论著

文章编号:1000-5404(2009)10-0922-04

肺炎链球菌毒力蛋白DNA疫苗优势抗原组合筛选及鉴定

马千里,张 巧,姚 伟,李 琦,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DNA疫苗候选抗原联合免疫的优势抗原组合方式。**方法** 分子克隆肺炎链球菌表面蛋白A(PspA)N端及肺炎链球菌溶血素(Ply)基因序列,构建重组质粒pcDNA3.1-PspA'和pcDNA3.1-PBD(PBD为Ply点突变减毒体),免疫印迹(Western blot)检测重组质粒在哺乳动物BHK-21细胞中的表达(包括前期工作中构建的重组质粒pcDNA3.1-PsaA)。将3种重组基因疫苗以不同方式组合肌肉注射免疫150只BALB/c小鼠(B组:pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PspA', C组:pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PBD, D组:pcDNA3.1-PspA' + pcDNA3.1-PBD,E组:pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PspA' + pcDNA3.1-PBD),检测各组小鼠血清特异性抗体IgG水平,观察免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌D39携带改变和D39腹腔攻击小鼠21 d生存情况。**结果** 成功构建3种重组真核表达载体,ELISA检测结果显示B组小鼠血清特异性IgG抗体水平与E组相似($P>0.05$),均明显高于A、C、D组[A组:对照空质粒组pcDNA3.1(+)]小鼠($P<0.01$);免疫小鼠鼻咽部D39携带菌落计数提示B组小鼠相似于E组小鼠($P>0.05$),并明显少于C、D组和阴性对照组(A组和PBS组,$P<0.01$),并且D39腹腔攻击小鼠21 d生存时间分析亦提示其中位生存时间明显长于C组及阴性对照组(A组和PBS组,$P<0.01$)。**结论** PspA'联合PsaA的抗原组合方式具有高效的协同保护效能,可作为肺炎链球菌DNA疫苗的优势候选抗原组合。

关键词: 肺炎链球菌;肺炎链球菌表面黏附素A;肺炎链球菌表面蛋白A;肺炎链球菌溶菌酶;基因疫苗

中图法分类号: R392-33;R392.7;R563.1 **文献标识码:** A

Screening of dominant antigen formats of DNA vaccine against *Streptococcus pneumoniae*

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

Abstract: Objective To screen different formats of dominant antigens of DNA vaccine of *Streptococcus pneumoniae*. **Methods** The fragments of pneumococcal surface protein A (PspA') and PBD [mutant of pneumococcal lysozyme (Ply)] from *Streptococcus pneumoniae* R6 genome were amplified and then cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). These recombinant vectors pcDNA3.1-PspA', pcDNA3.1-PBD and pcDNA3.1-PsaA (pneumococcal surface adhesin A, produced in our preliminary work) were transfected into BHK-21 cells, and their expressions were detected with Western blotting. In 7 d after receiving an injection of cardiotoxin into the quadriceps muscle of thigh, BALB/c mice groups (Group A: pcDNA3.1(+); Group B: pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PspA'; Group C: pcDNA3.1-PsaA' + pcDNA3.1-PBD; Group D: pcDNA 3.1-PspA + pcDNA3.1-PBD; Group E: pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PspA' + pcDNA3.1-PBD; and PBS group) were injected intramuscularly by corresponding formats of recombinant vectors on Day 0 and 28 respectively. The serum levels of antibodies against PspA', PsaA and PBD proteins were tested by ELISA on 28 d after last immunization. The nasopharyngeal colony count of Streptococcus pneumoniae D39 and survival time after intraperitoneal infection in BALB/c mice models were analyzed. **Results** The mice in Group B and Group E ($P<0.05$) produced higher levels of serum IgGs in responses to PsaA and PspA' than the other groups ($P<0.01$ *vs* Group A). The results of nasopharyngeal colony counting showed there was no significant difference between Group B and Group E, and they had significantly fewer pneumococci in the nasophary than the

作者简介: 马千里,男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事细菌感染方面的研究。E-mail: cqmql@163.com

通信作者: 王长征,电话:(023)68774303,E-mail: czwang@netease.com

收稿日期: 2009-02-24;**修回日期:** 2009-03-06

other 3 groups ($P<0.01$ *vs* Group A). The same results were noted in the intraperitoneal infection of *Streptococcus pneumoniae* D39 in BALB/c mice models. **Conclusion** Among the formats of dominant candidate antigens for DNA vaccine, the DNA vaccine of the combined format of PspA' and PsaA has higher performance in the protection from *Streptococcus pneumoniae*.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; pneumococcal surface protein A; pneumococcal surface adhesin A; pneumococcal lysozyme; DNA vaccine

应用疫苗预防及治疗肺炎链球菌感染是目前 WHO 提出减少耐药菌传播、缓解抗生素耐药压力,保护高危人群的唯一方法[1,2]。鉴于目前应用的肺炎链球菌疫苗存在血清型依赖、价格高昂等诸多不足[3,4],新一代肺炎链球菌 DNA 疫苗因其广覆盖、高效能、低成本的优势在发展中国家具有迫切市场应用需求[5]。靶抗原的选择是基因疫苗的首要问题。国内外研究提示到目前为止尚没有一种肺炎链球菌毒力蛋白被认为能激发覆盖所有致病菌株定殖、黏附、侵袭全过程的免疫保护作用,而联合使用多种蛋白抗原被认为具有协同激发机体更有效保护性免疫能力[6]。本研究根据国内外文献报道及本研究小组前期研究结果[7-10],筛选了具备良好保守性及免疫原性的 3 种肺炎链球菌毒力蛋白(PspA、PsaA 和 Ply),评价其相应的基因疫苗不同方式的联合免疫小鼠的免疫原性及保护效能差异,旨在为肺炎链球菌新一代 DNA 疫苗筛选优势靶抗原及其组合方式。

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。

1.2　抗体、工具酶和试剂

DNA 限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、T_4 DNA 连接酶,高保真 *Taq* 酶(*Taq* Plus DNA Polymerase)、*Taq* DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司,细菌基因组提取试剂盒购自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,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 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 BALB/c 小鼠 150 只,6~8 周龄,体质量(20±1)g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.4　重组真核表达质粒的构建

PsaA 重组真核表达质粒由课题组人员前期构建[10]。PspA'重组真核表达质粒的构建:以 GenBank 中提供的 PspA 蛋白 N 端序列设计引物,上游 5′-GGGGTACCATGGCAGAAGAATCTCCCGT-3′,下游 5′-GCTCTAGATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGATTAACTGCTTTCTTAAGG-3′。长度 898 bp。

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 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。产物连接真核载体 pcDNA3.1(+),重组阳性克隆质粒送北京华大基因公司测序。Ply 减毒突变体 PBD 重组真核表达质粒的构建:参照国外文献[11]报道,重组阳性克隆质粒送北京华大基因公司测序。

1.5　重组质粒转染 BHK-21 细胞及 Western blot 鉴定

BHK-21 细胞转染前以含有 10% 胎牛血清的 MEM 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,Western blot 检测 PspA、PBD、PsaA 蛋白的表达: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 PspA、PsaA 和 PBD 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-PspA'、pcDNA3.1-PsaA 和 pcDNA3.1-PBD,稀释至 1 g/L 浓度,-20 ℃保存备用。将 75 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠分 5 组,每组 15 只。A 组:pcDNA3.1(+);B 组:pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PspA';C 组:pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PBD,D 组:pcDNA3.1-PspA' + pcDNA3.1-PBD;E 组:pcDNA3.1-PsaA + pcDNA3.1-PspA' + pcDNA3.1-PBD。每组小鼠于免疫前 1 周双侧股四头肌注射心肌毒素 100 μl (10 μmol/L)预处理后,第 1 天免疫小鼠,每只小鼠两侧股四头肌接种 DNA 疫苗,每组小鼠注射每种重组质粒 50 μl,第 28 天同法加强免疫 1 次。

1.7　检测小鼠血清特异性抗体 IgG

末次免疫后第 28 天于 2 组小鼠眶静脉采血制备血清,ELISA 检测血清中 PspA、PsaA 和 PBD 特异性 IgG 水平,我室前期制备[10] PspA、PsaA 和 PBD 抗原包板,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗,OPD 显色,37 ℃闭光反应 20 min,H_2SO_4 终止反应,采用 492 nm 波长酶标仪测定吸光度值[D(492)]。

1.8　免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌 D39 菌落计数

按上述方法进行实验分组及免疫小鼠,加设阴性 PBS 对照组,PBS 组小鼠注射 100 μl PBS 对照,末次免疫 14 d 后,按照文献[12]确立的小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带模型制备方法,建立 6 组免疫小鼠鼻腔携带状态,7 d 后处死 3 组小鼠,按文献报道

方法取鼻腔灌洗液行菌落计数。

1.9 免疫小鼠肺炎链球菌 D39 腹腔攻击后 21 d 生存时间分析

按 1.6 方法免疫小鼠及设置分组，末次免疫 28 d 后，按照文献[13]确立的小鼠腹腔攻击模型，培养至对数生长期，将肺炎链球菌 D39 6 μl(10^4菌落形成单位 CFU)腹腔注射 6 组免疫小鼠，观察 21 d 生存情况。

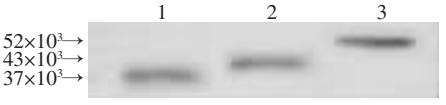
1.10 统计学分析

鼻咽部灌洗液菌落计数均值采用 lg($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用 t 检验。21 d 生存情况按 Keplan-Meier 法统计中位生存时间并绘制生存曲线[14]，组间分析用 Log-rank 检验。

2 结果

2.1 3 种重组质粒在 BHK-21 细胞的表达

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、43×10^3 和 52×10^3 大小的蛋白条带，分别与 PsaA、PspA' 及 PBD 相对分子质量符合(图 1)。



1：PsaA；2：PspA'；3：PBD

图 1 PsaA、PspA'、PBD 在重组质粒瞬时转染 BHK-21 细胞中的表达

2.2 免疫小鼠血清特异性抗体水平 ELISA 检测

ELISA 检测免疫小鼠第 28 天血清抗 PsaA、PspA' 及 PBD 特异性 IgG 抗体水平(表 1)，B 组血清抗 PspA' 特异性抗体水平较 A、D 组明显升高($P < 0.05$)，抗 PsaA 特异性抗体水平较 A、C 组明显升高($P < 0.05$)，而与 E 组相似($P > 0.05$)。在包含pcDNA3.1-PBD 疫苗注射小鼠组(C、D、E 组)中，血清抗 PBD 的特异性抗体水平无统计学差异($P > 0.05$)。

表 1 血清特异性 IgG 水平检测 [$D(492), \bar{x} \pm s$]

组别	PspA'	PsaA	PBD
A 组	0.10 ± 0.06^b	0.09 ± 0.06^b	0.10 ± 0.06
B 组	0.66 ± 0.07^a	0.42 ± 0.08^a	
C 组		0.35 ± 0.06^b	0.42 ± 0.05
D 组	0.58 ± 0.08^b		0.41 ± 0.07
E 组	0.66 ± 0.08	0.43 ± 0.08	0.44 ± 0.06

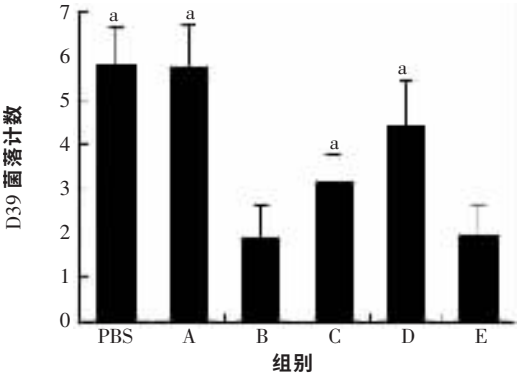
a：$P < 0.01$，与 A 组比较；b：$P < 0.05$，与 B 组比较

2.3 免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌 D39 携带情况

免疫小鼠鼻咽部定殖 7 d 后鼻腔灌洗液菌落计数(图 2)，可见 PBS 组及 A 组小鼠鼻咽部肺炎链球菌定殖成功，菌落计数无明显差异($P > 0.05$)，B 组小鼠鼻咽部肺炎链球菌数量明显减少，与 E 组无统计学差异($P > 0.05$)，与 PBS 组及 A 组间存在显著性差异($P < 0.01$)，较 C 组和 D 组减少更显著($P < 0.01$)。

2.4 免疫小鼠肺炎链球菌 D39 腹腔攻击 21 d 生存情况

各组免疫小鼠 28 d 后应用致死剂量的肺炎链球菌强毒株 D39 腹腔攻击小鼠后 21 d 生存情况分析发现，B 组小鼠中位生存时间达 13 d，明显长于 PBS 组和 A 组($P < 0.01$)，并优于 C 组($P < 0.01$)和 D 组($P < 0.01$)，而与 E 组中位生存时间相同，生存曲线相似(图 3)。



a：$P < 0.01$，与 B 组比较

图 2 各组免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌 D39 携带情况

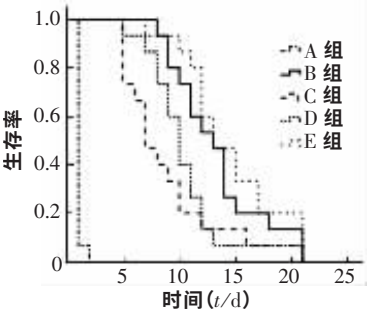


图 3 小鼠肺炎链球菌腹腔攻击 21 d 生存曲线

3 讨论

众多肺炎链球菌毒力蛋白在肺炎链球菌的携带、定殖、迁移及黏附侵袭的不同阶段发挥不同毒力作用，它们作为新一代肺炎链球菌 DNA 疫苗的候选抗原，其保守性和免疫原性被进一步评价。因为在大多数肺炎链球菌毒力蛋白个体间存在等位基因的变化，针对单一蛋白质的抗体不能识别不同的等位基因，所以使用多种等位基因抗原蛋白或多种抗原蛋白联合，针对肺炎链球菌致病的不同阶段，被认为有利于减少肺炎链球菌的免疫逃逸[15]。目前研究最多的肺炎链球菌相关毒力蛋白主要有 PspA、PsaA、PLY、自溶酶(LytA)、胆碱结合蛋白 A(CbpA)、PHT 家族以及神经酰胺酶(nanA)等，PHT 家族及 LytA、nanA 在细菌毒力中发挥的作用存在争议[16]，其基因疫苗激发的相应抗体效价低，CbpA 分子结构具有抗原多样性，故是否能激发异种血清型抗体交叉反应，目前还不明确。PsaA 是肺炎

链球菌的黏附分子,具有高度保守的基因序列,覆盖所有肺炎链球菌血清型,通过阻止 Mn 离子(补体的充分表达需要 Mn 离子的参与)的传导过程,进而抑制补体与细菌的结合,干扰补体介导的调理吞噬作用,被认为主要与肺炎链球菌鼻咽部定殖相关[17]。PspA 蛋白是肺炎链球菌表面的一种胆碱结合蛋白,主要通过阻断补体旁路途径减少 C3b 与肺炎链球菌结合的数量,进而减少补体介导的调理吞噬作用的效力,被认为是肺炎链球菌毒力的必需成份,几乎存在于所有的肺炎链球菌血清型中,虽然各型肺炎链球菌株中的 PspA 有很高的变异性,但 PspA 分子间存在广泛的交叉反应[7]。Ply 蛋白是一巯基激活毒素家族中的一员,具有良好保守性,存在于所有肺炎链球菌血清型中,可以干扰肺部纤毛的运动,同时通过抑制补体结合和抑制吞噬细胞吞噬发挥毒力效力,PBD 是其点突变后保留免疫原性的减毒性蛋白[8,10]。因此,PsaA、PspA 和 PBD 蛋白是 3 种理想的候选抗原,分别在肺炎链球菌的定殖、侵袭的不同阶段发挥重要的毒力作用,如何联合应用从而更高效的激发机体保护效能是本研究拟解决的关键问题。

国外报道更多的联合应用毒力蛋白具有更好的协同效能。本研究我们观察到 3 种重组 DNA 疫苗(携带 3 种理想候选抗原 PspA'、PsaA 和 PBD)以不同的组合方式免疫 BALB/c 小鼠后,PspA' + PsaA 的联合 DNA 疫苗所激发的特异性抗体效价以及对小鼠肺炎链球菌鼻咽部定殖和侵袭性感染的保护作用均不仅优于其他的两两组合的疫苗组(PsaA + PBD 组和 PspA' + PBD 组),并与 3 种蛋白组合的疫苗组(PsaA + PspA' + PBD 组)具有相当的免疫原性和保护效能,提示 PBD 的联合应用并不显著增加保护性抗体效价和保护作用,PspA 和 PsaA 蛋白作为肺炎链球菌 DNA 疫苗的优势候选靶抗原,其联合的组合方式具有高效的协同保护效能,可作为肺炎链球菌 DNA 疫苗的优势候选抗原组合,并可以避免 PBD 存在的弱毒性问题,而其抗原呈递的优化有待进一步研究。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] Huss A, Scott P, Stuck A E, *et al*. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis[J]. CMAJ, 2009, 180(1): 48 - 58.

[4] Melegaro A, Edmunds W J. The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Part Ⅱ. A cost-effectiveness analysis for invasive disease in the elderly in England and Wales[J]. Eur J Epidemiol, 2004, 19(4): 365 - 375.

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

[6] Ogunniyi A D, LeMessurier K S, Graham R M, *et al*. Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of Streptococcus pneumoniae D39 in a mouse model[J]. Infect Immun, 2007, 75(4): 1843 - 1851.

[7] Miyaji E N, Dias W O, Tanizaki M M, *et al*. Protective efficacy of PspA (pneumococcal surface protein A)-based DNA vaccines: contribution of both humoral and cellular immune responses[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 37(1): 53 - 57.

[8] Srivastava A, Henneke P, Visintin A, *et al*. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease[J]. Infect Immun, 2005, 73(10): 6479 - 6487.

[9] 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.

[10] 张　巧, 马千里, 李　琦, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8): 739 - 742.

[11] Paton J C, Lock R A, Lee C J, *et al*. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to Streptococcus pneumoniae type 19F polysaccharide[J]. Infect Immun, 1991, 59(7): 2297 - 2304.

[12] 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.

[13] Ogunniyi A D, Woodrow M C, Poolman J T, *et al*. Protection against Streptococcus pneumoniae elicited by immunization with pneumolysin and CbpA[J]. Infect Immun, 2001, 69(10): 5997 - 6003.

[14] Dinse G E, Lagakos S W. Nonparametric estimation of lifetime and disease onset distributions from incomplete observations[J]. Biometrics, 1982, 38(4): 921 - 932.

[15] 张晓兵, 廖　杨, 龚雅利, 等. 肺炎链球菌临床分离株耐药性及红霉素耐药相关基因的研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(10): 899 - 900.

[16] Jedrzejas M J. Pneumococcal virulence factors: structure and function[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(2): 187 - 207.

[17] 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.

(编辑　栾　嘉)