

枯草芽孢杆菌芽孢表面展示重组抗原疫苗研究进展*

张柯 宁德刚** 徐卫东

(江苏大学生物与环境工程学院 镇江 212013)

摘要: 枯草芽孢杆菌芽孢所具有的独特的理化特性及生理特征, 使之成为新型的蛋白或酶类药物载体而倍受关注。简介了枯草芽孢杆菌芽孢结构特征, 以及诱导机体产生的免疫反应, 重点阐述了利用芽孢表面展示技术研制重组外源抗原疫苗, 最后对芽孢表面展示外源抗原疫苗的应用前景进行了展望。

关键词: 芽孢, 表面展示, 重组疫苗

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0134-04

Advance on the Surface Display of Recombinant Vaccines on *Subtilis bacillus* Spores*

ZHANG Ke NING De-Gang** XU Wei-Dong

(College of Environmental and Biological Engineering Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

Abstract: *Subtilis bacillus* spores for novel vaccine delivery has attracted significant interest of more and more researchers by their unique biological characteristics. In this review, the structure and immunogenicity of spores were briefly discussed, then special emphasis placed on the use of recombinant spores as vaccine delivery vehicles, some ideas for further studies on surface display of recombinant vaccines on *Subtilis bacillus* spores were also proposed

Key words: Spores, Surface display, Recombinant vaccine

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是好氧性的革兰氏阳性细菌。枯草芽孢杆菌在营养缺乏或其他胁迫条件下, 能形成具有抗逆性的休眠体—芽孢, 由于芽孢所具有的独特的理化及生理特征, 以及基因组的破译和可操作的遗传系统的建立, 使之成为新型的蛋白或酶类药物载体而倍受关注^[1]。作者参考国内外最新研究进展, 围绕枯草芽孢杆菌芽孢表面展示重组疫苗由来及其最新研究成果进行综述。

1 枯草芽孢杆菌作为重组蛋白表达载体的研究

枯草芽孢杆菌和大肠杆菌一样, 已成为规模化生产重组蛋白常用的宿主。但革兰氏阳性菌, 尤其是一些被称为益生菌的枯草芽孢杆菌更为安全可靠。大部分革兰氏阴性菌的细胞壁如大肠杆菌含有脂多糖, 终产品需要去掉热源, 纯化工艺极为复杂^[2]。此外, 枯草芽孢杆菌细胞质具有很好的还原条件, 可使大量表达的重组蛋白正确的折叠, 阻止了包涵体的形成。但应用枯草芽孢杆菌作为宿主大规模表达蛋白或酶类药物落后于大肠杆菌, 主要原因在于: (1) 缺乏合适的表达载体; (2) 质粒在宿主细胞中

* 江苏省自然科学基金项目 (No. 05KJB530020)

江苏大学高级人才专项基金 (No. 1283000072)

** 通讯作者 Tel: (0511) 8791564, E-mail: 306502@uj.su.edu.cn

收稿日期: 2005-11-10, 修回日期: 2006-01-20

容易丢失；(3) 细胞中存在大量的蛋白酶，使重组蛋白降解。近年来，随着枯草芽孢杆菌研究的逐步深入，通过以下途径使得以上问题正逐步得以解决，并成功生产一些蛋白质和酶类药物^[3,4]。(1) 构建外源基因整合平台质粒，使外源基因整合于宿主染色体并稳定遗传；(2) 构建分泌性表达载体，使重组蛋白分泌表达，在信号肽和重组蛋白之间添加信号肽酶的剪切位点，并增加宿主细胞中信号肽酶的表达；(3) 构建蛋白酶缺陷的工程菌株，减少重组蛋白的降解；(4) 使基因组最小化。有研究表明，枯草芽孢杆菌细胞只有大约 270 个基因是枯草芽孢杆菌在丰富培养基中生长所必需的，基因组的最小化并不影响细胞活力和关键生理功能，将大大简化蛋白生产下游分离纯化过程^[4]。随着枯草芽孢杆菌基因组的破解 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>) 及蛋白质组学研究的深入，枯草芽孢杆菌已成为工业化生产重组蛋白药物的理想宿主。

2 枯草芽孢杆菌芽孢结构

多数枯草芽孢杆菌在营养缺乏时，能形成处于代谢休眠状态的芽孢，适宜条件下萌发成具有分裂能力的营养细胞^[5]。芽孢由芽孢髓质、皮层、芽孢衣和芽孢外壁构成。芽孢髓质包括含染色体的核心、芽孢质、芽孢质膜和肽聚糖构成的芽孢壁；含芽孢肽聚糖和 DPA-Ca 皮层覆盖芽孢髓质；外层主要有疏水蛋白构成的芽孢衣，具有抗酶解、抗药物功能；最外层是芽孢外壁，含有透性很差的脂蛋白。芽孢的形成是一系列调控基因和结构基因按一定时序调控表达的过程。处于细胞分裂周期某一阶段细胞，在尚不清楚的环境因素作用下，激活复杂的磷酸化级联反应，完成芽孢的分化。在这一过程中，与芽孢形成有关基因的表达替代与营养生长有关基因。不同的转录因子 σ 按一定顺序与核心聚合酶结合，顺序地激活并指导芽孢形成基因在恰当的时空表达。这些基因包括芽孢衣结构基因以及调控基因，如 *cotA*、*cotB*、*cotC* 和 *cotF* 20 余种^[6]。

3 枯草芽孢杆菌芽孢生理及理化特性

芽孢是生命世界中抗逆性最强的一种结构，在抗热、抗化学药物和抗辐射等方面十分突出，一般可存活几年至几十年。最极端的例子是在美国一块 2,500 ~ 4,000 万年历史的琥珀，至今还可从其蜜蜂肠道内分离到有萌发能力的芽孢^[5]。

芽孢具有高度耐热性的机制了解的很少。渗透调节皮层膨胀学说认为：芽孢的耐热性在于芽孢衣对多价阳离子和水分的透性很差而皮层的离子强度很高，使皮层产生极高的渗透压去夺取芽孢核心中的水分，皮层的充分膨胀和核心的高度失水，赋予芽孢极强的耐热性^[7]。芽孢能抵抗化学因子与芽孢衣和脱水的髓质有关。芽孢衣是由蛋白质组成的多层致密的结构，众多的二硫键共价交联使芽孢衣蛋白的结构相当稳定，对有害化学因子有很强的抵抗力。外壳可以防止表面活性剂、酶类及各种化学因子侵入芽孢，成为保护芽孢的第一道屏障。当某些化学因子穿过外壳，芽孢膜也能减少化学物质的透过。另外，髓质的缺水条件不但有利于减少化学因子与生命物质的反应，也使其生物大分子的结构更加稳定，能抵抗酸、碱及有机溶剂等变性剂的作用^[7]。这些独特的特性使芽孢成为异源抗原和生物活性分子在极端环境中传递的很好载体。

4 枯草芽孢杆菌芽孢作为疫苗载体的由来

芽孢疫苗研究由来已久，早在 19 世纪 80 年代就用炭疽芽孢杆菌芽孢来防御炭疽的

记载。之后巴斯德采用加热热灭活芽孢作为炭疽疫苗，但免疫能力和毒力不稳定。至20世纪30年代，减毒兽用芽孢疫苗的应用使全球的家畜炭疽患病率下降，动物病例的减少使得人类感染的机率随之下降^[8]。但减毒活疫苗残存毒力带来的副作用和偶见的动物死亡限制了它在人类中的应用。随后世界各国研制出不同类型的非细胞炭疽疫苗，取得了很好的效果^[9]。

因此，人们对细菌芽孢的免疫特性及与免疫系统之间的相互作用作了深入研究。芽孢对局部的巨噬细胞具有很高的亲和能力，并可被快速有效的吞噬。当含有芽孢的巨噬细胞迁移到淋巴结时，细胞内的芽孢萌发成营养细胞并在细胞内增殖，巨噬细胞裂解后营养细胞释放到血液中。对萌发芽孢在动物体内的归宿研究表明，巨噬细胞的活性决定营养细胞能否存活。当芽孢萌发时致死因子(LF, lethal factor)在巨噬细胞中合成，并随细胞裂解而释放^[10]。巨噬细胞是体内致死毒素(PA + LF, LeTx)作用的细胞介导因子，当致死毒素达到一定浓度时，LeTx刺激前致炎因子TNF- α , IL-1等的产生。因此营养细胞的死亡可能是这些细胞因子刺激免疫细胞产生的IL-1作用的结果。Duc le H等^[11]对枯草杆菌芽孢的免疫特性以及在细胞内的归宿研究显示：芽孢可诱导机体产生局部免疫和系统免疫反应，芽孢可在体内萌发成营养细胞。

5 芽孢表面展示疫苗载体系统的研究

由于芽孢独特的抗逆性和免疫学特性，以芽孢为载体，通过芽孢表面展示研制新型口服重组蛋白疫苗成为科学家关注的焦点。Isticato等^[12]利用CotB作为芽孢表面展示外源抗原的融合载体蛋白，成功地在枯草芽孢杆菌芽孢表面展示了破伤风毒素(TTFC) C末端的459氨基酸片段。CotB是一种有380个氨基酸的芽孢衣蛋白。将编码TTFC多肽的基因序列置于cotB序列下游，由cotB基因启动子控制重组基因片段cotB-TTFC整合于枯草芽孢杆菌染色体上，保证芽孢形成时能按正确时相表达。试验结果证明TTFC抗原展示于芽孢表面，每个芽孢表面约有 1.5×10^3 个TTFC蛋白分子，可被特异性抗体识别，并且TTFC的出现并未影响芽孢衣的结构和功能。

用芽孢衣的另一蛋白成分，8.8kD的多肽CotC作为融合载体蛋白，分别将TTFC和大肠杆菌的不耐热肠毒素B亚单位(LTB)展示于芽孢表面。融合蛋白占芽孢壳蛋白的0.3%，每个芽孢中CotC-TTFC、CotC-LTB的分子数分别为 9.7×10^2 和 2×10^2 。腹腔注射重组芽孢均能诱导小鼠局部和系统免疫应答，并且TTFC、LTB与CotC融合后并不影响芽孢的结构和功能^[13]。大部分枯草芽孢杆菌芽孢衣蛋白，包括CotA, CotB, CotC, CotD, CotF无显著的功能，缺乏其中任何一个都不会引起明显的性状改变^[6]，结合上述研究结果可以推断，用多个不同的融合载体蛋白，可以同时芽孢衣表面展示多种不同的抗原，以制备多价重组抗原疫苗。

6 芽孢载体表面展示重组疫苗的机体免疫类型

以CotB-TTFC重组芽孢腹腔注射免疫小鼠，可产生特异性的抗-TTFC IgG，抗体滴度为 1.5×10^3 ；口服免疫小鼠33d后产生的特异性抗体滴度高达 10^3 ，鼻腔免疫也可产生特异性抗体，但抗体水平低于前者。对口服免疫小鼠的抗体类型分析显示，主要为IgG、IgA和IgM。其中IgG包括IgG1、IgG2a、IgG2b和IG3亚型，口服免疫后54dIgG1和IgG2b亚型水平最高；而鼻腔免疫后抗体主要为IgG1、IgG2b和IgM；在口服或鼻腔

免疫的小鼠粪便中均可检测到分泌型 IgA 抗体。口服免疫后的小鼠可抵抗致死剂量为 10 LD₅₀ TTFC 毒素攻击^[14]。以上结果表明 CotB-TTFC 重组芽孢口服或鼻腔接种均可诱导机体产生具有保护能力局部免疫和系统免疫反应。

分别以 CotC-TTFC 和 CotC-LTB 重组芽孢腹腔注射免疫小鼠, 机体可产生特异性的抗-TTFC IgG 抗体, 58d 后 TTFC 抗体滴度 $>5 \times 10^2$, LTB 抗体滴度 $>2 \times 10^2$; 分别以两种重组芽孢口服免疫小鼠, 68d 后抗-TTFC 特异性抗体滴度高达 2×10^2 , 主要抗体类型为 IgG1、IgG2a 和 IgG2b; 但 LTB 抗体滴度与对照组无显著差别, 而在新鲜粪便中抗-LTB 分泌性抗体 IgA 比抗-TTFC IgA 高出 10 倍^[13]。

抗体亚类分析揭示了重组 TTFC 和 LTB 芽孢免疫机体可产生的不同免疫反应。Th1 细胞参与细胞免疫, 而 Th2 细胞参与体液免疫。IgG2a 亚类的大量产生是 Th1 参与免疫反应的标志, 而 IgG1 的出现是 Th2 参与免疫反应的标志^[15]。研究发现, 用 CotC-LTB 芽孢注射免疫只诱导 IgG2a, 且 IgG2a 水平相对较高, 但缺乏 IgG1, 表明主要为 Th1 参与的细胞免疫。而重组的 TTFC 的反应包括大约等量的 IgG1、IgG2a、IgG2b, 暗示 Th1、Th2 同时参与免疫反应, 这一反应对 TTFC 抗原的芽孢递呈是特异的。对小鼠口服重组 CotB-TTFC 芽孢的归宿研究结果表明, 少量完整芽孢可通过消化道粘膜进入淋巴结, 并可在淋巴结中萌发成营养细胞^[14]。

7 问题与展望

随着生物技术的发展, 人们试图研制新型的疫苗及其疫苗载体。可溶性抗原的口服免疫产生不太明显的免疫反应, 其原因在于抗原在胃肠内被降解, 耐受性差, 吸收有限。要提高口服疫苗诱导的免疫反应, 必须解决抗原的运载系统。理想的口服或鼻腔内免疫疫苗可快速诱导机体产生保护性免疫反应。枯草芽孢杆菌芽孢具有良好的抗逆性, 储存时间长, 可顺利通过胃肠屏障, 并且芽孢载体抗原能直接靶向抗原提呈细胞及周围淋巴器官, 诱导并调节机体的特异性免疫反应。所有这些特点使芽孢成为蛋白疫苗的有效载体。

参考文献

- [1] Reichert J M, Paquette C. *Biotechniques*, 2003, 35: 176 ~ 185.
- [2] Bredmose L, Madsen S M, Vrang A, et al. In: Merten O W, et al. *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cell*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishing, 2001. 269 ~ 275.
- [3] 金明飞, 朱欣华, 金丽, 等. *微生物学通报*, 2005, 32 (2): 69 ~ 72.
- [4] Westers L, Westers H. *Biochimica Biophysica Acta*, 2004, 1694: 299 ~ 310.
- [5] Barak I, Ricca E, Cutting S M. *Mol Microbiol*, 2005, 55 (2): 330 ~ 338.
- [6] Henriques A O, Moran C P J. *Methods*, 2000, 20 (1): 95 ~ 110.
- [7] Aronson A, Pandey N K. In: Chambliss G, Vary J C (ed), *Spores-VII*, American Society for Microbiology, Washington D C, 1978. 54 ~ 56.
- [8] Turnbull P C B. *Curr Opin Infect Dis*, 2000, 13: 113 ~ 120.
- [9] Oggioni M R, Ciabattini A, Cuppone A M, et al. *Vaccine*, 2003, 2: S96 ~ 101.
- [10] Guidi-Rontani C, Levy M, Ohayon H, et al. *Mol Microbiol*, 2001, 42: 931 ~ 938.
- [11] Duc le H, Hong H A, Uyen N Q, et al. *Vaccine*, 2004, 22: 1873 ~ 1885.
- [12] Iaticato R, Cangiano G, Tran H T, et al. *J Bacteriol*, 2001, 183: 6294 ~ 6301.
- [13] Emilia M F, Mauriello A, Duch Le H, et al. *Vaccine*, 2003, 22: 1177 ~ 1187.
- [14] Duc le H, Hong H A, Fairweather N, et al. *Infect Immun*, 2003, 71 (5): 2810 ~ 2818.
- [15] Ricci S, Medagliani D, Rush C M, et al. *Infect Immun*, 2000, 68: 760 ~ 766.