

文章编号: 1004-0374(2009)01-0053-03

霍乱毒素无毒B亚单位(CTB)黏膜免疫佐剂的研究进展

严小芳, 张佩*, 董硕

(辽宁医学院, 锦州 121001)

摘要: 霍乱毒素(CT)具有很强的黏膜免疫佐剂活性, 是当今研究热点之一, 但CT的黏膜免疫佐剂效应机理尚未完全弄清。本文主要就霍乱毒素无毒B亚单位(CTB)的黏膜免疫佐剂作用进行综述。

关键词: 霍乱毒素; 霍乱毒素B亚单位; 黏膜佐剂

中图分类号: R378 **文献标识码:** A

Advance on the immuno-adjuvant of cholera toxin B subunit

YAN Xiao-fang, ZHANG Pei*, DONG Shuo

(Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: cholera toxin(CT) is an effective adjuvant in mucosal immunity, therefore it becomes the focus in the immunity study. Just now the mechanisms of CT have been not solved. This article reviews the function of cholera toxin B subunit in mucosal immuno-adjuvant.

Key words: cholera toxin(CT); cholera toxin B subunit(CTB); mucosal adjuvant

黏膜免疫是机体免疫防御的第一道防线, 在防御细菌、病毒等病原体引起的肠道及呼吸道感染中起主要作用; 但黏膜表面特殊的理化性质, 减弱了黏膜免疫应答的强度, 甚至导致免疫耐受。良好的免疫佐剂能使少量的抗原诱导机体产生早期、高效且持久的免疫应答。霍乱毒素(cholera toxin, CT)具有较好的佐剂活性, 但又因其具有一定的毒性, 所以研究转向CT相关的无毒B亚单位(CTB)。本文就CTB的黏膜免疫佐剂作用的研究近况作一简要综述。

1 CT和CTB结构与作用机制

霍乱弧菌是由1个A和5个完全相同的B亚单位所构成的多亚单位大分子。A亚基是一条单链, 合成后常在194、195位氨基酸残基间裂解为CTA1与CTA2, 两者以二硫键连接。其中CTA1具有ADP-核糖基转移酶活性, 与CT的佐剂作用有密切关系; CTA2则连接CTA1和CTB。5个CTB亚单位彼此以非共价键结合成五聚体, 再通过CTA2环绕CTA1形成AB₅结构^[1]。CTB能与大多数哺乳动物细胞表面的神经节苷脂GM1特异性结合, 诱导细胞膜构型改变, 并将CTA转移到受体细胞膜上或胞浆

内, 随后CTA1与CTA2解离。CTA1能激活G蛋白, 并随之激活腺苷酸环化酶(AC), 引起细胞内环磷酸腺苷(cAMP)浓度升高, 最终导致腹泻。而CTB结合神经节苷脂GM1的功能, 可使连接的抗原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^[2]。Sun等^[3]发现CTB在黏膜免疫中的机制: (1)促进抗原通过黏膜屏障; (2)加强抗原被DC和其他抗原提呈细胞的提呈作用; (3)增强抑制性T细胞分泌TGF- β 。

2 CTB黏膜免疫佐剂研究现状

2.1 天然CTB的免疫佐剂活性 Tamara等^[4]用纯化的流感病毒A/YR/8/34(PR8, H1N1)血凝素(HA)单独或HA+CTB混合免疫小鼠, 4周后将其中的2组以HA加强免疫, 然后以致死量的病毒攻击并对免疫的小鼠的血清和鼻腔冲洗液中的抗体水平和肺内的病毒滴度进行测定。结果表明, HA+CTB免疫组不论是否进行加强免疫, 其鼻腔中的IgA、IgG抗体滴度

收稿日期: 2008-06-30; 修回日期: 2008-10-29

*通讯作者: jyzhangpei@163.com

和血清中的HI抗体水平均高于HA单独免疫组,比未加强免疫组分别高4、15和32倍;加强免疫组分别高50、300和256倍。Luci等^[5]研究发现阴道途径免疫接种CTB-OVA可诱导MHC-I类细胞毒反应,分泌抗体,促进黏膜局部DC摄取抗原。高玲等^[6]将3周龄雌性NOD小鼠60只随机分为磷酸缓冲液(PBS)阴性对照、1mg胰岛素阴性对照、CTB+胰岛素100ug、CTB+胰岛素1mg等4组。动态监测小鼠尿糖、血糖。结果显示,与PBS组比较,CTB+胰岛素100ug和CTB+胰岛素1mg两组能够减少NOD小鼠糖尿病的发生,降低小鼠糖尿病的累积发病率;后组的预防效果优于前组。

2.2 重组CTB的免疫活性 关于CTB免疫佐剂作用,较多的研究是用从CT全毒素中纯化天然CTB进行的。但是由于该制剂中存在的微量CT污染,故一直存在着争论。为澄清这一问题,一些研究者用无CT污染的重组CTB(rCTB)进行了研究。Coccia等^[7]采用SJL/J小鼠建立黏膜炎症模型(TNBS),实验表明,口服rCTB在TNBS诱导过程中可抑制TNBS大肠炎的进展,造模后则可使炎症消散。ELISA测定肠黏膜固有层单核淋巴细胞分泌的IFN- γ 和IL-12含量,rCTB明显降低TNBS小鼠LPMC的IL-12和IFN- γ 分泌。此项研究证实了CTB抑制黏膜Th1细胞,并且有望应用于CD的治疗。Isaka等^[8]以加或不加rCTB的白百破(DPT),对BLAB/c小鼠鼻腔免疫第35天处死小鼠,收集血液及肺部、鼻腔和肠道洗液,以及粪便、唾液和阴道分泌物,用ELISA法测定抗原特异性IgG、IgA和IgE抗体水平,用细胞培养法(CCM)测定血清白喉抗毒素滴度;用破伤风毒素中和法(TTN)测定破伤风抗毒素滴度;用Kaketsuken颗粒凝集法(KPA)测定破伤风和白喉抗毒素滴度。结果显示,加rCTB组的ELISA、CCM和KPA测定的血清白喉类毒素(DTd)特异性IgG水平均高于未加rCTB组。证明rCTB对DTd具有很好的佐剂作用。Holmgren等^[9]发现rCTB具有促进抗原提呈,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,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。

2.3 CT突变体 运用定点突变,筛选出无毒但仍保留CT佐剂性和免疫原性的分子,这是另一种分离CT佐剂性与毒性的思路。CTK 63是CT突变体之一,无毒,结构稳定,但是其佐剂性很弱。而

另一种CT突变体CTS106仅有1%的CT毒性,与野生型CT有相似的佐剂效果。CT突变体的研究还在深入进行之中。随着CT黏膜佐剂作用和免疫原性研究的深入,特别是其亚单位和突变体的研究,将为霍乱弧菌疫苗开发和黏膜免疫佐剂研究提供新思路^[2]。

3 霍乱毒素B亚单位的应用

3.1 载体蛋白 霍乱毒素B亚单位作为免疫载体的应用受到广泛的重视。CTB是霍乱毒素的无毒亚单位,它与大肠杆菌热敏肠毒素B亚单位(LTB)一样,具有结合神经节苷脂GM1的功能,可使毒性A亚单位紧密结合在肠道黏膜细胞表面,使融合蛋白更易与消化道黏膜作用,进而引起一系列生理生化反应,产生更强的免疫效果。CTB还可以作为某些外源多肽的稳定载体。当它与化学偶联或基因融合的抗原同时进入体内之后,会激起融合表位抗原的免疫原性,使机体产生强烈的免疫反应,有可能达到免疫保护作用^[5]。

3.2 免疫佐剂 肽疫苗是新一代疫苗,以其不含无用成分、全无毒副作用而受到研究者的重视。由于合成肽相对分子质量小,所含Th抗原决定簇数量少,因此免疫原性差,不能刺激机体产生较强的保护性免疫效应以抵抗病原体感染。现在一般通过形成环肽、与载体蛋白交联以及使抗原决定簇基因与载体蛋白基因融合表达等方法提高肽疫苗的免疫原性。霍乱毒素B亚单位无毒性,具有很强的免疫原性,能刺激产生黏膜IgA和血清IgG抗体,具有能加强抗原表位的抗原性的特点,故B亚单位常被选作肽疫苗的佐剂。很多实验室证实了CTB可以作为免疫佐剂,用于强化多糖、小肽等半抗原。刘吏婷等^[10]用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。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。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。

3.3 口服免疫蛋白 口服疫苗的研究已成为许多流行性疾病的预防研究中的一个重要组成部分,尤其是某些只通过肠道免疫产生的分泌性IgA才能清除已感染病菌的疾病口服疫苗的研究更显重要。研究证实CTB能抑制黏膜Th1细胞,并可应用于克隆病的治疗^[7]。而CTB蛋白是用于疫苗口服的一种理想

蛋白质,因为它不仅可以提高肠道对蛋白质的吸收率,而且可以作为免疫佐剂,提高机体产生的抗体效价。CTB亚单位除了通过神经节苷脂GM1结合而使得它协助口服疫苗进入细胞外,它还能特异地影响小肠黏膜细胞间的联结或小带闭锁结构,增加通透性,防止口服疫苗在小肠黏膜处被消化分解,保持其抗原性,使机体产生良好的免疫反应。另外,CTB是很好的口服和鼻黏膜免疫剂,当用做口服抗原时,它可以引起消化道黏膜产生分泌型抗体,同时诱导出血清中的抗体。很多实验室证实了CTB既可以作为免疫试剂,又可作为免疫佐剂^[3,7]。

4 研究方向

目前研究认为CT具有很强黏膜佐剂性,但CT的强毒性使其应用受限。作为未来的CT佐剂,CTB是一种良好的免疫佐剂和输送抗原载体,通过黏膜途径免疫其效果更佳。而将其与目的抗原偶联或表达成融合蛋白后可增强其佐剂和载体作用,使机体产生较强的抗特异性抗原的黏膜和系统免疫应答。近期研究证明CTB能下调Th1介导的自身免疫性疾病,如炎症性肠病、类风湿性关节炎、糖尿病,所以具有潜在的治疗作用,至于CTB如何连接到黏膜上而诱导信号转导,其信号转导到是否作用所有细胞,是否受限于免疫细胞群,其信号转导和转运递呈功能是否有某种联系等问题有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Schulze K, Medina E, Talay SR, et al. Characterization of the domain of fibronectin-binding protein I of *Streptococcus*

pyogenes responsible for elicitation of a protective immune response. *Infect Immun*, 2001, 69(1): 622-5

- [2] Pizza M, Giuliani M, Fontana M, et al. Mucosal vaccines: nontoxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, 2001, 19(17-19): 2534-41
- [3] Sun JB, Raghavan S, Sjöling A, et al. Oral tolerance induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates both Foxp3⁺ CD25⁺ and Foxp3⁻ CD25⁻ CD4⁺ regulatory T cells. *J Immunol*, 2006, 177(11): 7634-44
- [4] Tamura S, Funato H, Hirabayashi Y, et al. Functional role of respiratory tract heamagglutinin-specific IgA antibodies in protection against influenza. *Vaccine*, 1990, 8(5): 479-85
- [5] Luci C, Hervouet C, Rousseau D, et al. Dendritic cell-mediated induction of mucosal cytotoxic responses following intravaginal immunization with the nontoxic B subunit of cholera toxin. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2749-57
- [6] 高玲, 张大兵, 欧阳凤秀, 等. 霍乱毒素B亚单位胰岛素混合蛋白抗糖尿病作用. *中国公共卫生*, 2006(10): 1245-52
- [7] Coccia EM, Remoli ME, Giacinto CD. Cholera toxin subunit B inhibits IL-12 and IFN- γ production and signaling in experimental colitis and Crohn's disease. *Gut*, 2005, 54: 1558-64
- [8] Isaka M, Komiya T, Takahashi M, et al. Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. *Vaccine*, 2004, 22(23-24): 3061-8
- [9] Holmgren J, Adamsson J, Clemens J, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett*, 2005, 97(2): 181-8
- [10] 刘史婷, 江海燕, 颜艳, 等. 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. *西北农业学报*, 2007, 16(4): 202-5