

戈登链球菌的生物学特性及在黏膜疫苗的应用

贾 平 杜先智*

(重庆医科大学附属第二医院 重庆 400010)

摘 要: 戈登氏链球菌是一种非致病性革兰氏阳性黏膜共生菌, 参与组成人类口腔正常菌群。它具有特殊的生物学特性, 非常适合作为黏膜疫苗的载体。了解戈登氏链球菌的生物学特性, 常用表达体系及该菌在黏膜疫苗的应用情况, 将为其黏膜疫苗的进一步研制提供重要参考。

关键词: 戈登氏链球菌, 黏膜疫苗, 疫苗载体

The Bionomics of *Streptococcus gordonii* and Its Application in Mucosa Vaccine

JIA Ping DU Xian-Zhi*

(The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010)

Abstract: *Streptococcus gordonii* is a nonpathogenic gram-positive commensal bacterium and component of the normal microbial flora of the human oral cavity. It is suitable to be as a mucosa vaccine vector due to its special bionomics. knowing the bionomics of *Streptococcus gordonii*, the general expressing system, and the application of it in mucosa vaccine, will provide important reference for the further development of its mucosa vaccine.

Keywords: *Streptococcus gordonii*, Mucosa vaccine, Vaccine vector

就疾病的预防而言, 疫苗的研制是近年的热点。与传统疫苗相比, 黏膜疫苗有许多优势, 采用局部黏膜接种, 通过激活机体局部和系统双重而持续的免疫应答阻止病原微生物入侵, 还可通过诱导抗原特异性的黏膜耐受而选择性地治疗自身免疫性疾病、变态反应性疾病及感染性免疫病理紊乱等^[1]。黏膜疫苗载体种类较多, 其中非致病性革兰氏阳性菌—戈登氏链球菌为研究最多的载体菌之一。现将其生物学特性及在黏膜疫苗的应用作一综述。

1 生物学特性

1.1 一般特性

戈登氏链球菌, 又称 α 溶血性链球菌, 属于革兰氏阳性球菌属米勒链球菌组, 兼性厌氧, 是存在于人类口腔的一种非致病性黏膜共生菌, 为牙面的早期定居菌之一, 在儿童 6 个月大小时便开始出现, 因其生长的周围竞争较小, 故易生长^[2]。在口腔, 戈登氏链球菌主要参与牙菌斑的构成, 其菌细胞表面

有一系列的粘附素,可参与介导口腔其它细菌的粘附和聚集^[3]。该菌是一种自然突变菌,常与外界环境发生基因交换,体外实验已证实戈登链球菌可从唾液中摄取胞外游离DNA,表明该菌较易进行生物转化^[4]。同时该菌具有在人体持续增殖的潜力,并能稳定表达外源蛋白^[5],是较有前景的黏膜疫苗载体。

1.2 M6 蛋白的特性

M6 蛋白是化脓性链球菌表面的一种纤丝状蛋白^[6],常作为表达抗原的辅助工具,编码基因为 *emm6*。该蛋白的作用在于其分泌和锚定的特殊功能。其N端和C端具有各自的功能区,靠近N端的122个氨基酸组成一个功能区,作用在于将M6蛋白分泌到细胞表面,靠近C端的140个氨基酸组成另一个功能区,可将蛋白固定于细胞壁上,如果去掉了C端功能区,该蛋白就会直接分泌到细胞外^[7]。通过基因技术可将 *emm6* 整合入戈登氏链球菌的染色体中,得到表达M6蛋白的重组菌。再将M6蛋白与目标抗原进行融合表达,就可起到呈递抗原的作用。实验表明,即使 *emm6* 不完整,只要其编码的N端和C端区域的功能结构存在,同样可用于表达异源蛋白^[7]。利用这个表达系统,各种抗原,从15到450个氨基酸大小,都可在戈登氏链球菌菌体表面稳定表达,并有效检测。

2 常用表达体系

2.1 以 *emm6* 为基础的基因融合

首先利用大肠杆菌构建 *emm6* 与目的基因之间的基因融合^[8]。基础质粒PVMB20系大肠杆菌质粒,含有完整的 *emm6* 及 *ermC*(红霉素抗性基因),其他质粒都是在此基础上构建而成而具有不同特点和功能^[6,8]。其中衍生质粒PSMB55最常用于转化受体菌而表达抗原,该质粒同样含有 *emm6* 和 *ermC*, *emm6* 中心有538 bp大小的片段被一个28 bp大小的人工接头所取代,该接头含有多克隆位点,供外源基因进行整合^[8]。外源基因经相应酶切,连接于PSMB55的多克隆位点上,再经筛选鉴定,便可用于受体菌的转化。

2.2 常用受体菌

受体菌须带有与质粒载体同源的序列,才能使外源基因与受体菌染色体进行整合。利用基因技术

将 *emm6* 随机整合入戈登氏链球菌染色体上,可得到表达M6蛋白且与质粒载体有同源序列的重组菌^[7]。在Pozzi.G等构建的表达M6蛋白的重组菌中^[9],GP230应用较多。由GP230(含 *ermC*)可得到2种常用表达株GP251和GP1221^[7],在GP251染色体中, *emm6/ermC*片段的中心部位被 *cat*(氯霉素抗性基因)取代, *cat*两端分别连接剩下的 *emm6* 前145个核苷酸和 *ermC* 后202个核苷酸以作为质粒载体识别的同源序列,可用于表达15至440个氨基酸大小的外源蛋白;GP1221是以 *aph* (卡那霉素抗性基因)取代 *emm6/ermC* 中心部位构建而成,两端剩下的同源片段长度分别为504 bp和581 bp,其特点为转化效率高, Pozzi G等用1 μ g质粒DNA转化1 mL GP1221感受态细胞,便可得到 8.1×10^5 个转化子^[8],因此PSMB55/GP1221为常用的表达系统。成功转化的重组菌易筛选,100%对红霉素耐药^[7]。

2.3 受体菌的转化

质粒PSMB55并不在戈登氏链球菌内复制,而是将含有同源序列的基因整合于该菌的染色体中随染色体的复制而复制^[7]。目前已测得该菌接受生物转化的最佳条件和参数^[10],转化最适合在其指数生长期进行,转化效率与两者同源序列的长度成正比^[7]。转化原理(以GP1221为例)如图1^[7]。

3 黏膜疫苗的应用

3.1 口腔和鼻腔免疫

戈登氏链球菌存在于人体口鼻腔,因此口腔和鼻腔接种自然成为最可行也是最主要的免疫方式。鼻腔内存在上呼吸道、鼻腔和口腔的黏膜诱导部位—鼻相关淋巴组织(NALT)^[11],可经此诱导产生免疫效应,其机制主要为重组戈登氏链球菌通过诱导单核细胞向树状突细胞分化,并激活树状突细胞而引发局部和全身的免疫应答^[11]。

目前,很多目的抗原已经通过该菌成功表达,并进行了小鼠动物实验,证实了重组戈登氏链球菌可在小鼠口鼻腔增殖并能激发机体的免疫应答。Valeria Falcone等将表达人呼吸道合胞病毒糖蛋白G的重组戈登氏链球菌用皮下接种和鼻内黏膜接种的方式免疫小鼠^[12],结果发现,前者可以诱导出血清特异性的IgG,而在后者,血清和肺泡分泌液中都可检测到特异性IgA。用病毒攻击小鼠后发现肺内

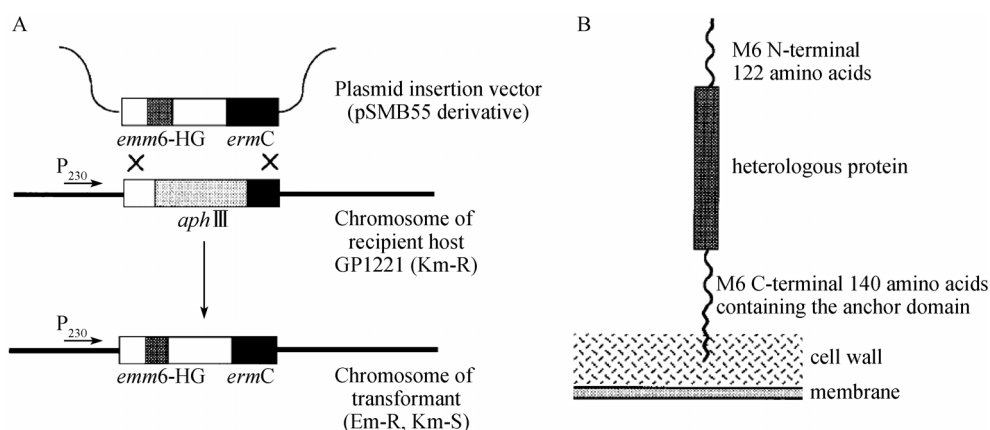


图1 转化原理图

Fig. 1 Principle diagram of translation

注: A: 外源基因(HG, 灰色表示)被插入到质粒 PSMB55 上 *emm6* 编码区(白色表示)之中, 构成新的重组质粒, 该质粒与受体菌 GP1221 的染色体同源部分发生同源重组, 取代受体菌的卡那霉素标记(*aphIII*, 浅灰色表示), 并在上游固有启动子 P_{230} 的作用下启动表达; B: 外源蛋白借助 M6 蛋白 N 端和 C 端功能区连接于细胞壁, 表达于链球菌细胞表面; Km-R: 耐卡那霉素; Km-S: 卡那霉素敏感; Em-R: 耐红霉素

Note: A: The DNA of a recombinant pSMB55 derivative is shown where a heterologous gene (HG, shown in gray) is inserted within the *emm6* coding region (white). The plasmid DNA recombines with regions of homology of the engineered locus of the chromosome of the recipient strain GP1221. The kanamycin marker (light gray) has been substituted with the recombinant insert. The expression of the gene fusion is derived by the upstream resident promoter P_{230} ; B: The recombinant fusion protein is linked to the cell wall and displayed on the streptococcal cell surface by the N-terminal and C-terminal region; Km-R: Kanamycin resistant; Km-S: Kanamycin sensitive; Em-R: Erythromycin resistant

病毒滴度明显低于对照组, 表明该疫苗的确可以减少病毒在小鼠肺内的复制。Song F. Lee等将表达百日咳毒素的重组菌接种于BALB/c小鼠口腔, 19周之后在60%的小鼠口腔内仍可检测到重组菌的存在^[13]。类似的Lee CW、Medaglini等分别将表达白喉毒素、大黄蜂毒液的重组戈登氏链球菌接种于小鼠口腔, 其可增殖时间分别为11周和12周^[2]。这表明, 重组菌具有在小鼠口腔增殖的能力, 但并非永久性的, 且不同的重组菌增殖能力也会有差异。在这三者的研究中, 小鼠唾液和肺灌洗液中都可以检测到抗原特异性IgA, 在肠灌洗液中也能检测到较低浓度的IgA, 这对于以口鼻为病原菌主要入侵门户的呼吸系统的免疫而言至关重要, 因为这样的免疫方式使病原菌在侵入呼吸系统以前便可被阻止, 但并非所有的菌株都能诱导出系统性IgG免疫反应。这可能与不同抗原免疫原性的差异有关, 同时也表明, 在现有研究中重组戈登氏菌的黏膜免疫效能并未达理想的水平。目前尚无人体临床实验检测重组戈登氏链球菌的免疫能力。

3.2 消化道和生殖道免疫

消化道免疫是黏膜免疫的另一种方式, 主要采取口服的形式。迄今为止, 除了脊髓灰质炎口服疫苗外, 几乎没有黏膜疫苗被有效地用于人^[1]。胃肠道

同样存在着黏膜诱导部位—Peyer氏结(Peyer's patch, PP), 可通过免疫活性细胞诱导免疫应答。Ricci等将表达不耐热肠毒素的重组戈登氏链球菌注入小鼠胃内, 在小鼠粪便和血浆中分别检测到抗原特异性的IgA和IgG^[7], 证实了该菌疫苗消化道免疫的潜力。但消化道免疫和生殖道免疫一样, 脱离了戈登氏链球菌特有的生长环境, 为持续增殖带来了困难, 且有研究证实鼻内接种比口服免疫更有效, 鼻内免疫需要较少的抗原就能诱导有效的免疫应答, 且没有抗原的丢失, 简单易行^[1]。相比而言, 沙门氏菌等肠道寄生疫苗载体在消化道免疫方面则更有优势。

生殖道黏膜免疫主要针对以生殖道黏膜为感染途径的疾病, 如艾滋病等。目前尚无有效的生殖道黏膜疫苗应用于临床。Pozzi G等将表达人类乳头瘤病毒(HPV-16)E7蛋白的重组戈登氏链球菌接种于小鼠阴道黏膜, 在小鼠阴道分泌物和血浆中分别检测到抗原特异性IgA和IgG^[7]。Barbara等将一种艾滋病病毒灭活蛋白CV-N成功表达于戈登氏链球菌, 体外实验证实该蛋白的确有俘获HIV病毒的能力, 可望将来通过黏膜接种, 从性传播途径上预防艾滋病的发生^[14]。Oggioni等在用表达白色念珠菌相关抗原的戈登氏链球菌免疫小鼠阴道的实验中也发现, 免

疫效果与给予氟康唑治疗的效果相当^[15]。这些研究为戈登氏链球菌在阴道免疫的应用提供了较好的参考,但相比其他部位的黏膜免疫而言,阴道的局部免疫应答往往需要重复的接种和较多量的抗原方能诱导,抗原的局部降解、阴道上皮细胞通透性的改变、宿主的动情周期等因素都会对免疫应答的产生带来影响^[7]。

3.3 人体安全性和增殖问题

本菌一般不致病,国外有报道该菌是感染性心内膜炎的病原菌之一^[16],近年国内也有报道在亚急性细菌性心内膜炎的患者血液中检测出戈登氏链球菌^[17],该菌通过血流侵入心瓣膜而引发瓣膜病变,往往发生于抵抗力下降、不合理使用抗生素、有口腔创伤的患者,但发病率低,其发病机理可能与有毒株能逃避黏附素介导的吞噬作用有关^[16]。为研究该菌作为疫苗载体的安全性问题, Karen L等将不表达任何外源抗原但含有抗性标记的重组菌SP204接种于150名健康志愿者口腔以观其毒性反应^[18],结果发现,在接种引起的头痛、咽喉痛、鼻充血、发热等症状中,大多患者反映轻微,在短期内便可恢复,使用常用抗生素则能加速恢复,证明人体对该菌耐受良好。值得注意的是,虽然早期的研究表明将天然菌株移植回人体口腔,该菌仍可持续增殖2年以上^[19],但该实验报道SP204在志愿者体内最多只能存活35 d,而作为接种人体的理想黏膜疫苗,这个增殖时间显然是不够的。目前也没有其它研究详细报道重组菌在人体的增殖能力。戈登氏链球菌属黏膜共生正常菌群,其生存与其他共栖菌群的相互作用、与宿主的免疫状态等因素都有重要联系。重组菌株是否改变了与其他菌群的共生关系,或已作为人体免疫监视的目标,以及如何提高重组菌在人体的增殖能力等问题,须在以后的研究中予以阐明。

4 结语

黏膜疫苗通过激活机体黏膜和系统双重免疫应答而达到预防疾病的目的。戈登氏链球菌作为黏膜疫苗载体,其潜力已被看好,但其免疫效应并未达到理想的水平。目前, Karen G等发现戈登氏链球菌脂膜酸中的某种成分对于调节免疫应答起关键作用^[5]。也有报道如果将目的基因与某些细胞因子(如

IL-2, IFN- γ)进行融合表达,会具有更好的免疫力^[20]。为该菌黏膜疫苗的研究提供了重要参考。同时,对于重组菌的持续增殖问题,尚需进一步研究。相信随着微生物学和基因工程技术的成熟和完善,这些问题会得以很好的解决。

参 考 文 献

- [1] 孟晓丽,殷国荣. 黏膜疫苗及其佐剂的研究进展. 国外医学-寄生虫分册, 2005, 32(1): 23-29.
- [2] Song F Lee. Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: potential use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens. *Curr Opin Infect Dis*, 2003, 16: 231-235.
- [3] 何俐,边专,张倩. 变形链球菌葡糖基转移酶基因在戈登链球菌中的表达. 武汉大学学报-医学版, 2005, 26(3): 340-342.
- [4] Wang BY, Chi B, Kuramitsu HK. Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. *Oral Microbiol Immunol*, 2002, 17(2): 108-112.
- [5] Karen G Chan, Matt Mayer, Elisabeth M Davis, et al. Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity. *Infect Immun*, 2007, 75(6): 3033-3042.
- [6] Provvedi R, Maggi T, Oggioni MR, et al. Selection and characterization of a promoter for expression of single-copy recombinant genes in Gram-positive bacteria. *BMC Biotechnology*, 2005, 5: 3.
- [7] Oggioni MR, Medaglini D, Maggi T, et al. Engineering of the Gram-positive bacterial cell surface for the construction of bacterial vaccine vectors. *Methods*, 1999, 19: 163-173.
- [8] Oggioni MR, Pozzi G. A host-vector system for heterologous gene expression in *Streptococcus gordonii*. *Gene*, 1996, 169: 85-90.
- [9] Pozzi G, Oggioni MR, Manganelli R, et al. Expression of M6 protein gene of *Streptococcus pyogenes* in *Streptococcus gordonii* after chromosomal integration and transcriptional fusion. *Res Microbiol*, 1992, 143: 449-457.
- [10] Pozzi G, Musmanno RA, Lievens J, et al. Method and parameters for genetic transformation of *Streptococcus sanguis* *challis*. *Res Microbiol*, 1990, 141: 659-670.
- [11] Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, et al. Stimulation of Human Monocytes with the Gram-Positive Vaccine Vector *Streptococcus gordonii*. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(9): 1037-1043.
- [12] Falcone V, Mihm D, Costa C, et al. Systemic and mucosal immunity to respiratory syncytial virus induced by recombinant *Streptococcus gordonii* surface-displaying a domain of viral glycoprotein G. *FEMS Immunol Med Mi-*

- crobiol*, 2006, **48**(1): 116–122.
- [13] Lee SF, Halperin SA, Wang H, *et al.* Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii* expressing a pertussis toxin S1 fragment in mice. *FEMS Microbiol Letts*, 2002, **208**: 175–178.
- [14] Giomarelli B, Provvedi R, Meacci F, *et al.* The microbicide cyanovirin-N expressed on the surface of commensal bacterium *Streptococcus gordonii* captures HIV-1. *AIDS*, 2002, **16**: 1351–1356.
- [15] Oggioni MR, Beninati C, Boccanera M, *et al.* Recombinant *Streptococcus gordonii* for mucosal delivery of a scFv microbicidal antibody. *Int Rev Immunol*, 2001, **20**(2): 275–287.
- [16] Lee SY, John O. Cisar, Joseph L. Bryant, *et al.* Resistance of *Streptococcus gordonii* to polymorphonuclear leukocyte killing is a potential virulence determinant of infective endocarditis. *Infect Immun*, 2006, **74**(6): 3148–3155.
- [17] 刘春国, 周 斌. 从血液中检出格氏链球菌 1 例. *中华医学研究杂志*, 2005, **5**(10): 976–976.
- [18] Karen L Kotloff, Steven S Wasserman, Kevin F Jones, *et al.* Clinical and microbiological responses of volunteers to combined intranasal and oral inoculation with a *Streptococcus gordonii* carrier strain intended for future use as a group A *Streptococcus* vaccine. *Infect Immun*, 2005, **73**(4): 2360–2366.
- [19] Fischetti VA, Medaglini D, Pozzi G. Gram-positive bacteria for mucosal vaccine delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, **7**: 659–666.
- [20] Chelsea M Byrd, Tove C Bolken, Kevin F Jones, *et al.* Biological consequences of antigen and cytokine co-expression by recombinant *Streptococcus gordonii* vaccine vectors. *Vaccine*, 2002, **20**(17-18): 2197–2205.

勘 误

由于排版人员的疏忽，本刊 2008 年 35(2)期 p.262 题名为“酿酒酵母乙醇脱氢酶 I 基因的超表达”的表 1 引物序列有误，正确的引物序列列表如下，特此更正并向所有作者和读者致歉！

表 1 扩增引物
Table 1 Primers used for amplification

引物 Primers	长度 Length	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
<i>adh</i> -F	20	CTGAAGGCTAGGCTGTGGAT	
<i>adh</i> -R	20	TACACTGCCTCATTGATGGT	
PGK-F	20	GAAACCGACCATAGAAGAGT	
PGK-R	20	CAAGTCGTATTCAAAGGCAC	
F-PGK1	26	CCGGATATCCAGACAACCTTTGAAGAT	<i>EcoR</i> V
F-PGK2	37	GAGTTTCTGGGATAGACATTCTAACTGATCTATCCAA	
F- <i>adh1</i>	37	TTGGATAGATCAGTTAGAATGTCTATCCCAGAACTC	
F- <i>adh2</i>	34	GGACTAGTTATTAGAAGTGTCACAAACGTATC	<i>Spe</i> I
CYC-F	26	GGACTAGTGGCCGCAATTAAGCCT	<i>Spe</i> I
CYC-R	28	TCCCCGCGGGTCATGTAATTAGTTATGT	<i>Sac</i> II
Y1	18	CTGTGCGTCTTGAGTTGA	
Y2	18	CGGAGATAGCAACCCAGT	

在此也特别提醒广大作者在清样校对过程中一定要认真校对。