文章编号:1000-5404(2014)16-1651-05

论著

以Pam2CSK4为佐剂的减毒活疫苗D39△CPS-TA可保护幼鼠抵抗肺炎链球菌感染

曾令斌[1],廖 璞[2],宋志新[1],赵家宁[1],高 松[1],吴盈盈[1],尹一兵[1],胥文春[1] (400016 重庆,重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室[1];400014 重庆,重庆市第三人民医院检验科[2])

[摘要] **目的** 评价新型减毒肺炎链球菌疫苗株D39△CPS-TA与佐剂Pam2CSK4联用时在幼鼠模型中的免疫保护效果及安全性。**方法** D39△CPS-TA、D39△CPS-TA+霍乱毒素(cholera toxin, CT)、D39△CPS-TA+Pam2CSK4经鼻免疫C57/BL6幼鼠,每周1次,共4次。末次免疫后1周,酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗体及细胞因子水平。末次免疫后2周,采用19F型和2型肺炎链球菌攻毒,观察免疫保护效果。生存率实验评价D39△CPS-TA的安全性;从体质量变化和肺组织病理学改变2个角度,评价Pam2CSK4的安全性。**结果** D39△CPS-TA+Pam2CSK4免疫幼鼠可有效引起抗原特异性IgG升高,其中以IgG1为主;能有效促进IFN-γ、IL-4、IL-10和IL-17A水平升高;能有效抵抗19F型肺炎链球菌在小鼠鼻咽部定植;能有效提高小鼠经2型肺炎链球菌攻毒后的生存率。高剂量D39△CPS-TA可被幼鼠耐受,Pam2CSK4较CT安全。**结论** D39△CPS-TA+Pam2CSK4经鼻免疫幼鼠可安全有效地刺激其体液免疫和细胞免疫,进而对抗肺炎链球菌感染。

[关键词] 肺炎链球菌;疫苗;佐剂;安全性
[中图法分类号] R378.14;R392.12;R392.3 [文献标志码] A

A live attenuated vaccine D39△CPS-TA with Pam2CSK4 as adjuvant elicits protection against pneumococcal infection in infant mice

Zeng Lingbin[1], Liao Pu[2], Song Zhixin[1], Zhao Jianing[1], Gao Song[1], Wu Yingying[1], Yin Yibing[1], Xu Wenchun[1] ([1]Key Laboratory of Diagnostic Medicine of Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Clinical Laboratory, Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the safety and efficacy of a novel pneumococcal attenuated vaccine strain D39△CPS-TA when delivered intra-nasally with adjuvant Pam2CSK4 in a infant mice model of pneumococcal infection. **Methods** C57/BL6 infant mice were intra-nasally administrated on days 0, 7, 14 and 28 with 1 dose of D39△CPS-TA + cholera toxin (CT) or Pam2CSK4, with D39△CPS-TA alone or with one of selected adjuvant alone. In 1 week after the last immunization, antibodies and cytokines levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In 2 weeks after the last immunization, mice were challenged with pneumococcal serotype 19F or 2 and protective effects were observed. Furthermore, the safety of D39△CPS-TA was measured by a survival experiment and the safety of Pam2CSK4 was evaluated by monitoring body weight and pathological analysis. **Results** Intranasal immunization with D39△CPS-TA + Pam2CSK4 in infant mice induced IgG1-based rise in antigen-specific IgG, increase of IFN-γ, IL-4, IL-10 and IL-17A, clearance of nasal colonization of pneumococcal serotype 19F and protective effects against lethal infection of pneumococcal serotype 2. High dose of D39△CPS-TA was tolerated by infant mice and Pam2CSK4 was safer than CT. **Conclusion** Intra-nasal immunization with D39△CPS-TA + Pam2CSK4 in infant mice stimulates humeral and cellular immune responses safely and effectively, and protects mice against pneumococcal infection.

[**Key words**] *Streptococcus pneumoniae*; mucosal adjuvant; vaccine; safety

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070819, 31270984), the Special Fund of Key Laboratory Chongqing Commission of Science and Technology (CSTC) and the Project of Chongqing Municipal Commission of Education (KJ120318). Corresponding author: Xu Wenchun, E-mail: xuwen0303@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(31070819,31270984);重庆市科委重点实验室专项经费(CSTC);重庆市教委课题(KJ120318)
[通信作者] 胥文春, E-mail: xuwen0303@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140424.1042.012.html(2014-04-24)

在全球范围内,肺炎链球菌感染是现阶段引起儿童死亡的主要原因[1]。据估算,全球每年死于肺炎链球菌感染的5岁以下儿童约100万人[2]。肺炎链球菌疫苗是全球最急需的疫苗之一,但目前使用较广的肺炎链球菌疫苗都有显著的局限性。肺炎链球菌多糖疫苗难以保护2岁以下的儿童[3]。多糖结合疫苗覆盖的血清型有限,且价格高昂。我们在前期实验中得到了1株无荚膜、磷壁酸表达显著降低的2型肺炎链球菌突变株D39△CPS-TA,作为疫苗免疫成年鼠,可抵抗多种类型的肺炎链球菌感染[4]。该菌高度减毒,我们尝试用其经鼻免疫幼鼠,但保护效果不佳。使用佐剂是提高疫苗保护效果的有效手段。然而,最为经典的黏膜佐剂CT的毒性过强,不适用于人类。安全、有效的黏膜佐剂对于预防儿童感染肺炎链球菌尤为重要。Pam2CSK4属于Toll样受体2(Toll-like receptor 2, TLR2)激动剂,其本质是人工合成的一种脂肽,之前作为黏膜佐剂已成功应用于流感疫苗[5]和沙眼衣原体疫苗[6],但其能否安全有效地应用于肺炎疫苗的幼年动物模型尚少见文献报道。本研究在幼鼠模型中,以CT为对照,评价以Pam2CSK4为佐剂的D39△CPS-TA疫苗的保护效果及安全性。

1 材料与方法

1.1 菌株

肺炎链球菌菌株D39(2型)购于英国国家典型菌种保藏中心(NCTC, London, United Kingdom),肺炎链球菌菌株CMCC(B)31693(19F型)购于中国医学菌种保藏中心。D39△CPS-TA为本实验室前期实验所得。上述菌株接种于C+Y培养基,在5% CO_2、37℃环境中进行培养。

1.2 小鼠与免疫

SPF级C57/BL6幼鼠,雌性,2周龄,体质量4.5~5.5 g,购于重庆医科大学实验动物中心[动物生产许可证号:SYXK(渝)2007-0001]。幼鼠经0.75%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,随机分为3个免疫组(D39△CPS-TA组、D39△CPS-TA+CT组、D39△CPS-TA+Pam2CSK4组)和2个对照组(CT组、Pam2CSK4组),每组19只。免疫组将D39△CPS-TA(1×10^8 CFU)单独或与佐剂(CT 1 μg, Sigma-Aldrich;Pam2CSK4 10μg, InvivoGen)混合后重悬于10 μL无菌PBS后经小鼠鼻腔滴入;对照组将CT(1 μg/只)或Pam2CSK4(10 μg/只)溶于10 μL无菌PBS后经小鼠鼻腔滴入。以上述方法连续免疫4次,每2次免疫之间间隔1周。

1.3 免疫后小鼠血清及唾液中特异性抗体检测

小鼠尾静脉血样本和唾液样本于末次免疫后1周采集,并于-20℃冰箱冻存备用。血液样本中的特异性IgG、IgG亚型(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3)及唾液样本中的IgA以间接ELISA测定。ELISA实验以D39△CPS-TA为包被抗原,连续稀释的血清或唾液样本为一抗,山羊抗小鼠IgG或IgA(Santa Cruz公司)为二抗,反应终止后用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度值[$D(450)$]。以$D(450)$值大于2.1倍阴性对照孔平均值对应的最大稀释度为特异性抗体效价。

1.4 细胞因子测定

末次免疫后1周,每个实验组均随机取出3只小鼠分离脾脏,70 μm孔径无菌不锈钢筛网分离脾细胞,以DMEM培养基洗涤2次,重悬于含10% FBS的DMEM培养基,调整浓度至5×10^6/mL后,于24孔板板中培养,每孔1 mL。热灭活的D39△CPS-TA(1×10^7个/孔)作为刺激因素加入培养孔中,而后将24孔板置于5% CO_2、37℃环境中孵育72 h,吸取上清于-70℃冰箱冻存备用。依照BioLegend细胞因子测定试剂盒说明书,以ELISA法测定上清中的IFN-γ、IL-4、IL-10和IL-17A水平。

1.5 免疫保护实验

末次免疫后2周,经小鼠鼻腔进行肺炎链球菌攻毒实验。在肺炎链球菌鼻腔定植模型中,每个实验组随机取出6只小鼠,每只经鼻滴入1×10^8 CFU 19F型肺炎链球菌,3 d后取小鼠鼻腔灌洗液(150 μL/只),连续稀释后铺于血平板,于5% CO_2、37℃环境中培养16~18 h后计数。在肺炎链球菌致死性感染模型中,每个实验组随机取出10只小鼠,每只经鼻滴入1×10^8 CFU D39,连续监测生存率至攻毒后21 d。

1.6 安全性评估实验

选取2周龄C57/BL6幼鼠,分别评价D39△CPS-TA和Pam2CSK4的安全性。疫苗安全性评价实验:共2组幼鼠,每组10只,以10 μL/只的剂量分别经鼻滴入D39(5×10^8 CFU/只)和D39△CPS-TA(5×10^8 CFU/只),连续监测生存率至感染后21 d。佐剂安全性评价实验:幼鼠经鼻滴入CT(1 μg/只)或Pam2CSK4(10 μg/只),PBS滴鼻组为阴性对照,各组($n=8$)滴鼻1次/d,连续滴鼻7 d并监测体质量。末次称质量后,取小鼠肺组织,浸泡于4% 多聚甲醛溶液中固定过夜后,石蜡包埋、连续切片后进行常规HE染色。

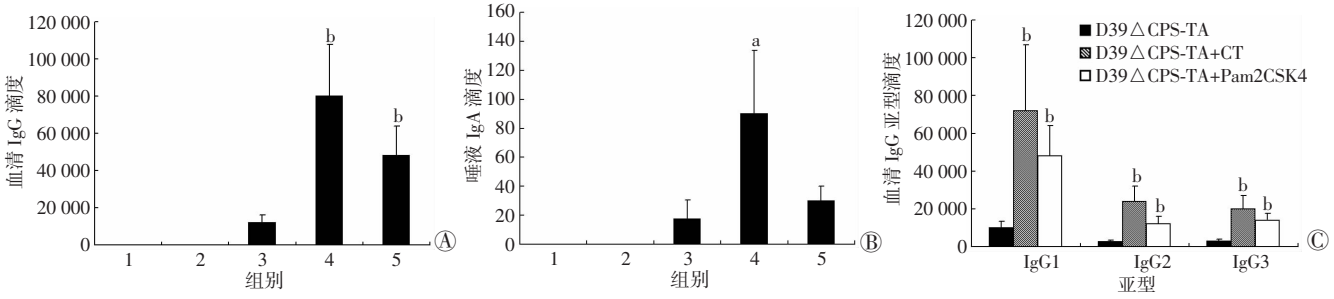
1.7 统计学分析

采用Graph pad Prism 5软件作图,抗体效价、细胞因子水平、肺炎链球菌定植实验计数差异进行Mann-Whitney U检验,生存率差异进行Log-rank检验。

2 结果

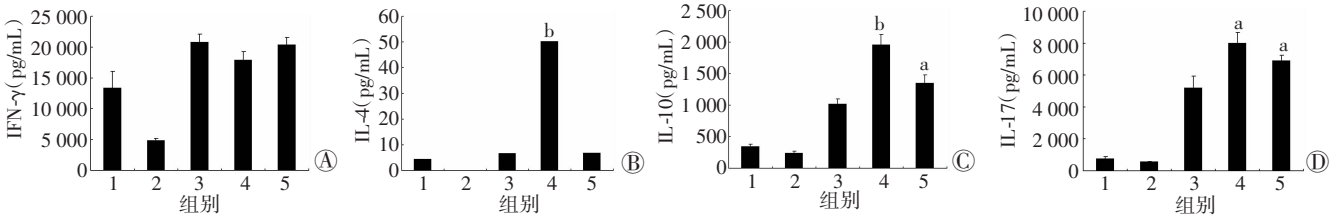
2.1 D39△CPS-TA特异性体液免疫

图1A显示D39△CPS-TA经鼻免疫幼鼠可有效促进其血清中产生特异性IgG,D39△CPS-TA+CT组和D39△CPS-TA+Pam2CSK4组的特异性IgG显著升高($P<0.01$),表明CT和Pam2CSK4均可协助疫苗促进高滴度的IgG产生。图1B显示D39△CPS-TA组、D39△CPS-TA+Pam2CSK4组的唾液IgA均升高,但无D39△CPS-TA+CT组升高显著。IgG亚型分析结果显示,D39△CPS-TA所刺激的IgG以IgG1为主,同时包含IgG2a和IgG2b,IgG3未检出;D39△CPS-TA+CT或D39△CPS-TA+Pam2CSK4均可进一步显著促进IgG1、IgG2a和IgG2b产生($P<0.05$,图1C),提示Pam2CSK4类似于CT,可同时有效刺激Th1和Th2型免疫反应。



A:血清;B:唾液;C:血清 IgG 亚型;1:CT;2:Pam2CSK4;3:D39△CPS-TA;4:D39△CPS-TA + CT;5:D39△CPS-TA + Pam2CSK4; a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 D39△CPS-TA 组比较

图 1　经鼻免疫诱导的体液免疫反应



A: IFN-γ; B:IL-4; C:IL-10; D:IL-17A　1:CT;2:Pam2CSK4;3:D39△CPS-TA;4:D39△CPS-TA + CT;5:D39△CPS-TA + Pam2CSK4; a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与 D39△CPS-TA 组比较

图 2　经鼻免疫诱导的细胞免疫反应

2.2　D39△CPS-TA 特异性细胞免疫反应

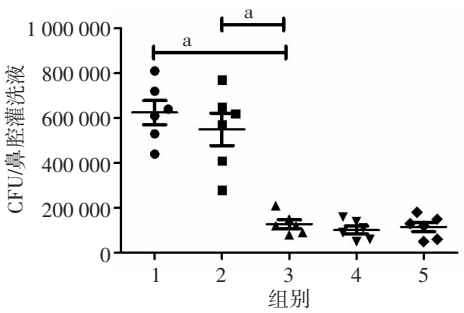
脾细胞上清细胞因子检测提示,D39△CPS-TA 可特异性促使 Th1 型细胞因子(IFN-γ)、Th2 型细胞因子(IL-4)、Treg 型细胞因子(IL-10)、Th17 型细胞因子(IL-17A)产生,D39△CPS-TA + CT 可使 IL-4、IL-10、IL-17A 水平进一步显著提高($P<0.05$),D39△CPS-TA + Pam2CSK4 可使 IL-10、IL-17A 水平进一步显著提高($P<0.05$,图 2)。综上所述,D39△CPS-TA 经鼻免疫幼鼠可引起 Th1/Th2/Th17 型免疫反应,D39△CPS-TA + CT 可进一步显著促进 Th2/Th17 型免疫反应,D39△CPS-TA + Pam2CSK4 可进一步显著促进 Th17 型免疫反应。

2.3　D39△CPS-TA 的抗肺炎链球菌定植作用

经 D39△CPS-TA 免疫的幼鼠的鼻腔中的肺炎链球菌载量显著低于阴性对照组($P<0.01$),但 D39△CPS-TA + CT 组和 D39△CPS-TA + Pam2CSK4 组的细菌载量未进一步显著下降(图 3),提示经 D39△CPS-TA 免疫的幼鼠可有效对抗 19F 型肺炎链球菌的鼻咽定植,而 CT 和 Pam2CSK4 不能进一步显著增强 D39△CPS-TA 的抗定植能力。

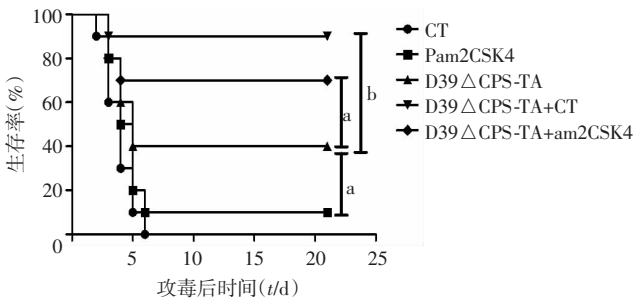
2.4　D39△CPS-TA 抵抗致死性肺炎链球菌感染

如图 4 所示,D39 攻毒后,D39△CPS-TA + CT 组和 D39△CPS-TA + Pam2CSK 组的生存率分别为 90% 和 70%,显著高于 D39△CPS-TA 组($P<0.05$)。D39△CPS-TA 组的生存率显著高于单纯佐剂对照组($P<0.05$)。提示,经 D39△CPS-TA 免疫的幼鼠可在一定程度上抵抗致死剂量的 D39 感染,D39△CPS-TA + CT 或 D39△CPS-TA + Pam2CSK4 可使该种抵抗力进一步显著的提高。



1:CT;2:Pam2CSK4;3:D39△CPS-TA;4:D39△CPS-TA + CT;5:D39△CPS-TA + Pam2CSK4　鼻腔灌洗液中的的细菌载量于感染后第 3 天测定,a: $P<0.01$

图 3　经鼻免疫在定植模型中的保护作用

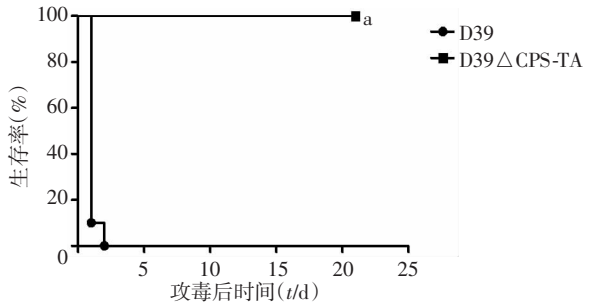


经小鼠鼻腔以 D39 攻毒,连续监测小鼠生存率 21 d,a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

图 4　经鼻免疫在致死性感染模型中的保护作用

2.5 幼鼠对D39△CPS-TA具有良好的耐受性

经D39滴鼻的幼鼠在感染后2 d内全部死亡,经同等菌量的D39△CPS-TA滴鼻的幼鼠于感染后21 d仍全部存活(图5),提示高剂量的D39△CPS-TA可被幼鼠耐受。



经幼鼠鼻腔以D39(5×10^8 CFU/只)或D39△CPS-TA(5×10^8 CFU/只)攻毒,连续监测生存率21 d,a:$P<0.01$,与D39比较

图5 幼鼠对D39△CPS-TA的耐受性

2.6 Pam2CSK4是相对安全的黏膜佐剂

3个实验组的幼鼠分别经PBS、Pam2CSK4、CT连续滴鼻7 d,Pam2CSK4组与PBS组的体质量变化相似,而CT组出现体质量增长迟滞(图6)。肺组织切片HE染色结果提示,PBS组与Pam2CSK4组的肺组织结构完整,无明显白细胞浸润(图7A、B);CT组的肺组织结构被破坏并存在显著的白细胞浸润(图7C)。提示,Pam2CSK4作为黏膜佐剂较CT安全。

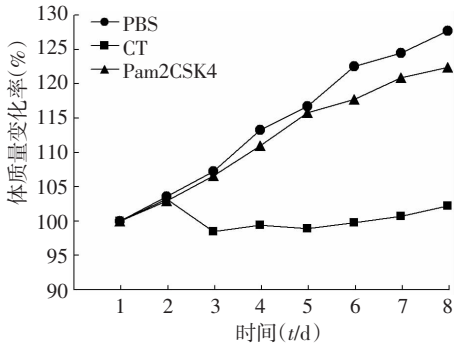


图6 3组幼鼠连续7 d分别经PBS、CT、Pam2CSK4滴鼻后的体质量变化

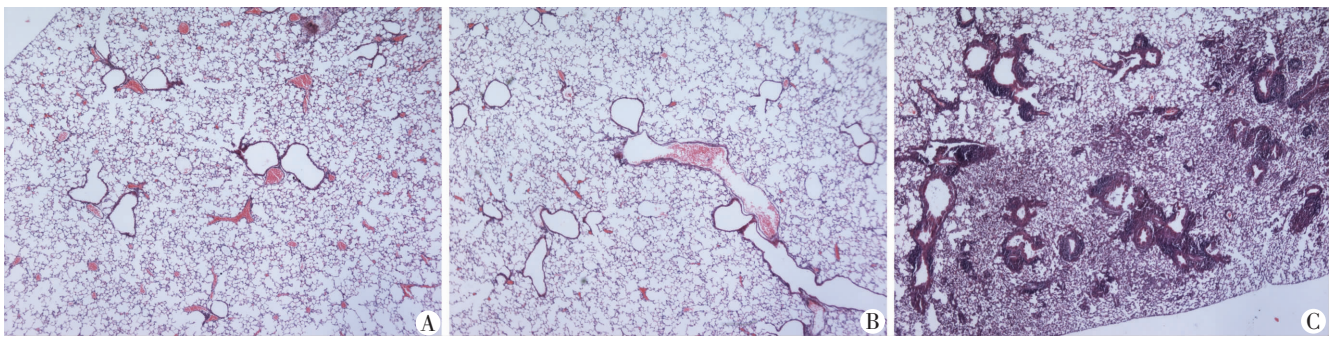
3 讨论

疫苗及佐剂的安全性和有效性是幼年个体免疫过程中的重点和难点。我们证明了D39△CPS-TA + Pam2CSK4经鼻免疫C57/BL6幼鼠可有效且相对安全地激发其体液免疫和细胞免疫,进而协助小鼠抵抗肺炎链球菌感染。

鼻咽定植是肺炎链球菌入侵机体的第一步,因此D39△CPS-TA的抗定植能力不容忽视。对抗肺炎链球菌的定植是一个复杂的免疫过程,一些细胞因子,如IFN-γ、IL-17A均可在抗肺炎链球菌定植方面发挥重要作用[7-8]。本研究中,D39△CPS-TA能有效促进上述细胞因子的分泌,同时能促进抗炎因子IL-10的分泌,从而在激发免疫反应、促进肺炎链球菌清除的同时具有良好的可耐受性。单独的D39△CPS-TA经鼻免疫幼鼠虽然可有效对抗在亚太地区的儿童中流行最广的19F型肺炎链球菌[9]的鼻咽定植,但对抗致死性肺炎链球菌D39感染的能力不佳。

使用佐剂是增强疫苗免疫原性、改善免疫效果的有力手段。铝佐剂是人类疫苗中应用最广的佐剂,它能够有效提高抗原的稳定性和免疫原性,但刺激黏膜免疫的能力不佳[10]。研究提示,针对呼吸道疾病,经鼻黏膜免疫是更为安全有效的免疫方式[11-12]。CT通常被视为黏膜佐剂中的金标准。TLR激动剂也是一类重要的佐剂[13]。还有研究证实TLR2在对抗肺炎链球菌感染过程中发挥至关重要的作用[14-15]。本实验中,TLR2激动剂Pam2CSK4在刺激体液免疫方面展现出与CT相近的能力。在细胞免疫方面,Pam2CSK4能够有效激发Th17型免疫反应。CT、Pam2CSK作为佐剂可促进免疫组小鼠的生存率显著提高,但二者在对抗肺炎链球菌鼻腔定植方面无显著促进作用。

在幼年个体的免疫过程中,安全性与有效性同等



A:PBS处理组;B:Pam2CSK4处理组;C:CT组

图7 3组幼鼠肺组织病理学观察 (HE ×40)

重要。我们通过生存率实验,在幼鼠模型中证明了D39△CPS-TA可被良好耐受。通过监测经CT或Pam2CSK4滴鼻的幼鼠的体质量,我们发现CT组的体质量增长出现了明显迟滞,而Pam2CSK4组则无此现象。以肺组织切片HE染色为手段进行病理学分析时可见CT对肺组织的损害明显大于PBS和Pam2CSK4。

综上,本研究显示,D39△CPS-TA + Pam2CSK4能安全有效地经鼻黏膜促进幼鼠的体液免疫和细胞免疫,对抗肺炎链球菌鼻咽定植及致死性肺炎链球菌感染,有成为人类幼儿肺炎疫苗的良好潜能。但是,本研究所使用的的攻毒菌株仅为2型和19F型,所使用的免疫方式仅为鼻黏膜免疫,该疫苗-佐剂组合对其他常见致病血清型(如6B型、19A型)的肺炎链球菌的抵抗作用以及经其他途径免疫(如口服或皮下免疫)的保护效果尚有待验证。

参考文献:

[1] O'Brien K L, Wolfson L J, Watt J P, *et al*. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates[J]. Lancet, 2009, 374(9693): 893-902.

[2] Olafsdottir T A, Lingnau K, Nagy E, *et al*. Novel protein-based pneumococcal vaccines administered with the Th1-promoting adjuvant IC31 induce protective immunity against pneumococcal disease in neonatal mice[J]. Infect Immun, 2012, 80(1): 461-468.

[3] Douglas R M, Paton J C, Duncan S J, *et al*. Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age [J]. Infect Dis, 1983, 148(1): 131-137.

[4] 尹一兵, 张雪梅, 吴凯峰, 等. 肺炎链球菌减毒活菌疫苗: 中国, CN200910104370.9[P]. 2009-12-30[2014-02-15].

[5] Tan A C, Mifsud E J, Zeng W, *et al*. Intranasal administration of the TLR2 agonist Pam2Cys provides rapid protection against influenza in mice[J]. Mol Pharm, 2012, 9(9): 2710-2718.

[6] Cheng C, Jain P, Bettahi I, *et al*. A TLR2 agonist is a more effective adjuvant for a Chlamydia major outer membrane protein vaccine than ligands to other TLR and NOD receptors[J]. Vaccine, 2011, 29(38): 6641-6649.

[7] Elhaik-Goldman S, Kafka D, Yossef R, *et al*. The natural cytotoxicity receptor 1 contribution to early clearance of Streptococcus pneumoniae and to natural killer-macrophage cross talk[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23472.

[8] Zhang Z, Clarke T B, Weiser J N. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(7): 1899-1909.

[9] Lin T Y, Shah N K, Brooks D, *et al*. Summary of invasive pneumococcal disease burden among children in the Asia-Pacific region[J]. Vaccine, 2010, 28(48): 7589-7605.

[10] Vecchi S, Bufali S, Skibinski D A, *et al*. Aluminum adjuvant dose guidelines in vaccine formulation for preclinical evaluations[J]. J Pharm Sci, 2012, 101(1): 17-20.

[11] Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe I C, *et al*. Experience with registered mucosal vaccines[J]. Vaccine, 2003, 21(7/8): 678-683.

[12] Simon J K, Levine M M, Weniger B G, *et al*. Mucosal immunization and needle-free injection devices[M]//Levine M M, Kaper J B, Rappuoli R, *et al*. New generation vaccines. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2010: 405-14.

[13] Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, *et al*. TLR-based immune adjuvants [J]. Vaccine, 2011, 29(17): 3341-3355.

[14] Koedel U, Angele B, Rupprecht T, *et al*. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis[J]. J Immunol, 2003, 170(1): 438-444.

[15] Albiger B, Sandgren A, Katsuragi H, *et al*. Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice[J]. Cell Microbiol, 2005, 7(11): 1603-1615.

(**收稿**:2013-12-31;**修回**:2014-02-01)

(编辑 吴培红)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中,引用英文文献的比例很高,但有不少作者将英、美人的姓名搞错,以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是:名-名-姓,"名"可以有1个、2个或3个,但"姓"只有1个。因此,从书籍或期刊中的姓名转录到文献时,要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的;"名"可以缩写,用第一个字母大写,不用缩写点。数据库在著录作者姓名时,已经调整为姓-名-名,可照录。

例如:John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部