DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.003
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)22-1991-03

论著

ISCOMs作为粘膜免疫佐剂在避孕疫苗构建中的作用研究

李玉清,梁志清,何 畏,史常旭,李玉艳 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 探索有效提高避孕疫苗生殖道粘膜免疫的方法。方法 将合成纯化的35多肽与皂甙QuilA、脂类混合物(等体积比的磷脂和胆固醇)以1∶4∶1比例混合,经充分透析后得到35肽-ISCOMs;将35肽-ISCOMs和35肽-弗氏佐剂混悬物分别免疫纯系BALB/c雌性小鼠,并比较免疫后小鼠生殖道内特异性IgA的动态变化以及小鼠生育力的变化。结果 制备成功的35肽-ISCOMs在电镜下可见明显的、较规则的蜂巢样结构;35肽-ISCOMs免疫组IgA抗体在第10周时达最高值(1∶600),约持续4周左右;而35肽-弗氏佐剂组IgA抗体在第14周时达最高值(1∶300),约持续1周左右;35肽-ISCOMs免疫后小鼠的受孕率(14.3%)显著低于35肽-弗氏佐剂免疫组(60.0%)。结论 ISCOMs可以显著提高抗原在生殖道内的粘膜免疫效应,增强抗生育作用,是一种极富潜力的粘膜免疫佐剂。

关键词:避孕疫苗;ISCOMS;粘膜免疫;佐剂
中图法分类号:R392.12;R392.7;R979.5 文献标识码:A

Roles of immune-stimulating complexes as the mucous adjuvant in construction of an immunocontraceptive vaccine

LI Yu-qing, LIANG Zhi-qing, HE Wei, SHI Chang-xu, LI Yu-yan (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the methods for the improvement of the effect of genital mucosal immunologic reaction of the contraceptive vaccine. **Methods** A chimeric peptide with 35 amino acid residues and two specific epitopes was obtained by chemical synthesis. After purification, the peptide was mixed with Quil A and lipid mixtures at the ratio of 1∶4∶1 to form immune-stimulating complexes (ISCOMs) after sufficient dialysis. C57B1/6 mice were divided two groups A and B, in which mice were immunized respectively by peptide-ISCOMs and peptide-Freund's adjuvant. **Results** Regular and honeycomb-like structures of peptide-ISCOMs were found by electron microscopy. The highest titer of specific IgA in the vaginal lotion lasted for about 4 weeks in group A at 1∶600, but just 1 week in group B at 1∶300. The rate of pregnancy in group A (14.3%) was significantly lower than that in group B (60.0%). **Conclusion** ISCOMs could significantly improve the effect of genital mucosal immunologic reaction.

Key words: immune-stimulating complex; mucosal adjuvant; contraceptive vaccine

随着免疫学机制的进一步阐明和生物学技术的不断进步,疫苗的研究已逐渐从以往的盲目筛选转向靶向和表位抗原分子设计及人工重组/合成抗原的方向发展,使疫苗的特异性、安全性均得到明显提高。但新型疫苗往往免疫原性差,不足以刺激机体产生有效的免疫应答,需要研究有效提高抗原性的方法。鉴于受精和早期胚胎发育均是在输卵管粘膜管腔和子宫粘膜管腔中实现的,故研制安全有效的引发粘膜免疫反应的避孕疫苗逐渐成为生殖与避孕领域的主要课题之一。本研究选择了免疫刺激复合物(immunostimulating complexes, ISCOMs)作为新型佐剂,对其激发的粘膜免疫作用做深入探讨。

基金项目:国家自然科学基金资助(30000083)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000083)
作者简介:李玉清(1964-),男,四川省邛崃市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事生殖医学方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754409
收稿日期:2003-08-22;修回日期:2004-03-24

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 多表位嵌合肽的设计与合成 参见文献[1],在多肽合成仪上合成含35个氨基酸的嵌合肽,经HPLC纯化后备用。从多肽的氨基端起,该嵌合肽分别牛核糖核酸酶非限制性Th细胞表位序列、小鼠精子抗原SP17和Cyritestin的免疫优势B细胞表位。

1.1.2 主要试剂及实验动物 磷脂酰胆碱、胆固醇、Mega10购置美国Sigma公司,Quil A由丹麦Superfos公司Erik Lindblad

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

博士馈赠；实验动物 BALB/c 小鼠购自中科院上海实验动物中心(雌性 40 只、雄性 20 只)，周龄 8～10 周。

1.2 方法

1.2.1 配液 取磷脂酰胆碱和胆固醇各 10 mg 加入 1 ml 20%的 Mega10 中，完全溶解配制脂类混合物贮备液；取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 和 30 mg SDS 溶于 50 ml 95% 乙醇中，加入 85%磷酸 100 ml，最后加蒸馏水定容于 1 000 ml，使用前过滤，配制 Bradfords 溶液。

1.2.2 ISCOMs 的制备 称取 P3 多肽和 Quil A，与脂类混合物贮备液一起，肽∶Quil A∶脂类按 4∶2∶1 混合，室温作用 2 h 后转至透析袋；在 0.01 mol/L PBS(pH 7.2～7.4)中室温透析 2 h，4 ℃透析 48 h；每 6 小时更换一次透析液；收集透析袋内液体，小心加入预先制备好的 40%、10%蔗糖梯度离心管的顶层，20 ℃，30 000 r/min 离心 18 h；在两层蔗糖间的界面吸出 ISCOMs，并置于透析袋，在 0.01 mol/L PBS(pH 7.2～7.4)中 4 5 ℃下，透析 18 h，每 6 h 一次透析液，以除去蔗糖；取少量透析液行负染，于透射电子显微镜下观察，余经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，－20 ℃保存。

1.2.3 嵌入率检测 PBS(0.01 mol/L，pH 7.2～7.4)配制 BSA 储备液(1 mg/ml)，然后稀释成不同浓度的标准液，每管 50 μl；向标准液及待测样品(50 μl)内分别加入 1 ml Bradfords 溶液，室温孵育 5 min；在紫外分光光度仪上测定 495 nm 下，标准品及样品的吸光度值(A)；根据标准品及其相应的 A_{495} 绘制标准曲线，并由此确定多肽-ISCOMs 中的多肽含量。

1.2.4 电镜样品制备 将样品滴于铜网上沉淀 10 min；取出吸干铜网后，用 2%磷钨酸染色 10 min；滤纸吸干铜网，电镜下观察。

1.2.5 ELISA 参见文献[1]。

1.3 动物免疫

1.3.1 动物分组 雌性小鼠数字表随机法分组：实验组 A 以多肽-ISCOMs 为免疫原、实验组 B 以多肽-弗氏佐剂为免疫原，每组各 15 只，对照组 10 只未予任何处理。

1.3.2 免疫小鼠 取实验组小鼠，于双后肢足垫处皮下注射免疫原，每侧 30 μl，初次免疫后 2 周追加免疫，每 2 周 1 次，共 3 次。待全程免疫结束后 10 d 3 组小鼠同时行雌雄小鼠合笼喂养，观察雌鼠的受孕情况；免疫前及初次免疫后 2 周开始，每周取小鼠阴道冲洗液，用于抗体检测。

1.4 统计学方法

应用 SPSS10.0 统计软件行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 多肽-ISCOMs 的电镜观察和嵌入率的检测

2.1.1 多肽-ISCOMs 的结构 制备完成后的液体经负染后在电镜下观察，结果见到规则的蜂巢样、由多个亚单位构成的开放型结构(图 1)。

2.1.2 多肽嵌入率 经 Bradford 法测得多肽-ISCOM 复合物的 A_{495} 为 0.135 6，对应的多肽含量约 0.26 mg/ml。

2.2 多肽-ISCOMs 的免疫效应

运用 ELISA 检测免疫后小鼠的阴道冲洗液。结果表明：实验组 A 在免疫结束体内即可检测出特异性 IgA(1∶150)，且在第 10 周达最高(1∶600)，持续 4 周左右，第 20 周时降至 1∶400；而实验组 B 的 IgA 在第 14 周时达最高峰(1∶300)，持续 1 周左右。

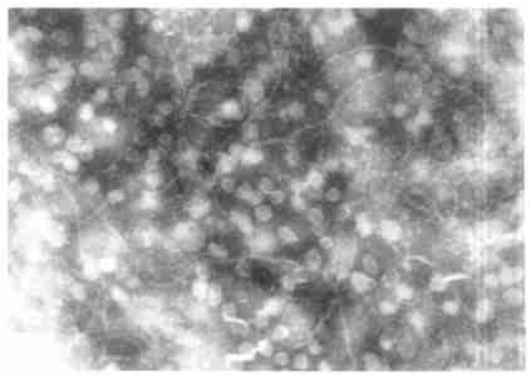


图 1 电镜下的多肽-ISCOMs (EM× 8 000)

Fig 1 Structure of peptide-ISCOMs by electron microscopy (EM× 8 000)

2.3 多肽-ISCOMs 的避孕效应

3 组资料组间有统计学差异(χ^2＝14.13，P＝0.01)在实验组 A 中免疫结束 10 d 时，共有 15 只雌鼠进入生育实验。结果除去死亡 1 只外，雌鼠的受孕率为 14.3%(2/14)，显著低于实验组 B 60.0%(9/15，χ^2＝6.428，P＝0.011)，和对照组小鼠 90.0%(9/10，χ^2＝10.593，P＝0.001)。

3 讨论

ISCOMs 年是一种直径 30～40 nm 的开放型笼状结构，每个分子由 12 个亚单位构成，通常一个 ISCOMs 可容纳 10～12 个蛋白分子[2]。这种颗粒型佐剂的大小较固定，结构独特，稳定性好，可同时递呈多个抗原分子；与传统疫苗相比，ISCOMs 具有许多优点，它不仅可使蛋白抗原诱导强效抗体和 MHC-II类限制性 T 细胞应答，还可携带蛋白抗原进入抗原加工的同源性途径，诱导 MHC-1 类限制性 CTL 应答[2～5]。此外，ISCOMs 还可刺激先天性免疫，口服、非肠道给药均有效[5～7]。ISCOMs 的免疫佐剂活性成分来自 Quil A，它具有表面活性，是微团形成的必要品。ISCOMs 中胆固醇∶磷脂∶Quil A 的典型组成比是 1∶1∶0.5，而抗原的量可调节，主要根据抗原的类型、大小而定。不同的 ISCOMs 制备时各组分比例可以变动。在 ISCOMs 的制备过程中，除脂类、皂甙比例适合外，抗原分子应当具有双亲性(抗原决定簇是亲水性的，锚定区域是疏水性的)，这样疏水段才能才能有效嵌入 ISCOMs，而且不需连接其它疏水残基，通过溶剂处理就能与脂-皂甙基质结合；非双亲性的抗原必须经过结构修饰，如：脂化、部分变性、共价耦联等，使其具备双亲性，才能制备 ISCOMs。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本研究对多价精子抗原表位嵌合肽-免疫刺激复合物的形成、生化特性和免疫效应进行了研究。首先以适当比例混合蛋白、脂类和 Quil A，应用透析法制备了多肽-ISCOMs 复合物，并在电镜下见到特殊形态的微粒样结构出现；然后测定了其中多肽的含量，约为 0.26 mg/ml；提示以调整后适当蛋白、脂类、皂甙比例可成功制备多肽-ISCOMs。以多肽-ISCOMs 免疫小鼠，结果与通常使用的弗氏佐剂相比，在小鼠体内迅速产生高效价、持久的特异性抗体，诱发出较高的避孕效率，且 3 个月后仍保持较好的避孕率；提示 ISCOMs 的粘膜佐剂效应显著高于传统的弗氏佐剂，在避孕疫苗研究领域极具开发前景。

尽管 ISCOMs 作为提高避孕效应的佐剂时显示出惊人的效力，它的研究中仍存在一些不可回避的问题。主要包括：①ISCOMs 的形成依赖胆固醇、皂甙和蛋白质疏水性残基间的相互作用，这种反应的化学基础尚不明确。因此 ISCOMs 各组分的比例应个体化，不能从一种蛋白质外推到另一种蛋白质[8]。②Quil A 是佐剂活性的重要因子，也是副作用的主要因素[9,10]；不同纯化产品及半纯品中 Quil A 的佐剂活性和安全性也不同。③ISCOMs 的体内递呈抗原的机制和定量还不十分清楚等。总之，靶抗原、靶载体和疫苗传递系统的设计和合理选择是避孕疫苗研制中的三大核心问题。一种具有使用价值的避孕疫苗必须是安全有效、可逆、价廉而易于使用的。目前国内外的研究者已进行了大量的工作，但离此要求还相距甚远，要获得适用于某种动物，或人类的抗原-载体-抗原传递系统还需做更深入的研究。

参考文献：

[1] 何 畏，梁志清，吴玉章，等. 一种精子蛋白嵌合肽实验研究[J]. 中华医学杂志，2002，82(7)：484－486.
[2] Morein B, Sundquit B, Hoglund S, *et al*. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses[J]. Nature, 1984, 308(1958)：457－460.
[3] Osterhaus A D, Rimmelzwaan G F. Induction of virus-specific immunity by ISCOMs[J]. Dev Biol Stand, 1998, 92：49－58.
[4] Mohamedi S A, Brewer J M, Alexander J, *et al*. Antibody responses, cytokin levels and protection of mice immunised with HSV-2 antigens formulated into NISV or ISCOM delivery systems[J]. Vaccine, 2000, 18(20)：2083－2094.
[5] Smith R E, Donachie A M, Mowat A M. Immune stimulating complexes as mucosal vaccines[J]. Immunol Cell Biol, 1998, 76(3)：263－269.
[6] Morein F, Bengtsson K L. Functional aspects of Iscoms[J]. Immunol Cell Biol, 1998, 76(4)：295－299.
[7] Villacres M C, Behboudi S, Nikkila T, *et al*. Internalization of Iscom-borne antigens and presentation under MHC class Ⅰ or class Ⅱ restriction [J]. Cell Immunol, 1998, 185(1)：30－38.
[8] Johansson M, Lovgren-Bengtsson K. Iscoms with different quillaja saponin components differ in their immunomodulating activities[J]. Vaccine, 1999, 17(22)：2894－2900.
[9] Behboudi S, Morein B, Villacres Eriksson M, *et al*. *In vivo* and *in vitro* induction of IL-6 by Quillaja saponaria molina triterpenoid formulations[J]. Cytokine, 1997, 9(9)：682－687.
[10] 何 畏，梁志清，吴玉章，等. 多价精子抗原表位肽的设计与免疫效应研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(7)：796－798.

（编辑 刘洪娥）

文章编号：1000-5404(2004)22-1993-01

个案与短篇

普林格尔理疗法治疗产后尿潴留的效果

Effect of PLGE physiotherapy in postpartum urine retention

袁吉钊，江 露，常 青 （第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038）

尿潴留和排尿困难是产后常见的并发症之一。产后尿潴留是指产后因暂时性排尿功能障碍使部分或全部的尿液不能从膀胱排出[1]。在以往的临床护理过程中，多采用针灸、热敷膀胱区或听流水声以诱导排尿，效果欠佳。我科从 2003 年 5－7 月采用普林格尔理疗法治疗产后尿潴留 52 例，效果明显，现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料

筛选我科 2003 年 5－7 月产后 4～6 h 不能排尿或剖宫产术后拔除尿管后膀胱充盈而不能自主排尿者 52 例，其中经阴道分娩行会阴侧切术患者 44 例，剖宫产术患者 8 例。

1.2 方法

采用普林格尔产后康复仪，嘱产妇取平卧位，将普林格尔

（下转 1997 页）

作者简介：袁吉钊(1977－)，女，四川省宜宾市人，护师，主要从事妇科患者术后康复护理方面的研究。电话：(023)68754411

收稿日期：2004-03-22；修回日期：2004-08-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net