文章编号:1000-5404(2008)08-0739-04

论著

肺炎链球菌黏附素A基因疫苗的构建及对小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带的防御作用

张 巧,马千里,李 琦,曾雪峰,王长征 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨肺炎链球菌表面黏附素A(PsaA)基因疫苗的免疫原性及其对小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带的防御作用。**方法** PCR技术从肺炎链球菌R6标准株扩增PsaA基因,构建重组真核表达质粒pcDNA3.1-PsaA,脂质体法转染BHK-21细胞,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫印迹(Western blot)检测重组质粒在BHK-21细胞中的转录和表达。应用PsaA基因疫苗肌肉注射免疫BABL/c小鼠,ELISA检测脾细胞上清IFN-γ分泌,特异性抗体IgG水平及其亚型分布(IgG1/IgG2a)。利用BABL/c小鼠肺炎链球菌D39株鼻咽部携带模型,鼻咽部灌洗液菌落计数观察免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带改变。**结果** RT-PCR及Western blot显示重组PsaA蛋白在BHK-21细胞瞬时表达,ELISA检测到免疫小鼠血清高水平的IFN-γ及特异性IgG抗体(IgG1/IgG2a<1),小鼠攻击实验证明PsaA基因疫苗免疫组小鼠D39携带菌落计数明显少于对照组($P<0.01$)。**结论** 肺炎链球菌表面毒力蛋白PsaA基因疫苗免疫小鼠激发了抗原特异性的细胞及体液免疫反应,显著减少了小鼠鼻咽部肺炎链球菌的携带,为肺炎链球菌DNA疫苗理想侯选抗原之一。

关键词: 肺炎链球菌;肺炎链球菌表面黏附素A;基因疫苗
中图法分类号: R-332;R378.14;R392.7 **文献标识码:** A

Construction of DNA vaccine of pcDNA3.1-PsaA and its effects against nasopharyngeal colonization of *Streptococcus pneumoniae*

ZHANG Qiao, MA Qian-li, LI Qi, ZENG Xue-feng, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the immunogenicity of DNA vaccine expressing pneumococcal surface adhesion A (PsaA), and its effect against nasopharyngeal colonization of *Streptococcus pneumoniae* in BALB/c mice. **Methods** The genomic DNA of the standard *Streptococcus pneumoniae* strain D39 was isolated. PsaA gene open reading fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). Recombinant pcDNA3.1-PsaA was transfected into BHK-21 cells using Lipofectamine™2000, and the expression of PsaA protein was detected by Western blot. **Results** RT-PCR and Western blot analysis of total cell extracts showed successful transcription and expression of PsaA in BHK-21 cells. The DNA vaccine pcDNA3.1-PsaA produced high levels of IFN-γ and high titers of serum IgG antibody in response to PsaA, and specific IgG2a isotype dominant responses (IgG1/IgG2a<1). There were significantly fewer pneumococci in nasopharynx of mice immunized with the DNA vaccine pcDNA3.1-PsaA than those receiving plasmids pcDNA3.1(+) ($P<0.01$). **Conclusion** The DNA vaccine pcDNA3.1-PsaA induces specific humoral and cellular immunity in the immunized mice. The vaccine is effective in protecting mice against nasopharyngeal colonization of *Streptococcus pneumoniae* in BALB/c mice. The DNA vaccine encoding immunogenic protein of PsaA can be used as a candidate for novel vaccine design.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; PsaA; DNA vaccine

肺炎链球菌属于人体鼻咽部正常菌群,因机体免疫能力下降及黏膜层局部损害等多因素而增殖、迁移、致病[1-3]。目前肺炎链球菌感染性疾病是引起全球所有年龄组高发病率和病死率的主要原因。伴随肺炎链球菌全球耐药问题的日趋严重,WHO提出针对高危人

作者简介:张 巧,女,四川省大竹县人,博士研究生,医师,主要从事肺炎链球菌感染与免疫方面的研究。电话:(023)68774603,E-mail:cqmql@163.com
通信作者:王长征,电话:(023)68774303
收稿日期:2007-12-20;修回日期:2008-01-09

群应用肺炎链球菌疫苗是减少耐药菌传播,防治肺炎链球菌感染,减缓抗生素耐药压力的唯一策略[4-6]。伴随肺炎链球菌基因全序列的破解,相关毒力蛋白逐渐被报道,针对这些毒力蛋白及其编码基因研发克服目前应用的多糖荚膜疫苗(PSV)和多糖蛋白结合疫苗(PCV)不足的基因疫苗成为热点。鼻咽部携带是致肺炎链球菌感染性疾病的关键,肺炎链球菌表面黏附素A(PsaA)是一种肺炎链球菌表面的黏附分子,与肺炎链球菌在鼻咽部定殖密切相关,且具有高度保守的序列。本研究根据 GenBank 报道的肺炎链球菌标准株 R6 序列[7],构建了 PsaA 真核表达质粒基因疫苗,动物实验观察其免疫原性及对小鼠肺炎链球菌鼻咽部携带的防御,为探索肺炎链球菌的 DNA 疫苗筛选理想候选抗原。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、细胞株

肺炎链球菌标准株 R6 购自美国标准生物品收藏中心(ATCC),大肠杆菌 DH5α 为我室保存,真核载体 pcDNA3.1(+)由第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸内科吴奎博士惠赠。幼仓鼠肾细胞 BHK-21 [C-13],购自中国科学院细胞库,培养在 MEM(含 2 mmol/L L-谷氨酰胺和 Earle's BSS, 1.5 g/L $NaHCO_3$, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 1.0 mmol/L 丙酮酸钠)+10% 胎牛血清中。

1.2 抗体、工具酶和试剂

高保真 *Taq* 酶(*Taq* Plus DNA 聚合酶)、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司,细菌基因组提取试剂盒及 RNA 提取试剂盒购置上海华舜生物工程有限公司,质粒快速提取试剂盒购自 Promega 公司,脂质体转染试剂 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司,IFN-γ ELISA 检测试剂盒购自 R&D Systems 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a 购自 Southern 生物工程公司,抗 His 单克隆抗体购自 Santa Cruz 生物技术工程公司。

1.3 实验动物

二级雌性 BABL/c 小鼠,6~8 周龄,体质量(19±1)g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.4 PsaA 重组真核表达质粒的构建

以 GenBank 中提供的 PsaA 序列设计引物:上游 5′-TAGGGTACCACCATGGCTAGCGGAAAAAAAGATACAAC-3′, 下游 5′-GAATCTAGATTAGTGGTGGTGGTGGTGTTTTGCCAATCCTTCAGCAAT-3′。引物设计中引入 His-tag 序列,并插入 *Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ酶切位点。提取肺炎链球菌 R6 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 PsaA 片段,反应条件如下:94 ℃预变性 2 min(94 ℃变性 30 s,55 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 2 min),30 个循环;72 ℃延伸 10 min。取 50 μl 产物电泳回收后,用 *Kpn* Ⅰ及 *Xba* Ⅰ双酶切目的片段及真核载体 pcDNA3.1(+),连接制备重组子化学法转化 DH5α 感受态细胞,挑选阳性克隆,抽提重组阳性克隆质粒送北京华大基因公司测序。

1.5 核酸疫苗重组质粒转染 BHK-21 细胞及 RT-PCR 和 Western blot 鉴定

BHK-21 细胞转染前以含有 10% 胎牛血清的 MEM 的培养基 37 ℃,5% CO_2,传代培养 18~24 h,细胞贴壁 60%~80% 后,采用脂质体介导的转染方法,将脂质体与 2 μg 质粒混合,25 ℃放置 25 min。洗涤细胞,无血清与细胞共培养 5 h,加入 20% 血清,继续培养 24 h 换液,再继续培养 24 h,收获细胞。RT-PCR 检测 PsaA 基因的表达:按 RNA 提取试剂盒说明提取转染细胞总 RNA,合成引物上游:5′-GGTGGCAATGCTTGGTTTAC-3′,下游:5′-GCTCCTTCGCTGGTTACAAT-3′,常规两步法 RT-PCR 及扩增产物电泳鉴定 PsaA 基因表达。Western blot 检测 PsaA 蛋白的表达:采用 12% SDS-PAGE 进行蛋白电泳,转移至硝酸纤维素膜,2% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,加入鼠抗 His 单克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,DAB 为显色底物显影。鉴定 PsaA 蛋白在真核细胞中的表达。

1.6 动物免疫

大量抽提质粒 pcDNA3.1(+)及重组质粒 pcDNA3.1-PsaA,稀释至 1 g/L 浓度 -20 ℃保存备用。6~8 周龄雌性 BABL/c 小鼠 60 只,每组 30 只,分 pcDNA3.1(+)组和 pcDNA3.1-PsaA 组。每组小鼠于免疫前 1 周双侧股四头肌注射心肌毒素 100 μl(10μmol/L)预处理后,第 0 天免疫小鼠,每只小鼠两侧股四头肌共注射 200 μl(100 μl/侧),第 28 天同法加强免疫 1 次。

1.7 检测细胞因子 IFN-γ 分泌

为检测免疫小鼠细胞免疫情况,我们进行了脾细胞分泌细胞因子 IFN-γ 水平检测。末次免疫小鼠后第 7、14、21 天 2 组小鼠各 5 只无菌取脾,研碎后经尼龙网过滤得到单细胞,用淋巴细胞分离液分离小鼠淋巴细胞,每孔加入 100 μl(5×10^5)淋巴细胞,用我室制备 PsaA 蛋白共孵育刺激 72 h,按照 IFN-γ ELISA 检测试剂盒使用说明操作,检测 IFN-γ 水平,采用 450 nm 波长酶标仪测定 D(450)值。

1.8 检测小鼠血清特异性抗体 IgG 及其亚型分布特点

末次免疫后第 28 天及第 56 天于两组小鼠眶静脉采血,制备血清,ELISA 检测血清中 PsaA 特异性 IgG 水平及 IgG1/IgG2a 比值,我室前期制备 PsaA 抗原包板,HRP 标记的羊抗鼠 IgG、IgG1 或 IgG2a 作为二抗,每孔 100 μl,37 ℃孵育 1 h, OPD 显色,37 ℃闭光反应 20 min,H_2SO_4终止反应,采用 492 nm 波长酶标仪测定 D(492)值。

1.9 小鼠鼻咽部携带肺炎链球菌 D39 菌落计数

按上述方法免疫小鼠,PBS 组,pcDNA3.1(+)组,pcDNA3.1-PsaA 组各 10 只,PBS 组小鼠注射 100 μl PBS 对照,末次免疫 14 d 后,按照文献[8]确立的小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带模型制备方法,培养至对数生长期肺炎链球菌 D39 10 μl(10^6菌落形成单位 CFU)滴鼻建立 3 组免疫小鼠鼻腔携带状态,7 d 后处死 3 组小鼠,按文献[8]报道方法取鼻腔灌洗液行菌落计数。

1.10 统计学分析

鼻咽部灌洗液菌落计数采用 $\lg(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采用

t 检验。

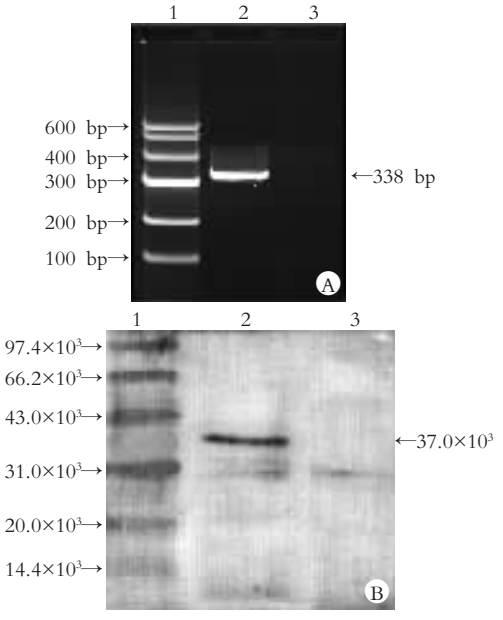
2　结果

2.1　重组 PsaA 真核表达载体鉴定

PCR 扩增出正确大小 PsaA 片段,克隆入真核载体 pcDNA3.1(+) *Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ多克隆位点,化学法转化 DH5α 感受态细胞,挑选阳性克隆抽提质粒,质粒测序鉴定结果 PsaA 序列与 GenBank 报道序列完全一致,证明重组真核表达载体构建成功。

2.2　pcDNA3.1-PsaA 在 BHK-21 细胞的表达

RT-PCR 检测:重组质粒 pcDNA3.1-PsaA 转染 RT-PCR 结果阳性,对照空质粒组阴性(图 1A),从基因转录水平证明了 PsaA 的表达;Western blot 检测:重组载体转染 BHK-21 细胞总蛋白提取物 Western blot 分析可见 37×10^3 大小蛋白带,与 PsaA 分子量符合,对照空质粒转染组未见对应蛋白表达带,从翻译水平证明了重组真核载体在哺乳动物细胞的成功表达(图 1B)。



A: pcDNA3.1-PsaA 瞬时转染 BHK-21 细胞 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳结果　1:DNA 标准; 2: pcDNA3.1-PsaA 转染组; 3: pcDNA3.1(+)转染组

B: pcDNA3.1-PsaA 瞬时转染 BHK-21 细胞 Western blot 结果　1:蛋白分子量标准; 2: pcDNA3.1-PsaA 转染组; 3: pcDNA3.1(+)转染组

图 1　PsaA 在 pcDNA3.1-PsaA 瞬时转染 BHK-21 细胞中的转录和表达

2.3　ELISA 检测免疫小鼠细胞免疫及体液免疫

ELISA 检测免疫小鼠脾细胞分泌 IFN-γ 水平如表 1。对照组[pcDNA3.1(+)组]小鼠血清中几乎检测不到 IFN-γ 分泌,存在显著差异($P<0.01$);ELISA 检测免疫小鼠第 28 天及第 56 天血清抗 PsaA 特异性 IgG 抗体(表 2),pcDNA3.1-PsaA 组小鼠总 IgG 水平较空质粒对照组明显升高,存在显著差异($P<0.01$),并且分析发现在第 28 天再次免疫后抗体水平在第 56 天再次明显升高,IgG 亚型分析显示 IgG1/IgG2a 值小于 1(第 28 天,IgG1/IgG2a = 0.06;第 56 天,IgG1/IgG2a = 0.17)。

2.4　免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌 D39 携带情况

3 组免疫小鼠鼻咽部定殖 7 d 后鼻腔灌洗液菌落计数,均值分别为 5.34×10^6 CFU(PBS 组)、5.26×10^6 CFU[pcDNA3.1(+)组]、2.83×10^6 CFU(pcDNA3.1-PsaA 组),可见 PBS 及空质粒组小鼠鼻咽部肺炎链球菌定殖成功,菌落计数无明显差异($P>0.05$),pcDNA3.1-PsaA 组小鼠鼻咽部肺炎链球菌数量明显减少,不足定殖最少细菌数,与 PBS 组及 pcDNA3.1 组对照存在显著性差异($P<0.01$)。

表 1　血清 IFN-γ 水平检测[ng/ml, $\bar{x}\pm s$]

距末次免疫后时间	pcDNA3.1-PsaA 组	pcDNA3.1(+)组
7 d	14.23 ± 1.02	0.020 ± 0.005[a]
14 d	19.34 ± 2.23	0.050 ± 0.012[a]
21 d	26.88 ± 3.45	0.030 ± 0.007[a]

a:$P<0.01$,与 pcDNA3.1-PsaA 组比较

表 2　血清特异性 IgG 水平检测[$D(492)$, $\bar{x}\pm s$]

距末次免疫后时间	pcDNA3.1-PsaA 组	pcDNA3.1(+)组
28 d	0.38 ± 0.06	0.11 ± 0.03[a]
56 d	1.79 ± 0.24	0.88 ± 0.17[a]

a:$P<0.01$,与 pcDNA3.1-PsaA 组比较

3　讨论

肺炎链球菌一直是机体各种感染的最常见致病菌,伴随其抗生素耐药性的增加,肺炎链球菌疫苗已成为目前世界上使人类获益最大的疫苗之一。目前已研制使用的肺炎链球菌疫苗有多糖荚膜疫苗(PSV)和多糖蛋白结合疫苗(PCV),PSV 为非 T 细胞依赖抗原,通过 B 细胞诱导产生抗体,故对 2 岁以下 B 细胞免疫系统尚未发育成熟的儿童无效,且在高危人群几乎不能激发保护性免疫反应,不降低黏膜肺炎链球菌在鼻咽部的携带率而逐渐被淘汰。PCV 将荚膜多糖结合到蛋白质上,改变抗原复合物的性质,而激发了 T 细胞依赖型抗体反应,在婴幼儿能诱导免疫记忆,但存在荚膜血清型转换现象,覆盖血清型亦有限且造价的高昂使它在发展中国家的应用变得不可能,目前仅美国及极少数欧洲国家使用。DNA 疫苗是一种继减毒活疫苗及亚单位疫苗后的第 3 代疫苗,即通过将编码外源性抗原的基因插入到含真核表达系统的载体上,直接导入人或动物体内,在宿主细胞中持续表达抗原蛋白,同时诱导机体产生细胞和体液免疫反应的防治性疫苗。研发肺炎链球菌 DNA 疫苗具有较 PSV 疫苗和 PCV 疫苗更多的优势:非血清型依耐、覆盖面更广、作用更持久、造价更简便、制备更简便等[9]。

靶抗原的选择是研发 DNA 疫苗的关键,PsaA 是

一种 37×10^3 大小的肺炎链球菌表面锚定蛋白,是金属黏附脂蛋白家族中的一员[10],作为 ABC 转运系统的一部分参与 Mn^{2+} 及 Zn^{2+} 离子向肺炎链球菌的传输,介导肺炎链球菌对上呼吸道上皮细胞的黏附。Berry 等[11]用等位基因置换技术构建来源于肺炎链球菌 D39 株的 PsaA 缺陷菌株,通过功能实验显示 PsaA 缺陷菌对呼吸道上皮细胞的黏附率仅为亲代菌的 9%,无法在小鼠鼻咽部定殖。Morrison 等[12]以 10 种限制性内切酶对 90 个肺炎链球菌株(包括 23 价多糖疫苗中的 23 个血清型)的 PsaA 基因进行 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析,结果显示仅有 10% 的菌株发生微小变异,证明不同血清型肺炎链球菌 PsaA 基因高度保守,PsaA 为靶抗原的 DNA 疫苗的研制,有望减少肺炎链球菌在鼻咽部携带,预防其在人群间的水平传播。

本研究成功构建了 pcDNA3.1-PsaA 重组质粒,并在转录和翻译水平证实了重组 PsaA 蛋白在哺乳动物细胞中的表达,pcDNA3.1-PsaA 基因疫苗免疫 BABL/c 小鼠;ELISA 检测免疫小鼠脾细胞分泌 IFN-γ 的水平及血清总 IgG 抗体水平,并结合 IgG 亚型比例(IgG1/IgG2a)分析,表明 pcDNA3.1-PsaA DNA 成功诱导小鼠产生了特异性的细胞及体液免疫应答,且以Ⅰ型辅助性 T 细胞介导的细胞免疫应答为主,同时提示再次免疫有助于增强免疫应答的效能;通过肺炎链球菌 D39 毒力株在 BABL/c 小鼠鼻咽部定殖模型证实 pcDNA3.1-PsaA DNA 疫苗有效阻止了肺炎链球菌在小鼠鼻咽部的定殖。

肺炎链球菌表面毒力蛋白在肺炎链球菌致病的不同环节发挥着独立或协同作用,减少肺炎链球菌鼻咽部携带是减少肺炎链球菌迁移、侵袭、致病及在人群间水平传播的关键环节。本研究应用 PsaA 的 DNA 疫苗有效激发了机体保护性免疫应答,减少了肺炎链球菌的鼻咽部携带,提示 PsaA 是针对肺炎链球菌鼻咽部携带环节的有效保护性抗原,可作为肺炎链球菌新一代 DNA 疫苗的理想候选抗原之一。

参考文献:

[1] Jacobs M R. Streptococcus pneumoniae: epidemiology and patterns of resistance[J]. Am J Med, 2004, 117 Suppl 3A: 3S-15S.

[2] Ortqvist A, Hedlund J, Kalin M. Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and clinical features[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2005, 26(6): 563-574.

[3] Barros M M, Cartagena S C, Bavestrello F L. Prevention of community-acquired pneumonia in adults[J]. Rev Chilena Infectol, 2005, 22(Suppl 1): s67-s74.

[4] Bogaert D, Hermans P W, Adrian P V, *et al*. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies[J]. Vaccine, 2004, 22(17-18): 2209-2220.

[5] 张 巧, 王长征, 林科雄, 等. 社区获得性下呼吸道重症感染病原菌及耐药性分析[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(19): 1771-1773.

[6] Swiatlo E, Ware D. Novel vaccine strategies with protein antigens of Streptococcus pneumoniae[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 38(1): 1-7.

[7] Hoskins J, Alborn W E Jr., Arnold J, *et al*. Genome of the bacterium Streptococcus pneumoniae strain R6[J]. J Bacteriol, 2001, 183(19): 5709-5717.

[8] Wu H Y, Virolainen A, Mathews B, *et al*. Establishment of a Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal colonization model in adult mice[J]. Microb Pathog, 1997, 23(3): 127-137.

[9] Andreas K, Frosch M. Genome-based vaccines[J]. Int J Med Microbiol, 2004, 294(5):295-301.

[10] De B K, Woolfitt A R, Barr J R, *et al*. Analysis of recombinant acylated pneumococcal surface adhesin A of streptococcus pneumoniae by mass spectrometry[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 419(2): 147-157.

[11] Berry A M, Paton J C. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae[J]. Infect Immun, 1996, 64(12): 5255-5262.

[12] Morrison K E, Lake D, Crook J, *et al*. Confirmation of psaA in all 90 serotypes of Streptococcus pneumoniae by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 434-437.

(编辑 栗 嘉)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部