

肠毒素性大肠杆菌疫苗的研制进展

应天翼 韩照中 苏国富 RS1 B

细菌性腹泻是常见的肠道传染病,广泛流行于世界各地。据统计,全球年腹泻病人达 30 亿左右,我国年发病约 8 亿多人次,死亡率达 0.02%,其中最常见的是由肠毒素性大肠杆菌(Enterotoxigenic *escherichia coli*, ETEC)引起的腹泻^[1]。由于是经口传播,所以常因食品或水源污染导致爆发性流行,特别是在自然灾害和战争时期更不易避免和控制,同时由于滥用抗菌药物而导致有耐药性细菌的大量增长,所以研制有效的疫苗加强免疫预防是迫切需要解决的公共卫生问题,但是目前还没有一种行之有效的 ETEC 疫苗^[2-7]。

一、ETEC 的定居因子

ETEC 是通过一种叫作定居因子(colonization factors, CFs)的蛋白表面结构黏附到上皮细胞表面,之后可单独或同时分泌不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)与耐热肠毒素(heat-stable enterotoxin, ST)。在全世界范围内分离出的 ETEC 菌株中,大约 35% 分泌 LT 和 ST,约 35% 只分泌 ST,其余的仅分泌 LT。

通过流行病学研究证明并非所有的 ETEC 菌株都含有 CFs,CFs 在 ETEC 中的分布也呈现出一定的特异性。在同时产 ST 与 LT 的菌株中约有 90% 都表达现在已知的 CFs,而在单纯分泌 ST 或 LT 的菌株中表达已知 CFs 的菌株数量则分别占 60% 和 10%。在现今已知的人类 ETEC 的 20 种 CFs^[8]中特征最鲜明且研究最多的是定居因子抗原 I (colonization factor antigen I, CFA/I)和菌毛表面抗原 1~6 (coli surface antigens 1~6, CS1~CS6),而同时流行病学研究显示出在世界的不同地区,ETEC 所含 CFs 的种类也不尽相同。在我们最关心的亚洲地区,同时表达 ST 与 LT 的菌株占大多数^[9]。由于将来预防 ETEC 腹泻的疫苗中所含的抗原将是在人群中出现频率最高的一种或几种 CFs,所以还有必要进一步搞清楚关于世界各地流行的 ETEC 所含 CFs 种类的详细情况。

1. CFs 的受体与黏附:ETEC CFs 结合的受体分子是一种复合糖。由于不同的 CFs 需要不同的结合位点,所以病原性大肠杆菌对宿主和组织有着显著的选择性,例如动物 ETEC 所含重要的 CFs 并不存在于感染人类的 ETEC 中。尽管已有许多文献报道了人类 ETEC 如何黏附到红细胞及肠细胞,但是由于无法获得有效的人体肠道模型,所以对于结合位点的结构了解得远不如对动物 ETEC 清楚。

2. 人源 ETEC 的 CFs 结构:基于形态学分类,在人类 ETEC 中已发现 20 种不同的 CFs,分为菌毛与原纤维丝两种,菌毛类如 CFA/I、CS1 是呈致密、发丝状、纤维状细胞器,由几百个同样的蛋白亚基构成,这种蛋白决定了菌毛的免疫学特性。纤维类如 CS3 和 CS7 菌毛,由两条纤维缠绕成双螺旋。原纤维丝更细,更具柔韧性且结构更开放,它每一个螺旋中的亚基数目比菌毛要少。

3. CFs 的分类:在已发现的 20 种 CFs 中,CFA/I、CS1、CS2、CS4、CS14、CS17 和 CS19 这一组菌毛,由于具有一定的遗传相关性^[8],所以被称为 CFA/I 样组。它们主要亚基的氨基酸序列非常相似,这些菌毛可能是由于宿主的免疫压力进化而来的。免疫学研究显示,这一组中 CFA/I 与 CS4 亲缘关系最近,其次是 CS14、CS1、CS17,而 CS2 与 CFA/I 的差别最大。

CS5、CS13、CS18、CS20 被称作“CS5 组”,它们的亚基氨基酸序列与动物 ETEC 的 K88、F41 或 987P 菌毛有遗传相似性,CS7 可能也属于这一组,因为 CS7 与 CS5 有同样的亚基大小、螺旋结构和红细胞凝集形式。CS7 与 CS5 亚基在蛋白质印迹反应中有交叉反应,且它们最前面的 20 个 N-端氨基酸是一致的。另外,还有一组 CFs,其中包括 CS3、CS6、CS10、CS11、CS12,它们与已知的任何菌毛都不同源。

二、ETEC 疫苗

鉴于 CFs 在 ETEC 病理学中的关键性地位,用 CFs 作为人用 ETEC 疫苗抗原的可能性已经引起人们的极大关注。尽管已经鉴定出 20 种不同的 CFs,但可在 50%~80% 的临床分离出的 ETEC 中找到大约 7 种常见的 CFs(CFA/I, CS1, CS2, CS3 复合物,CS4, CS5, CS6 复合物)。动物及志愿者实验表明:CFs 对表达同源 CFs 的大肠杆菌感染具有高效保护性^[10],CFs 还可以协同 ETEC 毒素抗原对 ETEC 表达的毒素及同源 CFs 提供保护。所以如果选择包括 CFA/I 和 CS1~CS6 中的一种或几种作抗原,再结合一定的类毒素,在理论上这样的候选株可以对世界范围内的 80% 以上 ETEC 菌株提供保护,如果再加上一些出现频率较低的菌毛抗原(如 CS12, CS14, CS17),并配以合适的载体菌^[11],则将大大提高保护能力。

1. 亚单位疫苗:在 80 年代初期曾试图以纯化的 CFs 蛋白为口服免疫原来对抗表达各种同源 CFs 的 ETEC 侵袭,但结果是令人沮丧的,因为经分离纯化的菌毛蛋白在肠分泌物中很容易被蛋白酶降解。当时也曾作过其他尝试,包括直接将菌毛送至小肠或给它们包上一层可生物降解的荚膜,尽管

作者单位:100071 北京生物工程研究所四室
第一作者现工作单位:102205 北京药物化学研究所二室

有半数带荚膜的疫苗诱导了针对 CFs 的黏膜免疫,但对表达同源 CFs 的 ETEC 菌株攻击还是无法提供显著的保护。另外,分离纯化菌毛费用昂贵,所以,注意力开始转向能够提供表面 CFs 的灭活或者活的全菌疫苗。

2. 灭活疫苗:由于 ETEC 引起的疾病与小肠密切相关,于是有观点认为最重要的抗体将是在肠道内诱发的抗体。于是,评价不同 ETEC 疫苗时最关键的是看它在肠道内诱发的免疫应答效价如何。有一种疫苗,它包含福尔马林灭活的表达 CFA/I 与 CFA/II 的 ETEC,疫苗给人服用后,产生针对 CFA/I 与 CFA/II 的分泌型 IgA 抗体的抗体分泌细胞(antibody secreting cells, ASC)应答最高,居中的是 IgM-ASC,最低的是 IgG-ASC。另外还测出了疫苗特异性的 T 细胞免疫应答。众多结果显示,灭活的全菌疫苗(whole cell vaccine, WCV)所保持的全菌结构对于诱导强烈的免疫应答是非常重要的,它与毒素有明显的辅助协同效应。

由于霍乱毒素(CT)与 LT 结构类似,其 B 亚基之间有免疫交叉反应,已有实验证明霍乱毒素 B 亚基(CTB)可对大肠杆菌疾病提供高效保护,所以现在普遍认为一个可行的办法是用基因工程手段制备携带有 CTB 基因、用福尔马林灭活的、表面表达多数流行 CFs 的 ETEC 联合疫苗。这种 ETEC 疫苗在不同国家内(如瑞典、美国、孟加拉和埃及)进行了广泛的一期和二期临床实验。结果表明,70%~90% 的用 CTB-CFA ETEC 疫苗免疫过的瑞典志愿者中,IgA 呈显著增多。

总的来说,口服灭活菌体疫苗方便、安全,但用量偏大,费用稍高,且不如胃肠道外疫苗效果好。此外,它对菌株和灭活方式的选择很讲究,而诸如福尔马林、酚、大肠菌素 E2 或加热等灭活方式可能会破坏菌体表面重要的不稳定抗原^[12]。

3. 基因工程活菌疫苗:口服活菌疫苗是用细菌作为活载体来延长在小肠内相关的淋巴组织驻留时间并表达不同的 CFs 和类毒素抗原,这些载体允许在一剂疫苗中存在多种抗原。另外由于口服疫苗成本低廉、贮存稳定性好、便于调配,产生的免疫刺激与病原菌最为接近,所以采用基因工程手段,以 ETEC 菌毛作为抗原,以细菌为载体构建口服活菌疫苗开始引起普遍关注。现在进行的研究大都是以减毒伤寒沙门氏菌、减毒志贺痢疾菌和减毒霍乱弧菌为载体,但最为引起重视的是减毒伤寒沙门氏菌^[13]。

从某种意义上可以说,前人的失败应部分归因于采用肠道途径免疫而没有刺激相应的黏膜免疫^[14]。而减毒伤寒沙门氏菌的特点就在于它保持了抗原性,可以刺激机体相应区域产生黏膜免疫^[15]。黏膜组织自有一套独特的免疫系统,独立于一般的免疫系统之外发挥保护作用^[16]。黏膜免疫过程中派伊尔节(Peyer's patches, PP)的作用是独特且关键的,将 PP 作为靶部位是非常重要的。相比之下,用大肠杆菌则不能在血清及黏膜诱导有效的抗体应答。换句话说,活菌载体倾向于进入或瞄准黏膜诱发部位并可有效地刺激 T

细胞及 B 细胞免疫应答。现在一些证据表明可以用伤寒沙门氏菌作为载体将 ETEC 的 CFA/I 菌毛运送至体内脏器相关的淋巴器官刺激黏膜免疫,并诱生了针对 CFA/I 的 IgA 和 IgG^[17]。

口服活菌疫苗存在的最大问题是如何确保其稳定无毒(因为利用突变手段制备的菌体很容易产生回复突变而恢复其毒性),以及没有反应原性(或可耐受的反应原性)。Ascon 等^[18]利用平衡致死系统构建了能够稳定表达 CFA/I 及 K99、K88 等菌毛的疫苗,他们用 BALB/c 和 CD-1 小鼠实验的结果显示口服免疫这种疫苗可以很好地诱导 IgA 及 IgG 的应答。目前国内也正在大量使用平衡致死系统构建多种活菌疫苗。

4. 其他新型疫苗:在分子生物学高速发展的今天,除了上述用传统方法制备的各种疫苗外,还有许多新思路与新方法正在处于探索中。例如 Freedman 等^[19]用纯化浓缩的 CFAs 免疫奶牛,而后从牛奶中浓缩 IgG 给志愿者口服。15 名志愿者接受口服 10^9 cfu 剂量表达 CFA/I 的 ETEC 菌株攻击,只有 1 人发病,在服用安慰剂的 10 人中有 7 人发病。

用转基因植物作为抗 ETEC 的疫苗,让马铃薯表达 LT-B 基因,用这些块茎来喂小鼠,在小鼠体内可诱导 IgA 与 IgG,当用 LT 对小鼠进行攻击时,发现可提供一定程度的保护^[20]。由此可见,植物表达的 LT-B 有抵抗 ETEC 与霍乱的能力。最近的实验结果显示,植物表达的 CT-B 可以刺激小鼠体内产生抗体来中和毒素^[21]。

最近几年新兴的核酸疫苗对传统疫苗已经构成了一种挑战,它克服了减毒、灭活疫苗的潜在致病性和亚单位疫苗免疫反应的不完全性等缺点,可表达经修饰的天然抗原,诱导机体产生全面的免疫应答,适于制备多价苗,既可预防,又能治疗,一次免疫剂量即可产生有效的免疫反应,此外它还具有生产简便、成本低廉、稳定性好、贮运方便等优点^[22]。Alves 等^[23]将编码 ETEC CFA/I 菌毛的基因克隆于真核表达载体,并用作 DNA 疫苗进行免疫,发现在注射 DNA 后的 2~4 周之间 CFA/I 特异性 IgG 水平有明显增高,而且在 7 周后仍然有升高的迹象,但是他们发现 CFA/I 特异性表达质粒所诱导出来的抗体与完整的 CFA/I 菌毛上暴露在表面的抗原决定簇的反应有别于用那些纯化的 CFA/I 菌毛产生的抗体。DNA 免疫所产生的抗体与那些用菌毛免疫产生的抗体在功能上也有所区别,究其原因是由于它们在菌毛表面的结合位点不一样所造成的,具体的机理尚未搞清楚,不过可能的原因是由于两种抗原的表达方式不同,这个问题至今仍难以解决^[24]。

三、小结

最后应该指出的是,尽管关于大肠杆菌的定居因子人们已经了解得很多,但是这方面工作比预想的复杂得多,主要原因是菌毛抗原有许多型,而每一型内又有血清学的变异,加上抗原性的漂移以及还有一些迄今为止所未知的定居因子抗原,所以这方面的工作仍然有待于进一步的深入。

综上所述可以看出,随着转基因动物、转基因植物和核酸疫苗等新技术的逐渐趋于成熟,对黏膜免疫机理、功能抗原确定和高效表达体系的进一步深入研究,合适的用于疫苗效果评价的动物模型的建立,相信在不久的将来会有一批预防 ETEC 感染的新型高效疫苗为人类造福。

参 考 文 献

- 1 阮力,主编. 新型疫苗研究的现状与展望. 北京: 科学出版社, 1992. 171-183.
- 2 Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, 1992, 257: 1050-1055.
- 3 Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 1992, 257: 1064-1073.
- 4 Wilson ME. Travel and the emergence of infectious disease. *Emerg Infect Dis*, 1995, 1: 39-46.
- 5 Hughes JM, Tenover FC. Approaches to limiting emergence of antimicrobial resistance in bacteria in human populations. *Clin Infect Dis*, 1997, 24(suppl 1): s131-s135.
- 6 Black RE. Epidemiology of travelers' diarrhea. *Rev Infect Dis*, 1990, 12(suppl 1): s73-s79.
- 7 Gorbach S, Edelman R. Travelers' diarrhea: national institutes of health consensus development conference. *Rev Infect Dis*, 1986, 8 (suppl 2): s227-s233.
- 8 Gastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol*, 1996, 4: 444-453.
- 9 Serichantalergs O, Nirdnoy W, Cravioto A, et al. Coli surface antigens associated with Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from persons with traveler's diarrhea in asia. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1639-1641.
- 10 Svennerholm AM, Wenneras C, Holmgren J. Roles of different coli surface antigens of colonization factor antigen II in colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits. *Infect Immun*, 1990, 58: 341-346.
- 11 Cardenas L, Clements JD. Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine*, 1993, 11: 126-135.
- 12 雷祥荣,主编. 细菌毒素分子生物学. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 24-33.
- 13 Hormaeche CE, Khan CM, Villarreal B, et al. *Salmonella* vaccines: Mechanisms of immunity and their use as carriers of recombinant antigens. In: Ala' Aldeen AA, Hormaeche CE eds.

Molecular and Clinical Aspects of Bacterial Vaccine Development, Chichester: John Wiley & Sons, 1995. 155-178.

- 14 Edelman R, Russell RG, Losonsky G, et al. Immunization of rabbits with enterotoxigenic *E. Coli* colonization factor antigen (CFA/I) encapsulated in biodegradable microspheres of poly (lactide-co-glycolide). *Vaccine*, 1993, 11: 155-158.
- 15 Galan JE, Nakayama K, Curtiss R. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*; use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine. *Gene*, 1990, 94: 29-35.
- 16 Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, et al. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiol*, 1992, 184: 157-179.
- 17 Wu S, Pascual DW, Vancott JL, et al. Immune response to novel *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* vectors that express colonization factor antigen I (CFA/I) of enterotoxigenic *E. Coli* in the absence of the CFA/I positive regulator *cfuR*. *Infect Immun*, 1995, 63: 4933-4938.
- 18 Aason MA, Hone DM, Walters N, et al. Oral immunization with a *Salmonella typhimurium* vaccine vector expressing recombinant Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbriae elicits elevated antibody titers for protective immunity. *Infect Immun*, 1998, 66: 5477-5484.
- 19 Freedman DJ, Tacket CO, Delehanty A, et al. Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 1998, 177: 662-667.
- 20 Mason HS, Haq TA, Clements JD, et al. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin(LT); potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, 1998, 16: 1336-1343.
- 21 Arakawa T, Chong DK, Langridge WH. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 292-297.
- 22 孙树汉,主编. 核酸疫苗. 上海: 第二军医大学出版社, 2000. 1-6.
- 23 Alves AM, Lasaro MO, Almeida DF, et al. Epitope specificity of antibodies raised against enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I fimbriae in mice immunized with naked DNA. *Vaccine*, 1998, 16: 9-15.
- 24 Pardoll DM, Beckerleg AM. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity*, 1995, 3: 165-169.

(收稿日期: 2001-01-30)

(本文编辑: 尹廉)

· 出版信息 ·

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊, 主要刊登药理学研究论文, 多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖, 被国家权威机构认定为医学类、药理学类核心期刊, 并被几乎所有国内检索期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。1997 年曾名列美国《CA》收录的中国医药期刊第 1 名。

《中国药理学通报》为双月刊, 大 16 开 120 页, 印刷质量高, 每期定价 12.00 元, 全年 72.00 元。邮发代号: 26-52, 请及时向当地邮局订阅, 漏订读者请直接汇款至我刊编辑部, 免收邮费。地址: 安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部, 邮编: 230032, 联系人: 武明静。电话: 0551-3667273, 电子邮箱: huanghs@mail.hf.ah.cn。