

肉毒中毒症疫苗的研究现状

彭国瑞,彭小兵,李旭妮,杜吉革,蒋玉文*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-06-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 09-0066-04 [中图分类号] S859.797

[摘要] 用于预防肉毒中毒症的传统疫苗有灭活菌苗和类毒素疫苗,近年来对于重组亚单位疫苗、重组嵌合体疫苗和 DNA 疫苗等研究成为热点,文章着重对这些新型疫苗的发展现状进行了综述,以期为相关研究提供借鉴。

[关键词] 肉毒中毒症;毒素;新型疫苗

Current Status of Research on Botulism Vaccines

PENG Guo-rui, PENG Xiao-bing, LI Xu-ni, DU Ji-ge, JIANG Yu-wen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The traditional vaccines included inactivated vaccines and toxoid vaccines, and the new types of vaccines included recombinant subunit vaccines, recombinant chimeric vaccines and DNA vaccines. In order to provide reference for development on botulism vaccines, this paper reviewed the current status of research on these vaccines which had been developed rapidly in recent years.

Key words: botulism; neurotoxin; new types of vaccines

肉毒中毒症(botulism)是机体经消化道或伤口摄入了肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)或其外毒素肉毒毒素(botulinum neurotoxin, BoNT)而引起的一种急性、高度致死性、中毒性疾病。肉毒毒素是目前已知毒物中毒性最强的一种,是肉毒梭菌主要的致病性毒力因子,也是防治肉毒中毒症的关键免疫抗原。依据抗原性,毒素分为 A、B、C、D、E 和 F 型,其中 A、B、E、F 型均可引起人食物中毒, A、B 型毒素引起马、牛、水貂等动物饲料中毒, C 型毒素为马、牛、羊以及水貂肉毒中毒症和水禽软颈病的主要病因, D 型毒素是牛、绵羊肉毒中毒的病因。大多数菌株只产生一种毒素,有些可产生两种,但其

中一种占优势,如 Ab、Af、Ba、Be、Bf,用各型毒素或类毒素免疫动物,只能获得中和相应型毒素的特异性抗毒素。有些产生 C/D 嵌合毒素,但没有菌株可以同时产生 C 和 D 两种毒素, C、D 毒素有共同的表位,多抗有交叉反应^[1]。尽管各型之间在免疫学特性、毒力、自然致病动物类型上各不相同,但生化作用和结构却极为相似。该毒素通常由相对分子质量约 150 kD 的单链毒素前体,经内源性或外源性蛋白酶作用产生切口,形成以二硫键相连的双链结构,其中相对分子质量约 50 kD 较小片段为轻链(light chain, LC),具有锌依赖金属内肽酶活性,是毒素的毒性作用位点;100 kD 较大片段为重链

作者简介: 彭国瑞,硕士,从事兽用生物制品检验和研究工作。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail:jiangyuwen@ivdc.org.cn

(heavy chain, HC) 不具毒性, 负责与受体结合及轻链的内化^[2]。

肉毒中毒症对公共卫生、安全和畜牧业存在着较大的风险, 接种疫苗是预防该病最有效的方法之一。目前针对该病的常规疫苗有灭活疫苗和类毒素疫苗, 随着生物技术的发展, 重组亚单位疫苗, 重组嵌合体疫苗和 DNA 疫苗等新型疫苗的研究得到迅速发展。本文将就这些新型疫苗的研究现状进行综述, 以期对相关研究提供借鉴。

1 常规疫苗

灭活菌苗是将含特定毒素型肉毒梭菌菌液用甲醛溶液灭活后, 加入适当的佐剂或是干燥处理制成, 多种毒素型按适当比例添加制成多价苗, 或是与预防其他疾病的疫苗一同制成联苗。与菌苗相比纯化后脱毒制备的类毒素疫苗, 可以降低杂蛋白可能引起的副反应。美国、德国和俄罗斯研制和储备了单价、三价和五价的类毒素疫苗, 主要用于实验室工作人员和执行特殊任务军人的免疫接种^[3]。澳大利亚和非洲的一些国家, 每年都会对水貂、牛、羊、雉等畜禽进行类毒素免疫接种^[4]。但传统疫苗制备过程复杂, 生产条件要求较高, 生产过程存在安全风险, 以及脱毒剂在发挥脱毒作用的同时对抗原表位有一定的破坏, 导致免疫效率低。

优化脱毒方法, 尽可能保持免疫原性关键表位的完好, 对提高免疫效果具有重要意义。James E K 等对脱毒剂浓度、脱毒时间以及是否加入赖氨酸等条件进行研究, 表明 0.08% 甲醛浓度 37 °C 脱毒 28 d 以上可获得免疫原性优良的类毒素^[5]。Jones R G 等用碘乙酰胺烷基化的方法使 B 型毒素的毒力降低 7 个数量级乃至几乎无毒状态, 具体方法是用 1 体积 1 mg/ml 的毒素与 3 体积新鲜制备的烷基化缓冲液 (66.67 mmol/L Tris、1.33 mmol/L EDTA、2.67 mol/L NaCl、2.67 mol/L 尿素和 266.7 mmol/L 碘乙酰胺, pH 8.0) 混合, 37 °C 作用 3 h, 然后进行透析。该方法制备的类毒素刺激机体产生的中和抗体比甲醛脱毒法制备的类毒素高 600 倍^[6], 小鼠免疫 49 d 之后, 每毫升血清能中和 10^7 个 LD₅₀ 的毒素, 较甲醛类毒素和重组受体结合域亚单位疫苗

(rBoNT-Hc) 的免疫反应更快更有效^[7]。

2 重组毒素疫苗

随着肉毒毒素的结构、生物活性以及基因突变等方面研究不断深入, 有关肉毒中毒症重组疫苗研究成为热点。

2.1 受体结合域(Hc 片段)疫苗 无毒性的肉毒毒素受体结合域片段 (BoNT-Hc) 能够有效保护动物模型抵抗相应型毒素攻击, 同时又能降低安全风险, 被认为是很有潜力的候选疫苗^[8]。Yari 等^[9] 原核表达制备了 rBoNT/A-Hc, 经过对培养基组成、诱导剂剂量、诱导温度及时间等表达条件进行优化, 最高获得了 52.1 mg/L 的可溶性 rBoNT/A-Hc。Byrne 等^[10] 在真核毕赤酵母表达人工合成编码 BoNT-Hc 的基因, 纯化后每千克湿细胞可产生纯度超过 98% 具有免疫原性的 rBoNT-Hc 蛋白 200 ~ 500 mg。以弗氏佐剂或铝胶佐剂皮下和肌肉注射免疫 rBoNT/F-Hc 一次 (5 mg) 或二次免疫 (每次 ≥ 0.04 mg) 就能够保护小鼠对 2×10^4 个 LD₅₀ 的 BoNT/F 攻击^[11]。Yu YZ 等^[12] 证实小鼠二次免疫 (每次 ≥ 0.2 mg) 或三次免疫 (每次 ≥ 0.04 mg) 的 rBoNT/A-Hc 后均能抵抗 10^6 个 LD₅₀ 毒素的攻击。由于 BoNT-Hc 基因中含较高的 A 和 T 不利于原核表达, Zichel 等^[13] 用天然基因在含有蛋白质二硫键异构酶 (PDI) 以及具有还原或氧化作用的非细胞开放系统 (CE) 中, 直接制备了 A、B 和 E 型肉毒毒素 Hc 片段的融合蛋白, 提高了产量, 动物实验证实其具有很好的免疫原性。2004 年第一个肉毒中毒症重组亚单位疫苗 rBV A/B (*Pichia pastoris*) 被用于人体临床试验^[14]。在重组嵌合疫苗的研究方面, 嵌合了 LTB 佐剂的 C 和 D 型肉毒毒素 Hc 片段免疫牛, 产生的抗体可以分别中和 5 IU/mL 的 C 型肉毒素和 6.14 ± 1.06 IU/mL 的 D 型肉毒素, 这一效果得到了巴西农业部的认可^[15-16]。

2.2 突变型重组毒素疫苗 对 A 型肉毒毒素的基因 E224A/E262A 位点进行双基因突变, 得到与天然毒素结构相似的无毒性突变型重组毒素, 小鼠腹腔注射免疫 24.0 μ g, 用红外 (NIR 800) 标记检测其在体内的分布情况类似于天然毒素, 通过吸入免疫

刺激产生的体液免疫和粘膜免疫水平足以使小鼠抵抗天然毒素攻击^[17]。

2.3 其他候选亚单位疫苗 罗森和贾宏丽等通过原核表达系统获得了重组 A 型肉毒毒素轻链(rBoNT/A-LC),研究证实其具有反应活性和蛋白酶催化活性^[18-19]。血细胞凝集素 33(HA-33)是 BoNT/A 复合体的组成成分,在肠道内对 BoNT/A 起保护和辅助作用,Sayadmanesh 等^[20]研究表明,重组 HA-33 免疫小鼠两周后,用 ELISA 检测免疫血清,对 HA-33 的抗体滴度可达 1:128000。但是,能否将这些重组蛋白作为候选亚单位疫苗用于肉毒症的预防还需进一步的试验研究。

3 DNA 疫苗

Scott 等^[21]以单价和三价 A、B 和 E 型肉毒毒素受体结合域片段(BoNT-Hc)为靶位,人工合成了 DNA 疫苗,免疫实验动物后,激活了强大的体液免疫和 CD4 T 细胞免疫,二次免疫可以实现对机体的完全保护,免疫血清能中和最小致死剂量的毒素。Balb/c 小鼠接种了携带 BoNT/A-Hc 基因的来源于森林病毒(SFV)质粒 DNA 复制子的疫苗后,AHc 和粒细胞巨噬细胞克隆刺激因子(GM-CSF)在 SFV 上共表达,特异性地激活了机体针对 AHc 的体液免疫和细胞免疫,免疫原性被加强,抗 AHc 抗体滴度和小鼠对 BoNT/A 攻击的存活率均显著提高,再经磷酸铝胶佐剂二次免疫,免疫效力得到进一步增强^[22]。这些研究结果证明,DNA 疫苗可以诱导机体产生免疫保护。

4 展望

许多国家都将肉毒毒素列为食品安全的重要关注对象,同时作为一种生物武器,其也受到了一些军事机构和疾病预防控制中心的重视。因此,一直以来疫苗研究都是这一领域的热点。新型重组亚单位疫苗、突变无毒型疫苗和 DNA 疫苗可以克服一些传统疫苗的不足,但在提高疫苗抗原含量,保证免疫效果的稳定性,开发有效的免疫佐剂,研究适合产业化的生产技术等方面还需更进一步的探索。在这些新型疫苗中,重组受体结合域(Hc 片段)疫苗较其他类型的疫苗研究较为深入,免疫效

果也更为确实,是当前和今后可能被应用于临床实践的主要研究方向。随着生物信息技术的发展,利用生物信息技术设计疫苗,模拟机体免疫应答是今后疫苗开发很好的思路。另外,有 1/3 的天然毒素多肽分子具有通过空气途径被吸入,激活免疫反应,而且这些多肽还可以作为载体分子用于其他病原的吸入免疫^[23],利用这一特点,研制使用更为方便,吸入式免疫的肉毒中毒症疫苗或是其他疾病疫苗对于临床应用将是十分有意义的。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 5 版. 北京:中国农业出版社, 2013.
- [2] Smith L. Botulism and vaccines for its prevention [J]. Vaccine, 2009, 27:D33 - D39.
- [3] 王景林. 肉毒神经毒素及其相关医学防护问题[J]. 军事医学科学院院刊, 2003, 27(3): 213 - 216.
- [4] Krüger M, Skau M, Shehata A A, *et al.* Efficacy of *Clostridium botulinum* types C and D toxoid vaccination in Danish cows [J]. Anaerobe, 2013, 23:97 - 101.
- [5] Keller J E. Characterization of new formalin - detoxified botulinum neurotoxin toxoids[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2008, 15(9):1374 - 1379.
- [6] Jones R G, Liu Y, Rigsby P, *et al.* An improved method for development of toxoid vaccines and antitoxins [J]. Journal of Immunological Methods, 2008, 337(1):42 - 48.
- [7] Daniel M H, Amy C S, Scott F, *et al.* Vaccination of rabbits with an alkylated toxoid rapidly elicits potent neutralizing antibodies against botulinum neurotoxin serotype B [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2010, 17(6): 930 - 936.
- [8] Ben D A, Torgeman A, Barnea A, *et al.* Expression, purification and characterization of the receptor - binding domain of botulinum neurotoxin serotype Bas a vaccine candidate [J]. Protein Expr Purif, 2015, 110:122 - 129.
- [9] Yari K, Fatemi S S, Tavallaee M. Optimization of the BoNT/A-Hc expression in recombinant *Escherichia coli* using the Taguchi statistical method [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2010, 56(1):35 - 42.
- [10] Byrne M P, Smith L A. Development of vaccines for prevention of botulism[J]. Biochimie, 2000, 82(9/10):955 - 966.
- [11] Yu Y Z, Li N, Wang R L, *et al.* Evaluation of a recombinant Hc of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype F as an effective

- subunit vaccine [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, 15(12):1819–1823.
- [12] Yu Y Z, Sun Z W, Li N, *et al.* Protection with a recombinant Hc of *Clostridium Botulinum* neurotoxin serotype A from *Escherichia coli* as an effective subunit vaccine[J]. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 2009, 31(2):261–266.
- [13] Zichel R, Mimran A, Keren A, *et al.* Efficacy of a potential trivalent vaccine based on Hc fragments of botulinum toxins A, B, and E produced in a cell – free expression system [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(5):784–792.
- [14] Smith L A, Rusnak J M. Botulinum neurotoxin vaccines: past, present, and future [J]. *Critical reviews in immunology*, 2007, 27(4):303–318.
- [15] Gil L A, da Cunha C E, Moreira G M, *et al.* Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against *Clostridium botulinum* neurotoxin types C and D [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e69692.
- [16] Cunha E P, Gustavo M S, Felipe M S, *et al.* Vaccination of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D [J]. *Vaccine*, 2014, 32(2):214–216.
- [17] Ravichandran E, Janardhanan P, Patel K, *et al.* *In vivo* toxicity and immunological characterization of detoxified recombinant botulinum neurotoxin type A [J]. *Pharm Res*, 2016, 33(3):639–652.
- [18] 罗 森, 齐芬芳, 宫路路, 等. 王慧 A 型肉毒毒素轻链的原核表达、纯化及活性鉴定 [J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(5):632–635.
- [19] 贾宏丽, 王景林. 重组肉毒神经毒素 A 轻链 (BoNT/A – LC) 蛋白的表达、纯化与鉴定 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2005, 29(1):30–33.
- [20] Sayadmanesh A, Ebrahimi F, Hajizade A, *et al.* Expression and purification of neurotoxin – associated protein HA – 33/A from *Clostridium botulinum* and evaluation of its antigenicity [J]. *Iranian Biomedical Journal*, 2013, 17(4):165–170.
- [21] Scott V L, Villarreal D O, Hutnick N A, *et al.* DNA vaccines targeting heavy chain C – terminal fragments of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotypes A, B, and E induce potent humoral and cellular immunity and provide protection from lethal toxin challenge [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(8):1961–1971.
- [22] Li N, Yu Y Z, Yu W Y, *et al.* Enhancement of the immuno – genicity of DNA replicon vaccine of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A by GM – CSF gene adjuvant [J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2011, 33(1):211–219.
- [23] Park J B, Simpson L L. Progress toward development of an inhalation vaccine against botulinum toxin [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2004, 3(4):477–487.

(编 辑:李文平)