

# 新型佐剂 - 细菌样颗粒对百日咳抗原 体液免疫的效果研究

孔祥忍,毛双双,刘欣宇,马胜男,孟令杰,陈家琦,李雅林

(山东第一医科大学,山东 泰安 271000)

**摘要:**目的 探讨新型佐剂-细菌样颗粒(BLP)用于百日咳疫苗的效果。方法 将乳酸菌经三氯乙酸处理制备 BLP,随机将 50 只小鼠分为空白对照组、BLP 黏膜组、铝佐剂黏膜组、BLP 佐剂腹腔组和铝佐剂腹腔组,于第 0 天和 28 天进行免疫,观察小鼠有无不良反应;在初次免疫后的第 7、21 及 35 天取血,通过 ELISA 检测抗百日咳毒素 IgG 抗体水平,ELISA 检测鼻灌洗液抗百日咳毒素 sIgA 水平,鼻腔菌液攻击实验及肺组织病理评分分析疫苗的保护作用。结果 ①接种后各组小鼠均未发现明显异常,无体重减轻,鼻孔及口腔处均无明显炎症、溃疡及脱毛现象;②接种 7、21、35 天,BLP 黏膜组、铝佐剂黏膜组、BLP 佐剂腹腔组和铝佐剂腹腔组抗百日咳毒素 IgG 均高于空白对照组,且 BLP 佐剂腹腔组、铝佐剂腹腔组高于 BLP 黏膜组、铝佐剂黏膜组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),其中铝佐剂腹腔组抗体水平最高;③与空白对照组比较,各组 sIgA 水平均升高,BLP 佐剂黏膜组 sIgA 水平最高,高于铝佐剂黏膜组、BLP 佐剂腹腔组及铝佐剂腹腔组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );④空白对照组表现为病理组织损伤,其他各组只出现轻微的炎性细胞浸润,其中 BLP 佐剂黏膜组小鼠肺组织损伤最小。结论 新型佐剂-细菌样颗粒通过黏膜免疫保护作用最佳,主要通过诱导产生高滴度的 sIgA 发挥作用。

**关键词:**细菌样颗粒;佐剂;百日咳;疫苗;体液免疫

中图分类号:R183.3

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.02.025

文章编号:1006-1959(2021)02-0095-04

## Study on the Effect of New Adjuvant-bacteria-like Particles on Pertussis Antigen Humoral Immunity

KONG Xiang-ren, MAO Shuang-shuang, LIU Xin-yu, MA Sheng-nan, MENG Ling-jie, CHEN Jia-qi, LI Ya-lin

(Shandong First Medical University, Tai'an 271000, Shandong, China)

**Abstract:** Objective To explore the effect of a new adjuvant-bacteria-like particles (BLP) used in pertussis vaccine. Methods Lactic acid bacteria were treated with trichloroacetic acid to prepare BLP. 50 mice were randomly divided into blank control group, BLP mucosal group, aluminum adjuvant mucosal group, BLP adjuvant intraperitoneal group and aluminum adjuvant intraperitoneal group. Immunization was performed on days 0 and 28 to observe whether the mice had adverse reactions; blood was collected on days 7, 21 and 35 after the initial immunization, and the level of anti-pertussis toxin IgG antibody was detected by ELISA. ELISA detects the anti-pertussis toxin sIgA level of nasal lavage fluid, nasal cavity bacteria fluid challenge experiment and lung tissue pathological score analysis of the protective effect of the vaccine. Results ①After the inoculation, no obvious abnormalities were found in each group of mice, no weight loss, no obvious inflammation, ulcers and hair loss in the nostrils and mouth; ②At 7, 21, and 35 days of vaccination, the anti-pertussis toxin IgG in the BLP mucosal group, aluminum adjuvant mucosal group, BLP adjuvant intraperitoneal group and aluminum adjuvant intraperitoneal group were higher than those of the blank control group and the BLP adjuvant intraperitoneal group and aluminum adjuvant intraperitoneal group were higher than the BLP mucosal group and aluminum adjuvant mucosal group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ), and the aluminum adjuvant intraperitoneal group had the highest antibody level; ③Compared with the blank control group, the sIgA level of each group was increased. The BLP adjuvant mucosal group had the highest sIgA level, which was higher than that of the aluminum adjuvant mucosal group, the BLP adjuvant intraperitoneal group and the aluminum adjuvant intraperitoneal group, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ); ④The blank control group showed pathological tissue damage, and the other groups showed only slight inflammatory cell infiltration. Among them, the BLP adjuvant mucosa group had the least lung tissue damage. Conclusion The new adjuvant-bacteria-like particles have the best protective effect through mucosal immunity, mainly by inducing high titer sIgA.

**Key words:** Bacterial-like particles; Adjuvant; Pertussis; Vaccine; Humoral immunity

百日咳是由百日咳鲍特杆菌(*bordetella pertussis*)感染引起的急性呼吸系统传染病,病程长且危害严重<sup>[1]</sup>。现行疫苗使用的铝佐剂及肌肉接种方法是影响疫苗效果的要素,开发更有效新型百日咳疫苗势在必行。佐剂因具有增强疫苗免疫应答的作用

而广泛用作疫苗的重要成分。细菌样颗粒(bacterium-like particles, BLP)是近年来新被发现的新型佐剂,其成分是灭活的乳酸乳球菌,该细菌是一种常见的非致病细菌,被广泛应用在益生菌饮料和奶产品的生产,同其他常见的黏膜免疫佐剂相比,BLP 在安全性方面具有良好的优势<sup>[2-4]</sup>。近年来有报道 BLP 用作佐剂可增强流感疫苗、肺炎链球菌疫苗的效果,但 BLP 能否用作百日咳疫苗佐剂尚不十分清楚。此外,接种途径也是影响疫苗效果的重要因素之一,百日咳是呼吸系统传染病,通过鼻黏膜途径进行疫苗接种

基金项目:1.山东省重点研发计划(编号:2019GSF108256);2.山东第一医科大学 2019 年省级大学生创新创业训练计划项目(编号:S201910439095)

作者简介:孔祥忍(1996.10-),女,山东滕州人,本科

通讯作者:李雅林(1974.3-),女,山东菏泽人,博士,副教授,主要从事免疫治疗研究

种是非常理想的选择,既能协调系统免疫反应和局部黏膜免疫,又能兼顾体液和细胞免疫。现行疫苗主要为肌肉接种,这也可能是导致现行百日咳疫苗免疫效果不理想的原因之一。为此,本研究拟制备 BLP 作为百日咳疫苗的佐剂,探讨其用于百日咳疫苗后对小鼠的体液免疫作用及保护效果,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料及仪器** 健康 8 周龄雌性 NIH 小鼠 50 只,鼠龄 8 周龄,体重 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有动物均在山东第一医科大学实验动物中心 SPF 级环境饲养。乳酸乳球菌购自上海丹曦化工科技有限公司,百日咳攻击菌和百日咳类毒素购自兰州生物制品研究所有限责任公司,氢氧化铝佐剂购自美国赛默飞世尔公司。百日咳毒素 (pertussistoxin, PT) IgG ELISA 试剂盒和百日咳 PT sIgA ELISA 试剂盒购自德国 IBL 公司。本研究经山东第一医科大学动物伦理委员会审核通过。主要仪器:生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司, HFSafe1200LC)、分光光度计、旋转蒸发仪(上海巴玖实业有限公司, RE-6000A)、酶标仪(赛默飞世尔, Multiskan FC)、显微镜(日本奥林巴斯, CX43)、冷冻切片机(德国莱卡, Leica CM1850)。

## 1.2 方法

**1.2.1 制备细菌样颗粒(BLP)佐剂** 将乳酸菌菌种接种于含葡萄糖的 M17 液体培养基中培养,经三氯乙酸处理并加热以裂解菌体,经离心、沉淀及洗涤可获得 BLP。经染色及油镜观察 BLP 形态。经旋转蒸发仪蒸发法测定 BLP 干重。经分光光度计检测法检测 BLP 浓度。通过各项参数的优化、制备形态大小合适、安全的细菌样颗粒用作佐剂。

**1.2.2 制备百日咳类毒素疫苗** 以 0.3 mg BLP 为佐剂,以百日咳类毒素为抗原,将百日咳类毒素抗原以一定比例和用量混合,乳化混匀后保存于 2℃~8℃中或直接用于免疫接种;以氢氧化铝为佐剂的疫苗,参照人用剂量进行换算,将类毒素抗原和铝佐剂吸附后再合并在一起,在 2℃~8℃中保存或直接进行免疫。

**1.2.3 实验分组及免疫方案** 选取 8 周龄雌性 NIH 小鼠,将 50 只小鼠随机分为空白对照组、百日咳抗原+BLP 佐剂黏膜免疫组(BLP 佐剂黏膜组)、百日咳抗原+铝佐剂黏膜免疫组(铝佐剂黏膜组)、百日咳抗原+BLP 佐剂腹腔免疫组(BLP 佐剂腹腔组)和百日咳抗原+铝佐剂腹腔免疫组(铝佐剂腹腔组)。各组中 BLP 剂量均为 0.25 mg;黏膜组铝佐剂用量为 0.1 mg,腹腔组剂量为 0.5 mg;鼻黏膜组百日咳抗原

剂量为 5 μg,腹腔组百日咳抗原剂量为 25 μg。黏膜免疫组进行常规滴鼻免疫,每只小鼠每个鼻孔滴加 25 μl 疫苗,腹腔注射组进行腹腔注射 0.5 ml 疫苗,空白组滴鼻并腹腔注射等量 0.01 mol/L PBS(pH 为 7.2~7.4),于第 0 天和 28 天免疫 2 次。

**1.2.4 疫苗安全性检测** 接种后连续 3 d 观察小鼠有无明显异常,如体重减轻,重点观察鼻孔及口腔处是否有炎症、溃疡及脱毛现象,并抽检接种部位有无溃疡。

**1.2.5 抗百日咳特异性抗体检测** 在初次免疫后的第 7、21 及 35 天取血,分别采小鼠尾部静脉血 100 μl 左右,37℃静置 1 h,然后 4℃静置 4 h,吸取上层血清备用。ELISA 检测抗百日咳毒素特异性 IgG。免疫后第 35 天,采集小鼠鼻洗液样本。将小鼠处死后固定于实验台上,剖开颈部皮肤,剪开小鼠气管,使用注射器将 400 μl 灌洗液由气管注入,由鼻腔流出,收集灌洗液。对制备的鼻灌洗液行 ELISA 检测抗百日咳毒素特异性 sIgA。ELISA 操作按照试剂盒说明书进行。

**1.2.6 百日咳疫苗保护力检测** 在初次免疫后 42 d,于生物安全柜中进行菌液鼻腔攻击实验,攻击后第 2 及 14 天,取肺行 HE 染色,进行肺损伤程度的病理评分。评分规则如下:损伤非常温和(+/-),温和(+),损伤中等(++),损伤严重(+++)。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用  $q$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 疫苗安全性检测** 接种后连续 3 天,各组小鼠均未出现明显异常,无体重减轻,鼻孔及口腔处均无明显炎症、溃疡及脱毛现象,抽检的接种部位未见溃疡,疫苗具有良好的安全性。

**2.2 各组小鼠血清抗百日咳毒素 IgG 水平检测** 各组小鼠接受百日咳疫苗免疫接种后,血清抗百日咳毒素 IgG 抗体水平逐渐升高,对照组无抗体产生。接种 7、21、35 天,BLP 黏膜组、铝佐剂黏膜组、BLP 佐剂腹腔组和铝佐剂腹腔组抗百日咳毒素 IgG 均高于空白对照组,且 BLP 佐剂腹腔组和铝佐剂腹腔组均高于 BLP 黏膜组和铝佐剂黏膜组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中铝佐剂腹腔组抗体水平最高,见表 1。

**2.3 各组小鼠鼻洗液 sIgA 水平比较** 与空白对照组比较,各组 sIgA 水平均升高,BLP 佐剂黏膜组 sIgA 水平最高,高于铝佐剂黏膜组、BLP 佐剂腹腔组及铝佐剂腹腔组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

2.4 百日咳杆菌鼻腔攻击后各组组织病理学损伤评估 攻击后 14 天,取小鼠肺组织,经固定、HE 染色后进行显微镜观察,空白对照组小鼠肺组织表现为显著的病理组织损伤,而接受疫苗免疫各组小鼠肺内只出现轻微的炎性细胞浸润;与其他各组比较,BLP 佐剂黏膜组小鼠肺组织损伤较小,见表 3。

表 1 各组小鼠血清抗百日咳 IgG 抗体水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	接种 7 天	接种 21 天	接种 35 天
空白对照组	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
铝佐剂黏膜组	10	2.33±0.38 <sup>a</sup>	3.52±0.22 <sup>a</sup>	4.32±0.35 <sup>a</sup>
BLP 佐剂黏膜组	10	2.46±0.24 <sup>ab</sup>	3.74±0.48 <sup>ab</sup>	5.43±0.54 <sup>ab</sup>
铝佐剂腹腔组	10	2.93±0.26 <sup>ab</sup>	7.52±0.57 <sup>ab</sup>	11.65±0.93 <sup>ab</sup>
BLP 佐剂腹腔组	10	2.64±0.32 <sup>abc</sup>	6.81±0.32 <sup>abc</sup>	8.38±1.03 <sup>abc</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与铝佐剂黏膜组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与铝佐剂腹腔组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$

表 2 各组小鼠血清抗百日咳 sIgA 抗体水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	SigA 滴度( $\log_2$ )
空白对照组	10	0.00±0.00
铝佐剂黏膜组	10	3.23±0.51 <sup>a</sup>
BLP 佐剂黏膜组	10	8.83±0.79 <sup>ab</sup>
铝佐剂腹腔组	10	3.10±0.64 <sup>a</sup>
BLP 佐剂腹腔组	10	3.31±0.45 <sup>a</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与铝佐剂黏膜组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与铝佐剂腹腔组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$

表 3 各组小鼠肺组织病理损伤评分结果

组别	n	病理损伤评分
空白对照组	10	+++
铝佐剂黏膜组	10	+
BLP 佐剂黏膜组	10	+/-
铝佐剂腹腔组	10	+
BLP 佐剂腹腔组	10	+

### 3 讨论

百日咳是由百日咳鲍特杆菌感染引起的急性呼吸系统传染病,接种疫苗是防治百日咳的最有效方法。目前所有市售的无细胞百日咳疫苗因其良好的安全性成为目前的主流疫苗,虽然在全球覆盖率达到 85%以上,但该疫苗的保护力并不理想,近年来百日咳发病率不断攀升,因此开发更有效新型百日咳疫苗势在必行。

佐剂因具有增强疫苗免疫应答的作用而广泛用作疫苗的重要成分。研究显示,佐剂不同,疫苗的免疫效果差别很大。铝佐剂是应用最早、范围最广的佐剂,被用于制备白喉破伤风联合疫苗<sup>[9]</sup>。虽然铝佐剂仍然是目前应用最广泛的佐剂,但人们也逐渐开始发现它的局限性,如黏膜免疫效果不理想。BLP 是近年来新被发现的新型佐剂,其成分是灭活的乳酸乳球菌,乳酸乳球菌经热酸处理后球菌的细胞膜、细胞内的核

酸、胞质等内容物被破坏,而构成细菌外壳的肽聚糖复合物被保留下来,而且也保留了细菌原有的形状和大小(直径大约 1  $\mu\text{m}$ ),即成为 BLP。BLP 不仅可作为疫苗佐剂使用,也可作为抗原成分的载体。BLP 模拟了微生物感染的天然途径进行抗原提呈,有细菌一样的大小与外形因此很容易被机体所吞噬,特别是在黏膜组织中。同其他常见的黏膜免疫佐剂相比,BLP 在安全性方面具有良好的优势<sup>[6,7]</sup>。近年研究报道 BLP 用作佐剂可增强流感疫苗、肺炎链球菌疫苗的效果,但 BLP 能否用作百日咳疫苗佐剂尚不清楚<sup>[8-10]</sup>。

除了佐剂对疫苗免疫效果的影响之外,接种途径亦对疫苗的免疫效果有较大影响。百日咳是呼吸系统传染病,通过鼻黏膜途径进行疫苗接种是非常理想的选择,这样既能协调系统免疫反应又能激发局部黏膜免疫。然而,目前应用的百日咳疫苗均采用肌肉注射,此类疫苗能够促使机体产生足够的体液免疫应答,但并不能充分诱导以 sIgA 分泌为标志的局部黏膜免疫,现有疫苗在这方面的缺陷很可能是导致百日咳死灰复燃的另一重要原因。通过鼻腔进行百日咳疫苗免疫接种是激活和强化局部黏膜免疫防御的有效方法,与肌肉注射和皮下注射相比,鼻腔免疫与百日咳的自然感染更加相似,预计能够有效的诱导系统免疫应答和局部免疫应答。

本研究比较了百日咳疫苗通过鼻黏膜和腹腔两种途径免疫的差异,在两种途径中分别比较了 BLP 和氢氧化铝佐剂作用的效果。结果显示,尽管以 BLP 为黏膜佐剂的百日咳疫苗在诱导系统性 IgG 水平方面略低于传统铝佐剂疫苗,但其经鼻黏膜免疫效果优于传统铝佐剂疫苗,可获得较好的免疫效果,能够提高小鼠鼻黏膜 sIgA 抗体水平,提高小鼠抵御活菌攻击的能力,降低小鼠肺组织病理损伤。本研究也存在一定的不足,由于实验条件限制,未研究疫苗对细胞免疫的诱导作用,在以后的工作中,将深入研究以 BLP 为佐剂的百日咳抗原疫苗对细胞免疫的诱导作用。

总之,新型佐剂-细菌样颗粒通过黏膜免疫保护作用最佳,其主要通过诱导产生高滴度的 sIgA 发挥作用。

### 参考文献:

- [1]Margaryan S,Wells M,Apresyan H,et al.When will the coughing stop? Characteristics of children with pertussis (whooping cough)in Armenia (2014 -2018)[J].J Infect Dev Ctries,2019,13(5.1):57S-62S.
- [2]Li B,Chen X,Yu J,et al.Protection elicited by nasal immunization with pneumococcal surface protein A(PspA)adjuvanted with bacterium-like particles against Streptococcus pneumoniae infection in mice[J].Microb Pathog,2018(123):115-119.

(下转第 104 页)

(上接第 97 页)

- [3]Keijzer C,Haijema BJ,Meijerhof T,et al.Inactivated influenza vaccine adjuvanted with bacterium-like particles induce systemic and mucosal influenza A virus specific T-cell and B-cell responses after nasal administration in a TLR2 dependent fashion [J].Vaccine,2014,32(24):2904-2910.
- [4]Van Braeckel-Budimir N,Haijema BJ,Leenhouts K.Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications [J].Front Immunol,2013(4):282.
- [5]Moyer TJ,Kato Y,Abraham W,et al.Author Correction:A Engineered immunogen binding to alum adjuvant enhances humoral immunity[J].Nat Med,2020,26(5):804.
- [6]Heine SJ,Franco-Mahecha OL,Chen X,et al.lactis bacterium-like particles induce protective immunity in adult and infant mice[J].Immunol Cell Biol,2015,93(7):641-652.
- [7]Anyiwe K,Richardson M,Brophy J,et al.Assessing adolescent

immunization options for pertussis in Canada:A cost-utility analysis[J].Vaccine,2020,38(7):1825-1833.

[8]Mack I,Erlanger TE,Lang P,et al.Dose-dependent effectiveness of acellular pertussis vaccine in infants:A population-based case-control study[J].Vaccine,2020,38(6):1444-1449.

[9]Raya Tonetti F,Arce L,Salva S,et al.Immunomodulatory Properties of Bacterium-Like Particles Obtained From Immunobiotic Lactobacilli:Prospects for Their Use as Mucosal Adjuvants[J].Front Immunol,2020(11):15.

[10]Kye YC,Park SM,Shim BS,et al.Intranasal immunization with pneumococcal surface protein A in the presence of nanoparticle forming polysorbitol transporter adjuvant induces protective immunity against the Streptococcus pneumoniae infection[J].Acta Biomater,2019(90):362-372.

收稿日期:2020-11-10;修回日期:2020-11-17

编辑/王朵梅