

细菌芽胞——一种新型的疫苗载体

王艳春, 张兆山*

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要: 杆菌属的芽胞作为益生菌已经应用于人和动物的食品生产和细菌疗法。目前, 芽胞作为一种新型的疫苗载体, 开始用于破伤风、炭疽等疫苗的研究。与目前的第二代疫苗相比, 细菌芽胞热稳定性好, 遗传操作方便, 是一种理想的疫苗载体。本文就其作为疫苗载体的相关研究进行综述。

关键词: 细菌芽胞; 疫苗; 疫苗载体

中图分类号: Q933.91 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0413-05

疫苗是用来预防和控制传染病的关键手段, 在人类与疾病作斗争的过程中发挥着越来越重要的作用。根据 WHO 的建议^[1], 良好的疫苗应该是口服或鼻腔给药, 室温下稳定, 能提供长期的免疫效果, 并且能够保护主要的病原体感染途径。而细菌芽胞作为一个新颖的疫苗载体, 在贮存和运输过程中不要求冷链, 可以口服免疫, 且使用方便, 因此日益受到关注。

1 芽胞——疫苗载体

芽胞是某些细菌生长发育后期, 在细胞内形成的一个圆形或椭圆形的抗逆性休眠体。芽胞具有极强的抗热、抗辐射、抗化学药物和抗静水压的能力。能

产生芽胞的细菌主要是革兰氏阳性杆菌——芽胞杆菌科的两个属, 即好氧性的芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 和厌氧的梭菌属 (*Clostridium*)。其中芽胞杆菌属的枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 芽胞研究较多。研究表明细菌芽胞外层芽胞衣蛋白具有一定的伸缩性, 能够延长或缩短, 而这一特质既对芽胞形成或萌发有非常重要的作用^[2,3]。同时芽胞也因为具有这些特性而在表面呈现和药物递送方面表现出很好的应用前景。

由于芽胞具有上述的特点, 因此研究人员开始将其应用于疫苗学的研究中, 发展成一种新型的疫苗载体。这是细菌芽胞一个比较新的用途, 而利用重组的芽胞作为口服疫苗的研究, 更只是近 5 年的事情^[4-7]。但是已经表现出了许多潜在的优点, 如表 1 所

表 1 芽胞疫苗的潜在优点

Table 1 Potential beneficial attributes of spore vaccines

Aspect	Comments
Delivery route	Be effective for oral delivery of an antigen and can stimulate mucosal immune response.
Stability	Stable to 85 ~ 90°C depending on species, can be desiccated and stored at room temperature and no cool-chain needing.
Safety	Most <i>Bacillus</i> spore formers are non-pathogenic or attenuated nontoxigenic.
Production	Simplified production, but production of spores would require a separate fermentor.
Genetic manipulation	Excellent genetic tools available for <i>Bacillus subtilis</i> . Genome sequenced for a number of spore formers.
licensing	Have been used as human and animal probiotics in Europe, Asia and the US.
Others	Potential to express multiple antigens in spores. Two routes for antigen expression available (spore and germinating spore). Potential to express any biologically important protein.

*通讯作者。Tel:+86-10-66948834; E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn

作者简介: 王艳春(1980-), 男, 山西人, 博士研究生, 研究方向为病原微生物及其疫苗。E-mail:springwyc@hotmail.com

收稿日期: 2007-07-16; 修回日期: 2007-09-05

示^[8-10]。重组芽胞冻干后能在铝箔包装中保存,且可以室温下保存相当长的时间。必要时可以用水重悬后口服免疫,因此使用起来非常方便。理论上讲,芽胞疫苗被摄入后,黏附于肠道表面,并进一步萌发,产生有增殖能力的菌体。这样能够保证有足够的抗原产生,从而激发机体很强的免疫反应。

1.1 外源抗原递送方式

芽胞用作疫苗载体时,其携带外源抗原的方式主要有两种:芽胞表面展示外源抗原和在芽胞萌发后在繁殖体内表达外源抗原。以下对两种方式分别进行简要介绍。

芽胞表面展示外源抗原目前研究最多的是枯草芽胞杆菌芽胞表面展示系统,其最初的研究是在 *B. subtilis* 的芽胞衣蛋白 CotB 上以融合表达的方式展示破伤风毒素 C 片段(tetanus toxin fragment C, TTFC)。Isticato 等^[11]通过研究发展出了一种基于细菌芽胞的新型表面呈现系统。以定位于芽胞表面的芽胞衣蛋白 CotB 为基础,采用融合表达的方式表达破伤风毒素 C 端 459 个氨基酸残基片段。通过一系列实验估算,每个芽胞表面约暴露有 1.5×10^3 个 TTFC 分子,且能够被 TTFC 特异性抗体识别。这种呈现外源蛋白的方式效率高,且芽胞稳定性好,能够在室温下长期贮存,纯化过程简单,所以,很快受到研究人员的重视。此外,另一个芽胞衣蛋白组分 CotC 也被成功地用来表达 TTFC 和大肠杆菌热稳定肠毒素的 B 亚单位(B subunit of the heatlabile toxin of *E. coli*, LTb)^[6]。CotB 和 CotC 都是定位于芽胞衣外侧的结构蛋白,为组成性表达,且在芽胞衣总蛋白含量中所占比例较大。同时,融合有外源蛋白片段时对其结构和功能不会产生太大的影响,适于融合表达外源蛋白^[12]。

另外,除了在芽胞表面融合表达外源抗原外,还可以在芽胞萌发以后,在繁殖体内表达外源抗原。Cohen^[13]等以高度减毒的炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)为宿主菌,构建了分泌表达炭疽的保护性抗原(protective antigen, PA)重组菌 MASC-10。在体外诱导表达时,rPA 得到了较高水平的表达($\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$),更重要的是,这一重组菌以芽胞的形式免疫豚鼠后,能够在豚鼠体内检测到高滴度的抗 PA 中和抗体,说明芽胞在体内萌发后同样可以表达 PA,发挥后者的免疫保护作用。

采用繁殖体表达抗原蛋白这种方式时,外源抗原的表达既可以在芽胞萌发相关基因启动子的控

制下进行表达^[14],也可以用其它相关的启动子进行调控^[15],同样可以达到递送外源抗原的目的。最终通过对免疫原性等进行评估来选择合理的表达方式。

1.2 芽胞疫苗免疫特点

芽胞作为一种疫苗载体,必须很好地了解芽胞或者是菌体免疫(口服或采用其它方式免疫)后在宿主体内的命运,精确把握其激发机体体液免疫或细胞免疫的相关事件,这对发展相应合理和有效的疫苗有着十分重要的意义。

Duc 等^[16,17]发现芽胞疫苗口服免疫后,与胃相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)有着复杂的相互作用。被摄取的芽胞一部分在肠内萌发,在再次形成芽胞前经历一个很有限的生命周期。同时,芽胞也能够短时间内在派伊尔结(Peyer's patches)的吞噬细胞内持续存在。这种持续存在可能引起针对芽胞的细胞免疫应答,也可能增强体液免疫和天然免疫。这一点对于提高疫苗效果来讲是非常有利的。而且芽胞能够在巨噬细胞内萌发,诱导炎症因子的分泌。通过分析 GALT 和淋巴组织中相关细胞因子的 mRNA,结果表明用芽胞疫苗免疫后,在早期能诱导 Th1 细胞分泌 IFN- γ , 同时也能诱导炎症因子 TNF- β 的产生。与此同时,体外实验也证明, *B. subtilis* 芽胞与单核细胞相互作用后,合成 TNF- α 和 IL-1 β 的细胞比例明显增加。Hoa^[18]也表明, *B. subtilis* 芽胞在巨噬细胞内萌发是其激发机体免疫反应的一个关键步骤,保证了相应抗原顺利地由抗原提呈细胞加工和提呈给淋巴细胞。

同时,由于芽胞疫苗对所携带的外源抗原有多种表达方式,因此,其免疫特点也存在一定的区别。Uyen 等^[19]研究在破伤风芽胞疫苗时发现,TTFC 呈现于芽胞表面和在芽胞萌发后表达这两种情况下,免疫小鼠后激发的免疫效果有着明显的区别。采用表面呈现的方式表达 TTFC 时,能激发较为强烈的免疫应答,且具有明显的 Th1 偏向性,但血清中抗体水平达到最高的时间较慢(第 68 天)。相比之下,采用芽胞在体内萌发后再表达 TTFC,产生的 TTFC 特异性应答达到最高水平的速度要快(第 23 天),且诱发的是 Th2 型 T 细胞反应。Mauriello 等的实验结果也证明,当用表面展示有 TTFC 的重组 *B. subtilis* 芽胞免疫 Balb/C 小鼠时,能够激发很强的 Th1 型细胞免疫应答^[20]。

芽胞能与抗原提呈细胞(APC)相互作用,诱导前炎症因子(pro-inflammatory cytokines)的产生,且具

有免疫刺激特性, 这些使得芽胞成为一个值得关注的疫苗载体, 通过其将相关的抗原提呈给 APC 和其它二级淋巴器官。但是 *B.subtilis* 芽胞在动物体内的免疫原性比较低, 不能象 *B.anthraxis* 的芽胞一样有效地激发机体的全身或局部的抗体反应, 特别是经口服途径进行免疫时, 因此要求免疫剂量比较大 (10^{10} 个芽胞)^[4]。如何提高 *B.subtilis* 芽胞的免疫原性一直是研究人员努力的一个方向, 并且取得了一定的成果。

2 芽胞作为疫苗载体的应用

细菌芽胞是一个新颖的疫苗载体, 可以以口服的方式进行免疫, 易于激发机体的黏膜免疫, 增加了抗原提呈机会, 这使得机体能对芽胞本身或者芽胞上呈现的外源抗原产生较好的免疫应答。

在以往的研究过程中, 本实验室通过对炭疽芽胞杆菌 A16R(基因型为 $pOX1^+OX2^-$) 进行高温传代培养, 获得一株能够形成芽胞, 但基因型为 $pOX1^-OX2^-$ 的新型减毒株(命名为 AP422, 已经申请专利), 实验证明其毒性大大降低, 并用其成功表达了相关的蛋白, 极有可能发展成为一种新的疫苗, 为相关烈性传染病疫苗开发提供有效的帮助。目前我们正在从基因水平对 AP422 株进行进一步改造, 以期获得一种新型的疫苗载体, 在相关疫苗的研究中取得一定的成就。

另外, 用芽胞作为疫苗载体研究, 国外的研究主要集中在 *B.subtilis* 形成的芽胞上, 同时也有用减毒的 *B.anthraxis* 进行相关研究成功报道。现选取几例简单介绍。

2.1 基于芽胞的炭疽疫苗

炭疽是一种由 *B.anthraxis* 引起的烈性种染病, 为人兽共患。人感染炭疽主要有 3 种临床形式: 皮肤炭疽、吸入炭疽和胃肠道炭疽。在过去的 120 年中, 人们一直在努力寻找一种安全有效的炭疽疫苗。很多研究表明, 芽胞疫苗比繁殖体疫苗和重组 PA 疫苗都更加有效, 因此现在人们开始越来越关注基于芽胞的炭疽疫苗。

Cohen 等^[13]用减毒的 *B. anthracis* 株 $\Delta 14815$ ($pOX1^-pOX2^-$) 分泌表达的炭疽芽胞杆菌的保护性抗原 PA, 构建了相应的重组菌株 MCSA-10, 并利用该菌株能形成芽胞的特性, 分别用繁殖体细菌和芽胞经皮下免疫豚鼠。结果表明, 两种免疫方式都能激发

豚鼠产生高水平的抗 PA 抗体(分别为 600 和 2900), 但前者保护率仅为 40%, 而用芽胞进行免疫时, 保护率达到了 100%。这一结果也表明芽胞作为疫苗的形式有很明显的优势。在这一研究的基础上, 同一研究小组的 Mendelson 等^[21]用 $\Delta 14815$ 分别构建了表达 PA 的突变体和致死因子 LF 的重组菌 MCSA-13 和 MCSA-51。其中用 MCSA-13 的芽胞经皮下免疫豚鼠后, 能诱导产生高水平的抗 PA 的中和抗体, 并且在能够保护作用持续 12 个月以上。更重要的是, MCSA-13 免疫后, 能够很快进入脾脏, 可在体内持续存活一个月以上。在其萌发的过程中不断表达 PA, 激发机体的免疫应答, 从而提供较长时间的保护作用。Aloni-Grinstein 等^[7]则用 MCSA-13 的芽胞采用口服方式免疫豚鼠, 研究口服芽胞疫苗。免疫实验结果表明, 以芽胞的形式口服免疫后豚鼠后, 芽胞能较好的抵抗胃肠道的杀伤作用, 可以顺利通过胃肠道, 且产生 PA 特异性 IgG, 同时也引发了抗 PA 分泌型 IgA 应答, 这也就证实很好地引发了黏膜免疫系统的应答, 同时也起到了很好的保护作用。

Duc 等^[22]用 *B. Subtilis* 的芽胞采用两种不同的表达方式表达炭疽的保护性抗原 PA 及 PA 的片段, 研究相应的炭疽芽胞杆菌疫苗。并以 A/J 小鼠为动物模型进行相关的免疫学研究。结果表明, 当 PA 以分泌表达的形式从萌发后的活菌表达和展示在芽胞表面上时, 均能引起机体的保护性免疫应答。但采用胞内表达时则不能引发相应的保护性免疫。且两种表达方式引起的保护性免疫水平都比较高。用 100 倍 LD_{50} 的 *B. anthracis* STI 芽胞进行攻毒实验的结果也表明, 所有重组 *B. subtilis* 芽胞免疫的 A/J 小鼠均得到很好的保护, 而对照组则出现明显的炭疽症状, 并且在攻毒实验后 2~5 d 全部死亡。

这些研究表明, 不论是减毒的 *B. anthracis* 芽胞还是 *B. subtilis* 芽胞都能够作为炭疽保护性抗原 PA 或其它抗原的载体, 起了很好的免疫保护作用。同时也揭示了许多使用重组芽胞进行炭疽的免疫保护时重要的特点, PA 只有表达于芽胞表面或分泌表达时, 才能激发有效的免疫保护, 而在胞内表达时, 则不能激发机体的免疫应答。

2.2 基于芽胞的破伤风疫苗

Isticato 等^[11]用 *B. Subtilis* 的芽胞采用融合表达的方式, 在芽胞衣蛋白 CotB 上展示了破伤风毒素 459 个氨基酸的 C 片段(TTFC)。经实验检测证实, 融

合蛋白确实定位于芽胞衣上,且经测算,每个芽胞上约有 1.5×10^3 个 TTFC 分子。Duc 等^[4]用口服和鼻饲两种方式免疫小鼠。实验证明,口服免疫 33 天后,TTFC 特异性 IgG 的滴度达到了较高的水平($>10^3$),但针对芽胞衣蛋白应答相对较低。同时,免疫后的小鼠用 10 倍 LD₅₀ 的破伤风毒素进行攻毒实验,所有实验小鼠都得到很好的保护。最重要的是,经口服免疫后的小鼠,用 20 倍 LD₅₀ 的破伤风毒素进行攻毒实验时,8 只小鼠中只有一只出现明显的全身性症状,表现出很好的保护效果。这一结果表明,用表面融合表达 TTFC 的 *B. Subtilis* 重组芽胞免疫小鼠后同时能够引起局部或全身性的抗原特异性免疫应答。

3 展望

疫苗发展一个主要目标就是研究和设计热稳定的和非注射疫苗,以便于疫苗的使用。细菌芽胞能携带外源抗原,具有很好的热稳定性,同时即使是采用口服的方式免疫,也能抵抗胃液的破坏,研究表明它是一种很有潜力的疫苗载体。另外,其生产加工容易,储存不需要冷链,非常有利于配送和储备条件相对较差的发展中国家使用。同时,由于杆菌芽胞已经作为益生菌在人及动物食品生产中广泛使用^[23],相对安全可靠,这一点也便于其将来作为一类口服疫苗获得最终相关法规的许可。细菌芽胞作为一种新颖的疫苗载体,越来越受到人们的关注和重视。

参 考 文 献

- [1] Green BA, Baker SM. Recent advances and novel strategies in vaccine development. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5(5): 483-488.
- [2] Driks A. The dynamic spore. *Proc Nat Acad Sci*, 2003, 100(6): 3007-3009.
- [3] Chada VG, Sanstad EA, Wang R, et al. Morphogenesis of bacillus spore surfaces. *J Bacteriol*, 2003, 185(21): 6255-6261.
- [4] Duc LeH, Hong HA, Fairweather N, et al. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect Immun*, 2003, 71(5): 2810-2818.
- [5] Ciabattini A, Parigi R, Istatico R, et al. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. *Vaccine*, 2004, 22(31-32): 4139-4143.
- [6] Mauriello EM, Duc LeH, Istatico R, et al. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine*, 2004, 22(9-10): 1177-1187.
- [7] Aloni-Grinstein R, Gat O, Altboum Z, et al. Oral spore vaccine based on live Attenuated Nontoxigenic *Bacillus anthracis* Expressing recombinant protective antigen. *Infect Immun*, 2005, 73(7): 4043-4053.
- [8] Duc LeH, Cutting SM. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(8): 1263-1270.
- [9] Barak I, Ricca E, Cutting SM. From fundamental studies of sporulation to applied spore research. *Mol Microbiol*, 2005, 55(2): 330-338.
- [10] Duc LeH, Hong HA, Barbosa TM, et al. Characterization of bacillus probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(4): 2161-71.
- [11] Istatico R, Cangiano G, Tran TH, et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, 2001, 183(21): 6294-6301.
- [12] Ricca E, Cutting SM. Emerging Applications of Bacterial Spores in Nanobiotechnology. *J Nanobiotechnology*, 2003, 1(1): 6.
- [13] Cohen S, Mendelson I, Altboum I, et al. Attenuated Nontoxigenic and Nonencapsulated Recombinant *Bacillus anthracis* Spore Vaccines Protect against Anthrax. *Infect Immun*, 2000, 68(8): 4549-4558.
- [14] Paccetz JD, Nguyenb HD, Luiz WB, et al. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine*, 2007, 25(24): 4671-4680.
- [15] Nguyen HD, Nguyen QA, Ferreira RC, et al. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid*, 2005, 54(3): 241-248.
- [16] Duc, LeH, Hong, HA., Uyen NQ et al. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine*, 2004, 22(15-16): 1873-1885.
- [17] Duc LeH, Hong HA, Cutting SM. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Vaccine*, 2003, 21(3): 4215-4224.
- [18] Hoa TT, Duc LeH, Istatico R, et al. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 3819-3823.
- [19] Uyen NQ, Hong HA Cutting SM. Enhanced immunisation and expression strategies using bacterial spores as heat-stable vaccine delivery vehicles. *Vaccine*, 2007, 25(2): 356-365.
- [20] Mauriello EM, Cangiano G, Maurano F, et al. Germination-independent induction of cellular immune response by *Bacillus subtilis* spores displaying the C fragment of the tetanus toxin. *Vaccine*, 2007, 25(5): 788-793.
- [21] Mendelson I, Gat O, Aloni-Grinstein R, et al. Efficacious, nontoxigenic *Bacillus anthracis* spore vaccines based on strains expressing mutant variants of lethal toxin components. *Vaccine*, 2005, 23(48-49): 5688-5697.

- [22] Duc LeH, Hong HA, Atkins HS, *et al.* Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. *Vaccine*, 2007, 25(2): 346–355.
- [23] Hong HA, Duc leH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(4): 813–835.

Bacterial spore - a new vaccine vehicle—A Review

Yanchun Wang, Zhaoshan Zhang*

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Bacterial spores are robust and dormant life forms with formidable resistance properties. Spores of the genus *Bacillus* have been used for a long time as probiotics for oral bacteriotherapy both in humans and animals. Recently, genetically modified *B. subtilis* spores and *B. anthracis* spores have been used as indestructible delivery vehicles for vaccine antigens. They were used as vaccine vehicles or spore vaccine for oral immunization against tetanus and anthrax, and the results were very exciting. Unlike many second generation vaccine systems currently under development, bacterial spores offer heat stability and the flexibility for genetic manipulation. At the same time, they can elicit mucosal immune response by oral and nasal administration. This review focuses on the use of recombinant spores as vaccine delivery vehicles.

Keywords: bacterial spore; vaccine; vaccine vehicle; immunization

* Corresponding author. Tel: +86-10-66948834; E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn

Received: 6 July 2007/Revised: 5 September 2007

科学出版社生命科学新书推介(2008-01)

RNA 世界

〔美〕雷蒙德·F.格斯特兰德 托马斯·R.切赫 约翰·F.阿特金斯 主编; 郑晓飞 主译

978-7-03-020060-0 ¥85.00 2008年1月11日出版

本书根据美国冷泉港实验室出版社出版的《RNA 世界》第三版译出。本书系统地介绍了 RNA 在生命起源中的作用和 RNA 功能, 是国际上 RNA 领域最权威的专业书籍。内容涵盖了 RNA 的起源、核酶、核糖体、剪接体、核糖开关、RNA 蛋白质复合物、snRNP、snoRNP、端粒酶 RNA、RNA 编辑、RNAi、microRNA、非编码 RNA、RNA 二级结构预测和 RNA 动力学研究等。全书具有系统性和权威性。同时, 为方便读者阅读使用, 本书还附有英汉术语对照和索引。

本书可供分子生物学、生物化学、细胞生物学、分子遗传学、微生物学、生物技术、医药卫生, 以及农、林、牧等生命科学领域相关科研、教学、技术人员, 研究生和高年级本科生参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目