

转基因益生菌：预防肠道感染的新型微生态制剂

林 勇 姚 文 朱伟云*

(南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

摘 要：引起主要肠道疾病的许多致病菌能够特异性地利用宿主肠道细胞表面的各式寡糖，将其作为自身黏附或者分泌毒素的受体。因此，阻断致病菌及其分泌毒素与宿主靶细胞表面受体结合是一种可行的治疗方法。一类宿主肠道细胞表面受体基因重组益生菌在消化道内能够高效结合致病菌和所分泌的毒素，具有良好的预防肠道疾病的应用前景。本文主要以类志贺毒素受体重组益生菌为例，阐述转基因益生菌的原理、技术及其疗效和潜在的问题与对策。

关键词：类志贺毒素，转基因，益生菌

Recombinant Probiotics for Prevention of Enteric Infections

LIN Yong YAO Wen ZHU Wei-Yun*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Many microbial pathogens, including those responsible for major enteric infections, exploit oligosaccharides that are displayed on the surface of host cells as receptors for toxins and adhesins. Blocking crucial ligand receptor interactions is therefore a promising therapeutic strategy. One approach is to express molecular mimics of host receptors on the surface of harmless recombinant bacteria that can survive in the gut. These recombinant probiotics bind bacterial toxins in the gut lumen with very high avidity, thereby preventing disease.

Keywords: Toxins, Recombinant, Probiotics

自上世纪 60 年代中期益生菌(Probiotics)概念被提出以来，对益生菌作用原理和应用的研究取得了令人瞩目的进展。传统理论认为益生菌是来源于动物自身肠道或其它生态环境的天然有益微生物。其预防和治疗肠道功能紊乱的机制是益生菌可以竞争性地排斥病原菌并产生多种抑菌物质，从而维持肠道内微生物区系的平衡，达到防病、治病的目的。这些传统益生菌符合人们追求天然食品的心理，但不能特异性地预防并治疗由肠道特定病原菌和其分泌的关键毒素引起的疾病。

由肠道致病菌引起的腹泻类疾病，每年在全球导致约两百多万人死亡。而在动物生产中，肠道感染也是危害家畜健康的最常见疾病之一。临床治疗上通常使用抗生素类药物对这类疾病进行控制，由于会增加致病菌的耐药性而使腹泻症状更加严重^[1]。随着分子生物学和基因工程等相关技术的发展，研究者开始根据实际需求，由被动筛选天然益生菌转为主动改造菌种，从而获得一些具有特定功能性状的转基因益生菌，借此探索预防和治疗肠道感染类疾病的新方法。

基金项目：高校博士学科点专项科研基金(仔猪水肿病的专用疫苗及其益生菌开发的研究)

* 通讯作者：Tel: 025-84395523; ✉ zhuweiyunnjau@hotmail.com

收稿日期：2007-10-18; 接受日期：2007-12-09

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 基因重组宿主受体表达的益生菌

1.1 基因重组益生菌作用机理

对于致病菌与宿主细胞相互作用在发病机理中的认识推动了新的抗肠道感染方法的建立,即利用重组益生菌大量地表达肠道细胞受体,以阻断病原体和毒素与宿主细胞结合。宿主细胞膜表面含有丰富的糖蛋白和糖脂,其中寡糖链作为受体识别关键的结构,参与了分子识别和细胞识别。宿主细胞膜表面的寡糖受体随物种、细胞类型、生理期的不同而不同。其特异性取决于单糖单位、糖苷键以及直链或支链的变化。肠道致病菌或/和其分泌的毒素通过识别和特异性地结合寡糖受体,定殖于宿主肠道黏膜,协助毒素或致病菌进入宿主细胞,从而干扰正常的细胞功能。目前,人和动物肠道重要致病菌的关键毒素和黏附素结构以及宿主特异性寡糖受体结构均已被破解,阻断病原菌及毒素特异地结合到肠上皮细胞对应的受体上可有效地预防肠道致病菌的感染,并且不会产生耐药性微生物。当已知某种病原菌侵染肠道时,口服表达该病原菌受体的重组益生菌可以竞争地与肠道上皮细胞结合,有效地减少了病原菌或/和毒素侵染宿主的机会,有效地预防和治疗肠道病原菌的感染^[2]。

1.2 基因重组益生菌生产工艺

通过基因重组技术,将表达宿主细胞表面受体的异源功能基因转入到无致病性的受体细菌内,生产出基因重组益生菌,外源基因在重组益生菌中得以表达,并转运到细胞膜表面,使外膜富含病原菌受体。另外,相关的糖基转移酶决定了糖蛋白和糖脂上寡糖链的特异性,因此,将对应病原菌受体的糖基转移酶重组到非病原菌体内,并使之表达,也可生产出重组益生菌。当然,一些特定的病原性革兰氏阴性菌,例如嗜血性流感杆菌、脑膜炎奈瑟球菌、淋病奈瑟球菌、空肠弯曲杆菌和幽门螺旋杆菌等能模拟宿主细胞表面寡糖分子结构并表达在自身的细胞膜上,使得病原菌可能顺利地逃过免疫监视。这些存在于病原菌体内的糖基转移酶也可以作为天然的供体基因转移到受体菌当中去^[3]。

2 基因重组益生菌的疗效

2.1 类志贺毒素受体表达的基因重组益生菌

2.1.1 类志贺毒素晶体结构及其受体结构简介: 类

志贺毒素(SLT)是由一类产类志贺毒素大肠杆菌(STEC)所分泌的毒素,易引起婴、幼儿腹泻以及人出血性结肠炎和溶血性尿毒综合症,在动物上还会引起猪水肿病。类志贺毒素是一种典型的AB₅模式蛋白毒素,即完整的毒素是由1个A亚单位和5个B亚单位组成的复合体,其中B亚单位为结合单位,能使毒素分子特异性地结合在宿主易感组织的细胞膜受体上,并协助A亚单位穿过细胞膜^[4]。B亚单位五聚体构成受体结合蛋白复合体,每一个亚单位又含有多个受体结合位点。例如组成SLT-I、SLT-II的B亚单位含3个受体结合位点,其中位点3更接近B亚单位五聚体的中心,外围的结合位点1、2比位点3重要^[5],从而使B亚单位五聚体的表面均匀分布着15个受体结合位点,这解释了AB₅模式蛋白毒素能高效和多价地黏附在宿主靶细胞膜受体上。SLT-I、SLT-II对应受体的寡糖链结构也已被分析出来,为Gb₃(Gal(α1,4)Gal(β1,4)Glc-cerami-de)。对一系列AB₅模式蛋白毒素晶体结构的研究,促进了高效价的模拟宿主表达的基因重组益生菌的设计和合成,显著提高了其与对应毒素的黏附性。

2.1.2 类志贺毒素 I 型、II 型受体基因重组益生菌设计原理和疗效: 近年来通过基因重组的益生菌主要预防由产类志贺毒素大肠杆菌感染引起的一些疾病。通过基因重组,使得重组细菌细胞表面表达类志贺毒素受体,因此具有很高的吸收和中和类志贺毒素的能力^[6]。这里选择的受体细菌是大肠杆菌的一种变异类型*E. coli* CWG308,因为*waaO*基因的突变,使得大肠杆菌细胞膜外的LPS构型改变,末端以Glc糖基结尾。通过转化,将携有两个奈瑟球菌半乳糖基转移酶基因(*lgtC*和*lgtE*)的质粒转入*E. coli* CWG308,使得*E. coli* CWG308在细胞膜外表达LPS时,按照正常的合成途径,在侧链多糖Glc糖基末端连上-Gal(β1,4)Gal(α1,4),最终使LPS末端转变为-GlcGal(β1,4)Gal(α1,4),即模拟宿主的类志贺毒素受体Gb₃。实验结果表明,1 mg该转基因益生菌在体外能中和至少100 μg的SLT-I或SLT-II,并且在老鼠毒理学实验中,口服此类转基因益生菌能完全预防老鼠服用致死量的产类志贺毒素大肠杆菌所引起的疾病^[6]。其中和类志贺毒素结合的效果优于人工合成寡糖,因为转基因益生菌细胞膜外的毒素受体的高密度二维空间排布,并且由于细胞膜本身的流动性,使得毒素受体能灵活地改变在膜外的排布方式,

能更好地结合毒素。

2.1.3 SLT-2e受体表达基因重组益生菌的疗效: 中和其它AB₅模式蛋白毒素的转基因益生菌也正不断地深入研究。例如, 断奶仔猪水肿病是一种肠毒血症, 发病率通常为 10%~30%, 病死率高达 80%~100%, 危害性较大, 目前还没有好的防治方法^[7]。水肿病系由产类志贺毒素大肠杆菌引起的, 常见血清型为O138:K81、O139:K82 和 O141:K85, 该菌产生的类志贺毒素SLT-2e是导致该病发生的主要毒力因子。SLT-2e是类志贺毒素(SLT-I和SLT-)家族中的一员, 其生物学活性与志贺毒素及其它SLT十分相似。SLT-2eB亚单位的最佳受体是球丁糖基神经酰氨(Gb4 ;GalNAc(β1,3)Gal(α1,4)Gal(β1, 4)-Glc -ce- ramide)^[8]。Paton在能模拟表达受体Gb₃转基因益生菌 *E. coli* CWG308 的基础上, 再将N-acetylgalactosamine转移酶基因(*lgtD*; 来自 *N. gonorrhoeae*)和UDP-N-acetylglucosamine-4-异构酶基因(*gne*; 来自 *E. coli* O113)导入受体菌内, 最终构建了能在细胞膜上模拟表达受体Gb₄的转基因益生菌^[9]。实验结果表明, 该转基因益生菌在体外能中和 98.4%的SLT-2e粗提取物, 但是中和SLT-I和SLT- 的能力却显著降低, 这可能是末端GalNAc糖基在原子空间排布上阻碍了SLT-I和SLT- 的B亚单位与该转基因益生菌膜上模拟受体的相互作用。当然, 在饲料中添加转基因益生菌是否能够有效预防断奶仔猪水肿病, 还应该在动物饲养模型中得到进一步的验证。

2.2 其它毒素受体表达基因重组益生菌的疗效

根据利用非致病性细菌作为受体细菌, 模拟表达其它肠毒素受体结构的原理, Paton 研制了一种新型的转基因益生菌(CWG308:pLNT), 旨在预防和治疗由产不耐热肠毒素(LT)大肠杆菌引起的腹泻^[10]。这种转基因益生菌, 是以*E. coli* CWG 308 为受体细菌, 将脑膜炎奈瑟球菌或空肠弯曲菌的糖基转移酶基因导入受体菌内, 使受体菌细胞膜外的LPS以lacto-N-neotetraose (LNnT)为末端。实验结果表明, CWG308:pLNT在体外至少使 93.8%的粗制LT失活, 并且能够吸附 5%自身重量的纯LT。在兔肠段结扎实验中, 预先或同时与LT服用CWG308: pLNT, 能有效阻止LT介导的肠细胞分泌机能的亢进。另外, 为预防和治疗由霍乱弧菌感染引起的霍

乱, Focareta开发了新的转基因益生菌。将淋病奈瑟球菌和空肠弯曲菌的糖基转移酶基因导入受体菌内, 使得受体菌细胞膜外的LPS末端结构类似于霍乱毒素受体。实验结果表明, 该转基因益生菌在体外能够吸附至少 5%自身重量的纯Ctx。在幼鼠毒理实验中, 攻毒后 1 h服用转基因益生菌的 12 只幼鼠全部存活, 而未经任何处理的对照组的 12 只幼鼠, 在攻毒后仅存活一只。实验结果表明, 使用转基因益生菌, 是一种可行的、能有效预防和治疗一些与肠毒素有关的、肠道感染类疾病的新方法^[11]。

3 需解决的问题和对策

转基因益生菌存在的一个主要问题是属于转基因食品(GMO)范畴, 它的应用在大多数国家受到严格地管制, 即便是非常有效, 也有可能因为公众的抵制而没有市场前景。然而, 转基因益生菌并非一定要在存活的状态下才会发挥效用。经过灭活处理的转基因益生菌不属于转基因食品, 也就不受到国家法规的约束, 并且容易使公众接受。在老鼠用产SLT-2 的STEC的攻毒实验中, 服用致死剂量的O113:H21 STEC后, 口服甲醛灭活处理的转基因益生菌(CWG308: pJCP-Gb3), 只要适当增加服用频率, 仍能有效地保护老鼠使其全部存活^[12]。因为细菌的失活使其被胃肠道排空速度加快, 而必须增加饲喂次数来保证保护效用。用甲醛灭活处理的转基因益生菌, 在 4 液体冷藏保存或制成冻干粉, 可长时间保持中和毒素的效用。

要使转基因益生菌发挥出理想的治疗效果, 必需在疾病发生早期使用。由STEC感染引起的疾病, 自早期肠胃病症出现到最终危及生命通常有一个星期左右的时间。因此, 要在临床上取得治疗效果, 必须在这期间使用转基因益生菌。在老鼠毒理实验中, 服用致死量的产SLT-2 STEC后 48 h, 使用转基因益生菌, 能达到显著的保护作用^[12]。当然, 临床上早期使用转基因益生菌, 需要人们能快速、准确的检测到STEC, 运用快速ELISA或者PCR-screening检测分析病人的粪样可以方便进行早期诊断^[13]。

口服转基因益生菌可能会引起机体免疫应答是另一个值得认真思考的问题。机体对自身成分存在免疫耐受。转基因益生菌由于能够在细胞膜上模拟表达宿主肠壁细胞表面受体, 这种持续暴露“自身抗原”, 在调整自身免疫与非自身免疫中发挥了关

键作用,导致了特异性免疫耐受^[2]。有研究表明,嗜血性流感杆菌和病原性奈瑟球菌,能于细胞膜外模拟表达鞘糖脂类宿主受体Gb₃和Gb₄,在其定殖黏膜和系统感染宿主细胞引发的免疫应答中,与Gb₃、Gb₄没有相关性^[3]。另据研究表明,于细胞膜外模拟表达神经节苷脂类宿主受体GM₁的空肠弯曲菌与其它未知血清型的空肠弯曲菌是格林-巴利综合征(GBS)病前主要的感染因子之一,但是空肠弯曲菌感染与GM₁没有相关性^[14]。

4 讨论

在人类医药和畜牧生产中,寻找并建立新的抗肠道感染方法,以替代传统的抗生素治疗,已经变得越来越迫切。在一些疾病中,阻断病原菌与宿主靶细胞受体间的相互作用成为关键。此种方法的最大特点在于,它并不会增强致病菌的耐药性,并且后者可通过大规模的发酵获得,因此在生产成本上占有很大的优势。以后,还需对转基因益生菌做进一步的改进,以满足人类的需求。同时,在未来通过食品级细菌,如乳酸杆菌和乳球菌,在细胞膜外表达特异性的寡糖也将成为可能。虽然这些革兰氏阳性菌细胞膜外相关多糖结构基因表达还未完全研究透彻,但是类似的操作在一些大肠杆菌上已成为可能,这样利用无害的食品级细菌模拟表达宿主细胞受体同样能达到预防一些疾病的效果^[15]。转基因益生菌的应用将会给预防、治疗一些肠道感染类疾病,研究病原菌与靶细胞之间的相互关系提供新的方法。

参 考 文 献

- [1] Servin AL. Antagonistic activities of *Lactobacilli* and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, **28**(4): 405–440.
- [2] Karlsson KA. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol Microbiol*, 1998, **29**(1): 1–11.
- [3] Harvey HA, Swords WE, Apicella MA. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun*, 2001, **16**(3): 257–262.
- [4] Mulvey G, Kitov PI, Marcato P, *et al.* Glycan mimicry as a basis for anti-infective drugs. *Biochimie*, 2001, **83**(8): 841–847.
- [5] Bast DJ, Banerjee L, Clark C, *et al.* The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. *Mol Microbiol*, 1999, **32**(5): 953–960.
- [6] Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent for treatment of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nature Med*, 2000, **6**(3): 265–270.
- [7] Tsiloyiannis VK, Kypiakakis SC, Vlemmas L, *et al.* The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. *Res Vet Sci*, 2001, **70**(3): 281–285.
- [8] Zweifel C, Schumacher S, Beutin L, *et al.* Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Vet Microbiol*, 2006, **117**(3): 328–332.
- [9] Paton AW, Morona R, Paton JC. Neutralization of Shiga toxins Stx1, Stx2c and Stx2e by recombinant bacteria expressing mimics of globotriose and globotetraose. *Infect Immun*, 2001, **69**(3): 1967–1970.
- [10] Paton AW, Jennings MP, Morona R, *et al.* Recombinant probiotics for treatment and prevention of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Gastroenterology*, 2005, **128**(5): 1219–1228.
- [11] Focareta A, Panton JC, Morona R, *et al.* A Recombinant probiotic for treatment and prevention of cholera. *Gastroenterology*, 2006, **130**(6): 1688–1695.
- [12] Paton JC, Rogers TJ, Morona R, *et al.* Oral administration of formalin-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxinogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2001, **69**(3): 1389–1393.
- [13] Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, EHEC-hlyA, rfbO111 and rfbO157. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(2): 598–602.
- [14] Yuki N, Susuki K, Koga M, *et al.* Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(31): 11404–11409.
- [15] Yoshida Y, Ganguly S, Bush CA, *et al.* Carbohydrate engineering of the recognition motifs in streptococcal co-aggregation receptor polysaccharides. *Mol Microbiol*, 2005, **58**(1): 244–256.