

细胞因子作为人类疫苗佐剂的研究进展

那君¹, 胡婧雯^{1*}, 杨小茜¹, 胡敏娟¹, 衡宇¹, 路丽明²

(1. 上海交通大学医学院瑞金临床医学院, 上海 200025; 2. 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要: 疫苗接种是现代医学抵抗传染病的有效方式和重要手段。佐剂对于疫苗的免疫效果具有举足轻重的作用。细胞因子是构成免疫系统的重要介质之一, 在免疫细胞的发育分化、免疫应答的调节中扮演重要角色。近年来, 大量研究发现细胞因子作为佐剂应用于人类疫苗, 与传统佐剂相比有着特殊的优势。本文主要简述细胞因子, 包括干扰素、白介素、趋化因子和集落刺激因子等, 作为人类疫苗佐剂的研究进展。

关键词: 细胞因子; 佐剂; 疫苗接种; 免疫机制

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2016)04-0337-04

细胞因子是由免疫细胞等组织细胞分泌的在细胞间、细胞内发挥调控作用的一类小分子可溶性多肽蛋白质, 通过与相应受体结合, 调节细胞分化、生长及其免疫效应, 从而调控免疫应答。众多细胞因子在机体内相互制约, 形成十分复杂的细胞因子调节网络, 既可发挥多种重要生理功能, 又可参与许多病理损伤过程。佐剂是指预先或与抗原同时注入体内, 可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型的非特异性免疫增强物质。传统的铝盐或矿物盐佐剂因其作用于人体常会引起剧烈的局部反应或全身毒性反应, 目前已较少使用。而细胞因子因其独特的生物学特性, 近年来也作为佐剂被应用于人类疫苗中。

1 干扰素

干扰素是最早被认识的细胞因子, 按其来源和理化性质的不同分为 I 型干扰素(IFN- α/β)和 II 型干扰素(IFN- γ)。目前研究表明^[1], 干扰素可以刺激机体固有免疫系统, 促进巨噬细胞、NK 细胞等多种免疫细胞的分化与增殖; 诱导 MHC II 类分子的表达; 促进 Th0 细胞分化为 Th1 细胞, 抑制 Th2 细胞增殖。纪晓光等^[2]将 IFN- α 与 IFN- γ 联

合应用进行体外抗 SARS-CoV 试验。结果发现 IFN- α 与 IFN- γ 均明显抑制了病毒的生长, 并且两种干扰素配伍后抗病毒作用大于单个药物。Yang 等^[3]构建了表达 IL-2/IFN- γ 融合蛋白的质粒(pFP), 并联合 HBV-DNA 疫苗免疫小鼠。结果表明, 成功表达 IL-2 和 IFN- γ 的小鼠体内 HBs 特异性淋巴细胞应答水平明显提高, 细胞免疫得到加强。初始 T 细胞的分化方向受到多种因素的影响, 而 IFN- γ 和 IL-2 作为 Th1 型细胞因子可诱导机体产生针对疫苗的 Th1 型免疫反应, 具有佐剂效应。

2 白细胞介素

2.1 IL-2 IL-2 主要由 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞产生, 其主要功能是激活单核巨噬细胞, 促进 T 细胞、NK 细胞、B 细胞增殖, 促进细胞因子和抗体分泌, 诱导并促进调节性细胞增殖。在炎症反应、抗肿瘤免疫和移植排斥反应中发挥重要作用。在临床应用方面, IL-2 已被批准用于治疗转移性肾细胞癌和黑色素瘤。但由于 IL-2 的半衰期较短, 所以临床和科研方面都依赖于高剂量 IL-2 的使用。针对这一问题, 已有研究证明 IL-2/Ig 可以显著延长 IL-2 的半衰期而不影响其活性。Barouch 等^[4]构建了编码融合蛋白的质粒 IL-2/Ig 来研究 IL-2 作为 HIV-1 疫苗佐剂的免疫调节功能。研究发现佐剂的给药时间是一个很重要的变量, 相比于和疫苗同时注射, 在疫苗免疫两天后给药可产生最强的免疫应答。IL-2 和疫苗共同作用会导致毛细血管破坏和自身免疫等毒副作用, 但是 IL-2 的效能依赖于

收稿日期: 2016-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(31370904); 上海市浦江人才计划资助(15PJJD021); 上海市科委生物医药领域科技支撑项目(15401900500)

作者简介: 那君, 女, 临床医学五年制在读, 主要从事疫苗免疫机制研究。* 并列第一作者

通讯作者: 路丽明(E-mail: lulunew2003@163.com)

它的剂量,所以临床应用 IL-2 时需留意使用剂量,以免产生不良反应。

2.2 IL-1 家族 IL-1 家族由 11 种细胞因子组成,主要包含 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33 等。其主要功能是诱导形成复杂的促炎细胞因子网络,通过上调白细胞和内皮细胞整合素的表达水平来启动和调节炎症反应。Kayamuro 等^[5]将 26 种白细胞介素作为佐剂分别和重组流感病毒血凝素一起鼻内免疫小鼠,发现 IL-1 家族可同时促进 Th1 型和 Th2 型免疫应答。DC 一直被认为是佐剂发挥作用的主要靶细胞,但该实验发现巨噬细胞对 IL-1 家族佐剂发挥功能意义重大。在实际应用方面,IL-1 家族细胞因子对中枢神经系统的毒副作用也明显低于肠毒素型佐剂,说明 IL-1 家族作为疫苗佐剂可能具有其独特的优势。

2.3 IL-15 IL-15 可由单核细胞、巨噬细胞、上皮细胞和 DC 等多种细胞合成,但是在 T 细胞内却不能表达。IL-15 和 IL-2 的受体有共同亚基,具有相似的功能,均可促进 B 细胞产生抗体,诱导 NK 细胞增殖、分化,促进 T 细胞增殖和细胞因子的产生。Kim 等^[6]使用 HPV 表面 E7 蛋白 DNA 疫苗来比较 IL-2 和 IL-15 的免疫效能,发现相比于 IL-2,IL-15 诱导的抗肿瘤活性相对较弱。但中央记忆型 T 细胞(central memory T cell, T_{cm})表面有 IL-15 受体,而 T_{cm} 是诱导长期保护性免疫应答的关键细胞,这提示 IL-15 可能具有延长疫苗保护时间的潜能。Eickhoff 等^[7]发现 IL-15 可以显著增强小鼠对致死性克氏锥虫的免疫应答,并显著提高小鼠的生存率。其机制在于 IL-15 能延长 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞分泌的细胞因子发挥效能的时间,增强抗原特异性 CD8⁺ 细胞的增殖能力,进而增强疫苗保护效能,延长疫苗保护时间。

2.4 IL-6 IL-6 是由活化的 T 细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等产生的多功能 Th2 型细胞因子,以自分泌和旁分泌的方式发挥作用。它可以调节 IL-2 受体的表达以及淋巴细胞和内皮细胞的增殖,在 B 细胞、CTL、Th2 细胞的分化中发挥重要作用。Wang 等^[8]通过构建真核表达质粒来研究牛 IL-6 对手足口病病毒 DNA 疫苗的影响,结果发现 IL-6 可以显著提高机体黏膜免疫和系统免疫应答,尤其是体液免疫。

2.5 IL-9 IL-9 是一种分子质量为 14kD 的细胞因子,多由 T 细胞、巨噬细胞、嗜酸粒细胞和中性粒

细胞产生。其主要功能是参与体内造血细胞的调节,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,提高 IgG1 和 IgE 的分泌水平。Zou 等^[9]将表达 IL-9 的真核质粒(proV-IL9)与编码手足口病病毒衣壳蛋白 VP1 的 DNA 疫苗(pcD-VP1)共同通过肌肉注射免疫小鼠。结果显示,IL-9 能明显提高小鼠体内抗原特异性 IgG 水平,促进 T 淋巴细胞增殖,诱发强烈的体液和细胞免疫应答,而且通过诱导 T_{c1} 细胞来发挥其细胞毒效应。这些实验结果提示 IL-9 可以成为 DNA 疫苗一种强有力的 T_{c1} 型佐剂。

3 趋化因子

到目前为止已发现超过 50 种趋化因子和 18 种趋化因子受体。国际命名委员会根据 CK 的结构特征将其分为 CXC(α)、CC(β)、C(γ)、CX3C(δ)四类。因为趋化因子及其受体组成的系统在免疫细胞的发育、定位及免疫应答中发挥着重要作用,所以利用趋化因子作为疫苗佐剂来调节机体免疫反应、提高疫苗效能已经成为当前的研究热点。

3.1 RANTES(CCL5) RANTES 是趋化因子 CC 亚族成员,又名 CCL5,受体有 CCR1、CCR2、CCR4、CCR5。Aravindaram 等^[10]发现 RANTES 可以明显减慢肿瘤生长速度,减少肺转移肿瘤细胞数目并延长小鼠生存时间。RANTES 一方面能促进 APC、未成熟 DC 和 CD4⁺ 效应 T 细胞迁移并能募集其他多种免疫细胞;另一方面 RANTES 可明显提高体内 IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF 水平,降低 IL-10 水平,即促进 Th1 型细胞反应。而 TNF- α 、GM-CSF 水平升高可以提高肿瘤细胞对于 mTRAIL 和 mFasL 的敏感性,并协同穿孔素和颗粒酶 A 发挥效应。其在抗肿瘤、抗病毒免疫反应中起着关键作用。

3.2 CXCL10(IP-10) CXCL10 的合成和功能都依赖于 IFN- γ 的诱导,其受体为 CXCR3。Kang 等^[11]将 HPV-16 中的 E7 蛋白基因同 IP-10 基因结合免疫小鼠,结果发现 E7 蛋白的定位改变(由细胞核到内质网)可引起 E7 蛋白和 IP-10 的分泌增加,同时使 MHC 分子的表达上调,说明该疫苗可增强趋化作用和抗原提呈作用,从而增加活化 CD8⁺ T 细胞的数目并诱导活化 T 细胞和 NK 细胞的迁移,提高机体抗肿瘤能力。这种方法可以介导特定抗原在内质网有效表达并增强 MHC 分子的提呈功能,对于加强针对弱免疫原性抗原的免疫反应

有借鉴意义。

3.3 CCL19 (MIP-3beta) 巨噬细胞炎性蛋白质 (MIP-3beta) 属于 CC 亚族, 受体是 CCR7。其作用是协助 T、B、DC 细胞在外周免疫器官中正确定位并发挥相互作用, 最终提高效应 T 细胞抗感染和肿瘤的能力。Hartoonian 等^[12]用编码 MIP-3beta 的质粒和 HCV 核心 DNA/蛋白质结合免疫小鼠, 发现小鼠体内细胞免疫、体液免疫均得到增强。MIP-3beta 曾被用作免疫增强剂, 此项研究也发现成熟 DC 分泌的 MIP-3beta 可以提高 T 细胞对抗原的敏感度并降低其活化阈值。

3.4 CCL20 CCL20 由上皮细胞合成、分泌, 通过结合受体 CCR6 发挥作用。CCL20 可以趋化未成熟 DC、效应 T 细胞、记忆 T 细胞并增强 DC 摄取、提呈抗原的能力。Christine 等^[13]发现 CCL20 作为一种免疫佐剂可以增强 Th1 细胞介导的免疫应答, 是解决 DNA 疫苗低免疫原性的成功尝试之一。

3.5 CCL21 (CCR7L) CCL21 的特异性受体是 CCR7, 两者结合后的信号由活化 MAPKs 通路传导。Toka 等^[14]发现 pCCR7L 对加强针对黏膜表面抗原的免疫反应有着重要作用。Hong 等^[15]的研究证明 CCL21 能够调节 DC 分化, 影响成熟 DC (mDC) 分泌细胞因子, 进而增强对靶细胞的杀伤能力。另外, 经 CCL21 作用的 mDC 分泌高水平的 CXCL10 (IP-10), 而 IP-10 能显著改善 CTL 的功能且 IP-10 的分泌是发挥 CCL21 功能的必要条件。有趣的是 CCL21 增强了 IFN- γ 分泌, 但对颗粒酶 B 和 FasL 的表达没有明显影响。

4 集落刺激因子

集落刺激因子是一类能促进造血干细胞定向分化成熟的细胞因子, 据其作用范围分为粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、粒细胞和巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等。它们可促进 T 细胞和 DC 等免疫细胞成熟, 增强机体的细胞免疫和体液免疫, 因此可以与疫苗联用起到佐剂作用。Kamran 等^[16]将 HBV 疫苗与 G-CSF 共同应用于肝硬化患者来探究其佐剂作用。目前, 肝移植是晚期肝硬化患者的主要治疗手段, 但由于输血及免疫抑制剂的应用, 肝移植患者术后感染尤其是 HBV 感染的风险大大增加。术前应用 HBV 疫苗是预防 HBV 感染的重要手段, 但肝硬

化患者对 HBV 疫苗反应不佳, 而该实验结果显示 G-CSF 可以明显加快抗体滴度上升速度, 并且不会诱导机体产生明显的不适反应, 这为降低肝硬化患者移植术后感染率提供了一个研究方向。Kaufman 等^[17]总结了 GM-CSF 在黑色素瘤治疗中的作用。GM-CSF 可以促进淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等的成熟; 调节效应 T 细胞和调节性 T 细胞的产生; 加强 CTL 反应等, 从而增强抗肿瘤免疫。临床试验发现外源 GM-CSF 应用于黑色素瘤 III/IV 期病人后, 病人体内 DC 和 T 细胞数量增多, 存活率明显提高。但大量临床实验结果并不完全一致, 其作用机制尚有待研究。

此外, GM-CSF 也可以与其他细胞因子联用来增强机体的免疫应答。Norell 等^[18]将 GM-CSF 和 IL-2 作为佐剂应用于基因疫苗治疗乳腺癌, 他们将疫苗和低剂量的 GM-CSF、IL-2 用于正在使用曲妥单抗治疗的转移性乳腺癌病人, 病人体内 CD4⁺T 细胞反应加强, 抗体分泌增多, 同时曲妥单抗效用明显加强, DNA 疫苗的保护性得到提高。二者的作用为肿瘤疫苗用于预防和治疗肿瘤病人提供了一个研究方向。

5 结语

细胞因子半衰期短、彼此间联系复杂等因素限制了其作为疫苗佐剂的应用, 然而随着细胞生物学和基因工程技术的发展, 各种细胞因子衍生物和复合体应运而生并且很好地发挥了佐剂的作用。同时, 应用质粒将细胞因子类佐剂和 DNA 疫苗同时注入体内, 为解决 DNA 疫苗低免疫原性的问题提供了一个新的研究方向。目前, 各种细胞因子类佐剂还处于临床实验阶段, 给药间隔时间和给药剂量等细节正在进一步探索中, 相信在不久的将来, 细胞因子类佐剂将在预防人类各类传染性疾病和肿瘤治疗等方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] 孙亚萍, 王英明, 乔守怡. 干扰素及其最新研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22: 676-679.
- [2] 纪晓光, 赵艳红, 张敏, 等. α -干扰素和 γ -干扰素以及联合作用体外抗 SARS-CoV 试验研究[J]. 解放军药学报, 2008, 24: 268-269.
- [3] Yang FQ, Chen GM, Rao GR, *et al.* Adjuvant effect of IL-2 and IFN- γ fusion protein gene plasmid on HBV DNA vaccination in BALB/c mice[J]. Chi J Mod Med, 2008, 18: 838-846.

- [4] Barouch DH, Craiu A, Kuroda MJ, *et al.* Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2000, 97: 4192-4197.
- [5] Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, *et al.* Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus[J]. *J Virol*, 2010, 84: 12703-12712.
- [6] Kim H, Kwon B, Sin JI. Combined stimulation of IL-2 and 4-1BB receptors augments the antitumor activity of E7 DNA vaccines by increasing Ag-specific CTL responses[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e83765.
- [7] Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, *et al.* Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against trypanosoma cruzi [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5: e983.
- [8] Wang G, Pan L, Zhang Y, *et al.* Intranasal delivery of cationic PLGA nano/microparticles-loaded FMDV DNA vaccine encoding IL-6 elicited protective immunity against FMDV challenge[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e27605.
- [9] Zou Q, Wu B, He XD, *et al.* Increasing a robust antigen-specific cytotoxic T lymphocyte response by FMDV DNA vaccination with IL-9 expressing construct [J]. *Biomed Res Internat*, 2010, 2: 562356.
- [10] Aravindaram K, Yu HH, Lan CW, *et al.* Transgenic expression of human gp100 and RANTES at specific time points for suppression of melanoma[J]. *Gene Therapy*, 2009, 16: 1329-1339.
- [11] Kang TH, Kim KW, Bae HC, *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by antigen linkage to IFN- γ -inducible protein-10[J]. *Internat J*, 2011, 128: 702-714.
- [12] Hartoonian C, Sepehrizadeh Z, Yazdi MT, *et al.* Enhancement of immune responses by co-delivery of CCL19/MIP-3beta chemokine plasmid with HCV core DNA/protein immunization[J]. *Hepatitis*, 2014, 14: 81-82.
- [13] Christine H, Zargham S, Mehdi M, *et al.* Modulation of hepatitis C virus core DNA vaccine immune responses by co-immunization with CC-chemokine ligand 20 (CCL20) gene as immunoadjuvant[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 5943-5952.
- [14] Toka FN, Gierynska M, Rouse BT. Codelivery of CCR7 ligands as molecular adjuvants enhances the protective immune response against herpes simplex virus type 1 [J]. *J Virol*, 2003, 77: 12742-12752.
- [15] Hong CY, Lee HJ, Kim HJ, *et al.* The lymphoid chemokine CCL21 enhances the cytotoxic T lymphocyte-inducing functions of dendritic cells[J]. *Scand J Immunol*, 2014, 79: 173-180.
- [16] Kamran Bagheri L, Mozaffar T, Ahad E, *et al.* Granulocyte colony stimulating factor adjuvant role on the immunological response to hepatitis B vaccine in patients with cirrhosis: a double blind randomized placebo controlled trial[J]. *Hepatitis*, 2014, 14: e15447-e15447.
- [17] Kaufman HL, Ruby CE, Hughes T, *et al.* Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma[J]. *J Immunol Therapy Cancer*, 2014, 2: 11.
- [18] Norell H, Poschke I, Charo J, *et al.* Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial[J]. *J Transl Med*, 2010, 8: 53.