

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.04.11

细菌活载体疫苗的研究进展

倪志远, 蒋桃珍*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-02-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 04-0072-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 细菌活载体疫苗是指将某一病原体的特定抗原基因插入到细菌基因组或其质粒, 然后在其增殖过程中直接表达外源抗原或将携带的外源 DNA 递呈到宿主细胞的一类重组细菌。细菌活载体疫苗能够诱导机体产生粘膜免疫、体液免疫和细胞免疫, 是目前传染病预防控制、肿瘤免疫治疗、免疫调节等方面的重要研究方向之一。从细菌活载体疫苗的构建及应用两个方面进行介绍, 以期为细菌活载体疫苗的研究与应用提供参考。

[关键词] 细菌活载体疫苗; 免疫应答; 研究进展

Advances of Live Bacterial Vector Vaccine

NI Zhi-yuan, JIANG Tao-zhen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Tao-zhen, E-mail: taozhen_jiang@163.com

Abstract: The bacteria engineered to deliver plasmids or carry heterologous gene which were also called live bacterial vector could stimulate the host's broad-based immune system by expressing heterologous antigen, while still offering good levels of safety. The live bacterial vector vaccines which have become a trend in the development of biological products industry are promising candidates for plague prevention and tumor immunotherapy. Genetic technologies are evolving, which potentiate the development of the live bacterial vector vaccines. There is a brief overview of the construction, characteristics and the research status of live bacterial vaccine vector.

Key words: live bacterial vector vaccine; immune response; research status

疫苗是预防和控制传染病的最有效和最经济的技术手段。通过采用疫苗进行免疫接种, 全球已经消灭了天花、牛瘟等重要人和动物传染病。DNA 重组技术的出现和快速发展, 为基因工程疫苗的研究提供了良好的技术平台。目前以细菌和病毒为载体, 构建表达特定目的蛋白的活载体疫苗已成为

疫苗研究的热点之一。

1980 年 Schaffnerr 研究发现 SV40 DNA 可以直接通过细菌转移到哺乳动物细胞, 这一发现为细菌活载体疫苗的研究奠定了基础^[1]。细菌载体疫苗是利用基因工程技术将目的 DNA 质粒或保护性抗原核酸片段插入到细菌基因组或质粒, 通过细菌自

作者简介: 倪志远, 硕士研究生, 从事兽医微生物及免疫学研究。

通讯作者: 蒋桃珍。E-mail: taozhen_jiang@163.com

然感染将其运输到靶细胞、组织和器官后,诱导机体对特定病原产生有效的免疫应答反应。利用一些细菌如沙门菌、乳酸杆菌等构建的活载体活疫苗,可以通过口服和鼻内等途径进行接种,从而诱导粘膜免疫,这对于通过呼吸道感染或肠道感染疾病的预防是非常有效的^[2]。此外,相比病毒活载体疫苗,细菌活载体疫苗的生产成本低,生产工艺简单且利于纯化,这也是近些年细菌活载体疫苗研究成为热点的重要原因之一。

1 细菌活载体疫苗的构建及表达系统的类别

目前,细菌活载体疫苗构建的方式主要分为两种,一种是将外源基因整合到细菌染色体,另一种是将外源基因整合到细菌质粒中。染色体整合是将细菌某段非必须基因组敲除后替换为目的基因,或直接插入表达外源抗原的表达盒,这种构建方式可以保证异源基因的稳定性^[3]。另一种方式是将外源基因插入到细菌质粒中,利用细菌质粒的表达元件表达目的抗原,诱导机体产生免疫反应。一般而言,由构建的载体细菌直接表达外源基因从而刺激宿主免疫反应的载体系统称为原核表达系统,而由构建的载体细菌将外源基因传递至宿主细胞,由宿主细胞表达外源基因从而刺激宿主免疫反应的称为真核表达系统^[4]。

1.1 原核表达系统 在细菌原核表达系统中,细菌自身产生外源抗原运输至抗原提呈细胞,外源抗原可以在细菌内合成,也可以通过表面展示和分泌系统运出细菌^[5]。细菌表达外源抗原要克服基因组稳定性和免疫原性两个方面的挑战。在防止目的抗原丢失、无质粒细菌过度生长的众多构建策略中,平衡致死系统是最为经典的方法:即敲除或突变细菌活载体的复制必须基因,使携带的质粒能够编码细菌复制必须蛋白,导致无质粒或少质粒的子代细菌无法正常代谢而死亡。例如弱毒鼠伤寒沙门氏菌的 *asd* 基因编码 β -半醛脱氢酶,该酶不仅与氨基酸的合成有关,还介导了细胞壁的合成,因此敲除细菌 *asd* 基因后,构建含有编码 *asd* 基因的质粒,这样存活的后代鼠伤寒沙门氏菌就都携带

质粒^[6],确保外源基因的稳定性和有效表达。

合适的启动子是调控表达效率、诱导足够免疫应答的关键点。Hohmann 发现利用组成型启动子构建的鼠伤寒沙门氏菌载体虽然能高水平的表达外源抗原,但表达的抗原不能诱导产生足够的免疫保护;而诱导型启动子 *P_{pagc}* 使细菌被巨噬细胞吞噬后才可表达大量抗原,并诱导产生足够的免疫保护^[7]。分析其原因,是因为组成型启动子在表达大量外源抗原时,增加了细菌代谢负担从而降低了免疫原性。因此构建的细菌的特征应是在最初免疫时尽可能减少外源抗原的表达量,而在细菌定植和诱发免疫应答时最大化表达外源抗原^[8]。

细菌分泌系统和表面展示也是较为广泛使用的两种技术手段。Kang 和 Curtiss 将肺炎克雷伯菌 *PspA* 基因与沙门氏菌 β -lactamase 的分泌信号整合,构建了可以分泌 *PspA* 的沙门氏菌活载体疫苗,该菌株诱导的体液免疫比非分泌型 *PspA* 的菌株强 1 万倍^[9]。细菌表面展示是用基因重组方法将外源蛋白表达于细菌表面,将外源抗原基因与编码外膜蛋白的基因如 *OmpA*, *LamB* 融合,产生的融合蛋白定位在细胞膜外刺激并增强机体免疫应答。此外,将刺激免疫反应的一些细胞因子和外源抗原共表达也可提高细菌活载体的免疫原性。

1.2 真核表达系统 具有侵袭性的载体细菌进入宿主靶细胞后菌体裂解,质粒释放到胞质内,释放的质粒通过真核细胞的转录和翻译机制表达目的蛋白并经修饰、折叠,从而刺激机体产生免疫反应。该类细菌载体疫苗的作用机理类似 DNA 疫苗,但克服了 DNA 疫苗接种剂量大,免疫原性差,质粒生产成本较高等缺点^[10],而且细菌活载体还可以特异性的被抗原提呈细胞识别,加工,诱导比 DNA 疫苗作用更持久有效的免疫保护^[11]。鼠伤寒沙门氏菌、志贺氏菌、产单核细胞李氏杆菌等均可以将其携带的真核表达质粒转运至真核细胞内。但到目前为止,通过细菌活载体运输质粒的机制尚未研究清楚,推测可能与细菌侵染特性有关。

细菌载体质粒一般由真核表达框和载体骨架

两个部分组成,表达框包含启动子、多克隆位点、5'UTR和 Poly A;骨架包含复制起始位点 Ori、抗生素抗性基因或其他选择性标志基因。可通过优化真核表达框元件和精简载体骨架来提高质粒的稳定性和安全性^[12]。真核表达系统中,能在宿主细胞内高效表达蛋白的启动子起着至关重要的作用,CMV、SV40 和鼠白血病病毒启动子是真核表达常用的启动子。Zhi-Li Xu 研究发现 CMV 增强子,启动子和含有 intron A 的 5'UTR 联用可以在体内和体外诱导高水平的基因表达^[13];Garg 研究发现 CMV 增强子与 β -actin 启动子,WPRE 等元件联合组成杂合启动子能表达更高水平的 HA 蛋白,诱发强烈的免疫保护反应^[14]。一些非病毒启动子也能有效表达抗原基因,Kos 利用胶原启动子在皮肤细胞特异性表达 IL-12^[15]。大肠杆菌 Ori ColE1 作为 pUC 载体的 OriV,也一直是 DNA 疫苗起始位点的良好选择,可以使质粒在细菌内有 500~700 的拷贝数^[16]。Poly A 对基因的表达也有很大的影响,DNA 疫苗常使用的 Poly A 序列包括 SV40,兔 β -globin 和牛生长激素的 Poly A 序列^[17]。由于使用抗性基因作为选择标志可能会导致抗性基因的传播和宿主微生物种群的改变,欧洲药品管理局(MEA)推荐选择抗生素抗性基因以外的标志基因来降低生物安全风险,目前已有营养缺陷性菌株,毒素-抗毒素系统,RNA 标记和 ORT 系统来用于替代抗生素抗性标志基因,并取得了较好的进展^[18]。

2 细菌活载体疫苗研究进展

用于载体疫苗研究的细菌有多种,主要包括沙门氏菌、产单核细胞李氏杆菌、乳酸菌、百日咳波氏杆菌、枯草芽孢杆菌等,利用这些细菌构建的多种载体疫苗已进入临床试验阶段,其中用百日咳波氏杆菌构建的表达 EV71 病毒 SP70 的载体疫苗,用于酪乳酸杆菌以及产单核细胞李氏杆菌表达的人乳头瘤病毒 E7 蛋白的载体疫苗等已进入了一期临床实验。

2.1 沙门氏菌活载体疫苗 沙门氏菌是兼性胞内寄生菌,属于革兰氏阴性菌,因其可通过化学突变

或基因工程方法进行减毒或致弱,是目前研究最多的细菌载体之一。减毒沙门氏菌作为活载体时,以口服或鼻腔途径进行免疫,可通过自然感染模式将目的抗原蛋白或携带的目的抗原质粒运送到宿主细胞内,诱导机体产生免疫反应。Xu 利用亚硝基胍诱导伤寒沙门氏菌非定点突变得到了 Ty21a 血清型变异株,并构建了表达痢疾志贺菌 O-Ps 的载体疫苗,疫苗通过腹膜内接种小鼠后,可以检测到抗痢疾志贺菌的 IgG,攻毒后小鼠存活率达 100%^[19],该疫苗已进入临床前实验;Bumann 利用 Ty21a 株构建了表达铜绿假单胞菌 OprF-OprI 的载体疫苗,人通过口服或鼻腔接种后可检测到高水平抗铜绿假单胞菌的 IgG 和 IgA^[20],该疫苗已进入一期临床实验;Aebischer 利用 Ty21a 株构建了表达幽门螺杆菌抗原的载体疫苗,通过口服接种后有 69% 志愿者检测到特异性辅助 T 细胞,该疫苗已进入一期临床实验^[21]。

在所有细菌活载体疫苗研究中,沙门氏菌的研究是最广泛深入的。国内学者构建了多种用于动物疫病预防的沙门氏菌活载体疫苗。陈凯构建了表达肠炎沙门氏菌 SEF14 菌毛的重组减毒禽伤寒沙门氏菌 SG9R(pYA3342-sef),鸡经两次免疫后可检测到高水平的 IgG,攻毒后免疫组鸡组织病变显著低于对照组^[22]。鲜思美将鸭瘟病毒(DEV) gB/NP28 基因插入到真核表达质粒 pcDNA3.1 后转化到减毒沙门氏菌,口服免疫雏鸭后,用强毒攻击可提供 75% 以上的保护^[23]。王君耀构建了表达旋毛虫 43 ku ES 蛋白的重组减毒沙门氏菌,口服免疫小鼠后可刺激脾脏和肠系膜淋巴结的增殖,产生较高水平的抗体和细胞因子,攻毒后免疫小鼠体内旋毛虫数量显著减少^[24]。

2.2 乳酸菌活载体疫苗 乳酸菌是一种非致病菌,广泛用于食品工业,是目前认为最安全的细菌载体之一。许多研究表明乳酸球菌可以将 DNA 质粒递送到宿主细胞内^[25]。也有研究报道,将金黄色葡萄球菌的纤连蛋白结合蛋白 A 基因或产单核细胞李氏杆菌的内化蛋白 A 基因整合到乳酸菌的

基因组后,可增加其对宿主细胞的侵袭性^[26],同时可提高其递送 DNA 的能力。此外,也有研究表明某些种类的乳酸杆菌显示出与巨噬细胞活化有关的非特异性佐剂效应^[27]。Adachi 采用干酪乳酸杆菌构建的表达 HPV E7 蛋白的载体疫苗通过口服、皮内和肌肉途径免疫小鼠后利用流式细胞技术和 ELISPOT 等技术进行分析,发现可诱导产生有效的粘膜免疫应答^[28]。Ramasamy 利用乳酸乳球菌构建的表达恶性疟原虫 MSA2 的载体疫苗,通过口服和鼻腔途径接种兔后,利用 IFA 检测到有效的免疫反应,其中口服后血清中的抗体水平更高^[29]。但乳酸菌在体内定植时间较短,无法诱发足够稳定的免疫保护,基础研究不足等问题也制约着乳酸菌活载体疫苗的研究进程^[30]。

3 展 望

通过近二十年的研究,细菌活载体疫苗已经取得了一定的进展,研制的许多细菌载体疫苗已被临床试验证明有效。此外,细菌活载体作为 DNA 疫苗、肿瘤疫苗或某些细胞因子的递呈系统有着明显优势,沙门氏菌等肠道菌群对肠粘膜的树突状细胞和巨噬细胞有天然的趋向性,可以诱导包括粘膜免疫在内的较为广泛的免疫应答^[31]。同时细菌载体某些成分如革兰氏阴性菌的脂多糖和革兰氏阳性菌的脂磷壁酸能够刺激机体产生炎性细胞因子,使之发挥佐剂的作用,诱导产生较强的免疫应答^[32]。

细菌活载体疫苗研究目前所面临的挑战主要包括两个方面:一方面是如何使其诱发更持久有效的免疫保护,在保证免疫效力的同时如何提高活载体的稳定性^[33];另一方面是临床应用的安全性,如其对环境潜在的安全隐患,毒力返强可能对宿主造成的健康危害,细菌耐药性的公共卫生风险等问题^[34]。与病毒活载体疫苗不同,虽然很多细菌活载体疫苗已进入临床试验阶段,但是至今仍然没有商品化的细菌活载体疫苗。因此,筛选更合适的细菌活载体,构建更安全的表达系统,研发新的免疫策略,将是今后可商品化应用的细菌活载体疫苗研究的重点方向。

参考文献:

- [1] Schaffner W. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells[J]. C R Acad Sci USA, 1980, 77: 2163-2167.
- [2] Da Silva A J, Zangirolami T C, Novo-Mansur, *et al.* Live bacterial vaccine vectors: An overview[J]. Braz J Microbiol, 2014, 45: 1117-1129.
- [3] Hussein M I, Curtiss R. Evaluation of Salmonella live vaccines with chromosomal expression cassettes for translocated fusion proteins[J]. Vaccine, 2009, 27: 3780-3787.
- [4] Celec P. Gene therapy using bacterial vectors[J]. Front Biosci, 2017, 22: 4473.
- [5] Chengchao D, Junfei M, Qingli D, *et al.* Live bacterial vaccine vector and delivery strategies of heterologous antigen: A review[J]. Immunology Letters, 2018, 197: 70-77.
- [6] Galan J E, Nakayama K, Curtiss R, *et al.* Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: Use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains[J]. Gene, 1990, 94: 29-35.
- [7] Hohmann E L, Oletta C A, Loomis W P, *et al.* Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 2904-2908.
- [8] Wang S, Li Y, Shi H, *et al.* Comparison of a regulated delayed antigen synthesis system with *in vivo*-inducible promoters for antigen delivery by live attenuated *Salmonella* vaccine[J]. Infect Immun, 2011, 79: 937-949.
- [9] Kang H Y, Curtiss R. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 37: 99-104.
- [10] Becker P D, Noerder M, Guzman C A. Genetic immunization: Bacteria as DNA vaccine delivery vehicles[J]. Human Vaccine, 2016, 4(3): 189-202.
- [11] Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity[J]. Nat Immunol, 2004, 5: 971-974.
- [12] Williams J. Vector Design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production[J]. Vaccines, 2013, 1: 225-249.
- [13] Zhi-Li Xu, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, *et al.* Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors[J]. Gene, 2001, 272: 149-156.
- [14] Garg S, Tesic N, Kamensek U, *et al.* The hybrid cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter along with wood chuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances the

- protective efficacy of DNA vaccines[J]. Immunol, 2004, 173: 550-558.
- [15] Kos S, Tesic N, Kamansek U, *et al.* Improved specificity of gene electrotransfer to skin using pDNA Under the control of collagen tissue-specific promoter[J]. Membr Biol, 2015, 248: 919-928.
 - [16] Montgomery D L, Prather K J. Design of palmsid DNA constructs for vaccines[J]. Methods Mol Med, 2006, 127: 11-22.
 - [17] Ertl P F, Thomsen L L. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines[J]. Methods, 2003, 31: 199-206.
 - [18] Vandermeulen G, Marie C, Scherman D, *et al.* New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trails[J]. Mol Ther, 2011, 19: 1942-1949.
 - [19] Xu D Q, Cisar J O, Osorio M, *et al.* Corelinked LPS expression of Shigella dysenteriae serotype 1 O-antigen in live *Salmonella typhi* vaccine vector Ty21a: Preclinical evidence of immunogenicity and protection[J]. Vaccine, 2007, 25: 6167-6175.
 - [20] Bumann D, Berhre C, Behre K, *et al.* Systemic, nasal and oral live vaccines against *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical trial of immunogenicity in lower airways of human volunterrs[J]. Vaccine, 2010, 28: 707-713.
 - [21] Aebischer T, Bumann D, Eppele H J, *et al.* Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunterrs challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines[J]. Gut, 2008, 57: 1065-1072.
 - [22] 陈凯, 孟霞, 朱国强. 表达肠炎沙门氏菌 SEF14 菌毛的减毒鸡伤寒沙门氏菌重组疫苗的构建及免疫保护研究[D]. 扬州大学, 2017: 1-71.
Chen K, Meng X, Zhu G Q. Construction and immunoprotein evalutiaon of orally attenuated recombinant *Salmonella gallinarum* vaccine expressing SEF14 fimbriae of *Salmonella enteritidis*[D]. Yangzhou University, 2017: 1-71.
 - [23] 鲜思美, 李婷, 冯将, 等. 携带 DEV-gB/NP28 重组减毒沙门氏菌诱导鸭的免疫应答研究[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 4: 330-335.
Xian S M, Li T, Feng J, *et al.* Study on the immune response of ducks induced by recombinant attenuated *Salmonella* carrying DEV-gB/NP28[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 4: 330-335.
 - [24] 王君耀, 杨桂连. 旋毛虫 ES 抗原 43ku 基因重组减毒沙门氏菌构建及其免疫保护效果评价[D]. 东北农业大学, 2017: 1-47.
Wang J Y, Yang G L. Construction of attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Trichinella spiralis* ES antigen 43ku gene and its evalution of immune protective effects[D]. Northeast Agricultural University, 2017: 1-47.
 - [25] Chatel J M, Pothelune L, Ah-Leung, *et al.* In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting *Lactococci* to murine epithelial cells[J]. Gene Ther, 2008, 15: 1184-1190.
 - [26] Valentina Yurina. Live bacterial vectors - A promising DNA vaccine delivery system[J]. Med Sci, 2018, 6(27): 1-12.
 - [27] Perdigon G, de Macias M E, Alvarez S, *et al.* Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobalillus acidophilus*[J]. Immunology, 1988, 63: 17-23.
 - [28] Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, *et al.* Oral immunization with a *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7[J]. Vaccine, 2010, 28: 2810-2817.
 - [29] Ramasamy R, Yasawadena S, Zomer A, *et al.* Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunisations[J]. Vaccine, 2006, 24: 3900-3908.
 - [30] 曹海鹏, 王红宁, 张安云, 等. 乳酸菌活载体疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9): 258-264.
Cao H P, Wang H N, Zhang A Y, *et al.* Research progress of lactic acid bacteria as live vaccine vehicle[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(9): 258-264.
 - [31] Mohaed T S, Stevceva L, Agwale S, *et al.* Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors[J]. Molecular Medicine Today, 2000, 6: 66-71.
 - [32] Janeway C A, Medzhitov R. Innate immune recognition[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 197-216.
 - [33] Medina E, Guzman C A. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: Potential and limitations[J]. Vaccine, 2001, 19: 1573-1580.
 - [34] Ivan Y C, HaoVan T T, Smooker P. Live-attenuated bacterial vectors: Tools for vaccine and therapeutic agent delivery[J]. Vaccines, 2015, 3: 940-972.

(编辑:李文平)