

沙眼衣原体分泌性蛋白 Pgp3 滴鼻免疫增强小鼠 对衣原体生殖道感染的保护作用

陆春雪¹ 吴移谋^{1*} 彭波² 李忠玉¹ 胡四海¹ 钟光明³

(1. 南华大学 微生物与免疫学教研室 湖南 衡阳 421001)

(2. 南华大学 肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001)

(3. Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Texas 78229, USA)

摘要: 【目的】探讨不同免疫途径沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)分泌性蛋白 Pgp3 的免疫保护效果, 分析其可能的保护机制, 以确定 Pgp3 蛋白疫苗在 Ct 疫苗研制中的应用价值。【方法】分泌性蛋白 Pgp3 经滴鼻或肌注途径免疫雌性 Balb/c 小鼠, 免疫 60 d 后, 阴道接种鼠沙眼衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm) 建立生殖道感染动物模型, 在该模型中评价 Pgp3 蛋白疫苗抗 Cm 感染的保护效果, 并探讨其机制。【结果】滴鼻或肌注免疫后, 小鼠血清及生殖道中检测到了特异性抗体; 小鼠脾淋巴细胞产生 IFN- γ 、IL-17 及 IL-5 水平均明显高于对照组, 且滴鼻免疫组 IFN- γ 水平升高较肌注组更显著($P<0.05$); Pgp3 蛋白滴鼻免疫组小鼠经 Cm 生殖道感染后, 阴道带菌时间明显缩短, 输卵管病理改变轻而肌注免疫组其保护作用不明显。【结论】Pgp3 蛋白经滴鼻免疫可有效诱导小鼠产生明显的抗 Cm 保护效应。其可能的免疫保护机制与诱导 Th1 型为主的细胞免疫应答及高效价的特异性抗体有关, 提示 Pgp3 蛋白疫苗具有潜在的疫苗研究与开发价值。

关键词: 沙眼衣原体, Pgp3, 蛋白疫苗, 免疫保护, Th1 型免疫反应

Intranasal immunization with secretion protein Pgp3 enhances protective immunity against mice genital *Chlamydia muridarum* infection

LU Chun-Xue¹ WU Yi-Mou^{1*} PENG Bo² LI Zhong-Yu¹

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.30970165); 湖南省高校科技创新团队(湘教通[2010]53 号)

*通讯作者: Tel: 86-734-8281555; 信箱: yimouwu@sina.com

收稿日期: 2011-08-18; 接受日期: 2011-11-28

HU Si-Hai¹ ZHONG Guang-Ming³

(1. Department of Microbiology and Immunology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

(2. Cancer Research Institute, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

(3. Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Texas 78229, USA)

Abstract: [Objective] To validate the immune protective efficacy of Chlamydia secretion protein Pgp3 and to analyze the potential immune mechanisms related to this protection. **[Methods]** The prokaryotic recombinant protein Pgp3 was purified and evaluated for its protective efficacy in a genital tract infected mouse model. Groups of BALB/c mice were immunized intranasally or intramuscularly with adjuvants plus Pgp3 protein or PBS and GST control. Humoral and cellular immune responses were evaluated. After *Chlamydia muridarum* intravaginal challenge, the chlamydia shedding from the lower genital tract and the chlamydia-induced upper genital tract gross pathology and histopathological characterization were also detected. **[Results]** Adjuvant plus Pgp3 immunization can induce high level of Pgp3 specific antibody as well as IFN- γ , IL-17 and IL-5 cytokine production. More importantly, intranasal immunization compare with intramuscular route induced more Th1-dominant immunity that significantly reduced the shedding of live organisms from the lower genital tract and attenuated inflammatory pathologies in the oviduct tissues. **[Conclusion]** These observations have demonstrated that secretion protein Pgp3 intranasal immunization can induce protective immunity against chlamydial infection and pathology in mice.

Keywords: *Chlamydial trachomatis*, Pgp3, Protein vaccine, Immune protection, Th1 immune response

衣原体是专性胞内寄生的革兰阴性菌, 根据传染途径和症状不同分为沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体、肺炎衣原体等, 其中沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, Ct) 与人类疾病关系最为密切。Ct 可分为 19 个血清型及两种传染类型, A、B、Ba 及 C 型主要侵入人体眼结膜和角膜引起沙眼和包涵体结膜炎, 甚至致盲; D-K 型以及 L1 至 L3 血清型主要通过性接触传播, 是性病最常见的病原体之一。世界卫生组织(WHO)最近的一份报告指出, 在全球每年新增的 5 亿例性传播疾病(STD)中, 9 000 多万例为 Ct 感染^[1]。流行病学调查结果显示, 由于 Ct 感染存在大量的无症状或微症状患者, 通常不被发现和治

疗, 可持续存在数月至数年, 最终引起盆腔炎、不孕不育等严重并发症^[2], 构成了衣原体感染的高发病率和沉重的社会经济负担, 因此对 Ct 感染的预防研究已成为当今国内外研究的热点之一, 其中 Ct 疫苗的开发研究便是预防措施中的重点, 遗憾的是到目前为止仍然没有成功的疫苗问世。

Ct 质粒编码蛋白 Pgp3 是一种能分泌到宿主细胞胞浆的分泌性蛋白, 由 264 个氨基酸编码, 生物信息学分析发现该蛋白缺乏信号肽序列, 具有多个亲水性区域, 提示可能存在多个抗原表位^[3]。我们的前期研究已证实 Ct STD 感染患者的血清中存在高滴度的抗分泌性蛋白 CPAF (衣原

体蛋白酶样活性分子)和 Pgp3 的特异性抗体,其血清反应阳性率分别为 94%和 96%^[4]。众所周知,CPAF 已被人们广泛应用于疫苗的研究,并能诱导机体产生一定的免疫保护作用,而同为分泌性蛋白且具有强免疫原性的 Pgp3 疫苗研究较少,仅有相关核酸疫苗研究显示 Pgp3 DNA 具有一定的保护作用^[5],因此本研究采用重组 Pgp3 蛋白与新型免疫佐剂-CpG 寡脱氧核苷酸联合,经滴鼻或肌注途径免疫小鼠后,通过建立鼠沙眼衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm)生殖道感染模型^[6],检测经 Pgp3 蛋白免疫的小鼠在受到生殖道衣原体感染攻击后,其下生殖道衣原体清除情况及上生殖道组织病理学变化,探讨 Pgp3 蛋白亚单位疫苗免疫保护效果并分析其可能的免疫保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 4-5 周龄雌性 Balb/c 小鼠由美国得克萨斯大学圣安东尼奥健康科学中心(UTHSCSA)动物部提供和饲养。

1.1.2 菌株及试剂: Ct D 菌株基因组 DNA 模板、Cm Nigg 株及纯化的 Cm EB,由 UTHSCSA 钟光明实验室保存。HeLa 细胞,购自美国标准菌株保存中心(ATCC, cat#CCL2)。HRP 标记的羊抗鼠 IgG (H+L)、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 均购自 Jackson Immuno Research 公司; IFN- γ 、IL-17、IL-5 等细胞因子检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 Pgp3 蛋白抗原的制备: 从 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)获取 D 型 Ct Pgp3 基因全长序列,设计引物,以 Ct D 型菌株基因组 DNA 为模板,PCR 法扩增其全长并克隆入 pGEX-6p-2 载体,转化 *E. coli* BL21, IPTG 诱导表达 GST-Pgp3 融合蛋白,经凝血酶酶切后进行目

的蛋白的纯化、浓缩和定量检测。

1.2.2 动物免疫: 雌性 Balb/c 小鼠共 90 只,随机分为滴鼻组和肌注组,每组又再分 3 小组,每小组 15 只。将 30 μ g 纯化的 Pgp3 蛋白或相同剂量纯化的 GST 蛋白分别与 10 μ g CpG 混匀后,经滴鼻免疫 Balb/c 小鼠;肌肉免疫组剂量与滴鼻免疫组一致,但加用等量油性弗氏不完全佐剂(IFA),超声乳化后,注射于小鼠两侧臀部。同时滴鼻组和肌注组均设立 PBS 及 GST 对照。每只小鼠于第 0 天、14 天、28 天各免疫一次,共免疫 3 次。

1.2.3 细胞因子检测: 末次免疫 2 周后,每组各取小鼠 5 只,无菌条件下分离其脾淋巴细胞,用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液调整细胞数为 5×10^6 个/mL,加置 24 孔细胞培养板中,每孔 1 mL,每只小鼠的脾淋巴细胞悬液设 3 个组,每组设 2 个复孔;其中第一组加入 10 μ g Pgp3 抗原,第二组加入 10 μ g GST 抗原,第三组加入 PBS 对照,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养 72 h 后收集上清,酶联免疫吸附实验(ELISA)法定量检测细胞因子 IFN- γ 、IL-5、IL-17 的产生水平。

1.2.4 小鼠抗原特异性抗体检测: 末次免疫 2 周后,每组各取小鼠 5 只,分别从小鼠的尾静脉采血,ELISA 测定 Pgp3 免疫组、GST 免疫组及 PBS 对照组血清总抗体、IgG 亚类及生殖道局部分泌性 IgA 抗体水平。Pgp3 抗原以 10 mg/L 包被酶标板,4 $^{\circ}$ C 过夜,1% BSA 室温封闭 1 h,加入稀释好的血清或阴道稀释物,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,0.05% PBST 洗涤 3 次后分别加入羊抗鼠总抗体或 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 抗体孵育 1 h,加入底物 ABTS,37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 min 后,酶标仪读取 405 nm 波长的吸光值。

1.2.5 抗感染实验: 小鼠末次免疫一个月后,于阴道后穹窿处接种 2×10^4 IFU 的 Cm,感染后每间隔 3-5 d 用阴道拭子取宫颈分泌物于 500 μ L SPG

缓冲液中, 然后以 1:5 进行梯度稀释, 将稀释的棉签拭子标本接种到培养于 24 孔培养板盖玻片上的 HeLa 单层细胞, 37 °C 继续培养 24 h; 然后用 2% 多聚甲醛固定 30 min, 2% 皂苷处理 1 h 使其通透性增加, 洗涤和封闭后, 用赫斯特(蓝色)标记 DNA, 兔抗 Cm 一抗及带 Cy2 标记的羊抗兔 IgG 二抗(绿色)进行免疫荧光检测。在荧光显微镜下计数获得的 Cm 包涵体(IFU)数目, 每个盖玻片随机选取 5 个视野计数。平均值由棉签拭子标本不同的稀释浓度和重复数计算。获得每个棉签标本的总 IFUs 数值, 先进行以 10 为底的对数(Log10)转换, 再计算每个组在每个时间点的 Log10 IFUs 的均值和标准差。

感染 60 d 后处死小鼠, 分离生殖道组织。10% 的中性甲醛固定, 石蜡包埋后纵向切片(5 μ m/张)。H&E 染色, 双盲法给予子宫角及输卵管的炎症反应和水肿程度评分^[6,14]。子宫角和输卵管水肿的评分标准是: 0, 无明显水肿; 1, 有 1 处轻微水肿; 2, 有 2-3 处水肿; 3, 有 3 处以上水肿; 4, 显著的成片的水肿。炎性细胞浸润的评分标准是(慢性感染阶段, 主要观察单核细胞浸润): 0, 无明显浸润; 1, 有 1 处浸润; 2, 有 2-4 处浸润; 3, 有 4 处以上浸润; 4, 显著的成片的浸润。依此标准分别对每只小鼠进行评分, 再计算每个组的均值和标准差。

1.2.6 统计学分析: 用方差分析比较各组间 IFU 和细胞因子水平的差异, 用 *t* 检验(Two-tailed Student's *t* test)做两两比较、病理评分结果及 IgG2a/IgG1 比值分析, 用 Fisher's 精确概率法比较两组间的疾病发生率。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Pgp3 蛋白免疫可提高机体特异性细胞免疫应答反应

滴鼻或肌注免疫小鼠 3 次后, 取各组小鼠

脾细胞, 体外用 Pgp3 蛋白刺激, 测定脾细胞上清细胞因子水平。结果显示(图 1), 不论是滴鼻还是肌注免疫 Pgp3, 小鼠脾细胞产生的 IFN- γ (Th1 型 CD4⁺T 细胞产生)、IL-5 (Th2 型 T 细胞产生)、和 IL-17 (Th17 型 T 细胞产生)水平均明显高于相应的 PBS 和 GST 对照组。但用无关蛋白 GST 刺激时, 各免疫组细胞因子水平与对照组无明显变化。进一步分析发现 Pgp3 滴鼻免疫组(21 538.9 \pm 516.2 ng/L)较肌注免疫组其 IFN- γ (8 088.7 \pm 750.3 ng/L)水平明显升高, 而 IL-17 水平无明显差异, IL-5 (210.7 \pm 79.7 ng/L)水平则较肌注免疫组(510.7 \pm 65.6 ng/L)明显降低, 以上结果表明 CpG+Pgp3 滴鼻免疫可诱导更强的特异性 Th1 型细胞免疫应答。

2.2 Pgp3 蛋白免疫可提高机体特异性体液免疫应答反应

滴鼻或肌注免疫小鼠 3 次后, 取小鼠尾静脉血, ELISA 法检测小鼠血清中特异性抗体的滴度和 IgG 抗体亚型。结果显示(图 2A、B、C), Pgp3 蛋白免疫组血清各类抗体水平均明显高于对照组($P < 0.01$), 其中滴鼻免疫 IgG2a/IgG1 比值大于 1 (3.43 \pm 0.32), 肌注免疫比值小于 1 (0.71 \pm 0.26), 两组比值间有显著差异($P < 0.01$)。该比值进一步说明 CpG+Pgp3 滴鼻免疫可诱导 Th1 型而肌注主要诱导 Th2 型免疫反应。各接种组生殖道冲洗液分泌型 IgA 检测结果见图 2D、E, Pgp3 蛋白免疫组 IgA 抗体水平均高于对照组($P < 0.05$), 且滴鼻免疫(0.48 \pm 0.03)较肌注(0.17 \pm 0.04)升高更为显著, 表明 Pgp3 滴鼻免疫可有效诱导局部特异性体液免疫应答。

2.3 CpG+Pgp3 滴鼻免疫可加快机体对鼠沙眼衣原体下生殖道感染的清除

各组小鼠免疫 30 d 后, 通过生殖道感染 Cm 建立鼠沙眼衣原体感染模型并监测机体体内衣原

体的清除情况。结果显示 Pgp3 滴鼻免疫组(图 3A、C), 感染 15 d 后, 生殖道带菌量仅为 1.14 ± 0.51 , 感染率为 40%, 而同期 PBS 及 GST 滴鼻对照组生殖道带菌量大于 4.23 ± 0.68 , 感染率为 100%, 其差异有显著性($P < 0.05$); 滴鼻组所有小鼠于感染后 21 d 再无衣原体检出, 而对照组推迟

到感染后 30 d。Pgp3 肌注免疫组虽于感染后 21、24 d 衣原体检出量和检出率较对照组明显减少, 但完全清除时间推迟到感染后 27 d, 与对照组无明显差异(图 3B、D), 这表明 CpG+Pgp3 滴鼻免疫较肌肉免疫能更好地加快机体对 Cm 下生殖道感染的清除。

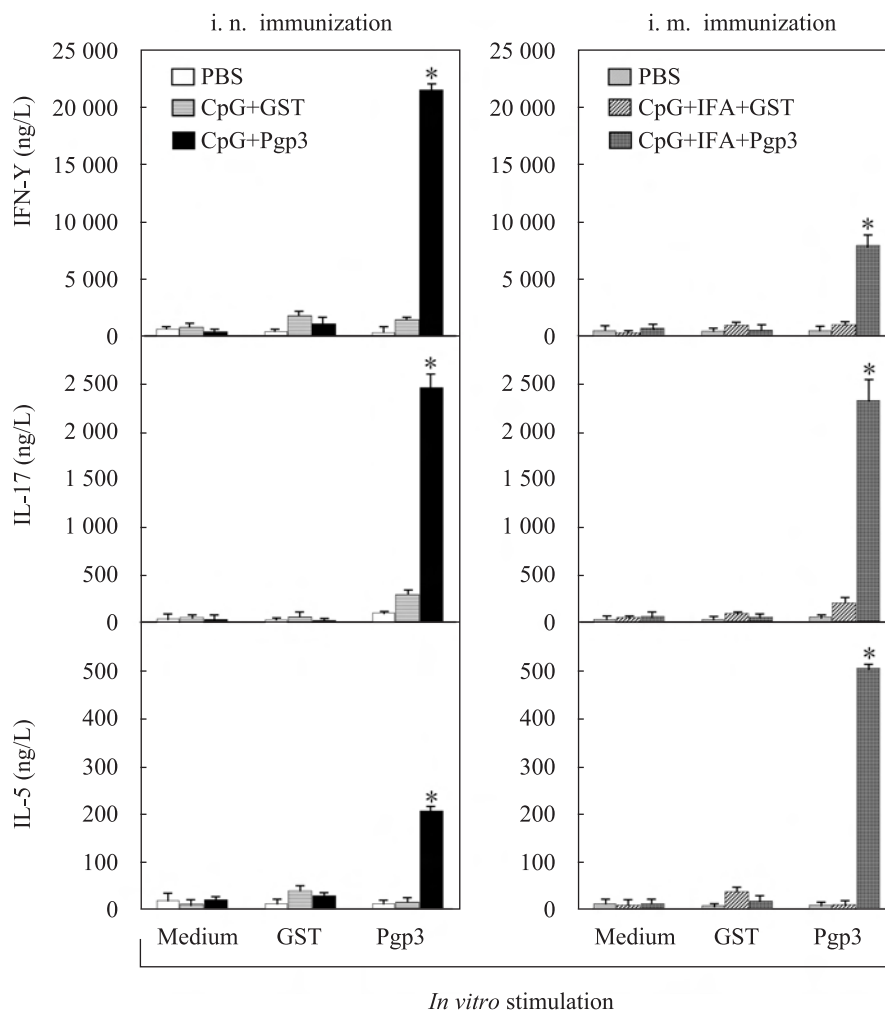


图 1 Pgp3 蛋白免疫对细胞因子产生的影响

Fig. 1 Pgp3 protein vaccination induces robust cytokine production

注: *: Pgp3 滴鼻或肌注免疫诱导产生的细胞因子水平与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$), 且 Pgp3 滴鼻免疫 IFN- γ 产生显著高于肌注组, IL-5 产生则显著低于肌注组($P < 0.05$).

Note: *: Significant differences in cytokine secretion between Pgp3 immunization and PBS or GST control immunization ($P < 0.05$, student's t test). In addition, i.n. Pgp3 immunization can induce significantly high IFN- γ but low IL-5 product than i.m. immunization ($P < 0.05$, student's t test).

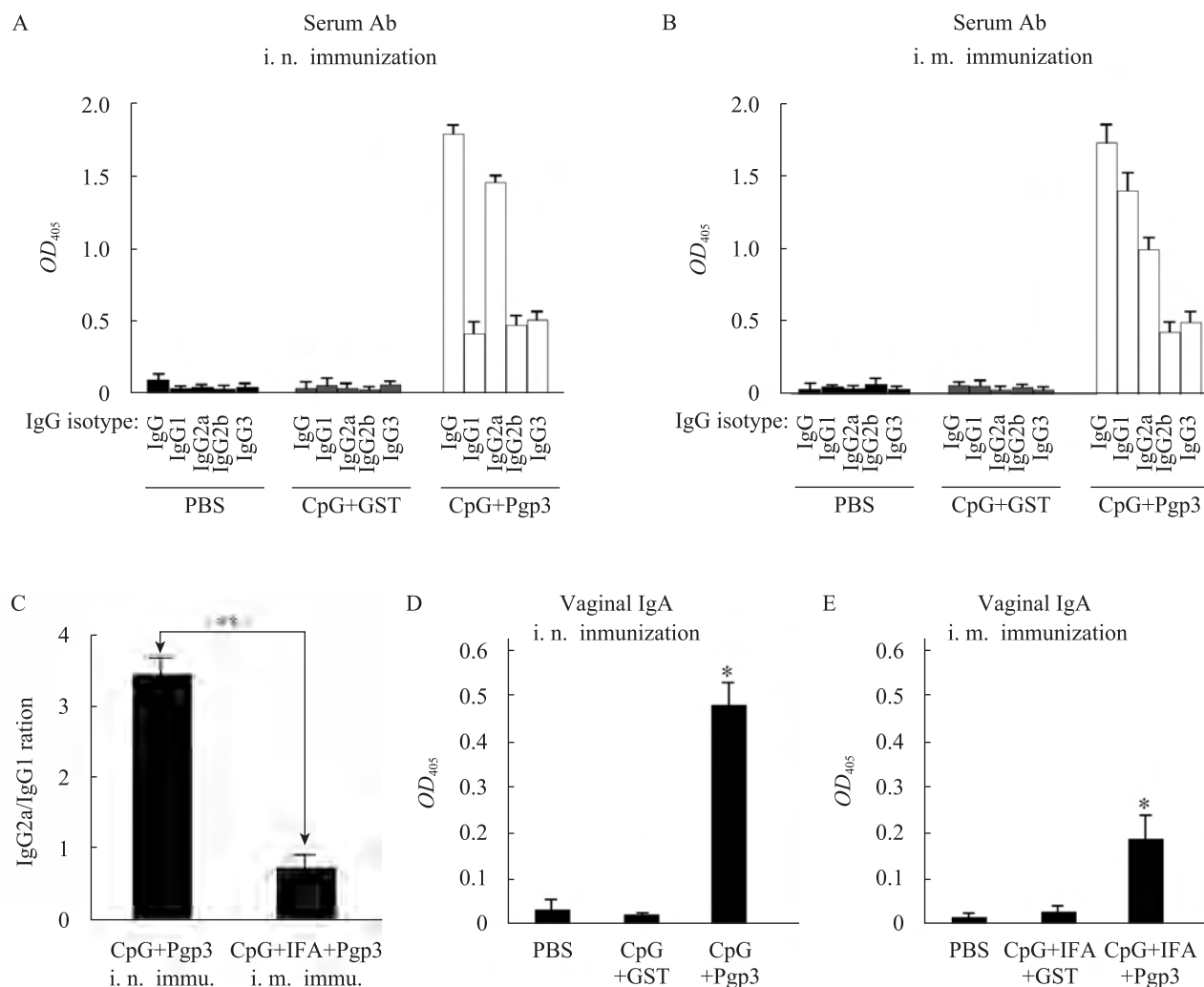


图 2 Pgp3 蛋白免疫对体液免疫的影响

Fig. 2 Pgp3 protein vaccination induces robust humoral immune responses

注: A、B: 血清中抗-Pgp3 IgG 总抗体及各亚型的检测; C: Pgp3 滴鼻和肌注组 IgG2a/IgG1 的比值比较, **: $P < 0.01$; D、E: 黏膜局部分泌型 IgA 的检测。

Note: A, B: Systemic anti-Pgp3 Ab responses after immunization. C: The ratio of Pgp3-specific IgG2a/IgG1. **: $P < 0.1$, compared with i.n. versus i.m. Pgp3 vaccinated mice. D, E: Mucosal anti-Pgp3 IgA responses after immunization.

2.4 CpG+Pgp3 滴鼻免疫可减轻衣原体感染引起的生殖道病理反应

小鼠 Cm 生殖道感染后第 60 天处死, 分离生殖道进行肉眼观察及病理学检测。肉眼观察可见, CpG+Pgp3 滴鼻免疫组小鼠输卵管积水 (Hydrosalpinx) 的发生率为 20%, 且仅见于单侧发病; 而其它各组感染小鼠均出现明显的单侧或双侧输卵管水肿, 发生率在 70% 以上(图 4A, 表 1)。

病理学检测(图 4B、C)证实各组小鼠子宫角 (Uterine Horn) 局部水肿及炎症反应均不典型, 且各组间无显著性差异; 但输卵管(Oviduct)的病变程度不一, 对照组可见输卵管管腔扩大, 大量淋巴细胞、浆细胞浸润, CpG+Pgp3 滴鼻免疫组小鼠输卵管病变轻, 水肿及炎性细胞浸润较对照组有显著差异($P < 0.05$), 说明 CpG+Pgp3 滴鼻免疫可减轻 Cm 感染引起的上生殖道并发症。

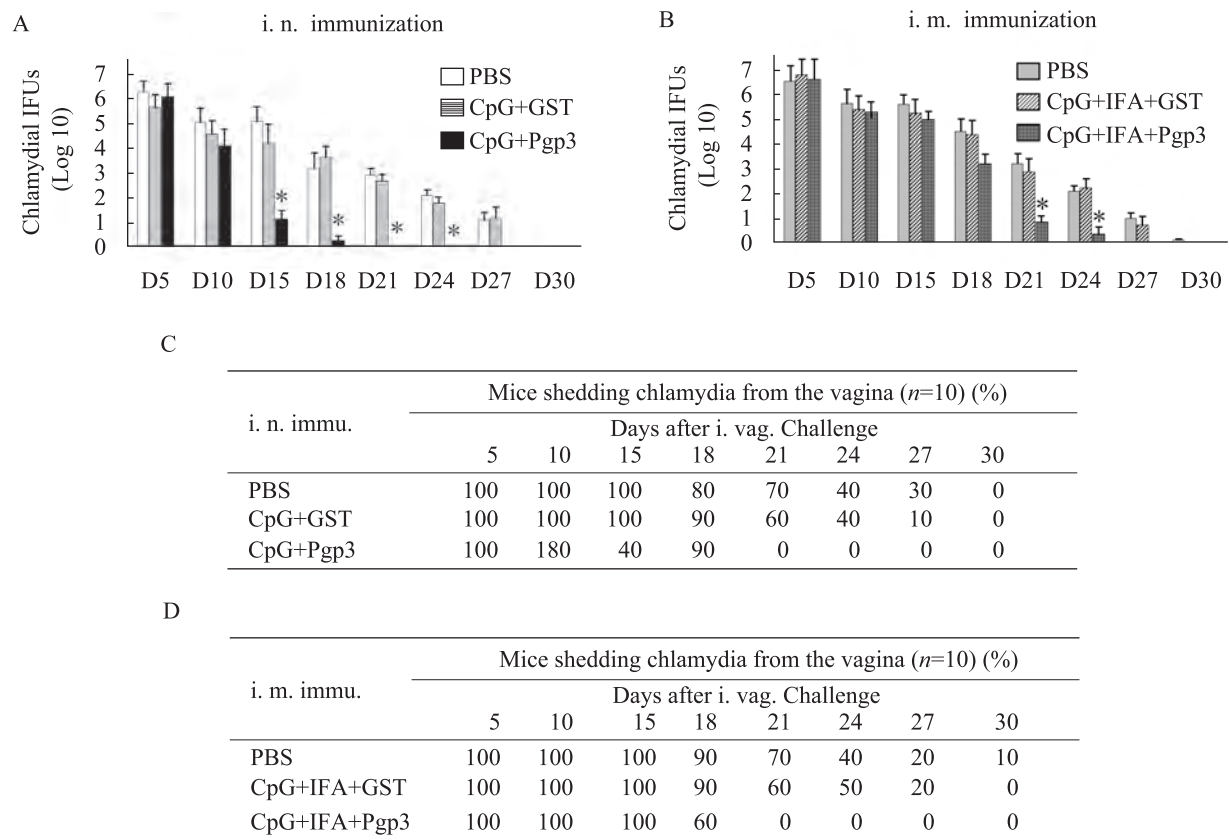


图 3 Pgp3 蛋白免疫对衣原体清除率的影响

Fig. 3 Intranasal CpG+Pgp3 vaccination enhances the resolution of a genital challenge

注：小鼠阴道脱落上皮细胞衣原体包涵体形成单位均转换为 Log10。A、B：脱落细胞中衣原体量的比较；C、D：脱落细胞衣原体检出阳性小鼠的比率。

Note: The IFU (Chlamydial inclusion forming units) from each swab was converted into Log₁₀. A, B: Numbers of Log₁₀ IFUs recovered from vaginal swabs at the indicated days as shown along the X-axis. C, D: Percentage of animals shedding Chlamydia after genital challenge.

表 1 肉眼观察小鼠输卵管积水的发生率 Table 1 Incidence of oviduct hydrosalpinx					
免疫途径 Route	小鼠组别 Group	小鼠数量 No.	双侧发病率 Bilateral	单侧发病率 Unilateral	总发病率 Total
滴鼻免疫 I.N.	PBS	10	4/10 (40%)	4/10 (40%)	8/10 (80%)
	CpG+GST	10	5/10 (50%)	4/10 (40%)	9/10 (90%)
	CpG+ Pgp3	10	0/10 (0%)*	2/10 (20%)	2/10 (20%)*
肌肉免疫 I.M.	PBS	10	5/10 (50%)	4/10 (40%)	9/10 (90%)
	CpG+IFA+GST	10	5/10 (50%)	4/10 (40%)	9/10 (90%)
	CpG+IFA+Pgp3	10	4/10 (40%)	3/10 (30%)	7/10 (70%)

注：*：Pgp3 蛋白滴鼻免疫组小鼠阴道感染后，输卵管积水的总发病率和双侧发病率较对照组明显降低(P<0.05)，但肌肉免疫组与对照组比较无差异。

Note: *: When the incidence of oviduct hydrosalpinx was compared between Pgp3 immunized group and control group (Using Fisher's Exact Test), the i.n. Pgp3 vaccinated mice had a statistically significantly lower probability of developing hydrosalpinx follow C. muridium infection (P<0.05).

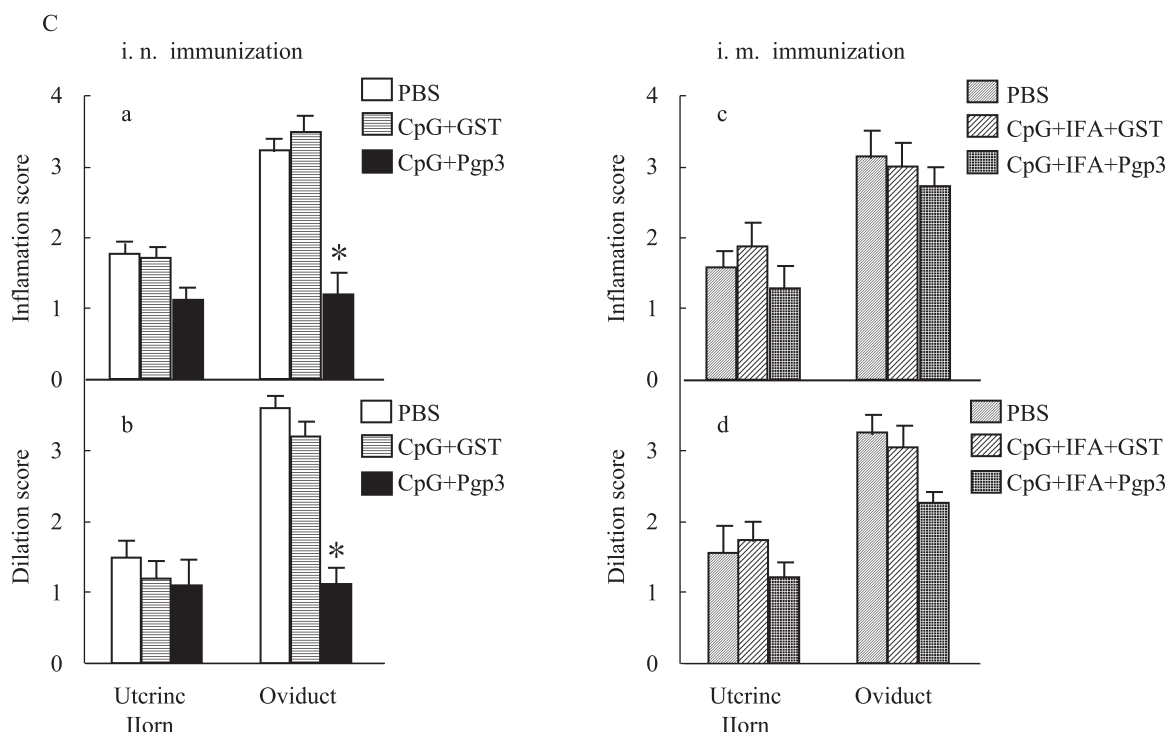


图4 Pgp3 蛋白免疫对生殖道病理反应的影响

Fig. 4 Intranasal CpG+Pgp3 vaccination reduces the development of oviduct pathology

注: A: 6组小鼠生殖道标本的肉眼观察; B: 病理学检测: a-f 示子宫颈, g-l 示输卵管, DI 表示水肿, IN 表示炎症; C: 各组小鼠子宫颈和输卵管炎症、水肿病理评分的比较。

Note: A: Representative images of the gross appearance of genital tract tissues from each of the 6 groups of mice as listed on the left of the figure. B: The genital tract tissues were examined under microscope after H&E staining, a-f show uterine horns, g-l show oviducts. DI-Dilation, IN-Inflammation. C: Inflammation and dilation of both uterine horns and oviduct were semiquantitatively scored under microscope and the scores were used to calculate the means and standard errors for each group as shown along the Y-axis.

3 讨论

Ct 感染目前仍缺乏有效疫苗。Ct 主要外膜蛋白(MOMP)是衣原体外膜的主要成分, 占整个外膜成分的 50%–60%, 从 20 世纪 80 年代以来, MOMP 被认为是最有潜力的 Ct 疫苗候选者, 广泛用于疫苗研究。但重组 MOMP、MOMP 合成肽、MOMP DNA 疫苗以及被动免疫 MOMP 单克隆抗体等均仅提供部分保护作用, 其原因与衣原体血清型多、抗原构象复杂且易变异等因素有关^[7], Batteiger 等研究证实 MOMP 上的 B 细胞表位能刺激机体产生中和抗体, 但针对这些表位的中和抗体不能有效中和其它型别的 Ct 感染, 且同

一型别的 B 表位, 由于大多存在于可变区, 在免疫选择的压力下, 可变区常发生突变导致 Ct 对体液免疫的逃逸^[8]。其它衣原体膜结构蛋白如: 热休克蛋白(HSP60)、富含半胱氨酸特异性膜蛋白(OmcB)、多形态性外膜蛋白(pmpD)、包涵体膜蛋白 A(IncA)等由于各种原因, 其保护作用也都不尽人意^[9–11]。因此发现新的有效抗 Ct 的疫苗分子和发展新的疫苗策略是必要的。

Ct 分泌性蛋白是由 Ct 基因编码并分泌到宿主细胞胞浆中的活性蛋白, 在衣原体的致病过程中发挥重要作用, 如分泌性蛋白 CPAF 能降解 MHC 转录因子 RFX25 和 USF21 而逃避免疫系统; CPAF 亦能降解角蛋白-8, 与包涵体在细胞内扩

展及细菌胞外基质中传播有关^[12-13]。Murthy 等尝试用分泌性蛋白 CPAF 作为疫苗候选抗原, 惊喜的发现 CPAF 可诱导较强的保护性免疫应答, 这可能与分泌性蛋白更易被抗原提呈细胞摄取、加工提呈有关, CPAF 在 Ct 各型间有较高同源性且不易变异^[14]。尽管 CPAF 免疫仍不能从根本上清除衣原体感染, 但提示人们不再把眼光局限于含量丰富的膜蛋白。Pgp3 是继 CPAF 之后发现并鉴定的第二种衣原体分泌蛋白^[3], 本课题组前期研究发现 Ct 患者血清中存在高滴度特异性 Pgp3 抗体^[4], 其反应率和反应强度均高于经典的免疫优势抗原 MOMP 和 HSP60, 与 CPAF 基本相似, 提示 Pgp3 可能为衣原体感染提供新的潜在的靶抗原。

免疫途径是影响蛋白疫苗免疫效果的重要因素。基于黏膜淋巴归巢的理论, 机体各部分的黏膜组织可作为一个完整的免疫系统, 即当局部黏膜受到抗原刺激时, 其刺激作用可引起机体整个黏膜系统的免疫应答效应。沙眼衣原体主要通过泌尿生殖道黏膜感染人而致病, 因此黏膜免疫是研究沙眼衣原体各种蛋白疫苗免疫接种的重要途径^[15]。另外肌肉免疫因其临床依从性好, 对疫苗的摄取率高, 且蛋白抗原经与油性佐剂乳化后, 在局部持续缓慢释放, 能延长抗原与免疫细胞的接触时间, 增强抗原的免疫原性, 但蛋白抗原与油性佐剂乳化后不能再用于滴鼻免疫。因此, 为增强衣原体蛋白疫苗免疫原性, 充分激活泌尿生殖道黏膜免疫系统, 本研究采用滴鼻和肌注两种途径进行 Pgp3 蛋白的免疫接种, 为全面评估 Pgp3 作为 Ct 候选疫苗提供实验依据。

抗 Ct 感染的细胞免疫主要依赖于 CD4⁺Th1 型细胞反应, 由 CD4⁺Th1 细胞及 Th1 型细胞因子 IFN- γ 等在清除衣原体感染中起着极其重要的作用^[16-17]。本实验采用 ELISA 法检测实验组与对照组的细胞因子水平, 结果发现末次免疫后 2 周,

两种途径免疫的小鼠脾细胞在体外再次受 Pgp3 抗原刺激时均能产生显著高于对照组的 IFN- γ (Th1 型)、IL-5 (Th2 型)、和 IL-17 (Th17 型) 细胞因子水平。滴鼻组相对于肌注组而言产生更高水平 IFN- γ 和较低水平的 IL-5, 说明 CpG+Pgp3 滴鼻免疫可优势诱导产生 CD4⁺Th1 型细胞免疫反应, 血清 IgG 抗体亚型分析显示滴鼻免疫 IgG2a/IgG1 比值明显高于对照组, 进一步说明 Pgp3 滴鼻免疫能增强 Th1 型细胞免疫应答。Ct 泌尿生殖道感染未经及时治疗可并发输卵管炎和输卵管积水, 导致输卵管阻塞和随后的不孕症^[18], 因此是否能预防衣原体感染后输卵管的病变是判断疫苗是否有效的重要指标。本研究中, Pgp3 滴鼻免疫能有效降低 Cm 阴道接种后在下生殖道的定殖量, 缩短 Cm 感染的自然排菌时间; 同时使 Cm 上行感染受限, 输卵管水肿减轻, 炎性细胞浸润减少, 输卵管积水发生率降低。但 Pgp3 肌肉免疫的保护效果却不理想, 仅在感染后期下生殖道的定殖量有减少, 输卵管炎症及积水程度与对照组无差异。因此选择有效的佐剂、优化免疫方案并加以组合以期获得更高水平的免疫保护作用是有必要的。

综上所述, 本研究用 Ct 分泌性蛋白 Pgp3 经滴鼻或肌注免疫小鼠后可成功诱导小鼠产生强烈的体液及细胞免疫应答, 其中滴鼻免疫可优势诱导 Th1 型免疫反应, 并在小鼠生殖道感染模型中获得了高效的免疫保护作用, 这为对 Pgp3 蛋白疫苗做更深入的实验研究及其临床应用奠定了基础。

致谢: 本工作在美国得克萨斯大学圣安东尼奥健康科学中心微生物学和免疫学系 Dr. Zhong 实验室完成, 特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of

- Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(2): 149–161.
- [2] Smith J S, Muñoz N, Herrero R, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185(3): 324–331.
- [3] Li ZY, Chen D, Zhong YM, et al. The chlamydial plasmid-encoded protein pgp3 is secreted into the cytosol of *Chlamydia*-infected cells[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(8): 3415–3428.
- [4] Wang J, Zhang YQ, Lu CX, et al. A genome-wide profiling of the humoral immune response to *Chlamydia trachomatis* infection reveals vaccine candidate antigens expressed in humans[J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 185(3): 1670–1680.
- [5] Donati M, Sambri V, Comanducci M, et al. DNA immunization with pgp3 gene of *Chlamydia trachomatis* inhibits the spread of chlamydial infection from the lower to the upper genital tract in C3H/HeN mice[J]. *Vaccine*, 2003, 21(11/12): 1089–1093.
- [6] 陈丽丽, 吴移谋, 周洲, 等. MyD88 在鼠衣原体生殖道感染过程中的作用[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 937–942.
- [7] Kari L, Whitmire WM, Crane DD, et al. *Chlamydia trachomatis* native major outer membrane protein induces partial protection in nonhuman primates: implication for a trachoma transmission-blocking vaccine[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(12): 8063–8070.
- [8] 王乐丹. 沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原表位的研究进展[J]. *国外医学预防诊断治疗用生物制品分册*, 2005, 28(5): 196–199.
- [9] 王洁, 张颖骞, 钟光明, 等. 沙眼衣原体 OmcBc 基因的克隆、表达与抗原性研究[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(7): 1558–1561.
- [10] Gomes JP, Nunes A, Bruno WJ, et al. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(1): 275–286.
- [11] Suchland RJ, Jeffrey BM, Xia MS, et al. Identification of concomitant infection with *Chlamydia trachomatis* IncA-negative mutant and wild-type strains by genomic, transcriptional, and biological characterizations[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(12): 5438–5446.
- [12] Zhong GM, Fan PY, Ji HZ, et al. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2001, 193(8): 935–942.
- [13] Dong F, Su H, Huang YQ, et al. Cleavage of host keratin 8 by a *Chlamydia*-secreted protease[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(7): 3863–3868.
- [14] Murthy AK, Li WD, Guentzel MN, et al. Vaccination with the defined chlamydial secreted protein CPAF induces robust protection against female infertility following repeated genital chlamydial challenge[J]. *Vaccine*, 2011, 29(14): 2519–2522.
- [15] Ralli-Jain P, Tifrea D, Cheng CM, et al. Enhancement of the protective efficacy of a *Chlamydia trachomatis* recombinant vaccine by combining systemic and mucosal routes for immunization[J]. *Vaccine*, 2010, 28(48): 7659–7666.
- [16] Cunningham KA, Carey AJ, Timms P, et al. CD4⁺ T cells reduce the tissue burden of *Chlamydia muridarum* in male BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2010, 28(31): 4861–4863.
- [17] Yu H, Jiang XZ, Shen CX, et al. *Chlamydia muridarum* T-cell antigens formulated with the adjuvant DDA/TDB induce immunity against infection that correlates with a high frequency of gamma interferon (IFN- γ)/tumor necrosis factor alpha and IFN- γ /interleukin-17 double-positive CD4⁺ T cells[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 2272–2282.
- [18] Sharma M, Sethi S, Daftari S, et al. Evidence of chlamydial infection in infertile women with fallopian tube obstruction[J]. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 2003, 46(4): 680–683.