

肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)及其荚膜多糖交联物的免疫原性和交叉保护作用*

黄金钟 林海英 蔡倩影 郭养浩 孟 春**

(福州大学药物生物技术研究所, 福州大学生物科学与工程学院, 福州 350002)

摘要 分别采用肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)和 PspA- 荚膜多糖交联物免疫小鼠, 研究 PspA 及其交联物的免疫特性. 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗原的免疫原性, 用动物保护试验检验抗原对肺炎球菌 6B, 5, 1, 23F, 19F 型的交叉免疫效果. 实验结果表明: 肺炎球菌表面蛋白 A 及其多糖交联物表现出一定的交叉保护作用, 具有较好的应用前景.

关键词 肺炎球菌表面蛋白 A, 交联物, 免疫原性, 交叉保护作用

学科分类号 R392.5

肺炎链球菌表面的多种膜蛋白是重要的毒力因子, 可作为一种重要的抗原物质^[1]. 由于外膜蛋白具有保守的组成结构, 因此外膜蛋白可望诱发交叉免疫作用. 外膜蛋白用于合成新型疫苗, 既作为载体蛋白, 又具有抗原的功能^[2]. 肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)^[3, 4]广泛存在于 90 种肺炎链球菌亚型中, 不同血清型肺炎链球菌的 PspA 分子质量不同, 分子质量为 60~100 ku. PspA 蛋白的 α 螺旋端是一个重要的抗原决定区域. 单克隆抗体识别的位点在氨基端, 该区具有高度可变性. 但是, 在不同的血清型中, PspA 的 C 端疏水区具有保守结构. PspA 的这些特征类似于 A 群链球菌的表面蛋白——M 蛋白. M 蛋白被认为是参与细菌粘附作用的表面蛋白, 它介导肺炎链球菌与宿主受体间的连接.

目前市场上的 23 价肺炎球菌荚膜多糖疫苗的抗原为胸腺非依赖型, 对婴幼儿及老年人的免疫原性较弱. 最近也有蛋白多糖结合疫苗的研究, 但是都不采用自身蛋白, 而采用诸如白喉毒素等外源蛋白. 本研究采用肺炎球菌表面蛋白 A 和荚膜多糖制备交联物, 分别研究肺炎球菌表面蛋白 A 及肺炎球菌表面蛋白 A 多糖交联物在小鼠体内的免疫特性.

1 材料和方法

1.1 菌种和试剂

菌种: 6B, 5, 1, 23F, 19F 型肺炎球菌均由中国生物制品研究所提供.

试剂: 分子质量标准蛋白购自 Sigma 公司; HRP 标记二抗、TMB 购自华美生物工程公司; 5# 肺炎球菌表面蛋白 A(PsaA)及蛋白多糖交联物由实验室自制, 蛋白多糖交联物由 5# 肺炎球菌表面蛋白 A 和 5# 肺炎球菌荚膜多糖交联得到^[5]. 氢氧化铝胶体由上海生物制品检定所提供.

1.2 小鼠免疫

按实验要求, 配置一定浓度的抗原, 对 18~22 g 的雌性昆明小鼠(购自福建医科大学)进行腹腔注射免疫, 每只注射 0.5 ml (含 25 μ g 抗原). 氢氧化铝佐剂免疫老鼠做对比. 初次免疫两周后强化免疫一次, 强化免疫两周后眼眶采血分离血清用于 ELISA 检测.

1.3 ELISA 检测

相应抗原包板, 每个样品梯度稀释, 将吸光度 A 值与稀释度的对数值回归直线, 根据样品的 A 值计算该样品的滴度. 采用 SPSS 13.0 统计软件进行显著性分析^[6].

1.4 动物主动保护实验

二次免疫过的老鼠腹腔注射 6B 菌, 密切观察 14 天, 详细记录老鼠的死亡状况. 6B 菌的剂量 1 000 cfu.

* 福州大学校科技发展基金(2005-XQ-10).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 0591-87893046, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

收稿日期: 2007-09-06, 接受日期: 2007-11-16

1.5 动物被动保护实验

免疫的老鼠眼眶取血分离血清备用。另取相同只数空白老鼠腹腔注射这些血清，24 h 后腹腔注射 6B，密切观察 14 天，详细记录老鼠的死亡状况。6B 菌的剂量 1 000 cfu^[7]。

2 结 果

2.1 肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)及其荚膜多糖交联物的免疫原性测定

分别以多糖、蛋白质及其交联物两次免疫小鼠，14 天后测定小鼠血清的抗体效价，比较这 3 种抗原引起的总抗体水平。

由图 1 可知，这 3 种抗原都有较好的免疫原性，特异性抗体的效价都高于 3 000。其中交联物的总抗体水平最高，其次为蛋白质，多糖最低。交联物的抗体水平高于多糖，这可能是由于以蛋白质为载体增强了多糖的免疫原性。另外推测蛋白质分子较小，使得蛋白质的免疫原性较小，所以相应的表现为总体的抗体水平较低。3 种抗原的滴度都是减去空白组计算所得，相对于空白组其免疫效果是显著的。

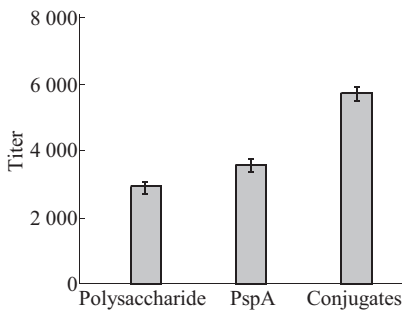


Fig. 1 Mean IgG antibody titers elicited by different antigen

不同类型的抗原引起的抗体种类不同，本工作进一步比较这两种抗原在小鼠体内诱导的 IgM 滴度水平上的差异。

实验结果如表 1 所示，多糖的 IgM 平均滴度为 3 466，交联物为 3 586。多糖和交联物的 IgM 平均滴度相差不多。多糖和交联物在这一指标上，效果相近。

Table 1 Mean IgM antibody titers elicited by different antigen

Antigen	Polysaccharide	Conjugates
IgM antibody titers	1 : 3 466	1 : 3 586

两种抗原引起的 IgG2a 的结果表明(表 2)，蛋白质的 IgG2a 平均滴度为 826，而交联物的则达到 1 480。以 IgG2a 滴度反映出交联物对 Th1 细胞具有较显著的活化作用，有利于增强以 IgG2a 抗体为特征的免疫反应。而蛋白质对以 IgG2a 抗体为特征的体液免疫反应的增强作用较弱。

Table 2 Mean IgG2a antibody titers elicited by different antigen

Antigen	Protein	Conjugates
Ig2a antibody titers	1 : 826	1 : 1 480

2.2 保护实验

以注射等量氢氧化铝佐剂的小鼠为空白对照，观察免疫多糖、蛋白质及其交联物的小鼠在腹腔注射肺炎球菌 6B 后的存活情况。采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行显著性分析。

实验结果如图 2 所示。交联物的平均存活时间最长，达到 11 天。而蛋白质的为 6 天。空白的平均存活时间是 3 天。这一结果表明，交联物引起的保护作用最强，蛋白质有一定的保护作用，但效果不及交联物。进行显著性分析，结果多糖组、蛋白质组及蛋白多糖交联物组相对于空白组 *P* 值小于 0.05，即这 3 组平均存活时间的结果显著。多糖组、蛋白质组及蛋白多糖交联物组的免疫效果明显优于空白组。

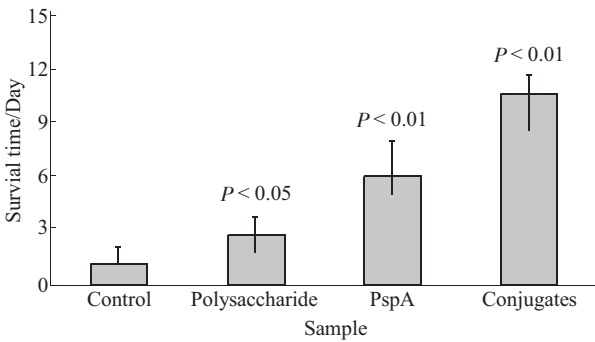


Fig. 2 Survival times for mice of protection after i.p.challenge

P-value: The statistical difference between the sample and the control. There are 12 mice for every group.

免疫多糖、蛋白质及其交联物的老鼠眼眶取血分离抗血清。另取相同只数正常老鼠腹腔注射这些抗血清，注射氢氧化铝小鼠的抗血清免疫对照组小鼠，密切观察 14 天，详细记录老鼠的死亡状况。数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行显著性分析。

实验结果表明(图 3)。被动保护实验与主动保

护实验的结果大致相同. 交联物的平均存活时间最长, 达到 12 天. 而蛋白质的为 7 天, 多糖的为 2 天. 空白的平均存活时间是 1 天. 这一结果表明, 交联物引起的保护作用最强, 蛋白质有一定的保护作用, 但效果不及交联物. 而多糖引起的保护作用很弱. 显著性分析表明, 多糖组、蛋白质组及蛋白多糖交联物组相对于空白组 P 值小于 0.05, 即这 3 组平均存活时间的结果显著. 多糖组、蛋白质组及蛋白多糖交联物组的免疫效果明显优于空白组.

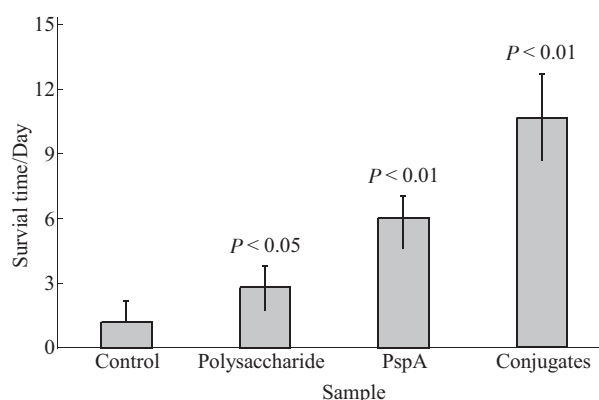


Fig. 3 Survival times for mice of passive protection after i.p. challenge

P -value: The statistical difference between the sample and the control. There are 12 mice for every group.

进行被动保护实验是为了验证保护实验是由抗体介导的, 而被动保护实验与主动保护实验的结果大致相同. 这在一定程度上说明, 保护实验是由抗体介导的.

肺炎球菌的亚型众多, 其中 6B, 5, 1, 23F, 19F 这 5 种亚型是临床最常见的致病菌. 本实验以蛋白多糖交联物在小鼠体内诱生抗体, 检测其与其他 5 种最常见血清型肺炎球菌的交叉反应, 实验结果如图 4 所示.

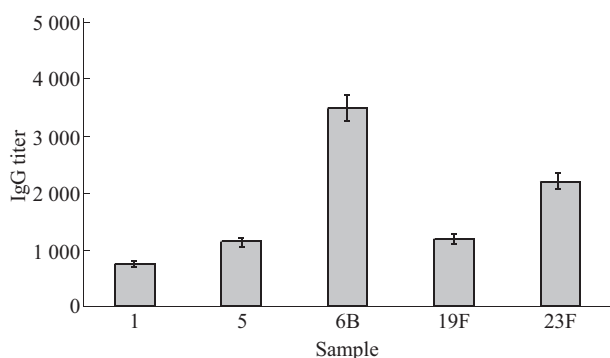


Fig. 4 Mean IgG antibody elicited by conjugates titers to different serotype strains

由图 4 可知, 肺炎球菌表面蛋白 A 对 5 种血清型的菌株均有不同程度的交叉反应, 其中与 6B 菌株的反应滴度最高, 其次为 23F, 其他 3 个菌型的反应相对较弱.

实验结果表明, 单独使用外膜蛋白制备疫苗, 交叉保护作用有一定的限制. 但采用自身膜蛋白交联荚膜多糖制备疫苗, 在免疫保护性和免疫记忆性方面, 将明显优于目前的多糖疫苗和多糖交联白喉毒素结合疫苗.

3 讨 论

免疫原性测定及保护实验的结果表明, 蛋白多糖交联物的免疫效果最好, PspA 也有一定的免疫效果. 蛋白多糖交联物不仅可以引起 IgG 滴度抗体水平的提高, 而且还增加了 IgG2a 滴度水平, 说明交联物有利于增强以 IgG2a 抗体为特征的体液免疫反应.

蛋白多糖交联物对 6B 菌引起的反应最大, 而 6B 菌又是较流行的菌型, 说明蛋白多糖交联物有良好的应用价值.

蛋白多糖交联物的血清在不同菌型中都引起了反应, 说明蛋白多糖交联物可引起一定程度的交叉反应, 蛋白多糖交联物优于多糖疫苗. 蛋白多糖交联物是一种有应用前景的疫苗. 当然蛋白多糖交联物的免疫效果还有待于在其他血清型的菌株中验证.

参 考 文 献

- David E B, Susan H, Brooks-Walter A, *et al.* The potential to use PspA and other *pneumococcal* proteins to elicit protection against *pneumococcal* infection. *Vaccine*, 2000, **18**(16): 1707~1711
- Bogaert D, Hermans P W, Adrian P V, *et al.* *Pneumococcal* vaccines: an update on current strategies. *Vaccine*, 2004, **22**(17-18): 2209~2220
- Coats M T, Benjamin W H, Hollingshead S K, *et al.* Antibodies to the *pneumococcal* surface protein A, PspA, can be produced in splenectomized mice and can protect splenectomized mice from infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*, 2005, **23**(33): 4257~4262
- Mark J J. Unveiling molecular mechanisms of *pneumococcal* surface protein A interactions with antibodies and lactoferrin. *Clinica Chimica Acta*, 2006, **367**(1-2): 1~10
- 王国祥, 聂峰光. 琼脂糖凝胶偶联 DEAE 基团反应的影响因素. *化学反应工程与工艺*, 2002, **18**(1): 80~85.
Wang G X, Nie F G. *Chemical Reaction Engineering and Technology*, 2002, **18**(1): 80~85
- 吴雄文, 梁智辉. *实用免疫学实验技术*. 湖北: 湖北科学出版社,

2002, 49~50

Wu X W, Liang Zh H. Experimental Technique of Applied Immunology. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2002. 49~50

7 Cao J, Chen D, Xu W, *et al.* Enhanced protection against *pneumococcal* infection elicited by immunization with the combination of PspA, PspC, and ClpP. *Vaccine*, 2007, **25**(27): 4996~5005

Immunogenicity and Cross-protection of *Pneumococcal* Surface Protein A and Its Conjugates With Polysaccharide*

HUANG Jin-Zhong, LIN Hai-Ying, CAI Qian-Ying, GUO Yang-Hao, MENG Chun**

(Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, College of Biological Science and Biotechnology, Fuzhou 350002, China)

Abstract The immunogenicity and cross-protection of *Pneumococcal* surface protein A (PspA) and its conjugates with polysaccharide were researched in mice injected with PspA and its conjugates respectively. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to detect the immunogenicity of the antigen. Passive and active protection experiments against intraperitoneal challenge with *Pneumococcal pneumonia* were carried out to validate the protection of PspA and the conjugates with polysaccharide. The experimental results showed that the immune effects of both the conjugates and PspA were effective to against invasion of *Pneumococcal pneumonia* in mice ($P < 0.01$). And the conjugates of PspA with polysaccharide gave the best protection and survived 3 days longer than that of PspA. The conjugates with polysaccharide enhanced the higher level of both IgG and IgG2a antibody titer than that of PspA. The cross-reactivity of Western-blotting showed conjugates with polysaccharide caused immune reaction in different serological *Pneumococcal pneumonia*, this meant that the conjugates had some cross-protection function against different serotypes 6B, 5, 1, 23F, 19F. The conjugates of PspA with polysaccharide showed better immunocompetence and immune protection against invasion of *Pneumococcal pneumonia* than PspA and the capsule polysaccharide. This study demonstrated that the conjugates could enhance protection against *Pneumococcal pneumonia*, which should be pertinent to future efforts to develop new protein-based complex vaccines.

Key words *Pneumococcal* surface protein A, conjugates, immunogenicity, cross-protection.

*This work was supported by a grant from Technologic Development of Fuzhou University (2005-XQ-10).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-591-87893046, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

Received: September 6, 2007 Accepted: November 16, 2007