技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)05-0711-04

肺炎链球菌溶菌酶作为肺炎链球菌多价核酸疫苗候选抗原的保护效能评价

张 巧,林科雄,马千里,王长征
(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

【摘 要】目的:肺炎链球菌溶菌酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase,LytA)作为肺炎链球菌多价核酸疫苗候选抗原的保护效能评价。方法:PCR 技术从肺炎链球菌 R6 标准株扩增 LytA 基因序列,构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1-LytA,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。与前期构建的肺炎链球菌表面蛋白 A(Pneumococcal surface protein A, PspA)N 端序列基因构建的质粒 pcDNA3.1-PspA'核酸疫苗联合或单独肌肉注射免疫 BABL/c 小鼠,检测各组小鼠血清特异性抗体 IgG 水平,并观察免疫小鼠肺炎链球菌 D39 腹腔攻击 21d 生存情况。结果:ELISA 检测发现 3 组(pcDNA3.1-LytA 组,pcDNA3.1-PspA'组,pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA'组)实验组小鼠特异性 IgG 水平较空质粒对照组显著升高($P<0.001$),pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA'组小鼠抗 LytA 特异性抗体 IgG 水平较 pcDNA3.1-LytA 组明显升高($P<0.01$),但是与 pcDNA3.1-PspA'组比较抗 PspA 特异性抗体 IgG 水平无显著差异($P>0.05$)。小鼠攻击试验提示 pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA'组小鼠中位生存时间较 pcDNA3.1-LytA 组及空质粒对照组显著延长($P<0.01$),但与 pcDNA3.1-PspA'组比较中位生存时间无显著差异($P>0.05$),生存曲线相似。结论:LytA 联合 PspA'的肺炎链球菌多价核酸疫苗免疫效能并不优于单一抗原 PspA'的肺炎链球菌核酸疫苗,LytA 作为肺炎链球菌多价核酸疫苗的优势候选抗原组分之一有待进一步研究。

【关键词】肺炎链球菌;肺炎链球菌溶菌酶;肺炎链球菌表面蛋白 A;多价疫苗
【中国图书分类法分类号】R2332;R378.14;R392.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-09

Evaluation of the protections of multivalent DNA vaccine of *Streptococcus pneumoniae* containing *LytA* gene

ZHANG Qiao, et al
(*Institut of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstrct】*Objective*: To evaluate the ability of the cooperative protection of the *Streptococcus pneumoniae* multivalent DNA vaccine containing *lytA* gene (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, LytA) and *pspA*' gene (N fragment of pneumococcal surface protein A, PspA) against intraperitoneal *Streptococcus pneumoniae* D39 infection. *Methods* The genomic DNA of the standard *Streptococcus pneumoniae* strain D39 was isolated. *LytA* gene fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (+), which was transfected into BHK-21 cells using Lipofectamine ™2000, and then the expression of LytA protein was detected with Western-blot. Furthermore, three formats of recombinant plasmid DNA vaccines (pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA', pcDNA3.1-PspA', pcDNA3.1-LytA) were used to inject intramuscularly BALB/c mice, with pcDNA3.1 (+) plasmid and PBS as controls. The levels of antibodies against PspA' and LytA proteins were checked. Live times of intraperitoneal infection mice by *Streptococcus pneumoniae* D39 in BALB/c models were analysis. *Results*: The three DNA vaccines all producted high levels serum special IgG antibodies. The anti-LytA antibodies level elicited by the DNA vaccine pcDNA3.1-LytA + pcDNA3.1-PspA' was higher than the DNA vaccine pcDNA3.1-LytA ($P<0.01$), but the anti-PspA' antibodies level elicited by the DNA vaccine pcDNA3.1-LytA + pcDNA3.1-PspA' had no significant statistics deviation ($P>0.05$). The result of the effect on intraperitoneal infection by Streptococcus pneumoniae D39 in BALB/c mice models showed the median live times in pcDNA3.1-LytA + pcDNA3.1-PspA' group was longer than pcDNA3.1-LytA group and the control groups ($P<0.01$), but no significant statistics deviation was found between pcDNA3.1-LytA + pcDNA3.1-PspA' group with pcDNA3.1-PspA' group ($P>0.05$). *Conclusion*: The multivalent DNA vaccine of *Streptococcus pneumoniae* containing *LytA* gene and *pspA* gene had no the higher performance protection than the DNA vaccine only containing *pspA* gene against *Streptococcus pneumoniae*. It is should be further evaluated that LytA gene is concluded as the one of advantages candidate antigens of the *Streptococcus pneumoniae* multivalent DNA vaccine.

【Key words】*Streptococcus pneumoniae*; LytA; PspA; Multivalent vaccine

作者介绍:张 巧(1977-),女,主治医师,在读博士研究生,研究方向:细菌感染及疫苗研究。
通讯作者:王长征,男,教授,E-mail:czwang@neteaso.com。

肺炎链球菌的各种毒力蛋白在肺炎链球菌致病的不同阶段发挥不同的毒力作用,但目前为止没有一种毒力蛋白被认为能激发覆盖所有致病菌株定殖、粘附、侵袭全过程的免疫保护作用[1],而近年的研究发现联合应用多种毒力蛋白的多价疫苗具有协同的保护作用,能有效减少肺炎链球菌的免疫逃逸[2,3]。肺炎链球菌自溶酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase,LytA)是肺炎链球菌疫苗的候选抗原分子之一,位于肺炎链球菌细胞壁,与脂磷壁酸的胆碱分子相连,其编码基因序列保守,其毒性作用是间接通过肺炎链球菌溶血素的释放而实现的[4]。本研究应用通过基因重组技术构建的 LytA 和肺炎链球菌表面蛋白 A(Streptococcus pneumoniae surface proteins A,PspA)的肺炎链球菌核酸疫苗,比较 LytA 单独或联合 PspA 的单价及多价核酸疫苗免疫小鼠激发机体免疫反应及防御肺炎链球菌侵入性感染的保护效能差异,以期评价 LytA 作为肺炎链球菌多价核酸疫苗候选抗原组分的可能,旨在为肺炎链球菌多价核酸疫苗的优势抗原组合成分的选择提供实验室研究基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、细胞株及培养条件

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 工具酶、试剂、抗体

DNA 限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、T4DNA 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 TM2000 购自 Invetrogen 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 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,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

PspA'重组真核表达质粒由课题组人员前期构建[5]。LytA 重组真核表达质粒的构建:以 Genbank 中提供的 LytA 基因序列设计引物:

上游:5'- GAGGGTACCATGGAAATTAATGTGAG-3';

下游:5'- GCTCTAGATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTTTACTGTAATCAAGCCATC-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 LytA 开放阅读框片段,反应条件如下:94℃预变性 2 min;(94℃变性 30 s,53℃复性 30 s,72℃延伸 1 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 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,传代培养约 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。Western-blot 检测 LytA 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 LytA 蛋白在真核细胞中的表达。

1.6 免疫动物

大量抽提质粒 pcDNA3.1(+)及重组质粒 pcDNA3.1-PspA'、pcDNA3.1-LytA,稀释至 1 g/L 浓度,-20℃保存备用。6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 60 只,每组 15 只,分为空白对照 pcDNA3.1(+)组、实验组(pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA'组,pcDNA3.1-PspA'组,pcDNA3.1-LytA 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(10 μmol/L)预处理后,第 0 d 免疫小鼠,每只小鼠两侧股四头肌接种核酸疫苗,pcDNA3.1(+)组、pcDNA3.1-PspA'组,pcDNA3.1-LytA 组小鼠两侧股四头肌各注射质粒 25 μl,总量 50 μl,pcDNA3.1-LytA +pcDNA3.1-PspA'组小鼠注射两侧股四头肌(pcDNA3.1- LytA 和 pcDNA3.1-PspA' 重组质粒各 50 μl),第 28 d 同法加强免疫 1 次。

1.7 ELISA 检测小鼠血清特异性抗体 IgG 水平

末次免疫后第 28 d 于 2 组小鼠眶静脉采血制备血清,ELISA 检测血清中 PspA'、LytA 特异性抗体 IgG 水平,我室前期制备 PspA'、LytA 蛋白抗原包板,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 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 OD(492)值。

1.8 肺炎链球菌 D39 腹腔攻击免疫小鼠 21d 生存时间观察

按上述方法免疫小鼠,设阴性对照组:PBS 组和空白质粒 pcDNA3.1(+)组,实验组:pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA'组,pcDNA3.1-PspA'组,pcDNA3.1-LytA 组,各 15 只,PBS 组小鼠注射 100 μl PBS 对照,末次免疫 28 d 后,按照文献确立的小鼠腹腔攻击模型[6],培养至对数生长期肺炎链球菌 D39 6 μl(10^4 菌落形成单位 CFU)腹腔注射 5 组免疫小鼠,观察 21 d 生存情况。

1.9 统计学分析

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[7]，组间分析用 Log—rank 检验；组间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 重组真核表达载体鉴定

pcDNA3.1-PspA' 由本课题组人员前期构建成功。PCR 扩增出 975bp 正确大小 LytA 片段，克隆入真核载体 pcDNA3.1(+)，重组质粒 pcDNA3.1-LytA 测序提示 LytA 序列与 Genbank 报道序列完全一致。

2.2 重组质粒在 BHK-21 细胞的表达

重组真核载体在哺乳动物细胞的成功表达：重组载体转染 BHK-21 细胞总蛋白提取物 Western-blot 分析可见 36 kD 大小蛋白带，与 LytA 分子量符合（图 1）。

2.3 免疫小鼠血清特异性抗体水平 ELISA 检测

ELISA 检测免疫小鼠第 28d 血清抗 LytA、PspA' 的特异性 IgG 抗体水平，3 组实验组小鼠特异性 IgG 水平较空质粒对照组显著升高（$P<0.001$），pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA' 组小鼠抗 LytA 特异性 IgG 抗体水平较 pcDNA3.1-LytA 组明显升高，存在显著差异（$P<0.01$）；与 pcDNA3.1-PspA 组比较，抗 PspA 特异性 IgG 抗体水平有所提高，但统计学无显著差异（$P>0.05$）（表 1）。

2.4 肺炎链球菌 D39 腹腔攻击免疫小鼠 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，pcDNA3.1-LytA+pcDNA3.1-PspA' 组小鼠中位生存时间达 T=10 d，明显长于对照组（PBS 组 T=0 d，pcDNA3.1(+)组 T=1 d，$P<0.01$），并优于 pcDNA3.1-LytA 组（T=5，$P<0.05$），但和 pcDNA3.1-PspA 组（T=9，$P>0.05$）比较中位生存时间无明显差异（图 2A），生存曲线相似（图 2B）。

表 1 血清特异性 IgG 水平检测(ODA492)

分组	LytA	PspA'
pcDNA3.1(+)空质粒组	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.02
pcDNA3.1-PspA'+pcDNA3.1-LytA 联合免疫组	0.43 ± 0.04[b]	0.52 ± 0.05[a]
pcDNA3.1-PspA'组	-	0.49 ± 0.06
pcDNA3.1-LytA 组	0.25 ± 0.08	-

a：与 pcDNA3.1-PspA' 组比较，$P>0.05$；b：与 pcDNA3.1-LytA 组比较，$P<0.01$

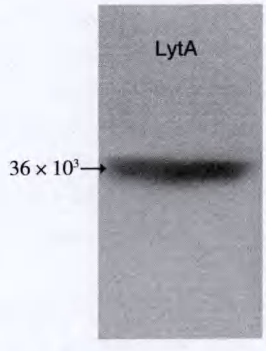


图 1 重组质粒 pcDNA3.1-LytA 转染 BHK—21 细胞后 LytA 的表达

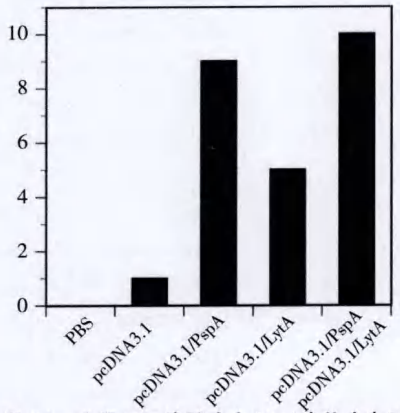


图 2A 小鼠 S.P 腹腔攻击 21 d 中位生存时间(d)

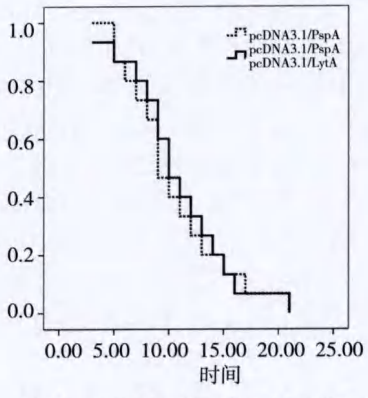


图 2B 小鼠 S.P 腹腔攻击 21 d 生存曲线

3 讨 论

肺炎链球菌是目前引起社区获得性肺炎、中耳炎、菌血症及儿童脑膜炎的主要致病菌，在动物实验中发现，肺炎链球菌表面荚膜并不阻挡细胞壁表面蛋白的表达及毒力作用，其相应抗体也表现出了积极的免疫保护作用[8]，针对这些毒力蛋白及其编码基因的新一代核酸疫苗不仅能提供对肺炎链球菌所有血清型的保护作用，而且它所诱导的免疫应答是 T 细胞非依赖性的，具有免疫记忆，能克服传统的肺炎链球菌荚膜多糖疫苗和多糖—蛋白疫苗的诸多缺点[9,10]，有望更有效的应用于防御肺炎链球菌感染与耐药菌的传播，缓解抗生素耐药压力。目前，国内外疫苗研发筛选的候选抗原主要集中在肺炎链球菌表面的毒力蛋白[1,11]，如肺炎链球菌表面蛋白 A（Pneumococcal surface protein A，PspA），肺炎链球菌黏附素 A（Pneumococcal surface adhesion A，PsaA），胆碱结合蛋白 A（Choline binding protein A，CbpA），溶菌素（Pneumolysin，Ply）等，并且国内外研究表明多种候选抗原联合应用具有协同作用，较单一使用其中的任何一种候选抗原所激发的免疫反应和保护效能更强，因此多价核酸疫苗成为目前新型肺炎链球菌疫苗的发展方向[2,3]。

LytA 是一种分子量为 36 kD 的 N—乙酰胞壁酸—L—丙氨酸酰氨酶，正常情况下与细菌细胞壁上的糖脂相连时无活性，当肺炎链球菌营养不足或抗生素处理时，脂磷壁酸与

LytA 间的关系被破坏，与之分离后作用于细胞壁的 N－乙酰胞壁酸和丙氨酸之间的共价键，水解细胞壁含胆碱的肽链间的共价结合为糖链和肽链，导致细胞溶解，促使毒性物质如细胞降解物质、溶血素等从细胞中释放，从而对宿主造成损害[4,12]，研究发现由基因变异导致 LytA 缺失的菌株致病力降低[13]，本课题组前期试验亦证实 LytA 广泛存在于肺炎链球菌中，编码序列保守。因此 LytA 被考虑为肺炎链球菌新型疫苗的候选抗原分子之一。PspA 蛋白是肺炎链球菌细菌表面的一种胆碱结合蛋白，它可以与乳铁蛋白结合抑制补体活化，降低补体 C3b 在肺炎链球菌表面的沉淀，减少补体介导的调理吞噬作用，其毒力作用覆盖肺炎链球菌的定殖及侵袭过程[14]，其强免疫原性及作为多价疫苗的组成成分激发其它毒力蛋白更强免疫效能及协同保护作用已被本研究小组成员前期研究及国外文献报道[2,3,5,15]，是目前最有希望成为肺炎链球菌新型疫苗成分的候选抗原。

本研究应用 LytA 核酸疫苗与 PspA 的核酸疫苗单独或联合免疫小鼠，评价 LytA 联合 PspA 的核酸疫苗是否具有协同的保护作用，激发机体更强免疫效能。结果发现，LytA 和 PspA 的核酸疫苗单独免疫小鼠均成功激发了 LytA 和 PspA 特异性的保护抗体，但两者的联合应用并没有显著增强 PspA 核酸疫苗抗 PspA 的特异性抗体效价，也没有明显的提高 PspA 的核酸疫苗免疫小鼠受致死性腹腔攻击后的中位生存时间；而 PspA 的核酸疫苗不仅激发了高效价的 PspA 特异性保护抗体，联合 LytA 的核酸疫苗免疫小鼠后激发了比单一使用 LytA 的核酸疫苗更高的 LytA 特异性抗体效价。我们的结果提示：LytA 作为单一应用的肺炎链球菌新型疫苗的候选抗原具有一定的针对肺炎链球菌侵入性感染的免疫保护效能，但并不具有协同增强多价核酸疫苗的免疫保护效能，故 LytA 是否适合作为肺炎链球菌新型多价疫苗的优势抗原组分候选者尚有待进一步评价。我们的研究也进一步提示联合应用多种肺炎链球菌毒力蛋白以期协同增强多价疫苗的免疫效能的疫苗优化策略并非适用于所有的肺炎链球菌毒力蛋白，筛选多价疫苗的优势抗原组合具有重要意义。

参 考 文 献

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

[2] Ogunniyi A D, Folland R L, Briles D E, et al. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with Streptococcus pneumoniae[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 3028-3033.

[3] Quin L R, Moore Q C, McDaniel L S. Pneumolysin, PspA, and PspC contribute to pneumococcal evasion of early innate immune responses during bacteremia in mice [J]. Infect Immun, 2007, 75(4): 2067-2070.

[4] Martner A, Dahlgren C, Paton J C, et al. Pneumolysin released during Streptococcus pneumoniae autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils[J]. Infect Immun, 2008, 76(9): 4079-4087.

[5] 马千里，张 巧，姚 伟，等. 肺炎链球菌毒力蛋白 DNA 疫苗优势抗原组合筛选及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2009，31(10)：922-925.

[6] 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.

[7] Hu X J, Lagakos S W. Nonparametric estimation of the mean function of a stochastic process with missing observations[J]. Lifetime Data Anal, 2007, 13(1): 51-73.

[8] Watson D A, Musher D M, Verhoef J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1995, 14(6): 479-490.

[9] 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.

[10] Butler J C, Shapiro E D, Carlone G M. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions[J]. Am J Med, 1999, 107(1A): 69s-76s.

[11] Mahdi L K, Ogunniyi A D, LeMessurier K S.et al. Pneumococcal virulence gene expression and host cytokine profiles during pathogenesis of invasive disease [J]. Infect Immun, 2008, 76(2): 646-657.

[12] Romero P, Lopez R, Garcia E. Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in Streptococcus pneumoniae[J]. J Biol Chem, 2007, 282(24): 17729-17737.

[13] Hirst R A, Gosai B, Rutman A, et al. Streptococcus pneumoniae deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis [J]. J Infect Dis, 2008, 197(5): 744-751.

[14] 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.

[15] McDaniel L S, Sheffield J S, Delucchi P, et al. PspA, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type[J]. Infect Immun, 1991, 59(1): 222-228.

（责任编辑：冉明会）