

以霍乱毒素重组 B 亚单位为佐剂的 流感抗原滴鼻免疫效果研究

刘吏婷^{1,2}, 江海燕², 颜 艳¹, 崔 平¹, 王希良², 王建华¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨陵 712100; 2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘 要: 研究霍乱毒素重组 B 亚单位(recombinant cholera toxin B subunit, rCTB)为佐剂的流感抗原滴鼻免疫小鼠后,小鼠的体液免疫和局部黏膜免疫反应。三价流感病毒灭活抗原及裂解抗原按比例与 rCTB 配伍,滴鼻免疫小鼠,分析血清中 IgG 和 IgM 的动态变化,二免三周后,分析血清中 HAI 的变化,收集鼻、肺冲洗液,分析 IgG 和 sIgA 的变化。结果表明:全病毒组及 rCTB+裂解抗原组各项指标变化较明显,小鼠血清 IgG 和 IgM 在二免三周后仍维持在较高的水平,而其他两组均呈下降趋势;全病毒组鼻、肺冲洗液 IgG 和 sIgA 抗体滴度以及血清 HAI 抗体滴度均高于 rCTB+全病毒组($P<0.01$),而 rCTB+裂解抗原组鼻、肺冲洗液 IgG 和 sIgA 抗体滴度以及血清 HAI 抗体滴度明显高于裂解抗原组($P<0.01$)。研究表明:以全病毒抗原及 rCTB+裂解抗原滴鼻免疫小鼠,均可诱导小鼠产生较强的系统免疫反应和局部黏膜免疫反应。rCTB 与流感裂解抗原配伍滴鼻,可提高抗原的免疫原性,增强机体的黏膜免疫应答反应。

关键词: 流感;rCTB;免疫效果

中图分类号:R373.1⁺3

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2007)04-0202-04

Intranasal Administration of Trivalent Influenza Virus with rCTB on Mice

LIU Li-ting^{1,2}, JIANG Hai-yan², YAN Yan¹, CUI Ping¹,
WANG Xi-liang² and WANG Jian-hua¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Department of Immunology of Research Institute of Microbiology and Epidemiology Academy of Military Medical Science, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing 100071, China)

Abstract: To study the systemic and mucosal antibody response induced by i. n. trivalent whole influenza virus (wFlu) and trivalent split influenza virus (sFlu) with rCTB. wFlu and sFlu was formulated with rCTB, administered intranasal (i. n.). Mice sera were collected from 0 day to 28 day post i. n. Changes of serum IgG and IgM were observed, as well as the titres of hemagglutination inhibition (HAI) and specific IgG and sIgA in lung and nasal washes were determined. The result showed that the mice i. n. with rCTB-wFlu and rCTB-sFlu changed obviously. In brief, the wFlu and rCTB-sFlu elicited high titres of serum IgG, and IgM and maintained high level post 28d, whereas the others decreased post 28d. In addition, i. n. with wFlu induced significant higher titres of HAI and specific IgG and sIgA in lung and nasal washes than rCTB-wFlu, but the rCTB-sFlu induced significant higher titres of HAI and specific IgG and sIgA in lung and nasal washes than sFlu. I. n. with wFlu or rCTB-sFlu might elicit systemic and mucosal immunoresponse. And rCTB are a potent mucosal adjuvants for split influenza vaccines.

收稿日期:2006-11-02 修回日期:2007-01-30

基金项目:军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫学实验室与华兰生物工程股份有限公司合作项目(56081)。

作者简介:刘吏婷(1982-),女,湖南人,硕士,主要从事毒理学与免疫学研究。Tel:13424789049;Email:crith_cn@sina.com

Key words: Influenza; rCTB; Immunoresponse

流行性感冒是一种主要发生于秋季和冬季的急性呼吸道疾病,分别由甲、乙、丙三型流感病毒引起。该病传染性强、爆发突然、蔓延迅速、波及面广,严重危害人类身体健康。而且近年来,禽流感突破物种的界线,直接传染给人类,给人类的生命安全带来了严重的威胁^[1]。接种疫苗仍是当今防治流感和禽流感发生及流行最有效、最主要的手段。注射接种全病毒流感疫苗,易引起较多的不良反应,对于小年龄组(12岁)以下的接种一直未被批准^[2]。目前,经口服和鼻腔进行接种的流感疫苗越来越引起人们的关注。研究表明,鼻内接种流感疫苗是一种既安全又有效的疫苗接种方式,它适用于各年龄段人群,与肌肉注射相比,它不仅可刺激机体产生系统免疫应答,而且能诱导机体产生较强的黏膜免疫应答^[3]。现以流感喷鼻疫苗为冷适应株减毒活疫苗,用于5~17岁健康少年儿童以及18~49岁健康成人,其存在的主要问题是疫苗的遗传稳定性以及体质虚弱的老年人接种疫苗的安全性和有效性^[4]。霍乱毒素 B 单位是近年来研究较多的一种新型黏膜佐剂,以它作为口服和鼻内等途径免疫佐剂能诱导机体产生较强的特异性、系统性免疫应答反应。本研究选用 rCTB 为佐剂,与抗原配伍,滴鼻免疫 Balb/c 小鼠,检测血清及鼻、肺冲洗液中的 IgG、IgM 及 HAI 的动态变化,为流感黏膜疫苗的免疫学评价提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Balb/c 小鼠,6~8 周龄,雌性,购自军事医学科学院实验动物中心。

1.1.2 抗原 三价流感全病毒灭活抗原由本课题组制备。病毒在 9 日龄 SPF 鸡胚中培养 48~72 h,收集尿囊液,甲醛灭活后超滤浓缩,经蔗糖密度梯度离心,透析后,得单价病毒液。单向免疫扩散实验分别测定单价病毒液 HA 含量,按一定比例混合,使三价病毒液中,各种病毒的 HA 含量达 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。三价流感裂解抗原由华兰生物制品公司提供。

1.1.3 佐剂 霍乱毒素 B 亚单位由军事医学科学院生物工程所惠赠。

1.1.4 主要试剂 HRP-Goat-anti-mouse IgG、

IgA、IgM 购自美国 BETHYL 公司,霍乱弧菌滤液(RDE)购自国家流感中心,其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及免疫方案 小鼠随机分为 PBS 对照组、rCT-B + 全病毒组、全病毒组、rCTB + 裂解病毒组和裂解病毒组,每组 5 只小鼠。乙醚轻度麻醉小鼠,按每组每只 30 μL 进行滴鼻(1 μg HA/10 μL),阴性对照组以 20 μL PBS 滴鼻,共免疫 2 次,间隔两周。

1.2.2 佐剂与抗原配伍 rCTB : HA = 1 : 1 (m/m)。

1.2.3 ELISA 检测小鼠血清抗体效价 每次免疫后一周断尾采血,末次免疫后 3 周眼球摘除取血,分离血清,先用流感病毒三价裂解抗原包被酶联板(包被浓度:2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 总蛋白),4℃过夜;用含 2% 牛血清白蛋白的 TST 进行封闭,100 μL /孔,37℃温箱,孵育 2h;PBS-T 洗 3 次,设置空白、阴性对照,以 PBS-T 对血清进行倍比稀释,37℃孵育 1h 后 PBS-T 洗 3 次;加 HRP-羊抗鼠 IgG(稀释倍数:1 : 5000)、IgA(1 : 50000)、IgM(1 : 50000),50 μL /孔,37℃孵育 30 min;PBS-T 洗 3 次,加入显色液 50 μL /孔,室温避光显色 10 min,加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μL /孔终止反应;酶标仪 450 nm 波长处测 A 值。实验孔 A 值/阴性对照 A 值 ≥ 2.1 者,判为阳性。

1.2.4 ELISA 检测小鼠鼻、肺冲洗液抗体效价 末次免疫 3 周后处死小鼠,断头,暴露气管,摘取肺脏,分别用 0.6 mL PBS 冲洗鼻咽及肺部,收集冲洗液,于 -20℃ 保存。用间接 ELISA 检测冲洗液中的 IgG、IgA 和 IgM,方法同上。

1.2.5 血凝抑制试验检测血清 HAI 效价 4 体积 RDE 与 1 体积血清混合,37℃水浴 17~18h,而后 56℃灭活 1 h。设红细胞对照组和病毒对照组,用生理盐水对 RDE 血清混合液从 1 : 5 开始进行倍比稀释,25 μL /孔;分别加入等体积的单价病毒液(4 个血凝单位),室温作用 1 h;加入等体积的 1% 鸡红细胞悬液,4℃作用 30 min。观察结果,以能完全抑制红细胞凝集的最高血清稀释度的倒数为 HAI 抗体效价。

1.2.6 统计学方法 取以 2 为底抗体效价倒数的对数,以平均数 ± 标准差表示试验结果(几何均

数),统计学方法采用 SAS8.0 统计软件进行单因素 k 水平方差分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠血清 IgG 和 IgM 的测定

以 rCTB 三价流感抗原滴鼻免疫小鼠,初次免疫后 7 d,各组小鼠血清中均可检测到特异性抗体,加强免疫后,抗体水平明显升高。结果见图 1,一免 7 d 后,各组抗体水平相当,至二免一周时,全病毒组及 rCTB + 裂解病毒组的血清 IgG

明显高于 rCTB + 全病毒组 ($P < 0.01$),至二免二周时,各组血清 IgG 均呈现下降趋势。rCTB + 裂解病毒组的血清 IgM 在一免一周时达到最大值,之后一直呈现下降趋势;全病毒组血清 IgM 在二免一周时达最大值,之后持平;而 rCTB + 裂解病毒组及裂解病毒组在二免一周达峰值后迅速下降,至二免二周时,血清内检测不到特异性 IgM。PBS 对照组血清 IgG 及 IgM 始终为阴性,图中未标明。

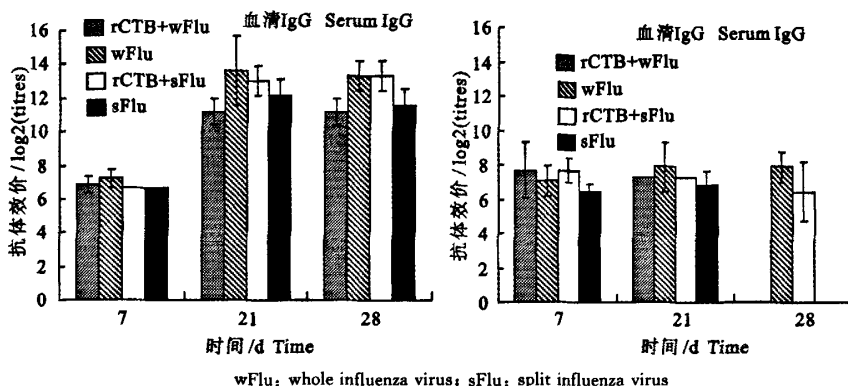


图 1 rCTB 三价流感抗原滴鼻免疫后小鼠血清抗体的动态变化

Fig. 1 Serum antibodies titres of mice with rCTB-sFlu (i. n.)

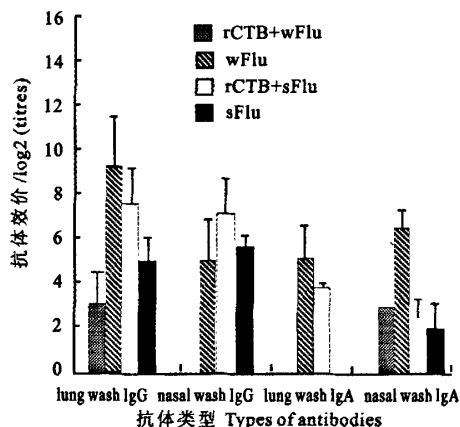


图 2 rCTB 三价流感抗原二免二周后小鼠鼻、肺冲洗液抗体的变化

Fig. 2 Washing antibody titre of mice with rCTB-Flu (i. n.)

2.2 小鼠肺冲洗液、鼻腔冲洗液 IgG 及 sIgA 的测定

用 rCTB 三价流感抗原滴鼻免疫小鼠,二免二周时,小鼠鼻、肺冲洗液特异性抗体检测结果如图 2 所示。肺冲洗液 IgG,以 rCTB + 全病毒组最低,全病毒组最高,二者差异显著 ($P < 0.01$)。

鼻冲洗液 sIgA,以全病毒组最高,且显著高于其余各组 ($P < 0.01$)。PBS 对照组肺冲洗液、鼻腔冲洗液 IgG 及 sIgA 始终为阴性,图中未标明。

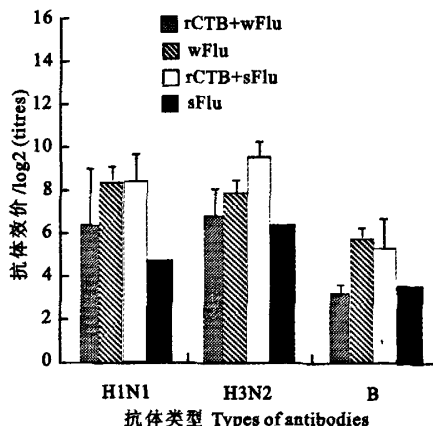


图 3 rCTB 三价流感抗原二免二周后小鼠血清 HAI 抗体的变化

Fig. 3 Serum HAI titres of mice with rCTB-Flu (i. n.)

2.3 小鼠血清 HAI 抗体的测定

二免二周时,分别检测小鼠血清内抗 H1N1、H3N2 及 B 型病毒的 HAI 抗体水平。结果如图

3所示,3种HAI抗体水平变化基本一致,其中全病毒组显著高于rCTB+全病毒组($P<0.05$),rCTB+裂解病毒组显著高于裂解病毒组($P<0.01$),而全病毒组与rCTB+裂解病毒组之间差异不显著($P>0.05$)。PBS对照组血清HAI抗体始终为阴性,图中未标明。

3 讨论

试验结果显示,以三价流感全病毒灭活抗原及rCTB+三价流感裂解抗原滴鼻免疫小鼠,均能刺激机体产生较高水平的特异性抗体,使机体不但产生系统免疫应答,而且还诱导机体产生较强的黏膜免疫反应。而以rCTB为佐剂的三价流感全病毒灭活抗原滴鼻免疫小鼠,其抗体水平明显低于全病毒组,说明rCTB与全病毒配伍时,不但没有起到佐剂的作用,反而降低了全病毒的免疫原性。这可能是因为rCTB与流感抗原结合后,形成的抗原颗粒过大,当其进入机体后,大部分抗原直接被吞噬细胞清除,因而不能刺激机体的抗原提呈细胞对抗原进行加工。而全病毒成分较为复杂,其中的某些成分可能具有佐剂作用,而且其大小适中,免疫原性较强,进入机体后易被抗原呈递细胞捕获,从而刺激机体的系统免疫应答和局部免疫应答反应。Takada等用灭活的禽流感全病毒滴鼻免疫小鼠,小鼠血清HAI及黏膜sIgA显著升高^[5],这与本实验结果是一致的。

裂解抗原中主要含有的是小分子抗原,由于分子量小,抗原表面决定簇少,故其免疫原性较弱,不能刺激机体产生较强的免疫保护效应。CTB是霍乱毒素的无毒亚单位,具有结合神经节苷脂GM1的功能,可使毒性亚单位(A)紧密结合在黏膜细胞表面,使蛋白更易与黏膜作用,进而引起一系列生理生化反应,产生更强的免疫效果^[6]。本试验结果显示,以rCTB+三价流感裂解抗原滴鼻免疫小鼠,可刺激机体产生一定水平的sIgA,较高水平的血清HAI,而单独以三价流感裂解抗原滴鼻免疫小鼠,其系统免疫应答及局部黏膜免疫应答远远低于含rCTB佐剂组。这可能是因为rCTB具有促进抗原提呈作用、诱导Th2细

胞产生细胞因子、促进B细胞同种型分化及诱导T、B细胞记忆效应等功能^[7,8],推测rCTB可能刺激小鼠淋巴细胞增殖和分化,分泌Th2型细胞因子,诱导局部黏膜免疫以及全身免疫。有研究报道,以rCTB简单地与抗原混合进行免疫时,产生的抗体效价远不及与抗原化学交联后进行免疫所产生的抗体效价^[9]。

参考文献:

- [1] 何维明,高育鹏,姜艳芬,等.禽流感流行病学调查及病原分离鉴定初报[J].西北农业大学学报,2001,10(3):16~19.
- [2] Carolyn B, Bridges M D. Center for Disease Control and Prevention Control of Influenza; Recommendations of the advisory committee on immunization (ACIP)[J]. MMWR, 2005, 51: 1~23.
- [3] Keitel W A, Piedra P A. Live Cold-adapted, Reassortant Influenza vaccine [M]. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay A J, editors. Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell Science, 1998. 373~990.
- [4] Evgenia G, Dan E, Reuven L, *et al.* Mucosal (SIgA) and serum (IgG) immunologic responses in young adults following intranasal administration of one or two doses of inactivated, trivalent anti-influenza vaccine[J]. Vaccine, 2004, 22 (20):2566~2577.
- [5] Takada A, Kuboki N, Okazaki K, *et al.* Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic[J]. Virology, 1999, 73(10):8303~8307.
- [6] Pizza M, Giuliani M, Fontana M, *et al.* Mucosal vaccines: nontoxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants [J]. Vaccine, 2001, 19(11):2534~2541.
- [7] Holmgren J, Harandi A M, Czerkinsky C, *et al.* Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA[J]. Expert Rev Vaccines, 2005, 97(2):205~217.
- [8] 吴秀芳,于三科,谢应国,等.鼠疫F1-V重组蛋白疫苗滴鼻免疫应答效果的研究[J].免疫学杂志,2006,22(5):269~276.
- [9] Kunio T, Masanori I, Yoko Y, *et al.* Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin[J]. Vaccine, 1998, 16(2):150~155.

作者：[刘吏婷](#)，[江海燕](#)，[颜艳](#)，[崔平](#)，[王希良](#)，[王建华](#)，[LIU Li-ting](#)，[JIANG Hai-yan](#)，[YAN Yan](#)，[CUI Ping](#)，[WANG Xi-liang](#)，[WANG Jian-hua](#)

作者单位：[刘吏婷,LIU Li-ting\(西北农林科技大学动物科技学院,陕西杨陵,712100;军事医学科学院微生物流行病研究所,病原微生物生物安全国家重点实验室,北京,100071\)](#)，[江海燕,王希良,JIANG Hai-yan,WANG Xi-liang\(军事医学科学院微生物流行病研究所,病原微生物生物安全国家重点实验室,北京,100071\)](#)，[颜艳,崔平,王建华,YAN Yan,CUI Ping,WANG Jian-hua\(西北农林科技大学动物科技学院,陕西杨陵,712100\)](#)

刊名：[西北农业学报](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名：[ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)

年，卷(期)：2007,16(4)

被引用次数：3次

参考文献(9条)

1. [何维明,高玉鹏,姜艳芬,黄建文,刘斌峰,潘瑞 禽流感流行病学调查及病原分离鉴定初报\[期刊论文\]-西北农业学报 2001\(3\)](#)
2. [Carolyn B;Bridges M D Center for Disease Control and Prevention Control of Influenza:Recommendations of the advisory committee on immunization\(ACIP\) 2005](#)
3. [Keitel W A;Pieda P A Live Cold-adapted,Reassortant Influenza vaccine 1998](#)
4. [Evgenia G;Dan E;Reuven L Mucosal\(SIgA\)and serum\(IgG\)immunologic responses in young adults following intranasal administration of one or two doses of inactivated,trivalent anti-influenza vaccine 2004\(20\)](#)
5. [Takada A;Kuboki N;Okazaki K Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic 1999\(10\)](#)
6. [Pizza M;Giuliani M;Fontana M Mucosal vaccines:nontoxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants 2001\(11\)](#)
7. [Holmgren J;Harandi A M;Czerkinsky C Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin,cholera toxin B subunit and CpG DNA 2005\(02\)](#)
8. [吴秀芳,于三科,谢应国,王栋,袁源,刑丽,武素琴,王希良 鼠疫F1-V重组蛋白疫苗滴鼻免疫应答效果的研究\[期刊论文\]-免疫学杂志 2006\(3\)](#)
9. [Kunio T;Masanori I;Yoko Y Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin 1998\(02\)](#)

本文读者也读过(10条)

1. [黄文州.Huang Wenzhou 毫米波用于免疫治疗\[期刊论文\]-电子测量与仪器学报2008,22\(3\)](#)
2. [龚婕宁.张庆宏.郭海.赵岩松.杨进 苍果喷雾剂对流感病毒感染小鼠抗病毒免疫的影响\[期刊论文\]-中药药理与临床2008,24\(6\)](#)
3. [张庆宏.郭海.杨进.龚婕宁.赵岩松 苍果挥发油对流感病毒感染小鼠肺中γ-IFN、TNF-α的影响\[期刊论文\]-南京中医药大学学报\(自然科学版\) 2007,23\(2\)](#)
4. [谢荔朋 微生物胞外多糖对养殖动物的免疫增强作用\[期刊论文\]-福建畜牧兽医2006,28\(1\)](#)
5. [段正赢.徐涤平.王红琳.杨克礼.刘泽文 猪链球菌病单价与多价灭活苗的免疫效果\[期刊论文\]-安徽农业科学 2007,35\(31\)](#)
6. [王福祥.孙永涛 重组微生物BCG疫苗研究\[期刊论文\]-国外医学\(流行病学传染病学分册\)2004,31\(1\)](#)

7. [孔卫青, 杨金宏](#) 3种微生物诱导的家蚕attacin基因异常表达形式的研究[期刊论文]-[安徽农业科学](#)2009, 37(6)
8. [程安春, 杨金龙, 潘康成, 倪学勤, 杨晓燕, 葛忠源, 黄永成, 张素辉, 尹念春, 曹省艳](#) 感染微生态及鸭重要致病微生物感染和免疫微生态研究进展[期刊论文]-[中国家禽](#)2008, 30(14)
9. [范锋, 赵中兴, 倪谷音, 毛爱民, 陈治国, 陆春兵, 毕邹生, FAN Feng, ZHAO Zhong-xin, NI Gu-yin, MAO Ai-ming, CHENG Zhi-guo, LU Chun-bing, BI Zou-sheng](#) 无锡地区鸡群禽流感疫苗免疫效果[期刊论文]-[江苏农业学报](#) 2008, 24(6)
10. [孙喜稳, 吕翠霞, 张淼, 孙喜涛, 余斌, 张歌, SUN Xi-wen, LV Cui-xiao, ZHANG Miao, SUN Xi-tao, YU Bin, ZHANG Ge](#) 清营解表合剂防治流感免疫调节机制的研究[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#)2010, 16(11)

引证文献(3条)

1. [郭路生, 张佩, 伦恒忠, 严晓芳](#) 霍乱毒素B亚单位对树突状细胞成熟的影响[期刊论文]-[中国组织工程研究与临床康复](#) 2010(44)
2. [高岩岩, 张靖, 张学峰, 靳玉琴, 沈心亮, 李启明](#) rCTB和TT为蛋白载体的A群流脑多糖黏膜免疫初步研究[期刊论文]-[中华微生物学和免疫学杂志](#) 2009(06)
3. [高岩岩](#) rCTB和TT为蛋白载体的A群流脑多糖蛋白结合物黏膜免疫的初步探讨[学位论文]硕士 2008

引用本文格式: [刘吏婷, 江海燕, 颜艳, 崔平, 王希良, 王建华, LIU Li-ting, JIANG Hai-yan, YAN Yan, CUI Ping, WANG Xi-liang, WANG Jian-hua](#) 以霍乱毒素重组B亚单位为佐剂的流感抗原滴鼻免疫效果研究[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007(4)