e224-228.

[19] Nadjarzadeh A, Shidfar F, Amirjannati N, et al. Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial[J]. Andrologia, 2014, 46(2): 177-183.

[20] Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial[J]. Fertil Steril, 2009, 91(5): 1785-1792.

[21] Safarinejad MR. Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men[J]. J Urol, 2009, 182(1): 237-248.

[22] Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, et al. Effects of the reduced form of coenzyme Q 10 (ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study[J]. J Urol, 2012, 188(2): 526-531.

[23] Safarinejad MR. The effect of coenzyme Q10 supplementation on partner pregnancy rate in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: an open-label prospective study[J]. Int Urol Nephrol, 2012, 44(3): 689-700.

[24] Lafuente R, González-Comadrán M, Solà I, et al. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis[J]. J Assi Rep Gene, 2013, 30(9): 1147-1156.

(收稿日期:2016-03-26 修回日期:2016-06-14)

·综 述· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.037

佐剂在肺炎链球菌疫苗免疫中的作用*

张 静 综述,崔亚利,江咏梅△审校

(四川大学华西第二医院检验科,成都 610041)

[关键词] 霍乱毒素;肺炎链球菌疫苗;佐剂

[中图分类号] R446 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2016)25-3565-03

肺炎链球菌是引起各年龄组高发病率和病死率的主要病原菌,其疫苗的研制和使用对肺炎链球菌感染的防治具有重要意义。但目前临床能投入使用的疫苗却较少,主要有 23 价多糖疫苗和 7、10、13 价多糖蛋白结合疫苗,原因之一是缺乏能用于人体的高效的免疫佐剂。肺炎链球菌疫苗常用的佐剂主要有:霍乱毒素(cholera entero toxin,CT)、大肠杆菌不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin LT)、乳酸乳球菌(lactococcus lactis)、DNA 疫苗佐剂、铝剂等。本文对肺炎链球菌疫苗中常用的几种佐剂的免疫效应进行了综述,为肺炎链球菌疫苗及免疫佐剂的临床应用和进一步研制提供参考资料。

1 常用肺炎链球菌疫苗佐剂及作用机制

1.1 CT CT 是霍乱弧菌分泌的一种不耐热肠毒素,由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位构成[1]。A 亚单位为毒性单位,可引起机体腹泻,包含 A1 和 A2 两种肽链,A1 肽链具有腺苷二磷酸(ADP)核糖基转移酶活性,能催化肠道上皮细胞表面环磷酸腺苷复合物中三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白腺苷二磷酸核糖化反应。A2 肽链则通过与 B 亚单位结合参与受体介导的内吞作用中的转位作用。B 亚单位能特异性地同时与真核生物肠上皮细胞的 5 个神经节苷脂神经节苷脂 1(GM1)结合[2],它们之间的这种交互作用可增强机体对疾病的感应。已有学者提出 CTB 可有效增强自身免疫病及过敏性疾病的治疗效果[3]。CTB 与抗原共同经鼻或口服免疫,不仅诱导局部黏膜发生免疫反应,同时远隔部位其他黏膜也可产生。其免疫反应的机制可能如下:(1)诱导肠黏膜离子通道和载体的表达,增加分泌黏蛋白的表达[4],也可通过改变抗原的物理性状和增加肠黏膜通透性来增加抗原的摄入量。(2)增强抗原递呈细胞(如树突状细胞、吞噬细胞、B 淋巴细胞)呈递抗原的能力[5]。(3)增强细胞因子如白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-10,而非 IL-2、IL-12、干扰素 γ(IFN-γ)的产生及诱导以 Th17 为主的免疫反应[6],也可通过激活肠黏膜淋巴细胞核因子 κB(NF-κB)通路增强免疫效应[7]。(4)诱导产生抗炎反应,促进 Th2 型反应,抑制 Th1 型反应,增强 IgA 的产生。(5)调节黏膜相关淋巴组织 T 调节细胞(Treg)生长环境。

CT 作为免疫佐剂主要有两种使用方式:一种是与抗原形成嵌合或融合蛋白进行免疫,另一种是与抗原简单的混合共同免疫,这两种方法对免疫效应的影响是不同的。目前肺炎链球菌候选疫苗蛋白,如肺炎链球菌表面蛋白 A(PsaA)与 CTB 融合,形成融合蛋白,融合的 PsaA-CTB 免疫原性远远高于单独的 PsaA 或 CTB,经鼻或经口免疫可诱导系统的及局部的免疫反应,诱导产生大量 IgG 和 IgA,其中由 Th2 型免疫反应介导的抗体亚型 IgG1、IgG2a 滴度最高。虽然 CT 已广泛用于动物实验,但因其具有强毒性,在人体的使用仍受到限制,目前,已有研究通过对 CTA 区域进行肽链融合及对 CT 的活性中心进行定点诱变来减弱 CT 的毒性[3]。

1.2 LT LT 由产毒性大肠杆菌产生,其三维结构与 CT 极为相似,由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位组成,A 亚单位具有 ADP 核糖基转移酶活性,B 亚单位则可与细胞结合[8]。根据基因、生化、免疫学方面的差异,可将 LT 分为 LTⅠ和 LTⅡ,通常所说的 LT 一般是指Ⅰ型大肠杆菌不耐热肠毒素,而 LTⅡ与人类疾病无关,在自然界很少见。LT 通过肠道黏液的分泌来激活 A 亚单位,诱导机体产生较强的体液和细胞免疫反应。LTA 是 LTⅠ的毒性亚基,可引起机体发生水性腹泻。目前,有些研究者通过突变 LT 中的某些氨基酸位点,去除毒性而保留其作为佐剂的免疫原性。LTB 无毒性且具有良好的黏

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81301399)。 作者简介:张静(1989—),在读硕士,主要从事肺炎链球菌致病机制及蛋白疫苗研发的分子生物学研究。 △ 通讯作者,E-mail:jiangyongmei-1@163.com。

膜佐剂活性，可作为黏膜免疫的佐剂。LTB 通过与免疫细胞表面的受体结合而发挥作用。目前，LT 作为佐剂已可通过黏膜（滴鼻、舌下、口服、直肠）、局部外用（经皮）、肠外（皮下、皮内）等免疫途径与免疫原共同用于机体免疫。LT 可能通过调节一些细胞因子的水平，如 IFN-γ、IL-4、IL-10 等来增强免疫效应。

1.3 乳酸乳球菌 乳酸乳球菌是一种革兰阳性菌，在发酵及食品保存中广泛应用，被美国食品与药品管理局（food and drug administration，FDA）认证为安全级微生物（generally regarded as safe，GRAS）。乳酸乳球菌基本不在胃肠道内定植，不会危害肠道内正常益生菌群和造成基因污染，并可避免长期定植带来的耐受[9]。活的或灭活的乳酸乳球菌都是较好的疫苗载体[10]，能诱导特定人群如婴幼儿、老年人、免疫抑制人群产生有效的免疫反应。乳酸乳球菌本身分泌蛋白较少，可减少载体微生物自身蛋白对外源分泌蛋白的干扰，不产生任何胞外蛋白酶，不会引起抗原蛋白降解，表达的重组蛋白不需纯化[11]。乳酸乳球菌可激活 Toll 样受体，能刺激、活化免疫细胞，进而增强抗原特异性免疫反应[12]。重组乳酸乳球菌已成功用于表达多种异种抗原，可作为多种病原菌及病毒的佐剂[13]。目前，对乳酸乳球菌在各种疫苗中的应用研究已取得了一定成果，但仅限于临床前期研究阶段，对乳酸乳球菌特性、增强抗原免疫原性、产生免疫应答的机制仍需进一步探索。

肺炎链球菌候选疫苗蛋白，如 PspA[14]、肺炎链球菌保护蛋白（PppA）与活的或灭活的乳酸菌经黏膜或经口免疫小鼠[13]，都可诱导小鼠产生系统的、局部的免疫反应，其免疫效应高于用铝剂作为佐剂的效应。但由于重组乳酸菌表达的抗原不同，诱导产生的抗体类型也有所不同。

1.4 DNA 疫苗佐剂 鸟嘌呤核苷酸（CpG）DNA 序列由胞嘧啶核苷酸和 CpG 为基序组成，在 DNA 疫苗载体骨架中导入该基序，能够快速活化 T、B 细胞，诱导产生 Th1 型细胞因子及多价 IgM，增强主要组织相容性复合体（MHC）Ⅱ类分子、CD40、细胞间黏附分子（ICAM）的表达，并能促进抗原递呈细胞的增殖与成熟。用肺炎链球菌候选疫苗蛋白 PspA 与 Flt3 配体（pFL）和 CpG 寡脱氧核苷酸（ODN）联合免疫 2 岁龄的小鼠，可诱导产生与幼鼠相似的免疫反应，主要是 Th1、Th2 型反应，并可诱导小鼠上呼吸道的成熟 DCs[15]。并且在鼻黏膜相关淋巴组织（NALT）、颈部淋巴结（CLNs）表面可检测到表达 MHC Ⅱ、CD40、CD80、CD86 等黏附分子的 $CD11b^+$、$CD8^+$、$B220^+$ DCs。pFL 诱导的 $CD8^+$ DC 对 Th2 型细胞因子介导的抗原特异性免疫反应具有重要作用。CpG ODN 通过激活类浆细胞样树突状细胞表面的 Toll 样受体 9（TLR9），进一步介导 B 淋巴细胞的激活[16]，TLR9 介导的免疫反应在免疫应答过程中具有重要作用，CpG DNA 疫苗佐剂可有效地诱导产生抗原特异性免疫反应，是一种高效的黏膜免疫佐剂[17]。

1.5 铝盐佐剂 铝盐佐剂从 19 世纪 30 年代开始已广泛用于疫苗中，且是美国惟一批准的可用于临床的疫苗佐剂。铝盐佐剂能辅助疫苗快速地诱导机体产生免疫反应，增强细胞因子如 IL-1β 的分泌。但是一些研究者认为炎症因子并不参与铝盐佐剂诱导的机体免疫反应[18]。铝剂与抗原共同免疫能诱导机体产生持续的、高浓度的 IgG 抗体[19]。由于铝剂对机体的生物反应性，它也可作为有效的过敏性免疫治疗的佐剂。尽管铝剂已用于临床多年，但其诱导机体产生免疫反应的机制仍然不清楚。

2 其他肺炎链球菌疫苗佐剂

肺炎链球菌疫苗候选蛋白除与上述几种常用佐剂可共同作用发挥免疫保护作用外，还可与如细菌鞭毛蛋白（vibrio vulnificus flagellin，FlaB）、纳米凝胶（nanogel，consisting of a cationic cholesteryl group-bearing pullulan，cCHP）、IL-12 等共同免疫而增强机体的免疫效应。

2.1 FlaB FlaB 在细菌体内高度表达且生物学功能稳定，作为疫苗及免疫治疗的佐剂对黏膜具有很强的免疫刺激作用。FlaB 是 TLR5 的配体，是种类有限的受体激动剂之一，可直接结合表达 TLR5 的免疫细胞，激活 NF-κB 途径，促进细胞因子的分泌。将 FlaB 与 PspA 融合组成重组蛋白：FlaB-PspA 和 PspA-FlaB，分别免疫小鼠，结果显示 FlaB-PspA 组小鼠存活率较高，并有大量的 IL-4 产生，但两组小鼠的 IFN-γ 水平无差别，并且 IgG1 滴度高，IgG2a 滴度低，这都表明 FlaB 刺激机体主要产生 Th2 型反应[20]。

2.2 cCHP cCHP 是一种纳米凝胶制剂，用重组的 cCHP-PspA 免疫小鼠可抵抗肺炎链球菌致死性感染，减少肺炎链球菌在宿主上下呼吸道黏膜的定植及侵袭，增强细菌在支气管黏膜及肺部的清除，诱导机体系统的及局部的黏膜免疫反应[21]。研究表明 cCHP-PspA 经鼻黏膜免疫，是一种有效、安全的免疫方式，不会引起嗅球及中枢神经系统受损[22]。主要诱导黏膜产生强烈的 Th2 和 Th17 型免疫反应，产生大量的 IL-4 和 IL-13 等细胞因子。

2.3 IL-12 IL-12 是一种调节性细胞因子，可诱导 $CD4^+$ T、$CD8^+$ T 细胞产生免疫反应，刺激 Th1 和 NK 细胞产生 IFN-γ、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）等细胞因子，也可增强固有免疫反应，促进感染部位中性粒细胞的聚集[23]。肺炎链球菌的清除主要通过调理吞噬作用，用 IL-12 作佐剂经鼻黏膜免疫小鼠可诱导机体产生系统的、局部的免疫反应，其中 IgM、IgG2a 的滴度较高，而 IgG1 的滴度与不加佐剂组相比无差异，IgG3 在无佐剂组则不能检测到。IL-12 作佐剂可减少肺炎链球菌在鼻咽部的定植，曾有文献报道，IL-12 作为 PPS 疫苗佐剂经皮下免疫具有显著的毒性作用，但是也有其他研究表明 IL-12 经鼻黏膜免疫与经注射途径给药相比所产生的毒性作用较小。

3 展 望

同种类的疫苗选择不同的免疫佐剂对免疫效应的影响不同。开发研制新型的免疫佐剂以增强疫苗的免疫效力并减少疫苗的毒副作用将是未来的发展趋势。相信随着分子生物学和免疫学理论与技术的发展，对相关载体和佐剂的研究将极大地推动其在免疫中的应用。

参考文献

[1] Sanchez J，Holmgren J. Cholera toxin - A foe & a friend [J]. Indian J Med Res，2011，133(2)：153-163.

[2] Chinnapen DJ，Hsieh WT，Te Welscher YM，et al. Lipid sorting by ceramide structure from plasma membrane to ER for the cholera toxin receptor ganglioside GM1[J]. Dev Cell，2012，23(3)：573-586.

[3] Sun JB，Czerkinsky C，Holmgren J. Mucosally induced immunological tolerance，regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit[J]. Scand J Immunol，2010，71(1)：1-11.

[4] Kirkeby S. Cholera toxin B subunit-binding and ganglioside GM1 immuno-expression are not necessarily correlated in human salivary glands[J]. Acta Odontol Scand，2014，72(8)：694-700.

[5] Gustafsson T,Hua YJ,Dahlgren MW,et al. Direct interaction between cholera toxin and dendritic cells is required for oral adjuvant activity[J]. Eur J Immunol,2013,43(7):1779-1788.
[6] Basset C,Thiam F,Di Martino C,et al. Cholera-Like enterotoxins and regulatory T cells[J]. Toxins (Basel),2010,2(7):1774-1795.
[7] Im SY,Kim KJ,Kim HA,et al. Cholera toxin breakdowns oral tolerance via activation of canonical NF-kappa B[J]. J Immunl,2013,190(1):92-99.
[8] Sánchez J,Holmgren J. Cholera toxin structure,gene regulation and pathophysiological and immunological aspects [J]. Cell Mol Life Sci,2008,65(9):1347-1360.
[9] Berlec A,Ravnikar M,Strukelj B. Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules[J]. Pharmazie,2012,67(11):891-898.
[10] Vintiöi EO,Medina MS. Immune response in nasopharynx,lung,and blood elicited by experimental nasal pneumococcal vaccines containing live or heat-killed lactobacilli as mucosal adjuvants[J]. Can J Physiol Pharmacol,2014,92(2):124-131.
[11] Zhang QX,Zhong J,Huan LD. Expression of hepatitis B virus surface antigen determinants in Lactococcus lactis for oral vaccination[J]. Microbiol Res,2011,166(2):111-120.
[12] Lei H,Xu Y,Chen J,et al. Immunoprotection against influenza H5N1 virus by oral administration of enteric-coated recombinant Lactococcus lactis mini-capsules[J]. Virology,2010,407(2):319-324.
[13] Vintiöi EO,Medina MS. Host immunity in the protective response to nasal immunization with a pneumococcal antigen associated to live and heat-killed Lactobacillus casei [J]. BMC Immunol,2011,12:46.
[14] Campos IB,Darrieux M,Ferreira DM,et al. Nasal immunization of mice with Lactobacillus casei expressing the Pneumococcal Surface Protein A:induction of antibodies,complement deposition and partial protection against Streptococcus pneumoniae challenge[J]. Microb Infect,2008,10(5):481-488.
[15] Hanniffy SB,Carter AT,Hitchin E,et al. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using Lactococcus lactis affords protection against respiratory infection[J]. J Infect Dis,2007,195(2):185-193.
[16] Fukuyama Y,King JD,Kataoka K,et al. A combination of Flt3 ligand cDNA andAged MiceImmunity to streptococcus pneumoniae in adjuvant elicits protective Secretory-IgACpG oligodeoxynucleotide asNasal [J]. Immunol,2011,186(4):2454-2461.
[17] Iho S,Maeyama J,Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants[J]. Hum Vaccin Immunother,2015,11(3):755-760.
[18] Li H,Willingham SB,Ting JP. Cutting edge:In ammasome activation by alum and alum′s adjuvant effect are mediated by NLRP3[J]. J Immunol,2008,181(1):17-21.
[19] Barbaud A,Deschildre A,Waton J,et al. Hypersensitivity and vaccines:an update[J]. Eur J Dermatol,2013,23(2):135-141.
[20] Nguyen CT,Kim SY,Kim MS,et al. Intranasal immunization with recombinant PspA fused with a flagellin enhances cross-protective immunity against Streptococcus pneumoniae infection in mice[J]. Vaccine,2011,29(34):5731-5739.
[21] Kong IG,Sato A,Yuki Y,et al. Nanogel-Based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by streptococcus pneumoniae[J]. Infect Immun,2013,81(5):1625-1634.
[22] Nochi T,Yuki Y,Takahashi H,et al. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines[J]. Nat Mater,2010,9(7):572-578.
[23] Sun KE,Salmon SL,Lotz SA,et al. Interleukin-12 promotes gamma interferon-dependent neutrophil recruitment in the lung and improves protection against respiratory Streptococcus pneumoniae infection[J]. Infect Immun,2007,75(3):1196-1202.

(收稿日期:2016-03-18 修回日期:2016-05-15)

·综 述· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.038

Treg 细胞与肿瘤免疫的关系*

李晓英[1]综述,罗福康[2],谢启超[3△]审校
(1.重庆市渝北区人民医院肿瘤科 401120;2.第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037;
3.第三军医大学新桥医院肿瘤科,重庆 400037)

[关键词] 调节性 T 细胞;肿瘤免疫;免疫调节
[中图分类号] R574 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2016)25-3567-04

肿瘤免疫逃逸是导致肿瘤发生、进展的核心机制。调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)作为调控机体免疫系统内稳态及人体自身免疫耐受的重要机制,也在肿瘤免疫的调控中扮演着重要角色,是目前该领域的研究热点。因此,本文对 Treg 在

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会基金项目(20142181)。
△ 通讯作者,E-mail:626105562@qq.com。
作者简介:李晓英(1977-),主治医师,硕士,主要从事肿瘤免疫研究。