

DOI: 10.13376/j.cbls/2021042

文章编号: 1004-0374(2021)03-0383-09

· 技术与应用 ·

鱼类革兰氏阴性病原菌外膜蛋白疫苗的研究进展

武瑶^{1,2}, 李小艳^{1,2}, 林潇可^{1,2}, 林向民^{1,2*}

(1 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002; 2 福建农林大学福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福州 350002)

摘要: 鱼类细菌性感染作为十分常见且危害严重的一类水产病害, 严重阻碍了我国水产养殖业的发展, 同时也造成了巨大经济损失, 而免疫防治作为一种安全有效的防治方法, 正逐步受到人们的关注。外膜蛋白作为革兰氏阴性菌外膜的主要组成成分, 不仅在维持细菌正常生命活动中发挥着重要作用, 同时具有较强的免疫原性及交叉免疫原性, 可以作为潜在的免疫保护性抗原, 在渔用疫苗的研发中具有广阔的应用前景。该文介绍了鱼类病原菌外膜蛋白的结构组成、种类功能、免疫原性等基本特性, 对外膜蛋白在亚单位疫苗、DNA疫苗、多价多联疫苗及活载体疫苗等渔用疫苗中的应用进行了论述, 并从疫苗佐剂应用及铁离子相关外膜蛋白研究等方面展开讨论, 以期对外膜蛋白渔用疫苗研发提供参考。

关键词: 病原菌; 外膜蛋白; 疫苗; 免疫保护

中图分类号: S942 文献标志码: A

Research progress of outer membrane protein vaccine of fish gram-negative pathogenic bacteria

WU Yao^{1,2}, LI Xiao-Yan^{1,2}, LIN Xiao-Ke^{1,2}, LIN Xiang-Min^{1,2*}

(1 School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2 Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: As a common and serious aquatic disease, bacterial infection of fish has seriously hindered the development of aquaculture industry in China and caused huge economic losses. Immunization prevention and treatment as a safe and effective prevention method has gradually attracted people's attention. As the main component of the outer membrane of gram-negative bacteria, outer membrane protein (OMP) not only plays an important role in maintaining the normal life activities of bacteria, but also has strong immunogenicity and cross-immunogenicity. Therefore, outer membrane protein can be used as a potential immune protective antigen and has a broad application prospect in the development of fishery vaccines. To provide reference and new research ideas for the development of OMP fishing vaccines, this review introduces the basic characteristics of OMPs of fish pathogens, such as structure composition, category, function and immunogenicity. The application of OMPs in subunit vaccines, DNA vaccines, multivalent vaccines and live vector vaccines for fishery vaccines is also discussed. In addition, we discuss the application of vaccine adjuvants and iron-related OMPs.

Key words: pathogen; outer membrane protein; vaccine; immune protection

中国是世界水产养殖第一大国。近年来, 我国渔业发展极为迅速, 2018年全国水产品总产量达6 457.66万吨, 占世界水产品总产量的78%, 渔业经济总产值高达25 864.47亿元^[1]。然而, 随着水产养殖业集约化、规模化程度不断提高, 所面临的各

类病害威胁也在不断加剧, 其中细菌性疾病在各类型病害中占到40%以上, 是最为常见且危害最为严

收稿日期: 2020-09-09; 修回日期: 2020-12-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670129)

*通信作者: E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

重的一类疾病。我国每年因水产病害所造成的经济损失高达数百亿元,严重阻碍了我国水产养殖业的快速发展。

长期以来,人们常常采用抗生素及化学药品进行细菌性疾病的防治,而这些措施会造成许多严重后果。例如,滥用抗生素会导致病原菌耐药性增强;抗生素还会随血液循环分布于组织器官,直接抑制吞噬细胞的吞噬功能,从而降低鱼类自身免疫力;同时,动物体内残留的药物不仅能够通过食物链对人体健康造成威胁,更在一定程度上破坏了生态系统的平衡。以上这些问题都将对我国水产养殖业和人类食品安全等方面构成威胁。因此,人们将水产养殖病害防治的研究重点转向渔用疫苗开发,主要集中在如何提高现有疫苗效力及开发新型高效疫苗上。作为目前最经济有效、最环保的预防细菌感染的生物制品,渔用疫苗起源于1942年,Duff首次应用灭活的杀鲑产气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)对硬头鳟进行口服免疫并取得成功^[2]。直至1975年,美国疫苗有限公司(American Vaccine Co. LTD)才获准生产首例商品性渔用疫苗——ERM菌苗^[3],此后疫苗的商业化生产及应用促进了渔用疫苗的研究进展。1984年至今,渔用疫苗的研发进入攀登发展期,商用疫苗数量由最初的2种发展到如今的24种,同时疫苗的种类也越来越多样化:早期的鱼类疫苗以灭活疫苗、减毒疫苗等传统疫苗为主;随着生物工程技术发展日渐成熟,如今陆续出现的亚单位疫苗、DNA疫苗、多联多价疫苗、活载体疫苗等各类新型疫苗,表现出更好的免疫效果、更高的安全性等传统疫苗无法比拟的独特优势。渔用疫苗研发进程及免疫保护效果除了受生物技术发展限制外,还受到多方面因素的影响,其中筛选免疫保护性良好的抗原对于疫苗研发具有重要价值,对疫苗免疫保护效果至关重要。外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)作为革兰氏阴性菌细胞表面分子,不仅在维持细胞结构及生命活动方面发挥作用,还被认为是细菌与外界环境相互作用的靶位点,其暴露的抗原决定簇致使外膜蛋白极易被宿主的免疫系统所识别,进而引起宿主的体液免疫和细胞免疫,起到良好的免疫保护作用。同时,一些高度保守的外膜蛋白诱导产生的免疫对不同种类的病原菌或同一病原菌的其他血清型具有交叉保护作用,是一种具有潜力的共同保护性抗原,可以有效运用到各类新型疫苗研发中。外膜蛋白作为免疫保护性抗原正成为渔用疫苗开发的研究热点。本文对

鱼类革兰氏阴性病原菌外膜蛋白的组成、功能、免疫原性及其在渔用疫苗中的应用展开论述,以期为进一步外膜蛋白疫苗研发提供参考。

1 外膜蛋白

1.1 外膜蛋白的分类及功能

鱼类革兰氏阴性病原菌具有由细胞质膜、肽聚糖细胞壁和外膜组成的复杂的膜系统^[4],以适应各种环境条件变化,同时能够有选择性地控制多肽、蛋白质、核酸及有机物质等各类分子的运输。外膜是革兰氏阴性菌膜系统所独有的组成结构,位于细菌的胞浆膜和肽聚糖外侧,由脂双层、外膜蛋白、脂多糖等组成^[5]。其中,外膜蛋白作为革兰氏阴性菌外膜的主要成分,占外膜总组成的一半,大都具有由不同偶数个 β -折叠构成的 β -桶结构,通常这些桶状结构会进一步形成三聚体或二聚体,甚至更为复杂的拓扑结构来行使其生物学功能^[6]。

外膜蛋白种类繁多,其中外膜蛋白A(outer membrane protein A, OmpA)、微孔蛋白(porin)及脂蛋白(lipoprotein)等是外膜蛋白中的主要蛋白,它们在细胞内表达的拷贝数较高,为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ /细胞。OmpA是外膜中相对保守的跨膜蛋白,在维持细菌结构以及适应环境变化等方面发挥作用。同时,一些OmpA同系物还可以作为宿主先天和适应性免疫反应的靶点,从而增强宿主的抵抗力^[7]。微孔蛋白又称基质蛋白,通常通过共价键形式与肽聚糖及脂多糖相连接,从而形成具有通透特性的相对非特异性通道,不仅能够保证细菌新陈代谢所必需的营养物质吸收,而且还能够控制环境中抗菌素及抑制剂等各类分子的扩散,有助于维持细菌的正常生命活动。脂蛋白能够通过稳定细胞外膜-肽聚糖复合体,进而维持细胞外膜结构的稳定性,在蛋白质分泌、信号转导、细胞壁代谢、抗生素耐药性、生物膜的形成以及与宿主组织的黏附等方面也发挥重要作用;此外,还可以作为脊椎动物先天免疫系统的信号分子,通过Toll样受体引起炎症,引发先天和适应性免疫反应^[8]。除上述蛋白以外,外膜中还存在一些含量较低,但同样具有重要生理功能的蛋白,称之为微量蛋白。现已证明,微量蛋白除了参与特异性的扩散过程之外,还在细胞生长发育过程中发挥重要作用,但其生物学功能尚未完全阐明^[9]。

1.2 外膜蛋白的免疫原性

已有研究表明,某些细菌的外膜蛋白能够在细菌致病过程中发挥作用。例如,Song等^[10]发现,与

禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)正常毒力菌株相比, 外膜蛋白基因*ybjX*突变菌株的致病性明显减弱。研究发现, 外膜蛋白的致病性主要是由于OMP能够增强细菌对宿主细胞的入侵、黏附作用, 有助于细菌在宿主内存活并逃避宿主的免疫防御机制^[11]。然而, 值得注意的是, 外膜蛋白的致病性往往需要在全菌条件下与其他致病因子协同作用, 当前并未有研究证明表达纯化后的OMP具有致病性。随着对外膜蛋白研究的不断深入, 人们发现外膜蛋白除了与细菌毒力相关外, 还具有良好的免疫原性, 不仅能够诱导机体产生体液免疫、细胞免疫, 还能激活补体介导的免疫系统。

在病原菌侵袭宿主的过程中, 外膜蛋白极易被宿主的免疫系统所识别, 进而引起免疫相关反应。在此过程中, 外膜蛋白在经过抗原递呈细胞处理、加工和递呈后, 可被抗原特异性淋巴细胞识别并进行活化、增殖、分化, 从而产生效应细胞及免疫效应因子。此外, 由于鱼类具有胸腺、肾脏、脾脏等主要的免疫器官以及免疫系统重要组分^[12-13], 其完善的免疫系统也奠定了外膜蛋白作为渔用疫苗的理论基础。目前已有一系列基于外膜蛋白免疫原性进行的鱼类疫苗研究。例如, Nehlah等^[14]将溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)外膜蛋白OmpK和OmpW基因构建到pET32 Ek/LIC载体中并在大肠杆菌中表达, 用表达OMP的灭活大肠杆菌对石斑鱼进行免疫。攻毒结果显示, rOmpK组和rOmpW组的相对成活率分别达到100%、63%, 血清中检测到溶藻弧菌的IgM抗体, rOmpK和rOmpW接种组接种后抗体水平呈上升趋势, 表明外膜蛋白OmpK、OmpW均能够在一定程度上保护鱼类免受溶藻弧菌的感染。Tang等^[15]对鱼肠弧菌(*Vibrio ichthyenteri*) OMPs的免疫保护作用进行了研究, 发现OmpT的相对免疫保护率(RPS)达到76.9%, 并且能够明显诱导特异性抗体的产生和sIg⁺淋巴细胞的增殖, 而且免疫相关因子表达明显上调, 表明OmpT可诱导牙鲆产生较强的先天免疫和体液免疫应答, 对鱼肠弧菌感染具有有效的免疫保护作用, 可作为预防鱼肠弧菌感染的候选疫苗。

此外有研究表明, 外膜蛋白诱导产生的免疫对不同种类的病原菌或同一病原菌的其他血清型具有交叉保护作用, 是一种潜在的共同保护性抗原^[16]。例如, Peng等^[17]对副溶血性弧菌外膜蛋白抗血清和重组蛋白的被动和主动免疫保护作用进行了研究, 发现其中两种重组蛋白VP1667和VP2369对副溶血

性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)均表现出有效的免疫保护作用, 是潜在的多价疫苗候选疫苗。伦镜盛等^[18]用霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的OmpU蛋白免疫小鼠后, 以多种弧菌进行攻毒实验, 分析其交叉保护特性; 结果表明, OmpU蛋白抗血清在弧菌种内和种间均产生显著的免疫交叉反应, 能够对小鼠提供43.0%~100%的免疫交叉保护作用。Yadav等^[19]在研究嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) OmpC蛋白免疫原性时发现, OmpC与不同的气单胞菌菌株具有特异的交叉反应性, 可以作为一种有效的疫苗来对抗气单胞菌的不同菌株。基于以上特性, 外膜蛋白已经逐步成为当前渔用疫苗研发的关注热点。

2 外膜蛋白疫苗的应用

2.1 外膜蛋白亚单位疫苗

亚单位疫苗是指通过提取病原菌中有效的免疫原成分而制成的成分单一的疫苗, 具有免疫特性稳定、抗体出现早、滴度高、免疫持续时间长等特点, 并且具有较高的安全性^[20]。在渔用疫苗研究初期, 利用外膜蛋白制备亚单位疫苗通常采用的方法是对外膜蛋白直接进行分离纯化。研究表明, 纯化的外膜蛋白在动物体内具有良好的免疫原性, 亚单位疫苗对动物体进行免疫后, 抗原能够通过吞噬或吞饮作用进入抗原提呈细胞形成吞噬体, 吞噬体与溶酶体相互融合形成吞噬溶酶体后, 在蛋白酶的作用下降解为肽, 随后肽装载到MHC II类分子上, 抗原肽-MHC II复合物转运至抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)表面, 供CD4⁺ T细胞识别, 能够有效地诱导机体的细胞免疫, 产生效应T细胞和淋巴因子。此外, 亚单位疫苗还可以通过激活细胞毒性T淋巴细胞而诱导机体细胞免疫反应, 产生特异性抗体^[21]。有实验数据表明, 外膜蛋白亚单位疫苗在抵抗对应病原菌感染方面, 能够提供50%~100%的相对免疫保护率。例如, Zhang等^[22]分析了嗜水气单胞菌外膜蛋白OmpF和OmpK对免疫相关基因的表达调控作用及对欧洲鳗鲡的免疫保护作用, 结果发现宿主免疫相关因子表达量均有所增加, 且外膜蛋白OmpK对欧洲鳗鲡的相对免疫保护率为70%, 有望成为抵御嗜水气单胞菌感染的候选疫苗; Valderrama等^[23]利用美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)外膜蛋白FrpA以及全菌灭活疫苗分别对塞内加尔鳗进行注射免疫, 攻毒实验

结果显示, 二者的相对免疫保护率分别为72.9%和79.3%, 证明外膜蛋白FrpA可以作为候选蛋白, 用于开发美人鱼发光杆菌亚单位疫苗。虽然多个实验数据证明了外膜蛋白亚单位疫苗对于抵御病原菌感染具有较高的应用价值, 但外膜蛋白的直接分离纯化操作过程较为复杂, 且制备成本较高、获得率低, 使得该方法难以在生产实践中得到广泛应用。

随着生物技术的不断发展, 当前亚单位疫苗的研发更多地应用了基因组学、蛋白质组学、基因工程等生物学技术, 基因工程亚单位疫苗应运而生。对外膜蛋白基因进行序列查询后, 设计特异性引物对目的基因进行扩增, 最后选择合适的载体以及表达系统对目的性外膜蛋白进行重组表达^[24]。这种方法极大地提高了外膜蛋白纯化效率, 能够从不可培养、高致病性或培养成本极高的细菌中获取外膜蛋白抗原, 降低研发及生产成本, 有利于大规模投入到生产实践中。当前利用基因工程重组表达的病原菌外膜蛋白包括嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌外膜蛋白等十余种。这些重组蛋白已经在大黄鱼、虹鳟、石斑鱼、印度草鱼等众多水产养殖对象中进行免疫实验。结果表明, 这些基因工程外膜蛋白亚单位疫苗均能够为免疫对象提供50%以上的相对免疫保护率^[25-26]。然而, 外膜蛋白亚单位疫苗存在一个主要问题, 灭活疫苗、减毒疫苗等全生物体疫苗通常包含多种抗原以及其他免疫刺激分子, 而外膜蛋白亚单位疫苗仅包含单一抗原且不具有免疫刺激作用, 免疫原性较差, 这可能是由于B细胞受体交联能力降低以及抗原呈递细胞刺激能力降低而导致的。因此, 外膜蛋白亚单位疫苗通常需要依赖有效的佐剂诱导免疫, 并利用加强免疫接种以确保长期保护性免疫。

2.2 外膜蛋白DNA疫苗

DNA疫苗是指将带有目的抗原基因的重组质粒转染或注射到动物体内, 使之表达天然抗原物质的一类疫苗。编码抗原的DNA疫苗能够诱导宿主产生适应性免疫反应, DNA疫苗经腹腔注射或肌肉注射等给药途径转染宿主的角质形成细胞或肌细胞, 表达抗原基因, 并通过外泌体或凋亡小体释放蛋白, 该蛋白被未成熟的树突状细胞(imature dendritic cells, iDC)内化, 随后树突状细胞通过组织相容性复合体MHC II将抗原呈递给淋巴结中的CD4⁺ T细胞。DNA疫苗也可直接转染包括iDC在内的抗原呈递细胞, 进行内源性转基因表达, 并通过组织相容性复合体MHC I和MHC II呈递, 产生CD8⁺和CD4⁺

T细胞反应。除细胞免疫反应外, 如果宿主B细胞受体识别蛋白质抗原, 在抗原特异性CD4⁺ T细胞协助下, 能够引发宿主体液免疫反应。与传统疫苗相比, DNA疫苗具有更高的安全性及更好的稳定性, 并且能够在动物体内长时间存在, 为宿主提供持续的免疫保护^[27], 因此广泛应用于癌症、传染性疾病预防以及水产养殖等各类疫苗研究中。2005年, 首个获批用于水产养殖的DNA疫苗问世, 该疫苗主要用于保护大西洋鲑鱼免受传染性造血坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)感染, 这也是首个获批用于全球畜牧生产的兽用DNA疫苗。影响DNA疫苗免疫效果的因素有许多, 其中目的基因的选定是关键, 只有准确选择合适的抗原基因, 才能在一定程度上保证构建疫苗的安全性及有效性。病原菌外膜蛋白具有较高的安全性, 同时具有良好的免疫原性, 适用于构建DNA疫苗。例如, 将哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) SF-1外膜蛋白基因OmpU插入PEGFP-N1质粒中构建DNA疫苗, 对大菱鲆进行免疫后产生了特异性抗体反应, 并保护宿主免受哈维氏弧菌感染, 免疫保护率达到51.4%^[28]。与此同时, 基于质粒可以同时容纳多种抗原基因这一特性, 通过对抗原基因进行优化和组合, 可以尝试构建多价多联DNA疫苗。例如, Li等^[29]利用DNA重组技术, 将副溶血弧菌、溶藻弧菌、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)及大肠杆菌的OmpA序列进行重组, 构建了43个重组嵌合体基因; 溶藻弧菌及迟钝爱德华氏菌攻毒结果显示, 在43种OmpA DNA疫苗中, EompAs19能够有效预防溶藻弧菌及迟钝爱德华氏菌感染。这是首次报道利用DNA重组技术开发多价疫苗, 为渔用疫苗的开发提供了新的策略。然而, 虽然针对外膜蛋白DNA疫苗的研究众多, 却往往难以成功应用于生产实践中, 主要是由于DNA疫苗的免疫原性较差, 且裸露的质粒DNA在动物体内会有部分降解, 成功进入细胞的DNA分子需要穿过核膜屏障才能进行转录, 这些问题均会影响外膜蛋白DNA疫苗的生产应用效果。当前, 可以采取的优化措施主要是通过优化启动子及密码子增强抗原表达, 采用纳米载体保护DNA疫苗不被降解, 以及使用佐剂增强对抗原呈递细胞的刺激, 提高DNA疫苗的免疫原性。

2.3 外膜蛋白多联多价疫苗

水产养殖环境复杂, 病原菌种类繁多, 且不同种类或不同血清型的病原菌可能存在混合感染的情况, 使用单价疫苗逐一对常见病原菌进行免疫, 操

作难度较大, 需要耗费大量人力物力。因此, 利用多种病原菌及其不同血清型之间存在的交叉免疫原性构建联合疫苗, 成为近年来研究比较热门的鱼类疫苗形式。联合疫苗主要分为多价疫苗和多联疫苗两种类型。多价疫苗是指由一种病原生物的多个血清型抗原所制成的、对同一病原菌的若干血清型具有交叉保护作用的疫苗。例如, 李惠和彭宣宪^[30]对常见的水产病原菌外膜蛋白交叉免疫原性进行了较为系统的分析研究, 为外膜蛋白多价疫苗的研究奠定了基础。他们分别对大肠杆菌、副溶血弧菌、溶血弧菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等主要水产病原菌的118个外膜蛋白进行了免疫保护作用评价, 筛选出24个免疫效果较好的外膜蛋白, 其中9种具有较高的交叉免疫原性, 表明外膜蛋白可以作为多价疫苗研发的潜在研究对象, 能够成为多价疫苗的候选蛋白。多联疫苗是由针对不同病原菌的抗原按照特定比例混合而成, 不仅可以用于预防多种病原菌感染, 还能够避免交叉感染, 减轻水产养殖免疫负担。人们早在19世纪30年代就已经开始了对多联疫苗的研究^[31]。随着对鱼类病原菌研究的不断深入, 研究人员发现多种水产病原菌之间存在着交叉保护作用, 为研制渔用多联疫苗提供了可能。例如, Xing等^[32]利用鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)热休克蛋白Hsp33与迟钝爱德华氏菌OmpC构建了一种多联疫苗, 并对其免疫原性进行分析, 发现该疫苗具有良好的免疫原性, 对鳃弧菌、迟钝爱德华氏菌的免疫相对保护率分别为70%、60%, 为多联疫苗的进一步研究奠定了基础; Guo等^[33]利用嗜水气单胞菌外膜蛋白及鳃弧菌外膜蛋白OmpA构建了一种多联疫苗, 对欧洲鳗鲡进行免疫后检测到机体内免疫相关基因表达活性、全血细胞增殖、血清和皮肤黏液抗体效价、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性均显著升高, 表明该疫苗可以有效提高欧洲鳗的免疫功能, 并且对预防嗜水气单胞菌、鳃弧菌和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)感染都起到有效的免疫保护作用, 为鱼类多联疫苗的开发提供了有价值的参考。

2.4 外膜蛋白重组活载体疫苗

活载体疫苗是指以非致病性生物体作为载体, 携带并表达免疫相关抗原基因的一类疫苗, 当前常用的活菌载体主要是无致病性或者减毒致病菌^[34]。由于活载体疫苗中抗原决定簇具有与致病性病原体抗原相同或相似的构象, 且活的细菌载体具有能够被免疫系统识别的自然特性, 因此能够有效诱导黏

膜和全身免疫应答, 引发强烈的免疫反应^[35]。例如, 李梅^[36]在大肠杆菌及乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中分别表达嗜水气单胞菌OmpA, 对小鼠进行口服免疫及嗜水气单胞菌攻毒后, 乳酸乳球菌活载体疫苗表现出良好的免疫保护效果, 对小鼠的免疫保护率高达为90%。后续研究发现, 抗原基因在动物机体内的表达情况及留存时间对活载体疫苗的免疫效果至关重要。通常来讲, 质粒介导的外源基因在机体内表达水平较高, 但随着动物机体的新陈代谢, 质粒数量也在随之减少, 便可能引起抗原基因表达量下降, 进而影响免疫效果。因此, 构建高水平持续表达的外源基因表达系统对研发活载体疫苗是至关重要的, 这也是当前水产方面活载体疫苗研发的重点和难点。

3 外膜蛋白疫苗研究新方向

3.1 应用新型佐剂提高疫苗效力

佐剂作为当前疫苗组成的基本成分^[37], 最早起源于20世纪20年代。1926年, 研究人员通过吸附于铝盐类化合物的白喉类毒素证明了铝佐剂的佐剂活性。迄今为止, 铝盐类佐剂仍然是使用最为广泛的疫苗佐剂。但与此同时, 人们也发现其存在一定缺陷, 例如无法诱导机体产生细胞免疫, 无法对多糖类抗原发挥协助作用等, 这些问题大大限制了铝佐剂在多种疫苗中的应用。随后研制出的种类繁多的佐剂类型也都具有一定的限制性, 例如乳剂类佐剂、弗氏完全佐剂和脂多糖类佐剂具有极大的毒副作用, 极易对免疫机体造成伤害。常规的佐剂类型难以满足快速发展的新型疫苗的需求, 因此, 新型佐剂的研究开发成为人们的关注重点。当前的新型佐剂主要有: 纳米粒子佐剂、细胞因子、脂质体、cpG序列等。

1981年, Kreuter和Liehl^[38]通过将抗原与纳米聚合物颗粒相结合, 激发机体的细胞免疫及体液免疫, 使得特异性免疫抗体反应延长, 证明了纳米材料具有良好的佐剂活性及更高的稳定性。这主要是由于纳米粒子不仅在结构上能够与抗原紧密结合, 增加相对表面积和量子尺寸效应, 而且能够被细胞吞噬, 从而促进细胞对抗原的摄取, 提高抗原呈递能力^[39]。另外, 部分研究表明, 纳米技术的应用还能够增加疫苗在机体内的溶解度、稳定性、靶向性、生物相容性及渗透性^[40]。当前用于开发鱼类疫苗的纳米材料的类型主要有聚合物纳米颗粒、纳米脂质体、碳纳米管、磷酸钙、石墨烯等。其中碳纳

米管凭借其极高的稳定性, 以及能够携带多种抗原的特性, 使其在生物医学研究中应用最为广泛, 尤其是常应用于各类新型疫苗中。例如, 郭壮^[41]构建了7种嗜水气单胞菌外膜蛋白亚单位疫苗及其对应的碳纳米管载外膜蛋白疫苗, 并分别利用注射免疫及浸泡免疫斑马鱼的方法对外膜蛋白及碳纳米管载外膜蛋白进行免疫效果评价。结果显示, 与普通蛋白组相比, 无论是注射免疫还是浸泡免疫, 碳纳米管载外膜蛋白都能够显著提高免疫相关基因表达量, 增强机体免疫应答反应, 提供更强的免疫保护作用。纳米粒子佐剂作为新型佐剂, 虽然具有传统佐剂无法比拟的优势, 但在毒性安全及作用机制方面还缺乏相关研究, 对此仍需要进一步的探索。

随着对细胞因子研究的不断深入, 人们发现一些细胞因子具有明显的免疫佐剂活性, 对机体的免疫应答具有上调作用, 可增强机体抗感染能力, 增强疫苗的免疫保护作用^[42]。不同的细胞因子通过不同的作用机制发挥其佐剂活性, 例如, IFN- γ 上调Th1反应并增强MHC表达, IL-2、IL-4分别上调Th1、Th2反应, IL-1刺激T和B细胞成熟, IL-12诱导强Th1移位等^[43]。细胞因子作为新型疫苗佐剂, 在一定程度上对高效渔用疫苗的研发起到了推动作用。例如, 细胞因子IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、G-CSF作为免疫佐剂能够诱导更强的体液免疫、细胞免疫, 并增强迟发性肠杆菌亚单位疫苗OmpV对爱德华氏菌病的免疫效果^[44-45]。

脂质体是由胆固醇和无毒的天然磷脂形成的球形囊泡, 抗原成分可以被包裹在闭合囊泡内或结合在囊泡膜上, 随脂质体一同被抗原呈递细胞摄取, 诱导体液和细胞介导的免疫反应^[46], 同时脂质体还可以通过控制抗原释放速度进而延长免疫反应时间。此外, 进一步提高脂质体免疫佐剂作用的方法包括受体介导靶向巨噬细胞、使用多种辅助佐剂、修饰囊泡的结构特征和使用细胞因子^[47]。但由于脂质体在稳定性及生产成本方面的问题, 目前在渔用疫苗方面并未广泛应用, 在外膜蛋白疫苗的研发中尚无相关研究。

3.2 铁离子相关外膜蛋白的研究为疫苗研发提供新思路

当前对外膜蛋白的研究主要集中在少数几个高丰度蛋白上, 而对于自然环境条件下铁离子浓度较低(10^{-8} ~ 10^{-9} mol/L)的情况下所表达的外膜蛋白, 其免疫原性和免疫保护性的研究较少, 缺乏系统的筛选与分析。如前所述, 外膜蛋白在适应外部环境变

化中发挥重要作用, 包括对渗透压、抗生素、酸胁迫以及铁限制(iron-limited)的反应能力^[48]等。在对鱼类病原菌的研究过程中发现, 铁是大多数细菌必需的微量营养素, 通常可从铁螯合的铁载体或直接从含铁的宿主蛋白中获取。对于革兰氏阴性细菌而言, 经典的铁转运系统主要是由外膜蛋白受体、周质结合蛋白以及内膜ABC转运蛋白协同工作, 将铁离子从细胞表面运送至细胞质^[49], 进而参与细菌的电子传递、DNA合成、三羧酸循环、生物膜形成等诸多重要的生物学过程。同时研究发现, 铁也是细菌毒力和致病性的关键调控因子, 细菌毒力及其致病性取决于其从宿主体内获取铁的能力^[50], 但目前铁调控细菌毒力的分子机制并未完全阐明。

值得注意的是, 当细菌入侵宿主时, 往往处于局部缺铁的环境中, 此时某些特定的外膜蛋白在参与调节细胞内部铁离子平衡中发挥重要的生物学功能。例如溶藻弧菌外膜蛋白OmpU与细菌内部铁离子平衡相关^[51], 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)外膜蛋白OmpW参与细菌的铁吸收^[52]等。此外, 研究表明在限铁条件下, 作为铁载体复合物和铁转运血红素复合物受体的外膜蛋白表达上调^[53]。对这些铁调节相关外膜蛋白的免疫保护特性进行研究, 有望筛选出新的渔用疫苗候选蛋白, 为当前新型疫苗的开发提供有效的候选抗原。例如, Wang等^[54]通过定量蛋白质组学方法比较铁限制与营养充分条件下嗜水气单胞菌蛋白质组表达差异, 鉴定出21个上调的外膜蛋白、10个下调的外膜蛋白, 并评估了5个铁调节相关外膜蛋白对斑马鱼的免疫保护作用; 其中, A0KIU8的相对免疫保护率可达到68.85%, 表明嗜水气单胞菌中部分铁调节蛋白可能成为潜在的候选疫苗。Xiong等^[55]研究了溶藻弧菌外膜蛋白在限铁条件下的表达变化, 并鉴定了相关蛋白的免疫保护活性, 分析得出7种铁离子相关蛋白; 攻毒实验结果表明, VA1061和VPA0860是显性抗原, 能够刺激宿主产生更强的抗体反应, 进一步加深了对鱼类病原菌铁离子相关蛋白的认识。此外, 广泛存在于革兰氏阴性细菌的外膜蛋白OmpW不仅与细菌毒力及致病性相关, 其蛋白表达量的变化还与铁离子浓度相关^[56], 有研究表明该蛋白具有良好的免疫原性^[57], 因此对其进行铁调控机制的研究有利于推进该蛋白在疫苗研发中的应用。

4 小结及展望

本文对外膜蛋白的组成、功能、免疫原性及其

在渔用疫苗中的应用进行了论述。外膜蛋白作为革兰氏阴性菌外膜的主要结构, 具有良好的免疫原性, 在渔用疫苗研究中被广泛应用, 而生物技术的不断发展也将进一步推进渔用疫苗的研发进程。与此同时, 还需要继续对以下几个方面进行深入研究, 以期尽快将更多的研究成果投入到生产实践中。首先, 针对当前已有的渔用疫苗种类, 在研究刺激干扰素诱导、抗原呈递以及B细胞和T细胞活化等作用机制的同时, 还要更多地关注疫苗抗原的特征和传递方式/途径, 在常规的注射、浸泡、口服等给药方式的基础上进行升级改进, 针对不同的疫苗种类选择适当的佐剂类型及免疫方式, 以期能够进一步加强疫苗的作用效果。其次, 实验阶段的疫苗检测内容和评价标准应进一步完善, 包括剂量反应、时间过程和保护作用的特异性等。此外, 对于疫苗的攻毒实验设计应当尽可能地与自然生存环境相一致, 能够反映在当前渔业条件下的疫苗作用效果。最后, 利用生物技术加快新型疫苗的开发利用是当前的研究重点。随着全基因组测序技术的不断发展, 人们已经掌握了多种鱼类病原菌全基因组序列, 这为利用反向疫苗学识别特异性潜在抗原提供了基础。mRNA疫苗作为DNA疫苗的一种替代方法现已用于临床医学。该技术始于1990年, 但稳定性较差、先天免疫原性高和体内传递效率低等因素限制了mRNA疫苗的发展; 当前, mRNA疫苗的稳定性和给药方法都有所改善, 使得mRNA疫苗可以快速、低成本地进行生产应用^[58]。然而, 目前这类疫苗主要用于预防和治疗癌症, 针对细菌性传染病的mRNA疫苗的临床试验仍处于初级阶段。

[参 考 文 献]

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019
- [2] Wang Q, Ji W, Xu Z. Current use and development of fish vaccines in China. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 96: 223-34
- [3] Wangkahart E, Secombes CJ, Wang T. Dissecting the immune pathways stimulated following injection vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against enteric redmouth disease (ERM). *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 85: 18-30
- [4] Vergalli J, Bodrenko IV, Masi M, et al. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 164-76
- [5] Baltoumas FA, Hamodrakas SJ, Iconomidou VA. The gram-negative outer membrane modeler: automated building of lipopoly saccharide-rich bacterial outer membranes in four force fields. *J Comput Chem*, 2019, 40: 1727-34
- [6] Slusky JS. Outer membrane protein design. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 45: 45-52
- [7] Nie D, Hu Y, Chen Z, et al. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Biomed Sci*, 2020, 27: 538-82
- [8] Narita SI, Tokuda H. Bacterial lipoproteins; biogenesis, sorting and quality control. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862: 1414-23
- [9] Bhati KK, Blaakmeer A, Paredes EB, et al. Approaches to identify and characterize microProteins and their potential uses in biotechnology. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 2529-36
- [10] Song X, Li C, Qi K, et al. The role of the outer membrane protein gene *ybjX* in the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathol*, 2018, 47: 294-9
- [11] Confer AW, Ayalew S. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol*, 2013, 163: 207-22
- [12] Lund H, Bakke AF, Sommerset I, et al. A time-course study of gene expression and antibody repertoire at early time post vaccination of *Atlantic salmon*. *Mol Immunol*, 2019, 106: 99-107
- [13] Scapigliati G, Fausto AM, Picchietti S. Fish lymphocytes: an evolutionary equivalent of mammalian innate-like lymphocytes? *Front Immunol*, 2018, 9: 971
- [14] Nehlah R, Firdaus-Nawi M, Nik-Haiha NY, et al. Recombinant vaccine protects juvenile hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*, against infection by *Vibrio alginolyticus*. *Aquacul Int*, 2017, 25: 2047-59
- [15] Tang X, Wang H, Liu F, et al. Recombinant outer membrane protein T (OmpT) of *Vibrio ichthyoenteri*, a potential vaccine candidate for flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microb Pathog*, 2019, 126: 185-92
- [16] Liu Q, Tan K, Yuan J, et al. Flagellin-deficient outer membrane vesicles as adjuvant induce cross-protection of *Salmonella Typhimurium* outer membrane proteins against infection by heterologous *Salmonella* serotypes. *Int J Med Microbiol*, 2018, 308: 796-802
- [17] Peng B, Lin X, Wang S, et al. Polyvalent protective immunogens identified from outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* and their induced innate immune response. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 72: 104-10
- [18] 伦镜盛, 张设熙, 董亚萍, 等. 弧菌外膜蛋白OmpU的免疫交叉反应性和交叉保护性. *微生物学报*, 2016, 56: 867-79
- [19] Yadav SK, Meena JK, Sharma M, et al. Recombinant outer membrane protein C of *Aeromonas hydrophila* elicits mixed immune response and generates agglutinating antibodies. *Immunol Res*, 2016, 64: 1087-99
- [20] Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: from whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol*, 2016, 120: 1-14

- [21] Xing J, Zhang Z, Luo K, et al. T and B lymphocytes immune responses in flounder (*Paralichthys olivaceus*) induced by two forms of outer membrane protein K from *Vibrio anguillarum*: subunit vaccine and DNA vaccine. *Mol Immunol*, 2020, 118: 40-51
- [22] Zhang W, Liao Z, Hu F, et al. Protective immune responses of recombinant outer membrane proteins OmpF and OmpK of *Aeromonas hydrophila* in European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquacul Res*, 2019, 50: 3559-66
- [23] Valderrama K, Balado M, Rey-Varela D, et al. Outer membrane protein FrpA, the siderophore piscibactin receptor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, as a subunit vaccine against photobacteriosis in sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 94: 723-9
- [24] Pandey A, Shin K, Patterson RE, et al. Current strategies for protein production and purification enabling membrane protein structural biology. *Biochem Cell Biol*, 2016, 94: 507-27
- [25] Nguyen HT, Nguyen TTT, Chen Y, et al. Enhanced immune responses and effectiveness of refined outer membrane protein vaccines against *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *J Fish Dis*, 2018, 41: 1349-58
- [26] Wang S, Cheng Z, Ling X, et al. Construction, immune protection and innate immune response of shuffled polyvalent OmpAs vaccines. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 74: 325-31
- [27] Adams A. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 90: 210-4
- [28] 王晴. 哈维氏弧菌外膜蛋白基因OmpU的克隆表达、DNA疫苗构建及对大菱鲆免疫效果探究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011
- [29] Li H, Chu X, Li D, et al. Construction and immune protection evaluation of recombinant polyvalent OmpAs derived from genetically divergent *ompA* by DNA shuffling. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 49: 230-6
- [30] 李惠, 彭宣宪. 重要水产养殖动物病原菌高效多价疫苗保护原的研究. *生命科学*, 2010, 22: 1107-11
- [31] Slifka MK, Amanna IJ. Role of multivalency and antigenic threshold in generating protective antibody responses. *Front Immunol*, 2019, 10: 956
- [32] Xing J, Li P, Tang X, et al. Recombinant Hsp33 and OmpC protein can serve as promising divalent vaccine with protection against *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda* in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 74: 341-8
- [33] Guo S, He L, Wu L, et al. Immunization of a novel bivalent outer membrane protein simultaneously resisting *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella anguillarum* and *Vibrio vulnificus* infection in European eels (*Anguilla anguilla*). *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 97: 46-57
- [34] Szatraj K, Szczepankowska AK, Chmielewska-Jeznach M. Lactic acid bacteria-promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *J Appl Microbiol*, 2017, 123: 325-39
- [35] Yurina V. Live bacterial vectors-a promising DNA vaccine delivery system. *Med Sci (Basel)*, 2018, 6: 27
- [36] 李梅. 嗜水气单胞菌外膜蛋白基因工程活载体疫苗的制备及其对小鼠免疫效果的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007
- [37] Schijns VE, Lavelle EC. Trends in vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10: 539-50
- [38] Kreuter J, Liehl E. Long-term studies of microencapsulated and adsorbed influenza vaccine nanoparticles. *J Pharm Sci*, 1981, 70: 367-71
- [39] Shaalan M, Saleh M, El-Mahdy M, et al. Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: a review. *Nanomedicine*, 2016, 12: 701-10
- [40] Doll TA, Raman S, Dey R, et al. Nanoscale assemblies and their biomedical applications. *J R Soc Interface*, 2013, 10: 20120740
- [41] 郭壮. 单壁碳纳米管载嗜水气单胞菌外膜蛋白亚单位疫苗的评价[D]. 福州: 福建农林大学, 2019
- [42] Asif M, Jenkins KA, Hilton LS, et al. Cytokines as adjuvants for avian vaccines. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82: 638-43
- [43] Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 2007, 25: 3752-62
- [44] Tang X, Guo M, Sheng X, et al. Interleukin-2 (IL-2) of flounder (*Paralichthys olivaceus*) as immune adjuvant enhance the immune effects of *E. tarda* subunit vaccine OmpV against *Edwardsiellosis*. *Dev Comp Immunol*, 2020, 106: 103615
- [45] Guo M, Tang X, Sheng X, et al. The effects of IL-1 β , IL-8, G-CSF and TNF- α as molecular adjuvant on the immune response to an *E. tarda* subunit vaccine in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 77: 374-84
- [46] Villumsen KR, Kania PW, Christensen D, et al. Injection vaccines formulated with nucleotide, liposomal or mineral oil adjuvants induce distinct differences in immunogenicity in Rainbow trout. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8: 103
- [47] Gregoriadis G, Gursel I, Gursel M, et al. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J Control Release*, 1996, 41: 49-56
- [48] Masi M, Winterhalter M, Pagès JM. Outer membrane porins. *Subcell Biochem*, 2019, 92: 79-123
- [49] 冯言, 刘马峰, 程安春. 革兰氏阴性菌亚铁离子转运系统的组成及作用机制. *微生物学报*, 2016, 56: 1061-9
- [50] Sheldon JR, Laakso HA, Heinrichs DE. Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Microbiol Spectr*, 2016, 4: VMBF-0010-2015
- [51] Lv T, Dai F, Zhuang Q, et al. Outer membrane protein OmpU is related to iron balance in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol Res*, 2020, 230: 126350
- [52] Catel-Ferreira M, Marti S, Guillon L, et al. The outer membrane porin OmpW of *Acinetobacter baumannii* is involved in iron uptake and colistin binding. *FEBS Lett*, 2016, 590: 224-31
- [53] Teng T, Xi B, Chen K, et al. Comparative transcriptomic and proteomic analyses reveal upregulated expression of virulence and iron transport factors of *Aeromonas hydrophila* under iron limitation. *BMC Microbiol*, 2018, 18: 52

- [54] Wang Y, Chen H, Guo Z, et al. Quantitative proteomic analysis of iron-regulated outer membrane proteins in *Aeromonas hydrophila* as potential vaccine candidates. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 68: 1-9
- [55] Xiong X, Zhang B, Yang M, et al. Identification of vaccine candidates from differentially expressed outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* in response to NaCl and iron limitation. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29: 810-6
- [56] 叶智鸽. 铁离子对大肠杆菌外膜蛋白OmpW的调控机制研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2015
- [57] Huang P, Cai J, Yu D, et al. An IL-6 gene in humphead snapper (*Lutjanus sanguineus*): identification, expression analysis and its adjuvant effects on *Vibrio harveyi* OmpW DNA vaccine. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 95: 546-55
- [58] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 261-79