生物化学与生物物理进展 *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(7): 622~626
www.pibb.ac.cn

细菌菌蜕作为新颖药物递送体系的研究进展 *

张瑞平　张兆山 **
(军事医学科学院生物工程研究所，北京 100071)

摘要　细菌菌蜕是革兰氏阴性菌被噬菌体 PhiX174 的裂解基因 E 裂解后形成的完整细菌空壳. 由于它具有完整的细菌表面抗原结构，所以它能直接作为疫苗使用. 利用基因工程手段，可以非常便利地将外源抗原蛋白插入菌蜕的内膜、外膜或周质等多个部位，构建重组菌蜕多价疫苗. 目前，菌蜕作为新颖的药物递送体系也开始受到关注. 利用菌蜕可以递送 DNA 和蛋白质疫苗以及其他药物，能较好地产生免疫反应和治疗作用.

关键词　细菌，菌蜕，疫苗，递送体系
学科分类号　R573.6，Q754

20 世纪 80 年代奥地利学者 Lubitz 开始对细菌菌蜕(bacterial ghost)进行研究. 最初，人们直接利用菌蜕作疫苗使用，后来，通过基因工程手段对细菌进行改造，构建了各种重组细菌菌蜕. 最近，菌蜕作为一个新颖药物递送体系开始受到关注.

1　细菌菌蜕的形成和生产

菌蜕是革兰氏阴性菌被噬菌体 PhiX174 的裂解基因 E 裂解后形成的完整细菌空壳. 噬菌体 PhiX174 的裂解基因 E 编码 91 个氨基酸的疏水蛋白，它能在革兰氏阴性细菌细胞膜上形成一个直径约为 40～200 nm 的特异性的跨膜孔道，在渗透压的作用下使 G^-菌的胞质内含物由孔道排出，从而形成不含核酸、核糖体及其他组分的细菌空壳. 经电镜观察，该特异性跨膜孔道并不是在细胞膜上随机分布，而是仅限于细胞的中央和两端 (图 1). 而这种基因灭活过程不会引起细菌表面结构的任何物理化学变化，其内外膜结构也保持良好[1,2].

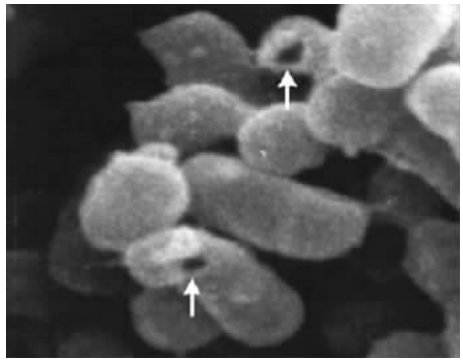

Fig. 1　Scanning electron-micrograph of *P. haemolytica* (pSON2) -ghosts[3]
图 1　*P. haemolytica* 菌蜕放射扫描电镜图[3]
箭头所指为裂解蛋白 E 形成的特异性通道.

菌蜕的生产是通过对裂解基因 E 的严格表达调控实现的. PhiX174 的裂解基因 E 可以受控于多个表达系统，如 pL/pR-cI857，LacpO-LacIq，或 tol 等，其中应用最多的是在 pL/pR-cI857 转录控制下实现基因的可控表达. 最初，在 λpL/pR-cI857 系统中，当温度低于 30℃时，阻遏蛋白 cI857 的表达能使基因 E 被稳定地抑制，而当高于 30℃时，阻遏蛋白 cI857 因热失活而导致基因 E 的表达，在 42℃时细菌裂解能达到最佳状态. 由于裂解前细菌需要在 30℃培养，不利于菌体的大量生产，同时在温度由 30℃向 42℃转变时，热冲击会对细菌表面的抗原决定簇结构造成影响，所以人们便开始对这一温控系统进行优化. 通过基因定点突变技术，使 λpR 启动子中操纵基因的 OR2 的一个碱基由 T 诱变为 C(T→C)，突变后的 λpR 系统在 37℃的高温下仍能稳定抑制基因 E 的表达，而当温度达到 39～42℃时开始诱导细胞裂解[4]. 绝大多数细菌能

*国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2004AA215213).
** 通讯联系人. Tel: 010-66948834, E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn
收稿日期：2006-01-20，接受日期：2006-02-28

被完全裂解，只有极少数细菌被部分裂解，甚至不被裂解 (图 2).

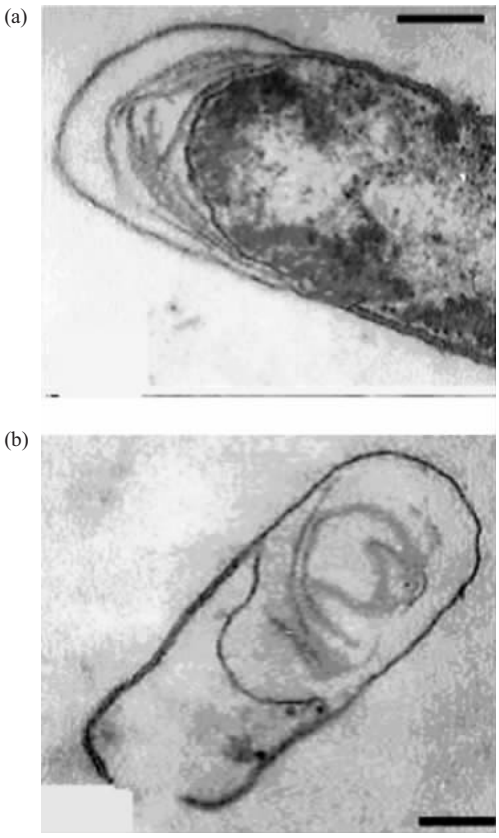

Fig. 2 Electron micrographs of *E. coli* pop2135 bacterial ghost [5]

图 2 大肠杆菌 pop2135 菌蜕透射电镜图 [5]

(a) 部分裂解；(b) 完全裂解.

目前，除大肠杆菌外，很多革兰氏阴性菌均能在裂解基因 E 作用下产生菌蜕，如：鼠伤寒沙门氏菌，肺炎克雷伯氏菌、霍乱弧菌、溶血性巴氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、幽门螺杆菌等[6-9]. 但在裂解过程中，常存在两个问题：一是出现抗裂解的突变株，特别是大肠杆菌，这可能与大肠杆菌是噬菌体 PHiX174 的天然宿主有关；二是菌体内含物释放不彻底. 为解决这个问题，经常采用如下方法.

a. 采用基因 E 和核酸酶 A 联合表达来完全灭活细菌. 葡萄球菌核酸酶 A 的克隆表达可导致细胞内核酸酶的聚集，使细菌 DNA 降解为不到 100 bp 的片段[10].

b. 对于未被裂解的幸存活菌，由于其膜上存在 E 蛋白，在冻干时更易破裂，因此冷冻干燥也可将它们完全灭活.

c. 发酵完毕后，添加链霉素和庆大霉素，彻底杀死突变株.

制备的菌蜕，可采用离心重悬的方法进行收集，–70℃或冻干后室温保存. 目前，已采用流式细胞仪进行菌蜕和活性细胞的快速计数，来对菌蜕的生产质量进行检测[11].

2 菌蜕疫苗应用

大肠杆菌菌蜕系统是一个新颖的疫苗递送体系. 其本身外膜蛋白结构不受破坏，它可以在不添加佐剂情况下就可产生免疫反应，与其他物理化学灭活菌体相比，因其不含细胞内含物而更安全. 同时，由于菌蜕表面存在着鞭毛和纤毛等结构，易于在特定组织和细胞中黏附，增加了抗原提呈细胞提呈机会，这使得机体能对菌蜕本身或者菌蜕上呈现的外源抗原，既能产生体液免疫反应也能产生细胞免疫反应.

最初，制成菌蜕疫苗的病原物主要集中在兽类动物的细菌病原上，直到最近，才把这项技术转移到人类病原上，现从中选取几例简单介绍.

a. 胸膜肺炎放线杆菌菌蜕

Katinger 等用胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)菌蜕和传统的灭活菌免疫猪群，研究结果表明：灭活菌免疫的猪群其 IgG^+ 和 IgA^+ 细胞显著地高于菌蜕组，菌蜕组猪的支气管肺泡内层液体中，IgA、IgM、淋巴胚细胞和粒细胞有显著的升高. 但攻毒后只有菌蜕组表现出完全的免疫力，而灭活组仍携带有致病菌. 研究还发现，菌蜕在不同种的血清型之间还诱导了交叉免疫保护作用[12~14].

b. 霍乱菌蜕疫苗

Eko 等[15,16]报道，用霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)菌蜕(VCG)腹腔注射免疫小鼠，可产生霍乱弧菌特异性 IgG 反应和高效价抗体. 用血清型为 O：1 和 O：139 制备的 *Vibrio cholerae* 菌蜕仍含有保护性抗原 - 毒素整合菌毛蛋白 TCP (toxin-corgulated pilli protein). 当用该菌蜕免疫兔子时，也能诱导高水平的抗体. 在用乳鼠进行试验时，也诱发乳鼠的保护性免疫. 而且，用 TCP 阳性 O：139 弧菌免疫兔子所得的血清能成功地保护 TCP 阳性 O：1 弧菌的攻毒.

c. 幽门螺杆菌菌蜕疫苗

用幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)菌蜕疫苗口服免疫 BALB/c 小鼠后，然后接种攻毒，发现菌蜕免疫组能显著降低小鼠胃组织中菌体密度. 在没有

使用佐剂的情况下，其中一组，10 个小鼠均得到了保护，另外一组 10 个小鼠中 5 个得到了保护. 当菌蜕和霍乱毒素 (CT) 共同使用免疫时，保护率达到了 100%，并且有 3 个小鼠胃组织中没有监测到 *Helicobacter pylori*[9].

除了利用这些常规菌蜕免疫动物外，人们正在将更多的外源抗原和基因展示在菌蜕上，使之成为外源抗原的载体. 外源目标抗原可以锚定在菌蜕外膜、内膜上，或者运送到周质中，也可以和 S 层蛋白融合表达形成片状自我组装结构后再运送到周质中[17].

最近，乙肝病毒核心抗原被整合到大肠杆菌的外膜蛋白 OMP-A 上，携带该融合蛋白的菌蜕与单纯的 HBC149 核心抗原相比，其诱导的免疫反应更为显著[18].

目标抗原定位在周质中，具有很多优势. 首先，周质中的抗原可以避免因暴露在外部而被降解，同时由于在富含糖基的环境中又避免了疏水性相互作用. 其次，由于裂解蛋白将内膜和外膜缝合起来，可以在周质中表达可溶性蛋白. 利用 MalE 蛋白的信号肽，可以单独构建分泌蛋白，或者和 S 层蛋白融合后再分泌出去. 定点突变 sbsA 和 sbsB 基因，表明该蛋白质在柔性弯曲部分可以插入 600 个氨基酸的蛋白质序列. 该融合蛋白在每个细胞中有数十万个拷贝，并且由于它们能形成片状超级结构而不会形成包涵体[19]. 研究表明，定位于 S 层蛋白的抗原比相应的可溶性蛋白，其免疫效果更好. 当非典型性流感嗜血杆菌蛋白 Omp26 与 S 层蛋白融合表达后，用该菌蜕免疫小鼠时，能诱导高水平的抗体，再用纯化的 Omp26 蛋白加强免疫时，保护效果更好[20].

为了锚定抗原蛋白到细胞内膜内侧上，人们发展了一种膜定位系统. 将外源 DNA 序列克隆到膜定位载体 pMTV5 上，任何基因都可以和膜锚定蛋白 E′或 L′以融合蛋白的形式锚定于内膜上. 内膜上携带有 HIV1-RT 和 HIV1-GP41 蛋白的菌蜕能在动物模型上诱导体液和细胞免疫[21]. 最近，VCG 被成功用来免疫预防沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*). 编码沙眼衣原体主要外膜蛋白 omp1 在 *V. cholerae* 的内膜中锚定表达. 研究结果表明，表达该融合蛋白的 VCG 可以替代亚单位疫苗来激发更为有效的粘膜免疫反应[22].

3 细菌菌蜕作为药物递送体系应用

目前，已经发展了几种比较新颖的生物源的药物递送系统. 其中之一是乙肝病毒表面抗原 HBsAg 形成的 L 颗粒，另外便是细菌裂解后形成的菌蜕.

当用核酸进行免疫或基因治疗时，通常需要多次大剂量的核酸接种才能获得有效的免疫和治疗效果，所以人们开始对核酸疫苗和治疗性药物的递送系统进行研究. 质粒 DNA 可以和菌蜕内膜非特异的结合. 将冷冻干燥的菌蜕直接悬浮在质粒溶液中，依据质粒浓度不同，每个菌蜕中大约有 6 000 个编码绿色荧光蛋白的质粒吸附到内膜上. 体外试验证明，包装有这些质粒的菌蜕能靶向到鼠巨噬细胞 RAW264.7 中，并且有 60%的巨噬细胞表达了该荧光蛋白[23]. 为了提高包装效率，也可以采取措施将质粒 DNA 特异地结合到菌蜕上. 例如，在菌蜕的内膜上定位表达 Lac Ⅰ蛋白，则它能特异地结合含有 lac 操纵子的质粒[24].

人们也正在尝试利用菌蜕来递送一些具有治疗作用的药物. 理论上，菌蜕的细胞质空间可以填充任何水溶性物质，甚至乳油. 最近用溶血性曼氏杆菌(*M. haemolytica*)菌蜕在体外来递送抗肿瘤药物阿霉素 DOX，进一步证明了菌蜕可以作为一个新颖的药物递送平台. 将 *M. haemolytica* 菌蜕和阿霉素 DOX 溶液混合孵育后，每毫克菌蜕可最多包装 88 μg 药物. 黏附试验表明，*M. haemolytica* 菌蜕能靶向到 Caco-2 细胞中，并能释放其中包裹的阿霉素 DOX. 细胞毒试验分析表明，和菌蜕共孵育的细胞显示出了双对数增长的细胞毒和抗增殖能力[25].

目前很多工作集中在探索如何提高菌蜕胞质空腔包装蛋白质类药物的能力上. 最近，填充了钙黄绿素(calcein)的菌蜕可以用膜囊与菌蜕内膜相融合的方法将菌蜕“缝合”起来. 膜黏附和吸收研究表明，鼠巨噬细胞和人 Caco-2 细胞能吞噬该菌蜕，并且将 calcein 在这些细胞中释放出来[26]. 包装蛋白质类药物的另一个策略也正在研究中，链亲和素靶向表达于菌蜕内膜中,而目标药物则被生物素酰化，利用生物素和链亲和素的特异性相互作用，将目标蛋白固定于胞质中. 当然，这种特异性相互作用可以和上面提到的“膜囊和内膜融合法”结合起来使用，如：裂解蛋白 E 形成的通道和链亲和素偶联，而用来与之融合的膜囊则被生物素酰化.

4 展 望

菌蜕，由于它既能携带外源抗原，又能同时递送核酸和其他药物，所以它被认为是非常有用的灭活载体. 其加工容易，安全可靠. 由于菌蜕表面存在很多受体，它们可以用来靶向作用于特异性的细胞和组织. 可以说，到目前为止，还没有其他生物递送体系具有上述特征，所以，菌蜕作为一种新颖的递送体系，越来越受到重视.

在幽门螺杆菌疫苗的研究中，我们正在将菌蜕递呈抗原和递送药物的功能合二为一. 幽门螺杆菌一旦侵入寄主，很难清除. 目前最有效的方法仍是化学疗法，其有效率通常很难达到 90%以上，而且还有一定的副作用，药物价格昂贵，更令人担忧的是临床上出现了大量耐药菌株. 人们渴望利用疫苗技术来解决这一问题，因此幽门螺杆菌的预防和治疗性疫苗受到了广泛重视，但迄今为止，该类疫苗临床效果仍不理想. 由于幽门螺杆菌是细胞外侵染，由以往经验可知，很难通过单一抗原达到较好的免疫效果. 为此，我们利用菌蜕系统的优势，构建了在外膜展示幽门螺杆菌抗原或抗原表位的大肠杆菌菌蜕，利用该菌蜕包裹具有预防或治疗作用的其他抗原的核酸或蛋白质疫苗. 目前，这些疫苗的免疫效果正在评价中.

参 考 文 献

1 Witte A, Lubitz W. Biochemical characterizationof PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1989, **180** (2): 393～398

2 Witte A, Blaësi U, Halfmann G, *et al*. PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. Biochimie, 1990, **72** (2～3): 191～200

3 Marchart J, Dropmann G, Lechleitner S, *et al*. *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*-ghosts: new vaccine candidates. Vaccine, 2003, **21** (25～26): 3988～3997

4 Jechlinger W, Szostak M, Witte A, *et al*. Altered temperature induction sensitivity of the lambda PR/cI857 system for controlled gene E-expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 1999, **173** (2): 347～352

5 Riedmann E, Kyd J, Smith A, *et al*. Construction of recombinant S-layer proteins (rSbsA) and their expression in bacterial ghosts—a delivery system for the nontypeable *Haemophilus influenzae* antigen Omp26. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, **37** (2～3): 185～192

6 Szostak M P, Hensel A, Eko F O, *et al*. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. J Biotechnol,1996, **44** (1～3): 161～170

7 Eko F O, Witte A, Huter V, *et al*. New strategies for combination vaccines based on the extended recombinant bacterial ghost system. Vaccine,1999, **17** (13～14): 1643～1649

8 Halfmann G, Gotz F, Lubitz W. Expression of bacteriophage PhiX174 lysis gene E in *Staphylococcus carnosus* TM3000. FEMS Microbiol Lett, 1993, **108** (2): 139～143

9 Panthel K, Jechlinger W, Matis A, *et al*. Generation of *Helicobacterpylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates. Infect Immun, 2003, **71** (1): 109～116

10 Haidinger W, Mayr U B, Szostak M P, *et al*. *Escherichia coli* ghost production by expression lysis gene E and staphylococcal nuclease. Appl Environ Microbiol, 2003, **69** (10): 6106～6113

11 Haidinger W, Szostak M P, Jechlinger W, *et al*. Online monitoring of the *Escherichia coli* ghost production. Appl Environ Microbiol, 2003, **69** (1): 468～474

12 Katinger A, Lubitz W, Szostak M P, *et al*. Pigs aerogenously immunized with genetically inactivated (ghosts) or irradiated *Actinobacillus pleuropneumoniae* are protected against a homologous aerosol challenge despite differing in pulmonary recombicellular and antibody responses. J Biotech, 1999, **73** (2～3): 251～260

13 Hensel A, Huter V, Katinger A, *et al*. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. Vaccine, 2000, **18** (26): 2945～2955

14 Huter V, Hensel A, Brand E, *et al*. Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine. J Biotechnol, 2000, **83** (1～2): 161～172

15 Eko F O, Hensel A, Bunka S, *et al*. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts following intra~peritoneal immunization of mice. Vaccine, 1994, **12** (14): 1330～1334

16 Eko F O, Schukovskaya T, Lotzmanova E Y, *et al*. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. Vaccine, 2003, **21** (25～26): 3663～3674

17 Mayr U B, Walcher P, Azimpour C, *et al*. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, **57** (9): 1381～1391

18 Jechlinger W, Haller C, Resch S, *et al*. Comparative immunogenicity of the hepatitis B virus core 149 antigen displayed on the inner and outer membrane of bacterial ghosts. Vaccine, 2005, **23** (27): 3609～3617

19 Truppe M, Howorka S, Schroll G, *et al*. Biotechnological applications of recombinant Slayer proteins rSbsA and rSbsB from Bacillus stearothermophilus PV72. FEMS Microbiol Rev, 1997, **20**: 47～98

20 Riedmann E, Kyd J, Smith A, *et al*. Construction of recombinant S-layer proteins (rSbsA) and their expression in bacterial ghosts-a delivery system for the nontypeable *Haemophilus influenzae* antigen Omp26. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, **37** (2～3): 185~192

21 Szostak M P, Auer T, Lubitz W. Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS. New York: Cold Spring

Harbor Laboratory Press, 1993. 419～425

22 Eko F O, Lubitz W, Mcmillan L, *et al*. Recombinant *Vibrio cholerae* ghosts as a delivery vehicle for vaccinating against *Chlamydia trachomatis*. Vaccine, 2003, **21** (15): 1694～1703

23 Paukner S, Kudela P, Kohl G. DNA-loaded bacterial ghosts efficiently mediate reporter gene transfer and expression in macrophages. Molecular therapy, 2005, **11** (2): 215～223

24 Mayrhofe P, Azimpour-Tabrizi C, Walcher P, *et al*. Immobilization of plasmid DNA in bacterial ghosts. J Control Release, 2005, **102** (3): 725～735

25 Paukner S, Kohl G, Lubitz W. Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells. J Control Release, 2004, **94** (1): 63～74

26 Paukner S, Kohl G, Jalava K, *et al*. Sealed bacterial ghosts-novel targeting vehicles for advanced drug delivery of water-soluble substances. J Drug Target, 2003, **11** (3): 151～161

Advances on The Novel Drug Deliver System: Bacterial Ghost*

ZHANG Rui-Ping, ZHANG Zhao-Shan**

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

Abstract Bacterial ghost is intact bacterial envelope which is lysised by the lysis geneE of PhiX174. It can be used as vaccine directly. Foreign antigen can be targeted into outer membrane, inner membrane or the periplasmic space of bacterial, as a result, a recombinant bacterial ghost is constructed. Bacterial ghost, as a novel drug delivery system, is becoming more and more concerned, which can deliver DNA and protein vaccine or other drugs in order to have a better immune responses and therapeutic effects.

Key words bacterial, bacterial ghost, vaccine, delivery system

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China(2004AA215213).

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

Received: January 20, 2006 Accepted: February 28, 2006