

基础研究

Sap2 蛋白与树突状细胞对系统性白假丝酵母菌感染的免疫保护性

徐美兰¹, 刘金星²嘉应学院医学院附属医院¹检验科,²中医科, 广东 梅州 514031

摘要:目的 小鼠进行重组蛋白与树突状细胞(DC)联合免疫,观察其对系统性白假丝酵母菌免疫保护效果。方法 原核表达并诱导表达白假丝酵母菌 Sap2 蛋白;将白假丝酵母菌孢子、菌丝混悬液致敏小鼠 DC 后,分5组小鼠行3次免疫接种重组蛋白及致敏 DC、致敏 DC、DC、Sap2、PBS,再造系统性白假丝酵母菌感染模型观察小鼠生存期、肾病理切片、肾负菌量、检测 CD4⁺、CD8⁺ 百分率观察保护性。结果 成功构建 pET32a-Sap2 原核表达载体,目的蛋白被诱导表达并收集纯化。重组蛋白与致敏 DC、DC、Sap2 蛋白均能有效延长系统性白假丝酵母菌感染小鼠生存期、保护小鼠肾脏、增强小鼠的免疫力,其中多组分联合免疫效果更佳。结论 多组分联合免疫能很好地抵抗系统性白假丝酵母菌感染,这为研究新型多组分联合疫苗奠定基础。

关键词:天冬氨酸蛋白酶2;树突状细胞;系统性白假丝酵母菌感染;免疫保护

Immunoprotection by Sap2 and dendritic cells against systemic *Candida albicans* infection in miceXU Meilan¹, LIU Jinxing²¹Clinical Laboratory, ²Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Medical College, Jiaying University, Meizhou 514031, China

Abstract: Objective To investigate the effect of combined immunization with recombinant Sap2 and dendritic cells (DCs) against systemic *Candida albicans* infection. **Methods** We constructed a prokaryotic expression vector carrying sap2 of *Candida albicans* to obtain Sap2 protein. Murine DCs were sensitized by pulsing with *Candida albicans* spores and rope. Five groups of mice were immunized with recombinant Sap2 protein and sensitized DCs, sensitized DCs, naive DCs, Sap2, or PBS alone for 3 times, and the effect of the immunization against systemic *Candida albicans* infection were assessed by observing the survival of the mice, detecting the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ cells, CFU in the kidney homogenate, and examining renal pathologies. **Results** Immunization with Sap2 and sensitized DCs and with DCs or Sap2 alone all prolonged the mouse survival and produced obvious effect in renal protection and immune enhancement, but such effects were more obvious with the combined immunization. **Conclusion** Combined immunization with Sap2 protein and DCs offers strong immunoprotection against systemic *Candida albicans* infection in mice, which provides experimental evidence for the development of new combined vaccines for immunoprotection.

Key words: Sap2; dendritic cells; systemic *Candida albicans* infection; immunoprotection

近年来白假丝酵母菌在医院感染中成为最常见的条件致病性真菌。临床上随着体内治疗装置的植入及器官移植等使系统性白假丝酵母菌感染率不断上升,深部真菌感染发病率在近30年增长了约36倍,其中深部白假丝酵母菌感染病死率高达40%^[1-3],在血行感染中位居第1位^[4]。所以研发有效的疫苗对系统性白假丝酵母菌感染防治具有重要意义。

目前的对抗系统性白念珠菌的疫苗主要是针对单一抗原,如甘露糖蛋白65,天冬氨酸蛋白酶2等,但其免疫效果只激活了机体的体液免疫或细胞免疫,而机体抵抗系统性白假丝酵母菌感染过程中,体液免疫和细胞免疫应答都发挥了重要的防御作用。因此本研究利用

PCR方法扩增SAP2,构建PET32-SAP2表达质粒载体,经诱导表达目的蛋白。将得到的重组Sap2蛋白与小鼠DC联合免疫小鼠,以期体液免疫与细胞免疫联合对抗系统性白假丝酵母菌感染,观察多组分联合免疫的保护效果。

1 材料与方法

1.1 试剂及动物

DH5a、BL21、pET-32a、白假丝酵母菌标准菌株 ATCC14053(均由本实验室储存),限制性内切酶(*EcoR* I、*Xho* I)、T₄ DNA Ligase、Long Amp DNA 聚合酶、蛋白相对分子质量Marker(NEB公司产品);rTaq DNA 聚合酶、pMD19-T试剂盒、DNA相对分子质量Marker(TaKaRa公司产品);普通质粒小提试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根公司产品);Turbo试剂盒(Stratagene);IPTG(Merck);酵母提取物、胰蛋白胨

收稿日期:2014-03-11

基金项目:广东省自然科学基金(S2011010002599)

作者简介:徐美兰,硕士,副主任技师,0753-2133069, E-mail: meilan0310@126.com

(Oxoid);小鼠DC2.4细胞(DC细胞来源于小鼠骨髓)购于上海希尔顿有限公司。KM系小鼠:5~6周龄约30 g,购于汕头大学动物实验中心(合格证号:SCXK2012-0017)。

1.2 设计克隆引物

(注:绿色标记为保护碱基,红色标记为酶切位点)引物1(Sap2-*EcoR* I):CGGAATTCATGTTTTTAAAGAATATTTTCATTGCTC,引物2(Sap2-*Xho* I):CCGCTCGAGGGTCAAGGCAGAAATACTG GAAG

1.3 PCR反应体系

(共50 μ l)5 $\times$ LongAmp PCR Buffer 10 μ l;dNTPs (10 mmol/L each) 1.5 μ l; Template (Genome DNA)、Primer FW (10 μ mol/L)、Primer RS (10 μ mol/L)、LongAmp Taq(2 U/ μ l) 各2 μ l;ddH₂O 31.5 μ l。

1.4 PCR反应条件

95 $^{\circ}$ C 30 s预变性,95 $^{\circ}$ C 30 s变性 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C退火1 min $\rightarrow$ 65 $^{\circ}$ C延伸1 min,共40个循环,末次循环后65 $^{\circ}$ C延伸1 min,反应结束后取5 μ l反应物,琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 凝胶电泳回收产物

16 $^{\circ}$ C过夜连接至pMD19-T载体上,再转化至DH5 α ;PCR鉴定出的阳性菌落送北京诺塞基因组研究中心进行测序。*EcoR* I和*Xho* I对测序正确的阳性pMD19-T-Sap2质粒和pET32a载体进行双酶切,T₄ ligase过夜连接,构建pET32a-Sap2表达载体;转化至DH5 α ;通过菌落PCR和双酶切鉴定,筛选出阳性克隆,转化至BL21(DE3),进行蛋白表达。

1.6 蛋白表达及鉴定、纯化

挑单个菌落接种于相应抗性的LB培养基,1 mmol/L的IPTG 18 $^{\circ}$ C条件下过夜诱导。离心收集菌体,在冰浴中超声破碎,收集上清和沉淀。进行Western-blot鉴定(一抗为Anti-His Antibody;二抗为Goat Anti Mouse IgG-HRP)。用2 mol/L和4 mol/L尿素洗涤沉淀,8 mol/L尿素溶解洗涤后的沉淀。蛋白质的纯化参照NI-NTA agarose说明书。

致敏DC参照文献制备白假丝酵母菌孢子与菌丝相混合液^[4]并进行灭活,以2倍于DC数的白假丝酵母菌混合液与小鼠DC混合,37 $^{\circ}$ C孵育1 h。牛血清白蛋白梯度离心后收集分界层细胞^[5],调DC浓度为 1×10^6 /ml置冰浴。每次取100 μ l小鼠尾静脉注射。

1.7 动物试验

小鼠随机分为5组,每组10只。实验组免疫原为重组蛋白100 μ l(浓度调整为0.1 mg/ml)与福氏完全佐剂等体积混合物,于第1、7、14天小鼠经胫前肌注射,同时尾静脉注射致敏DC;致敏DC组为等量福氏完全佐剂于第1、7、14天小鼠经胫前肌注射,尾静脉注射致敏DC;未致敏DC组为未与白假丝念珠菌接触的DC,处

理同上;重组蛋白Sap2组于第1、7、14天小鼠经胫前肌注射重组蛋白100 μ l(浓度调整为0.1 mg/ml)与福氏完全佐剂等体积混合物,PBS对照组注射等量PBS;参照文献造系统性白假丝酵母菌感染模型^[8],观察小鼠生存时间,小鼠肾脏做病理切片,眼球取血送广州华银检验中心检测CD4⁺、CD8⁺。无菌取小鼠同侧肾脏,加入1 ml无菌生理盐水研成匀浆,再以10倍无菌生理盐水连续稀释匀浆液3次,每次取稀释液0.5 mL分别倾入无菌沙堡氏培养皿培养48 h后计数菌落形成单位(CFU)。

2 结果

2.1 PCR扩增目的基因结果

电泳显示在1100 bp处有一条带(图1)。

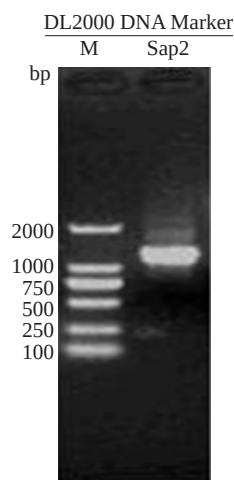


图1 PCR扩增Sap2基因的电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of PCR product of Sap2. M: Marker.

2.2 PCR鉴定pET32a-Sap2构建结果(图2)

小片段在1100 bp有一条带,为目的基因Sap2。

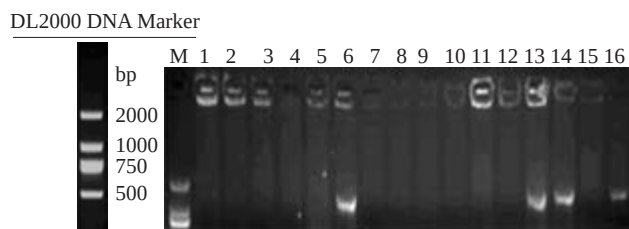


图2 PCR鉴定pET32a-Sap2载体构建电泳图

Fig.2 Electrophoresis of the PCR product of pET32a-Sap2 vector. M: Marker; Lanes 6, 14, 16: Target gene; Lanes 1-5, 7-12, 15: Negative.

2.3 双酶切鉴定pET32a-Sap2构建与鉴定(图3)

2.4 目的蛋白的诱导表达及Western-blot鉴定(图4)

2.5 蛋白纯化结果

100 mmol/L咪唑+4M Urea溶液对目的蛋白进行

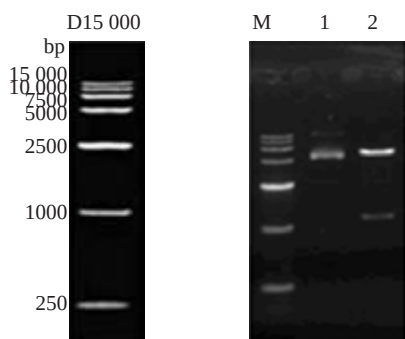


图3 *EcoR* I和*Xho* I双酶切pET32a-Sap2载体构建结果电泳图

Fig.3 Electrophoresis of pET32a-Sap2 vector digested by *EcoR* I and *Xho* I. M: Marker; 1: Before digestion; 2: After digestion.

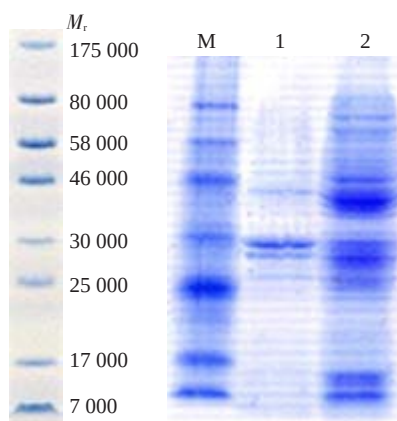


图4 18 °C过夜诱导表达结果12% SDS-PAGE电泳图

Fig.4 12% SDS-PAGE of Sap2 obtained after induced expression at 18 °C overnight. M: Marker; 1: Supernatant of 1.0 mmol/L IPTG Induced breakdown; 2: subside of 1.0 mmol/L IPTG Induced breakdown).

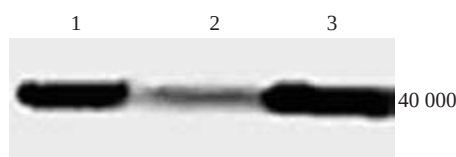


图5 Western Blot 检测结果

Fig.5 Result of Western blotting. 1: Marker; 2: protein of supernatant; 3: protein of subside.

大量纯化。

2.6 动物生存期及CD4⁺、CD8⁺

PBS对照组小鼠第1天死亡2只,至第3天内全部死亡;DC空白对照组3 d死亡3只,7 d死亡5只,其余存活至观察期结束;DC对照组3 d死亡1只,7 d死亡4只,其余存活至观察期结束;Sap2对照组3 d死亡2只,7 d死亡4只,其余存活至观察期结束;实验组第5天死亡1只,其余的存活至观察期结束。经Kaplan-Meier分析,①⑤、②⑤、④⑤、①③、①④有统计学意义($P<0.05$);②、①③、①④、①⑤、②③、②⑤、③⑤、④⑤CD4⁺(%)、

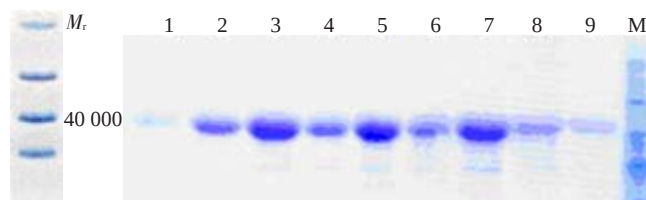


图6 纯化后各产物12% SDS-PAGE电泳图-2

Fig.6 Electrophoretogram of purified products. M: Marker, 1-9: protein of Sap2.

CD8⁺(%)比较,采用*t*检验分析, $P<0.05$,表1。

2.7 小鼠肾病理切片

如下图7。

2.8 肾脏携菌量(CFU)

定量加入小鼠肾脏洗涤液,培养后根据培养皿中菌落数计算得出白假丝酵母菌落单位(CFU)如下:①~⑤组依次为 $(1.58\pm 0.68)\times 10^2$, $(10.23\pm 5.48)\times 10^2$, $(16.04\pm 2.5)\times 10^2$, $(12.08\pm 2.32)\times 10^2$, $(58.10\pm 15.90)\times 10^2$;除②④组无显著性意义($P>0.05$),其他任意两组差异有显著性意义($P<0.05$)。

3 讨论

Sap2蛋白酶具有广泛的生物学活性,其中最显著的特性之一就是对底物特异性很低,能降解黏膜表面的粘蛋白、分泌性IgA和上皮细胞钙黏蛋白等黏膜保护分子,协助白假丝酵母菌对宿主组织的黏附、定植、破坏屏障、侵袭感染等作用^[5]。Sap2可以降解胞外基质,如角蛋白、胶原和波形蛋白等,有研究显示人上皮细胞层胞外基质蛋白被Sap分解,有助于白假丝酵母菌经循环系统感染播散^[6]。机体的防御蛋白也可以被Sap2水解,包括唾液乳铁蛋白、乳过氧化物酶、补体、组织蛋白酶D等参与机体免疫调节作用的蛋白^[7-8],从而破坏组织的免疫防御功能,对白念珠菌系统性感染起到促进作用。所以Sap2基因疫苗是研究的一个热点并具有广阔的应用前景^[9]。最初研究者多是研究Sap2疫苗对白假丝酵母菌粘膜感染的预防作用,而对系统性感染的预防作用报道很少。但近年来已有文献报道Sap2免疫接种对系统性白假丝酵母菌感染也有预防作用。Vilanova等^[10]直接从白假丝酵母菌中分离纯化Sap2,通过皮下注射法对小鼠进行预防接种,可保护小鼠不受系统性白假丝酵母菌的侵害,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测其血清IgG增加。表明此免疫保护由血清中抗Sap2 IgG产生,即免疫保护是由抗体介导的。本项目中Sap2组与对照组相比,生存期、CD4⁺、CD8⁺、肾带菌量均有显著性差异,表明重组Sap2蛋白刺激小鼠产生了相应的抗体,对机体产生了有效的免疫保护,肾病理切片也证实了Sap2在系统性白假丝酵母菌病中作为抗原激发免疫调节作用。

表 1 小鼠生存时间与生存状况及CD4⁺、CD8⁺百分比统计学分析Tab.1 Analysis of survival time and CD4⁺ and CD8⁺ cells of the mice

Group	Median survival	Survival rate(%)	CD4 ⁺ (%)*	CD8 ⁺ (%)*
Test group	7	90%	43.10	17.58
Sensitized DC group	5	50%	40.58	15.62
Not sensitized DC group	3	20%	25.31	13.23
Sap2 group	4	40%	30.98	14.44
PBS control group	2	0	20.98	11.46

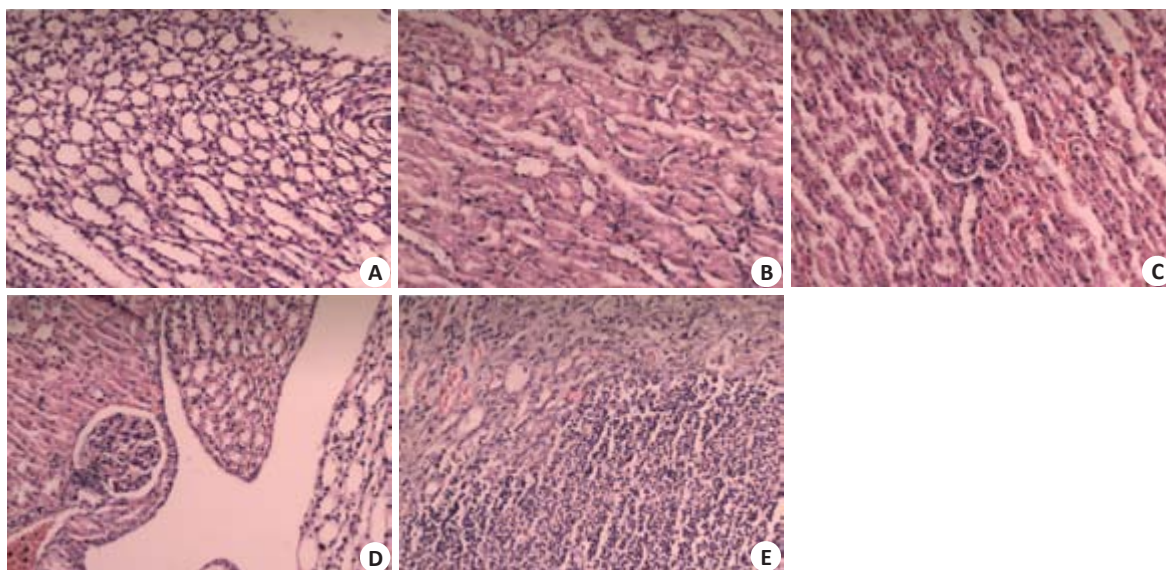


图7 小鼠肾脏病理切片

Fig.7 Renal pathologies in the mice (HE, original magnification: ×40). A: Combined immunization group; B: Sensitized DC group; C: no sensitized DC group; D: Sap2 group; E: PBS group.

本课题组利用PCR技术成功克隆出白假丝酵母菌毒力因子SAP2序列,片段大小与预计结果相符,在引物中设计了不同的酶切位点使目的基因顺利插入载体中,从而构建了原核表达PET-32a-SAP2,重组质粒经最佳诱导条件18℃,1.0 mmol/L IPTG条件下过夜诱导出目的蛋白。上清液与沉淀中均含有重组蛋白,即其以包涵体和可溶性蛋白两种形式存在,但主要存在于沉淀包涵体中。

DC作为体内最重要的抗原提呈细胞,其表面多样性的受体是其识别并捕捉各种形态真菌的物质基础,具有强大的提呈抗原作用和启动初始T细胞的能力。DC是目前已知的唯一可以活化初始辅助性T细胞(Th细胞)的专职APC,也是连接固有免疫应答和获得性免疫应答的枢纽^[11]。DC对抗原的感知依赖于其表面或者胞内的模式识别受体(PRR)^[12]。PRR的激活同时还可促进趋化因子的表达,募集免疫细胞至炎症部位,局限免疫应答的范围,同时通过分泌IL-12、IL-23等细胞因子

为后续的获得性免疫应答奠定基础。DC中mir-155不仅调控DC的分化过程,同时还调节DC对抗原刺激的反应性^[13-15],同时与mir-146a是调节固有免疫应答过程最重要的两个microRNA^[16]。被白假丝酵母菌活化的DC通过在感染部位及其附近淋巴结形成局部细胞因子而激活初始辅助性T细胞(Th细胞)的分化^[17],各种Th细胞在功能上彼此配合,相互制约,决定了针对白念珠菌的免疫应答的强度、类型和持续时间^[18]。本实验制成白假丝酵母菌孢子及菌丝相混悬液,并预先致敏小鼠DC后分离免疫接种,本实验中致敏DC组与未致敏DC组肾带菌量、CD4⁺、CD8⁺有显著性差异,病理显示未致敏DC组较致敏DC组充血、炎症明显,生存期两者虽无显著性差异,但致敏DC组较未致敏DC组生存期延长,说明致敏DC对白假丝酵母菌孢子及菌丝相都产生“免疫记忆”,当再次接触相应抗原可迅速进行免疫应答,其免疫保护效果更佳。

机体抗白假丝酵母菌的免疫机制包括固有免疫和

获得性免疫,DC在抗感染免疫中的作用十分独特,其既是固有免疫的第一道防线(识别、吞噬),又是获得性免疫的始动者(对不同免疫方向的诱导),主要诱导CD4⁺T(Th1、Th2)和CD8⁺T淋巴细胞的活化^[19-21]。本项目中实验组分别与致敏DC组、Sap2组CD4⁺、CD8⁺、肾带菌量都有显著性差异,实验组与Sap2组生存期也存在着显著的差异,说明联合免疫两者具有协同保护作用。这可能是由于重组蛋白Sap2刺激小鼠产生抗Sap2抗体—主导的是体液免疫;致敏DC主要诱导CD4⁺T(Th1、Th2)和CD8⁺T淋巴细胞的活化—主导的是细胞免疫,两者联合发挥作用在抗系统性白假丝酵母菌方面具有更佳的免疫保护优势。结果中实验组与致敏DC组生存期虽无显著性差异,但实验组生存期较致敏组DC有所延长,今后在实验中可延长生存期限进行观察验证。

小鼠肾脏病理切片也清晰显示出实验组与其他各组相比对肾脏的保护作用具有明显的效果,实验组肾小管轻度水肿,接近正常小鼠肾小管,无管型;致敏DC组水肿略明显,中度感染,无管型;未致敏DC组、重组蛋白Sap2组充血明显,肾小球中充满白细胞;PBS对照组肾小管重度水肿、充血、感染坏死,有白细胞管型。这与其他实验结果相符。

理想的抗系统性白念珠菌疫苗应选择既能诱导细胞免疫又能诱导体液免疫,综上所述,重组蛋白Sap2与致敏的DC的多组分联合免疫将有效激活两大系统的免疫保护,这为系统性白假丝酵母菌联合疫苗的开发奠定实验基础,对在未来临床应用中具有重要意义。

参考文献:

- [1] 潘朝铤,何贵新,何新兵,等.冠状动脉内注射替罗非班在经皮冠状动脉介入术中无复流治疗的临床研究[J].微创医学,2009,4(6):648-9.
- [2] Long SS, Stevenson DK. Reducing candida infections during neonatal intensive care: management choices, infection control, and fluconazole prophylaxis[J]. J Pediatr, 2005, 147(2): 135-41.
- [3] Chang MR, Correia FP, Costa LC, et al. Candida bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2008, 50(5): 265-8.
- [4] Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, et al. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p[J]. Infect Immun, 2007, 75(5): 2126-35.
- [5] Murad AM, d'enfert C, Gaillardin C, et al. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1[J]. Mol Microbiol, 2001, 42(4): 981-93.
- [6] Tongchusak S, Leelayuwat C, Brusic V, et al. In silico prediction and immunological validation of common HLA-DRB1-restricted T cell epitopes of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase 2[J]. Microbiol Immunol, 2008, 52(4): 231-42.
- [7] Degel B, Staib P, Rohrer S, et al. Cis-Configured aziridines are new pseudo-irreversible dual-mode inhibitors of *Candida albicans* secreted aspartic protease 2[J]. Chem Med Chem, 2008, 3(2): 302-15.
- [8] Cassone A. Fungal vaccines: real progress from real challenges[J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(2): 114-24.
- [9] Vilanova M, Teixeira L, Caramalho I, et al. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2[J]. Immunology, 2004, 111(3): 334-42.
- [10] Steinman RM, Idoyaga J. Features of the dendritic cell lineage[J]. Immunol Rev, 2010, 234(1): 5-17.
- [11] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 805-20.
- [12] Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(8): 2735-40.
- [13] Lu C, Huang X, Zhang X, et al. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1[J]. Blood, 2011, 117(16): 4293-303.
- [14] Martinez-Nunez RT, Louafi F, Friedmann PS, et al. MicroRNA-155 modulates the pathogen binding ability of dendritic cells (DCs) by down-regulation of DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN) [J]. J Biol Chem, 2009, 284(24): 16334-42.
- [15] Gantier MP. New perspectives in MicroRNA regulation of innate immunity[J]. J Interferon Cytokine Res, 2010, 30(5): 283-9.
- [16] Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults[J]. Blood, 2008, 112(5): 1557-69.
- [17] Romani L. Immunity to fungal infections[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(1): 11-23.
- [18] Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections[J]. Br J Haematol, 2005, 129(5): 569-82.
- [19] Le Blanc DM, Barousse MM, Fidel PJ. Role for dendritic cells in immunoregulation during experimental vaginal candidiasis[J]. Infect Immun, 2006, 74(6): 3213-21.
- [20] De Bernardis F, Lucciarini R, Boccanera M, et al. Phenotypic and functional characterization of vaginal dendritic cells in a rat model of *Candida albicans* vaginitis[J]. Infect Immun, 2006, 74 (7): 4282-94.

(编辑:孙昌朋)