

鼠疫疫苗研究进展

匡 衡, 蔡 欣综述, 汪茂荣审校

【摘要】 鼠疫主要依赖抗生素治疗, 近年来随着耐药鼠疫杆菌的发现及流行, 鼠疫疫苗的应用逐渐增多。目前国内使用的鼠疫疫苗主要为减毒活疫苗, 而亚单位疫苗、结合疫苗和 DNA 疫苗仍在研发中, 文章主要就近年来鼠疫疫苗的研究方向, 研究突破和对未来鼠疫疫苗应用的展望进行综述。

【关键词】 鼠疫; 疫苗; 研究进展

【中图分类号】 R516.8 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)03-0307-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.03.018

Progress in plague vaccine research

KUANG Heng, CAI Xin reviewing, WANG Mao-rong checking

(1. Anhui Medical University Affiliated with Baiyi Clinical College, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. Institute of Liver Disease, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 Plague is mainly handled by antibiotics. With the discovery and prevalence of drug-resistant *Yersinia pestis* in recent years, the application of plague vaccine is increasing gradually. Presently, the plague vaccine used in China is mainly live attenuated vaccine, while the subunit vaccine, conjugate vaccine and DNA vaccine are still under development. In this paper, the research direction of plague vaccine in recent years, the research breakthrough and the prospect of future application of plague vaccine is summarized.

【Key words】 plague; vaccines; advances in research

0 引 言

鼠疫是鼠疫耶尔森菌引起的一种严重的人畜共患传染性疾病, 在我国属于甲类传染病。人类历史上有记载的流行出现过 3 次, 造成了数亿人的死亡。第 3 次鼠疫流行开始于 18 世纪, 并持续至今^[1]。近几年来, 鼠疫疫情时有发生, 2017 年 8 月马达加斯加鼠疫疫情爆发, 感染者高达数千人, 其中大部分为肺鼠疫。2019 年 11 月 12 日北京确诊 2 例肺鼠疫病例, 11 月 15 日内蒙古确诊 1 例腺鼠疫病例。2020 年 7 月 5 日, 内蒙古 1 名牧民确诊为腺鼠疫, 8 月 2 日包头市发现 1 例死亡病例, 经会诊确诊为肠型鼠疫, 死亡原因为循环系统衰竭; 8 月 6

日包头市发现一起腺鼠疫病例, 患者于 8 月 7 日凌晨死亡。目前, 鼠疫治疗以链霉素为主的抗生素进行治疗, 但近年来发现鼠疫耐药菌甚至是多重耐药菌, 加之恐怖分子可利用耐药鼠疫耶尔森菌制作生物武器, 对人类造成生命威胁, 因此, 鼠疫疫苗的研发与临床应用显得尤为迫切。早在 19 世纪末, Alexandre Yersin 在香港发现了鼠疫耶尔森菌, 并在数年后研制出了第一剂鼠疫疫苗^[2]。目前为止, 鼠疫疫苗的种类主要有减毒活疫苗、亚单位疫苗、结合疫苗和 DNA 疫苗等, 但由于安全和保护效力问题, 国内仅有少数疫苗上市。本文就鼠疫疫苗的研发情况作一综述。

1 减毒活疫苗

目前国内上市的鼠疫疫苗大多为 EV76 减毒活疫苗, EV76 是 1926 年从马达加斯加获得的鼠疫菌株, 经过数年培养后减弱了毒性, 并投入临床使用。

作者单位: 210002 南京, 安徽医科大学八一临床学院 (匡 衡、蔡 欣); 210002 南京, 东部战区总医院秦淮医疗区肝病科 (汪茂荣)

通信作者: 汪茂荣, E-mail: maorongwang@126.com

在对 EV76 菌株不断培育和传代中,人们发现 *pyrE* 基因是 EV76 菌株的一个突变热点,这可能对研发新型 EV76 疫苗有所帮助^[3]。脂质 A 是脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的疏水性锚点,是 LPS 的毒性和生物学活性的主要组分, LPS 通过细胞表面的 TLR4 通路激活细胞。而鼠疫耶尔森菌在 37℃ 下合成一种 TLR4 通路无法识别的四酰化脂质 A, 以此来逃避先天免疫反应,在低温下, *lpxP* 表达,生成六酰化脂质 A, 激活 TLR4 通路^[4]。Sun 等^[5] 将大肠杆菌 *lpxP* 基因导入鼠疫耶尔森菌染色体中,以免由于细菌丢失质粒导致毒性,构建了 X10015 菌株,使其毒力大大降低。X10030 菌株是将 $\Delta Pcrp21::TT\ araC\ PBAD\ crp$ 突变导入 X10015 菌株得到,接种小鼠后诱导了高水平的 IL-10,并在动物实验中证实了其比 X10015 菌株更强的免疫原性和更低的毒性。2020 年, Wang 等^[6] 从 KIM10 (pKD46) 中去除质粒 pKD46, 得到 YPS19 菌株,再在 YPS19 上引入 $Dlacl::Plpp\ lpxE$ 突变,得到 YPS20 菌株。YPS20 比 YPS19 极大降低了毒性,但 YPS20 的脂质 A 去磷酸化失去了在 *pgm* 位点上调毒力因子的能力,导致 YPS20 肌内注射不能为小鼠提供任何保护。因此,合成六酰化脂质 A 的 YPS19 菌株具有进一步的研究价值。

LcrV 蛋白是一种鼠疫耶尔氏菌抗原,作为一种多功能蛋白质,通过与负调控因子 LcrG 结合,并与 YopB 和 YopD 一起,影响效应子的分泌并进入真核细胞。LcrV 也可作为鼠疫杆菌分泌系统的针帽蛋白与 n-甲酰肽结合^[7]。LcrV 具有高度的免疫原性,可诱导保护性免疫反应,升高 IL-10,降低肿瘤坏死因子 α , 是许多疫苗的重要组成部分^[8]。重组减毒沙门氏菌 RASV, 由 Branger 等^[9] 于 2009 年构建, RASV 合成了 LcrV 的截断形式——LcrV196。在动物实验中,单独使用 RASV 可为小鼠提供完全的保护,可能是由于 RASV 产生免疫原性交叉保护抗原,而 LcrV 的保护作用并不显著。在 2016 年, Sanapala 等^[10] 优化了 (RASV) X12094, 使小鼠口服后产生高水平 LcrV, Psn 和 F1 抗体,对皮下及鼻内接种鼠疫杆菌的小鼠起到完全保护作用,而且未观察到对小鼠的毒性作用。这种基于 RASV 的三价疫苗可进一步研究其对人体的安全性及免疫能力,经过临床验证后未来有望成为下一代鼠疫疫苗。

2015 年, van Lier 等^[11] 通过高通量标记诱变法获得了 50 088 个鼠疫耶尔森菌株 C092 的突变体,并在

肺鼠疫小鼠模型中用野生型鼠疫杆菌 C092 进行筛选, 获得了 $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta ail$ 和 $\Delta lpp\ \Delta msbB::ailL2$ 两株突变体, $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta ail$ 突变株删除了编码基因 LPP, 乙酰转移酶 *MsbB* 和附着入侵位点 *Ail* 的基因, 而 $\Delta lpp\ \Delta msbB::ailL2$ 包含毒性减弱的 *Ail* 基因。Tiner 等^[12] 检测了这两株突变体, 并新建了突变体 $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta pla$, $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta pla$ 未删除 *Ail* 而是删除了纤溶酶原活化蛋白酶 (plasminogen activating protease, *pla*) 基因, 在小鼠肺鼠疫模型中, 接受 $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta ail$ 和 $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta pla$ 免疫的小鼠均有 80%~100% 的存活率, 分别接种两种疫苗的大鼠也均获得长期的体液和细胞介导免疫反应。由于 $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta ail$ 突变体被美国疾病防控中心排除在预防选择代理列表外, $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta pla$ 突变株可能成为鼠疫疫苗的重点研究对象, 而 $\Delta lpp\ \Delta msbB\ \Delta ail$ 突变体也并非无研究价值。

2 亚单位疫苗

亚单位疫苗相对减毒活疫苗要有更高的安全度。Leary 等^[13] 将表达鼠疫 F1 与 V 抗原的基因融合并连接入 pUC18 中, 得到的质粒可表达 F1 与 V 抗原的融合蛋白。在小鼠动物实验中, 单独应用融合蛋白和 F1 与 V 抗原联用的保护作用相似, 但明显优于单独使用 F1 或 V 抗原的保护效果。F1-V 亚单位疫苗通常使用铝制凝胶作为佐剂, 这种佐剂通常诱导辅助性 T 淋巴细胞 2 (helper T lymphocytes 2, Th2) 调节的体液免疫, 在免疫效果方面不如体液免疫与细胞免疫的同时保护^[14]。Dinc 等^[15] 发现了一种新型佐剂 SA-4-1BBL, 该佐剂促进 CD4+ 和 CD8+T 细胞产生肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和干扰素 (Interferon, IFN), 增加了 Th1 诱导的细胞免疫应答。在皮下接种鼠疫杆菌的小鼠模型中, 接种 SA-4-1BBL 连用铝制凝胶作为佐剂的 F1-V 亚单位疫苗的保护效果要优于使用单一佐剂的疫苗。但在肺鼠疫小鼠模型中, 尽管 SA-4-1BBL 增加了细胞免疫的产生, 但对雄鼠未产生更好的保护效果, 因此 SA-4-1BBL 增加免疫疗效的结论仍有待商榷。SA-4-1BBL 强大的刺激细胞免疫效果不仅可使用在 F1-V 亚单位疫苗上, 对其他亚单位疫苗, 尤其是针对细胞内病原体的疫苗可能更有效。在开发 F1-V 亚单位疫苗上, 新型佐剂的研发可能尤为重要。Gregg 等^[16] 通过细菌酶组合化学合成的新型

TLR4 配体辅助化合物 BECC438 作为一种新型佐剂, BECC438 引起平衡的 IgG1/IgG2c 应答, 在体外诱导细胞因子谱, 诱导高抗菌素特异性免疫滴度和 Th1 相关的 IgG2c 免疫滴度, 在动物模型中, 使用 BECC438 作为佐剂的 F1-V 亚单位疫苗也成功保护了腹腔接种鼠疫杆菌的小鼠免于死亡。新型佐剂的研发可以有效解决亚单位疫苗免疫方式单一的问题, 随着各种佐剂的研发使用, 亚单位疫苗在鼠疫免疫上有着很大潜力, 目前亚单位疫苗主要研究对象是 F1-V 抗原, 其他鼠疫抗原则少有研究, 基于 F1-V 的二价或多价疫苗可能更有研究价值。

为降低 LcrV 的活性, 北京市微生物与流行病学研究所通过在载体 pET24a 中插入 rV270-凝血酶-六氧嘧啶融合基因, 或在载体 pET32a 中插入六氧嘧啶-肠激酶-rV270 或六氧嘧啶-Xa-rV270 融合基因制备了一种重组 LcrV 的变种——rV270 蛋白。他们将 F1 与 rV270 混合, 加入铝制凝胶作为佐剂, 制备了 F1 + rV270 亚单位疫苗^[17]。在一个长期的动物实验中, 雌性 BALB/c 小鼠免疫后 539 d 依然可以检测出 F1 和 rV270 抗体, 该疫苗可以维持一个长时间的体液免疫^[18]。尽管 F1+rV270 亚单位疫苗仍然在研发中, 只要提高其免疫效果, 验证安全性, 接种这种亚单位疫苗就有可能成为未来人类免疫鼠疫的主要方式之一。

3 结合疫苗

结合疫苗通常由鼠疫杆菌保护性抗原与活载体结合得到, 由于需要使用活载体, 必须精确衰减载体毒性, 过高的衰减会降低载体诱发免疫的能力, 降低表达保护性抗原的水平, 而过低的衰减则会导致人体产生并发症。尽管研发难度较高, 结合疫苗强大的免疫作用和易于大批量生产的特点使得结合疫苗一直是鼠疫疫苗研发的热点。

牛痘病毒是天花的疫苗, 也是许多传染病和癌症的常用疫苗载体, 人体单次接种牛痘病毒可以获得数十年的 T 细胞免疫应答^[19]。Embry 等^[20]使用重组 ACAM2000 牛痘病毒构建了可表达 LcrV-TM 蛋白的 LcrV-TM 病毒株, 通过电镜检查, 发现 LcrV-TM 蛋白表达在成熟病毒粒子的表面, 接受该疫苗免疫的小鼠在接种 15 倍半数致死量的鼠疫杆菌后, 5 d 存活率达 100%, 而仅接受 LcrV 蛋白免疫的小鼠存活率只有 20%, 由此推断, 牛痘病毒可有效

提高传递抗原的效率, 更好的诱导免疫应答。

腺病毒载体是一种转导效率极高的病毒载体, 由于其转入细胞内后不整合到宿主细胞染色质, 仅在细胞核内染色之外进行表达, 所以拥有很高的安全性, 被证明具有佐剂活性以及促进细胞免疫的能力, 在基因治疗方面被广泛应用^[21]。在 2008 年, Sofer-Podesta 等^[22]合成筛选并纯化得到了腺病毒介导的产生 LcrV 抗原的疫苗 Ad α V, 通过蛋白质印迹法分析, 接种疫苗小鼠血清中迅速出现 LcrV 抗原, 发生免疫反应。对暴露前 6 h, 暴露时和暴露后 6 h 的小鼠进行免疫, 小鼠平均存活率为 93.7%, 证明 Ad α V 在暴露前后均有疗效。2016 年, Sha^[23]等将融合基因 YFV (包括 ycsF、caf1 和 lcrV) 导入一种复制缺陷的人 5 型腺病毒载体中, 得到了 rAd5-YFV 三价疫苗, 并在食蟹猴模型中提供了 100% 的保护, 这种疫苗已经进入临床研究阶段。腺病毒载体能否搭载更多鼠疫抗原还未被研究, 更多高价疫苗可能对鼠疫杆菌, 尤其是耐药性鼠疫杆菌有更好的免疫效果。

4 DNA 疫苗

DNA 疫苗又称核酸疫苗, 是将外源基因直接注射到体内进行表达, 从而引起细胞或体液免疫的疫苗。DNA 疫苗单次接种后可持续较长时间, 能同时诱导体液免疫与细胞免疫, 拥有较好的免疫效果, 适合大批量生产, 并且存储以运输方式为干粉, 适合商业化^[24]。2010 年, Yamanaka 构建了可表达 F1-V 或 V-Ag 的淋巴细胞趋化因子 (LTN) DNA 疫苗 LTN/F1-V 和 LTN/V-Ag, 通过鼻腔给药时, 两种 DNA 疫苗对小鼠保护作用不明显; 通过对 TH 细胞光谱的比对, 发现鼻腔给药影响了 TH17 细胞免疫效应的产生, 而肌肉注射 DNA 疫苗的疗效则要明显提高, 肌肉注射也是 DNA 疫苗主要接种方式^[25]。近年来, 电穿孔技术逐渐使用在了 DNA 疫苗中, 与传统注射疫苗相比, 使用电穿孔技术可使体液和细胞免疫应答增加 100 倍^[26]。单独表达 LcrV 的 DNA 疫苗后被证明可以引起 CD8⁺ T 细胞对 LcrV 的特定表位的免疫应答, LcrV 上存在潜在的 T 细胞表位^[27]。构建可表达 F1-V-Ag 的疫苗或许是接下来 LTN DNA 疫苗的研究方向, 由于是近年来新兴的疫苗, DNA 疫苗在人体上能否表达及是否安全也有待研究。

5 结语与展望

近年来防止生化武器威胁需求不断扩大, 研制

新型有效的鼠疫疫苗迫在眉睫。在如今形势下,研制鼠疫炭疽等烈性传染病的混合疫苗和多价疫苗将成为趋势。灭活疫苗和减毒活疫苗可有效防治野生型鼠疫,但其不稳定的安全性和无法防治耐药型鼠疫成为无法忽视的弱点。亚单位疫苗和基于亚单位疫苗的结合疫苗是如今疫苗研制的热点,高效且安全的免疫是其优势,而 DNA 疫苗目前依然难以离开实验室,研制对人体有效的 DNA 疫苗任重道远。

【参考文献】

- [1] 李书宝,戴 绘. 世界鼠疫疫情态势及研究进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2000,15(1): 21-26.
- [2] Steensma DP, Kyle RA. Alexandre Yersin: Discoverer of the Plague Bacillus[J]. Mayo Clin Proc, 2020, 95(1): 7-8.
- [3] Cui Y, Yang X, Xiao X, et al. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (Yersinia pestis EV76 lineage) during laboratory passages in different countries[J]. Infect Genet Evol, 2014, 26: 172-179.
- [4] Sun W, Curtiss R. Rational considerations about development of live attenuated Yersinia pestis vaccines[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2013,14(10): 878.
- [5] Sun W. A live attenuated strain of Yersinia pestis KIM as a vaccine against plague[J]. Vaccine, 2011, 29(16): 2986-2998.
- [6] Wang X, Singh AK, Sun W. Protection and Safety Evaluation of Live Constructions Derived from the Pgm-and pPCP1-Yersinia pestis Strain[J]. Vaccines, 2020, 8(1): 95.
- [7] Depaolo RW, Tang F, Kim I, et al. Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis[J]. Cell Host Microbe, 2008,4(4): 350-361.
- [8] Sing A, Reithmeier-Rost D, Granfors K, et al. A Hypervariable N-Terminal Region of Yersinia LcrV Determines Toll-like Receptor 2-Mediated IL-10 Induction and Mouse Virulence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(44): 16049-16054.
- [9] Branger CG, Torres-Escobar A, Sun W, et al. Oral vaccination with LcrV from Yersinia pestis KIM delivered by live attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium elicits a protective immune response against challenge with Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica[J]. Vaccine, 2009, 27(39): 5363-5370.
- [10] Sanapala S, Rahav H, Patel H, et al. Multiple antigens of Yersinia pestis delivered by live recombinant attenuated Salmonella vaccine strains elicit protective immunity against plague[J]. Vaccine, 2016, 34(21): 2410-2416.
- [11] van Lier CJ, Tiner BL, Chauhan S, et al. Further characterization of a highly attenuated Yersinia pestis CO92 mutant deleted for the genes encoding Braun lipoprotein and plasminogen activator protease in murine alveolar and primary human macrophages[J]. Microb Pathog, 2015, 80: 27-38.
- [12] Tiner BL, Sha J, Ponnusamy D, et al. Intramuscular Immunization of Mice with a Live-Attenuated Triple Mutant of Yersinia pestis CO92 Induces Robust Humoral and Cell-Mediated Immunity To Completely Protect Animals against Pneumonic Plague[J]. Clin Vaccine Immunol, 2015, 22(12): 1255-1268.
- [13] Leary SE, Griffin KF, Garmory HS, et al. Expression of an F1/V fusion protein in attenuated Salmonella typhimurium and protection of mice against plague[J]. Microb Pathog, 1997, 23(3): 167-179.
- [14] Bowen W, Batra L, Pulsifer AR, et al. Robust Th1 cellular and humoral responses generated by the Yersinia pestis rF1-V subunit vaccine formulated to contain an agonist of the CD137 pathway do not translate into increased protection against pneumonic plague[J]. Vaccine, 2019, 37(38): 5708-5716.
- [15] Dinc G, Pennington JM, Yolcu ES, et al. Improving the Th1 cellular efficacy of the lead Yersinia pestis rF1-V subunit vaccine using SA-4-1BBL as a novel adjuvant[J]. Vaccine, 2014, 32(39): 5035-5040.
- [16] Gregg KA, Harberts E, Gardner FM, et al. A lipid A-based TLR4 mimetic effectively adjuvants a Yersinia pestis rF-V1 subunit vaccine in a murine challenge model[J]. Vaccine, 2018, 36(28): 4023-4031.
- [17] Wang W, Qi ZZ, Zhang QW, et al. Different strategies for preparation of non-tagged rV270 protein and its efficacy against Yersinia pestis challenge[J]. Biomed Environ Sci, 2010, 23(5): 333-340.
- [18] Wang Z, Zhou L, Qi Z, et al. Long-Term Observation of Subunit Vaccine F1-rV270 against Yersinia pestis in Mice[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(1): 199-201.
- [19] Bhattacharya D, Meccas J, Hu LT. Development of a vaccinia virus based reservoir-targeted vaccine against Yersinia pestis[J]. Vaccine, 2010, 28(48): 7683-7689.
- [20] Embry A, Meng X, Cantwell A, et al. Enhancement of immune response to an antigen delivered by vaccinia virus by displaying the antigen on the surface of intracellular mature virion[J]. Vaccine, 2011, 29(33): 5331-5339.
- [21] 范凌云,谢庆军. 腺病毒载体的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(2): 153-157.
- [22] Sofer-Podesta C, Ang J, Hackett NR, et al. Adenovirus-Mediated Delivery of an Anti-V Antigen Monoclonal Antibody Protects Mice against a Lethal Yersinia pestis Challenge[J]. Infect Immun, 2009, 77(4): 1561-1568.
- [23] Sha J, Kirtley ML, Klages C, et al. A Replication-Defective Human Type 5 Adenovirus-Based Trivalent Vaccine Confers Complete Protection against Plague in Mice and Nonhuman Primates[J]. Clin Vaccine Immunol, 2016, 23(7): 586-600.
- [24] 李学荣,余新炳. 核酸疫苗及其免疫机制研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000,6: 82-86.
- [25] Yamanaka H, Hoyt T, Yang X, et al. A parenteral DNA vaccine protects against pneumonic plague[J]. Vaccine, 2010, 28(18): 3219-3230.
- [26] Albrecht MT, Livingston BD, Pesce JT, et al. Electroporation of a multivalent DNA vaccine cocktail elicits a protective immune response against anthrax and plague[J]. Vaccine, 2012, 30(32): 4872-4883.
- [27] Wang S, Goguen JD, Li F, et al. Involvement of CD8+ T cell-mediated immune responses in LcrV DNA vaccine induced protection against lethal Yersinia pestis challenge[J]. Vaccine, 2011, 29(39): 6802-6809.

(收稿日期:2020-09-29; 修回日期:2020-12-02)

(责任编辑:刘玉巧; 英文编辑:吕铨烽)