

# 呼吸道感染细菌联合疫苗体外实验研究

张敬, 朱丽华, 张庆波

河北联合大学基础医学院, 河北唐山, 063000

**摘要:** **目的** 利用常见呼吸道感染细菌制备的联合疫苗作用人外周血单个核细胞, 探讨其对机体免疫功能的影响, 为临床应用提供参考。 **方法** 分离培养引起我国呼吸道感染的最常见细菌, 利用超声波破碎, 硫酸铵沉淀蛋白, 构建成细菌疫苗, 体外作用人外周血单个核细胞, 采用 CCK-8 法测定其增殖活性; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测细胞因子白细胞介素-2 (IL-2) 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 含量; 流式细胞仪 (FCM) 检测细胞表型变化。 **结果** 联合疫苗组单个核细胞增殖活性显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); 联合疫苗组 IL-2, IFN- $\gamma$  的浓度比空白对照组高, 并随疫苗浓度的增加而增多, 在一定浓度范围内成剂量依赖关系; 细胞表型分析显示联合疫苗既能刺激 T 细胞增殖, 也能刺激 B 细胞增殖。 **结论** 此联合疫苗可增强免疫功能, 它能提高细胞免疫功能, 对体液免疫功能也具有明显影响。

**关键词:** 细菌疫苗; 细胞免疫; 体液免疫; IFN- $\gamma$ ; IL-2

小儿反复呼吸道感染 (recurrent respiratory infection, RRI) 是儿科最常见的呼吸系统疾病, 国内调查显示, 儿童呼吸道感染病例占儿科病例总数的 60% 左右<sup>[1]</sup>。目前, 国内外用于预防小儿呼吸道感染疾病的措施是接种细菌溶解产物, 一般为兰菌净, 泛福舒, 必思添等, 这些均为国外生产的联合疫苗, 是通过将一些引起呼吸道感染的常见病原菌经过特殊溶解而制成的多联细菌抗原混悬液。通过刺激巨噬细胞, 释放淋巴因子, 激活 T 淋巴细胞和促进 B 细胞成熟并向浆细胞分化, 从而触发一系列免疫反应, 包括 T 淋巴细胞产生淋巴因子、浆细胞产生 IgA 和增加 NK 细胞活性, 提高机体抗病能力<sup>[2]</sup>。研究报道显示, 这些细菌溶解产物可以减少 RRI 的发生, 缩短 RRI 的感染时间。

但是, 由于地区菌株分布和生活习惯的差异, 制备这些疫苗的病原菌均为国外菌株中心提供的菌株 (肺炎链球菌 3 型、化脓性链球菌 A 组、卡他布兰汉菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌 B 型、肺炎克雷伯菌), 而不是引起我国小儿呼吸道感染的常见病原菌, 其是否为预防及治疗我国小儿反复呼吸道感染的最佳疫苗, 还有待大量的研究。据报道<sup>[3, 4]</sup>, 引起我国小儿呼吸道感染的常见病原菌是: 溶血性链球菌、流感嗜血杆菌 B 型、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌。分离培养引起我国小儿上呼吸道感染的常见细菌, 制成联合疫苗, 应用于国内儿童, 其预防效果可能会更佳。本研究通过这六种常见病原菌制备的联合疫苗体外作用人外周血单个核细胞, 对其进行免疫学效果评价, 为研制我国呼吸道感染细菌联合疫苗提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 血液标本 由唐山市妇幼保健院提供健康小儿血液标本。

1.2 菌种 由我院附属医院提供, 并在河北联合大学医学实验室分离培养。

1.3 仪器 超声波破碎仪 (赛飞有限公司) 分光光度计 (上海天普分析仪器有限公司) 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂) CO<sub>2</sub> 孵育箱 (上海旦鼎国际贸易有限公司) 全自动酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特有限公司)

1.4 试剂 细胞分离液 (上海创赛科学仪器有限公司); RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司); CCK-8 试剂 (上海经科化学科技有限公司); 白细胞介素-2 (interleukine 2, IL-2) 和干扰素- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 试剂盒 (ADLITTERAM DIAGNOSTIC LABORATORIES)。

1.5 联合疫苗的制备: 从反复呼吸道感染患儿标本中分离培养溶血性链球菌、流感嗜血杆菌 B 型、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌 6 种细菌, 用生理盐水洗细菌三次, 然后超声波破碎细菌, 用饱和硫酸铵沉淀细菌蛋白, 再通过透析膜去除硫酸铵, 分光光度计测定蛋白含量, 作为抗原。将抗原混合后用生理

收稿日期: 2014-06-16

通信作者: 朱丽华, E-mail: zhulihua1972@163.com;

作者简介: 张敬 (1984—), 女, 汉族, 检验师, 研究生硕士在读。研究方向: 联合疫苗对机体免疫功能的影响。

Email: 286638215@qq.com Tel: 13663369539

盐水配置成一定浓度作为联合疫苗。

1.6 外周血单个核细胞的制备：常规无菌采集健康小儿外周血 20ml，EDTA 抗凝。将 20ml 外周血与 20ml 磷酸盐缓冲液（PBS）按 1：1 的比例稀释混匀。再小心的将稀释后的外周血细胞加于细胞分离液液面上。然后进行密度梯度离心，2000 r/min，15min。收集白膜层细胞为单个核细胞，加适当 PBS 混匀，反复洗涤三次，每次离心 1000r/min，5min。倒掉上清，加适量完全 RPMI-1640 培养液充分吹打，制成单个核细胞悬液。

1.7 单个核细胞增殖的测定：用完全 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，接种于 96 孔平底培养板，每孔 100  $\mu\text{l}$ ，第一孔为对照孔，自第二孔起加入 100  $\mu\text{l}$  细菌破碎提取物，加入浓度依次为（100、50、25、12.5、6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），同时设阴性对照组，各设 3 复孔，在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。分别于培养的第 24h、48h、72h、96h，向每孔加入 10  $\mu\text{l}$  ICKK 溶液，并将培养板放在培养箱内孵育 1-4 小时，其在电子耦合试剂存在的情况下，可以被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臞产物，颜色的深浅与细胞增殖成正比，用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度，间接反映活细胞数量。

1.8 单个核细胞表型分析 检测人外周血单个核细胞中 CD3<sup>+</sup>细胞和 CD19<sup>+</sup>细胞。完全 RPMI-1640 培养液调整外周血单个核细胞浓度为  $5 \times 10^6/\text{ml}$ ，接种于 24 孔板，每孔含细胞悬液 2.0ml，实验组加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的抗原悬液 0.1mL，对照组加入 0.1 ml RPMI-1640 培养液，培养六天后，取细胞悬液，1500 转/min，离心 5min；PBS 洗涤；加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗 CD3 或抗 CD19 抗体（100 $\mu\text{L}$  细胞悬液：100 $\mu\text{L}$  抗体），避光孵育 30min，PBS 洗两次，每管加入 200 $\mu\text{l}$  1%多聚甲醛固定，流式细胞仪检测。

1.9 细胞因子检测 1.7 步骤中单个核细胞测定增殖前，取上清 50 $\mu\text{l}$  置于 -80℃冰箱中保存备用。样品收集完毕后，分别检测 IFN- $\gamma$ 、IL-2 的含量。在已包被好的微板孔内加入 50 $\mu\text{l}$  上清液，室温孵育 2 小时后，按要求清洗微板，然后加入 100 $\mu\text{l}$  生物素化的检测抗体，再室温孵育 2 小时后，清洗微板，再加入酶结合物，再次洗完微板后，加入底物溶液显色，酶标仪测吸光度值。（按酶联免疫试剂盒说明书要求操作）。

1.10 统计学分析 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 13.0 软件包对数据进行统计学处理，两组间数据比较采用 t 检验，多组间数据比较采用方差分析，显著性检验标准为  $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度抗原对外周血单个核细胞增殖活性的影响 见表 1

表 1 抗原诱导单个核细胞增殖结果 (OD 值)

时点	不同抗原浓度					
	..... ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
	0	6.25	12.5	25	50	100
24h	0.050 $\pm$ 0.002	0.058 $\pm$ 0.005	0.069 $\pm$ 0.004	0.078 $\pm$ 0.006	0.062 $\pm$ 0.008	0.032 $\pm$ 0.002
48h	0.055 $\pm$ 0.003	0.080 $\pm$ 0.006	0.102 $\pm$ 0.003	0.126 $\pm$ 0.016	0.165 $\pm$ 0.014	0.056 $\pm$ 0.002
72h	0.058 $\pm$ 0.002	0.162 $\pm$ 0.002	0.195 $\pm$ 0.010	0.226 $\pm$ 0.012	0.324 $\pm$ 0.106*	0.081 $\pm$ 0.003
96h	0.052 $\pm$ 0.006	0.065 $\pm$ 0.005	0.086 $\pm$ 0.002	0.098 $\pm$ 0.012	0.116 $\pm$ 0.006	0.072 $\pm$ 0.002

注：不同浓度抗原作用细胞 72h 结果之间的比较，\* $P < 0.05$

由表 1 可见，不同浓度的抗原刺激体外培养的外周血单个核细胞的增殖能力不同。抗原浓度在 6.25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间时，外周血单个核细胞的增殖能力随抗原浓度的增加而增强，抗原浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  时外周血单个核细胞增殖最显著；但浓度增大到 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  时，外周血单个核细胞增殖的趋势开始下降。同时，抗原浓度为 6.25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  时，外周血单个核细胞的增殖能力随培养时间延长而增强，均于 72h 达峰值，培养时间达 96h 时，细胞逐渐走向凋亡。

2.2 外周血单个核细胞表型变化结果 见表 2

根据表 1 中显示的细胞增殖结果，我们选择抗原浓度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  刺激外周血单个核细胞，用流式细胞仪检测细胞表型的变化。

表 2 CD3<sup>+</sup>细胞与 CD19<sup>+</sup>细胞检测结果 (  $\bar{x} \pm s$  )

组别	n	CD3 <sup>+</sup> 细胞占细胞总数的百分比 (%)	CD19 <sup>+</sup> 细胞占细胞总数的百分比 (%)
对照组	3	4.76±0.56	2.55±0.55
联合疫苗组	3	11.44±1.24*	4.93±0.34*
t		8.535	6.409
p		P<0.01	P<0.01

由表 2 可见，对照组 CD3<sup>+</sup>细胞为 4.76%，联合疫苗组 CD3<sup>+</sup>细胞为 11.44%；联合疫苗组 CD3<sup>+</sup>细胞数高于对照组（*P* <0.01），差异有统计学意义。同时，对照组 CD19<sup>+</sup>细胞为 2.55%，联合疫苗组 CD19<sup>+</sup>细胞为 4.93%；联合疫苗组 CD19<sup>+</sup>细胞数高于对照组（*P* <0.01），差异有统计学意义。说明不同刺激条件下细胞培养 6 日后诱导的效应细胞，CD3 与 CD19 均为阳性表达，利用超声波破碎细菌后提取的抗原既能刺激 T 细胞增殖，又能刺激 B 细胞增殖。

### 2.3 单个核细胞产生 IL-2 的检测结果 见表 3

表 3 不同浓度抗原刺激单个核细胞产生 IL-2 的比较（pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ ）

组 别	n	3 d	6 d	9 d
对照组	4	3.59±0.22	7.41±1.31	9.95±3.52
0.0625 mg/ml 组	4	6.63±0.52*	10.32±3.51**	16.92±5.53**
0.125 mg/ml 组	4	8.49±2.13*	12.64±3.21**	21.07±5.16**
0.250 mg/ml 组	4	9.35±2.42**	15.37±3.54**	22.32±5.23**
0.500 mg/ml 组	4	11.54±3.22**	19.73±5.51**	31.97±6.56**
1.000 mg/ml 组	4	11.39±2.54**	19.60±3.41**	32.21±5.64**

与对照组比较，\**P*<0.05，\*\**P*<0.01

由表 3 可见，培养 3d、6d 和 9d 的联合疫苗组 IL-2 的含量显著高于对照组，且随着联合疫苗浓度的增加而升高，以 0.5mg/mL 浓度效果最明显，各实验组随着培养时间延长，IL-2 的含量增加（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。

### 2.4 单个核细胞产生 IFN-γ 的检测结果 见表 4

表 4 不同浓度抗原刺激单个核细胞产生 IFN-γ 的比较（pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ ）

组 别	n	3 d	6 d	9 d
对照组	4	4.13±0.24	5.92±1.32	7.84±1.24
0.0625 mg/ml 组	4	5.65±1.32*	7.81±1.54*	14.95±3.36*
0.125 mg/ml 组	4	6.72±1.02**	9.96±1.63**	18.92±3.65**
0.250 mg/ml 组	4	7.95±1.35**	12.54±2.38**	20.84±3.62**
0.500 mg/ml 组	4	9.65±1.73**	16.96±2.34**	28.52±3.36**
1.000 mg/ml 组	4	9.52±1.65**	16.48±2.55**	28.49±4.25**

与对照组比较，\**P*<0.05，\*\**P*<0.01

由表 4 可见，培养 3d、6d 和 9d 的联合疫苗组 IFN-γ 的含量显著高于对照组，且随着联合疫苗浓度的增加而升高，以 0.5mg/mL 浓度效果最明显，高于此浓度时，其含量不再增加。各实验组随着培养时间延长，IFN-γ 的含量增加（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。

## 3 讨论

呼吸道感染是小儿常见呼吸系统疾病，目前，临床上主要依赖抗菌药物来应对急性感染，这既增加了患儿的痛苦，又容易导致细菌的耐药性形成。使用疫苗接种，能否有效地预防小儿呼吸道反复感染，是目前值得探讨的问题<sup>[5-8]</sup>。

本研究结果表明：利用我国常见呼吸道感染细菌制备的联合疫苗能刺激人血单个核细胞增殖，促进细胞因子的分泌。在一定浓度范围内，随着联合疫苗浓度的增加，细胞增殖效果也随之增加，抗原浓度为50μg/ml 时外周血单个核细胞增殖最显著。IL-2由活化的CD4<sup>+</sup>Th1细胞产生。T 细胞被激活后，分泌IL-2并表达，致使 T 细胞得以增殖而完成细胞免疫应答。IL-2还可促进 B 淋巴细胞生长与分化。因此，IL-2为调控免疫应答的重要因子，IL-2产生的水平反应T细胞功能。IFN-γ是机体免疫系统中重要的细胞因子，主要是由激活的CD4、CD8T细胞产生的。其主要活性是通过多种机制上调免疫应答。IL-2与IFN-γ的分泌量可以直接反映单个核细胞功能。实验结果表明IL-2和IFN-γ的分泌量，随着联合疫苗浓度的增加而增加，具有明显的量效关系。CD3分子是T细胞表面标志物，CD19分子是B细胞表面标志物<sup>[9]</sup>，研究结果显示联合疫苗不仅对T细胞有促进增殖的效果，对B细胞的作用也较明显，表明此联合疫苗既可以提高人体细胞免疫功能，也可提高体液免疫功能。国外研制的联合疫苗通过激活T淋巴细胞和促进B细胞成熟并向浆细胞转化，从而触发一系列免疫反应，提高机体抗病能力。黄中炎等<sup>[10]</sup>研究证实：兰菌净可提高血清中CD3、CD4及IgA水平，可同时提高细胞免疫和体液免疫功能，能减少呼吸道感染次数，缩短感染持续时间。由此可见，本研究研制的联合疫苗与国外联合疫苗相比，其对免疫系统的作用机制具有一致性，有可能成为我国有效预防小儿呼吸道感染的疫苗，以提高机体免疫功能，预防小儿呼吸道感染性疾病。

诚然，一种疫苗的研制与应用，特别是联合疫苗的研制与应用，需要进行大量的体内外实验，以及临床试验支持和证明。本研究虽然仅是对多联细菌疫苗所引起的免疫效果，做了初步的体外试验，达到了预期的研究结果，这为下一步进行免疫功能的体内研究，奠定了实验基础，为我国自主研制联合疫苗提供实验证据。

#### 参考文献

- [1] 蔡晓红,李吕崇,罗运春.儿童呼吸道疾病流行病学调查分析[J].临床儿科杂志,2003,21(6):341-343.
- [2] Rossi M E,Legal L, Azzari C, et al. Effect of a polyvalent bacterial preparation on nature kill cell activity in children with recurrent respiratory infections[J].Int J Immunotherapy,1993,9(4):225-233.
- [3] 成霖霞,杨湘峰.4651 例儿童呼吸道感染的细菌学检测及分析[J].实用预防医学,2008,15(5):1595-1596.
- [4] 李政,王玉春,蒋冬香,高玲.医院下呼吸道感染的病原菌分布及耐药性分析[J].实用预防医学,2012,19(9):1373-1375.
- [5] Mora R,Bellussi L,Passali FM,et al.Efficacy of a topical suspension of bacterial antigens for the management of recurrent eczema in children[J].Med Sci Monit,2004,10(9):99-103.
- [6] Pozzi E,Serra C.Efficacy of Lantigen B in the prevention of bacterial respiratory infections[J].Monaldi Arch Chest Dis,2004,61(1):19-27.
- [7] Wang CH,Chan ED,Perng CL,et al.Intravenous immunoglobulin replacement therapy to prevent pulmonary infection in a patient with Good's syndrome.LID-S1684-1182 (12)00208-3[pii]LID-10.1016/j.jmii.2012.09.003[doi].J Microbiol Immunol Infect,2012.
- [8] 李宏盈.小儿反复呼吸道感染的合理防治体会[J].中国卫生产业,2012(28):114.
- [9] 马淑芹,刘印华,葛淑芝,等.酵母多糖对免疫功能的影响[J].河北医药,2013,35(15):2245-2246.
- [10] 黄中炎,孙雅琴.兰菌净防治儿童反复呼吸道感染疗效观察[J].湖北大学学报,2012,34(2):208-210.