

提高黏膜免疫的方法及研究进展

周吉春^{1,2,3} 赵新新^{1,2,3} 刘青^{1,2,3} 孔庆科^{1,2,3*}

(1. 四川农业大学 动物医学院预防兽医研究所 四川 成都 611130)

(2. 四川农业大学 动物医学院禽病防治中心 四川 雅安 625014)

(3. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130)

摘要: 黏膜是很多病原体入侵机体的重要入口, 黏膜疫苗能诱导产生黏膜保护性免疫应答和系统性免疫应答, 阻止病原微生物黏附、入侵和繁殖。但多数候选黏膜疫苗的安全性、稳定性、免疫效力及保护作用还无法达到理想的效果, 佐剂或载体的使用改善了黏膜疫苗存在的不足, 使黏膜疫苗有了广阔的发展前景。文章综述了提高黏膜免疫的方法及研究进展。

关键词: 黏膜免疫, 黏膜疫苗, 佐剂, 黏膜疫苗载体

Recent advances in the improvement of mucosal immunization

ZHOU Ji-Chun^{1,2,3} ZHAO Xin-Xin^{1,2,3} LIU Qing^{1,2,3} KONG Qing-Ke^{1,2,3*}

(1. *Institute of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China*)

(2. *Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China*)

(3. *Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China*)

Abstract: The mucosal surfaces of the gastrointestinal, respiratory, and urinary tracts as well as the inner ear and the ocular conjunctiva are continuously exposed to potentially pathogenic microorganisms and represent major disease sites and entry points for harmful substances. Research has indicated that mucosal vaccination is capable of inducing protective immune responses both in the mucosal and systemic immune compartments, thereby preventing adhesion, invasion and colonization of disease pathogens. Many mucosal vaccines have been developed and evaluated, only a few of which were approved for human or animal use based on the safety, stability and efficacy of these vaccines. Application of adjuvants or vaccine delivery systems is able to efficiently improve these deficiencies. Here we will review current strategies for improvement mucosal immunization.

Keywords: Mucosal immunization, Mucosal vaccine, Adjuvant, Mucosal vaccine vectors

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31270981); 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31200697)

*通讯作者: ✉: qingke.kong@sicau.edu.cn

收稿日期: 2014-07-18; 接受日期: 2014-09-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-09

传染性疾病对人和动物的健康有很大的损害, 这些疾病的病原体多数都是通过感染机体的黏膜表面而引起发病的。人和动物的消化道、呼吸道、泌尿生殖道以及眼结膜、内耳和所有外分泌腺的管道都覆盖着黏膜, 这些黏膜表面长期接触着共生菌群、无害的食物抗原、潜在的病原微生物和其他有害物质^[1], 而黏膜具有各种免疫学和非免疫学机制协同地调控和保护其不被病原体入侵。黏膜的免疫学防御机制包括固有免疫和适应性免疫。目前的许多研究表明, 黏膜疫苗能诱导机体局部黏膜产生较好的适应性免疫反应, 增强机体抵抗病原微生物的能力。文章综述了目前的黏膜免疫方式和提高黏膜免疫的方法。

1 黏膜的防御功能

黏膜具有防止病原微生物黏附和入侵的能力, 这种能力由非免疫学和免疫学两种机制介导。黏膜表面的非免疫学防御机制包括物理和化学屏障, 如胃内的强酸性环境、肝脏分泌的胆盐和黏膜表面蛋白酶等都不利于病原微生物的生存; 紧密连接的黏膜上皮细胞使病原微生物不易入侵; 胃肠蠕动和小肠绒毛上皮细胞的运动使病原体不易黏附; 由黏膜上皮内的杯状细胞分泌的粘液覆盖在胃肠上皮表面, 可阻止病原微生物及其产生的毒素黏附接触上皮细胞; 存在于唾液、粘液等多数外分泌液中的抗菌物质如乳铁蛋白、溶菌酶、过氧化物酶等可分别通过使细菌减少铁的摄取、损坏细胞壁使细菌裂解、产生氧自由基等方式抑制细菌的生长繁殖。另外, 黏膜表面长期存在的正常微生物群竞争营养物质以及黏附和定殖位置, 形成了另一种重要的固有防御机制^[1-2]。

黏膜的免疫学机制同系统性免疫一样, 也包括固有性免疫和适应性免疫。在一个健康成年人体内, 黏膜局部免疫系统约含 80% 的免疫细胞, 这些免疫细胞在不同的黏膜相关淋巴组织(MALTs)之间聚集或转运, 形成功能独立于系统性免疫系统的、机体内最大的、高度划分的淋巴器官系统——黏膜

相关淋巴器官系统^[3]。由该系统全面介导机体黏膜部位的固有性免疫和适应性免疫。实际上, 固有性免疫和适应性免疫是相互协作和依赖的: 入侵的病原体接触到存在于抗原递呈细胞、淋巴细胞、上皮细胞等免疫细胞表面的模式识别受体如 Toll 样受体(TLRs)、结合核苷酸的寡聚化结构域受体(NLRs)、C 型凝集素和补体受体等后, 模式识别受体可将危险信号反馈给这些细胞, 使细胞产生相应的细胞因子和趋化因子, 募集和激活巨噬细胞、树突状细胞和淋巴细胞等更多的免疫细胞, 从而引起固有性和适应性免疫应答^[4-5]。在黏膜上皮内, 最重要的是黏膜树突状细胞, 激活的树突状细胞可直接捕获抗原或通过高度特化的微皱褶细胞(M 细胞)摄取抗原并递呈给淋巴细胞从而引起特异性黏膜免疫应答^[6-8]。

黏膜免疫应答的一个重要标志是产生分泌型 IgA (sIgA)。sIgA 可能主要通过以下 3 种作用机制发挥保护作用: (1) 阻抑黏附作用: sIgA 在肠上皮表面将病原微生物凝聚, 阻断病原微生物表面的特异结合位点, 或者与病原微生物结合形成复合物刺激杯状细胞分泌大量黏液, 从而阻止病原微生物黏附于黏膜上皮细胞; (2) 通过与溶酶体融合中和胞内病原体; (3) 在黏膜固有层清除病原体^[9]。

除了产生分泌型 IgA, 局部黏膜组织也可产生分泌 IgG 和 IgM^[3,10], 这些抗体也可阻止病原体感染相应部位。除了体液免疫, 黏膜免疫还可产生黏膜细胞毒性 T 淋巴细胞反应(CTLs), 黏膜 CTLs 在清除病原体的过程中也有着重要作用^[11-12]。由此, 黏膜筑起了阻止病原微生物入侵机体的第一道防线。

2 提高黏膜疫苗免疫效果的方法

尽管对黏膜的研究很多, 但由于其免疫途径和诱导的免疫反应的复杂性、实际进入机体的黏膜疫苗的量不易监测、黏膜 T 细胞的收集和功能测试需要大量劳动力且面临着技术问题等原因, 实际应用于预防和治疗人和动物相关疾病的黏膜疫苗非常少, 多数疫苗仍处于试验阶段。Gerdtts 等^[13]指出,

即使在发达的北美地区,目前批准用于家养动物的黏膜疫苗也仅约20种。理想的黏膜疫苗应该:(1)安全,无副作用;(2)在黏膜表面能保持稳定性;(3)易免疫,需要量小;(4)能穿过黏膜屏障;(5)能与黏膜上皮细胞作用,黏附于上皮表面;(6)能刺激黏膜产生固有免疫和适应性免疫;(7)含有能提高疫苗接种率的递送系统;(8)确保效应细胞归巢到感染位置;(9)诱导长效的免疫力^[13]。为此,研究者不断探索着各种方法以期提高疫苗的黏膜免疫效力。

2.1 免疫途径

黏膜免疫途径的选择影响了疫苗的剂型、佐剂的选择等疫苗设计问题,更重要的是,合适的黏膜免疫途径能最大程度地为机体提供相应的保护作用,因此,在免疫中确定最佳的免疫途径是非常重要的。

黏膜免疫途径可根据病原体从何部位入侵机体来选择,如经呼吸道感染的疾病,疫苗经鼻免疫可能会诱导最佳的保护力。相应地,在胃肠道、直肠或阴道等产生最佳保护作用的免疫途径可能分别是经口、直肠或阴道免疫^[2]。但大量的小鼠和人体实验表明,经黏膜途径接种疫苗后,并不仅仅只在疫苗接种部位产生免疫应答,由于共同黏膜免疫系统的存在,还可在其他远距离黏膜组织诱导产生免疫应答。如口服免疫后,除在胃肠道诱导强烈的抗原特异性IgA抗体应答,在生殖道、血液、乳腺和唾液腺也产生了抗原特异性IgA抗体应答;鼻内免疫除诱导呼吸道产生了强烈的IgA抗体应答,在生殖道、血液、乳腺、唾液腺也有抗原特异性IgA的产生;直肠免疫后,在直肠、结肠、血液、乳腺都有抗原特异性IgA的产生;经皮免疫后,可在呼吸道、结肠、直肠、生殖道检测到抗原特异性的IgA。但阴道内免疫,只诱导生殖道产生了强烈的特异性IgA抗体反应和血液IgA应答,并且阴道疫苗的免疫效果可能受生理周期的影响^[2,10,13-16]。很多研究表明,在这几种免疫途径中,鼻黏膜免疫能诱导远距黏膜组织如雌性生殖道产生更强的黏膜免疫反应

和较高的系统性免疫应答^[10,17],因此鼻内免疫被认为是较具优势的免疫途径。

近年来,Czerkinsky和Holmgren等^[14,18-21]报道,在大多数情况下,将灭活病毒、病毒样颗粒、细菌提取物等颗粒性抗原、可溶性蛋白以及减毒活毒株等各种抗原经舌下腺途径接种相应的实验动物模型,均能诱导机体在黏膜和黏膜外组织产生体液免疫和细胞毒性T淋巴细胞反应。其诱导的免疫反应的规模、广度和速度能与鼻免疫相媲美,重要的是,经舌下腺免疫的抗原和佐剂不直接靶向嗅球上皮,因此比鼻黏膜疫苗要更安全。另外,与口胃途径不同,非复制性抗原加佐剂经舌下腺免疫,可诱导分泌型抗体应答和生殖道细胞毒性T淋巴细胞反应^[19]。舌下腺接种人乳头瘤病毒样颗粒可在血清和阴道分泌液中诱发病毒中和性抗体反应,保护宿主免受经阴道攻毒的人乳头瘤病毒的感染^[19]。舌下腺免疫应用于人或动物体上,还有很多问题有待解决,包括其可能存在某些副作用以及对人或哺乳动物体内的精确的免疫学机制还不完全了解等。尽管如此,动物模型经舌下腺免疫获得了优良保护作用,这提示我们该免疫途径是值得继续探索的黏膜免疫途径。

另外,研究者也聚焦于将多种黏膜免疫途径结合使用或黏膜途径与注射途径联合使用。如Vajdy等^[22]研究显示,肌肉注射乙肝病毒表面抗原(HBsAg)只能诱导血清抗原特异性IgG抗体反应和细胞毒性T淋巴细胞反应,而不能诱导黏膜特异性IgA的产生,但经鼻加强免疫后,不仅能明显提高血清抗原特异性IgG抗体反应和细胞毒性T淋巴细胞反应,而且诱导了黏膜特异性IgA的产生。反之,先用鼻内免疫进行第一次免疫,再用肌肉注射进行加强免疫,也诱导小鼠体内产生了系统性免疫应答并加强了黏膜免疫反应。这些研究提示我们,对于某些疫苗,最佳的黏膜疫苗策略可能是联合使用黏膜免疫途径和全身性免疫途径。

2.2 黏膜疫苗佐剂

黏膜疫苗通过刺激黏膜免疫系统和系统性免

疫系统产生免疫反应,既能在感染早期阻止病原体入侵黏膜,又能在感染后中和病原体产生的毒素或抑制病原体在机体内复制。但黏膜免疫也存在不足,如由于抗原在黏膜表面的不稳定性,需要的免疫剂量较大;疫苗免疫原性不足而诱导免疫耐受;黏膜的物理屏障作用等。黏膜免疫的多数缺点可通过使用有效的佐剂和疫苗递送系统来避免^[23]。佐剂可提高高度纯化或重组抗原的免疫原性;减少免疫原的量或免疫次数;改善疫苗在新生儿、老年人或免疫力低下人群的免疫效力。另外,一些佐剂可作为抗原递送系统,加强黏膜对抗原的摄取^[24]。理想

的佐剂应具有以下特征:(1) 在有效的佐剂活性剂量范围内无毒;(2) 能刺激产生强烈的体液或细胞免疫应答;(3) 能提供长期的免疫记忆;(4) 不诱导自身免疫病和过敏反应;(5) 非致畸、致癌、致突变物质;(6) 不致高热;(7) 在大范围的储存时间、温度和 pH 条件下能保持稳定^[23-24]。佐剂的种类很多,但并不是所有的佐剂都能有效提高黏膜免疫应答,如目前在人用疫苗上应用得最多的注射佐剂明矾,经口服或鼻内途径免疫时却没有相应的佐剂效果^[25-26]。最有应用前景的黏膜佐剂有细菌毒素及其衍生物、TLR 配体、非 TLR 免疫刺激物和一些小分子(表 1)。

表 1 黏膜疫苗佐剂和疫苗递送系统 Table 1 Mucosal vaccine adjuvants and vaccine delivery systems			
	类别 Categories	主要功能 Main functions	应用举例 Application examples
细菌、病毒及其 衍生物 Bacterium/virus and their derivatives	减毒活细菌疫苗	佐剂/载体	酪氨酸羟化酶乙肝病毒和 HIV
	霍乱毒素(CT)	载体	幽门螺旋杆菌
	不耐热肠毒素(LT)	载体	霍乱弧菌 O 抗原特异性脂多糖
	外膜蛋白微囊体(OMVs)	佐剂/载体	肺炎链球菌蛋白 PspA
	病毒和病毒样颗粒(VLP)	佐剂/载体	传染性法氏囊病毒 VP2 疫苗
	霍乱毒素(CT)和不耐热肠毒素(LT)的脱毒产物以及霍乱毒素 A 亚单位突变体	佐剂	结核分枝杆菌蛋白抗原;产肠毒素大肠杆菌全菌灭活疫苗
TLR 配体 TLR agonists	单磷酸脂质 A (MPL)	佐剂	乙肝病毒表面抗原
	CpG-ODN	佐剂	破伤风类毒素;分枝杆菌 BCG
	鞭毛蛋白	佐剂	流感病毒血凝素表位或全病毒灭活疫苗
纳米和微米粒子 Nanoparticles and microparticles	聚乙烯(PLG)	载体	轮状病毒 VP4、VP6 和 VP7 DNA 疫苗
	聚苯乙烯	载体	金黄色葡萄球菌肠毒素疫苗
脂质或含脂质 物质 Lipid-based or lipid-containing	脂质体	载体	耶尔森菌全菌灭活疫苗
	脂蛋白体	载体	OVA
	免疫刺激复合物(ISCOMS)	佐剂/载体	OVA
	Cochleates	载体	OVA
	Eurocine™ 脂肪酸单甘脂	佐剂	百日咳菌苗
	古细菌脂质黏膜疫苗佐剂和载体系统 (AMVAD)	佐剂/载体	OVA
	皂苷	佐剂	HIV-1 囊膜蛋白抗原
	壳聚糖	佐剂	乙肝病毒表面抗原
其他 Others	内源性分子(细胞因子、趋化因子和防卫素)	佐剂	单纯疱疹病毒 2 型疫苗
	cdiGMP	佐剂	β-半乳糖苷酶和 OVA
	转基因植物“食用”疫苗	佐剂/载体	乙肝病毒表面抗原
	超分子生物载体(SMBVs)	载体	流感病毒疫苗

2.2.1 细菌毒素及其衍生物:霍乱毒素(CT)和不耐热肠毒素(LT)是试验系统中研究得最透彻、最有效的黏膜佐剂^[26-27]。CT 和 LT 能增加肠上皮的通透性,从而加强肠黏膜对抗原的摄取;可提高抗原递呈细胞递呈抗原的能力;可促进 B 细胞分化为 IgA 浆细胞;在 T 细胞增殖和细胞因子产生方面发挥复杂的刺激和抑制效应^[28-30]。基于这些作用机制,CT 或 LT 与抗原经黏膜或皮肤表面免疫动物后可加强抗原特异性 IgA 的产生并延长免疫记忆^[3]。但当用作人用疫苗的佐剂时,CT 和 LT 都具有太多的毒性。志愿者口服含 5 μg CT 的磷酸盐缓冲液造成了严重的腹泻;含 2 μg LT 的流感疫苗经鼻免疫人后,部分受试者出现贝尔氏麻痹症状^[31-32]。

为降低 CT 或 LT 的毒性,且同时保留其最佳的佐剂活性,研究者进行了长期的探索,其中,Norton 等^[33]构建的 LT 的双缺突变体 LT (R192G/L211A)(dmLT)几乎完全无毒并保留了强烈的佐剂活性。目前,dmLT 蛋白正在进行 I 期临床试验以检测其对人的不良反应,若其对人无毒,则将其结合产肠毒素大肠杆菌口服疫苗,观察能否提供保护性免疫作用。

2.2.2 TLR 配体:Toll 样受体(TLR)识别病原相关分子模式(PAMPs)会导致促炎症性细胞因子的产生和共刺激分子表达上调,从而激活固有性和适应性免疫应答。黏膜细胞或多或少都能表达 TLR,理论上,当这些细胞受到适当的刺激,能帮助诱导产生免疫应答^[23]。因此,通过 TLR 和其配体激活固有免疫系统可能是提高免疫应答的有效策略。

AS04 是美国首次及目前唯一应用的 TLR 配体黏膜佐剂,被美国食品及药品管理局批准(FDA)用于人乳头瘤病毒疫苗。AS04 由明矾和单磷酸脂质 A (MPL)组成,其受体是 TLR4 和 TLR2。Childers 等^[34]将 MPL 与不同的抗原一起经口服或鼻内途径进行免疫,结果表明 MPL 与以脂质体为载体的抗原经鼻免疫后有佐剂活性,能加强黏膜和系统性免疫应答。Baldridge 等^[35]报道,MPL 能够提高针对

乙肝病毒表面抗原、破伤风类毒素或流感病毒抗原的黏膜 IgA 抗体滴度,并诱导以 Th1 型应答为特征的系统性反应,同时增强细胞毒性 T 淋巴细胞反应。另外,研究报道,MPL 在以脂质体为载体的抗原中,佐剂活性更高^[34,36]。如由 MPL、脂质体和皂苷组成的 AS04 与 HIV 疫苗经阴道免疫非人灵长类动物,可显著提升黏膜和适应性免疫^[37]。

另一个有应用前景的黏膜佐剂是 TLR9 的配体 CpG, CpG 与 TLR9 相互作用后,通过 Toll/IL-1 受体信号途径迅速激活树突状细胞、脾细胞、单核细胞和巨噬细胞,使其产生 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IL-12、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和趋化因子等细胞因子,这些细胞因子又会刺激 T 细胞使其分泌细胞因子,并刺激自然杀伤细胞分泌 IFN- γ ^[38-39],提升宿主免疫应答。CpG 还能引起 B 细胞增殖,从而强烈影响由 B 细胞介导的抗原特异性免疫反应。另外,CpG ODNs 可引起共刺激分子和 MHC II 类分子表达上调,提高抗原递呈水平^[1]。CpG ODNs 已作为乙肝病毒表面抗原、灭活流感病毒、合成的麻疹病毒肽、I 型疱疹病毒糖蛋白膜、破伤风类毒素和分枝杆菌 BCG 等多种抗原的佐剂经口、鼻等黏膜途径接种动物模型,结果表明,它能明显增强针对相应抗原的固有性和适应性黏膜免疫应答^[40-41]。重要的是,一些研究指出,CpG ODNs 作为 Th1 型佐剂,诱导的 T、B 细胞应答强于弗氏佐剂,且毒性远小于弗氏佐剂^[29]。另一个重要的发现是,CpG ODNs 与 CTB 结合后其佐剂效应明显增强,能显著地提升不同抗原递呈细胞的活性以及促进体内 T 细胞反应和抗体应答^[42]。虽然动物模型实验数据显示 CpG ODNs 具有很好的黏膜佐剂活性,但目前人的临床试验中,CpG ODNs 主要作为注射用疫苗的佐剂,这些临床试验表明 CpG ODNs 有良好的安全性^[43],为 CpG ODNs 应用于黏膜疫苗提供了科学依据。

鞭毛蛋白是近几年才研究报道的具有许多优点的黏膜佐剂,鞭毛蛋白是目前报道的 TLR5 的唯

一同源配体, 只使用 MyD88 作为细胞质接头分子^[44]。Lee 等^[45]首次展示了鞭毛蛋白的佐剂活性优于其他 TLRs 配体, 创伤弧菌鞭毛蛋白与破伤风类毒素混合后经鼻免疫明显加强了抗破伤风毒素的保护性免疫。目前的研究表明鞭毛蛋白对破伤风类毒素(鼻内)^[45]、大肠杆菌热稳定毒素(口服)^[46]、人免疫缺陷病毒(口服)^[47]等多种抗原都具有黏膜佐剂活性作用。在鞭毛蛋白存在下, 机体产生了加强的抗原特异性黏膜固有性和适应性免疫应答, 为抵抗病原体的感染提供了保护作用。目前, 以鞭毛蛋白为佐剂的疫苗正在人体上进行 I 期临床实验, 以确定其对人无不利影响, 如全身性细胞因子分泌过量、免疫部位严重的炎症反应等。但由于极低的鞭毛蛋白量(1–10 μg)就能发挥相应效果^[48], 这些不良反应可能可以通过减少鞭毛蛋白量来避免^[49]。另外, 鞭毛蛋白的佐剂活性与 CT 和 LT 几乎相同, 但鞭毛蛋白不会在嗅觉神经积累且分子生物学遗传操作更为容易^[50], 因此, 鞭毛蛋白可能成为最具应用前景的蛋白质黏膜佐剂。

2.2.3 其他黏膜佐剂:除了上述的几种黏膜佐剂外, 免疫刺激复合物(ISCOMs)、 β -半乳糖神经酰胺、树突状细胞凝集素 1 激动剂、古细菌脂质黏膜疫苗佐剂和递送系统(AMVAD)和环鸟苷一磷酸(c-di-GMP)等非细菌毒素、非 TLR 配体、非细胞、趋化因子物质也具有黏膜佐剂活性。ISCOMs 具有佐剂效应的机制是其能募集抗原递呈细胞, 产生 IL-2 等细胞因子并调控抗原摄取, 从而刺激固有性免疫应答。更重要的是, ISCOMs 能将抗原靶向核内体和细胞质, 引起 MHC II 和 MHC I 限制性免疫应答^[13]。 β -半乳糖神经酰胺是 CD1d 的配体和自然杀伤细胞(NKT)激活剂, 是近几年报道的能用于各种疫苗的有效黏膜佐剂^[44]。树突状细胞凝集素 1 激动剂作为黏膜佐剂加强了 Th17 型免疫应答和 IgA 抗体反应^[51]。AMVAD 与 OVA 经鼻免疫小鼠后, 诱导鼻内、胃肠道、阴道和血清部位产生了强烈的 OVA 特异性 IgA 抗体应答以及系统性抗体

应答和 CTL 反应, 并维持了长期持续的免疫记忆^[52]。随后在实验动物模型上的研究显示 AMVAD 作为黏膜佐剂具有安全、有效、稳定等优点, 但 AMVAD 的佐剂活性机制还需进一步探索^[53]。c-di-GMP 是一个胞内信号分子, 不存在于高等真核生物, 常见于细菌, 是细菌内的第二信使。近年来有研究报道, c-di-GMP 可作为潜在的疫苗佐剂。体外研究显示, c-di-GMP 能诱导人未成熟的树突状细胞活化和成熟, 并加强 T 细胞的免疫活性^[54]。目前已有许多研究显示了 c-di-GMP 在不同实验动物模型中的黏膜佐剂活性^[55–56]。

2.3 疫苗递送载体

疫苗递送载体用来保护抗原不被黏膜的物理机制清除, 并不被黏膜表面的酶消化, 帮助抗原通过 M 细胞到达 Peyer's patch 等黏膜免疫应答诱导部位。事实上, 上述的一些佐剂同时也具有递送疫苗的功能, 如 OMVs、AMVAD 和 ISCOMs。同时, 细菌或病毒载体还具有很好的免疫刺激性, 提高机体对外源抗原的免疫原性。目前, 已研究报道得较多的疫苗载体见表 1。

2.3.1 活细菌载体:减毒活细菌作为不仅能有效运载外源抗原疫苗穿过黏膜上皮, 通过其分泌系统将外源抗原递送给抗原呈递细胞, 还具有免疫刺激性, 能加强机体对抗原的黏膜或系统性免疫反应。目前, 研究得较多的减毒活细菌疫苗载体有单核细胞增生性李斯特菌、沙门菌、大肠杆菌、志贺菌、炭疽芽孢杆菌、乳酸菌、耶尔森氏鼠疫杆菌、假结核棒状杆菌等^[13]。这些载体广泛用于运载细菌、病毒、寄生虫或 DNA 疫苗, 接种免疫实验动物。以减毒沙门菌为例, 大量研究表明, 利用减毒沙门菌运载含有外源基因的表达质粒, 由其毒力岛编码的 III 型分泌系统可将外源抗原直接分泌到宿主细胞中, 被抗原提呈细胞摄取, 且由于沙门菌是侵袭性胞内菌, 可使外源抗原在体细胞内进行持续表达, 从而加快并加强了外源抗原特异性的免疫反应, 在研制基因工程疫苗方面有独特的优越性。但传统的

通过直接缺失全局调控基因、代谢关键酶基因或毒力基因等对沙门菌存活起着关键作用的基因得到的减毒沙门菌对宿主内环境的抵抗力有所下降,运送异源抗原时可能还未到达宿主靶细胞就被宿主清除。为进一步提高沙门菌递送外源抗原的能力,作者与导师 Roy Curtiss III 以及其他同事对沙门菌等细菌性载体做了很多改造,如构建延迟减毒系统^[57-58],使重组减毒沙门菌疫苗顺利侵染宿主,有效定殖于效应淋巴组织,作为合成保护性抗原的“工厂”,诱导高效的保护性免疫应答;修饰沙门菌类脂 A^[59-60],使其由高毒性变为低毒性,减少了炎症性反应但不影响疫苗效力^[61];提高含异源抗原沙门菌外膜微囊体的分泌以提高外源抗原的免疫原性^[62-63];构建含 Asd⁺和 DadB⁺筛选标记的双质粒系统以开发多价疫苗,针对相应病原体提供完全的保护作用^[62-64]。这些技术改造提高了减毒沙门菌载体的安全性、耐受性以及有效性,这表明以减毒沙门菌为载体开发安全、有效、低成本的重组疫苗具备广阔的应用价值。有研究报道,减毒鼠伤寒沙门菌已用于表达 35 种细菌性抗原、15 种病毒抗原以及 15 种寄生虫抗原^[65]。如细菌性疫苗包括大肠杆菌、志贺菌、炭疽芽孢杆菌、结核分枝杆菌、幽门螺旋杆菌和单核细胞增生性李斯特菌等;病毒疫苗包括 HPV-16、乙肝病毒和 HIV 等;肿瘤疫苗如酪氨酸羟化酶、PSA、血管内皮生长因子受体 2、存活素、转录因子 Fos 相关抗原 1 等。动物实验结果表明,沙门菌载体的存在,改善了机体针对这些外源抗原的免疫反应。

2.3.2 病毒载体:病毒载体是能有效运送疫苗抗原穿过黏膜表面的另一潜在“工具”。病毒载体的效力主要与其宿主范围、组织嗜性、在动物体内的复制能力和外源抗原的表达而决定^[13]。目前, DNA 病毒和 RNA 病毒都被用作疫苗载体,如痘病毒、腺病毒和疱疹病毒等 DNA 病毒, 克林病毒、新城疫病毒、委内瑞拉乙型脑炎病毒以及一些逆转录病毒等 RNA 病毒^[13]。虽然研究得很多,但病毒载体

的安全性、稳定性、适用性及其在各种条件下的有效性仍是值得考虑的问题。

近年来发现,一种称为“假病毒”或病毒样颗粒(VLP)的物质作为疫苗运送载体具备广阔的发展前景。与病毒载体相比, VLP 更安全、便宜、易于制造,且保持良好的免疫原性^[14]。因此,少数病毒的 VLP 已成为商业化疫苗,如基于乙肝病毒和 HPV VLP 的疫苗^[66]。

2.3.3 其他疫苗载体:微粒递送系统可以保护蛋白质、灭活疫苗抗原不易被降解或清除,并能加强黏膜部位先天免疫细胞对抗原的摄取^[13]。研究较多的用于递送黏膜疫苗的微粒包括脂质体、脂蛋白体、Cochleates、聚苯乙烯、聚乙烯(PLG)等^[13,53,67]。更重要的是,这些载体可用生物黏附聚合物或表面活性剂等物质进行表面修饰,改变其大小、表面电荷和疏水性等,从而增加其与黏膜表面的相互作用或提高抗原的生物利用度。生物黏附物质包括聚乙二醇(PEG)、壳聚糖、硫胺素、精胺、油酸和藻酸盐等。此外,还可利用凝集素、微生物黏附素和单克隆抗体等包裹这些微粒,使其选择性地结合肠上皮表面的 M 细胞,增加淋巴组织对抗原的摄取^[68]。此外,这些微粒还可与 TLR 激动剂等佐剂一起使用,促进 DC 细胞活化,提高对外源抗原的黏膜固有性和适应性免疫应答^[69-71]。对多聚体微粒疫苗的修饰提高了疫苗在啮齿类和小动物体内的免疫原性,然而,基于此开发能有效用于人的微粒载体黏膜疫苗,还需要进一步解析黏膜 M 细胞、树突状细胞和其他抗原递呈细胞在摄取抗原和促进黏膜固有性免疫中的作用。

3 问题与展望

鉴于多数病原体都可经黏膜途径感染人类或动物体,研究和开发安全、稳定、高效的黏膜疫苗已成为疫苗研究领域的热点话题。

提高疫苗的黏膜免疫效力首先得了解病原体的感染特性,选择合适的黏膜免疫途径。虽然机体存在共同黏膜免疫系统,即在某一黏膜部位进行免

疫后,可能会在除了免疫部位以外的其他远距离黏膜部位也产生免疫应答,但黏膜相关淋巴组织也是一个高度划分的免疫系统(分为肠道相关淋巴组织 GALT、支气管相关淋巴组织 BALT、鼻相关淋巴组织 NALT 等),由于每一部位组织结构各不相同,通过不同的免疫途径进行局部免疫,会对系统性免疫应答和各黏膜部位的免疫应答水平产生显著的影响。因此,针对不同的病原体选择合适的黏膜免疫途径是非常重要的。其次,需要合理选择和利用佐剂或载体。黏膜佐剂和疫苗递送系统会增强疫苗对胃肠道低 pH 环境、胆盐、蛋白酶等不利环境的抵抗力,尤其像减毒沙门菌这样具有免疫刺激活性的黏膜疫苗载体,不仅能将外源保护性抗原送到机体的免疫系统,帮助其在正确的位置诱导保护性黏膜免疫应答,还能刺激机体的固有性免疫系统,增强机体对外源抗原的特异性免疫反应。目前,选择最佳的黏膜免疫途径、确定佐剂或靶向物质与载体系统的最佳组合以获得最佳的黏膜免疫效果且不伴随着不良反应的发生是黏膜疫苗开发的一大挑战。就目前研究的黏膜疫苗而言,尽管很多疫苗在动物模型上取得了理想的效果,但人和动物机体存在异质性,如肠道菌群、营养状态以及与病原体的相互作用存在差异等因素都会影响黏膜疫苗的安全与效力。因此,还需要对病原体与宿主,尤其是病原体与人体之间的相互作用、疫苗在动物体发挥保护作用的机制等进行更深入地研究,并通过大量临床试验评估疫苗的安全性与免疫效力后才能将这些黏膜疫苗广泛应用于人体。

参 考 文 献

- [1] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines[J]. *Nature Medicine*, 2005, 11(4 Suppl): S45-S53
- [2] Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(2): 148-158
- [3] Mestecky J, Lamm ME, Ogra PL, et al. *Mucosal Immunology*[M]. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press, 2005: 1-11
- [4] Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, 100(1): 6
- [5] Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, et al. Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001, 280(4): G710-G719
- [6] Kelsall BL, Rescigno M. Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(11): 1091-1095
- [7] Macpherson G, Milling S, Yrlid U, et al. Uptake of antigens from the intestine by dendritic cells[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, 1029(1): 75-82
- [8] McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(1): 17-27
- [9] Robinson JK, Blanchard TG, Levine AD, et al. A mucosal IgA-mediated excretory immune system *in vivo*[J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 166(6): 3688-3692
- [10] Kozlowski PA, Williams SB, Lynch RM, et al. Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(1): 566-574
- [11] Franco MA, Greenberg HB. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice[J]. *Journal of Virology*, 1995, 69(12): 7800-7806
- [12] Buzoni-Gatel D, Lepage AC, Dimier-Poisson IH, et al. Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*[J]. *The Journal of Immunology*, 1997, 158(12): 5883-5889
- [13] Gerdts V, Mutwiri GK, Tikoo SK, et al. Mucosal delivery of vaccines in domestic animals[J]. *Veterinary Research*, 2006, 37(3): 487-510
- [14] Czerkinsky C, Holmgren J. Topical immunization strategies[J]. *Mucosal Immunology*, 2010, 3(6): 545-555
- [15] Czerkinsky C, Holmgren J. Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues[A]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2012(354): 1-18
- [16] Ogra PL, Faden H, Welliver RC. Vaccination strategies for mucosal immune responses[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(2): 430-445
- [17] Staats HF, Montgomery SP, Palker TJ. Intranasal immunization is superior to vaginal, gastric, or rectal immunization for the induction of systemic and mucosal anti-HIV antibody responses[J]. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1997, 13(11): 945-952
- [18] Çuburu N, Kweon MN, Song JH, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice[J]. *Vaccine*, 2007, 25(51): 8598-8610
- [19] Çuburu N, Kweon MN, Hervouet C, et al. Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(12): 7851-7859
- [20] Czerkinsky C, Çuburu N, Kweon MN, et al. Sublingual vaccination[J]. *Human Vaccines*, 2011, 7(1): 110
- [21] Singh S, Yang G, Schluns KS, et al. Sublingual vaccination induces mucosal and systemic adaptive immunity for protection against lung tumor challenge[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90001
- [22] Vajdy M, Singh M, Kazzaz J, et al. Mucosal and systemic anti-HIV responses in rhesus macaques following combinations of intranasal and parenteral immunizations[J]. *AIDS Research Human Retroviruses*, 2004, 20(11): 1269-1281

- [23] Rhee JH, Lee SE, Kim SY. Mucosal vaccine adjuvants update[J]. Clinical and Experimental Vaccine Research, 2012, 1(1): 50-63
- [24] Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends[J]. Immunology and Cell Biology, 2004, 82(5): 488-496
- [25] Alpar H, Bowen J, Brown M. Effectiveness of liposomes as adjuvants of orally and nasally administered tetanus toxoid[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1992, 88(1): 335-344
- [26] Lawson LB, Norton EB, Clements JD. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity[J]. Current Opinion in Immunology, 2011, 23(3): 414-420
- [27] Holmgren J, Adamsson J, Anjuère F, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA[J]. Immunology Letters, 2005, 97(2): 181-188
- [28] Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral—mucosal adjuvant and antigen vector systems[J]. Vaccine, 1993, 11(12): 1179-1184
- [29] Holmgren J, Harandi AM, Czerkinsky C. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA[J]. Immunology Letters, 2005, 97(2): 181-188
- [30] Pizza M, Giuliani M, Fontana M, et al. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants[J]. Vaccine, 2001, 19(17): 2534-2541
- [31] Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland[J]. New England Journal of Medicine, 2004, 350(9): 896-903
- [32] van Ginkel FW, Jackson RJ, Yoshino N, et al. Enterotoxin-based mucosal adjuvants alter antigen trafficking and induce inflammatory responses in the nasal tract[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(10): 6892-6902
- [33] Norton EB, Lawson LB, Freytag LC, et al. Characterization of a mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin, LT (R192G/L211A), as a safe and effective oral adjuvant[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2011, 18(4): 546-551
- [34] Childers NK, Miller KL, Tong G, et al. Adjuvant activity of monophosphoryl lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(10): 5509-5516
- [35] Baldrige JR, Yorgensen Y, Ward JR, et al. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration[J]. Vaccine, 2000, 18(22): 2416-2425
- [36] Cox E, Verdonck F, Vanrompay D, et al. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa[J]. Veterinary Research, 2006, 37(3): 511-539
- [37] Cranage MP, Fraser CA, Cope A, et al. Antibody responses after intravaginal immunisation with trimeric HIV-1 CN54 clade C gp140 in Carbopol gel are augmented by systemic priming or boosting with an adjuvanted formulation[J]. Vaccine, 2011, 29(7): 1421-1430
- [38] Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, et al. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs[J]. The Journal of Immunology, 2001, 166(4): 2372-2377
- [39] Heegaard PM, Dedieu L, Johnson N, et al. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments[J]. Archives of Virology, 2011, 156(2): 183-202
- [40] McCluskie MJ, Weeratna RD, Payette PJ, et al. The potential of CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants[J]. Critical Reviews in Immunology, 2001, 21(1/3): 103-120
- [41] Harandi AM, Holmgren J. CpG DNA as a potent inducer of mucosal immunity: implications for immunoprophylaxis and immunotherapy of mucosal infections[J]. Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000), 2004, 5(2): 141-145
- [42] Adamsson J, Lindblad M, Lundqvist A, et al. Novel immunostimulatory agent based on CpG oligodeoxynucleotide linked to the nontoxic B subunit of cholera toxin[J]. The Journal of Immunology, 2006, 176(8): 4902-4913
- [43] Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant[J]. Expert Review of Vaccines, 2011, 10(4): 499-511
- [44] Akira S. Innate immunity and adjuvants[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2011, 366(1579): 2748-2755
- [45] Lee SE, Kim SY, Jeong BC, et al. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(1): 694-702
- [46] Pereira CM, Guth BEC, Sbrogio-Almeida ME, et al. Antibody response against *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin expressed as fusions to flagellin[J]. Microbiology, 2001, 147(4): 861-867
- [47] Vassilieva EV, Wang BZ, Vzorov AN, et al. Enhanced mucosal immune responses to HIV virus-like particles containing a membrane-anchored adjuvant[J]. Microbiology, 2011, 2(1): e00328-00310
- [48] Delaney KN, Phipps JP, Johnson JB, et al. A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice[J]. Viral Immunology, 2010, 23(2): 201-210
- [49] Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential[J]. The Journal of Immunology, 2010, 185(10): 5677-5682
- [50] Hong SH, Byun YH, Nguyen CT, et al. Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection[J]. Vaccine, 2012, 30(2): 466-474
- [51] Agrawal S, Gupta S, Agrawal A. Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13418
- [52] Patel GB, Zhou H, Ponce A, et al. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines[J]. Vaccine, 2007, 25(51): 8622-8636
- [53] Chen W, Patel GB, Yan H, et al. Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems[J]. Human Vaccines, 2010, 6(9): 706-714
- [54] Yan H, KuoLee R, Tram K, et al. 3',5'-Cyclic diguanylic acid elicits mucosal immunity against bacterial infection[J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2009, 387(3): 581-584
- [55] Chen W, KuoLee R, Yan H. The potential of 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant[J]. Vaccine, 2010, 28(18): 3080-3085
- [56] Pedersen GK, Ebsen T, Gjeraker IH, et al. Evaluation of the sublingual route for administration of influenza H5N1 virosones in combination with the bacterial second messenger c-di-GMP[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e26973
- [57] Kong Q, Liu Q, Roland KL, et al. Regulated delayed expression of *rfaH* in an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine enhances immunogenicity of outer membrane proteins and a heterologous antigen[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(12): 5572-5582

- [58] Kong Q, Liu Q, Jansen AM, et al. Regulated delayed expression of *rfe* enhances the immunogenicity and protective efficacy of a heterologous antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* vaccines[J]. *Vaccine*, 2010, 28(37): 6094-6103
- [59] Kong Q, Six DA, Roland KL, et al. *Salmonella* synthesizing 1-monophosphorylated lipopolysaccharide exhibits low endotoxic activity while retaining its immunogenicity[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(1): 412-423
- [60] Kong Q, Six DA, Liu Q, et al. Palmitoylation state impacts induction of innate and acquired immunity by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *msbB* mutant[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(12): 5027-5038
- [61] Kong Q, Yang J, Liu Q, et al. Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(10): 4227-4239
- [62] Wang S, Kong Q, Curtiss III R. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2013, 58: 17-28
- [63] Chen DJ, Osterrieder N, Metzger SM, et al. Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(7): 3099-3104
- [64] Zhao G, Weatherspoon N, Kong W, et al. A dual-signal regulatory circuit activates transcription of a set of divergent operons in *Salmonella typhimurium*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(52): 20924-20929
- [65] Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines[J]. *Immunological Reviews*, 1999, 171(1): 5-26
- [66] Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176
- [67] Singh M, Chakrapani A, O'Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2007, 6(5): 797-808
- [68] McNeela E, Lavelle E. Recent advances in microparticle and nanoparticle delivery vehicles for mucosal vaccination[A]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2012, 354: 75-99
- [69] Sharp FA, Ruane D, Claass B, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(3): 870-875
- [70] Kwon YJ, James E, Shastri N, et al. *In vivo* targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(51): 18264-18268
- [71] Pun PB, Bhat AA, Mohan T, et al. Intranasal administration of peptide antigens of HIV with mucosal adjuvant CpG ODN coentrapped in microparticles enhances the mucosal and systemic immune responses[J]. *International Immunopharmacology*, 2009, 9(4): 468-477