

菌影系统作为疫苗载体的研究进展

蔡嘉怡 综述,曾铁兵 审核

(南华大学医学院病原生物学研究所,湖南 衡阳 421001)

摘要: 菌影是完整的革兰阴性细菌的空菌体,不含核酸、核糖体等细胞内容物,但保持了活菌所具有的天然形态及所有结构,具有良好天然佐剂特性,可诱导免疫系统的固有免疫和适应性免疫应答;菌影又是外源性蛋白抗原或 DNA 的高效递送的载体。菌影可通过口腔、眼、鼻腔或支气管等进行黏膜免疫,这是疫苗最理想的免疫方式。本文综述菌影作为蛋白亚单位疫苗和 DNA 疫苗的载体的特性及其在人类疫苗和动物疫苗应用领域的研究进展。

关键词: 菌影; 抗原提呈系统; 免疫佐剂; 疫苗

中图分类号:R392 **文献标识码:**A

疫苗被广泛用于人类和动物预防感染性疾病。一种疫苗诱导免疫应答获得保护与适当的佐剂及高效的抗原递送系统密切相关。近年来一些合成的物质能增强抗原诱导免疫应答能力,如脂质体、质粒 DNA (pDNA)。脂质体由单层或多层磷脂膜组成,是一种有效的传递系统,但可能产生非特定的免疫刺激性信号和难以预料的不利作用^[1];pDNA 疫苗使用简单,发展潜力巨大,但其本身免疫原性低,难以被细胞摄取,限制其发展与应用。因此,开发能将抗原递送至特定的免疫细胞并增加递送抗原的免疫原性的新型载体系统,仍需广泛深入研究。菌影 (bacterial ghost, BG) 平台系统对递送疫苗、药物和活性物质是一项创新性的技术。菌影是利用噬菌体 PhiX174 的裂解蛋白 E^[2] 在细胞膜上形成一个跨膜通道,细胞质从该通道释放后得到的革兰阴性菌的空菌体。菌影可以装载药物、蛋白质、基因、酶及其它物质,还可形成封闭的囊泡。菌影和其它非生物疫苗相比,最大的优点是其具有未被破坏的完整细胞壁结构,作为天然佐剂刺激宿主免疫系统应答,同时递送特异性抗原给抗原提呈细胞 (APC) 或者活性物质给靶细胞^[3]。生产菌影高效、低成本、安全,制成冻干疫苗可以在室温下保存数月^[4]。此外,菌影

可采用多种免疫途径,如皮内、肌肉、皮下、腹膜、口服和胃等,还可通过黏膜免疫,如口腔、鼻腔、直肠、阴道或眼等^[5-7]。本文重点阐述菌影作为亚单位蛋白疫苗和 DNA 疫苗的载体的特性、菌影作为人用疫苗的发展潜力及在动物疫苗应用方面的最新进展。

1 菌影形成机制与制备

1.1 菌影形成机制

菌影的形成是通过控制裂解基因 E 的表达。该基因编码的裂解蛋白由 91 个氨基酸残基组成,通过与细菌内膜或外膜融合,能在多种革兰阴性细菌细胞膜和胞壁上形成 40 ~ 200 nm 的特异性跨膜孔道,包括核酸、核糖体在内的所有细胞质成分从跨膜通道流出,剩下的细菌空壳即为菌影。在裂解过程中菌影的细胞外膜和内膜结构仍保持完整。裂解蛋白 E 的裂解作用在细菌增殖的过程中进行,包括裂解蛋白 E 在细胞内膜聚集和裂解蛋白 E 构象的改变在细胞内外膜形成一个封闭的细胞周质间隙。

1.2 菌影制备

裂解基因 E 在控制表达的情况下许多种革兰阴性细菌可以形成菌影,包括人和动物的非病原菌、致病菌和益生菌,如大肠杆菌菌株 K12、肠产毒性大肠杆菌、脑膜炎奈瑟菌、出血败血性巴氏杆菌和益生菌大肠杆菌 Nissle 1917 等等。菌影的形成通过其生长和凋亡期里细菌的总数、增殖的细菌数以及光密度来判断,可用流式细胞仪来检测裂解基因 E 的效率、菌影的数量以及未裂解的细菌。控制裂解基因 E 的表达能使菌影的转化率达到 99.9%,剩余的

收稿日期:2014-01-09

基金项目:国家自然科学基金 (81273322); 湖南省自然科学基金重点项目 (11JJ2044)。

作者简介:蔡嘉怡,硕士研究生,研究方向:病原体防治, E-mail: 342521326@qq.com. 通讯作者曾铁兵,博士,教授,研究方向:病原体防治, E-mail: nhdxtzb@126.com.

活细菌用 β -丙内酯灭活。此外,将金葡菌核酸酶 A (SNUC)与裂解基因 E 一起表达,前者可降解宿主菌 DNA 和其它核苷酸,以避免致病基因或抗药基因的水平转移带来的相关隐患,该方法已用于痢疾志贺菌菌影制备^[8-9]。

2 菌影作为蛋白亚单位疫苗和 DNA 疫苗的载体

2.1 菌影作为亚单位蛋白的载体

DNA 重组技术已用于将外源蛋白抗原锚定在菌影胞膜复合物上来生产菌影,或以菌影作为亚单位蛋白疫苗的载体将外源抗原装载于菌影壳体中^[9-11]。抗原可与菌影外膜蛋白融合呈现在菌影表面,或锚定在内膜的 N 端、C 端或 N 与 C 端的膜锚定位点,这些锚定位点不影响外源性抗原的正确折叠,能保持构象表位的结构和酶活性物质的所有活性。此外,将目的抗原装载入细胞周质间隙可防止菌影生产过程中环境因素和冻干所致抗原的降解。细胞周质间隙的类凝胶区域富含膜源性低聚糖,能在细菌裂解过程中将外膜和内膜融合而将周质间隙紧紧封闭。独自存在或与 S 层融合蛋白 SbsA/SbsB 结合的靶抗原,通过与麦芽糖蛋白 (MalE) 的融合导出到周质间隙。SbsA 和 SbsB 结构特点使其能为菌影内腔装载外源抗原,SbsA 比 SbsB 装载外源抗原的能力更强,因其能插入较大的片段如 Omp26^[12]。

2.2 菌影作为 DNA 编码抗原的载体

菌影具有极强的装载能力与装载效率,能装载大量的核酸。装载菌影简便,只需将冻干粉剂菌影重悬在含有高浓度的 pDNA 溶液中,再洗去未结合的 pDNA 即可。菌影装载 DNA 量取决于溶液中 DNA 的浓度。有研究表明,一个菌影的装载量可达 6000 个中等大小的质粒^[13]。质粒或线性 DNA 与菌影胞膜之间的相互作用很可能是带负电荷的 DNA 分子与带正电荷的非极性内膜之间的静电作用^[13]。此外,pDNA 能被装载入菌影内并储存,是因为 pDNA 能与菌影内生物素葡聚糖胺或者聚赖氨酸结合。pDNA 带有的特定 DNA 序列 (LacOs 位点) 与内膜上的融合复合体 LacI-L' 膜锚点结合,使特异性自身固定的 pDNA (pSIP) 在裂解过程中被固定在细菌内膜^[14]。通过菌影递送 DNA 给靶细胞有两种机制:两步法是先制备菌影、冻干成干粉状,再装载高量的目的 DNA;一步法是采用 pSIP 系统直接制备带

有特异性 pDNA 的菌影^[1]。

3 人用菌影疫苗的发展潜力以及动物菌影疫苗的应用

菌影系统是一个新型、无生命、高效的抗原和药物递送平台,成为当前开发病毒性和细菌性疫苗的重要手段。研究表明,菌影对包括巨噬细胞、树突状细胞 (DC)、肿瘤细胞、内皮细胞和上皮细胞在内的许多细胞的生存能力和代谢活动无细胞毒性或遗传毒性^[1]。菌影具有完整的外部结构,能被 APC 表面受体如补体受体和 Toll 样受体有效识别并吞噬^[15]。在猪体内,胸膜肺炎放线杆菌菌影能增加 APC 表面 MHC 分子的表达并显著增加 APC 刺激 T 细胞增殖的能力^[16]。DC 作为专职性 APC,其吞噬活性和摄取能力取决于用于制备菌影的细菌菌株。鸡体内实验表明,使用非耐药质粒筛选的肠炎沙门菌菌影和常规途径筛选的菌影相比,免疫保护作用相当而生物技术安全性更高^[17]。

3.1 人用菌影疫苗的发展潜力

大量动物实验表明,菌影能引起针对菌体和目的抗原的特异性体液免疫和细胞免疫应答^[18]。菌影有多种可选择免疫途径,如腹腔、皮内、肌肉、皮下、胃内、吸入或者静脉免疫,装载 DNA 的菌影在体内转染 DC 能诱导特异性体液免疫和细胞免疫应答。C57BL/6 小鼠肌注带有沙眼衣原体重组外膜蛋白的霍乱弧菌菌影能引起局部黏膜和全身的 Th1 型免疫应答,特异性抗原致敏的 T 细胞可被动转移^[19-20]。C57BL/6 小鼠肌注表达沙眼衣原体孔蛋白 B 和多态性膜蛋白 D 的霍乱弧菌菌影后,能诱导持续强烈的系统和黏膜记忆性免疫应答^[21]。用重组 Omp18 蛋白的幽门螺杆菌菌影对 C57BL/6 小鼠进行治疗性免疫,Omp18 特异性抗体的增加和胃部细菌的减少与对照组差异显著^[22]。以嗜血杆菌 Omp26 的大肠杆菌 NM522 菌影通过肠黏膜和 (或) 肺黏膜免疫大鼠产生 IgG2a,诱导 Th1 型免疫应答,在 Omp26 支气管内加强免疫后增加更明显,显著清除呼吸道攻击的细菌^[12]。最近研究表明,伤寒沙门氏菌 Ty21a 菌影装载 HIVgp140 DNA 后免疫小鼠,易被巨噬细胞 RAW264.7 吞噬并有效表达,诱导外周和肠黏膜抗体水平明显高于裸露 DNA 免疫组小鼠^[23]。带有小肠结肠炎耶尔森氏菌突变基因 msbB 的小肠结肠炎耶尔森氏菌菌影灌胃免疫 BALB/c 小

鼠 Th1/Th2 混合型免疫应答,有效减低炎症细胞因子的分泌,以 100 倍最小致死量野毒株攻击,获得了 80% 的高保护率^[24]。

以装载编码 β -牛乳糖的 pCMV 的曼氏溶血杆菌菌影皮下和肌肉注射 BALB/c 小鼠,其体液免疫应答水平比用裸露 DNA 免疫至少高出一个数量级,菌影刺激特异性 Th1 和 Th2 型免疫应答,随后转换为 Th2 型应答,表明用于制备菌影的细菌株能调节抗原特异性 T 细胞免疫应答类型^[25]。进一步研究小鼠 APC,证实菌影具有强大的递送编码特异性抗原的 pDNA 给靶细胞的功能,转染靶细胞表达抗原效率高达 85%^[13,25]。此外,以体内转染装载 pCMV β -牛乳糖体曼氏溶血杆菌菌影的髓源性 DC 静注小鼠,在所有免疫鼠诱生了特异性抗 β -牛乳糖的抗体,而且在免疫后观察到识别 MHC I- β -牛乳糖抗原表位的 T 细胞释放 IFN- γ 水平增加^[25]。胸膜肺炎放线杆菌菌影刺激猪 DC 的结果与曼氏溶血杆菌、霍乱弧菌菌影共同培养刺激小鼠相似,DC 表面表达的 MHC 分子和共同刺激分子增加^[25]。定量分析菌影的加载量表明,低浓度的 DNA (50 质粒/菌影) 就足够有效递送给靶细胞,其转染率高达 82%^[26]。考虑到菌影 DNA 大加载量 (6000 质粒/菌影) 和最低浓度 DNA 即可成功转染靶细胞 (50 质粒/菌影),菌影内部空间的高载荷量表明它们能运载多种编码不同种类的抗原的质粒和 (或) 其它的免疫活性物质。

不同菌株的菌影能诱导不同动物模型和不同靶细胞的免疫应答,表明菌影能特异性刺激抗菌影的细菌株的有效体液和细胞免疫应答,菌影运载和递送给靶细胞的抗原足能保护动物抗特异性菌株的攻击感染。菌影可制备为不同的形式 (气溶胶、食物和液体)、可采用多种免疫途径及上述的各种免疫刺激能力的这些特性,表明菌影有希望发展为多价疫苗。评价菌影免疫动物的结果有助于选择最适用做菌影的菌株,以刺激最有效的免疫应答类型抗特定疾病 (病原体)。

3.2 兽类菌影疫苗

免疫途径在兽医实践应用中极其重要。疫苗最好的免疫途径是黏膜免疫,如口腔,鼻吸,眼内和呼吸道的免疫。黏膜免疫比其它途径免疫有以下优点:使用方便,副作用少,便于多次加强免疫。灭活疫苗通过黏膜免疫通常不能起到全面的免疫保护作用,必须使用黏膜佐剂如去毒的不耐热大肠杆菌毒

素和霍乱毒素等来增强免疫作用。动物实验中菌影作用于口腔、鼻腔、眼或者呼吸道的黏膜表面,在引起免疫应答的剂量范围内无任何不良反应^[27]。组织培养试验显示,即便是高剂量条件下 (1000 菌影/细胞),菌影也不会引起细胞毒性或遗传毒性^[28]。黏膜免疫通常需要至少一次相同疫苗来加强免疫以获得完全保护,这取决于菌影来源的菌株和递送途径。然而,使用出血性大肠杆菌菌影,一次直肠免疫即可获得 100% 保护^[29],因此对不同菌影的候选疫苗的剂量和免疫途径需要深入研究。

许多致病性革兰阴性细菌在不同的动物模型中被应用作为菌影。副猪嗜血杆菌菌影通过注射免疫可引起特异性 IgG 滴度、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比值显著增加。在菌影刺激下猪 DC 表面表达共刺激分子和 MHC 分子明显增加^[30]。肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 菌影胃内免疫保护小鼠抗细菌的致死性攻击感染,诱导体液免疫应答和 T 细胞产生 IFN- γ ,单剂量菌影免疫可获得 86% 的保护率,而增加剂量可以到达 93%^[31]。兔和鼠动物实验显示多杀性巴氏杆菌菌影和溶血二氧化碳嗜纤维菌的菌影能诱导产生特异性抗体对其它巴斯德菌的血清型和野生型分离株有交叉保护作用。小鼠腹腔免疫巴氏杆菌菌影诱导完全免疫保护具有剂量依赖性^[32]。在牛体内溶血二氧化碳嗜纤维菌菌影比商品化疫苗能获得更好的免疫保护作用^[33]。

3.3 鱼类菌影疫苗

鱼类养殖业繁荣发展使得鱼类生存空间狭窄,最易受爱德华氏菌和弧菌感染,而连续使用抗生素会导致耐药菌产生和抗生素残留,因此发展鱼类疫苗刻不容缓。爱德华氏菌影疫苗是养殖鱼业领域设计和发展新型疫苗的代表,在罗非鱼分别腹膜内注射爱德华氏菌菌影和用福尔马林灭活的爱德华氏菌,结果显示菌影获得了更强的免疫保护^[34]。此外,鳗弧菌菌影研究以用于预防鱼类的弧菌病^[35]。使用减毒活鳗弧菌为菌影被用于设计一种新型的减毒鱼疫苗,已成功诱导抗弧菌的交叉保护性免疫。在这个新方法中,将携带裂解 E 基因的减毒鳗弧菌喂给鱼类,使 E 基因在鱼体内激活表达,裂解减毒细菌形成菌影。这种新型疫苗有两个主要优点:菌影技术保证减毒株无毒力回复;外源抗原在细胞质中表达或者外源抗原与主体病原菌外膜融合作为多价疫苗可诱导针对靶抗原和致病菌的免疫应答。大比目鱼腹腔注射非致病性活大肠杆菌多价疫苗,在

裂解基因 E 介导下目的抗原在体内释放并引起免疫应答。以这种疫苗免疫 30 天后,以嗜水气单胞菌 ISA34 攻击感染,大比目鱼存活率达 80% 以上^[19]。以上表明,菌影技术与活细菌载体联合应用,可开发新的疫苗类型。

4 展 望

在当前的疫苗开发里菌影替代了传统的灭活病毒和细菌的方法。菌影是一个新颖的、无生命的、高效的抗原和药物递送平台。虽然菌影作为抗原载体的研究近几年才开始,但是越来越多的学者开始关注这项技术,它已经显示出很好的潜力。相信在不久的将来,菌影将在疫苗研究中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Muhammad A, Champeimont J, Mayr UB, et al. Bacterial ghosts as carriers of protein subunit and DNA-encoded antigens for vaccine applications[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2012,11(1):97-116.
- [2] Lubitz P, Mayr UB, Lubitz W. Applications of bacterial ghosts in biomedicine[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009,655:159-170.
- [3] Riedmann EM, Kyd JM, Cripps AW, et al. Bacterial ghosts as adjuvant particles[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2007,6(2):241-253.
- [4] Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, et al. The Bacterial Ghost platform system: production and applications[J]. *Bioeng Bugs*, 2010,1(5):326-336.
- [5] Ekong EE, Okenu DN, Mania-Pramanik J, et al. A *Vibrio cholerae* ghost-based subunit vaccine induces cross-protective chlamydial immunity that is enhanced by CTA2B, the nontoxic derivative of cholera toxin[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2009,55(2):280-291.
- [6] Walcher P, Cui X, Arrow JA, et al. Bacterial ghosts as a delivery system for zona pellucida-2 fertility control vaccines for brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) [J]. *Vaccine*, 2008,26(52):6832-6838.
- [7] Eko FO, Okenu DN, Singh UP, et al. Evaluation of a broadly protective Chlamydia-cholera combination vaccine candidate[J]. *Vaccine*, 2011,29(21):3802-3810.
- [8] Langemann T. Process development for industrial scale bacterial ghost production[D]. Vienna: University of Vienna, 2011.
- [9] Ifere GO, He Q, Igietseme JU, et al. Immunogenicity and protection against genital Chlamydia infection and its complications by a multisubunit candidate vaccine[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2007,40(3):188-200.
- [10] Macmillan L, Ifere GO, He Q, et al. A recombinant multivalent combination vaccine protects against Chlamydia and genital herpes[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007,49(1):46-55.
- [11] Ramey K, Eko FO, Thompson WE, et al. Immunolocalization and challenge studies using a recombinant *Vibrio cholerae* ghost expressing *Trypanosoma brucei* Ca(2+) ATPase (TBCA2) antigen[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2009,81(3):407-415.
- [12] Riedmann EM, Lubitz W, McGrath J, et al. Effectiveness of engineering the nontypeable *Haemophilus influenzae* antigen Omp26 as an S-layer fusion in bacterial ghosts as a mucosal vaccine delivery[J]. *Hum Vaccin*, 2011,7(Suppl):99-107.
- [13] Paukner S, Kudela P, Kohl G, et al. DNA-loaded bacterial ghosts efficiently mediate reporter gene transfer and expression in macrophages[J]. *Mol Ther*, 2005,11(2):215-223.
- [14] Mayrhofer P, Tabrizi CA, Walcher P, et al. Immobilization of plasmid DNA in bacterial ghosts[J]. *J Control Release*, 2005,102(3):725-735.
- [15] Paukner S, Stiedl T, Kudela P, et al. Bacterial ghosts as a novel advanced targeting system for drug and DNA delivery[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006,3(1):11-22.
- [16] Felnerova D, Kudela P, Bizik J, et al. T cell-specific immune response induced by bacterial ghosts[J]. *Med Sci Monit*, 2004,10(10):BR362-370.
- [17] Jawale CV, Lee JH. Development of a biosafety enhanced and immunogenic salmonella enteritidis ghost using an antibiotic resistance gene free plasmid carrying a bacteriophage lysis system[J]. *PLoS One*, 2013,8(10):e78193.
- [18] Guan L, Mu W, Champeimont J, et al. Iron-regulated lysis of recombinant *Escherichia coli* in host releases protective antigen and confers biological containment[J]. *Infect Immun*, 2011,79(7):2608-2618.
- [19] Eko FO, Lubitz W, McMillan L, et al. Recombinant *Vibrio cholerae* ghosts as a delivery vehicle for vaccinating against Chlamydia trachomatis[J]. *Vaccine*, 2003,21(15):1694-1703.
- [20] Ekong EE, Okenu DN, Mania-Pramanik J, et al. A *Vibrio cholerae* ghost-based subunit vaccine induces cross-protective chlamydial immunity that is enhanced by CTA2B, the nontoxic derivative of cholera toxin[J].

- FEMS Immunol Med Microbiol,2009,55(2):280-291.
- [21] Eko FO,Ekong E,He Q,et al. Induction of immune memory by a multisubunit chlamydial vaccine[J]. Vaccine,2011,29(7):1472-1480.
- [22] Talebkhan Y,Bababeik M,Esmaeili M,et al. Helicobacter pylori bacterial ghost containing recombinant Omp18 as a putative vaccine[J]. J Microbiol Methods,2010,82(3):334-337.
- [23] Wen J,Yang Y,Zhao GY,et al. Salmonella typhi Ty21a bacterial ghost vector augments HIV-1 gp140 DNA vaccine-induced peripheral and mucosal antibody responses via TLR4 pathway [J]. Vaccine, 2012, 30 (39): 5733-5739.
- [24] Cai K,Zhang Y,Yang BY,et al. Yersinia enterocolitica ghost with msbB mutation provides protection and reduces proinflammatory cytokines in mice[J]. Vaccine, 2013,31(2):334-340.
- [25] Ebensen T,Paukner S,Link C,et al. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines[J]. J Immunol,2004,172(11):6858-6865.
- [26] Kudela P,Paukner S,Mayr UB,et al. Effective gene transfer to melanoma cells using bacterial ghosts[J]. Cancer Lett,2008,262(1):54-63.
- [27] Jalava K,Eko FO,Riedmann E,et al. Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery [J]. Expert Rev Vaccines,2003,2(1):45-51.
- [28] Kudela P,Koller VJ,Mayr UB,et al. Bacterial Ghosts as antigen and drug delivery system for ocular surface diseases;effective internalization of Bacterial Ghosts by human conjunctival epithelial cells[J]. J Biotechnol,2011,153(3-4):167-175.
- [29] Mayr UB,Kudela P,Atrasheuskaya A,et al. Rectal single dose immunization of mice with Escherichia coli O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge [J]. Microb Biotechnol,2012,5(2):283-294.
- [30] Sorochkina AI,Kovalchuk SI,Omarova EO,et al. Peptide-induced membrane leakage by lysine derivatives of gramicidin A in liposomes, planar bilayers, and erythrocytes [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1828 (11): 2428-2435.
- [31] Mayr UB,Haller C,Haidinger W,et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of Escherichia coli O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge[J]. Infect Immun,2005,73(8):4810-4817.
- [32] Marchart J,Dropmann G,Lechleitner S,et al. Pasteurella multocida-and Pasteurella haemolytica-ghosts: new vaccine candidates [J]. Vaccine, 2003, 21 (25-26): 3988-3997.
- [33] Marchart J,Rehagen M,Dropmann G,et al. Protective immunity against pasteurellosis in cattle,induced by Pasteurella haemolytica ghosts [J]. Vaccine,2003,21(13-14):1415-1422.
- [34] Kwon SR,Nam YK,Kim SK,et al. Protection of tilapia (Oreochromis mosambicus) from edwardsiellosis by vaccination with Edwardsiella tarda ghosts[J]. Fish Shellfish Immunol,2006,20(4):621-626.
- [35] Kwon SR,Kang YJ,Lee DJ,et al. Generation of Vibrio anguillarum ghost by coexpression of PhiX 174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene[J]. Mol Biotechnol,2009,42(2):154-159.

(此文编辑:蒋湘莲)