

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.12.04

皂树皂苷 QS21 增强猪支原体肺炎活疫苗 滴鼻免疫小鼠效果评价

张珍珍, 韦艳娜, 王 佳, 于岩飞, 冯志新, 邵国青, 熊祺琰*

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 南京 210014)

[收稿日期] 2018-09-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 12-0024-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为提高猪支原体肺炎活疫苗的滴鼻免疫效果,以猪支原体肺炎(168 株)活疫苗为抗原,以 QS21 为免疫佐剂混合后滴鼻免疫小鼠,ELISA 法检测免疫效果,包括血清和支气管肺泡灌洗液中抗原特异性抗体水平,并测定了 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、Th2 型细胞因子 IL-4 和 Th17 型细胞因子 IL-17 的分泌情况。结果表明, QS21 能激活黏膜和全身性的体液免疫,升高血清和支气管肺泡灌洗液中 IgG、IgG1、IgG2a 抗体含量,并能提高支气管肺泡灌洗液中黏膜免疫抗体 sIgA 的含量。QS21 还能显著增加支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IFN- γ 和 IL-17 的分泌,激活 Th1、Th2 和 Th17 型细胞免疫应答。以上结果表明 QS21 能有效激活免疫系统,提示 QS21 可作为猪肺炎支原体活疫苗的候选黏膜佐剂。

[关键词] QS21; 佐剂; 滴鼻; 猪支原体肺炎活疫苗

Adjuvant QS21 Enhances Immune Responses in Mice Intranasally Immunized *Mycoplasma hyopneumoniae* Live Vaccine

ZHANG Zhen-zhen, WEI Yan-na, WANG Jia, YU Yan-fei,

FENG Zhi-xin, SHAO Guo-qing, XIONG Qi-yan*

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Key Laboratory of Veterinary

Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Corresponding author: XIONG Qi-yan, E-mail: qianxiong@163.com

Abstract: To improve intranasally immunized *Mycoplasma hyopneumoniae* live vaccine, this study used *Mycoplasma hyopneumoniae* live vaccine (168 strains) as antigen, mixed with QS21 as immune adjuvant, and then immunized mice by intranasally injection. ELISA method was used to detect immune effect, including the level of antigen-specific antibodies in serum and bronchoalveolar lavage fluid. The Th1 type cytokine IFN- γ , Th2 type cytokine IL-4 secretion and Th17 type cytokines IL-17 were also determined. The results showed that QS21 induced mucosal and systemic humoral immune response. QS21 increased the antibody level of immunized mice,

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20160583); 国家自然科学基金(31700158)

作者简介: 张珍珍, 博士, 助理研究员, 从事猪肺炎支原体感染机制及佐剂相关研究。

通讯作者: 熊祺琰。E-mail: qianxiong@163.com

promoted the production of IgG, IgG1, IgG2a antibodies in serum and bronchoalveolar lavage fluid, and increased the level of mucosal immune antibody sIgA. QS21 significantly increased the secretion of IL-4, IFN- γ and Th17 in bronchoalveolar lavage fluid and increased Th1, Th2 and Th17 type immune responses. The above results indicate that QS21 has great advantages in inducing immune responses and has the prospect of developing as a mucosal candidate adjuvant for the *Mycoplasma pneumonia* live vaccine.

Key words: QS21; adjuvant; intranasal; *Mycoplasma hyopneumoniae* live vaccine

猪支原体肺炎, 又称作猪气喘病是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 感染引起的一种慢性呼吸道传染病, 具有高传染性和高致病性, 同时由于感染后造成生产性能降低, 给养猪业带来巨大的损失^[1]。目前, 国内外主要通过疫苗免疫来防控猪支原体肺炎^[2-3]。猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗临床上通过肺内免疫具有很好的免疫保护效果。为了进一步拓展猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗的临床应用, 目前主要围绕猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗新的免疫途径进行开发。前期利用猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗滴鼻免疫试验猪, 具有一定的免疫保护效果, 但其免疫效果仍低于肺内免疫组^[4]。因此需要配合佐剂提高猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗滴鼻免疫效果。

现代中药化学研究表明中药包含的皂苷^[5]、多糖^[6]等成分具有良好的免疫调节作用, 可以被开发成免疫佐剂。QS21 是南美皂树 (*Quillaja Saponaria Molina*) 树皮中分离纯化到的活性皂苷成分, 其主要化学成分为酰化三萜糖甙, 分子量为 1990 Da^[7]。以 QS21 作为主要成分的疫苗佐剂如 AS01、AS04 已批准应用于人用疫苗, 能显著增强疫苗的保护效率^[8]。为了提高猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗滴鼻免疫效果, 研究拟利用 QS21 佐剂联合猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗滴鼻免疫小鼠, 探讨其免疫效果。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗, 批号 20170518, 由农业部兽用生物制品工程技术重点实验室制备提供; QS21 (商品名: VSP) 购自赛德奥生物科技 (北京) 有限公司; 小鼠 IL-4 ELISA 检测试剂盒、小鼠 IL-17 ELISA 检测试剂盒、小鼠 IFN- γ

ELISA 检测试剂盒购自武汉基因美生物科技有限公司。小鼠 IgG 抗体购自武汉博士德生物公司。小鼠 IgA、IgG1、IgG2a 抗体购自 BETHYL 公司。

1.2 动物分组及免疫 BALB/c 雌性小鼠, 购自扬州大学医学比较中心。随机分成 3 组, 分别为 QS21+疫苗组、疫苗组和对对照组。QS21+疫苗组滴鼻免疫 QS21 (6.25 $\mu\text{g}/\text{只}$) 和猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗 ($10^7\text{CCU}/\text{只}$); 疫苗组滴鼻免疫猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗 ($10^7\text{CCU}/\text{只}$); 对照组仅滴鼻同体积的 PBS 溶液。首免 14 d 后加强免疫 1 次, 免疫剂量与首免一致。

1.3 抗体检测 在末次免疫后第 14 天 (D14)、第 21 天 (D21)、第 28 天 (D28) 和第 42 天 (D42) 分别对小鼠进行眼眶采血, 每组 8 只, 1000 g 离心 15 min, 分离血清, 检测小鼠血清中 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平。D28 和 D42 分别取小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF), 每组 5 只, 300 g 离心 10 min, 收集上清, 检测其中 IgA、IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平。

1.4 细胞因子检测 D28 和 D42 天收集小鼠血清和 BALF, 离心后收集上清。根据 ELISA 试剂盒说明检测血清和 BALF 中 IL-4、IL-17 和 IFN- γ 的含量。

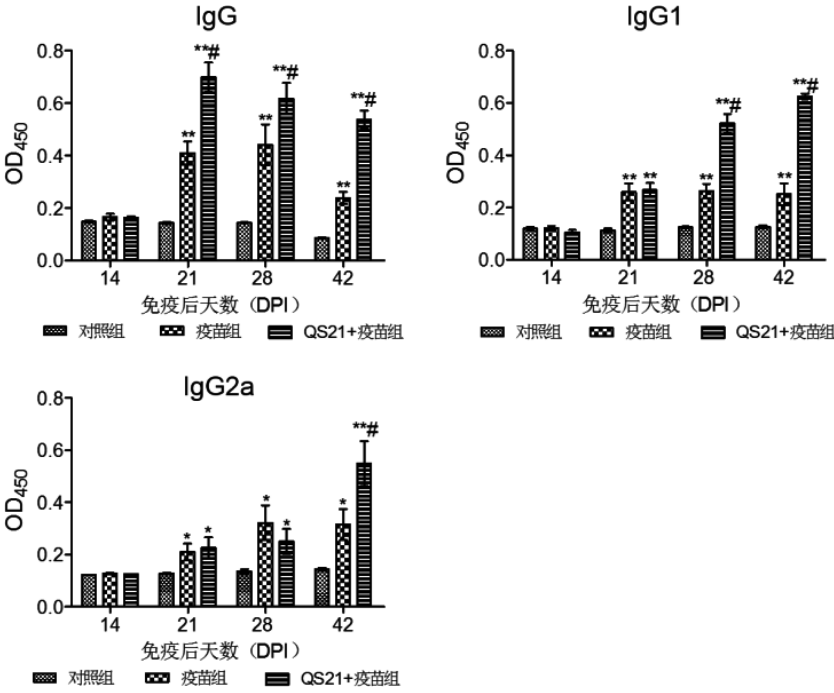
1.5 数据分析 数据采用 Graphpad 软件进行统计学分析, 结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用双侧 t 检验 (two-tailed unpaired t test) 分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 QS21 联合疫苗免疫对小鼠血清中 IgG 抗体及亚型的影响 QS21 与猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗共同滴鼻免疫小鼠, 不同时间点眼眶取血并分离血清, 利用 ELISA 法检测小鼠血清中猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗特异性 IgG 抗体水平。结果显示

(图 1),对照组不能诱导产生活疫苗特异性 IgG 抗体;末次免疫 14 d 后,疫苗组能产生较高的活疫苗特异性 IgG 抗体,与对照组相比有显著性差异($P<0.01$);QS21+疫苗组能够显著提高血清中活疫苗特异性 IgG 抗体水平($P<0.05$)。同时,检测了 QS21

对抗体亚型 IgG1 和 IgG2a 的影响,结果显示,末次免疫 28 d 后, QS21 能进一步提高活疫苗诱导的 IgG1 和 IgG2a 抗体水平,提示 QS21 能激活全身性体液免疫。



* 表示与对照组存在显著差异 ($P<0.05$), * * 表示与对照组存在极显著差异 ($P<0.01$), #表示与疫苗组存在显著差异 ($P<0.05$)

The data labeled * was significant compared with control group ($P<0.05$).

The data labeled * * was very significant compared with control group ($P<0.01$).

The data labeled # was significant compared with vaccine group ($P<0.05$).

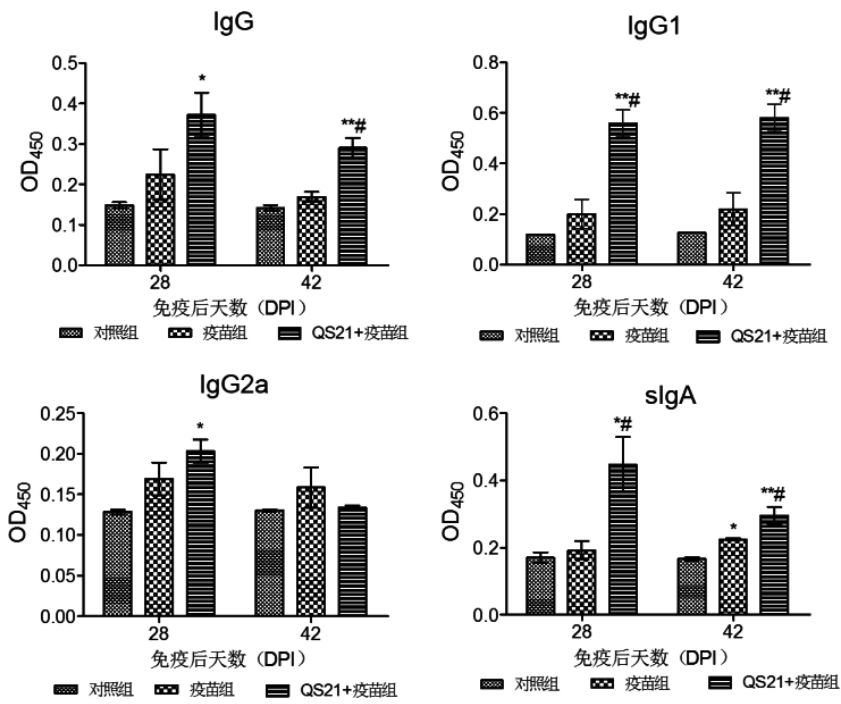
图 1 ELISA 检测小鼠免疫后血清抗体水平

Fig 1 ELISA detection of antibodies in mice serum post immunization

2.2 QS21 联合疫苗免疫对小鼠 BALF 中 IgG 及亚型和 sIgA 抗体的影响 进一步检测 QS21 与猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗共同滴鼻免疫小鼠后 BALF 中 IgG 抗体及亚型的变化,结果显示,与疫苗组相比,末次免疫 28 d 后, QS21+疫苗组能够显著提高血清中活疫苗特异性 IgG 和 IgG1 的抗体水平 (图 2)。sIgA 是黏膜免疫中重要的抗体类型,单独疫苗组仅在 D42 检测到 sIgA 抗体的升高;而与疫苗组相比, QS21+疫苗组能显著增强 sIgA 抗体水平 ($P<0.05$),表明 QS21 与疫苗共同滴鼻能显著性增强小鼠的黏膜免疫反应。以上结果表明 QS21 诱导

局部体液免疫。

2.3 QS21 联合疫苗免疫对小鼠血清和 BALF 中细胞因子的影响 IFN- γ 是 Th1 型细胞因子的典型代表, IL-4 是 Th2 型细胞因子的典型代表, IL-17 是 Th17 型细胞因子的典型代表。通过 ELISA 法检测了小鼠血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-4、IL-17 的水平。结果显示,疫苗组的血清中 IFN- γ 、IL-4 和 IL-17 含量显著高于对照组 ($P<0.01$, $P<0.05$), 而 QS21+疫苗组能进一步提升血清中 IL-17 的含量 ($P<0.05$), 但对 IFN- γ 和 IL-4 的含量无显著影响 (图 3)。



* 表示与对照组存在显著差异 ($P<0.05$), ** 表示与对照组存在极显著差异 ($P<0.01$), # 表示与疫苗组存在显著差异 ($P<0.05$).

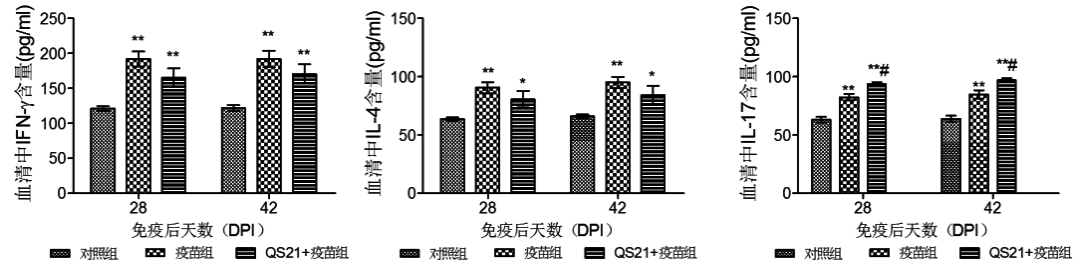
The data labeled * was significant compared with control group ($P<0.05$).

The data labeled ** was very significant compared with control group ($P<0.01$).

The data labeled # was significant compared with vaccine group ($P<0.05$).

图 2 ELISA 检测小鼠免疫后 BALF 抗体水平

Fig 2 ELISA detection of antibodies in mice BALF post immunization



* 表示与对照组存在显著差异 ($P<0.05$), ** 表示与对照组存在极显著差异 ($P<0.01$), # 表示与疫苗组存在显著差异 ($P<0.05$).

The data labeled * was significant compared with control group ($P<0.05$).

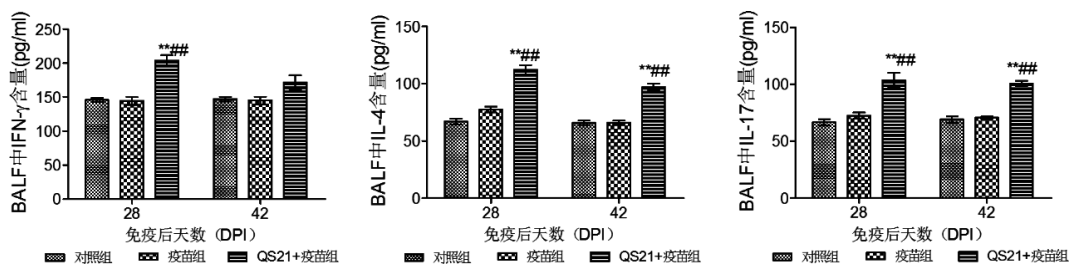
The data labeled ** was very significant compared with control group ($P<0.01$).

The data labeled # was significant compared with vaccine group ($P<0.05$).

图 3 ELISA 检测小鼠免疫后血清 IFN- γ 、IL-4 和 IL-17 水平

Fig 3 ELISA detection of IFN- γ , IL-4 and IL-17 levels in mice serum post immunization

在 BALF 中(图 4),与对照组相比,疫苗组未能升高 IFN- γ 、IL-4 和 IL-17 含量($P>0.05$),而加入 QS21 佐剂之后, BALF 中 IFN- γ 、IL-4 和 IL-17 的含量极显著升高($P<0.01$)。以上结果表明 QS21 可以诱导细胞免疫应答。



* * 表示与对照组存在极显著差异 ($P < 0.01$), ## 表示与疫苗组存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

The data labeled * * was very significant compared with control group ($P < 0.01$).

The data labeled ## was very significant compared with vaccine group ($P < 0.01$).

图 4 ELISA 检测小鼠免疫后 BALF 中 IFN- γ 、IL-4 和 IL-17 水平

Fig 4 ELISA detection of IFN- γ , IL-4 and IL-17 levels in mice BALF post immunization

3 讨论与结论

初始 CD4⁺ T 淋巴细胞在机体抗菌和抗病毒免疫调节过程中发挥重要作用,其分化方向及各类细胞比例能够影响机体的抗菌和抗病毒效应。初始 CD4⁺ T 淋巴细胞可以分化为 T 辅助细胞,包括 Th1 细胞、Th2 细胞和 Th17 细胞等。IFN- γ 是 Th1 细胞活化和分化的重要标志。IFN- γ 在呼吸道和肺中的分泌能够直接杀死病原体并激活呼吸道中巨噬细胞,从而产生免疫保护作用。IL-4 是 Th2 细胞活化的特征细胞因子,能增强 B 细胞的抗原递呈能力,发挥抗炎作用。研究表明 QS21 能够诱导 Th1 型细胞因子如 IL-2、IFN- γ 等^[9],以及 Th2 型细胞因子 IL-4^[10] 的表达。研究发现利用 QS21 配合猪肺炎支原体活疫苗滴鼻免疫能够显著提高 BALF 中 IFN- γ 和 IL-4 的水平,表明 QS21 能同时增强局部的 Th1 和 Th2 型细胞免疫应答。

IgG 亚型抗体的分泌水平也与 Th1 和 Th2 型细胞活化密切相关,其中 IgG1 分泌增多提示初始 Th 细胞向 Th2 型细胞分化,而 IgG2a 抗体量增多则提示 Th1 型细胞活化。QS21 在诱导 IgG1 和 IgG2a 平衡中有重要的调节作用^[10-11]。本研究结果显示, QS21 与猪支原体肺炎 (168 株) 活疫苗联合滴鼻免疫小鼠后,能够显著升高血清和 BALF 中 IgG1 和 IgG2a 的含量,表明 QS21 能够同时激活黏膜和全身性的 Th1 和 Th2 型免疫应答,这一结果提示, QS21 联合活疫苗免疫诱导的 Th1/Th2 型免疫应答

能够对抗猪支原体肺炎感染,发挥免疫保护效果。

IL-17 是 Th17 细胞分泌的重要细胞因子,在调节黏膜免疫和全身免疫中发挥着重要作用。IL-17 可以通过多种途径激活黏膜免疫^[12],一方面上调黏膜上皮细胞中多聚 Ig 受体水平进而提高 sIgA 的水平,另一方面还可以诱导聚免疫球蛋白受体的表达,促进 B 细胞向 IgA 分泌细胞分化。研究中检测结果显示, QS21 联合活疫苗滴鼻免疫小鼠后, BALF 中 IL-17 的含量显著高于疫苗组,同时 sIgA 抗体水平也显著提高,表明 QS21 可以激活 Th17 细胞介导的黏膜免疫。SATO 等研究表明血清中 IL-17 与猪支原体肺炎的病变程度呈负相关,提示 IL-17 对猪支原体肺炎的免疫保护非常重要^[13]。本研究检测结果也显示, QS21 联合活疫苗滴鼻免疫小鼠后的血清中 IL-17 的含量显著高于疫苗组,表明 QS21 激活的 Th17 型全身免疫有利于对抗猪支原体肺炎。

综上所述, QS21 能够激活 Th1、Th2 和 Th17 细胞免疫应答,表明 QS21 能有效激活免疫系统,提示 QS21 可作为猪肺炎支原体活疫苗的候选黏膜佐剂。以上研究可以为拓展猪支原体肺炎活疫苗的临床应用提供实验基础。

参考文献:

- [1] Simionatto S, Marchioro S B, Mess D, et al. Mycoplasma hyopneumoniae: from disease to vaccine development[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 165(3-4): 234-242.

- [2] 车艳杰, 王勇鹏, 柳舒航, 等. 我国市场上猪支原体肺炎疫苗现状及应用效果 [J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(12): 61-65.
Che Y J, Wang Y J, Liu S H, *et al.* The situation and application of swine mycoplasma pneumonia vaccine in domestic market [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(12): 61-65.
- [3] 华利忠, 刘茂军, 冯志新, 等. 猪支原体肺炎控制和净化评价方法研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 47(9): 54-57.
Hua L Z, Liu M J, Feng Z X, *et al.* Progress on the evaluation methods for the control and eradication of mycoplasma pneumonia of swine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 47(9): 54-57.
- [4] 杨若松, 邢宪平, 冯志新, 等. 猪支原体肺炎活疫苗 (168 株) 滴鼻免疫保护效果的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(4): 93-97.
Yang R S, Xing X P, Feng Z X, *et al.* The research of immune protective efficacy of mycoplasma hyoneumoniae vaccine '168 strain' by intranasal route [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2016, 39(4): 93-97.
- [5] Marciani D J. Elucidating the mechanisms of action of saponin-derived adjuvants [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2018, 39(6): 573-585.
- [6] 杨锦涛, 程 希, 陈红伟, 等. 白术多糖免疫调节作用机制的研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(6): 80-85.
Yang J T, Cheng X, Cheng H W, *et al.* Advances in the mechanism of polysaccharide immunization in Atractylodes macrocephala Koidz [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(6): 80-85.
- [7] Brunner L, Barnier C, Collin N. QS-21 adjuvant: laboratory-scale purification method and formulation into liposomes [M]// FOX C B. Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols. New York, NY; Springer New York. 2017: 73-86.
- [8] Zhu D, Tuo W. QS-21: a potent vaccine adjuvant [J]. Natural Products Chemistry & Research, 2016, 3(4): 1-4.
- [9] Liu G, Anderson C, Scaltreto H, *et al.* QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity [J]. Vaccine, 2002, 20(21-22): 2808-2815.
- [10] Matrt-roix R, Vladimer G I, Pouliot K, *et al.* Identification of QS-21 as an Inflammasome-activating Molecular Component of Saponin Adjuvants [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(3): 1123-1136.
- [11] Fernandez-tejada A, Chea E K, George C, *et al.* Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21 [J]. Nature Chemistry, 2014, 6(7): 635-643.
- [12] Solans L, Debie A S, Borkner L, *et al.* IL-17-dependent SIgA-mediated protection against nasal Bordetella pertussis infection by live attenuated BPZE1 vaccine [J]. Mucosal Immunology, 2018;1
- [13] Sato T, Okamura T, Kojima-shjbata C, *et al.* Correlated response of peripheral blood cytokines with selection for reduced mycoplasma pneumonia of swine lesions in Landrace pigs [J]. Animal Science Journal, 2016, 87(4): 477-483.

(编辑:陈 希)