

## 自组装纳米粒子防龋疫苗的免疫效能

叶倩琳<sup>1</sup> 李祯<sup>2#</sup> 曹茜茜<sup>1</sup> 刘畅<sup>1\*</sup> 樊明文<sup>1\*</sup>

(1. 口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室, 武汉大学口腔医学院 湖北 武汉 430079; 2. 武汉大学中南医院麻醉科 湖北 武汉 430071)

**[摘要]** 目的:研究自组装纳米粒子防龋疫苗 Glu-FTH 以及 Glu + Poly(I:C)(联合应用佐剂 Poly(I:C)与抗原 Glu)对小鼠特异性体液免疫和黏膜免疫的影响。方法:将小鼠随机分为 6 组,分别将 Glu-FTH、Glu、Glu-FTH + Poly(I:C)、Glu + Poly(I:C)、FTH、PBS 经鼻黏膜滴注免疫小鼠,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清和唾液中特异性抗体水平。结果:Glu-FTH、Glu、Glu-FTH + Poly(I:C)、Glu + Poly(I:C)均可有效提高小鼠血清中抗 Glu IgG 水平;Glu + Poly(I:C)和 Glu 可有效提高小鼠唾液中抗 Glu sIgA 水平。结论:防龋疫苗 Glu-FTH 具有一定的免疫效果,佐剂 Poly(I:C)与抗原 Glu 联合应用可引发较强的免疫反应。

**[关键词]** 龋齿 自组装纳米粒子疫苗 Poly(I:C) 佐剂 黏膜免疫

**[中图分类号]** R781.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2017)10-1023-04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.10.001

**Study on Immune Efficacy of Self-assembling Anti-caries Nanoparticle Vaccine.** YE Qian-lin<sup>1</sup>, LI ZHEN<sup>2</sup>, CAO Xi-xi<sup>1</sup>, LIU Chang<sup>1</sup>, FAN Ming-wen<sup>2\*</sup>. 1. The State Key Laboratory Breeding of Basic Science of Stomatology (Hubei-Most) & Key Laboratory of Oral Biomedicine Ministry of Education, School and Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China; 2. Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China.

**[Abstract]** **Objective:** To study the efficacy of self-assembling anti-caries nanoparticle vaccine Glu-FTH and Glu + Poly(I:C) on inducing protective humoral immune response and mucosal immune response in mice. **Methods:** The mice were separated into 6 groups randomly. Glu-FTH, Glu, Glu-FTH + Poly(I:C), Glu + Poly(I:C), FTH and PBS were respectively delivered into mice by intranasal administration. The levels of specific antibodies in serum and saliva were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** The levels of serum anti-Glu IgG in Glu-FTH, Glu, Glu-FTH + Poly(I:C), Glu + Poly(I:C) group increased. The levels of salivary anti-Glu sIgA in Glu + Poly(I:C) and Glu also increased. **Conclusion:** Anti-caries vaccine Glu-FTH and the synergy of Poly(I:C) and Glu can induce specific immune response.

**[Key words]** Caries Self-assembling nanoparticle vaccine Poly(I:C) Adjuvant Mucosal immune

变形链球菌细胞表面蛋白抗原 PAc (protein antigen c, PAc) 和葡糖基转移酶 GtfB (Glucosyl-transferases B, GtfB) 是防龋疫苗重要的有效抗原。其中 GtfB 包含氨基端催化活性区 CAT 和羧基端葡聚糖结合区 GLU<sup>[1~4]</sup>, 后者可作为防龋疫苗的亚

单位。为了探究何种佐剂可增强其免疫效果, 本实验以铁蛋白 (ferritin, FTH) 和 Poly(I:C) 作为佐剂联合 Glu 免疫小鼠, 检测血清和唾液中特异性抗体的水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 防龋疫苗 Glu-FTH、Glu 以及 FTH 的制备

1.1.1 Glu-FTH、Glu 以及 FTH 的蛋白提取 将含 Glu 基因片段的质粒 pET20b(+)-GLU、含 FTH 基因片段的质粒 pET28a(+)-FTH、含 Glu-FTH 基因片段的质粒 pET28a(+)-Glu-FTH 分别转化入 E. coli DH5α (以上质粒均由武汉大学口腔医学院中心实验室构建), 并接种于有相应抗性

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (编号: 210900019)

**作者简介** 叶倩琳 (1992~), 女, 山东人, 硕士, 主要从事牙体牙髓病学基础与临床研究工作。

李祯 (1987~), 男, 湖南人, 博士, 主要从事镇痛药物与骨质疏松及骨免疫相关基础与临床研究工作。

**\* 通讯作者** 刘畅, E-mail: liuc0728@whu.edu.cn

樊明文, E-mail: fmwmail@whu.edu.cn

# 为共同第一作者

的 LB 琼脂平皿,挑取单菌落后分别按 1 : 100 比例接种于 4 mL 含抗性的 LB 液体培养基中,过夜后转接入 500 mL 的 LB 培养基中。摇床 37 ℃、180 r/min 培养至菌液  $A_{600}=0.6$  时加 IPTG。IPTG 浓度以及加 IPTG 后的培养温度、时间见表 1。4 ℃ 10000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 重悬后再离心 1 次,弃上清,用 30 mL 含 10 mmol/L 咪唑,20 mmol/L Tris-Cl 和 0.5 mol/L NaCl 的溶液重悬沉淀。冰浴下 35%功率超声 3 s 停 5 s,超声总时间(包括停顿间隙)1.5 h。4 ℃,10000 r/min 离心 30 min,分别收集上清和沉淀。

表 1 工程菌发酵培养条件

Table 1 Fermentation conditions of Escherichia coli			
工程菌简称	IPTG 浓度 /mmol · L <sup>-1</sup>	培养温度 /℃	培养时间/h
Glu-FTH	0.5	16	24
Glu	1	30	3
FTH	0.5	30	4

1.1.2 镍柱亲和层析纯化 Glu-FTH 蛋白 平衡镍柱后,将上步中所得超声后上清(0.22 μm 滤器过滤)加入柱中,置于冷房摇床上摇 1 h。柱子垂直悬于架上,穿流液在重力作用下流出。依次加入 10 个柱体积含 10 mmol/L 咪唑、20 mmol/L 咪唑、60 mmol/L 咪唑、250 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L 咪唑的洗脱液(除咪唑外还含 20 mmol/L Tris-Cl 和 0.5mol/L NaCl)。分别收集穿流液以及 10、20、60、250、500 mmol/L 咪唑洗脱液。通过考马斯亮蓝染色法观察哪些洗脱液中有目的条带,确定最佳咪唑洗脱浓度。

1.1.3 包涵体蛋白 Glu、FTH 的纯化与复性 在上述条件下,Glu 和 FTH 以包涵体的形式表达,将离心后所得沉淀分别重悬于 40 mL 溶液①中,冰浴搅拌洗涤 30 min。4 ℃,10000 r/min 离心 15 min,弃上清。沉淀用 20 mL 溶液②重悬,室温搅拌 4 h 或 4 ℃(冰浴)搅拌过夜。4 ℃,12000 r/min 离心 15 min,收集上清。上清通过镍柱亲和层析纯化法纯化,其中洗脱液依次为 10 个柱体积 10 mmol/L 咪唑、20 mmol/L 咪唑、60 mmol/L 咪唑、100 mmol/L 咪唑、150 mmol/L 咪唑、200 mmol/L 咪唑、250 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L 咪唑。通过考马斯亮蓝染色法判断最佳咪唑洗脱浓度,将含目的蛋白的相应洗脱液依次透析于 1L 溶液③、④、⑤中,分别透析 4 h。透析液 4 ℃,10000 g 离心 30 min,上清即为目的蛋白,见表 2。

1.2 透射电镜观察 用移液器将适量(可浸没铜网)FTH 和 Glu-FTH 蛋白样品(0.01 g/L)转移到封口膜上,用镊子夹住铜网边缘,小心地将铜网分别浸于样品中 15 s,注意保持铜网的平整,多余溶液用无尘滤纸吸干。用 2%磷钨酸钠染色 45 s 后,将铜网置于透射电镜下观察。

表 2 包涵体蛋白纯化所用溶液

Table 2 Solution for purification of inclusion body proteins		
名称	成分	pH 值
溶液①	20mmol/L Tris-HCl,0.5mol/L NaCl、2mol/L 尿素、2% Triton	8.0
溶液②	8mol/L Urea,20mmol/L Tris-Cl、0.5mol/L NaCl	8.0
溶液③	4mol/L Urea,20mmol/L Tris-Cl、0.5mol/L NaCl	8.0
溶液④	2mol/L Urea,20mmol/L Tris-Cl、0.5mol/L NaCl	8.0
溶液⑤	1mmol/L DTT,20mmol/L Tris-Cl、0.5mol/L NaCl	8.0

1.3 动物实验

1.3.1 实验动物及分组处理 30 只 4 周龄 BALB/c 雌性小鼠,随机均分 6 组:Glu-FTH, Glu,Glu-FTH + Poly(I:C), Glu + Poly(I:C), FTH,PBS。鼻黏膜滴注免疫,第一次免疫记为 0 周,2 周、4 周分别加强免疫 1 次。Glu-FTH、Glu、FTH、Poly(I:C)每次免疫用量分别为 17.3、10、6.3、48μg/只。

1.3.2 样本的收集 免疫前(第 0 周)及免疫后(第 3、5、7、9 周)取唾液及血清样品。腹腔注射 0.2%毛果芸香碱 3.75 μL/g,移液器吸取唾液。血清样本收集时,小号针头从小鼠外眦进针到达球后静脉丛,挑破静脉丛,收集血液 100~200 μL,室温静置待血液凝固后置 4 ℃过夜,次日 1000 g 离心 20 min,收集上清血清,-20 ℃保存。

1.3.3 样本的检测 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠唾液中特异性抗 Glu sIgA 和血清中特异性抗 Glu IgG 水平及持续时间。用 10 mg/L 的标准品及 20 mg/L 纯化抗原 Glu 包被 96 孔板于 4 ℃过夜,洗板后每孔加 200 μL 3%BSA,于 37 ℃封闭 90 min。洗板后加入 100 μL 待测血清样本(PBST 1 : 100 稀释)和唾液样本(PBST 1 : 2 稀释),于 37 ℃孵育 2 h。洗板后分别加入 100 μL 1 : 10000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 和 1 : 5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgA。洗板后加入 100 μL OPD-柠檬酸磷酸盐缓冲液,底物显色后用 50 μL 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,酶标仪记录波长 490 nm 处的 A 值。

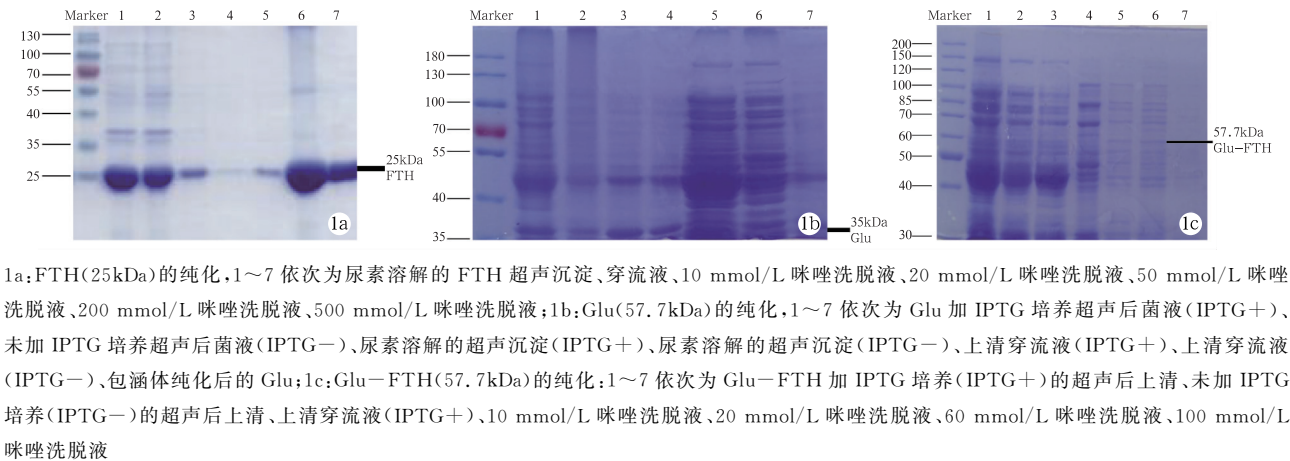
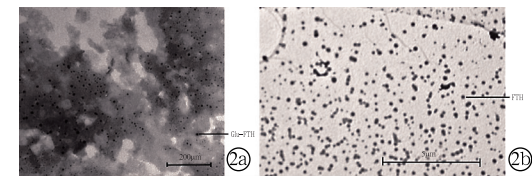
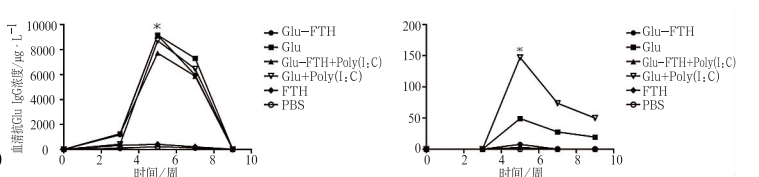


图 1 蛋白质纯化电泳图  
Fig. 1 Coomassie blue stain of purified proteins

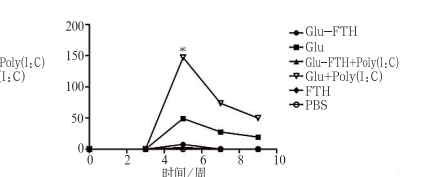


2a: 透射电镜观察纯化后的 Glu-FTH 蛋白;  
2b: 透射电镜观察纯化后的 FTH 蛋白  
Fig. 2 Transmission electron microscope results of FTH and Glu-FTH



Glu-FTH、Glu、Glu-FTH+Poly(I;C)、Glu+Poly(I;C)组 0~3 周时血清抗 Glu IgG 浓度较低, 3~5 周其浓度逐渐增加, 5 周时浓度最高

图 3 血清抗 Glu IgG 水平趋势图



Glu-FTH、Glu、Glu-FTH+Poly(I;C)、Glu+Poly(I;C)组 0~3 周时唾液抗 Glu sIgA 浓度较低, 3~5 周其浓度逐渐增加, 5 周时浓度最高

图 4 唾液抗 Glu sIgA 水平趋势图

Fig. 2 Transmission electron microscope results of FTH and Glu-FTH

Fig. 3 Trend of serum anti-Glu IgG

Fig. 4 Trend of salivary anti-Glu sIgA

1.4 统计学分析 采用 SPSS 软件单因素方差统计分析 ELISA 结果并绘制图。P<0.05 为统计差异显著性检验水平。

## 2 结果

2.1 蛋白质提取纯化 FTH、Glu、Glu-FTH 蛋白纯化的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝结果分别见图 1a、1b、1c。200 mmol/L 和 500 mmol/L 咪唑可洗脱 FTH 蛋白。60 mmol/L 咪唑可洗脱 Glu-FTH 蛋白。本实验的蛋白提取和纯化效果较好, 尤其是 FTH 纯化后蛋白浓度、纯度均较高。提取的 FTH 和 Glu-FTH 为自组装纳米粒子。

2.2 透射电镜结果 透射电镜下观察蛋白, 可见 Glu-FTH 和 FTH 直径分别约为 20 μm、0.5 μm, 纳米颗粒大小较一致, 分布较均匀, 见图 2。

2.3 血清中抗 Glu IgG 水平 各组血清中抗 Glu IgG 水平峰值均位于第 5 周。第 5 周时 Glu-FTH、Glu、Glu-FTH+Poly(I;C)、Glu+Poly(I;C)各组间无统计学差异, 但其均与 FTH 或 PBS 组间有统计学差异(P<0.05), 见图 3。

2.4 唾液中抗 Glu sIgA 水平 除 PBS 和 FTH 组外, 各组唾液中抗 Glu sIgA 水平均在第 5 周达到高峰。第 5 周时 Glu+Poly(I;C)组唾液中抗 Glu sIgA 水平显著高于其他各组(P<0.05), 是 Glu 组 sIgA 水平的 3 倍, 见图 4。

## 3 讨论

佐剂的种类和免疫途径可影响免疫反应的类型、强度、持续时间<sup>[5]</sup>, 因此选用合适的免疫佐剂和免疫途径对于提高防龋疫苗的免疫效果十分重要。Steven G Reed 等学者将佐剂分为三类: ①无免疫原性的物质, 仅作为抗原载体将更多的抗原高效地递呈给免疫系统; ②有免疫原性的物质, 可直接激活固有免疫受体(如 TLR); ③既有免疫原性又可将抗原递呈给免疫系统<sup>[6]</sup>。

Poly(I;C)为第②类佐剂, 是具有免疫双链 RNA 分子, 主要通过 TLR3 通路提高黏膜免疫效果, 诱导 Th1 型免疫反应<sup>[7]</sup>。有学者将 Poly(I;C)与 H1N1 疫苗联合应用, 取得了良好的免疫效果<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, Poly(I;C)作为佐剂联合 Glu 免疫

小鼠比单独用 Glu 免疫小鼠所产生的黏膜免疫反应更强,而血清中抗 Glu IgG 水平各组间未见明显差异。这印证了 Poly(I:C)是一种效果较好的黏膜免疫佐剂,主要诱导 Th1 型免疫反应<sup>[9]</sup>。

铁蛋白是一种广泛存在的具有自组装功能的储铁蛋白,能够形成由 24 个亚基构成的笼型结构,暴露在笼型结构外的 N 端可融合表达、展示外源蛋白。铁蛋白可作为载体,与多种抗原融合形成纳米粒子,将抗原呈递给免疫系统。尚无充分证据表明 FTH 具有免疫原性。先前已有研究者利用铁蛋白递呈 H1N1 蛋白亚单位流感疫苗,铁蛋白增强了 HA 抗原的免疫原性,并诱导产生了可中和多个 H1N1 亚型的抗体<sup>[10]</sup>。一般制备纳米粒子时需要采用化学处理等方法,而铁蛋白或其融合蛋白可自组装成纳米粒子,这减少了对蛋白活性的破坏,有利于形成均一的纳米粒子。本研究通过将生物信息学分析筛选的变形链球菌 Glu 的有效抗原表位通过基因重组结合到铁蛋白笼型结构的 N 端,制备新型自组装纳米粒子防龋疫苗 Glu-FTH。FTH 表面有着较高密度的 Glu 抗原表位,Glu-FTH 可被抗原递呈细胞高效地识别、捕获,进而诱导较强的免疫反应。本实验中 Glu-FTH 及 Glu-FTH+poly(I:C)第 5 周时与其他组均可诱导一定量的血清中抗 Glu IgG,而 Glu-FTH 及 Glu-FTH+poly(I:C)组唾液中抗 Glu-sIgA 浓度较低。FTH 的大小及其理化性质可能影响 Glu-FTH 的免疫效果。研究表明抗原载体的大小可影响疫苗的效果,然而其最佳大小尚存在争议;抗原载体的理化性质也可影响抗原在淋巴系统中的循环或抗原提呈细胞对抗原的递呈,进而影响疫苗效果<sup>[11]</sup>。另外,SDS-PAGE 实验结果显示蛋白 Glu-FTH 纯化后仍有部分杂蛋白(非目的蛋白 Glu-FTH),该杂蛋白可能影响疫苗的免疫效果,本课题组将调整蛋白纯化方法,以获得纯度更高的蛋白。然而本组正在进行的实验(数据尚未发表)表明 Glu-FTH 较 Glu 免疫小鼠后唾液中抗 PAc IgA 水平有显著性提高。提示 Glu-FTH 免疫所产生的唾液对 PAc 有交叉免疫保护作用,这可能是因为 Glu 和 PAc 之间有相似的结构,这也提示 PAc-FTH(PAc 和 FTH 融合蛋白)可能诱导浓度较高的唾液中抗 PAc sIgA。

铁蛋白作为抗原递呈载体亦具有较好的应用前景。纳米疫苗黏膜免疫抗原递呈系统包括病毒体、聚酯微球、脂质体等。抗原可黏附于抗原递呈系统的表面或被包裹在其中,递呈系统可增强抗原递呈,减缓抗原释放,进而增强抗原特异性免疫反应。并且该抗原递呈系统具有生物可降解性、生物相容性等良好的生物学特性。美国 FDA 已将 PLA 和 PLGA 纳米粒子认定为可用于人的分子材料,其作为药物传递载体已被广泛应用。

## 参考文献

- [1] Sun Y, Shi W, Yang JY, et al. Flagellin-PAc fusion protein is a high-efficacy anti-carries mucosal vaccine[J]. J Dent Res, 2012, 91(10):941-947
- [2] 曹茜茜,樊肇,孙晶晶,等.重组亚单位和合成肽防龋疫苗的免疫效能[J].口腔医学研究,2014,30(03):193-196+200
- [3] Cao XX, Fan J, Chen J, et al. Immunogenicity and prediction of epitopic region of antigen Ag I/II and glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2016, 36(3):416-421
- [4] 叶惟虎,刘忠芳,李宇红,等. AddaVax 经不同免疫途径对防龋疫苗的佐剂效应[J].口腔医学研究,2014,30(4):289-290+294
- [5] Nizard M, Diniz MO, Roussel H, et al. Mucosal vaccines: Novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2014, 10(8):2175-2187
- [6] Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines[J]. Nat Med, 2013, 19(12):1597-608
- [7] McNally B, Willette M, Ye F, et al. Intranasal administration of dsRNA analog poly(I:C) induces interferon- $\alpha$  receptor-dependent accumulation of antigen experienced T cells in the airways[J]. PLoS One, 2012, 7:e51351
- [8] Martins KA1, Bavari S, Salazar AM. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives[J]. Expert Rev Vaccines, 2015, 14(3):447-459
- [9] Martins KA1, Bavari S, Salazar AM. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives[J]. Expert Rev Vaccines, 2015, 14(3):447-459
- [10] Kanekiyo M1, Wei CJ, Yassine HM, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies[J]. Nature, 2013, 499(7456):102-106
- [11] 杨柳,杨颖,林玉红,等. LE-pGJA-P/VAX 黏膜递呈系统的制备及其理化性质评价[J].口腔医学研究,2012,28(3):218-219

[收稿日期:2017-08-16]

(本文编辑 汪喻忠)