

重组质粒 pcDNA3-*dnaJ*/蛋白 DnaJ 异源免疫诱导 Th1 和 Th17 细胞免疫应答抵抗肺炎链球菌感染*

孙 思¹ 邱喻兰² 颜菊荣¹ 杨 静¹ 吴光英¹ 王 玲¹ 胥文春^{1**}

(1 重庆医科大学检验医学院 临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆 400016)

(2 重庆医科大学附属儿童医院核医学实验室 重庆 400016)

摘要 目的:探索更有效的肺炎链球菌 DNA 疫苗和疫苗免疫策略,并探究其中的保护机制。方法:构建重组质粒 pcDNA3-*dnaJ* 并表达 DnaJ 蛋白,实验分别设置重组质粒 pcDNA3-*dnaJ*/蛋白 DnaJ 免疫小鼠组及单独质粒 pcDNA3-*dnaJ* 免疫小鼠组,分别比较肺炎链球菌菌株攻毒后小鼠鼻腔灌洗液细菌载量及生存率,采用 ELISA 检测免疫小鼠血清抗体效价及炎症因子,流式细胞术分析体外 BMDCs 激活情况及 Th1 和 Th17 细胞免疫应答。结果:质粒 pcDNA3-*dnaJ* 免疫 3 次可诱导血清中抗原特异性抗体的产生,并减少肺炎链球菌攻毒后鼻咽部的细菌载量,但在防止致死性感染方面效果较差。然而,与重复质粒 DNA 接种三次相比,pcDNA3-*dnaJ* 1 次/DnaJ 蛋白加强 1 次的免疫策略可以显著减少鼻咽中的肺炎链球菌定植,并能够更好的预防致死性感染。此外,与 DNA 质粒加强免疫相比,DnaJ 蛋白加强免疫后可产生更高水平的 IFN- γ 和 IL-17A。结论:重组质粒 pcDNA3-*dnaJ*/蛋白 DnaJ 异源免疫可能通过活化树突状细胞,进而诱导 Th1 和 Th17 细胞免疫应答,抵抗肺炎链球菌感染。

关键词 DNA 疫苗 肺炎链球菌 异源免疫 菌载量 生存率

中图分类号 Q816

肺炎链球菌是儿童、老年人和免疫缺陷成人中细菌性肺炎的主要病原体^[1-3]。在过去 30 年中,疫苗已成为防止肺炎链球菌感染必不可少的策略。然而,23 价肺炎球菌多糖疫苗(PPV-23)对免疫功能低下人群的保护作用较弱。PCV 疫苗是血清型依赖的,覆盖范围有限;且 PCV 价格昂贵,限制了在低收入国家的应用^[2]。因此,需要开发和优化针对肺炎链球菌感染的疫苗。DNA 疫苗已被证明可诱导体液和细胞免疫反应^[4],而且 DNA 疫苗易于制备,因而具有较大的发展前景。然而,有时单独用 DNA 疫苗的免疫保护效果欠佳。近年来,文献报道两种不同类型的疫苗联合使用的保护效果优于同种疫苗多次重复接种,如 DNA/病毒、DNA/蛋白质或蛋白质/病毒等^[5-7]。然而,关于肺

炎链球菌 DNA 疫苗以及采用不同类型疫苗免疫(异源免疫)的研究很少。

在本研究中,我们构建了编码肺炎链球菌 DnaJ 蛋白的真核表达质粒 pcDNA3-*dnaJ*,分别采用 pcDNA3-*dnaJ* 重复免疫 3 次和 pcDNA3-*dnaJ* 初免 1 次/DnaJ 蛋白增强免疫 1 次的策略免疫 C57BL/6 小鼠,比较 2 种不同免疫策略的保护效果并初步探讨其中的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所使用的 C57BL/6 小鼠,SPF 级,6~8 周大雌鼠,购于北京华阜康生物科技股份有限公司。小鼠均由重庆医科大学实验动物中心代养于无特定病原体(specific pathogen-free conditions, SPF)环境中,所有操作均按照重庆医科大学实验动物中心要求及规范执行;*E. coli* pcDNA3-*dnaJ* 由本课题组实验室制备及保

收稿日期:2019-04-19 修回日期:2019-05-18

* 国家自然科学基金(81671639)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:xuwen@cqmu.edu.cn

存;肺炎链球菌标准菌株 D39(NCTC7466,血清型 2 型)购买于欧洲菌种保存中心;肺炎链球菌 19F 型[CMCC(B) 31693]购买于中国微生物菌种保藏管理中心;Lipo2000 试剂购于 Invitrogen 公司;考马斯亮蓝(Xylene brilliant cyaninG, G250)、过硫酸铵购于生物工程股份有限公司;ELISA MAXTM Deluxe SET mouse 试剂盒购于 Biolegend 公司;胎牛血清 FBS 购于美国 Gibco 公司;流式抗体购于 eBioscience 公司;引物序列合成于生工生物工程股份有限公司;内毒素去除试剂盒购于金斯瑞公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质表达和纯化 将 *E. coli* BL21-*dnaJ* 菌株活化于 5ml 含 50ng/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基, 37℃、180r/min、8h。至 $OD = 0.5$;按 1:100 比例将活化后菌液加入 500ml LB 培养基中,37℃ 180r/min 摇床培养 4h。选择 20℃, IPTG 0.2mmol/L, 120r/min 摇床诱导表达 10h。留取 1ml 全菌样本,余下菌液 4℃ 5 000r/min 离心 10min 集菌,用 Binding buffer 清洗 2 次, -80℃ 保存备用^[8-9]。留取 1ml 全菌样本,余下菌液 4℃ 5 000r/min 离心 10min 集菌,用 Binding buffer 清洗 2 次, -80℃ 保存备用。蛋白质纯化 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化,SDS-PAGE 鉴定纯化结果。所得蛋白质经试剂盒去除其中 LPS 备用。

1.2.2 真核表达质粒构建 从肺炎链球菌 D39 菌株(NCTC 7466, serotype 2)基因组序列上扩增的 *dnaJ* 全长基因,所用上游引物为 5'CGGGATCCATGAACAATACTGAATTTTATGAT C 3',下游引物为 5'CCGCTCGAGTTATTCTCCATCAAAGGCATCTTTA 3',克隆后的 *dnaJ* 基因插入 DNA 疫苗载体 pcDNA3 (Invitrogen)的双酶切位点 *XhoI* 和 *BamHI*,该载体包含了真核启动子和抗生素抗性基因,即具有氨苄青霉素抗性。所得的重组质粒用 PCR 和基因测序的方式鉴定。本研究中的 DNA 质粒从转化后的 *E. coli* 经质粒宏量提纯试剂盒(美基公司)提取。

1.2.3 质粒 DNA 转染 将 pcDNA3-*dnaJ* 或空载质粒用 Lipo 2000 试剂 (Invitrogen) 转染到 6 孔板 (Excell Bio) 培养的 HEK293T 细胞中,即 1μg 质粒与 1μl Lipo2000 加入到 50μl DMEM 高糖培养基 (Gibco) 中,随后将培养基加入到 HEK293T 细胞中。转染 48h 后,在荧光显微镜下观察。

1.2.4 免疫小鼠 用 100μl 15% 苯巴比妥钠麻醉

C57BL/6 小鼠,并每间隔 2 周接受疫苗或空载接种。DNA 免疫组,小鼠每次接受 30μg 的质粒 pcDNA3-*dnaJ* 加 60μg 的佐剂 dPEI (PEI Max MW 40 000kDa)^[10],共 3 次。对照组小鼠则是 30μg 空载质粒加 60μg 佐剂 dPEI。异源初免增强免疫组,第一次采用质粒 pcDNA3-*dnaJ* 量(佐剂 dPEI 免疫),间隔 2 周,再接种一次蛋白质 DnaJ 10μg(佐剂 CT 1μg Sigma-Aldrich)。每只小鼠每次接受体积为 30μl。

1.2.5 攻毒小鼠 鼻咽部定植模型:末次免疫 2 周后,麻醉后小鼠用 1×10^8 CFU 肺炎链球菌 CMCC 31693 (serotype 19F) 菌株攻毒;攻毒 72h 后,取小鼠鼻腔灌洗液并铺板计数其中的细菌菌落数。致死剂量的鼻咽部攻毒模型:麻醉后小鼠用 1×10^8 CFU 肺炎链球菌 NCTC 7466 (D39, serotype 2) 菌株攻毒,观察攻毒后 21 天小鼠生存情况。

1.2.6 脾细胞分析 末次免疫 2 周后,分离脾细胞并制成单细胞悬液,在体外培养并用 5μg/ml 的重组 DnaJ 蛋白刺激,继续在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。孵育 3 天后收集细胞培养基并用酶联免疫分析法 (ELISA 试剂盒) (Biolegend 公司) 检测细胞因子 INF-γ、IL-4 和 IL-17A。用作流式细胞分析的脾细胞,经上述培养之后,用 Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (eBioscience) 刺激细胞,再培养 12h 后收集细胞用流式抗体 anti-CD3 APC、anti-CD4 FITC 染色,再用 Cytofix/Cytoperm™ kit (BD Pharmingen) 固定透化细胞。最后分别用脾细胞因子流式抗体 INF-γ PE、IL-4 PE 和 IL-17A PE 染色。用 FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) 检测荧光后,流式结果用软件 Flow Jo software (version 9.9, Tree Star, San Carlos, CA, USA) 分析。

1.2.7 小鼠骨髓来源树突状细胞的培养和分析 小鼠骨髓来源的细胞在体外用新鲜的 RPMI1640 (Gibco) 培养基培养。并在培养过程中用集落刺激因子 GM-CSF 和 IL-4 刺激骨髓细胞分化成树突状细胞 (BMDC)^[11-12]。1 周后收集非黏附细胞送流式细胞仪检测纯度,CD11c+ 细胞约有 80%,满足实验需求。体外培养的 BMDCs 用质粒 DNA 刺激后,流式检测表面分子的表达,ELISA 检测细胞培养上清中细胞因子 TNF-α 和 IL-6 的表达。

1.2.8 间接 ELISA 法检测抗体效价及抗体亚型 严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5.01 软件

进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 成功构建重组质粒 pcDNA3-*dnaJ*, 并可在 HEK293T 细胞中表达 DnaJ 蛋白

我们将肺炎链球菌 DnaJ 蛋白基因全长序列插入质粒 pcDNA3 的 *Xho*I 和 *Bam*HI 位点,PCR 结果(图

1a)、测序结果与预期相符。利用 lip2000 试剂将重组质粒 pcDNA3-*dnaJ* 转染真核细胞 HEK293T 细胞,荧光显微镜观察,结果显示带有绿色荧光标记蛋白的质粒成功转入 HEK293T 细胞(图 1b)。以上结果证明我们成功构建了含目标蛋白基因序列的重组质粒,且该质粒能够在真核细胞中表达 DnaJ 蛋白。

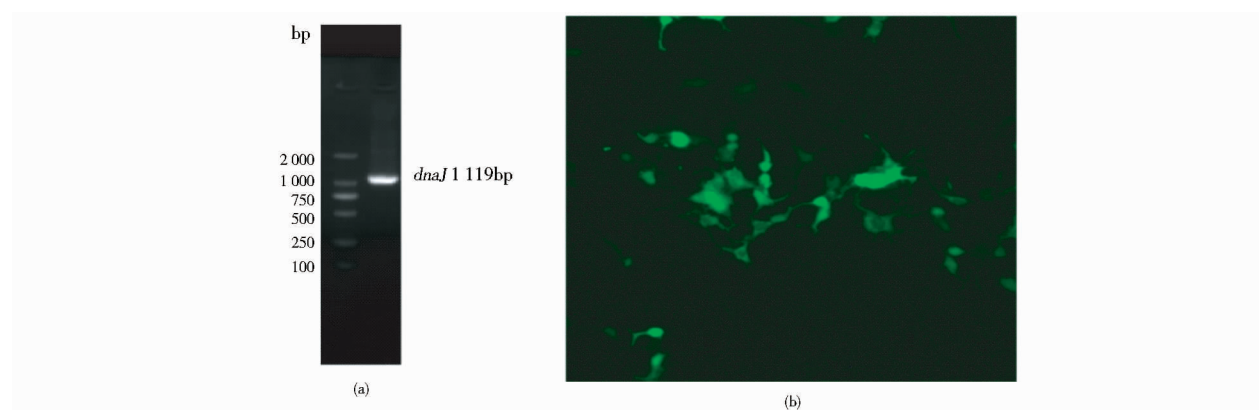


图 1 质粒 pcDNA3-*dnaJ* 构建及验证

Fig. 1 The construction of pcDNA3-*dnaJ*

(a) Agarose gel electrophoresis of *dnaJ* amplified by PCR from recombinant plasmid pcDNA3-*dnaJ*. Molecular marker sizes (bp) are indicated

(b) Photomicrograph of GFP observed after 48h using fluorescence microscopy ($\times 1\,000$)

2.2 重组质粒 pcDNA3-*dnaJ* 可在体外激活骨髓来源的树突状细胞

树突状细胞是一种经典的专职抗原提呈细胞,表达高水平的 MHCII (major histocompatibility complex class II) 分子,并连接固有免疫和适应性免疫应答^[13-17]。为确定重组质粒 pcDNA3-*dnaJ* 是否能激活树突状细胞,我们用不同浓度的质粒 pcDNA3-*dnaJ* 处理小鼠骨髓来源的树突状细胞 (bone marrow derived dendritic cells, BMDCs) 后,检测细胞培养上清中细胞因子 IL-6 和 TNF- α (BMDCs 成熟的标志) 的水平^[18],并用流式细胞术检测 BMDC 表面分子的表达。结果显示该质粒 DNA 能够诱导 BMDCs 表达 IL-6 和 TNF- α ,且呈剂量依赖(图 2a、b)。流式细胞术检测结果显示,与阴性对照组相比,质粒 DNA 处理后 BMDCs 表面的 MHCII、CD40 和 CD86 等提示 BMDCs 活化的分子的表达显著增加(图 2c) (其中:PBS:PBS 免疫组;Vector:pcDNA3 免疫组;DNA:pcDNA3-*dnaJ* 免疫组;DnaJ:DnaJ 蛋白免疫组;LPS:LPS 免疫组)。以上结果表明,质粒 pcDNA3-*dnaJ* 能够诱导小鼠 BMDCs 活化

与成熟,可引起小鼠免疫应答,具备用作疫苗的潜力。

2.3 pcDNA3-*dnaJ*/蛋白 DnaJ 免疫小鼠后的保护效果优于单独 pcDNA3-*dnaJ* 重复免疫

分别采用质粒 pcDNA3-*dnaJ* 重复免疫 3 次 (DNA 组) 和 pcDNA3-*dnaJ* 初免 1 次/DnaJ 蛋白增强免疫 1 次 (DP 组) 的策略免疫 BALB/c 小鼠,免疫后的小鼠用肺炎链球菌 19F 菌株攻毒后,检测鼻腔灌洗液中细菌载量;肺炎链球菌 D39 菌株攻毒后观察小鼠生存率。结果显示,与质粒载体免疫组相比,DP 组和 DNA 组小鼠鼻腔灌洗液中细菌载量均显著降低,并且 DP 组小鼠鼻腔灌洗液中细菌载量比 DNA 组更低,差异有统计学意义(图 3a);DP 组和 DNA 组小鼠生存率均显著高于载体组,且 DP 组高于 DNA 组,分别为 90% 和 70% (图 3b) (其中:Vector:pcDNA3 免疫组;DNA:pcDNA3-*dnaJ* 免疫组;DP:pcDNA3-*dnaJ* 初免/蛋白 DnaJ 增强免疫组)。以上结果提示,无论是从鼻咽部细菌定植还是肺部致死剂量细菌感染,异源免疫 DNA-蛋白质的免疫保护效果比单独使用质粒 pcDNA3-*dnaJ* 免疫更好。

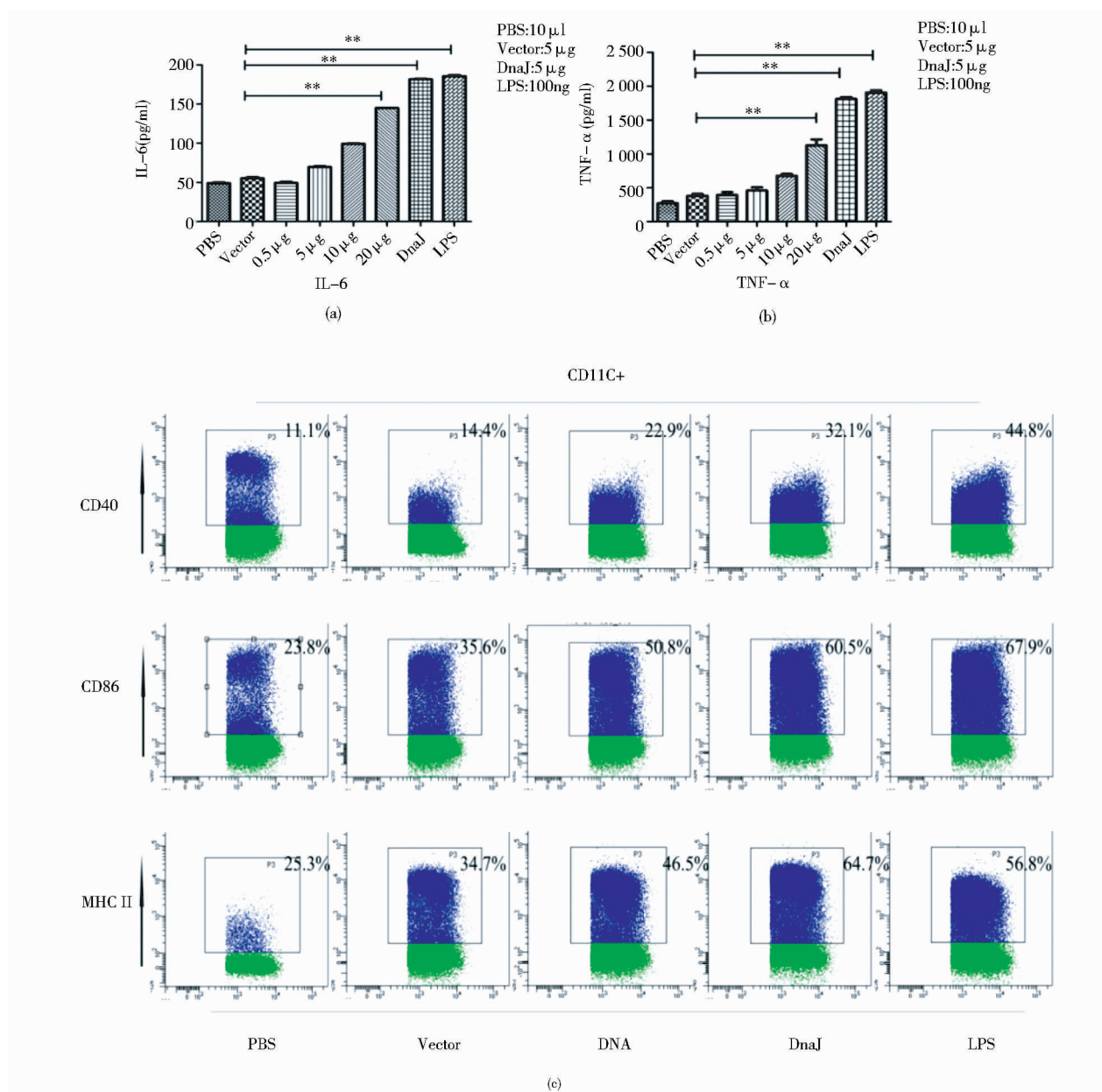


图2 质粒 pcDNA3-*dnaJ* 诱导 BMDCs 的活化与成熟

Fig. 2 Activation and maturation of BMDCs induced by pcDNA3-*dnaJ*

(a) IL-6 and (b) TNF-α levels from BMDCs culture supernatants stimulated by pcDNA3-*dnaJ* DNA (c) Surface expressions of MHCII, CD40 and CD86 as measured by flow cytometry after BMDCs were stimulated by pcDNA3-*dnaJ* DNA

2.4 pcDNA3-*dnaJ*/蛋白 DnaJ 免疫和单独 pcDNA3-*dnaJ* 重复免疫均仅能引起低水平的抗原特异性抗体产生

为了观察免疫后是否能刺激小鼠产生抗原特异性抗体以及抗体能否在体内长期存在,我们检测了免疫后 0 ~ 120 天不同时间点小鼠血清中抗 DnaJ 的 IgG 水平。结果显示,免疫后 35 ~ 90 天,DNA 组和 DP 组小鼠血清中抗原特异性抗体的滴度均较载体组高,且有显

著性差异,但是抗体水平最高时只有 10^4 ,且两组之间无显著性差异(图 4a ~ g)。在免疫后 120 天的时候,抗体水平恢复到免疫前水平(其中:Vector:pcDNA3 免疫组;DNA:pcDNA3-*dnaJ* 免疫组;DP:pcDNA3-*dnaJ* 初免/蛋白 DnaJ 增强免疫组)。

2.5 pcDNA3-*dnaJ*/蛋白 DnaJ 免疫可激活抗原特异性 Th1 和 Th17 细胞免疫应答

为了观察不同免疫策略免疫后小鼠体内细胞免疫

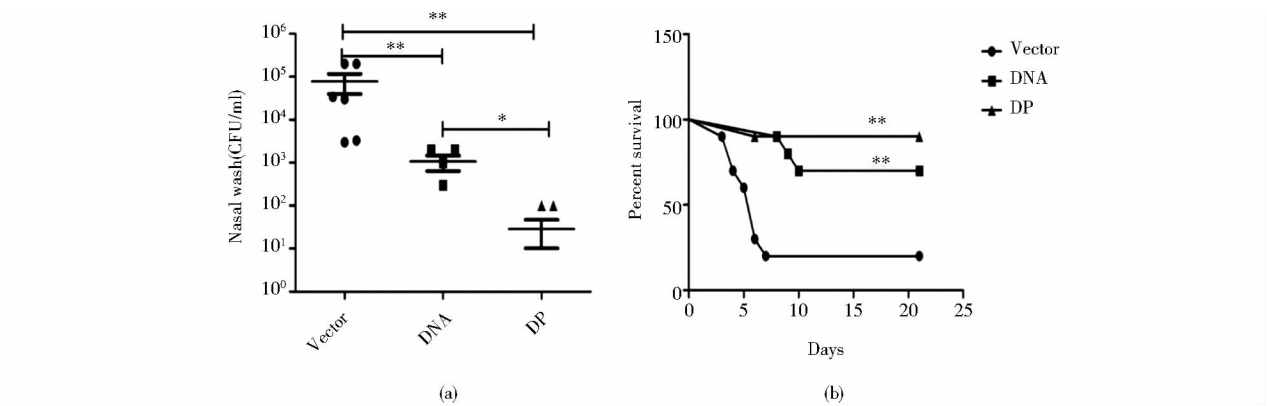


图 3 免疫小鼠后细菌载量和生存率

Fig.3 Bacterial loads and survival rates of immunized mice

(a) Bacterial loads in nasal washes of mice ($n=6$) previously vaccinated with pcDNA3-*dnaJ* (DNA) or pcDNA3 (vector) (b) Survival rates of mice vaccinated as above and challenged with a lethal dose of *S. pneumoniae* D39 ($n=10$)

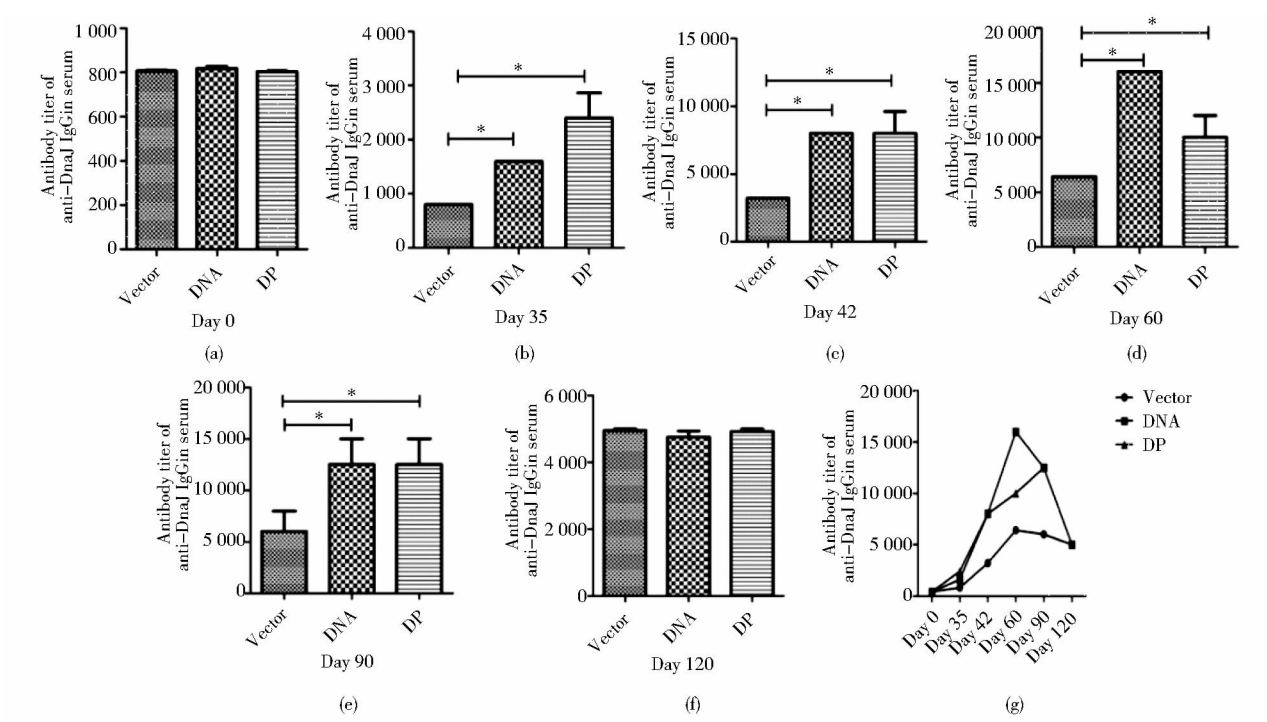


图 4 免疫小鼠血清抗体效价

Fig.4 Antibody titer of immunized mice

(a) ~ (f) DnaJ antibody titers of immunized mice ($n=4$) determined by ELISA at the indicated times (g) Anti-DnaJ antibody titers trends

应答情况,我们检测了小鼠脾细胞以及脾细胞因子。流式细胞术结果显示,DP 组小鼠脾细胞中分泌细胞因子 IFN- γ ⁺ 和 IL-17A⁺ 的 CD4⁺ T 细胞均显著高于 DNA 组(图 5a ~ c),但分泌细胞因子 IL-4⁺ 的 CD4⁺ T 在两组之间无显著性差异。脾细胞因子结果与流式细胞术检测结果一致,即 DP 组小鼠脾细胞培养上清中 IFN- γ 和

IL-17A 水平显著高于 DNA 组,而 IL-4 水平无显著性差异(图 5d ~ f)(其中: Vector: pcDNA3 免疫组; DNA: pcDNA3-*dnaJ* 免疫组; DP: pcDNA3-*dnaJ* 初免/蛋白 DnaJ 增强免疫组)。以上结果提示,异源免疫 DNA/蛋白质比单独 pcDNA3-*dnaJ* 免疫在小鼠体内能激活更强的 Th1 和 Th17 免疫应答。

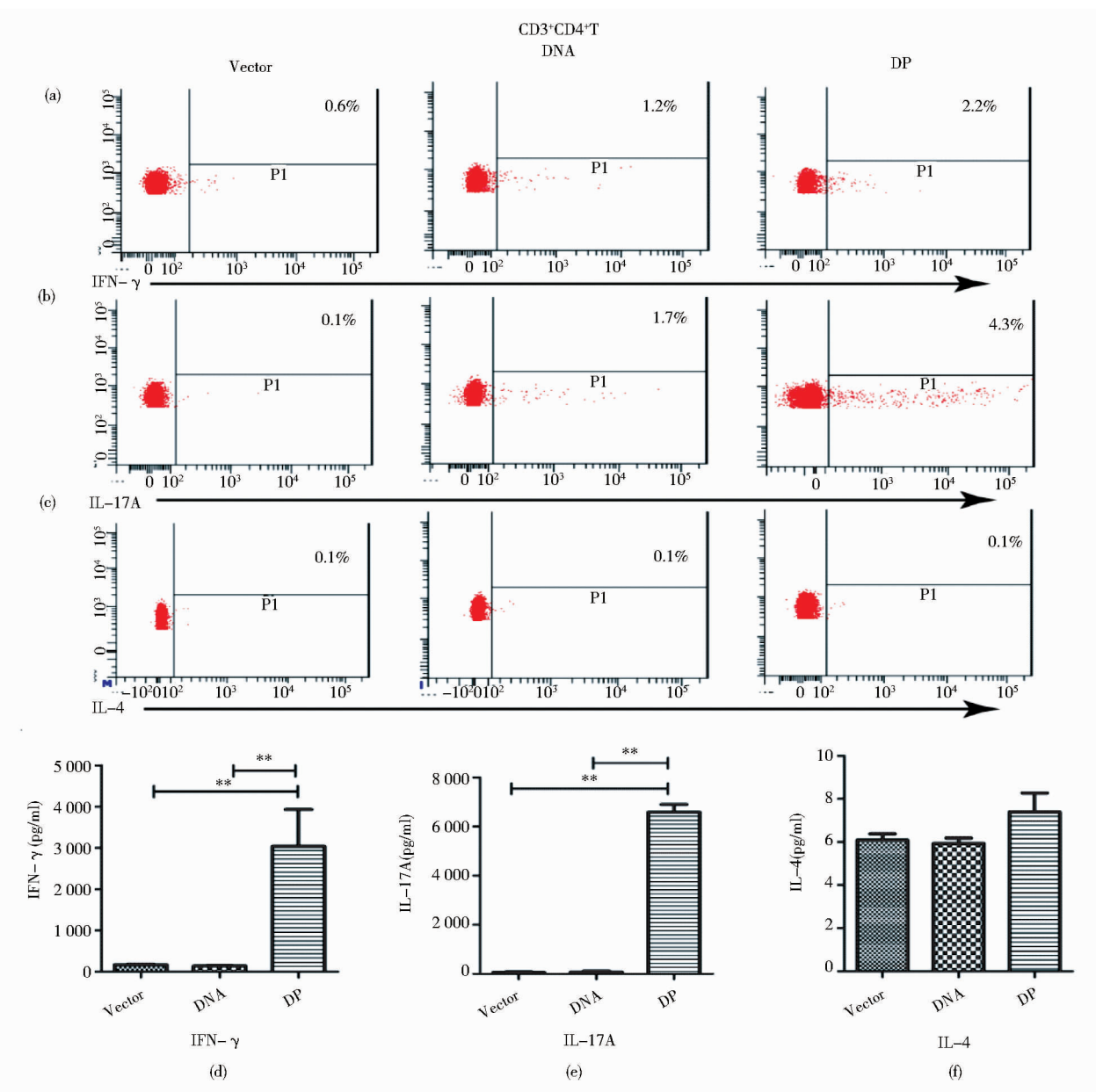


图5 免疫小鼠的细胞免疫应答

Fig.5 Cellular immune response of immunized mice

Splenocytes from immunized mice were stimulated with DnaJ protein antigen. Levels of (a) IFN- γ , (b) IL-17A and (c) IL-4 in CD3⁺ CD4⁺ T cells were measured by flow cytometry. Cytokines (d) IFN- γ , (e) IL-17A and (f) IL-4 in splenocytes culture supernatant

3 讨论

热休克蛋白 DnaJ 是肺炎链球菌的重要毒力因子, 表达在肺炎链球菌表面且在不同血清型中高度保守, 因此是一个良好的疫苗设计靶标。为研究肺炎链球菌的 DNA 疫苗, 本研究中我们首先构建了可在真核细胞中表达 DnaJ 蛋白的质粒 pcDNA3-dnaJ, 分别采用 pcDNA3-dnaJ 重复免疫 3 次和 pcDNA3-dnaJ 初免 1 次/

DnaJ 蛋白增强免疫 1 次的策略免疫 BALB/c 小鼠, 结果显示异源免疫接种 2 次的保护效果优于单独采用 pcDNA3-dnaJ 重复免疫 3 次的免疫效果。

树突状细胞是联系固有免疫和适应性免疫应答的专职抗原提呈细胞, 表面共刺激分子 MHCII、CD40 和 CD86 的表达是其活化的重要标志^[17], 活化成熟的 BMDCs 可分泌高水平的细胞因子 IL-6 和 TNF- α ^[18]。为了验证质粒 pcDNA3-dnaJ 的免疫原性, 我们将构建

成功的质粒 pcDNA3-*dnaJ* 在体外处理 BMDCs, 结果显示 BMDCs 的表面共刺激分子 MHCII、CD40 和 CD86 表达增强, 培养上清中 IL-6 和 TNF- α 表达增加, 表明 pcDNA3-*dnaJ* 可被 DC 识别, 可将其用于进一步疫苗研究。

单独的 DNA 疫苗免疫原性较低, 可能与其较低的细胞摄取率有关, 因此, 需要安全而有效的佐剂来辅助。聚乙烯亚胺 (PEI) 是一种非常有潜力的黏膜佐剂, 已有报道显示 PEI 用于 B 淋巴瘤病人的临床一期实验^[19-20]。而有研究人员进一步比较了 PEI 和线性结构 dPEI 的佐剂效果发现, 作为 PEI 的一种减毒形式, dPEI 是一种更好的黏膜佐剂。因此, 本次研究中我们选用 dPEI 作为 DNA 疫苗的佐剂^[21]。

本研究中, 我们发现无论是单独 DNA 免疫还是 DNA 初免/蛋白增强异源免疫小鼠后, 与载体对照组相比, 均能够有效的减少小鼠鼻咽部 19F 菌株的定植, 并且对肺部致死性感染具有保护作用, 而且 DP 免疫的保护效果更是优于单独 DNA 疫苗重复免疫。我们进一步探究了两种免疫方式所激活的免疫反应。从体液免疫来看, 二者均能刺激小鼠产生抗体, 且抗原特异性抗体可以在小鼠体内存在 120 天, 但滴度仅有 10^4 , 且二者之间并无显著性差异, 表明这两种不同方式的免疫效果差异不是来源于体液免疫。从细胞免疫反应来看, DP 组能够刺激起更强的 $CD4^+$ T 细胞免疫, 刺激更多的分泌 IL-17A 和 IFN- γ 的抗原特异性 $CD4^+$ T 细胞, 并分泌更多的细胞因子 IL-17A 和 IFN- γ 。该结果与细菌定植和细菌侵袭性感染保护结果一致。因而, 我们有理由相信, 与单独的 DNA 免疫相比, DNA-蛋白质异源免疫可能通过活化树突状细胞, 进而诱导更强烈的 Th1 和 Th17 型细胞免疫, 增强了小鼠对肺炎链球菌感染的保护作用。

肺炎链球菌在鼻咽部的定植是感染的第一步, 而且往往是一个很短暂的过程^[22]。因此, 在鼻黏膜清除肺炎链球菌阻止其进一步的侵袭感染尤为重要。已有研究报道 IL-17A 参与的细胞免疫对鼻咽部肺炎链球菌的清除十分重要^[22-24]。Wilson 等^[25]在 $CD4^+$ T 缺陷鼠或 IL-17A 缺陷鼠身上证明了预先免疫活菌后对后续肺炎链球菌攻毒的保护作用不复存在。因此, 对于呼吸道病原菌, 靶向提高 $IL-17A^+CD4^+$ T 细胞的疫苗有重要应用前景。

IFN- γ 有助于活化 DCs 和增强巨噬细胞的吞噬杀菌功能, 有利于机体清除细菌^[26]。IFN- γ 介导的 Th1

型细胞免疫在结核杆菌感染保护中所起的重要作用被深入研究^[27]。本研究发现异源免疫后小鼠脾细胞抗原特异性分泌 IFN- γ 的 $CD4^+$ T 增加且细胞培养后分泌的 IFN- γ 水平增加, 因此异源免疫组攻毒后局部细菌载量明显低于单独的 DNA 免疫组, 这或许有赖于增高的 IFN- γ^+CD4^+ T 细胞应答。

本研究发现同源质粒 DNA pcDNA3-*dnaJ* 3 次接种可降低小鼠鼻咽部肺炎链球菌的定植, 也对致死性感染有保护作用, 但是质粒 pcDNA3-*dnaJ* 初免 1 次/DnaJ 蛋白增强免疫 1 次后, 不但接种次数减少, 而且小鼠抵抗肺炎链球菌在鼻咽部的定植和致死剂量感染的能力更强, 这可能与增强的 Th1 和 Th2 型细胞免疫有关。本研究探索了基于肺炎链球菌 DnaJ 的 DNA 疫苗以及异源免疫策略, 为肺炎链球菌疫苗研究拓宽了思路。

参考文献

- [1] O'Brien K L, Wolfson L J, Watt J P, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 2009, 374(9693): 893-902
- [2] WHO. Pneumococcal vaccines WHO position paper--2012. *Releve Epidemiologique Hebdomadaire*, 2012, 87(14): 129-144.
- [3] Scott J A. The preventable burden of pneumococcal disease in the developing world. *Vaccine*, 2007, 25(13): 2398-2405.
- [4] Wang Y, Yue X, Jin H, et al. A suicidal DNA vaccine expressing the fusion protein of peste des petits ruminants virus induces both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *J Virol Methods*, 2015, 225: 35-40.
- [5] Li W, Wang S, Lu S. Pilot study on the use of DNA priming immunization to enhance *Y. pestis* LcrV-specific B cell responses elicited by a recombinant LcrV protein vaccine. *Vaccines (Basel)*, 2013, 2(1): 36-48.
- [6] Li P, Cao R B, Zheng Q S, et al. Enhancement of humoral and cellular immunity in mice against Japanese encephalitis virus using a DNA prime-protein boost vaccine strategy. *Vet J*, 2010, 183(2): 210-216.
- [7] Golshani M, Rafati S, Siadat S D, et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNA vaccine encoding Brucella L7/L12-truncated Omp31 fusion protein by a DNA priming and protein boosting regimen. *Mol Immunol*, 2015, 66(2): 384-391.
- [8] Wu K, Zhang X, Shi J, et al. Immunization with a combination of three pneumococcal proteins confers additive and broad protection against *Streptococcus pneumoniae* infections in mice. *Infect Immun*, 2010, 78(3): 1276-1283.
- [9] Nguyen C T, Kim S Y, Kim M S, et al. Intranasal immunization

- with recombinant PspA fused with a flagellin enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Vaccine*, 2011, 29(34): 5731-5739.
- [10] Mann J F, McKay P F, Arokiasamy S, et al. Pulmonary delivery of DNA vaccine constructs using deacylated PEI elicits immune responses and protects against viral challenge infection. *J Control Release*, 2013, 170(3): 452-459.
- [11] Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 1994, 180(1): 83-93.
- [12] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 1994, 179(4): 1109-1118.
- [13] Kapsenberg M L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Immunology*, 2003, 3(12): 984-993.
- [14] Banchereau J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392(6673): 245-252.
- [15] Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology*, 2011, 133(4): 409-419.
- [16] Schraml B U, Reis E, Sousa C. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 2015, 32: 13-20.
- [17] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 2002, 20(1): 621-667.
- [18] Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*, 1997, 27(12): 3135-3142.
- [19] Grant E V, Thomas M, Fortune J, et al. Enhancement of plasmid DNA immunogenicity with linear polyethylenimine. *Eur J Immunol*, 2012, 42(11): 2937-2948.
- [20] Wegmann F, Gartlan K H, Harandi A M, et al. Polyethylenimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(9): 883-888.
- [21] Mann J F, McKay P F, Arokiasamy S, et al. Pulmonary delivery of DNA vaccine constructs using deacylated PEI elicits immune responses and protects against viral challenge infection. *J Control Release*, 2013, 170(3): 452-459.
- [22] Lu Y J, Gross J, Bogaert D, et al. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog*, 2008, 4(9): e1000159.
- [23] Zhang Z, Clarke T B, Weiser J N. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119(7): 1899-1909.
- [24] Wang W, Zhou A, Zhang X, et al. Interleukin 17A promotes pneumococcal clearance by recruiting neutrophils and inducing apoptosis through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism in acute otitis media. *Infect Immun*, 2014, 82(6): 2368-2377.
- [25] Wilson R, Cohen J M, Jose R J, et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(3): 627-639.
- [26] Blair C, Naclerio R M, Yu X, et al. Role of type 1 T helper cells in the resolution of acute *Streptococcus pneumoniae* sinusitis: a mouse model. *J Infect Dis*, 2005, 192(7): 1237-1244.
- [27] Jahn-Schmid B, Messner P, Unger F M, et al. Toward selective elicitation of TH1-controlled vaccination responses: vaccine applications of bacterial surface layer proteins. *Journal of Biotechnology*, 1996, 44(1-3): 225-231.

Recombinant Plasmid pcDNA3-*dnaJ* Prime/DnaJ Protein Boost Immunization Induce Th1/Th17 Immune Responses and Protect Mice Against Pneumococcal Infection

SUN Si QIU Yu-lan YAN Ju-rong YANG Jing WU Guang-ying WANG Lin XU Wen-chun

(1 Key Laboratory of Diagnostics Medicine Designated by the Chinese Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(2 Laboratory of Nuclear Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Objective: To explore more effective *S. pneumoniae* DNA vaccines and vaccine immunization strategies and explore their protective mechanisms. Methods: The recombinant plasmid pcDNA3-*dnaJ* was constructed and DnaJ protein was expressed. The recombinant plasmid pcDNA3-*dnaJ*/protein DnaJ immunized group and the plasmid pcDNA3-*dnaJ* immunized group were separately set to compare the nasal lavage of mice treated with *S. pneumoniae* strain. The bacterial load and survival rate of the liquid, serum antibody titer and inflammatory factors after challenged were measured by ELISA. The activation of BMDCs and the immune responses of Th1 and Th17 cells were analyzed by flow cytometry. Results: The plasmid pcDNA3-*dnaJ* immunization three times induced antigen-specific antibody in serum and reduced the bacterial loads in the nasopharynx after challenge with live *S. pneumoniae*, but it was less effective in protecting against a lethal infection. However, compared with repeating the plasmid DNA inoculation three times, the strategy of pcDNA3-*dnaJ* prime one time/DnaJ protein boost one time could significantly reduce the pneumococcal colonization in the nasopharynx and provide better protection against lethal infection. Furthermore, DnaJ protein boosting generated higher levels of IFN- γ and IL-17A than the DNA boosting. Conclusion: Compared with DNA plasmid booster, immunization using DNA prime/protein boost of pneumococcus protein may be a new strategy to develop vaccines against pneumococcal infection.

Key words DNA vaccine *Streptococcus pneumoniae* Heterologous immunity Bacterial loads Lethal infection