

不同佐剂对柯萨奇病毒A组16型灭活疫苗诱导小鼠体液免疫应答的影响

张浩然^{1,2}, 姜莉², 杨二霞², 陈璐², 刘碧云², 刘鹏², 杜倩^{1*}

1. 徐州医科大学, 江苏 徐州 221004

2. 艾美康淮生物制药(江苏)有限公司, 江苏 泰州 225300

摘要: 目的 探索氢氧化铝佐剂、N, O-CMCS纳米粒佐剂在不同免疫方式、不同免疫剂量时对柯萨奇病毒A组16型(CA16)灭活疫苗诱导小鼠体液免疫应答的影响。方法 将ICR小鼠随机分为阴性对照组, CA16灭活疫苗高、低剂量(200、40 U)组; 氢氧化铝佐剂组, 氢氧化铝佐剂CA16灭活疫苗高、低(200、40 U)剂量组; N, O-CMCS纳米粒佐剂组, N, O-CMCS纳米粒佐剂CA16灭活疫苗高、低(200、40 U)剂量组, 共9个大组。每个大组按不同免疫方式(im、ip、id)随机分为3个小组, 共计27个小组, 每个小组6只小鼠(雌雄各半), 注射量为200 μ L/只, 共免疫2次, 间隔4周。分别在初次免疫后第28天、加强免疫后的第14、28天采集小鼠尾静脉血, 采用微量中和试验法检测小鼠血清抗体水平, 计算中和抗体几何平均滴度(GMT), 中和抗体滴度 $\geq 1:8$ 判定为阳性, 中和抗体滴度 $< 1:8$ 判定为阴性, 计算抗体阳转率。结果 氢氧化铝佐剂CA16灭活疫苗的抗体GMT值和中和抗体阳转率最高, 无佐剂疫苗组其次, N, O-CMCS佐剂疫苗组最低; CA16灭活疫苗组的高剂量组的抗体GMT值和中和抗体阳转率均明显高于低剂量; 在氢氧化铝佐剂CA16灭活疫苗组中比较中和抗体阳转率, id优于im。结论 选用氢氧化铝佐剂、CA16灭活疫苗高剂量、id免疫方式可显著增强CA16灭活疫苗诱导小鼠的体液免疫应答。

关键词: 柯萨奇病毒A组16型病毒; 灭活疫苗; 免疫方式; 佐剂; 体液免疫

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)05-0829-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.05.006

Effect of different adjuvants on humoral immune response of mice induced by Cocksackievirus A 16 inactivated vaccine

ZHANG Haoran^{1,2}, JIANG Li², YANG Erxia², CHEN Lu², LIU Biyun², LIU Peng², DU Qian¹

1. Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004

2. Aimekanghuai biopharmaceutical (Jiangsu) Co., Ltd., Taizhou 225300, China

Abstract: Objective To explore the effect of aluminum hydroxide adjuvant and N, O-CMCS nanoparticles adjuvant on the humoral immune response induced by CA16 inactivated vaccine in different immunization methods and doses. **Method** ICR mice were randomly divided into 9 groups: N, O-CMCS nanoparticles adjuvant vaccine group, aluminum hydroxide adjuvant vaccine group, non adjuvant vaccine group, aluminum hydroxide adjuvant group, N, O-CMCS nanoparticles adjuvant group and PBS control group. The vaccine was divided into high and low dose groups. Each large group was randomly divided into three groups, using the im, ip and im. 6 mice (half male and female) immunized under each immunization method. The amount of injection was 200 μ L / mouse. The mice were immunized twice, with an interval of 4 weeks. The tail vein blood of mice was collected on the 28th day after primary immunization, the 14th day and the 28th day after intensive immunization, and the serum antibody level of mice was detected by micro neutralization test. The geometric mean titer (GMT) of neutralizing antibody was calculated. If the titer of neutralizing antibody was $\geq 1:8$, it was positive, if the titer of neutralizing antibody was $< 1:8$, it was negative. The positive conversion rate of antibody was calculated. **Results** The antibody GMT and neutralizing antibody positive rate were highest in the immunized aluminum hydroxide adjuvant vaccine, followed by the non-adjuvant vaccine group, and the lowest in the N, O-CMCS nanoparticles adjuvant vaccine group. The effect of high dose was significantly higher than that of low dose in all vaccine groups.

收稿日期: 2019-12-24

基金项目: 国家重大新药专项(2014ZX9102042001)

第一作者: 张浩然, 研究方向为疫苗开发。E-mail: 904258636@qq.com

*通信作者: 杜倩 E-mail: duqian81@126.com

The positive conversion rate of neutralizing antibody in id injection is better than that in intramuscular injection in the aluminum hydroxide adjuvant vaccine group. **Conclusion** The use of aluminum hydroxide adjuvant, high dose group, and intradermal immunization can significantly enhance the humoral immune response of mice induced by CA16 inactivated vaccine.

Key words: Cocksackievirus A16; inactivated vaccine; immunization mode; adjuvant; humoral immunity

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)是一种由肠道病毒引起的急性传染病,感染人群多为婴幼儿,大多数患者表现为发热和口腔内部、手掌和脚底出现皮肤疱疹或皮疹,少数患者会出现严重的并发症,包括脑干脑炎、心肌炎、急性弛缓性麻痹等,个别重症患者可出现因心肺衰竭而立即死亡^[1]。柯萨奇病毒A组16型(Cocksackievirus A16, CA16)与肠道病毒71型(Enterovirus 71, EV71)是HFMD的主要病原体^[2]。与EV71相比,CA16所致疾病症状较轻,但其分布广,发病人数多^[3],近年也发生了CA16导致手足口病重症病例的发生,如心肌炎和顽固性休克^[4]。目前,在已有EV71疫苗上市的情况下,研发CA16疫苗对预防HFMD具有重大意义。

氢氧化铝作为传统佐剂,使用广泛,目前已在甲肝、乙肝、脊髓灰质炎、狂犬病等多种疫苗中应用,至今已超过数十亿剂次的含铝佐剂疫苗被接种。该佐剂化学分子式为 $\text{AlO}(\text{OH})$,主要基团为羟基,等电点为11.4。在pH 7.4的溶液中带正电,对酸性蛋白疫苗(带负电)具有良好的吸附作用^[5],其制备的疫苗外观应为微乳白色混悬液体,可因沉淀而分层,易摇散,不应有摇不散的块状物^[6]。但氢氧化铝佐剂作用机制尚不明确,主要假说有抗原储存库效应^[7]、促吞噬效应^[8]、促进Th2型免疫反应和补体激活^[9]等。

近年来,随着疫苗研究的飞速发展,佐剂得到广泛关注。壳聚糖纳米粒因独特的理化性质以及生物学特点成为疫苗佐剂研究的热点,其中也包括壳聚糖的一些衍生物,如羧甲基壳聚糖^[10]、三甲基壳聚糖^[11]等。N, O-羧甲基壳聚糖(N, O-Carboxymethyl Chitosan, N, O-CMCS)纳米粒佐剂是一种脱乙酰度在85%的壳聚糖衍生物,粒径约为150 nm,具有良好的水溶性和稳定性,在pH=7.4溶液中带正电,对呈酸性蛋白具有良好的吸附作用。

本研究旨在探索氢氧化铝佐剂与N, O-CMCS纳米粒佐剂在CA16灭活疫苗中的佐剂作用,为CA16灭活疫苗的研究寻求一种安全、有效的佐剂。并初步探索免疫剂量、不同免疫方式对CA16灭活疫苗诱导小鼠体液免疫应答的影响。

1 材料

1.1 细胞、病毒、佐剂

vero细胞,由中国医学科学院医学生物学研究所惠赠;CA16灭活疫苗,由艾美康淮生物制药(江苏)有限公司自主分离、鉴定的CA16病毒(GX-20K-D株,B基因型,genbank号Jn590244)制备;氢氧化铝佐剂由艾美康淮生物制药(江苏)有限公司供应中心制备;N, O-CMCS纳米粒佐剂为本实验室自制。

1.2 实验动物

ICR小鼠(清洁级)、雌雄各半,体质量18~22 g,购于南京青龙山动物繁殖场,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2018-0001。

1.3 主要试剂

CA16抗原国家标准品(批号201501001),购于中国药品食品检定研究院;CA16抗原ELISA检测试剂盒(批号20190614),由艾美康淮生物制药(江苏)有限公司研发部制备;新生牛血清(批号20150309),购于兰州民海生物工程有限公司;MEM溶液(批号2019-01F)、3%谷氨酰胺溶液(批号2019-02F)和6.6%碳酸氢钠溶液(批号2019-03F),由艾美康淮生物制药(江苏)有限公司供应中心提供。

1.4 主要仪器

4111型细胞培养箱、全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司产品);冷冻离心机(澳大利亚Dynamica公司产品);电子天平(德国sartorius公司产品)。

2 方法

2.1 疫苗的配制

使用CA16 ELISA抗原检测试剂盒与CA16抗原国家标准品(2 000 U/mL)测定CA16灭活疫苗原液的抗原含量,该试剂盒采用双抗体夹心法,96孔板内包被有CA16多克隆抗体(多抗),分别将CA16灭活原液与国家标准品在孔内进行对倍梯度稀释,上样量为100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,洗板5次后加入辣根过氧化氢酶标记的酶标CA16抗体,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗板5次后加入显色液,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min,加入2 mol/L硫酸溶液终止反应。利用酶标仪检测450、630 nm波长下的各孔吸光

度(A)值。采用Statistic软件的双平行线分析法,计算CA16灭活疫苗原液的抗原含量。

利用氢氧化铝佐剂、N, O-CMCS纳米粒佐剂、2 mmol/L PBS分别将CA16灭活疫苗原液配制成分原含量为1 000与200 U/mL两组疫苗样品,两种佐剂工作质量浓度均为0.5 mg/mL,佐剂与抗原室温需充分混合30 min。每只小鼠200 μ L的注射体积,即为每针免疫剂量200、40 U(高、低剂量)。

2.2 动物分组及免疫

将ICR小鼠随机分为9个大组:阴性对照组,CA16灭活疫苗高、低剂量(200、40 U)组;氢氧化铝佐剂组,氢氧化铝佐剂CA16灭活疫苗高、低(200、40 U)剂量组;N, O-CMCS纳米粒佐剂组,N, O-CMCS纳米粒佐剂CA16灭活疫苗高、低(200、40 U)剂量组。每个大组按不同免疫方式(im、ip、id)随机分为3个小组,共计27个小组,每个小组6只小鼠(雌雄各半),注射量为200 μ L/只,共免疫2次,间隔4周。分别在初次免疫后第28天、加强免疫后的第14天和第28天采集小鼠尾静脉血,分离小鼠血清,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

2.3 微量中和试验法检测小鼠血清中的抗CA16中和抗体水平

将各组血清于56 $^{\circ}$ C、30 min水浴灭活,在96孔板内将各组小鼠免疫血清自1:4起2倍系列稀释至1:1 024(用含2%新生牛血清的MEM稀释),每孔50 μ L,分别与50 μ L 500 CCID₅₀的CA16病毒收获液充分混合,5% CO₂的恒温培养箱37 $^{\circ}$ C中和2 h后,加入细胞密度为1 $\times$ 10⁵/mL的vero细胞悬液,100 μ L/孔,每块板中均设立空白细胞对照,将96孔板置5% CO₂的恒温培养箱37 $^{\circ}$ C培养,7 d后,显微镜下观察细胞病变情况,病变为阳性、未病变(与空白细胞对照相同)为阴性。记录中和抗体滴度,以此计算中和抗体几何平均滴度(geometric mean titer, GMT)。中和抗体滴度 $\geq$ 1:8判定为阳性,中和抗体滴度<1:8判定为阴性,以此计算抗体阳转率。

2.4 统计学分析

统计学分析用GraphPad Prism 5.00软件进行,采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)分析组间数据。

3 结果

3.1 免疫小鼠血清抗体阳转率结果

2个佐剂组与阴性对照组抗体阳转率均为0。加强免疫后,在同一免疫方式、同一免疫剂量下,氢氧化铝佐剂疫苗组中和抗体阳转率最高,无佐剂疫

苗组其次,N, O-CMCS纳米粒佐剂疫苗组最低(低于无佐剂组);在同一佐剂、同一免疫方式下,比较不同剂量组中和抗体阳转率,除氢氧化铝佐剂疫苗组外其余各组均体现高剂量组免疫效果明显高于低剂量组;同一佐剂、同一剂量,比较不同免疫方式下中和抗体阳转率,发现ip免疫方式效果最好。在N, O-CMCS纳米粒佐剂疫苗组与无佐剂疫苗组中发现im优于id,但在氢氧化铝佐剂疫苗组,发现中和抗体阳转率id优于im。见表1。

3.2 免疫小鼠血清中和抗体GMT结果

初次免疫后28 d,无论剂量高低,各组的中和抗体GMT值均较低。

表1 各组小鼠血清抗体阳转率

Table 1 Serum antibody positive conversion rates of mice in various groups

佐剂	免疫方式	CA16灭活疫苗/U	抗体阳转率/%		
			初免后28 d	加强免疫后14 d	加强免疫后28 d
无	im	0	0	0	0
		40	0	33.3	50
		200	16.7	83.3	100
	ip	0	0	0	0
		40	0	83.3	83.3
		200	40	100	100
	id	0	0	0	0
		40	0	0	0
		200	16.7	66.7	66.7
N, O-CMCS 纳米粒 佐剂	im	0	0	0	0
		40	0	16.7	16.7
		200	0	33.3	83.3
	ip	0	0	0	0
		40	0	0	0
		200	0	100	100
	id	0	0	0	0
		40	0	16.7	0
		200	0	16.7	33.3
氢氧化铝 佐剂	im	0	0	0	0
		40	33.3	83.3	100
		200	16.7	100	100
	ip	0	0	0	0
		40	66.7	100	100
		200	66.7	100	100
	id	0	0	0	0
		40	83.3	100	100
		200	50.0	100	100

加强免疫后 14 d,低剂量组中,N,O-CMCS 纳米粒 CA16 灭活疫苗组与无佐剂疫苗组中和抗体 GMT 值均较低,各免疫方式间无明显差异。氢氧化铝佐剂疫苗 ip 组的 GMT(161.27)明显高于 id 的 GMT(64.00)与 im 的 GMT(71.84);高剂量组中,氢氧化铝佐剂疫苗组优于无佐剂疫苗组,优于 N,O-CMCS 纳米粒疫苗组,各组在免疫方式上均体现 ip 优于 im 和 id。

加强免疫后 28 d,低剂量组中,与初免后 28 d 和加强免疫 14 d 比较,氢氧化铝佐剂疫苗组 GMT 有所提高,其中 ip 组 GMT 值最高(203.19),N,O-CMCS 纳米粒疫苗组与无佐剂疫苗组 GMT 值无明显升高;高剂量组中,氢氧化铝佐剂疫苗组的 GMT 值高于其他各组,其中 ip 方式最高(406.37),id 方式 GMT(228.07)略高于后肢 im 方式(181.02)。N,O-CMCS 纳米粒疫苗组 ip 方式 GMT 值最高为 22.63,低于无佐剂疫苗组 ip 方式的 GMT 值(322.54),反映出 N,O-CMCS 纳米粒在免疫 2 个月的时间内不利于诱导小鼠体液免疫应答的特性。见表 2 和图 1。

4 讨论

CA16 病毒灭活疫苗目前暂无成品上市,本次实验以无佐剂疫苗组为对照,探索了 N,O-CMCS 纳米粒佐剂与氢氧化铝佐剂在该病毒灭活疫苗中的作用。以期筛选出能够增强 CA16 灭活疫苗的免疫效果的适用佐剂。实验结果显示,CA16 全病毒灭活疫苗在无佐剂的情况下能诱导产生一定的抗体水平。N,O-CMCS 纳米粒做为 CA16 灭活疫苗佐剂在本次实验中却出现了比无佐剂疫苗组还低的中和抗体水平,无法作为 CA16 灭活疫苗的佐剂使用。有研究表明,N,O-CMCS 纳米粒具有极强的缓释效果^[12],推测小鼠免疫后的 2 个月内抗原被包裹,缓释出来的抗原水平较低,造成小鼠体液免疫应答较弱。但应用该种佐剂进行缓释型生物制品的研究及其长期抗体水平监测,也许会未来 N,O-CMCS 佐剂研究的一个探索方向。氢氧化铝做为 CA16 灭活疫苗的佐剂在本次实验中与无佐剂疫苗相比显著增强了 CA16 灭活疫苗诱导小鼠的体液免疫应答,体现出氢氧化铝做为该灭活疫苗佐剂的良好适用性。

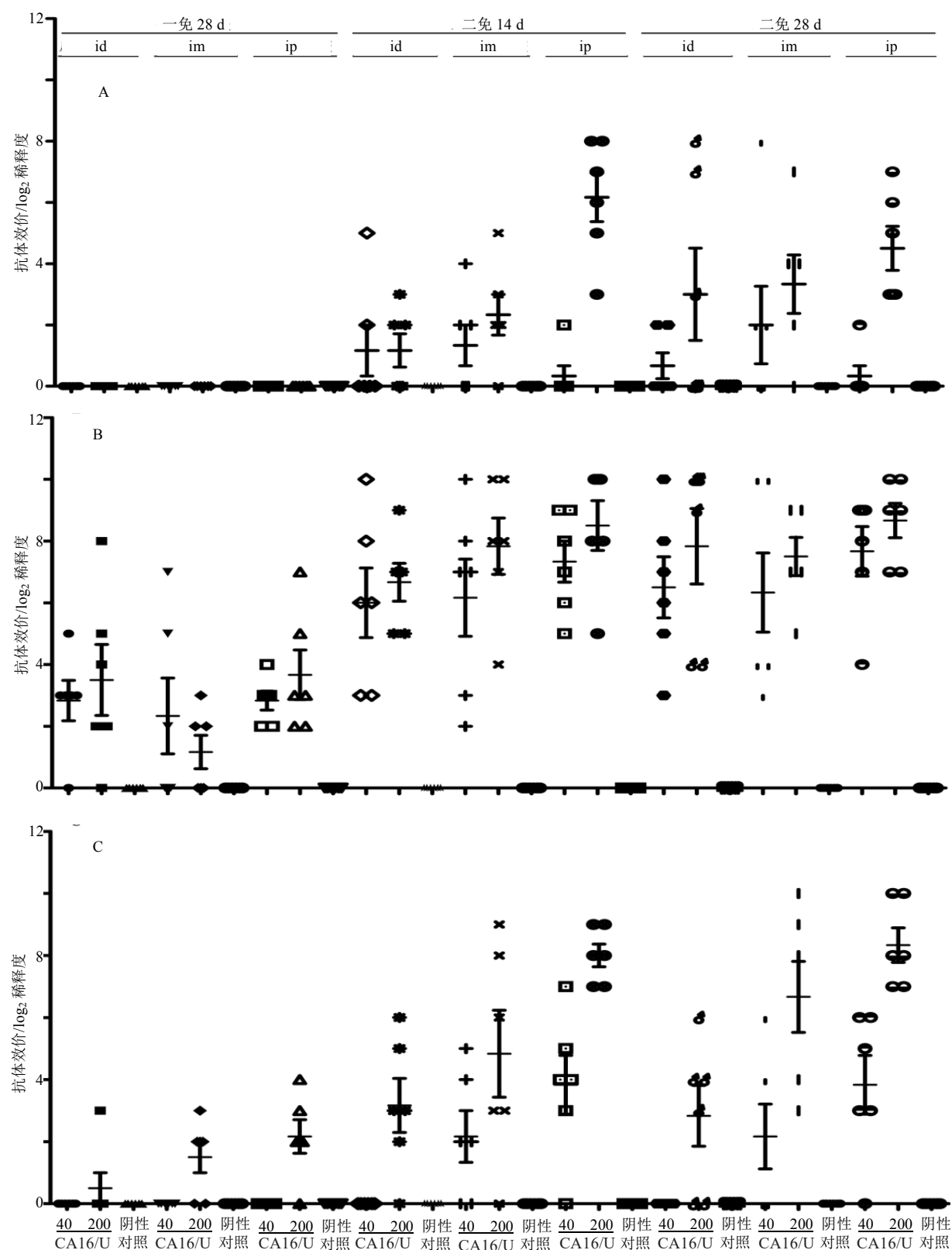
在氢氧化铝佐剂疫苗组中,本研究分别采用了 im、ip 和 id 的方式免疫小鼠。结果显示,ip 的免疫方式效果最佳,其主要原因可能是腹膜上存在着大量游走的非特异性免疫细胞,如巨噬细胞、树突状细胞以及 CD4 和 CD8 等细胞因子。疫苗采用 ip 免疫

表 2 各组小鼠血清中和抗体 GMT(1:x)

Table 2 GMTs of neutralizing antibody in sera of mice in various groups(1:x)

佐剂	免疫方式	CA16 灭活疫苗/U	GMT(1:x)		
			初免后 28 d	加强免疫后 14 d	加强免疫后 28 d
无	im	0	—	—	—
		40	1.26	4.49	4.49
		200	2.83	28.51	101.59
	ip	0	—	—	—
		40	—	14.25	14.25
		200	4.49	256.00	322.54
	id	0	—	—	—
		40	—	—	—
		200	1.41	8.98	7.13
	im	0	—	—	—
		40	—	2.52	4.00
		200	—	5.04	10.08
N,O-CMCS 纳米粒佐剂	ip	0	—	—	—
		40	—	1.26	1.26
		200	—	71.84	22.63
	id	0	—	—	—
		40	—	2.24	1.59
		200	—	2.24	8.00
氢氧化铝佐剂	im	0	—	—	—
		40	5.04	71.84	80.63
		200	2.24	228.07	181.02
	ip	0	—	—	—
		40	7.13	161.27	203.19
		200	12.70	362.04	406.37
	id	0	—	—	—
		40	7.13	64.00	90.51
		200	11.31	101.59	228.07

时,抗原直接与这些非特异性免疫细胞作用,所产生的免疫反应效果最为明显,但 ip 的方法不适用于疫苗在人体上的大规模应用。本次实验选用的 id 免疫在一免 14 d 抗体阳转率就得以大幅提升;比较二免 28 d 抗体 GMT 值,id 免疫略高于 im 免疫。这些结果均表明,氢氧化铝佐剂 CA16 灭活疫苗采用 id 免疫的方式可以获得良好的免疫效果。有研究表明 sIPV(Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗)id 免疫具有良好的免疫原性和安全性^[13]。此外有研究发现,1/5 和 1/3 剂量下 sIPV id 免疫阳转率与 im 免疫全剂量相当^[14]。在本次实验中氢氧化铝佐剂 CA16 疫苗采用 id 免疫低剂量的抗体阳转率优于 im 免疫高剂量



A-N, O-CMCS nanoparticles vaccine group; B-aluminum hydroxide adjuvant vaccine group; C-adjuvant free vaccine group

A-N, O-CMCS nanoparticles vaccine group; B-aluminum hydroxide adjuvant vaccine group; C-adjuvant free vaccine group

图1 免疫不同时间各组小鼠血清中和抗体效价散点图

Fig. 1 Scatter diagram of neutralizing antibody titer in serum of mice immunized with CA16 vaccine at different times

组,即使用较低剂量即可诱导较强的小鼠体液免疫应答,与同类研究的结果相一致。皮内具有丰富的抗原提呈细胞(APC),如树突状细胞(DC)、朗格汉斯细胞(LC)等。本实验结果与这类细胞的作用具有一定的相关性,但所激发的免疫机理及其结果,尚待进一步研究。

对CA16灭活疫苗剂量的研究表明,不同剂量在小鼠体内所诱导产生的体液免疫应答水平存在一定的差异性,这与其他类似疫苗的研究结果是相似的^[15]。在佐剂组和PBS对照组中发现,N,O-CMCS纳米粒佐剂与氢氧化铝佐剂的抗体阳转率和GMT值均为0,证明疫苗中的这些成分并无特异抗原性。

采用氢氧化铝佐剂、CA16灭活疫苗高剂量、id免疫的方式可显著增强柯萨奇病毒A组16型灭活疫苗诱导小鼠的体液免疫应答。为该种疫苗的佐剂选择、免疫剂量、免疫方式提供了研究数据,为该产品的研究开发奠定了基础。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2008年版) [J]. 首都公共卫生, 2008, 2(4): 146-148.
- [2] McMinn P C. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(1): 91-107.
- [3] 史颖颖. 柯萨奇病毒A16型分子流行病学分析及其诱导自噬机制的初步研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2016.
- [4] Wang C Y, Li Lu F, Wu M H, et al. Fatal coxsackievirus A16 infection [J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(3): 275-276.
- [5] Rinella J V Jr, White J L, Hem S L. Treatment of aluminium hydroxide adjuvant to optimize the adsorption of basic proteins [J]. Vaccine, 1996, 14(4): 298-300.
- [6] 中国药典 [S]. 三部. 2015.
- [7] HogenEsch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants [J]. Vaccine, 2002, 20 Suppl 3: S34-S39.
- [8] Mannhalter J W, Neychev H O, Zlabinger G J, et al. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation [J]. Clin Exp Immunol, 1985, 61(1): 143-151.
- [9] Güven E, Duus K, Laursen I, et al. Aluminum hydroxide adjuvant differentially activates the three complement pathways with major involvement of the alternative pathway [J]. PloS One, 2013, 8(9): e74445.
- [10] Kim J J, Nam J P, Nah J W, et al. Immunoadjuvant efficacy of N-carboxymethyl chitosan for vaccination via dendritic cell activation [J]. J Med Food, 2013, 17(2): 268-277.
- [11] Verheul R J, Hagenaaars N, van Es T, et al. A step-by-step approach to study the influence of N-acetylation on the adjuvanticity of N, N, N-trimethyl chitosan (TMC) in an intranasal nanoparticulate influenza virus vaccine [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 45(4): 467-474.
- [12] Prego C, Paolicelli P, Díaz B, et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection [J]. Vaccine, 2010, 28(14): 2607-2614.
- [13] Ma L, Cai W, Sun M B, et al. Analyzed immunogenicity of fractional doses of Sabin-inactivated poliovirus vaccine (sIPV) with intradermal delivery in rats [J]. Hum Vaccin Immunother, 2016, 12(12): 3125-3131.
- [14] 马磊, 寸怡娜, 苏敏, 等. Wistar大鼠皮内免疫Sabin株脊髓灰质炎灭活疫苗的免疫持久性及加强免疫效果研究 [J]. 病毒学报, 2019, 35(1): 6-11.
- [15] 黄茂娟, 庄伟煌. 淋巴瘤患者接种不同剂量乙肝疫苗的免疫效果及影响因素分析 [J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(6): 1856-1861.