

# 免疫佐剂作用机制及 CpG ODN 作为新型佐剂的研究

卢汀, 刘倩, 乔代蓉

(四川大学 生命科学学院, 中国四川 成都 610064)

**摘要:** 免疫佐剂通过免疫调节作用等 5 种方式发挥功能, 借助佐剂的非抗原特异性的多克隆激活是天然免疫细胞可能的作用机制。大部分佐剂通过直接参与天然免疫事件而间接/直接影响获得性免疫应答, 不同的佐剂可针对不同的事件发挥作用。CpG ODN 作为佐剂的优势在新近的研究中被逐渐发现。

**关键词:** 佐剂; 作用方式; 模式识别理论; 免疫应答; CpG ODN

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S0-099-04

## The Reactive Mechanism of Immunoadjuvant and CpG ODN as a New Type of Immunoadjuvant

LU Ting, LIU Qian, QIAO Dai-rong

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, Sichuan, China)

**Abstract:** Immunoadjuvant functions through five major ways such as immune regulation, multi-activation by immnoadjuvant's irrantigen specialty may possibly the reactive mechanism in natural immune cells. Most adjuvant indirectly/directly affects acquired immune responses through directly participate in natural immune events, different adjuvant functions to vary events. CpG ODN's advantages as adjuvant is gradually discovered in recent researches.

**Key words:** adjuvant; function ways; mode recognize theory; immune response; CpG ODN

(Life Science Research, 2006, 10(2): 99 ~ 102)

DNA 疫苗是近年来发展较为迅速的一类生物制剂, 它能诱导动物机体产生持久的体液免疫和细胞免疫, 其在抗病毒、细菌和寄生虫的感染方面起到了重要作用。但与传统的灭活疫苗相比, 其免疫效果并不理想。而免疫佐剂则能有效改善 DNA 疫苗免疫效力低下的问题。免疫佐剂是指与抗原同时或预先应用, 能促进、延长或增强对疫苗抗原特异性免疫应答的物质。各种免疫佐剂及其应用是近年来研究领域关注的焦点。

### 1 佐剂作用方式

佐剂作用方式可概括为以下 5 种:

收稿日期: 2006-04-17; 修回日期: 2006-06-15

作者简介: 卢汀 (1985-) 男, 重庆江北人, 四川大学生命科学学院学生, E-mail: luting763@qq.com.

**免疫调节作用:** 指调节细胞因子网络的能力。不同的佐剂诱导抗原提呈细胞 (APC) 分泌不同的细胞因子, 促使 Th 前体细胞向 Th1 或 Th2 不同的亚型分化。Th1 细胞可分泌  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 2 (IL-2)、 $\alpha$  肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 等介导细胞免疫, 辅助特异性 IgG2a 类抗体的产生, Th2 细胞则分泌 IL-4、5、10、13, 辅助 IgG1 亚类和 IgE 的产生。

**抗原提呈作用:** 指佐剂保持抗原构象完整并提呈给适当免疫效应细胞的能力。佐剂可影响 APC 摄取抗原和分泌 IL-1、诱导 Th1/Th2 转换、协助 B 细胞记忆和抗体亲和力成熟等。

诱导 CD8 细胞毒性 T 细胞(CTL)应答: 通过与细胞膜融合或保护抗原肽, 佐剂可促进相应肽掺入 MHC I 类分子并维持二者结合, 同时期望通过诱导 TFN、Y 和 TNF- $\alpha$  来提高肽-MHC I 类分子的表达。

靶向作用: 指佐剂通过激发 APC 摄取和传递抗原, 进而向免疫效应细胞提呈免疫原的能力。如在脂质体中加入甘露糖能够实现树突状细胞的靶向功能; 流感血液凝集素可以与 APC 表面的唾液酸残基结合, 含有流感血液凝集素的佐剂对 APC 具有靶向功能。此种调节有助于免疫系统获得足量免疫原以达到预期的免疫效果。

抗原贮存作用: 以铝佐剂和油包水佐剂为代表的短期贮存, 可将抗原捕获在注射部位免受肝脏清除, 像合成多聚体微球等长期贮存的佐剂, 可贮存抗原以提供持续和脉冲式释放。在 McNicoll 等的实验中, 以 PBP 为佐剂制备的疫苗接种后形成的局部抗原储池在疫苗接种部位至少可以存在一年以上<sup>[1]</sup>。

## 2 “危险基元”概念的提出和模式识别理论

长期以来, 人们一直认为免疫系统发挥作用的前提是区分“自我”和“非我”。这种假设在理解特异性 T、B 细胞识别抗原表位时取得很大成功, 但它很难解释许多“非我”抗原对机体免疫系统呈现很弱的免疫原性<sup>[2]</sup>。近来, Janeway 等提出了模式识别理论: 针对天然免疫主要靶分子的信号物称为病原体相关分子模式(PAMP), 天然免疫靶细胞上的识别受体称为模式识别受体(PRR), 免疫应答即是含有 PAMP 的反应物与天然免疫细胞上的 PRR 相结合, 激活天然免疫应答, 活化促炎途径, 诱导获得性免疫应答。该理论强调了宿主天然免疫系统在诱导对 PAMP 和损伤组织促炎信号上的选择压力。在新模式中, 疫苗和其他“非我”抗原只有通过模仿感染的主要方面或导致一定的组织损伤方可引起较强的免疫应答。高度纯化的新型疫苗因缺少 PAMP 而不能被天然免疫细胞的 PRR 很好识别, 不足以产生引起免疫应答的有效信号。于是, 人们期望将新型疫苗与佐剂联用来模仿感染过程以诱导免疫应答<sup>[3]</sup>。

PAMP 在进化中高度保守, 主要是广泛存在于病原体细胞表面的分子标志, 如细菌的非甲基化 CpG、RNA 病毒的 dsRNA、酵母细胞壁的甘露糖等。Kovarik 等把引起免疫应答的与外来病原体相似的结构或病理损伤因素统称为“危险”基元, 它们因可模仿感染过程、直接激活天然免疫系

统, 而可能成为新型佐剂开发的重点<sup>[3]</sup>。

借助佐剂的非抗原特异性的多克隆激活是天然免疫细胞可能的作用机制。后者在进化中产生了一套非克隆化的 PRR, 如 Toll 样受体家族(TLR)、甘露糖/岩藻糖受体、特定的化学活性物受体、清道工受体和细胞内吞受体等<sup>[4]</sup>。其中 TLR 在病原体识别中发挥重要作用, 包括控制由天然免疫向获得性免疫的转变。

PAMP 与 PRR 识别结合, 通过通用接头 MYD88(蛋白髓样分化因子) 在 APC 内传导一系列信号, 促使 IL-1、IL-12、TNF- $\alpha$ 、B7 等应答基因的转录。但由 PAMP-PRR 介导的天然免疫应答并非传统意义上的完全非特异性应答, 不同的 TLR 可在一定程度上识别、区分不同类型的病原体结构, 通过细胞内不同的信号传导蛋白诱导不同的免疫应答<sup>[5]</sup>。目前发现哺乳动物的 TLR 至少有 10 种, 如 TLR4 识别脂多糖(LPS), TLR2 介导对肽聚糖、酵母多糖及脂蛋白的反应, TLR2-TLR6 二聚体参与肽聚糖和甘露糖的识别, TLR3 识别 dsRNA, TLR5 识别鞭蛋白, TLR9 识别 CpG DNA 等。

## 3 佐剂对免疫应答影响的多层次性

大部分佐剂通过直接参与天然免疫事件而间接/直接影响获得性免疫应答。天然免疫应答由 APC 和入侵抗原间相互作用引起的炎症信号启动, 包括多个事件、由多种细胞分子综合参与, 不同的佐剂可针对不同的事件发挥作用。

吸引 APC 到炎症部位: CpG、dsRNA 等佐剂因含 PAMP 危险信号, 可模仿感染过程, 吸引 APC 到炎症部位。炎症处激活的内皮细胞分泌的化学活性物可发挥重要的免疫刺激作用<sup>[6]</sup>。

将抗原靶向 APC: APC 表达多种表面受体, 佐剂可通过 PAMP-PRR 识别、结合, 将与之相连的抗原靶向同一个 APC, 从而有助于 APC 对抗原的内化 and 提呈作用。另外, 特定的疫苗传递系统可将外源性抗原靶向内源性 MHC I 途径。

APC 的成熟和分化: APC 的及时成熟和分化对获得性免疫应答是重要的一步。以树突状细胞(DC)为代表, 当幼稚 DC 在组织中遇到“危险”信号时, 表达化学活性物受体 5(CCR5)、CCR6, 但 MHC II 和 B7 表达较低。此时的 DC 具有高度吞噬活性, 易摄取外来抗原, DC 捕获抗原以后, 表面 CCR5 和 CCR6 的表达降低, CCR7 表达上调, DC 移向淋巴结并经历成熟过程<sup>[6]</sup>。同时, B7 和

MHC I 表达增加,致使 DC 摄取和加工抗原的能力降低,提呈抗原的能力增加。

APC 与 T 细胞的相互作用及 T 细胞的激活、分化:不同佐剂因 PAMP 不同,提供不同的激活信号,诱导 APC 向不同方向分化,如革兰阴性菌的 LPS 促进 DC 向 DC1 亚类分化,线虫中含磷酸胆碱的糖蛋白诱导 DC 向 DC2 亚类分化。它们通过调节 DC 的成熟分化进一步控制 Th 细胞的分化,当 DC 分化为 DC1 时,分泌 IL-12 或/和 IL-18 等,刺激 Th<sub>1</sub> 向 Th1 亚类分化,DC2 和 IL-4 则在 Th2 分化中起重要作用。此外,尚有人提出第 3 类调节 T 细胞(Th3 或 Tr1),它通过 IL-10 和转化生长因子 p(TGF-p)调节 Th1 应答。此外,佐剂还可通过上调或抑制 APC 与 T 细胞间的共刺激信号,来调节天然免疫应答向获得性免疫应答的转化<sup>[6]</sup>。T 细胞活化需要双信号,在第一信号满足的情况下,大部分第二信号的获得可引起 T 细胞内相应细胞因子基因转录等一系列激活事件,但某些信号分子如 CTLA-4(T 细胞表面的一种共刺激分子)可导致无反应;对递呈到 APC 的非“危险”成分,则因缺乏第二信号使获得性免疫应答不能被有效激活。另外,一种只表达在激活 T 细胞表面的新的可诱导的共刺激分子(ICOS)与 APC 表面的 B7-H2 结合产生的第二信号,有利于 IL-10 的产生并最终导致向 Th2 分化。

#### 4 CpG ODN 作为一种新型佐剂的研究

CpG ODN 是指含有 CpG 基序(以非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤为基元构成的特定核苷酸序列结构)的 ODN。近期研究显示,CpG ODN 作为佐剂,可明显促进 Th1 型免疫应答的产生。其与不完全弗氏佐剂(IFA)联合应用时,其效应甚至强于完全弗氏佐剂(CFA)。即使与 Th2 型佐剂如氢氧化铝合用亦可明显促进免疫应答的产生,且 Th1 型应答明显强于 Th2 型应答<sup>[7]</sup>。

##### 4.1 CpG ODN 的免疫增强作用

###### 4.1.1 直接激活 B 细胞

CpG ODN 无需 T 细胞辅助就能直接激活 B 细胞。激活的 B 细胞与 B 细胞抗原受体传递的信号协同作用提高特异性免疫,使 B 细胞增殖,释放 IL-6 和分泌 IgM。CpG ODN 与抗原同时作用于机体时,能够驱动 B 细胞免疫球蛋白同种类型转换,增加协同刺激分子包括 MHC II 类分子、B7-1、B7-2 的表达<sup>[7]</sup>。Krieg 等(1995)研究发现,CpG DNA

与纯化的 B 细胞体外共同培养,使 95% 以上的 B 细胞进入细胞循环,说明它可以直接激活 B 细胞,该过程是非 T 细胞依赖和非抗原特异性的。

###### 4.1.2 对 T 细胞的作用

Bendigs 等实验表明,CpG ODN 在体外能刺激 T 细胞产生 IL-2,IL-2 又促使 T 细胞进一步分化,成为细胞毒性 T 细胞。CpG ODN 刺激巨噬细胞、树突状细胞表达 IL-2,IL-2 再激活 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,并在 Th1 细胞的协同作用下激活细胞毒性 T 细胞表现为强烈的细胞免疫反应<sup>[7]</sup>。

###### 4.1.3 直接激活抗原提呈细胞

CpG ODN 直接激活单核细胞,巨噬细胞和树突状细胞,诱导其分泌 IL-12、TNF- $\alpha$  等 Th1 型细胞因子,并上调细胞表面协同刺激分子的表达。

###### 4.1.4 对 NK 细胞的作用

一般认为,CpG ODN 不能直接活化 NK 细胞,但能刺激巨噬细胞产生 IL-12,被激活的巨噬细胞与 IL-12 协同作用,能间接刺激 NK 细胞分泌 IFN<sup>[7]</sup>。

#### 4.2 CpG 的受体

哺乳动物的免疫细胞对细菌各种成分的应答是通过 TLR(toll-like receptor)受体家族介导的。免疫细胞对细菌 DNA 中 CpG 的应答也不例外,由这一家族的一个新成员所介导。研究结果提示 TLR9 是 CpG DNA 激活天然免疫应答的必需蛋白分子。2002 年,Tsung-HsienC 等通过流式细胞仪分析为此提供了直接研究证据,他们将小鼠 TLR9 编码基因的胞质部分缺失之后转染 HEIA293 细胞,通过免疫沉淀和免疫印迹鉴定 mTLR9 在 HEK293 进行瞬时表达之后,用 CpG 刺激时,细胞并不产生应答<sup>[7]</sup>。因此进一步证明了 TLR9 是 CpG 的信号转导受体。Robert 发现,CpG ODN 在动物体内可与细胞表面的 TLR9 结合,而直接激活 B 淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞。由于 T 细胞表面缺乏 TLR9 受体,因此不能直接被激活。

#### 4.3 CpG ODN 在疫苗中的应用

CpG DNA 及合成的 CpG ODN 是天然免疫应答和获得性免疫应答的潜在激活剂,其作为多种抗原的佐剂都表现出了独特的免疫增强作用。将灭活流感病毒配以 CpG ODN 免疫小鼠,测得流感病毒的抗体比不加 CpG ODN 的对照组高出 7 倍以上。以 CpG ODN 联合猪繁殖障碍与呼吸道综合症灭活疫苗免疫仔猪,能显著提高仔猪的特异性抗体浓度、淋巴细胞 IL-2 诱生活活性以及 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 等淋巴细胞增殖。而在 DNA 疫苗方

面, Klinman 研究发现, 无论是将 CpG 序列插入 DNA 重组载体或是与 DNA 疫苗共同注射, 均可以显著提高疫苗的免疫效果<sup>[8]</sup>. Kojima Y 发现含有多个 CpG ODN 的 HIV-1 DNA 疫苗与单独接种 DNA 疫苗相比, HIV 特异性 DTH 反应明显增强, CTL 活性由约 20% 上升到约 70%, 差异显著. 汤义等发现含 CpG 基元的 SARS 冠状病毒 S-1 基因片段 DNA 疫苗可诱导小鼠产生很强的免疫反应<sup>[8]</sup>.

尽管目前对 CpG DNA 的免疫激活机制仍在探索之中, 真正用作疫苗佐剂前尚需大量研究工作, 但随着对其免疫作用机理逐步深入的研究, 我们将有望获得一种更为安全高效的新型疫苗佐剂, 这将为新一代基因疫苗的研制开辟一条新的途径.

## 5 佐剂研究展望

理想的佐剂应该有以下特征: 最小的免疫刺激可引起适当的免疫促进作用, 且无不良反应, 能促进体液和细胞介导的免疫, 也能作用于弱免疫性抗原, 而且不引起有害的副作用, 能以不同途径免疫, 也能用于不同抗原, 能在免疫抑制个体中发挥作用; 应用于食用动物不应留有毒素残留, 能有效影响免疫反应质量(型的控制、局部免疫以及细胞类型的控制) 稳定; 便宜而且容易产生. 随着研究的深入, 免疫佐剂的应用范围也从疫苗开始不断扩大, 包括免疫治疗药物、肿瘤疫苗, 增强机体对细菌、病毒、真菌、寄生虫的抵抗力和免疫应答. 随着基因工程和核酸技术的发展, DNA 重组苗、多肽苗和亚单位苗已逐步被兽医临床应用, 但这些疫苗免疫原性比较弱, 需要同安全、有效的免疫佐剂结合加以改进. 重组蛋白佐剂无毒性、分子质量小, 其效力和实际效果有待证实. 多糖类物质是一类十分重要的生物活性物质, 具有调节淋巴细胞、吞噬细胞、白细胞介素、抗体水平的功能, 其作为增强机体免疫功能的药物已进行了大量的研究. 因此, 开发研究安全、高效、无毒副作用的新型佐剂应当是未来佐剂研究的重点.

随着研究的深入, 今后免疫佐剂研究的主要发展趋势: 1) 进一步开展对免疫佐剂构效关系及其活性分子结构改造研究, 研制出化学结构明确、低分子质量、低毒、高效的新型免疫佐剂; 2) 在整体水平、细胞水平及分子水平上, 探讨了新型免疫佐剂的作用机制, 为进一步开发研究及安全、有效、合理地使用免疫佐剂提供理论依据; 3) 开展抗原-载体-免疫佐剂药剂学的研究, 包括优化免

疫佐剂配方的研究, 为制备低毒、高效、速效、长效的新免疫佐剂制剂开辟新途径; 佐剂及其配方、载体、传递系统等研究, 不仅可影响或改变机体免疫应答的强度(量), 而且也可以影响或改变机体免疫应答的类型(质), 也就是可以导、激活不同的免疫效应细胞和不同的免疫活性分子, 使新型免疫佐剂的作用具有更多选择性和可控性; 4) 开展诱导粘膜免疫的口服佐剂的研究; 5) 天然药物免疫佐剂开发研究; 6) 免疫佐剂新用途研究. 免疫佐剂的应用范围不断扩大, 包括了免疫治疗药物、肿瘤疫苗, 增强机体对细菌、病毒、真菌、寄生虫及一些转移瘤的抵抗力和免疫应答; 7) 开展宿主内源性免疫调节剂用作免疫佐剂及其诱生剂的研究, 特别是 T 细胞对抗原识别的分子基础和控制 T 细胞活化和功能专职应答的研究进展, 使免疫佐剂的作用不再局限于增强免疫应答, 而更着重于其诱导机体选择性地产生有效防御相应病原体感染的特异性的免疫应答, 减少抗原物质的副作用<sup>[9]</sup>.

随着分子免疫学等免疫学基础理论的飞速发展, 特别是 T 细胞对抗原识别的分子基础和控制 T 细胞活化和功能专职应答的研究进展, 使免疫佐剂的作用不再局限于增强免疫应答, 而更着重于其诱导机体选择性地产生有效防御相应病原体感染的特异性的免疫应答, 减少抗原物质的副作用. 因此, 佐剂的研究将接受新的挑战.

## 参考文献 (References):

- [1] GREGORIADIS G, McCORMACK B, OBRENOVIC M, *et al*. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carrier8 [C]//O HAGAN D T. Vaccine Adjuvants. Preparation Methods and Research Protocols. New Jersey: Humana Press, 2000. 137-150.
- [2] QING He, ALAINA Mitchell, TULIN Morcol, *et al*. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type2[J]. Clin Diag Lab Immune, 2002, 9(5): 1021-1024.
- [3] GLUCK R. Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes(IRIVs)[J]. Vaccine, 1999, 17: 1782-1787.
- [4] ROBERT L, MODLIN. A toll for DNA vaccines[J]. Nature, 2000, 408(7): 659-660.
- [5] 张玲华, 郭勇, 田兴山. CpG DNA 特异性识别的关键蛋白 Toll 样受体-9[J]. 生物技术通讯, 2005, 16, 4: 438-440.
- [6] MOLDOVEANU Z, LOVE Homan L, HUANG W Q, *et al*. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus[J]. Vaccine, 1998, 16: 1 216-1 224.
- [7] 冯颖, 胡建民. CpG ODN 的最新研究进展 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, 1: 6-8
- [8] ZHANG Ling-hua, TIAN Xing-shan, GUO Yong, *et al*. Effects of CpG ODN on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T subpopulations in the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine[J]. Vaccine, 2006, 24(11): 1874-1879.
- [9] ROBERT L Hunter. Overview vaccine adjuvants present and future[J]. Vaccine, 2002, 20: 7-12.