

低分子量透明质酸增强 HAV 抗原诱导的小鼠体液免疫应答的研究

舒晓明¹, 胡凝珠¹, 兰芸¹, 陶里¹, 陈阳¹, 罗爱华², 胡云章^{1*}

(¹中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, ²昆明医学院第一附属医院检验科, 云南昆明 650118)

[摘要] 目的: 研究内源性危险信号分子低分子量透明质酸作为天然佐剂对 HAV 抗原诱导小鼠体液免疫应答的影响。方法: 将 ICR 小鼠分成 9 组, 分别设生理盐水对照组、HAV 抗原组、HAV 抗原+铝佐剂组、HAV 抗原+低分子量透明质酸 50 μ g 组、HAV 抗原+低分子量透明质酸 100 μ g 组、HAV 抗原+低分子量透明质酸 200 μ g 组、HAV 抗原+低分子量透明质酸 300 μ g 组、HAV 抗原+低分子量透明质酸 500 μ g 组、HAV 抗原+低分子量透明质酸 1 mg 组, 皮下免疫小鼠。分别在 4、8、12、16 周用 ELISA 法检测小鼠血清抗 HAV IgG 水平。结果: (1)空白对照组在 4、8、12 和 16 周末见抗 HAV IgG 产生; 各实验组抗 HAV IgG 水平在 8 周时达到最高; 12 周和 16 周时各免疫组的抗 HAV IgG 水平逐渐下降, 尤以铝佐剂组下降明显; (2)与 HAV 抗原组相比, 低分子量透明质酸各免疫组小鼠血清抗 HAV IgG 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与铝佐剂组相比, 低分子量透明质酸免疫组明显增强特异性抗 HAV IgG 水平 ($P < 0.05$ 或 $P > 0.05$); (3)低分子量透明质酸安全无毒, 无过敏反应。结论: 低分子量透明质酸能够明显增强灭活 HAV 抗原的体液免疫应答, 具有强的免疫佐剂作用。其免疫佐剂效应优于铝佐剂。

[关键词] 透明质酸; 危险信号; 佐剂

[中图分类号] R392 **[文献标识码]** A

免疫佐剂对辅助抗原诱导机体产生持久高水平的免疫应答十分重要^[1], 透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是从动物组织提取的一种黏多糖, 由 (1- β -4)-D-葡糖醛酸和 (1- β -3)-N-乙酰基-D-氨基葡萄糖双糖单位重复连接组成。透明质酸是细胞外基质的重要成分而广泛分布于细胞外基质, 它是构成皮肤、玻璃体、关节滑液和软骨组织的重要成分, 具有独特的理化性质和生物学功能。近年研究表明, 低分子量透明质酸是免疫系统的一种重要内源性危险信号, 与 TLR-2 作用后, 以依赖于 MyD88、IL-1R 相关激酶、TIRAP 相关因子-6、蛋白激酶 C γ 、NF- κ B 的方式进行信号传导, 激活机体的天然免疫应答^[2]。因此我们推测低分子量透明质酸可能具有免疫佐剂的特性。

收稿日期: 2007-08-13 接受日期: 2007-09-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 资助 (2006AA0224C0)

作者简介: 舒晓明 (1981-), 男, 江西南昌人, 硕士生

Tel: 0871-8335334 E-mail: sxm992283@home.com

* Corresponding author E-mail: huyun@21.cn

本研究中以低分子量透明质酸作为疫苗佐剂, 与 HAV 抗原混合后皮下免疫接种小鼠, 观察内源性危险信号分子低分子量透明质酸对 HAV 抗原诱导小鼠体液免疫应答的影响, 以探讨低分子量透明质酸作为疫苗佐剂的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 ICR 健康小鼠 (SPF 级, 雌性, 6~8 周龄, 质量 18~20 g), 由中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所灵长类实验动物中心提供, 并按实验动物中心的方法饲养。酶标仪 (Bio-RAD Microplate reader Model 550) 购自美国 Bio-RAD 公司。抗 HAV IgG ELISA 检测试剂盒购自 KPL 公司, 酶标板购自美国 eBioscience 公司。灭活 HAV 抗原和 Al(OH)₃ 佐剂均由本室保存。低分子量透明质酸 (相对分子量 (M_r) 为 10 000 以下) 购自江苏镇江东元生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 低分子量透明质酸的制备 用电子天平称取适量低分子量透明质酸, 用蒸馏水溶解配制成浓度为 5 μ g/L。

1.2.2 免疫动物 将 ICR 雌性小鼠随机分成 9 组, 分别设生理盐水空白对照组、HAV 抗原 200 μ g 免疫组 (HAV)、HAV 抗原 200 μ g + 300 μ g 铝佐剂免疫组 (HAVAL)、HAV 抗原 200 μ g + 50 μ g 透明质酸免疫组 (HAVHA1)、HAV 抗原 200 μ g + 100 μ g 透明质酸免疫组 (HAVHA2)、HAV 抗原 200 μ g + 200 μ g 透明质酸免疫组 (HAVHA3)、HAV 抗原 200 μ g + 300 μ g 透明质酸免疫组 (HAVHA4)、HAV 抗原 200 μ g + 500 μ g 透明质酸免疫组 (HAVHA5) 和 HAV 抗原 200 μ g + 1 mg 透明质酸免疫组 (HAVHA6), 每组 6 只。免疫途径为皮下免疫, 共免疫 1 次。

1.2.3 血清抗 HAV IgG 水平检测 分别于免疫后 4、8、12 和 16 周对小鼠尾静脉采血, 血样 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 分离血清, 用 ELISA 试剂盒检测抗 HAV 的特异性 IgG 水平, 具体操作方法按照试剂盒说明书。

1.2.4 低分子量透明质酸安全性检测 (1) 低分子量透明质酸的异常毒性试验: 实验组选用 ICR 小鼠 10 只, 雌雄各 1 半, 每只小鼠皮下注射 5 mg 低分子量透明质酸, 同时设立生理盐水对照组, 连续观察 7 d (2) 低分子量透明质酸的刺激性试验: 取 ICR 小鼠 2 只, 分别在一侧后肢股四头肌注射低分子量透明质酸 (5 μ g/L) 1 mL, 另一侧注射等量生理盐水。另取 ICR 小鼠 2 只, 分别在一侧后肢脚掌注射低分子量透明质酸 (5 μ g/L) 1 mL, 另一只注射等量生理盐水。48 h 后处死, 解剖观察局部组织变化。 (3) 低分子量透明质酸的过敏试验: 取 ICR 小鼠 10 只, 雌雄各 1 半, 皮下注射 50 μ g 低分

子量透明质酸, 2周后再尾静脉注射 $50 \mu\text{g}$ 低分子量透明质酸, 立即观察有无过敏反应。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS1.5 统计软件进行单因素方差分析, 并进行 Levene 方差齐性检验, 如方差齐, 则进行单因素方差分析; 而方差不齐则采用 Kruskal-Wallis H Test, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 低分子量透明质酸安全性 (1) 低分子量透明质酸的异常毒性试验: 试验期内所有动物均未出现松毛、缩团、发抖等异常反应; 进食、饮水、粪便和精神等均正常。实验结束后所有动物均健在且质量增加, 说明低分子量透明质酸安全无毒。(2) 低分子量透明质酸的刺激性试验: 在小鼠股四头肌注射低分子量透明质酸 48 h 后解剖观察局部组织无充血、水肿及硬结等异常变化; 小鼠后掌注射 48 h 后解剖观察局部也无异常变化。表明低分子量透明质酸剂量为 5 mg 时安全无毒。(3) 低分子量透明质酸的过敏反应: 小鼠在过敏试验中未出现蜷缩、竖毛、流泪、喷嚏、搔鼻、抽搐、痉挛、呼吸困难、水肿及休克等过敏反应。

2.2 不同剂量低分子量透明质酸免疫增强效应 初免后 4、8、12、16 周检测抗 HAV IgG 水平, 结果显示生理盐水空白对照组检测不到抗 HAV IgG, 各实验组小鼠在 4 周内均产生抗 HAV IgG, 随着时间推移呈上升趋势, 到第 8 周达到抗体滴度的峰值, 此后逐渐下降; 但是不同剂量透明质酸免疫组的抗体水平仍然明显高于 HAV 单独抗原免疫组以及铝佐剂组。不同剂量低分子量透明质酸免疫组在同一时间的抗体水平不同, HAVHA4、HAVHA5 和 HAVHA6 组在 8 周时产生的抗 HAV IgG 的水平较高, 分别为 $1:(359.19 \pm 2.25)$ 、 $1:(320 \pm 3.46)$ 、和 $1:(285.09 \pm 3.10)$; 且 HAVHA5 和 HAVHA6 组的抗体水平能够长时间维持在较高水平, 至 16 周时两组的抗 HAV IgG 水平分别为 $1:(160 \pm 1.55)$ 和 $1:(113.13 \pm 2.25)$, 而其他实验组抗 HAV IgG 水平均已明显下降。提示低分子量透明质酸的免疫增强效应在一定范围内可能与免疫剂量成量效依赖性。

各低分子量透明质酸免疫组的免疫效应与 HAV 抗原单独免疫组的免疫效应相比较, 结果显示, 4 周、8 周、12 周和 16 周时结果显示不同剂量低分子量透明质酸免疫组的抗 HAV IgG 水平均明显高于 HAV 抗原单独免疫组, 在 4 周时 HAVH6 免疫组的抗 HAV IgG 水平最高, 为 $1:(201.59 \pm 3.10)$, 约为 HAV 抗原单独免疫组的 7 倍, 二者相比有统计学意义 ($P < 0.05$)。8 周时 HAVHA1 组、HAVHA4 组、HAVHA5 组、HAVHA6 组与 HAV 抗原单独免疫组相比有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。至 12 周和 16 周时, 所有剂量的低分子量透明质酸免疫组的抗 HAV IgG 水平与 HAV 抗原单独免疫组相比有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。这些结果表明, 低分子量透明质酸能够增强 HAV 抗原的特异性体液免疫应答, 具有免疫佐剂效应。

各低分子量透明质酸免疫组的免疫效应与铝佐剂组的免疫效应相比较, 结果显示, 除 HAVH3 免疫组的抗 HAV IgG 水平在 4 周时低于铝佐剂免疫组以外, 其他各低分子量透明

质酸免疫组的抗 HAV IgG 水平在 4、8、12 和 16 周时均要明显高于铝佐剂组。虽然在 4 周和 8 周时各低分子量透明质酸免疫组的抗体水平明显高于铝佐剂免疫组, 但是无统计学意义。在 12 周时结果显示, HAVHA1 组、HAVHA4 组、HAVHA5 组和 HAVHA6 组与铝佐剂组的抗 HAV IgG 水平相比, 具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1); 而 HAVHA2 免疫组、HAVHA3 免疫组的抗 HAV IgG 水平与铝佐剂组相比无统计学意义。至 16 周时, HAVHA2 组、HAVHA3 组和 HAVHA5 组与铝佐剂组的抗 HAV IgG 水平相比, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而其余低分子量透明质酸免疫组的抗 HAV IgG 水平与铝佐剂组相比无统计学意义。这表明低分子量透明质酸不仅具有免疫佐剂作用, 增强特异性的抗 HAV IgG 水平, 而且其佐剂效应在一定剂量范围内和一定时间内优于铝佐剂。

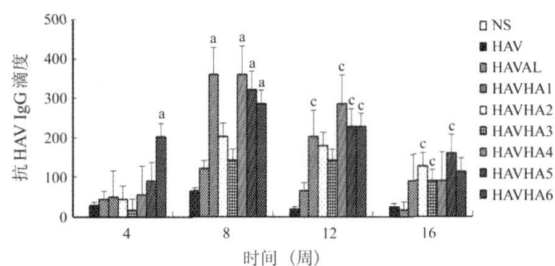


图 1 不同时间小鼠血清抗 HAV IgG 水平

^a $P < 0.05$ 与 HAV 组; ^c $P < 0.05$ 与 HAVHA1 组。

3 讨论

目前铝佐剂是唯一批准应用于人的疫苗佐剂, 但是铝佐剂存在诱导体液免疫应答, 而细胞免疫很弱, 与 E 型过敏性疾病有关等弊端等^[3]。理想疫苗佐剂应该是既能增强体液免疫应答, 又能诱导细胞免疫应答, 且无毒副作用^[1]。因此, 研究开发新型疫苗佐剂, 以替代铝佐剂成为疫苗佐剂的研究热点。研究发现, 细胞损伤释放的内源性危险信号分子具有刺激树突状细胞成熟, 增加共刺激分子如 CD86 和 CD83 等的表达, 促进细胞因子的分泌; 介导 T 细胞免疫应答的作用^[4-5]。提示内源性危险信号分子可能作为有效的内源性免疫佐剂, 增强 T 淋巴细胞对外来抗原的免疫应答。

为了探讨内源性危险信号分子低分子量透明质酸作为疫苗佐剂的可行性, 本研究中采用灭活 HAV 抗原和低分子量透明质酸进行不同剂量配比, 通过免疫小鼠观察了抗 HAV IgG 水平的变化, 并对低分子量透明质酸作为佐剂与铝佐剂的效应比较进行了初步探讨。研究证实, 低分子量透明质酸联合灭活 HAV 抗原进行免疫, 有效地诱导了抗 HAV IgG 的产生。与单独灭活 HAV 抗原组相比, 不同剂量低分子量透明质酸免疫组其产生的特异性抗体水平均明显高于 HAV 抗原单独免疫组, 其差异性有统计学意义

($P < 0.05$), 提示低分子量透明质酸具有免疫佐剂效应; 与铝佐剂组相比, 不同剂量的低分子量透明质酸免疫组其诱导产生的免疫增强效应在不同时期显示优于铝佐剂或与铝佐剂相当; 且本研究结果还提示在一定范围内随着低分子量透明质酸的剂量的增加, 抗 HAV IgG 的水平逐渐增高, 即其抗 HAV IgG 水平与低分子量透明质酸在一定范围内可能呈量效依赖性。低分子量透明质酸是细胞外基质成分, 属于内源性危险信号分子, 具有无毒安全性高、结构明确、易于生产和价格便宜等特点, 符合理想疫苗佐剂的特点。本实验结果也证实了低分子量透明质酸安全无毒。

综上所述, 本实验以低分子量透明质酸作为新型疫苗佐剂, 能够有效地增强灭活 HAV 抗原的体液免疫应答, 而且不同剂量低分子量透明质酸免疫增强效应显示相当于或优于铝佐剂, 且低分子量透明质酸的免疫增强作用持续时间要长于铝佐剂。因此, 通过本研究提示, 低分子量透明质酸可以作为一种潜在的新型人用疫苗佐剂。同时, 随着许多重大疾

病如 HBV、HM、肿瘤等严重危害着人类的健康, 开发新型治疗性疫苗迫在眉睫, 而寻找一种佐剂能够协同疫苗抗原诱导产生 CTL 免疫效应, 达到治疗疾病的作用是一种非常有潜力的策略。因此, 我们下一步的工作将进一步研究低分子量透明质酸是否能够诱导强的 CTL 免疫反应。

参考文献:

- [1] 周伊, 齐旭, 肖菊香, 等. 新型佐剂 SWZY 对弱免疫原性小鼠黑色素瘤疫苗的免疫增强作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(4): 526-529.
- [2] Scheibner KA, Luttmann A, Boadua S, et al. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2 [J]. J Immunol, 2006, 177(2): 1272-1281.
- [3] 王健, 冷静, 王启辉. LP3 辅佐 HBsAg 诱导机体产生特异性抗体的机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(6): 559-561.
- [4] Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells [J]. Nature, 2003, 425(6957): 516-521.
- [5] Hu Z, Yang XY, Liu Y, et al. Release of endogenous danger signals from HIF1 α -treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(1): 124-131.

(上接 182 页)

体介导的蛋白质的降解活性。表达磷酸化突变的 XAPC7 细胞将出现 G1/S 过渡和 S/G2 进展受损, 氧化应激和电离照射可导致 cAb1-XAPC7 复合物和磷酸化 XAPC7 的形成增加。可见, cAb 和 Ar8 介导的 XAPC7 的磷酸酪氨酸修饰调控着 26 S 和 20 S 蛋白酶体的活性。

尽管 XAPC7 参与多种重要的肿瘤相关蛋白的表达及活性调节 (如 HB α , HIF-1, cAb 及 Ar8), 但其本身在肿瘤的发生、侵袭及迁移中究竟起怎样的作用? 在肿瘤的发生中, XAPC7 是作为这些重要肿瘤相关蛋白的上游调控因子, 还是仅作为蛋白质降解的“垃圾处理站”而接受其他因子的调控? Sh 等^[8]采用 SEREX 技术在 cDNA 表达文库中筛选到 PSMa7 阳性克隆, 进一步的表达谱芯片表明 PSMa7 在 HCC 样本中呈现表达上调, 实时定量 RT-PCR 结果 16 个配对原发性肝细胞癌标本和癌旁非肿瘤组织标本中有 7 个在肿瘤组织中高表达 (44%), 初步提示 PSMa7 是一个原发性肝细胞癌的肿瘤相关抗原。但 PSMa7 在肝癌中究竟充当何种角色目前尚不清楚。为此, 本实验中成功构建了能在人肝癌细胞系 SMMC-7721 中表达的人 XAPC7 基因真核表达载体, 为进一步研究 XAPC7 基因对肿瘤细胞生物学功能的影响奠定了实验基础。同时本课题组正在制备抗 XAPC7 mAb 并构建 RNA 干扰重组质粒, 从细胞增

殖、细胞周期、细胞凋亡及对肿瘤细胞的侵袭迁移的影响等多方面考察本基因及其编码蛋白的功能。

致谢: 感谢上海复旦大学生命学院遗传所季朝能教授对本课题的协助和支持!

参考文献:

- [1] Israeli O, Goldring Aviram A, Rjentein S, et al. In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2005, 160(1): 35-42.
- [2] El-Rifai W, Frjerson Jr HF, Moskaluk CA, et al. Genetic differences between adenocarcinomas arising in Barrett's esophagus and gastric mucosa [J]. Gastroenterology, 2001, 121(3): 592-598.
- [3] Huang J, Kwong J, Sun EC-Y, et al. Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein [J]. J Virol, 1996, 70(8): 5582-5591.
- [4] Zhang Z, Toriij N, Fujisaka A, et al. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex [J]. J Biol Chem, 2000, 275(20): 15157-15165.
- [5] Krueger M, Beeger C, Welch PJ, et al. Involvement of proteasome α 1 subunit PSMa7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site mediated translation [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(24): 8357-8364.
- [6] Cho S, Choi YJ, Kim M, et al. Binding and regulation of HIF-1 α by a subunit of the proteasome complex, PSMa7 [J]. FEBS Lett, 2001, 498(1): 62-66.
- [7] Liu X, Huang W, Li C, et al. Interaction between cAb1 and Ar8 tyrosine kinases and proteasome subunit PSMa7 regulates proteasome degradation [J]. Mol Cell, 2006, 22(3): 317-327.
- [8] Shi YY, Wang HC, Yin YH, et al. Identification and analysis of tumour associated antigens in hepatocellular carcinoma [J]. Br J Cancer, 2005, 92(5): 929-934.