

·综述·

铜绿假单胞菌 PcrV 疫苗的研制现状

李文桂 陈雅棠

重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所 400016

通信作者:李文桂, Email: cqliwengui@163.com

【摘要】铜绿假单胞菌是一种院内感染的常见致病菌,采用疫苗防治该菌是当前研究的热点领域之一。PcrV 蛋白作为一种转运蛋白,是重要的免疫调控靶点,可作为一种有效的疫苗候选分子。本文综述了 PcrV 蛋白、PcrV 抗体、核酸疫苗以及重组鼠伤寒沙门菌疫苗等的研究现状,为新型疫苗研发提供参考。

【关键词】假单胞菌,铜绿;PcrV 蛋白;疫苗;转运蛋白;抗体

基金项目:国家自然科学基金(30801052、30671835、30500423、30200239)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200623-00205

Recent advances in PcrV vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*

Li Wengui, Chen Yatang

Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Li Wengui, Email: cqliwengui@163.com

【Abstract】 *Pseudomonas aeruginosa* is one type of pathogens causing nosocomial infections. It recently becomes highlight to control this bacterium by the application of related vaccine. PcrV protein, as a transport protein, is an important target for immune regulation and an effective candidate molecule of vaccine. The review outlines the research of PcrV protein, PcrV antibody, nucleic acid vaccine, and recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine, in order to provide references for the development of novel vaccine.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; PcrV protein; Vaccine; Transport protein; Antibody

Fund program: National Natural Science Foundation of China(30801052, 30671835, 30500423, 30200239)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200623-00205

铜绿假单胞菌是一种常见的机会致病菌^[1],Ⅲ型分泌系统(T3SS)是其主要致病因子,可协助其逃避巨噬细胞的吞噬和降解^[2]。其中 PcrV 蛋白是一种 T3SS 的转运蛋白,可将细菌产生的毒素蛋白转运至宿主细胞内,干扰细胞的功能,引起细胞死亡^[3-4],提示 PcrV 蛋白作为免疫调控靶点是一种有希望的疫苗分子。本文拟就 PcrV 蛋白分子、PcrV 抗体、核酸疫苗以及重组鼠伤寒沙门菌(St)疫苗等的研制现状进行综述。

一、PcrV 蛋白

弗氏佐剂(FA)是一种水包油制剂,完全 FA(CFA)含有失活的分枝杆菌,不完全 FA(IFA)则不含有,两者都能增强机体的免疫应答^[5]。Sawa 等^[6]将 10 μg 重组 PcrV 抗原加 FA 皮下注射 BALB/c 鼠,注射后 3 周皮下注射 5×10⁵ CFU 铜绿假单胞菌 PA103 株进行攻击,在攻击后 1 周发现肺组织的病变减轻,肺组织的细菌负荷下降,免疫组和对照组计数存活

率分别为 70%和 0。Holder 等^[7]将 10 μg 重组 PcrV 抗原加 FA 肌肉注射 CF-1 鼠,在首次注射后 2 周加强 1 次,在首次注射后 3 周显示血清 IgG 升高,4 周后制作 15%体表面积的烧伤模型,同时皮下注射 5×10⁵ CFU 铜绿假单胞菌 M-2 株、SBI-N 株和 1071 株进行攻击,在攻击后 1 周显现 3 个攻击组焦痂和肺组织的细菌负荷显著降低,M-2 攻击组、SBI-N 攻击组和 1071 株攻击组的存活率分别为 80%、60%和 40%,而对照组为 0。Moriyama 等^[8]将 30 μg 截短型 PcrV 抗原加 FA 皮下注射 BALB/c 鼠,在首次注射后 30 d 加强 1 次,在首次注射后 60 d 腹腔注射 5 mg 环磷酰胺诱导小鼠的中性粒细胞减少,在首次注射后 63 d 腹腔注射 5×10⁶ CFU 铜绿假单胞菌 PA103 株进行攻击,在攻击后 3 d 提示 PcrV₁₋₂₉₄ 免疫组和 PcrV₁₃₉₋₂₉₄ 免疫组的存活率均为 65%,而 PcrV₁₃₉₋₂₃₄ 免疫组和 PcrV₂₆₁₋₂₉₄ 免疫组均为 20%;被动免疫试验提示 PcrV₁₋₂₉₄ 和

PcrV₁₃₉₋₂₉₄ 免疫组 60 d 的抗血清可产生较好的保护力。

铝佐剂是美国 FDA 批准用于临床的佐剂之一,对 DC、T 细胞和 B 细胞具有明显的刺激作用,主要诱导宿主产生 Th2 型的免疫应答^[9]。Markham 等^[10]将 10 μg 重组 PcrV 抗原加铝佐剂肌肉注射 BALB/c 鼠,显现血清 IgG 在注射后 1~7 周升高,在注射后 3 周达较高水平。

CpG 寡脱氧核苷酸序列(CpG ODN)是一种人工合成的核酸佐剂,可以模拟细菌 DNA,促进免疫细胞表达 TLR9 受体,产生细胞因子,主要诱导 Th1 型的免疫应答^[11]。Naito 等^[12]将 10 μg 重组 PcrV 抗原加 10 μg 的 CpG ODN 核酸佐剂滴鼻接种 ICR 鼠,在初次接种后 2 和 3 周各加强 1 次,初次接种后 50 d 显示血清 IgG、IgG1 和 IgG2a 升高,IgG1 与 IgG2a 比值大于 1,支气管肺泡灌洗液的 IgA 升高;初次接种后 55 d 通过支气管注射的途径将 1.5×10⁶ CFU 铜绿假单胞菌 PA103 株进行攻击,攻击后 7 d 发现免疫组的肺组织病变减轻,细菌负荷减少,免疫组和对照组计数存活率分别为 73%和 0。

Hamaoka 等^[13]将 10 μg 重组 PcrV 抗原加 FA、铝佐剂和 ODN 佐剂分别滴鼻接种 ICR 鼠,初次接种后 20 和 40 d 各加强 1 次,初次接种后 60 d 证实血清 IgG、IgG1 和 IgG2a 升高,IgG1 与 IgG2a 比值大于 1,65 d 通过气管内注射将 1.5×10⁶ CFU 铜绿假单胞菌 PA103 株进行攻击,在攻击后 1 d 发现免疫组的肺组织水肿显著减轻,肺组织内的过氧化物酶减少,肺组织的细菌负荷减少,在免疫后 7 d 证实 PcrV 抗原加 FA 组、PcrV 抗原加铝佐剂组和 PcrV 抗原加 ODN 佐剂组的存活率分别为 90.9%、81.8%和 40.0%,而对照组为 0。

三氧十二烷酰高丝氨酸内酯[3-OXO-C12-HSL]是密度感应系统 LasRI 和 RhlRI 蛋白的诱导剂,可以调节铜绿假单胞菌毒力因子的表达,影响宿主的免疫应答^[14]。Golpasha 等^[15]将 10 μg 重组 PcrV 抗原加 10 μg 的 3-OXO-C12-HSL 佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次接种后 2 和 4 周各加强 1 次,6 周后显示血清 IgG、IgG1 和 IgG2a 升高,IgG1 和 IgG2a 比值大于 1,7 周后皮下注射 5×10² CFU 铜绿假单胞菌 PA01 株进行攻击,在攻击后 1 周显示免疫组的肝脾肾组织的细菌负荷是对照组的 1%,免疫组和对照组计数存活率分别为 78%和 0。

溶血素共调节蛋白 1(HCP1)是一种依赖 T6SS 的细胞内效应转运蛋白,可将毒素蛋白转运至宿主细胞内^[16]。Yang 等^[17]以 PA01 株的基因组 DNA 为模板扩增 PcrV28-294、Opr25-83 和 HCP11-162 基因,将它们融合为 POH 基因,插入 pGEX-6P-2,得 pGEX-POH。将 30 μg 融合蛋白加铝佐剂肌肉注射 BALB/c 鼠,初次接种后 2 和 3 周各加强 1 次,5 周发现血清 IgG、IgG1 和 IgG2a 升高,IgG1 与 IgG2a 比值大于 1,脾细胞明显增殖,并分泌高水平 IL-4、IFN-γ 和 IL-17A 等细胞

因子,此时用 5×10⁶ CFU 铜绿假单胞菌 PA01 株进行气管内注射攻击,在攻击后 1 d 显示免疫组的肺组织病理减轻,支气管肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平降低,在攻击后 7 d 发现免疫组和对照组计数存活率分别为 60%和 0。

二、重组 PcrV 抗体

PcrV 抗体结合 PcrV 后可阻断铜绿假单胞菌毒素蛋白的释放,从而提高宿主的抵抗力,但用 PcrV 抗体治疗铜绿假单胞菌感染存在一定的毒副作用,这就需要改造 PcrV 抗体,降低其免疫原性和毒性^[18]。Frank 等^[19]和管章春等^[20]先后制备了 PcrV 的单克隆抗体,体外试验表明它们均具有较好的抗铜绿假单胞菌活性。Neely 等^[21]制作 15%体表面积 CF-1 鼠烧伤模型,在烧伤后 1 h 皮下注射 10³ CFU 铜绿假单胞菌 SBI-N 株、1071 株和 M-2 株进行感染,感染后 1、2 和 3 d 腹腔注射 100 μg 的 PcrV-IgG 进行免疫治疗治疗后 1 周显示 SBI-N 攻击组、M-2 攻击组、1071 攻击组和对照组的存活率分别为 90%、80%、30%和 0。Wang 等^[22]将 5×10⁶ CFU 铜绿假单胞菌 R4 株加 10 μg 的 PcrV-IgG 支气管内注射 BALB/c 鼠,然后口服 500 mg/kg 的头孢他啶,1 次/d,连服 7 d,在治疗后 7 d 发现抗体治疗组的肺组织病理减轻,肺细菌负荷是对照组的 1%,计数存活率提示抗体治疗组和对照组分别为 100%和 0。

鸡蛋黄 IgG(IgY)是一种经济有效的多克隆抗体,对靶抗原的亲合力高,可以阻断铜绿假单胞菌与宿主上皮细胞的相互作用^[23]。Ranjbar 等^[24]将 100 μg 的 PcrV-IgY 腹腔注射 BALB/c 鼠,在抗体注射后 2 h 用 2×10⁷ CFU 铜绿假单胞菌 PA01 株进行滴鼻感染,感染后 7 d 计数存活率表明 IgY 治疗组和对照组分别为 70%和 0。

三、PcrV 核酸疫苗

铜绿假单胞菌外毒素 A(PEA)具有较强的免疫原性,将其免疫小鼠可产生较好的保护力^[25]。Jiang 等^[26]以 PA01 株的基因组 DNA 为模板扩增 PEA 和 PcrV 基因,分别插入 pIRES 的 2 个位点得 pIRES-PEA-PcrV,将 100 μg 重组质粒加 15 μg 的 CpG ODN1826 核酸佐剂肌肉注射 BALB/c 鼠,在初次接种后 2 和 4 周各加强 1 次,6 周后血清 IgG 升高,脾细胞明显增殖,并分泌高水平的 IFN-γ 和 IL-12,但 IL-10 和 IL-4 的分泌水平降低,此时用 5×10⁷ CFU 铜绿假单胞菌 PA01 株进行滴鼻攻击,在攻击后 3 d 提示免疫组脾和肺的细菌负荷均显著降低。

鞭毛的基本组成单元为鞭毛蛋白(Flag),Flag 可诱导宿主产生中和抗体,是一种有效的免疫原^[27]。Saha 等^[28]将 PcrV、PilA、OprF-I 的编码基因分别插入 pGACAG 获得 pCACAG-PcrV/PilA/OprF-I,各取 1 μg 的重组质粒组成混合 DNA 疫苗;采用基因枪轰击法接种 BALB/c 鼠,在初次接种后 2 周加

强 1 次,初次接种后 4 周提示血清 IgG 和 IgG1 升高,此时用 5×10^5 CFU 铜绿假单胞菌 D4 株进行滴鼻攻击,攻击后 1 d 显示免疫组支气管肺泡灌洗液内的中性粒细胞和巨噬细胞增加,MIP-2 和 IFN- γ mRNA 的转录水平升高,攻击后 10 d 提示免疫组和对照组的存活率分别为 100%和 0。

四、St 减毒株介导的 PcrV 疫苗

St 的减毒株主要用于伤寒和副伤寒的免疫防治。Aguilera-Herce 等^[29]分别以 PA01 株和 St 的 14028 株基因组 DNA 为模板分别扩增 PcrV 和 SseJ 分泌序列,将 PcrV 基因插入 pGEX-4T-2 获得 pGEX-PcrV,将 SseJ 基因插入 pGEX-PcrV 获得 pGEX-PcrV-SseJ,与 pWSK29 重组获得 pWSK29-PcrV-SseJ;将重组质粒电穿孔转化 St14028 株,筛选阳性重组菌,免疫印渍提示阳性血清识别重组菌表达的 PcrV 融合蛋白(相对分子质量为 35 000)。将 2×10^5 CFU 疫苗腹腔注射 C57BL/6 鼠,在注射后 3 周提示血清 IgG 升高,脾细胞分泌高水平的 TNF- α 和 IL-6,此时腹腔注射 9×10^6 CFU 铜绿假单胞菌 PA01 株进行攻击,在攻击后 7 d 提示免疫组肺和脾的细菌负荷下降,免疫组和对照组计数存活率分别为 75.0%和 12.5%。

五、结语

现有铜绿假单胞菌 PcrV 蛋白疫苗产生的保护力通常较低,常须加用佐剂或与其他抗原进行融合表达才能诱导有效的保护力;PcrV 抗体具有被动保护作用,但不良反应较大;核酸疫苗可诱导全面的细胞和体液免疫应答,但其有整合进宿主基因组的风险;重组 St 疫苗的表达产物与天然蛋白存在差异,表达水平较低。

随着核基因组学、泛基因组学、蛋白组学、高通量测序和反向疫苗学等技术的发展,人们将对铜绿假单胞菌的基因组学、蛋白质组学以及代谢组学进行深入研究,从而发现 PcrV 蛋白的结构与功能的关系;为了增加 DNA 疫苗的免疫原性,对 PcrV 抗原表位的序列进行修饰,构建 PcrV 多抗原表位或免疫增强序列-PcrV 抗原表位的融合基因疫苗,构建 PcrV 表位-佐剂序列或不同抗原表位序列的融合基因疫苗。同时应积极开展新型疫苗载体的探索,将它们联合起来,推动铜绿假单胞菌 PcrV 疫苗的研究跃上一个新的台阶。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Priebe GP, Goldberg JB. Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road[J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 13(4):507–519. DOI: 10.1586/14760584.2014.890053.
- [2] Dacheux D, Goure J, Chabert J, et al. Pore-forming activity of

- type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages[J]. Mol Microbiol, 2001, 40(1): 76–85. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02368.x.
- [3] Goure J, Pastor A, Faudry E, et al. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes[J]. Infect Immun, 2004, 72 (8): 4741–4750. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4741-4750.2004.
- [4] Sundin C, Thelaus J, Bröms JE, et al. Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PerG, PcrV and PopN[J]. Microb Pathog, 2004, 37(6): 313–322. DOI: 10.1016/j.micpath.2004.10.005.
- [5] Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials[J]. Vaccine, 2002, 20 Suppl 3: S56–S64. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00174-3.
- [6] Sawa T, Yahr TL, Ohara M, et al. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury[J]. Nat Med, 1999, 5(4): 392–398. DOI: 10.1038/7391.
- [7] Holder IA, Neely AN, Frank DW. PcrV immunization enhances survival of burned *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice[J]. Infect Immun, 2001,69 (9):5908–5910. DOI: 10.1128/iai.69.9.5908–5910.2001.
- [8] Moriyama K, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Protective effects of affinity-purified antibody and truncated vaccines against *Pseudomonas aeruginosa* V-antigen in neutropenic mice[J]. Microbiol Immunol, 2009, 53(11): 587–594. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2009.00165.x.
- [9] Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines[J]. Immunol Cell Biol, 2004, 82(5): 497–505. DOI: 10.1111/j.0818-9641.2004.01286.x.
- [10] Markham AP, Barrett BS, Esfandiary R, et al. Formulation and immunogenicity of a potential multivalent type III secretion system-based protein vaccine[J]. J Pharm Sci, 2010, 99(11): 4497–4509. DOI: 10.1002/jps.22195.
- [11] Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant[J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(4): 499–511. DOI: 10.1586/erv.10.174.
- [12] Naito Y, Hamaoka S, Kinoshita M, et al. The protective effects of nasal PcrV-CpG oligonucleotide vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. Microbiol Immunol, 2018, 62(12): 774–785. DOI: 10.1111/1348-0421.12658.
- [13] Hamaoka S, Naito Y, Katoh H, et al. Efficacy comparison of adjuvants in PcrV vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. Microbiol Immunol, 2017, 61(2): 64–74. DOI: 10.1111/1348-0421.12467.
- [14] Telford G, Wheeler D, Williams P, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity[J]. Infect Immun, 1998, 66(1): 36–42. DOI: 10.1128/IAI.66.1.36-42.1998.
- [15] Golpasha ID, Mousavi SF, Owlia P, et al. Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-r-PcrV conjugate enhances

- survival of mice against lethal burn infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2015, 15(2): 15–24. DOI: 10.17305/bjbm.2015.292.
- [16] Silverman JM, Agnello DM, Zheng H, et al. Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates[J]. Mol Cell, 2013, 51(5): 584–593. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.025.
- [17] Yang F, Gu J, Yang L, et al. Protective efficacy of the trivalent *Pseudomonas aeruginosa* vaccine candidate PcrV-OprI-Hcp1 in murine pneumonia and burn models[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3957. DOI: 10.1038/s41598-017-04029-5.
- [18] Casadevall A. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases[J]. Emerg Infect Dis, 1996, 2(3): 200–208. DOI: 10.3201/eid0203.960306.
- [19] Frank DW, Vallis A, Wiener-Kronish JP, et al. Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV[J]. J Infect Dis, 2002, 186(1): 64–73. DOI: 10.1086/341069.
- [20] 管章春, 刘方杰, 刘成华, 等. 抗铜绿假单胞菌 PcrV 蛋白单克隆抗体的筛选和功能验证[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(2): 233–238. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2018.02.015.
- Guan ZC, Liu FJ, Liu CH, et al. Screening and activity verification of monoclonal antibody against PcrV protein of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chin J Immunol, 2018, 34(2): 233–238. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2018.02.015.
- [21] Neely AN, Holder IA, Wiener-Kronish JP, et al. Passive anti-PcrV treatment protects burned mice against *Pseudomonas aeruginosa* challenge[J]. Burns, 2005, 31(2): 153–158. DOI: 10.1016/j.burns.2004.09.002.
- [22] Wang Q, Li H, Zhou J, et al. PcrV antibody protects multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* induced acute lung injury[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2014, 193: 21–28. DOI: 10.1016/j.resp.2014.01.001.
- [23] Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo FC Jr, et al. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases[J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(5): 1039–1048. DOI: 10.4161/hv.23383.
- [24] Ranjbar M, Behrouz B, Norouzi F, et al. Anti-PcrV IgY antibodies protect against *Pseudomonas aeruginosa* infection in both acute pneumonia and burn wound models[J]. Mol Immunol, 2019, 116: 98–105. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.10.005.
- [25] 刘祥, 俱雄, 陈春琳. 重组大肠埃希菌外膜蛋白 OmpT 的载体构建和表达条件优化及多克隆抗体制备[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(4): 350–355. DOI: 10.13331/j.cnki.jhau.2015.04.002.
- Liu X, Ju X, Chen CL. Construction, expression condition optimization and polyclonal antibody preparation for recombinant vector of OmpT, an *Escherichia coli*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2015, 41(4): 350–355. DOI: 10.13331/j.cnki.jhau.2015.04.002.
- [26] Jiang M, Yao J, Feng G. Protective effect of DNA vaccine encoding pseudomonas exotoxin A and PcrV against acute pulmonary *P. aeruginosa* infection[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96609. DOI: 10.1371/journal.pone.0096609.
- [27] Campodónico VL, Llosa NJ, Grout M, et al. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines[J]. Infect Immun, 2010, 78(2): 746–755. DOI: 10.1128/IAI.00806-09.
- [28] Saha S, Takeshita F, Sasaki S, et al. Multivalent DNA vaccine protects mice against pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Vaccine, 2006, 24(37–39): 6240–6249. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.077.
- [29] Aguilera-Herce J, García-Quintanilla M, Romero-Flores R, et al. A live *Salmonella* vaccine delivering PcrV through the type III secretion system protects against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. mSphere, 2019, 4(2): e00116–19. DOI: 10.1128/mSphere.00116-19.

(收稿日期: 2020-06-18)