

A 组链球菌疫苗研究进展

吴永祥 王嘉睿 刘金来

【摘要】 A 组链球菌是(GAS)一种常见的革兰阳性病原菌,人是其唯一自然宿主。GAS 感染人体后可导致一系列感染性疾病,还可引起一些自身免疫性疾病,严重危害人体健康,同时也给社会带来巨大的经济负担。目前,GAS 对青霉素仍然敏感,但对其他抗生素的耐药率不断增加。预防 GAS 感染最好的方法是研制安全、有效的疫苗。GAS 疫苗的研究已经持续了近百年,但迄今还没有商品化的疫苗研制出来。现在有多种疫苗正处于不同的研发阶段之中,该文就 GAS 疫苗的研究进展进行概述。

【关键词】 A 组链球菌;疫苗;M 蛋白;非 M 蛋白

Research progress on group A streptococcus vaccine Wu Yongxiang, Wang Jiarui, Liu Jinlai. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Liu Jinlai, E-mail: lj_lai@medmail.com.cn

【Abstract】 Group A streptococcus (GAS) is a common gram-positive pathogenic bacterium. Human is the only natural host of GAS. GAS infection can lead to a wide spectrum of infectious diseases and several autoimmune diseases, which seriously damages human health and brings significant economic burden to the society. Currently, GAS is still sensitive to penicillin, but it yields increasing resistance to other antibiotics. The best strategy to prevent GAS infection is to develop a safe and effective vaccine. Even though investigated for almost 100 years, no commercial vaccine for GAS has been developed worldwide. Multiple types of vaccine candidates are being investigated in different stages. In this paper, recent research progress on GAS vaccine was reviewed.

【Key words】 Group A streptococcus; Vaccine; M protein; Non-M protein

A 组链球菌(GAS)又称酿脓链球菌,是一种致病性很强的革兰阳性球菌,通过呼吸道和皮肤接触感染。GAS 有多个亚型,在全球不同地区的分布情况各异,在发达国家,GAS 主要以 emm1 型、emm12 型、emm28 型为主,而在非洲和太平洋地区,则没有某个特定分型的 GAS 明显占优势^[1]。GAS 感染人后可导致一系列疾病,包括常见的链球菌咽炎、猩红热、脓皮病及致命的败血症、坏死性筋膜炎、链球菌毒性休克综合征,还可引起自身免疫性疾病如风湿热、风湿性心脏病、急性链球菌感染后肾小球肾炎。

GAS 给全世界带来沉重的负担。WHO 的一项研究估计,全球至少有 1 800 万 GAS 相关疾病患者,每年有 51.7 万患者死于严重的 GAS 感染所致的疾病,其中又以风湿性心脏病最为严重,全球至

少 1 560 万患者,每年导致 23.3 万人死亡^[2]。另一种较为严重的疾病是侵入性感染,每年有 66.3 万新发病例,导致 16.3 万人死亡^[2]。链球菌咽炎、猩红热、脓皮病等疾病通常情况下虽不致命,但由于其反复流行,波及范围更广。据估计,每年有 6 亿人患链球菌咽炎,1.62 亿人患脓皮病^[3]。美国一项研究显示,在美国单是链球菌咽炎每年造成的社会经济学损失就高达(2.24 ~ 5.39)亿美元^[4]。虽然 GAS 对青霉素类抗生素仍然敏感,但对抗 GAS 的最好方法是研究 GAS 疫苗。

GAS 疫苗的研究已经进行了近百年,迄今仍未有可行的疫苗被制造出来,主要原因有两个:一是 GAS 最主要的候选抗原 M 蛋白与人心肌肌球蛋白、原肌球蛋白结构类似,M 蛋白源性疫苗可能会导致自身免疫性疾病;二是 GAS 亚型很多,不

同地区流行的亚型各异,而不同亚型 GAS 之间又缺乏交叉免疫,使得 GAS 疫苗难于推广^[5]。上世纪 70 年代,在美国一项 M 蛋白疫苗临床试验中,3 名受试者接种了疫苗后出现风湿热,FDA 因而禁止了 GAS 疫苗的临床研究,直至 2006 年才解禁。目前主要的疫苗可分为两类:M 蛋白疫苗和非 M 蛋白疫苗。

一、M 蛋白疫苗

1. M 蛋白

GAS 疫苗有多个候选疫苗表位,包括 M 蛋白、多糖抗原、C5a 肽酶等,其中 M 蛋白是研究最多的候选表位。M 蛋白由两条多肽链聚合而成,呈 α 螺旋卷曲结构,其羧基端(C 端)锚定于细菌表面,氨基端(N 端)游离。从 N 端到 C 端可分为 A、B、C、D 4 个重复区。A 区为高变区,能诱导机体产生特异性抗体,但这种抗体对异型 GAS 无作用。A 区氨基酸序列可用于鉴定 GAS 的 M 分型,近来 M 分型被更实用的编码 M 蛋白基因(emm)分型法取代,现已鉴定出 200 多个 emm 亚型^[6]。B 区为半可变区,C 区和 D 区为保守区。能诱导人体产生自身免疫病的抗原表位位于 B 区,而 A 区和 C 区则存在着与人体组织无交叉免疫且能诱导人体产生调理型抗体的抗原表位。据此,形成了两种研究思路,一是将多个 GAS 的 N 端片段组合起来构建多价疫苗,二是构建以 C 端保守区序列为基础的疫苗。

2. N 端疫苗

美国学者 Dale 等将 26 种 GAS 的 M 蛋白 N 端片段及串联到 4 条多肽链上,研制了 26 价多肽疫苗。动物实验显示,动物接受免疫后对 26 种 GAS 中的 25 种产生了较高滴度的抗体。目前该疫苗已完成了临床 II 期实验,显示了较好的免疫原性和安全性^[7]。在此基础上,Dale 等^[8]又研制了 30 价的多肽疫苗,以求覆盖北美和欧洲主要的 GAS 血清型,免疫动物产生了针对这 30 种 GAS 的高滴度抗体,让人意外的是,免疫血清竟对 26 种不包含在疫苗中的 GAS 也有调理作用。虽然机制未明,但这有可能扩展了多价 M 蛋白疫苗的覆盖范围。随后有学者提出了一种新的 GAS 分类方法,emm 簇(emm-cluster)分类法。根据 M 蛋白结构的不同和与宿主蛋白结合能力的差异,将 200 多种 emm 分型归入到 48 个 emm 簇,同簇的 GAS 的 M 蛋白性质相似,因而其所诱导产生的抗体对簇内其他 emm 型的 GAS 也有作用,用于解释 30 价疫苗的

“额外”调理作用^[9]。目前 30 价疫苗正在进行临床 I 期试验^[10]。N 端疫苗的缺陷在于,GAS 的血清型太多,针对某一地区优势血清型研制的疫苗在其他地区的覆盖率可能大大降低,如 26 价疫苗能覆盖发达国家 72% 的血清型,但只能覆盖非洲地区 39% 的血清型,而在太平洋地区覆盖率只有 24%,限制了其推广^[11]。为扩大多价疫苗的覆盖率,Dale 等^[12]研制了 Mrp 蛋白疫苗。Mrp 与 M 蛋白属同一家族,其 N 端氨基酸序列变异程度较 M 蛋白低,据此可将 Mrp 分为 3 型,每型包含若干个不同 emm 分型的 GAS。Mrp 疫苗诱导产生的抗体对同一 Mrp 分型下多种不同 emm 分型的 GAS 都有作用^[12]。三价 Mrp 疫苗的覆盖范围比 30 价 M 蛋白疫苗的范围还要广,被称为新一代 GAS 疫苗^[13]。

3. C 端疫苗

澳大利亚学者 Good 等从 M5 型 GAS 的 M 蛋白 C 端提取了一段 12 个氨基酸的序列,在这段短肽前后加上一段无关多肽以保持 α 螺旋卷曲结构,命名为 J8。为增强其免疫原性,将 J8 与白喉类毒素(DT)连接起来组成 J8-DT 疫苗,J8-DT 疫苗免疫小鼠后,能诱导产生调理型抗体,在 GAS 攻击实验中,免疫组小鼠生存率比对照组更高^[14]。其后的研究显示 J8-DT 疫苗还可诱导产生特异性记忆 B 细胞,在 GAS 感染时只需初始 T 细胞的协助即可启动记忆性免疫应答,对抗感染^[15]。J8-DT 的临床前期试验显示了良好的安全性^[16]。该疫苗在 2013 年进入临床 I 期试验^[10]。另一个保守区疫苗是巴西学者 Guilherme 研制的 StreptInCor。Guilherme 团队从 M5 型 GAS 的 M 蛋白保守区筛选出一个 B 细胞表位和一个 T 细胞表位,将其串联起来形成一条长为 55 个氨基酸的序列,命名为 StreptInCor^[17]。StreptInCor 免疫不同遗传背景的动物,都能诱导长效的抗体,且不引起自身免疫反应^[18]。在链球菌攻击试验中,StreptInCor 免疫后的近交系小鼠 30 天生存率达 100%,优于对照组^[17]。目前 StreptInCor 疫苗将要开始临床 I 期试验^[10]。C 端序列虽然保守,但 J8-DT 疫苗和 StreptInCor 疫苗也不能覆盖所有亚型的 GAS。

二、非 M 蛋白疫苗

除了 M 蛋白外,GAS 还表达其他毒力因子。出于对 M 蛋白疫苗会导致自身免疫病的担心及其诱导的抗体不能对异型 GAS 起作用的顾虑,一些学者研发了非 M 蛋白疫苗,主要有以下几种。

1. C5a 肽酶疫苗

C5a 肽酶是 GAS 细菌表面的一种蛋白分子,在 B 组、C 组和 G 组链球菌表面也表达。C5a 肽酶能特异性地剪切补体 C5a,使其灭活,从而干预补体介导的吞噬细胞募集,阻止 GAS 被清除。流行病学研究显示儿童感染 GAS 后体内产生 C5a 肽酶抗体^[19]。用 GAS 或者 B 组链球菌的 C5a 肽酶作用疫苗免疫小鼠,都能加速 GAS 的清除^[20]。由于不同组链球菌的 C5a 肽酶有很高的同源性,C5a 肽酶疫苗可能对在 B 组、C 组和 G 组链球菌也有作用。

2. 纤连蛋白结合蛋白疫苗

纤连蛋白结合蛋白(FBP)能与纤连蛋白结合,促进 GAS 与宿主细胞的黏附。GAS 表面有多种 FBP 表达,其中研究较多的是血清浑浊因子(SOF)。SOF 因能使血清变浑浊而得名。有研究表明皮下免疫 SOF 对 GAS 腹腔攻击有保护作用^[21]。而另一个研究中,鼻腔免疫 SOF 虽能诱发动植物产生抗体,但对 GAS 鼻腔攻击无保护作用^[22]。我国学者也研制了一个 FBP 疫苗,命名为 FbaA,在 GAS 攻击实验中,FbaA 疫苗的保护作用与 M 蛋白疫苗类似^[23]。

3. 多糖疫苗

M 蛋白是 GAS 分型的基础,不同血清型的 GAS 表达不同的 M 蛋白;而多糖是链球菌分型的基础,即所有的 GAS 均表达相同的多糖抗原,因此多糖疫苗理论上对不同型的 GAS 都有作用。Sabharwal 等^[24]研制了一个多糖疫苗,免疫动物后能产生调理性抗体,有保护作用,而且抗体与人体组织无交叉免疫反应。但有其他研究发现 GAS 多糖的组分 N-乙酰-D 葡萄糖胺与人心肌蛋白有交叉反应^[5]。多糖疫苗的安全性还需进一步研究。

4. 链球菌致热外毒素疫苗

链球菌致热外毒素 A (SpeA) 和外毒素 C (SpeC) 是一类超抗原,与链球菌毒素休克综合征密切相关。外毒素 B (SpeB) 是一种半胱氨酸蛋白酶,能够降解抗体,灭活补体。SpeB 的功能片段是 SpeB 羧基端的一段短肽,将其与链球菌溶血素的一段序列结合起来构建多肽疫苗,该疫苗对非侵入性的和侵入性的 GAS 攻击都有抵抗作用^[25-26]。另外的一项研究中,研究者将 SpeA 的一段序列和 SpeB 一段序列串联起来形成多肽疫苗,免疫人 HLA-DQ8 转基因小鼠,在 SpeA 和 GAS 攻击实验中,免疫组小鼠的生存率更高^[27]。

5. 其他非 M 蛋白疫苗

GAS 表达众多蛋白,除上述几种外,其他一些非 M 蛋白也成了疫苗研究对象。借助于基因组学及蛋白质组学技术,很多新的蛋白也被鉴定出来。在一项研究中,研究者从 GAS 表达的 40 种蛋白中选出 3 种蛋白,组合成一个新的疫苗,命名为 Combo,Combo 免疫小鼠能对多种 GAS 产生抵抗作用^[28]。也有研究者将 5 种非 M 蛋白疫苗组成一个新疫苗,用全 M 蛋白疫苗做阳性对照,该疫苗对 GAS 皮肤感染的保护作用与全 M 蛋白疫苗类似,而对深部感染的保护作用不如 M 蛋白疫苗^[29]。目前尚未有非 M 蛋白疫苗进入临床试验。

三、结 语

人们对 GAS 的研究持续了近百年,GAS 在大部分国家的感染率已经下降,但在贫困国家及发达国家的土著地区,GAS 依旧猖獗。近年来,GAS 似有死灰复燃之势,可能与耐药性的增加及高致病性毒株的出现有关^[30]。疫苗是对抗 GAS 最有效的方法。用分子生物学技术筛选出合适的抗原表位保证了疫苗的安全性,但不同地区 GAS 亚型的巨大差异性限制了疫苗的适用范围,迄今仍未有商品化的 GAS 疫苗问世。在候选疫苗中,M 蛋白疫苗的研究走在最前列。根据当地流行亚型挑选出相应的 M 蛋白 N 端序列串联成多价疫苗,或者将多个 M 蛋白疫苗与非 M 蛋白疫苗组合成新疫苗,是今后的趋势。

我国学者早期也开展了 GAS 的研究,受制于流行病学资料的不足,GAS 疫苗的研究较少^[31]。Ma 等^[23]合成了纤连蛋白结合蛋白疫苗,喻刚等^[32]合成了四价 M 蛋白疫苗,我们课题组^[33]合成了二价 M 蛋白疫苗,但都没有进入临床试验。近年来我们的研究及其他研究显示,我国主要的 GAS 流行亚型是 emm1 型和 emm12 型,研制针对这两个亚型的多价疫苗,应有很大的应用前景^[34-36]。

参 考 文 献

- [1] Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9 (10): 611-616.
- [2] Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5 (11): 685-694.
- [3] Bowen AC, Mahé A, Hay RJ, Andrews RM, Steer AC, Tong

- SY, Carapetis JR. The global epidemiology of impetigo: a systematic review of the population prevalence of impetigo and pyoderma. *PLoS One*, 2015, 10 (8): e0136789.
- [4] Pfoh E, Wessels MR, Goldmann D, Lee GM. Burden and economic cost of group A streptococcal pharyngitis. *Pediatrics*, 2008, 121 (2): 229-234.
- [5] Martin WJ, Steer AC, Smeesters PR, Keeble J, Inouye M, Carapetis J, Wicks IP. Post-infectious group A streptococcal autoimmune syndromes and the heart. *Autoimmun Rev*, 2015, 14 (8): 710-725.
- [6] Mcmillan DJ, Drèze PA, Vu T, Bessen DE, Guglielmini J, Steer AC, Carapetis JR, Van Melderden L, Sriprakash KS, Smeesters PR. Updated model of group A Streptococcus M proteins based on a comprehensive worldwide study. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19 (5): E222-E229.
- [7] 喻刚, 董太明, 全家斌. A 群链球菌疫苗的研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22 (8): 830-833.
- [8] Dale JB, Penfound TA, Tamboura B, Sow SO, Nataro JP, Tapia M, Kotloff KL. Potential coverage of a multivalent M protein-based group A streptococcal vaccine. *Vaccine*, 2013, 31 (12): 1576-1581.
- [9] Sanderson-Smith M, De Oliveira DM, Guglielmini J, Mcmillan DJ, Vu T, Holien J K, Henningham A, Steer AC, Bessen DE, Dale JB, Curtis N, Beall BW, Walker MJ, Parker MW, Carapetis JR, Van Melderden L, Sriprakash KS, Smeesters PR; M Protein Study Group. A systematic and functional classification of Streptococcus pyogenes that serves as a new tool for molecular typing and vaccine development. *J Infect Dis*, 2014, 210 (8): 1325-1338.
- [10] Steer AC, Carapetis JR, Dale JB, Fraser JD, Good MF, Guilherme L, Moreland NJ, Mulholland EK, Schodel F, Smeesters PR. Status of research and development of vaccines for Streptococcus pyogenes. *Vaccine*, 2016, 34 (26): 2953-2958.
- [11] Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9 (10): 611-616.
- [12] Dale JB, Niedermeyer SE, Agbaosi T, Hysmith ND, Penfound TA, Hohn CM, Pullen M, Bright MI, Murrell DS, Shenep LE, Courtney HS. Protective immunogenicity of group A streptococcal M-related proteins. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22 (3): 344-350.
- [13] Courtney HS, Niedermeyer SE, Penfound TA, Hohn CM, Greeley A, Dale JB. Trivalent M-related protein as a component of next generation group A streptococcal vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*, 2017, 6 (1): 45-49.
- [14] Batzloff M, Yan H, Davies M, Hartas J, Good M. Preclinical evaluation of a vaccine based on conserved region of M protein that prevents group A streptococcal infection. *Indian J Med Res*, 2004, 119 Suppl: 104-107.
- [15] Pandey M, Wykes MN, Hartas J, Good MF, Batzloff MR. Long-term antibody memory induced by synthetic peptide vaccination is protective against Streptococcus pyogenes infection and is independent of memory T cell help. *J Immunol*, 2013, 190 (6): 2692-2701.
- [16] Batzloff MR, Fane A, Gorton D, Pandey M, Rivera-Hernandez T, Calcutt A, Yeung G, Hartas J, Johnson L, Rush CM, McCarthy J, Ketheesan N, Good MF. Preclinical immunogenicity and safety of a Group A streptococcal M protein-based vaccine candidate. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12 (12): 3089-3096.
- [17] Guilherme L, Postol E, Ferreira FM, DeMarchi LM, Kalil J. Strept In Cor: a model of anti-Streptococcus pyogenes vaccine reviewed. *Auto Immun Highlights*, 2013, 4 (3): 81-85.
- [18] Guilherme L, Ferreira FM, Köhler KF, Postol E, Kalil J. A vaccine against Streptococcus pyogenes: the potential to prevent rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2013, 13 (1): 1-4.
- [19] Marshall HS, Richmond P, Nissen M, Lambert S, Booy R, Reynolds G, Sebastian S, Pride M, Jansen KU, Anderson AS, Scully IL. Group A streptococcal carriage and seroepidemiology in children up to 10 years of age in Australia. *Pediatr Infect Dis J*, 2015, 34 (8): 831-838.
- [20] Cleary PP, Matsuka YV, Huynh T, Lam H, Olmsted SB. Immunization with C5a peptidase from either group A or B streptococci enhances clearance of group A streptococci from intranasally infected mice. *Vaccine*, 2004, 22 (31-32): 4332-4341.
- [21] Steer AC, Batzloff MR, Mulholland K, Carapetis JR. Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. *Curr Opin Infect Dis*, 2009, 22 (6): 544-552.
- [22] Courtney HS, Pownall HJ. The structure and function of serum opacity factor; a unique streptococcal virulence determinant that targets high-density lipoproteins. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 956071.
- [23] Ma CQ, Li CH, Wang XR, Zeng RH, Yin XL, Feng HD, Wei L. Similar ability of FbaA with M protein to elicit protective immunity against group A streptococcus challenge in mice. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6 (1): 73-77.
- [24] Sabharwal H, Michon F, Nelson D, Dong W, Fuchs K, Manjarrez RC, Sarkar A, Uitz C, Viteri-Jackson A, Suarez RS, Blake M, Zabriskie JB. Group A streptococcus (GAS) carbohydrate as an immunogen for protection against GAS infection. *J Infect Dis*, 2006, 193 (1): 129-135.
- [25] Tsao N, Cheng MH, Yang HC, Wang YC, Liu YL, Kuo CF. Determining antibody-binding site of streptococcal pyrogenic exotoxin B to protect mice from group A streptococcus infection. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e55028.
- [26] Kuo CF, Tsao N, Cheng MH, Yang HC, Wang YC, Chen YP, Lin KJ. Application of the C3-binding motif of streptococcal pyrogenic exotoxin B to protect mice from invasive group A streptococcal infection. *PLoS One*, 2015, 10 (1): e0117268.
- [27] Ulrich RG. Vaccine based on a ubiquitous cysteinyl protease and streptococcal pyrogenic exotoxin A protects against Streptococcus pyogenes sepsis and toxic shock. *J Immune Based Ther Vac*

- cines, 2008, 6: 8.
- [28] Bensi G, Mora M, Tuscano G, Biagini M, Chiarot E, Bombaci M, Capo S, Falugi F, Manetti AG, Donato P, Swennen E, Gallotta M, Garibaldi M, Pinto V, Chiappini N, Musser JM, Janulczyk R, Mariani M, Scarselli M, Telford JL, Grifantini R, Norais N, Margarit I, Grandi G. Multi high-throughput approach for highly selective identification of vaccine candidates; the Group A Streptococcus case. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11 (6): M111.015693.
- [29] Rivera-Hernandez T, Pandey M, Henningham A, Cole J, Choudhury B, Cork AJ, Gillen CM, Ghaffar KA, West NP, Silvestri G, Good MF, Moyle PM, Toth I, Nizet V, Batzloff MR, Walker MJ. Differing efficacies of lead group A Streptococcal vaccine candidates and full-length M protein in cutaneous and invasive disease models. *MBio*, 2016, 7 (3): pii: e00616-18.
- [30] Andrey DO, Posfay-Barbe KM. Re-emergence of scarlet fever; old players return? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2016, 14 (8): 687-689.
- [31] 余步云, 汤美安, 钱孝贤, 周汉建. 80 年代以来风湿热的回顾性分析(附 341 例报告). *新医学*, 1994, (8): 407-408.
- [32] 喻刚, 杨京生, 全家妩. A 群链球菌四价重组蛋白的表达、纯化及其免疫原性. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23 (1): 17-21.
- [33] Ding Y, Ni Q, Liu J, Yu B. Immunogenicity of a divalent group A streptococcal vaccine. *Rheumatol Int*, 2013, 33 (4): 1013-1020.
- [34] 丁月霞, 倪琼琼, 刘金来. 广州市儿童致咽炎 β 溶血性链球菌的流行情况及其 emm 基因分型. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2011, 32 (3): 411-414.
- [35] 张代涛, 杨鹏, 吴双胜, 赵佳琛, 卢桂兰, 郭婧, 王全意, 彭晓旻. 2011-2014 年北京地区儿童咽扁桃体炎感染病例 A 组链球菌 emm 分型研究. *疾病监测*, 2015, 30 (11): 917-921.
- [36] 曾锦婷, 刘爱胜, 房笃智, 向华国, 田郭军. 深圳宝安区儿童感染致病性 A 群链球菌流行现状及 emm 基因分型研究. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24 (7): 123-125.

(收稿日期: 2017-05-06)

(本文编辑: 杨江瑜)

