公司;细胞筛购自Falcon公司;酶标仪购于 Nano Quant 公司。
- 1.2 L929 细胞无血清全悬浮细胞驯化
- 1.2.1 低血清贴壁培养驯化 取对数生长期的 L929 贴壁细胞,用胰酶消化后加入血清含量为 2.5% 的培养基(含5% FBS 的 RPMI 1640 培养基: 815 无血清培养基=1:1)继续培养,观察细胞生长状况,待细胞生长传代稳定后,再按照以含5% FBS 的 RPMI 1640 培养基: 815 无血清培养基的体积比例为 1:2、1:3 逐步将培养基中的血清含量降低,提高 815 悬浮细胞培养基含量,待细胞适应后,再置于 1% FBS 的 815 培养基中适应培养,直至细胞可连续稳定传代。
- 1.2.2 低血清悬浮培养驯化 取上一步驯化出的 L929 贴壁细胞,消化下来后转移至 125 mL 体积的 三角形细胞摇瓶中用 30 mL 含 1% FBS 的 815 培养基培养,细胞初始接种密度为 5 × 10<sup>5</sup>/mL,调整摇床转速为 110 r/min,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>条件下进行细胞悬浮培养,每隔 72 h 进行一次传代换液,直至细胞适应悬浮培养。每天观察细胞生长状况;如果在培养过程中或传代换液时发现细胞出现贴着摇瓶壁生长的现象时,可以加入适量的胰酶对细胞进行消化,消化下来后离心换液;若发现悬液中细胞结团成块的现象比较严重时,也可以直接加入适量的 EDTA 胰酶到培养液中,在培养的过程中使其慢慢分散开。
- 1.2.3 低血清悬浮培养驯化 将上一步驯化出的 L929 悬浮细胞转移至 0.5% FBS 的 815 培养基中培养,待细胞适应后,再将其转移至无血清的 815 培养基中传代培养,直至得到 L929 无血清全悬浮培养细胞株。
- 1.2.4 细胞密度、活力指标检验 将贴壁细胞制备成细胞悬液,悬浮细胞直接取样,对细胞进行台

盼兰染色,吸取适量的细胞悬液加入到血细胞计数 板上,使用手持式计数器做细胞计数,显微镜下观察 计数板的计数区,统计数据并计算细胞密度、活力。 1.3 L929 悬浮细胞培养流产衣原体的增殖工艺研究 取细胞浓度为  $6 \times 10^6$ /mL 的 L929 悬浮细胞,离心后弃上清,往细胞摇瓶补加 30 mL 新鲜的 815 培养液重悬细胞,分别在每瓶细胞中加入浓度为  $5.5 \times 10^4$  IFU/mL 的流产衣原体 GN -6 菌株,再往摇瓶中加入不同的促感染试剂,共 8 种接菌方式,如表 1 所示。加完促感染试剂,将它们置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中的摇床上 110 r/min 培养,分别在培养的第 0 h 和第 48 h 采样;取样品 20 μL,使用天根的血液/细胞/组织基因组提取试剂盒提取细胞组织基因组 200 μL;对提取的基因组样品进行荧光定量 PCR 检测,定量检测方法参考 OIE 推

# 表 1 加入不同促感染试剂的 8 种接菌方式 Tab 1 Eight ways of inoculation with different

proinfective agents

荐的引物序列[11]。

#### 接菌方式 促感染试剂 1 仅接菌 2 脂质体 2000 3 DEAE - D4 放线菌酮 5 DEAE - D + 脂质体 2000 6 DEAE - D + 放线菌酮 7 脂质体 2000 + 放线菌酮 DEAE - D + 脂质体 2000 + 放线菌酮

DEAE – D 溶液的工作浓度为 20 μg/mL;放线菌酮溶液的工作浓度为 0.4 μg/mL;脂质体 2000 的工作浓度约为 1.7 μL/mL

1.4 流产衣原体悬浮细胞灭活疫苗的制备 取培养 48 h 的 L929 悬浮细胞及流产衣原体,用超声破碎仪超声破碎后,于离心机中 3000 r/min 离心 5 min,弃去细胞碎片沉淀,保留上清;以本实验室保存的流产衣原体鸡胚卵黄囊膜甲醛灭活疫苗为对照进行抗原定量;提取上清及对照中的 DNA,使用荧光定量 PCR 方法进行定量。在定量好的流产衣原体上清中加入终浓度 1‰的甲醛,4℃摇床上

灭活一周;加入等体积的 206 佐剂,将其不停的摇晃混匀,直至变为乳白色的疫苗悬液;再加入终浓度 1‰的柳硫汞,达到疫苗防腐的效果。

- 流产衣原体悬浮细胞灭活疫苗的免疫保护效果初步评价
- 1.5.1 疫苗免疫保护试验 取8周龄的Balb/c雌性小鼠80只随机分为四个组。其中阴性对照组20只,每只小鼠后腿肌肉注射100 μL0.01 mol/L的PBS;其余三组,每组20只小鼠,分别肌肉注射25 μL、50 μL、100 μL流产衣原体悬浮细胞灭活疫苗。两周后进行二次接种操作;再过两周后对所有雌性小鼠进行配种;待小鼠怀孕第7天时,对四个组的小鼠进行腹腔注射攻毒,感染量为每只小鼠1×10<sup>5</sup>IFU;小鼠约在怀孕第21天生产,观察小鼠的产仔情况。
- 1.5.2 小鼠抗体水平检测 对二免两周后的小鼠进行眼眶采血,将血液离心后吸出上层血清,检测流产衣原体抗体,由于无检测小鼠流产衣原体抗体的试剂盒,所以检测时将该试剂盒中的酶标抗体替换为 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 抗体。
- 1.5.3 小鼠牌淋巴细胞增殖试验 取二免一周后的小鼠 6 只,将其脱颈致死,用剪刀镊子将脾脏剥离出来;在细胞筛上研磨脾脏,用适量红细胞裂解液裂解组织中的红细胞;然后加入含 10% FBS 的RPMI 1640 培养基重悬脾淋巴细胞沉淀,将其密度调至5 ×  $10^5$ /mL。在 96 孔板上进行试验,以加入200 μL 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基为空白对照;每孔中加入200 μL 脾细胞悬液,以只加脾细胞的孔为阴性对照,在已加入小鼠脾细胞的孔中分别添加10 μL 200 μg/mL的刀豆素蛋白 CoA、10 μL 灭活的流产衣原体分别作刺激的阳性对照和刺激的样品。然后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h,在每孔中加入20 μL 的 CCK8 后继续培养 4 h,取出96 孔板用酶标仪测量每孔的 OD<sub>450</sub>值。
- 1.5.4 小鼠细胞因子含量水平检测 将上一步中的脾淋巴细胞培养上清取出,使用细胞因子 ELISA 定量试剂盒检测 IFN γ、IL -2、IL -4、IL -17 四种

细胞因子的含量。

1.5.5 小鼠器官细菌载量检测 取产仔后的小鼠进行解剖,取出其心、肝、脾、肺、肾、十二指肠、子宫等组织,收集流产胎儿及胎盘;统一各组织碎块的重量,加入磁珠后用组织破碎仪对其进行破碎,再按天根血液/细胞/组织基因组提取试剂盒提取组织基因组;取2 μL 提取的基因组进行荧光定量PCR 检测,根据结果计算比较各器官中流产衣原体的数量差异。

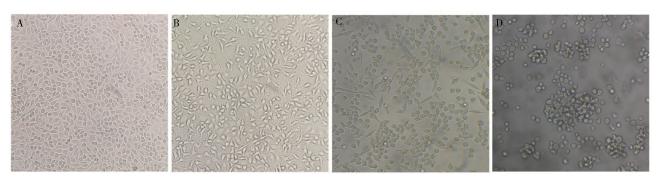
1.5.6 小鼠器官组织病理学观察 将以上免疫攻毒后小鼠的子宫、胎盘用4%的多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,常规苏木精-伊红染色,显微镜下观察。

#### 2 结果与分析

2.1 低血清贴壁培养驯化 不同血清培养基下 L929 细胞形态如图 1,当血清比例由 5% 降至 2.5%后,细胞能很快适应,且细胞仍呈贴壁式生长,但细胞形态开始发生改变,由长梭形变为中间较鼓的梭形;当血清比例降低至 1.67% 时,815 悬

浮培养基的比例高于 RPMI 1640 培养基,细胞需要 更长的时间去适应,细胞的贴壁性下降,大部分细胞形态开始变圆,少部分仍是梭形;而血清再次降低至1.25%时,815 悬浮培养基的含量达到 75%,细胞的适应时间缩短,细胞由贴壁式生长变为半悬浮式生长,轻轻拍打细胞瓶,瓶底细胞便会悬浮起来,细胞形态全部变为圆形,但有部分细胞出现结团的现象,传代培养后台盼兰染色显示细胞活率良好,最终收获到适应低血清培养的 L929 细胞株。

2.2 低血清悬浮培养驯化 将贴壁细胞瓶中的细胞转移至三角摇瓶中,用含 1% FBS 的 815 悬浮培养基培养,随着培养代次的增加,细胞生长速率逐渐提升,逐渐适应悬浮生长(图 2)。一开始细胞的生长速度较慢,细胞结团较多,摇瓶上可看到有细胞团块黏附在液面边缘上,通过添加适量的胰酶和更换新的摇瓶,细胞的成团率下降。将细胞由 F1代培养至 F25 代,在 72 h 内细胞浓度可由 5×10<sup>5</sup>/mL达到约 1×10<sup>7</sup>/mL。



A:5% FBS 的 RPMI 1640 培养基;B:815 培养基与 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基的比例为 1:1;

C;815 培养基与 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基的比例为 2:1;D;815 培养基与 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基的比例为 3:1

A: RPMI 1640 medium with 5% FBS; B: The ratio of 815 medium to RPMI 1640 medium with 5% FBS was 1:1; C: The ratio of 815 medium to RPMI 1640 medium with 5% FBS was 2:1. The ratio of D: 815 medium to RPMI 1640 medium with 5% FBS was 3:1

#### 图 1 不同血清培养基下 L929 细胞形态

Fig 1 Morphology of L929 cells in different serum medium

2.3 无血清悬浮培养驯化 用含 1% FBS 的 815 培养液培养的 F25 代 L929 细胞,转移至含 0.5% FBS 的 815 培养液中培养,随培养代次的增加,72 h内细胞浓度可由 5×10<sup>5</sup>/mL 达到约 8×10<sup>6</sup>/mL,细胞能很好的适应降血清培养。再取 0.5% FBS 815 培养液悬浮驯化的 F5 代 L929 细胞,降至无血清培

养,随培养代次的增加,细胞的生长速率缓慢提升并逐渐趋于稳定,72 h 内细胞浓度可由 5×10<sup>5</sup>/mL 达到约 7×10<sup>6</sup>/mL,获得可适应无血清悬浮培养的 L929 细胞株。驯化出的无血清悬浮培养的 L929 细胞生长曲线如图 3,形态如图 4,细胞结团率低,细胞透亮,边缘清晰,生长状态良好。

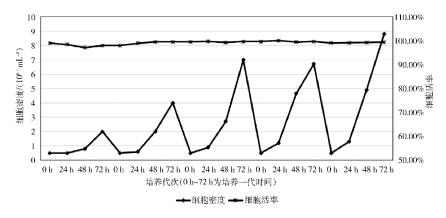


图 2 1% FBS 培养基中悬浮驯化的 F1 - F5 代 L929 细胞的生长曲线

Fig 2 Growth curve of the first five generations of L929 cells suspension culture in 1%FBS medium

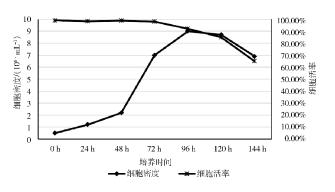


图 3 无血清悬浮培养的 L929 细胞生长曲线

Fig 3 Growth curves of L929 cells in serum – free suspension culture



图 4 无血清悬浮培养的 L929 细胞

Fig 4 Serum free suspension culture of L929 cells

2.4 L929 悬浮细胞培养流产衣原体的增殖工艺研究 通过荧光定量 PCR 方法定量检测不同促感染试剂对流产衣原体在 L929 悬浮细胞上生长的影

响,结果如表 2,因此培养时添加脂质体 2000 和放线菌酮能收获到更多的流产衣原体。

表 2 不同促感染试剂对流产衣原体在 L929 悬浮细胞上生长的影响

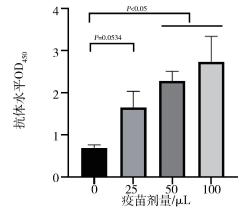
Tab 2 Effects of different pro – infective agents on the growth of C. abortus on L929 suspension cells

Tab 2 Effects of unferent pro – infective agents on the growth of C. abortus on 1929 suspension cens			
促感染试剂	平均 Ct 值		松石井(六半)
	0 h 取样	48 h 取样	增殖倍数
仅接菌	29.25	28.34	1.86
脂质体 2000	29.78	28.125	3.11
DEAE - D	29.19	27.02	4.42
放线菌酮	28.97	24.52	21.06
DEAE – D + 脂质体 2000	29.86	27.98	3.62
DEAE - D + 放线菌酮	28.95	24.55	20.35
脂质体 2000 + 放线菌酮	28.97	23.185	52.54
DEAE - D + 脂质体 2000 + 放线菌酮	28.635	23.33	37.82

- 2.5 小鼠抗体水平 用 GraphPad prism 8 软件分析接种不同疫苗剂量小鼠的抗体水平,结果如图 5, 随接种剂量的提高,抗体水平也不断升高,接种100 μL疫苗的小鼠产生的抗体水平最高。
- 2.6 小鼠脾淋巴细胞增殖水平 用软件分析比较接种了不同剂量流产衣原体悬浮细胞灭活疫苗的Balb/c 小鼠的脾淋巴细胞转化刺激指数 (Stimulation index, SI),每组6只小鼠,结果见图6。接种50  $\mu$ L和100  $\mu$ L疫苗的小鼠的脾淋巴细胞转化 SI高于未接种疫苗组,且差异极显著 ( $P \le 0.0001$ ),由此可推测接种50  $\mu$ L和100  $\mu$ L疫苗的小鼠对流产衣原体刺激后产生的免疫反应较强。
- 2.7 小鼠脾淋巴细胞上清细胞因子水平 用 GraphPad prism 8 软件分析比较不同疫苗剂量下小鼠脾淋巴细胞培养上清中的 IFN γ、IL 2、IL 4、IL 17 细胞因子分泌量的差异。如图 7 所示,随疫苗接种剂量的增加,IFN γ和 IL 2 的分泌水平也

巴细胞上清中 Th1 型细胞因子 IFN  $-\gamma$ 、IL -2 的含量显著升高(P < 0.0001);不同疫苗接种剂量组的小鼠的 IL -4、IL -17 的含量差异不显著(P > 0.05)。 2.8 小鼠器官中流产衣原体细菌载量 依据实验结果图 8,接种疫苗组的小鼠组织器官中流产衣原体基因组含量较低,各组织器官中的基因组含量差异较小(P > 0.05);而未接种疫苗组的流产衣原体基因组含量较高,其中十二指肠、子宫、胎儿、胎盘中的流产衣原体基因组含量显著高于其他组织(P < 0.0001)。如图 9,接种 25  $\mu$ L、50  $\mu$ L、100  $\mu$ L 疫苗组小鼠的脾脏、十二指肠、子宫中的流产衣原体基因组含量与未接种疫苗组的差异极显著(P < 0.0001),未接种疫苗组中基因组含量显著高于其余三组,说明该疫苗能显著降低动物流产衣原体的感染。

相应提升,接种50 µL和100 µL疫苗组的小鼠脾淋



0:注射 PBS;25:接种 25 μL 疫苗; 50:接种 50 μL 疫苗;100:接种 100 μL 疫苗 P < 0.05,差异显著;P > 0.05,差异不显著

0: Injected with PBS; 25: Inoculated 25  $\mu L$  vaccine;

50: Inoculated 50 μL vaccine;

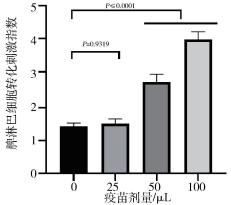
100: Inoculated  $100 \mu L$  vaccine

P < 0.05, the difference was significant;

P > 0.05, the difference was not significant

图 5 接种不同疫苗剂量小鼠的抗体水平

Fig 5 Antibody levels of the mice inoculated with different volumes of vaccine



0:注射 PBS;25:接种 25 μL 疫苗; 50:接种 50 μL 疫苗;100:接种 100 μL 疫苗 P<0.0001,差异极显著;P<0.05,差异显著; P>0.05,差异不显著

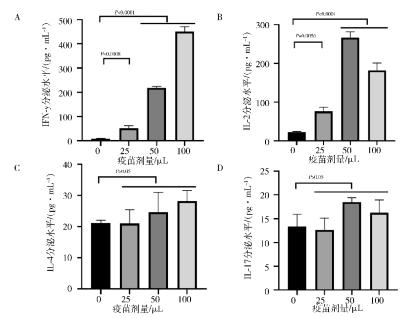
0: Injected with PBS; 25: Inoculated 25 μL vaccine;
50: Inoculated 50 μL vaccine; 100: Inoculated 100 μL vaccine
P < 0.0001, the difference was extremely significant;</li>

P < 0.05, the difference was significant;

P > 0.05, the difference was not significant

图 6 接种不同疫苗剂量小鼠的脾淋巴细胞增殖水平

Fig 6 The levels of spleen – lymphocyte proliferation from the mice inoculated with different volumes of vaccine

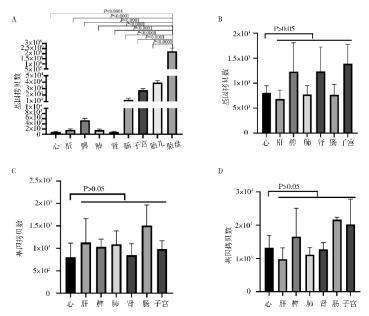


0:注射 PBS;25:接种 25 μL 疫苗;50:接种 50 μL 疫苗;100:接种 100 μL 疫苗 P < 0.0001,差异极显著;P < 0.05,差异显著;P > 0.05,差异不显著

0: Injected with PBS; 25: Inoculated 25 μL vaccine; 50: Inoculated 50 μL vaccine; 100: Inoculated 100 μL vaccine P < 0.001, the difference was extremely significant; P < 0.05, the difference was significant; P > 0.05, the difference was not significant.

## 图 7 接种不同疫苗剂量小鼠的脾淋巴培养上清中 4 种细胞因子水平

Fig 7 The levels of four cytokines in spleen -lymphocyte culture supernatant of the mice inoculated with different volumes of vaccine

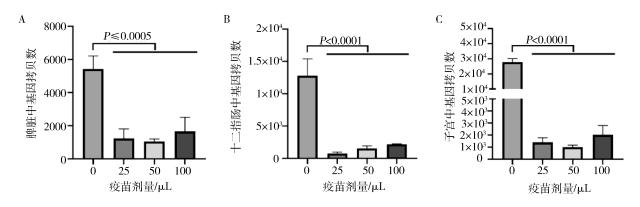


A:注射 PBS;B:接种 25 μL 疫苗;C:接种 50 μL 疫苗;D:接种 100 μL 疫苗 P < 0.0001,差异极显著;P < 0.05,差异显著

A: Injected with PBS; B: Inoculated 25  $\mu$ L vaccine; C: Inoculated 50  $\mu$ L vaccine; D: Inoculated 100  $\mu$ L vaccine P < 0.0001, the difference was extremely significant; P < 0.05, the difference was significant; P > 0.05, the difference was not significant

#### 图 8 接种不同疫苗剂量小鼠的组织器官中流产衣原体的细菌载量(组内比较)

Fig 8 Changes of *C. abortus* genome copies in various organs of mice inoculated with different volumes of vaccine (compare within groups)



0:注射 PBS;25:接种 25 μL 疫苗;50:接种 50 μL 疫苗;100:接种 100 μL 疫苗 P < 0.0001,差异极显著;P < 0.05,差异显著;P > 0.05,差异不显著

0: Injected with PBS; 25: Inoculated 25 μL vaccine; 50: Inoculated 50 μL vaccine; 100: Inoculated 100 μL vaccine

P < 0.0001, the difference was extremely significant; P < 0.05, the difference was significant; P > 0.05, the difference was not significant

#### 图 9 接种不同疫苗剂量小鼠的组织器官中流产衣原体的细菌载量(组间比较)

Fig 9 Changes of *C. abortus* genome copies in various organs of mice inoculated with different volumes of vaccine (comparison among groups)

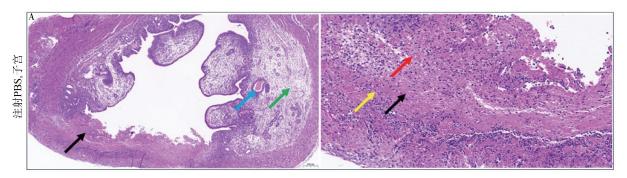
2.9 小鼠器官组织病理学切片 图 10 实验结果显示,未接种疫苗组的小鼠子宫、幼鼠胎盘以及接种 25 μL疫苗组小鼠的子宫发生了不同程度的病理变化,而接种 50 μL、100 μL疫苗组的小鼠子宫形态正常,说明接种 50 μL、100 μL流产衣原体悬浮细胞灭活疫苗可以在一定程度上防止小鼠的子宫免受流产衣原体的侵害。

#### 3 讨论

自从1956年汤飞凡等人用鸡胚培养法培养出沙眼衣原体后<sup>[12]</sup>,我国基本上就一直沿用该方法收集衣原体。后来又发展出用 Hela 细胞、L929细胞、McCoy细胞、Vero细胞、BHK细胞等贴壁细胞分离培养衣原体,但用这些方法培养衣原体需要离心的步骤,无疑会增加生产操作的复杂性,还提升了成本。因此,迫切需要能适应悬浮生长的细胞来满足扩大化的工业生产。前期研究表明,小鼠上皮样成纤维细胞(L929细胞)对流产衣原体敏感<sup>[13]</sup>,可在疫苗生产中使用。故本试验通过贴壁-贴壁降血清-悬浮降血清-悬浮无血清3个过程将对流产衣原体敏感的L929贴壁细胞逐步适应无血清悬浮培养环境,最终获得了1株L929无血清悬浮细胞株,该细胞株生长速度快,细胞密度可在72h内

由 5×10<sup>5</sup>/mL 达到约 7×10<sup>6</sup>/mL,该细胞为大规模 生产流产衣原体提供了有利条件。

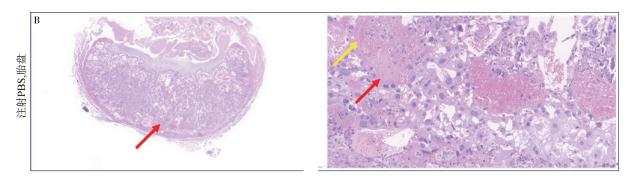
贴壁细胞培养增殖衣原体常采用离心法来提 高衣原体的感染率,同时会加入 DEAE - dextran、放 线菌酮等试剂辅助提高感染率。离心增加了衣原 体与细胞的接触概率,侵入细胞的几率可以增加 100~1000 倍。二乙氨基葡聚糖(DEAE - dextran) 可以改变细胞表面电荷,促使衣原体与细胞相吸 引,从而增加感染几率[14]。放线菌酮能通过控制 宿主细胞的生长繁殖,为衣原体的生长发育提供 更多营养物质,从而获得更多的衣原体[15]。脂质 体 2000 可显著提高流产衣原体的感染率,与离心 法的效果相当,但其具体的作用机制不清楚[17]。 本研究将 DEAE - dextran、放线菌酮、脂质体 2000 试剂应用于流产衣原体的悬浮细胞培养上,发现 它们均能提高衣原体的收菌量,尤其是放线菌酮 和脂质体 2000 的组合能最大程度提高抗原产量。 虽然驯化出来的 L929 悬浮细胞具有致瘤性,但经 甲醛灭活的培养流产衣原体的 L929 悬浮细胞无 致瘤性。收集悬浮细胞上的流产衣原体,用甲醛 进行灭活,以206为佐剂,制备出流产衣原体悬浮 细胞灭活疫苗。



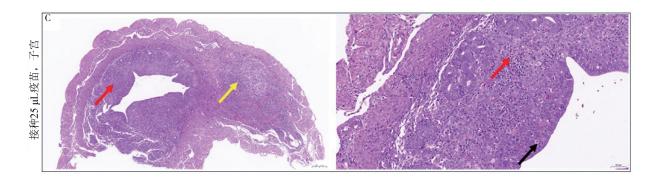
局灶性子宫内膜至肌层坏死,胞核碎裂或固缩,胞质呈嗜酸性均质状(黑色箭头), 伴有出血(红色箭头)及较多的炎性细胞浸润(黄色箭头);未坏死处子宫内膜重度水肿, 结缔组织排列疏松,伴有炎性细胞浸润(绿色箭头),子宫腺内可见嗜酸性均质状物质(蓝色箭头)

There was focal necrosis of the endometrium to the myometrium, nuclear fragmentation or pyknosis, eosinophilic homogeneous cytoplasm (black arrow), hemorrhage (red arrow), and more inflammatory cell infiltration (yellow arrow); The non-necrotic endometrium was severely edematous, with loose connective tissue arrangement and inflammatory cell infiltration (green arrow),

and eosinophilic homogeneous material was seen in the uterine glands (blue arrow)

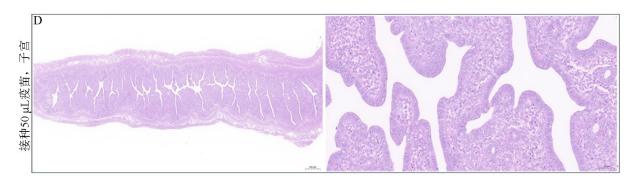


组织局部坏死伴轻度出血,坏死灶呈无结构的嗜酸性物(红色箭头),可见少量的红细胞(黄色箭头)
Organize local necrosis with mild hemorrhage, necrosis foci in unstructured acidophilic (red arrows),
is a small amount of red blood cells (yellow arrow)

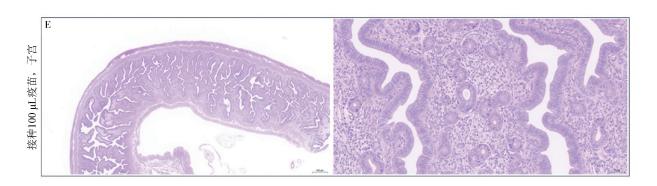


子宫内膜上皮细胞点状坏死,胞核碎裂(黑色箭头),固有层可见较多的炎性细胞浸润(红色箭头), 局部肌层可见大量的炎性细胞浸润(黄色箭头)

Endometrial epithelial cells dotted necrosis, cataclastic nucleus (black arrow), lamina propria visible more inflammatory cells infiltration (red arrows), local muscle layer shows a large amount of inflammatory cell infiltration (yellow arrow)



组织未见明显异常 No obvious abnormalities were found in the tissues



组织未见明显异常

No obvious abnormalities were found in the tissues

### 图 10 小鼠器官的组织病理学观察

Fig 10 Histopathological observation of mouse organs

对不同流产衣原体悬浮细胞灭活疫苗剂量组小鼠的血清抗体进行检测的结果说明,疫苗接种剂量越大,诱导的体液免疫保护水平越高。研究表明,IFN - γ和 IL - 2 水平的升高对预防胞内寄生微生物的感染发挥着重要的作用,如流产衣原体<sup>[17]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[18]</sup>、利什曼原虫<sup>[19]</sup>。临床调查发现,经衣原体抗原刺激后外周血淋巴细胞分泌 IFN - γ的妇女对衣原体感染有较高的抵抗能力,而分泌 IL - 10的妇女被感染的几率提高了6倍<sup>[20]</sup>。IFN - γ受体缺陷的小鼠被衣原体感染后发病持续时间久,再次感染后不会产生保护性免疫<sup>[21]</sup>。IFN - γ不仅激活 Th1 型 CD4 和 CD8 细胞的免疫反应,也诱导吲哚胺 2,3 - 双加氧酶(indoleamine - 2,3 - dioxgenase,IDO)降低细胞内衣原体代谢所需的色氨酸量,从而清除衣原体的感染<sup>[22]</sup>。通过免疫小

鼠的脾淋巴细胞增殖试验及脾淋巴细胞培养上清中细胞因子的检测结果可以看出,流产衣原体细胞灭活疫苗的接种剂量高于 25 μL 时可诱导免疫组小鼠产生显著高于对照组小鼠的 Th1 型细胞免疫应答,免疫组小鼠脾淋巴培养上清中产生了较高水平的 IFN - γ和 IL - 2,说明接种 50 μL、100 μL流产衣原体细胞灭活疫苗均能提高小鼠的 Th1 型细胞免疫反应,从而提高机体清除流产衣原体的能力。通过对小鼠组织器官中流产衣原体含量的检测发现,未接种疫苗组小鼠的十二指肠和子宫中的流产衣原体基因组含量较高,这可能与使用腹腔注射攻毒的方式有关,经肠系膜吸收的衣原体广泛分布于肠道组织,而流产衣原体主要导致动物流产,该病原多分布于生殖道黏膜表皮<sup>[23]</sup>。接种疫苗组与未接种疫苗组比,脾脏、十二指肠、子宫中的细菌

载量显著降低。接种 50 μL、100 μL 疫苗组小鼠子宫组织的病理切片结果显示无异常,而接种 25 μL 疫苗组小鼠及未接种疫苗组小鼠的子宫组织出现水肿、炎症、出血、坏死等病变。总而言之,通过细菌载量的检测比较表明,该疫苗能在一定程度上显著提高小鼠对流产衣原体的抵抗能力。

本试验制备的流产衣原体悬浮细胞灭活疫苗能够有效降低流产衣原体对 Balb/c 小鼠的感染水平,对于防控动物衣原体病具有重大意义,为更好促进养殖业健康和快速发展提供了有力的技术支持。

# 参考文献:

- Studdert M J, Kennedy P C. Enzootic abortion of ewes [J].
   Nature, 1964, 203: 1088 1089.
- [2] Timms K. Testing for enzootic abortion of ewes [J]. Vet Rec, 2021, 188(8): 314-315.
- [3] Zhu C, Lv M, Huang J, et al. Bloodstream infection and pneumonia caused by Chlamydia abortus infection in China; a case report [J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1); 181.
- [4] Pichon N, Guindre L, Laroucau K, et al. Chlamydia abortus in pregnant woman with acute respiratory distress syndrome [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(3): 628-629.
- [5] Esmaeili H, Shakeri A P, Rad Z N, et al. Causes of abortion in Iranian sheep flocks and associated risk factors [ J ]. Vet Res Commun, 2022, 46(4): 1227-1238.
- [6] Zhou J, Li Z, Lou Z, et al. Prevalence, diagnosis, and vaccination situation of animal chlamydiosis in China[J]. Front Vet Sci, 2018, 5; 88.
- [7] 杨学礼, 帅永玉, 葛文楠, 等. 羊衣原体流产的病原分离 [J]. 中国农业科学, 1984(02): 83-88. Yang X L, Shuai Y Y, Ge W N, et al. Pathogen isolation of chlamydia abortion in sheep [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1984(02): 83-88.
- [8] 邱昌庆. 豬衣原体流产灭活苗通过专家鉴定[J]. 畜牧兽医科技信息, 1998(05): 9.

  Qiu C Q. The aborted inactivated vaccine of *Chlamydia suis* was identified by experts[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 1998(05): 9.
- [9] 邱昌庆,周继章,程淑敏,等.奶牛衣原体病灭活疫苗研究 [Z].中国江西井冈山:20075.

- Qiu C Q, Zhou J Z, Cheng S M, et al. Research on inactivated vaccine for *Chlamydia* in dairy cows[Z]. Jinggangshan, Jiangxi, China; 20075.
- [10] Alymova I V, Kodihalli S, Govorkova E A, et al. Immunogenicity and protective efficacy in mice of influenza B virus vaccines grown in mammalian cells or embryonated chicken eggs[J]. J Virol, 1998, 72(5): 4472 - 4477.
- [11] Livingstone M, Wheelhouse N, Maley S W, et al. Molecular detection of Chlamydophila abortus in post – abortion sheep at oestrus and subsequent lambing [J]. Vet Microbiol, 2009, 135 (1/2): 134 – 141.
- [12] 汤飞凡, 张晓楼, 黄元桐, 等. 沙眼病原研究 W. 接种鸡胚, 分离病毒 [ J ]. 微生物学报, 1956, 4 (02): 189 - 210. Tang F F, Zhang X L, Huang Y T, et al. Pathogen research of trachoma IV. Inoculated chicken embryo and isolated virus [ J ]. Acta Microbiologica Sinica, 1956, 4(02): 189 - 210.
- [13] 赵 荣. 羊流产衣原体细胞灭活疫苗的研究[D]. 中国农业科学院, 2016.

  Zhao R. Development on inactivated cell vaccine of *Ovine Chlamydia abortus* [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [14] Rota T R, Nichols R L. Chlamydia trachomatis in cell culture.

   Comparison of efficiencies of infection in several chemically defined media, at various pH and temperature values, and after exposure to diethylaminoethyl dextran [J]. Appl Microbiol, 1973, 26(4): 560 565.
- [15] Ennis H L, Lubin M. Cycloheximide: aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells [J]. Science, 1964, 146 (3650): 1474-1476.
- [16] Li Z, Liu P, Zhou J. Lipofectamine enhances Chlamydia infectivity in cell culture [ J ]. Anal Biochem, 2020, 610; 113985.
- [17] Dixit S, Singh S R, Yilma A N, et al. Poly (lactic acid) poly (ethylene glycol) nanoparticles provide sustained delivery of a Chlamydia trachomatis recombinant MOMP peptide and potentiate systemic adaptive immune responses in mice[J]. Nanomedicine, 2014, 10(6): 1311-1321.
- [18] Forbes E K, Sander C, Ronan E O, et al. Multifunctional, high-level cytokine producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against Mycobacterium tuberculosis aerosol challenge in mice[J]. J Immunol, 2008, 181 (7): 4955-4964.

- [19] Darrah P A, Patel D T, De Luca P M, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine – mediated protection against Leishmania major [J]. Nat Med, 2007, 13 (7): 843-850.
- [20] Cohen C R, Koochesfahani K M, Meier A S, et al. Immuno epidemiologic profile of *Chlamydia trachomatis* infection: importance of heat – shock protein 60 and interferon – gamma [J]. J Infect Dis, 2005, 192(4): 591 – 599.
- [21] Johansson M, Schon K, Ward M, et al. Genital tract infection with Chlamydia trachomatis fails to induce protective immunity in gamma interferon receptor – deficient mice despite a strong local

- immunoglobulin A response [J]. Infect Immun, 1997, 65(3): 1032-1044.
- [22] Hu V H, Holland M J, Burton M J. Trachoma: protective and pathogenic ocular immune responses to *Chlamydia trachomatis* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(2): 2020.
- [23] Longbottom D, Entrican G, Wheelhouse N, et al. Evaluation of the impact and control of enzootic abortion of ewes [J]. Vet J, 2013, 195(2): 257 - 259.

(编辑:李文平)