

利用展示尿素酶 B 表位的大肠杆菌菌蛻 递送幽门螺杆菌核酸疫苗 *

张瑞平^{1, 2)} 刘纯杰¹⁾ 陶好霞¹⁾ 刘向昕¹⁾ 张兆山^{1)**}

(¹⁾ 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071; ²⁾ 河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄 050061)

摘要 探讨和分析了重组大肠杆菌菌蛻递送系统能否进一步提高幽门螺杆菌核酸疫苗的免疫应答水平。首先构建了展示尿素酶 B 表位的重组大肠杆菌菌蛻, 然后以此菌蛻包裹幽门螺杆菌核酸疫苗 pcDNAKAT, 经 DNA 凝胶电泳、荧光显微镜观察和 FACS 分析, 表明该质粒 DNA 可以非特异地结合到大肠杆菌菌蛻内膜上。该核酸疫苗经重组菌蛻包裹后免疫小鼠, 其血清抗过氧化氢酶抗体效价由单独免疫时的 1 : (307 ± 39) 提高到 1 : (520 ± 54), 二者差异极显著 ($P = 0.0058$), 结果表明利用菌蛻递送系统能较好地提高核酸疫苗的免疫应答水平。

关键词 核酸疫苗, 菌蛻, 幽门螺杆菌, 递送系统

学科分类号 R573.6, Q754

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00675

目前世界上约 50% 的人口感染了幽门螺杆菌, 发展中国家可高达 80%, 其中 10%~20% 的感染者可诱发慢性胃炎、消化道溃疡甚至胃癌及胃黏膜相关性淋巴组织淋巴瘤等疾病。目前最有效的治疗方法是以抗生素为基础的三联或四联疗法, 具有一定的副作用, 且临床上出现了大量耐药菌株, 部分治愈患者可被再次感染^[1-2]。由于疫苗技术在其他传染性疾病中取得的巨大成就, 因此人们也寄希望通过疫苗技术来解决该问题。

核酸疫苗作为一类新型疫苗, 因易于设计构建、成本低廉、适于规模化生产越来越受到人们的关注。2002 年以来, 幽门螺杆菌核酸疫苗相关性研究开始报道, 但总体上相对较少, 这可能与该核酸疫苗免疫原性和保护性差有直接关系^[3-5], 因此提高核酸疫苗的免疫保护效率势在必行。疫苗递送系统可提高抗原提呈细胞(APC)捕获抗原效率、加工效率、提高抗原肽对主要组织相容性复合物(MHC)分子的亲和力等, 能显著影响机体免疫应答水平和方式, 为此, 本研究尝试利用较新颖的递送系统 - 菌蛻来递送幽门螺杆菌核酸疫苗, 观察其对机体免疫应答效果的影响。

菌蛻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, 该裂解基因 E

编码的疏水蛋白在细胞膜上形成一个直径约为 40~200 nm 的跨膜孔道, 在渗透压的作用下使 G⁻ 菌的胞质内容物由孔道排出^[6]。细菌菌蛻可以很好地作为外源抗原的载体, 即外源抗原可锚定在菌蛻的外膜、内膜上, 或者运送到周质中, 菌蛻表面上存在着的鞭毛和纤毛等结构易于在特定组织和细胞中黏附, 增加了抗原提呈机会, 这使得机体对菌蛻上展示的外源抗原能产生良好的免疫应答反应^[7]。另外, 菌蛻作为药物递送系统日益受到关注, 理论上, 菌蛻的细胞质空间可以填充任何水溶性物质, 甚至乳油, 目前研究较多的是利用菌蛻递送核酸疫苗^[8-10]。

由于幽门螺杆菌是细胞外感染, 由以往经验可知, 很难通过单一抗原达到良好的免疫治疗效果。为此, 我们利用菌蛻系统的优势将其展示外源抗原和递送核酸疫苗的功能合二为一, 即首先利用大肠杆菌菌毛展示幽门螺杆菌尿素酶 B 表位抗原, 将该大肠杆菌制备为菌蛻, 然后利用该重组菌蛻包裹

* 河北省教育厅自然科学基金资助项目(2009113)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66948834, E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2010-12-22, 接受日期: 2011-03-22

表达幽门螺杆菌另一抗原(过氧化氢酶)的核酸疫苗, 进而考察其对机体免疫应答水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要菌种、细胞株、质粒. 大肠杆菌 TOP10、幽门螺杆菌 HPSS1 和 293T 细胞, 质粒 pAcYc184、pCSX72 和 pcDNAKAT 均由军事医学科学院生物工程研究所保存; 质粒 pHH43 由 Haas 教授惠赠。

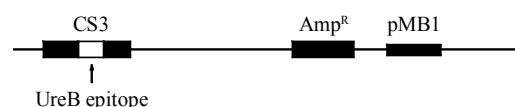
1.1.2 主要试剂. Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自宝生物大连有限公司; 质粒小量提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购自 Promega 公司; 质粒大量提取试剂盒(Mega)购自 QIAGEN 公司; 脂质体(Lipofectamine™ 2000)购自 Invitrogen 公司; HRP 酶标羊抗鼠 IgG 抗体、IgG1 抗体、IgG2a 抗体及 FITC 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 构建展示尿素酶 B 表位的重组大肠杆菌菌蛻. 首先, 将幽门螺杆菌的尿素酶 B 抗原表位展示到大肠杆菌 CS3 菌毛上, 即: 将尿素酶 B 表位的核酸序列^[1]经优化后分别合成其编码链 P1 和互补链 P2, 然后将其克隆至 CS3 菌毛展示载体 pCSX72 上, 所得质粒命名为 pCSXureB. 以质粒 pHH43 为模板, P3、P4 为引物, 扩增出裂解基因盒后克隆至载体 pAcYc184 上, 所得质粒命名为 pAcYclysis. 将这两种质粒同时转入大肠杆菌 TOP10 中, 28℃ 培养至 A 值为 3.0 时, 调整温度至 42℃ 继续培养, 每隔 30 min 测量培养液 A 值, 当 A 值不再下降时, 离心收集菌体, 冷冻干燥后保存。

P1: ctagaTGCCACCACTTGGATAAAAGCATTAAGAAGATGTTTCAGTTCGCTGATTCAAGGATCt, P2: ctagaGATCCTTGAATCAGCGAACTGAACATCTTCTTTAATGCTTTTATCCAAGTGGTGGCAt, P3: CGGGATCCTCAGCCAAACGTCTCTTCAG, P4: CGGGATCCTCACTCCTTCCGCACGTAAT.

质粒 A: pCSXureB



质粒 B: pAcYclysis



1.2.2 大肠杆菌菌蛻电镜观察及其尿素酶 B 表位展示检测. 新鲜制备的大肠杆菌菌蛻, 经 PBS 清洗、固定、包埋、脱水和切片, 进行透射电镜观察. 另取 1 mg 干燥大肠杆菌菌蛻, 重悬于 100 μl PBS 中, 60℃ 水浴中孵育 30 min 后涡旋振荡器上振荡 1 min 以使菌毛完全脱落, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清进行 SDS-PAGE 和免疫印记分析。

1.2.3 重组大肠杆菌菌蛻包裹核酸疫苗及检测. 质粒 pcDNAKAT 为军事医学科学院生物工程研究所构建的对幽门螺杆菌感染具有一定治疗作用的核酸疫苗, 按照 QIAGEN 公司质粒大量提取试剂盒操作手册提取该质粒并将其溶解至 HBS 溶液中. 称取冷冻干燥的大肠杆菌菌蛻 5 mg, 重悬于 100 μl 的质粒 pcDNAKAT 溶液中, 混匀后加入 CaCl₂ 溶液使其终浓度为 25 mmol/L, 24℃ 温育 30 min, 然后用 200 μl HBS 溶液洗涤菌蛻 4 次, 洗涤后的菌蛻提取质粒后进行凝胶电泳分析. 另取 60 μl 该核酸疫苗和大肠杆菌菌蛻按上述程序包裹并洗涤后, 加入 2 μl 的 SYBR Green I, 室温静置 10 min 后进行 FACS 分析和荧光显微镜观察。

1.2.4 幽门螺杆菌 HPSS₁ 培养及感染 BALB/c 小鼠. 幽门螺杆菌 HPSS₁ 在空肠弯曲菌血琼脂培养基上扩繁, 37℃ 微需氧环境(5%O₂, 10%CO₂, 85% N₂)下培养 48 h, 然后每平皿加入 1.0 ml 布氏肉汤培养基, 刮取菌体制成菌悬液(10⁸ cfu). 30 只雌性 6~8 周龄 BALB/c (SPF) 小鼠于灌胃前 12 h 禁食、禁水, 然后用 3% NaHCO₃ 灌胃, 0.3 ml/ 只, 30 min 后用幽门螺杆菌菌悬液灌胃, 0.3 ml/ 只, 灌后 4 h 恢复进食和饮水, 每隔一日再次灌服, 共计 3 次。

1.2.5 重组菌蛻递送核酸疫苗免疫 BALB/c 小鼠. BALB/c(SPF)小鼠经幽门螺杆菌攻毒 2 周后进行免疫治疗. 第一组: 单独质粒 pcDNAKAT 肌肉注射, 每次免疫剂量为 150 μg/ 只; 第二组: 大肠杆菌重组菌蛻肌肉注射, 每次免疫剂量为 150 μg/ 只; 第三组: 包裹质粒 pcDNAKAT 的重组菌蛻, 每只小鼠每次注射 150 μg DNA 疫苗和 150 μg 大肠杆菌菌蛻. 小鼠后腿肌肉多点注射, 注射后立即用基因导入仪对注射部位肌肉进行电脉冲刺激, 参数为 100 V/20 s 双向各 6 次脉冲. 每周免疫一次, 共 3 次. 2 周后小鼠眼静脉丛采血进行抗体 IgG、IgG1 和 IgG2a 滴度测定。

2 结 果

2.1 构建展示尿素酶 B 表位的重组大肠杆菌菌蛻

经菌体 PCR 初步鉴定(图 1)和序列测定分析表明尿素酶 B 表位基因已成功克隆到载体 pCSX72 上. 经酶切鉴定, 裂解基因盒 E 也已成功克隆到载体 pAcYc184 上(图 2).

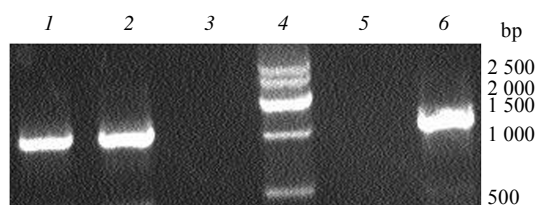


Fig. 1 Colony PCR of candidate strains

Specific band of ureB epitope was showed in lane 1, 2, 6, which was indicated that corresponding strains might harbor this gene.

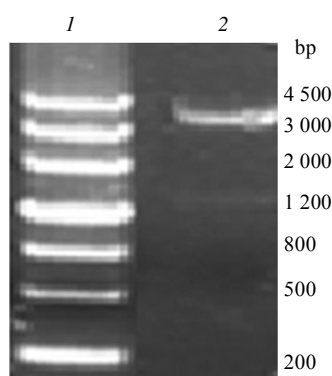


Fig. 2 Restriction enzyme digestion of pAcYc1ysis

A band equivalent to lysis gene cassette was showed after digestion by *Bam*H I (lane 2).

大肠杆菌 TOP10(pCSXureB, pAcYc1ysis) 由 28℃ 调整至 42℃ 继续培养时发现, A 值在经历短暂的上升后开始下降, 3 h 后生长曲线开始持平, 而大肠杆菌 TOP10(pCSXureB) 其 A 值则一直不断升高, 表明该裂解基因可行使正常功能将大肠杆菌裂解为菌蛻(图 3). 根据裂解前后菌落形成单位, 计算其裂解率可达 98.5%.

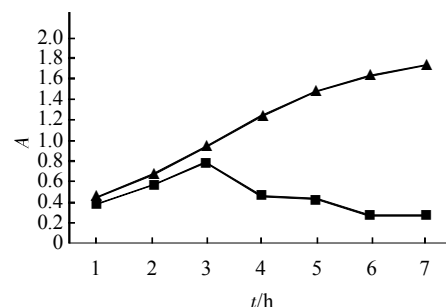


Fig. 3 Growth curve of recombinant TOP10 and ghost

A value of recombinant TOP10 became higher and higher, significantly distinctive from that of bacterial ghosts, which was indicated that lysis gene could work properly. $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: pCSX-ureB; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: pCSX-ureB + pAcYc-Lysis.

2.2 透射电镜观察大肠杆菌菌蛻和 Western blot 检测抗原表达

经透射电镜观察, 绝大部分大肠杆菌被裂解为菌蛻, 内部形成可见的空腔, 而极小部分未裂解的大肠杆菌则呈现为黑色实体(图 4).

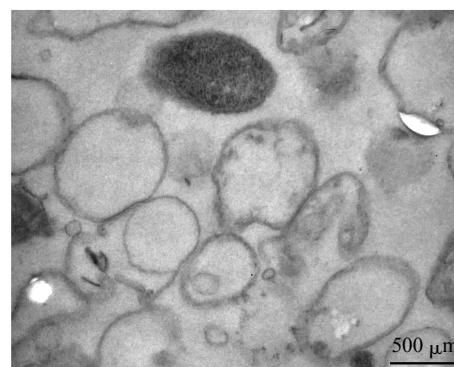


Fig. 4 Electron micrographs of recombinant bacterial ghosts

Almost all bacterial was lysed into ghosts with loss of cytoplasmic material and structural integrity.

经免疫印记分析, 重组菌 TOP10(pCSXureB) 和菌蛻 TOP10(pCSXureB, pAcYc1ysis) 菌毛均能和兔抗尿素酶 B 多抗有特异性反应, 且其对应的蛋白质分子质量与 CS3 分子质量大小基本一致, 表明二者利用 CS3 展示的尿素酶 B 表位均获得了成功, 即大肠杆菌在形成菌蛻时其展示抗原的能力不受影响(图 5).

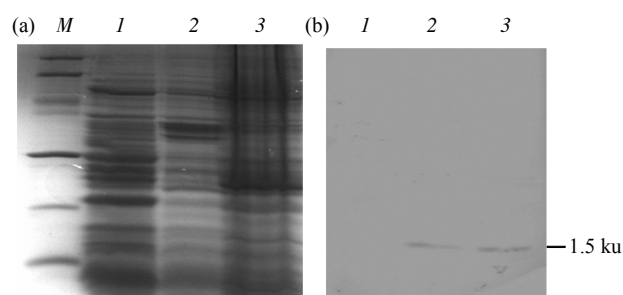


Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of crude fimbriae

SDS-PAGE of crude fimbriae of TOP10 (lane1), TOP10 (pCSXureB) (lane2) and bacterial ghosts (lane3) was showed in Figure 5a, corresponding Western blot analysis using rabbit anti-UreB antibody was showed in Figure 5b.

2.3 大肠杆菌菌蛻包裹 DNA 疫苗及检测

DNA 疫苗和菌蛻共孵育后用 HBS 洗涤, 发现经 4 次洗涤后洗涤液中仅有少量质粒 DNA 存在. 用质粒小提试剂盒提取洗涤后的重组菌蛻, 可发现一分子质量与目标质粒大小基本一致的 DNA 条带. DNA 疫苗和菌蛻共孵育后经 HBS 洗涤, 加入 SYBR Green I 与之结合, 再次洗涤后进行观察.

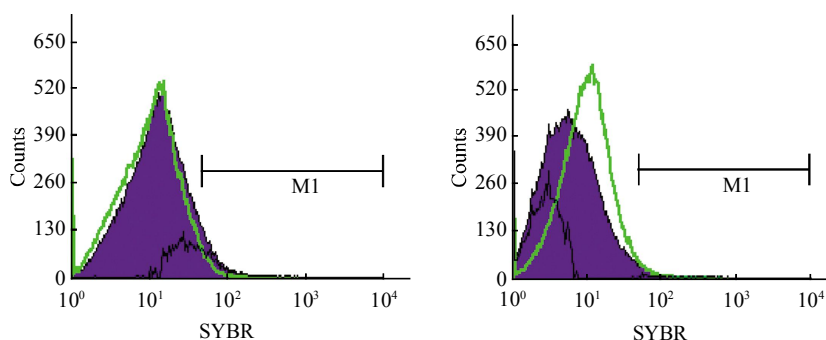


Fig. 7 Flow cytometric analysis of bacterial ghosts package experiment

The fluorescence of bacterial ghosts of unpackaged (a) was compared to that of the packaged (b). Successful loading resulted in the fluorescence shift of ghosts packaged indicated by the *MFI*, whereas the fluorescence of unpackaged ghosts remained almost unchanged.

2.4 免疫小鼠抗体效价测定

当用核酸疫苗 pcDNAKAT 单独免疫小鼠后, 其血清抗过氧化氢酶抗体效价为 1 : (307 ± 39), 而当用大肠杆菌菌蛻包裹该质粒后, 效价则提高到 1 : (520 ± 54), 经统计分析, 二者差异极显著

当荧光未激发时, 显微镜下可看到棒状暗灰色的大肠杆菌菌蛻, 荧光激发后, 则能观察到绿色的大肠杆菌菌蛻(图 6).

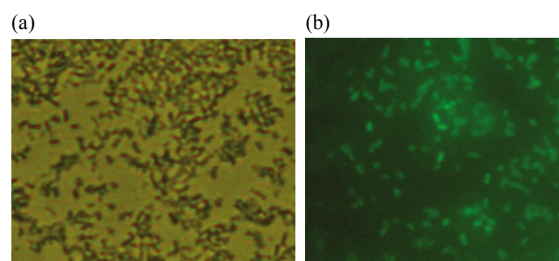


Fig. 6 Fluorescence microphotographs of *E. coli* ghosts

The microphotographs of ghost filled with DNA vaccine and stained with SYBR Green I was showed when fluorescence was unactivated (a) and activated (b).

为进一步验证大肠杆菌菌蛻包裹质粒 DNA 的效率, 我们进行了 FACS 分析. 如图 7 所示, 单独大肠杆菌菌蛻加入 SYBR Green I 后其平均荧光强度基本没有发生大的偏移, *MFI* 由 13.3 增大至 17.5, 而当大肠杆菌菌蛻包裹质粒 DNA 后再加入 SYBR Green I 时其平均荧光强度则发生了较大的偏移, *MFI* 由 8.61 增大至 14.7.

($P = 0.0058$, 图 8a). 单独用大肠杆菌菌蛻免疫小鼠时, 其抗尿素酶 B 抗体效价为 1 : (2998 ± 513), 而该大肠杆菌菌蛻包裹 DNA 疫苗后, 其抗尿素酶 B 抗体效价则降低为 1 : (2314 ± 894), 二者差异不显著(图 8b).

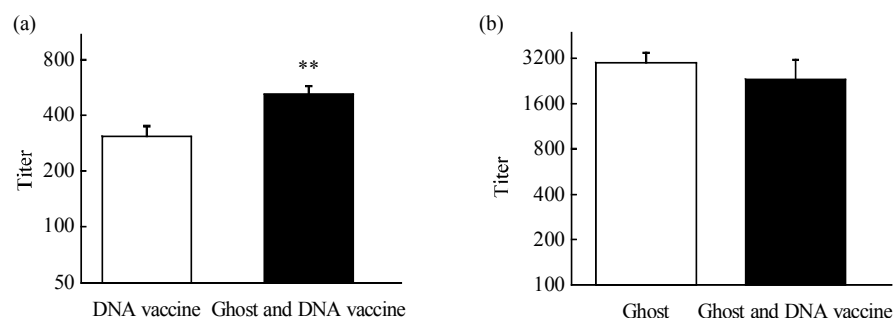


Fig. 8 Antibody titer determination of immunized mice

Anti-kat antibody titer of mice immunized with packaged ghost was higher than that immunized with DNA vaccine alone (a), however anti-ureB antibody titer of mice immunized with packaged ghost remained almost unchanged compared to that immunized with ghost alone(b).

当用大肠杆菌菌蛻单独免疫小鼠后，其抗尿素酶 B 抗体类型以 IgG2a 为主，即激发的免疫反应类型以 Th1 型为主；当用混合 DNA 疫苗的菌蛻免疫小鼠后，其抗体类型仍以 IgG2a 为主。对比两个免疫治疗组，其 IgG1 水平相差不大，混合 DNA 疫苗的大肠杆菌菌蛻免疫治疗组 IgG2a 水平偏低，但差异不显著 $P = 0.7256$ (图 9)。

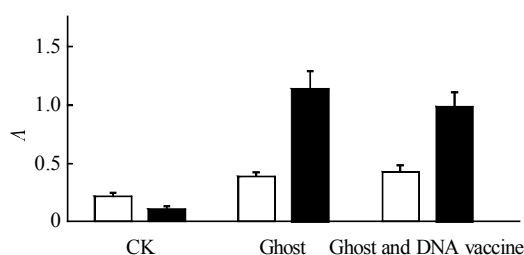


Fig. 9 Anti-ureB antibody type determination of immunized mice

Anti-ureB antibody type determination of different groups of immunized mice was shown, namely, IgG2a antibody level of all immunized groups was higher than that of IgG1 antibody level, which was indicated that Th1 immunized response was prone to elicited. □: IgG1; ■: IgG2a.

当用质粒 DNA 疫苗免疫小鼠后，其抗过氧化氢酶抗体类型以 IgG2a 为主，即激发的免疫反应类型以 Th1 型为主，当其和大肠杆菌菌蛻混合免疫小鼠后，其抗过氧化氢酶 IgG1 和 IgG2a 类型抗体水平均得到了明显提高，其中仍以 IgG2a 为主。经统计学分析，两组间的 IgG1 水平差异不显著($P = 0.102$)，但 IgG2a 水平差异显著($P = 0.034$)，图 10)。

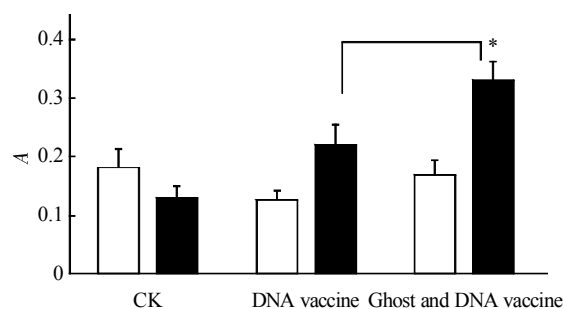


Fig. 10 Anti-katA antibody type determination of immunized mice

Anti-katA antibody type determination of different groups of immunized mice was shown, namely, IgG2a antibody level of all immunized groups was higher than that of IgG1 antibody level, which was indicated that Th1 immunized response was prone to elicited. □: IgG1; ■: IgG2a.

3 讨 论

菌蛻作为较新颖的药物递送系统不断受到重视，理论上，菌蛻的细胞质空间可以填充任何水溶性物质。目前，利用菌蛻递送最多的是核酸类药物或蛋白质类药物，最近用溶血性曼氏杆菌菌蛻在体外递送抗肿瘤药物阿霉素，进一步证明了菌蛻甚至可以用来递送中小药物分子^[11]。本实验中，利用展示尿素酶 B 表位的重组大肠杆菌菌蛻递送幽门螺杆菌核酸疫苗 pcDNAKAT，初步表明该质粒能和菌蛻内膜较稳定地非特异结合。但在试验中也观察到有相当数量的质粒被 HBS 洗涤下去，造成了递送效率偏低。为了提高包装效率和简化操作步骤，可采取进一步措施将质粒 DNA 特异地结合到菌蛻上。例如，在菌蛻的内膜上定位表达 Lac I 蛋白，

使之与含有 lac 操纵子的质粒 DNA 特异地结合。

为了观察双价疫苗是否能更好地治疗和预防幽门螺杆菌感染, 我们在试验中除了利用核酸疫苗表达幽门螺杆菌过氧化氢酶抗原外, 还在大肠杆菌菌蛻 CS3 菌毛上展示了尿素酶 B 表位抗原。当该重组大肠杆菌菌蛻和 DNA 疫苗一起混合免疫小鼠时, 发现小鼠抗 rKatA 抗体效价显著上升, 而与之不同的是抗 UreB 抗体效价却有所下降, 尽管二组差异不显著。这种现象可能与“抗原竞争”现象比较相似^[12-13], 分析可能的原因有: a. 免疫细胞在遇到第一个抗原时, 增殖过于强烈, 导致了 T 细胞和 B 细胞不能有效地接触反应。b. 两种抗原竞争巨噬细胞或 APC 等细胞的有限空间。c. 一种抗原的抗原肽可以和另外一种抗原的 MHC 分子竞争性结合。高强度的抗原竞争导致形成低亲和力抗体, 中低度抗原竞争则对抗体亲和力影响不大。因此, 在使用双抗原免疫动物时, 应考虑不同抗原的配伍组合情况, 尽量采取措施避免出现上述“抗原竞争”现象。

参 考 文 献

- [1] Blaser M J. *Helicobacter pylori*: its role in disease. Clin Infect Dis, 1992, **15**(3): 386-393
- [2] Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med, 1994, **330**(18): 1267-1271
- [3] Miyashita M, Joh T, Watanabe K, et al. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori* catalase. Vaccine, 2002, **20**(17-18): 2336-2342
- [4] Hatzifoti C, Elliott M B, Dorrell N, et al. A plasmid immunization construct encoding urease B of *Helicobacter pylori* induces an antigen-specific antibody response and upregulates the expression of β -defensins and IL-10 in the stomachs of immunized mice. Vaccine, 2004, **22**(20): 2651-2659
- [5] Hatzifoti C, Roussel Y, Harris A G, et al. Mucosal immunization with a urease B DNA vaccine induces innate and cellular immune responses against *Helicobacter pylori*. Helicobacter, 2006, **11**(2): 113-122
- [6] Witte A, Lubitz W. Biochemical characterization of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1989, **180**(2): 393-398
- [7] Szostak M P, Hensel A, Eko F O, et al. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. J Biotechnol, 1996, **44**(1-3): 161-170
- [8] Ebensen T, Paukner S, Link C, et al. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines. J Immunol, 2004, **172**(11): 6858-6865
- [9] 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
- [10] Mayrhofer P, Azimpour-Tabrizi C, Walcher P, et al. Immobilization of plasmid DNA in bacterial ghosts. J Control Release, 2005, **102**(3): 725-735
- [11] Hirota K, Nagata K, Norose Y, et al. Identification of an antigenic epitope in *Helicobacter pylori* urease that induces neutralizing antibody production. Infect Immun, 2001, **69**(11): 6597-6603
- [12] Kim Y T, Merrifield N, Zarchy T, et al. Studies on antigenic competition III. Immunology, 1974, **26**(5): 943
- [13] Babbitt B P, Matsueda G, Haber E, et al. Antigenic competition at the level of peptide-Ia binding. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83**(12): 4509-4513

Recombinant Bacterial Ghosts Displaying ureB Epitope Can Deliver *Helicobacter pylori* DNA Vaccine*

ZHANG Rui-Ping^{1,2)}, LIU Chun-Jie¹⁾, TAO Hao-Xia¹⁾, LIU Xiang-Xin¹⁾, ZHANG Zhao-Shan^{1)**}

¹⁾ Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

²⁾ Life Science Department of Hei Bei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract Whether the immunogenicity of DNA vaccine can be further increased by novel deliver system-bacterial ghost is discussed. First, the bacterial ghost displaying ureB epitope by CS3 fimbriae was constructed, namely, plasmids pCSXureB harboring ureB epitope and plasmids pAcYcysis harboring lysis cassette were transformed into *E. coli* together. The recombinant bacterial ghosts were then enfolded the *Helicobacter* DNA vaccine pcDNAKAT by incubating at 24°C for 30 min. It was confirmed by DNA agarose electrophoresis, fluorescent microscope that plasmids pcDNAKAT could bound to bacterial ghost unspecificly, successful loading also resulted in the fluorescence shift indicated by the *MFI* of flow cytometric analysis. The anti-katA antibody titer of mice immunized with packaged DNA vaccine was 1 : (520 ± 54), which was significantly higher than that of control groups ($P = 0.0058$), which was indicated strongly that bacterial ghosts could deliver DNA vaccine effectively.

Key words bacterial ghost, DNA vaccine, *Helicobacter pylori*, deliver system

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00675

*This work was supported by a grant from Hebei Education Department(2009113).

**Corresponding author.

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

Received: December 22, 2010 Accepted: March 22, 2011