



金黄色葡萄球菌肠毒素中毒的免疫治疗策略*

李 青 窦磊娜 温 凯 于雪芝 余文博 沈建忠** 王战辉**

(中国农业大学动物医学院, 动物源食品安全检测技术北京市重点实验室, 北京 100193)

摘要 金黄色葡萄球菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxins, SEs) 是由金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 分泌的一类具有呕吐活性的细菌外毒素, 可引起严重的炎症反应和食物中毒。SEs 具有超抗原活性, 可与 T 细胞受体的可变区和 MHC II 类分子形成三元复合物 (TCR-SEs-MHC II), 直接刺激 T 淋巴细胞大量产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 (interleukin, IL) -2、IL-6 和 γ 干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 等细胞因子, 从而导致中毒性休克综合征 (toxic shock syndrome, TSS)。在临床常见的 SEs 中, 肠毒素 A (staphylococcal enterotoxin A, SEA) 和肠毒素 B (staphylococcal enterotoxin B, SEB) 是出现频率最高、毒性最大、危害最严重的两种。目前尚没有针对 SEs 中毒治疗策略的综述性研究。本文首先概述了 SEs 的分类、结构及毒性作用, 重点围绕 SEA 和 SEB, 分析了 TCR-SEs-MHC II 类分子相互作用位点, 最后总结了针对 SEs 中毒的主动免疫疗法和被动免疫疗法, 本文为 SEs 的深入研究提供了必要信息。

关键词 金黄色葡萄球菌, 肠毒素, 作用位点, 免疫疗法**中图分类号** Q81, R392**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0324

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种生存能力极强的革兰氏阳性机会致病菌, 可产生多种毒力因子, 引起广泛感染、中毒性休克综合征 (toxic shock syndrome, TSS) 和食物中毒。其中, 金黄色葡萄球菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxins, SEs) 是金黄色葡萄球菌的主要毒力因子。同时还有一类与 SEs 结构十分相似但不具有呕吐活性的蛋白质分子。国际葡萄球菌超抗原命名委员会 (international nomenclature committee for staphylococcal superantigens, INCSS) 将具有呕吐活性的蛋白质分子命名为 SEs, 缺乏呕吐活性或未被检测是否具有呕吐活性的蛋白质分子命名为类肠毒素 (staphylococcal enterotoxins-like, SEls)^[1]。

金黄色葡萄球菌的适宜生长温度和 pH 值范围较广, 因此该菌不仅可以引起浅表皮肤感染和深层组织感染, 还可以污染各种各样的食物, 包括肉类、蔬菜、水果、糕点和奶制品^[2], 其分泌的 SEs 可引起广泛感染和食品污染。SEs 具有高度稳定性, 对高温和大多数蛋白水解酶都具有强烈的抗性。金黄色葡萄球菌的菌体细胞在 80℃ 下经 30 min 即可被杀灭, 而 SEs 可耐受 100℃ 高温, 即使煮沸 30 min 还维持其生物活性和免疫活性, 并

且 SEs 能够抵抗胃肠液中胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等蛋白酶的水解作用^[3-5]。

SEs 污染范围广、稳定性高、具有致命的毒性作用, 研发出有效的治疗策略十分必要。目前还没有针对 SEs 治疗策略展开论述的综述。因此本文首先介绍了 SEs 的分类, 并针对出现频率高、毒性大、危害最严重的两种 SEs——肠毒素 A (staphylococcal enterotoxin A, SEA) 和肠毒素 B (staphylococcal enterotoxin B, SEB), 总结了其基本结构、超抗原活性及呕吐活性等毒性作用, 重点讨论了 SEA、SEB 发挥作用的 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR)-SEs-主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 三元复合物的相互作用结合区域以及关键结合位点, 并针对 SEA、SEB 总结了以疫苗为主的主动治疗策略以及以中和性抗体为主的被动治疗策略, 以期为

*北京市科技计划 (Z211100007021007) 和国家十三五重点研发计划 (2018YFC1602900) 资助项目。

** 通讯联系人。

沈建忠 Tel: 010-62734565, E-mail: sjz@cau.edu.cn

王战辉 Tel: 010-62734565, E-mail: wangzhanhui@cau.edu.cn

收稿日期: 2022-07-14, 接受日期: 2022-10-21

SEs有效治疗提供思路。

1 金黄色葡萄球菌肠毒素的分类及结构特点

1959年, Bergdoll和Casman首次发现SE, 并将其命名为SEA, 至今共发现了23种SEs和金黄色葡萄球菌类肠毒素(staphylococcal enterotoxins-like, SEIs)^[6-10]。这些毒素是由168~261个氨基酸组成的球状单链蛋白, 分子质量大小为19~29 ku。几乎所有的金黄色葡萄球菌都至少编码1个SE, 有些甚至可编码12个SEs^[11]。根据SEs的核苷酸和氨基酸序列的同源性, SEs和SEIs可以分为5组, I组包括毒性休克综合征毒素1(toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)、葡萄球菌超抗原样蛋白7(staphylococcal superantigen-like protein 7, SSL7)和SEIX; II组包括SEB、SEC、SEG、SEIU和SEIW; III组包括SEA、SED、SEE、SEH、

SEIJ、SEN和SEP; V组包括SEI、SEK、SEL、SEM、SEQ、SET和SEIV; IV组来源于链球菌, 故本文不予讨论。

尽管SEs之间的一级序列不同, 但三维结构十分相似, 主要由氨基端和羧基端两个结构域组成^[12-13](图1)。氨基端有一个特征性的寡糖/寡核苷酸折叠(oligosaccharide/oligonucleotide fold, O/O fold), 形成 β 桶状结构, 其分子内部高度疏水, 但表面覆盖着大量的亲水残基。羧基端含有一个 β 抓握基序(β -grasp motif), 两个结构域之间的 α 螺旋在分子顶端形成一个与TCR结合相关的浅腔。以III组的SEA和II组的SEB为例, 具体介绍SEs的二级结构^[14-15]。SEA的氨基端包含两个 β 折叠(β -sheet), 一个 β 折叠由 β 折叠股(β -strand) β 1、 β 4a和 β 5b构成, 另一个 β 折叠由 β 折叠股 β 2、 β 3、 β 4b和 β 5a构成, 两个 β 折叠构成一个 β 桶状结构(图1b)。 β 桶状结构上被 β 3和 β 4a之间的 α 螺旋

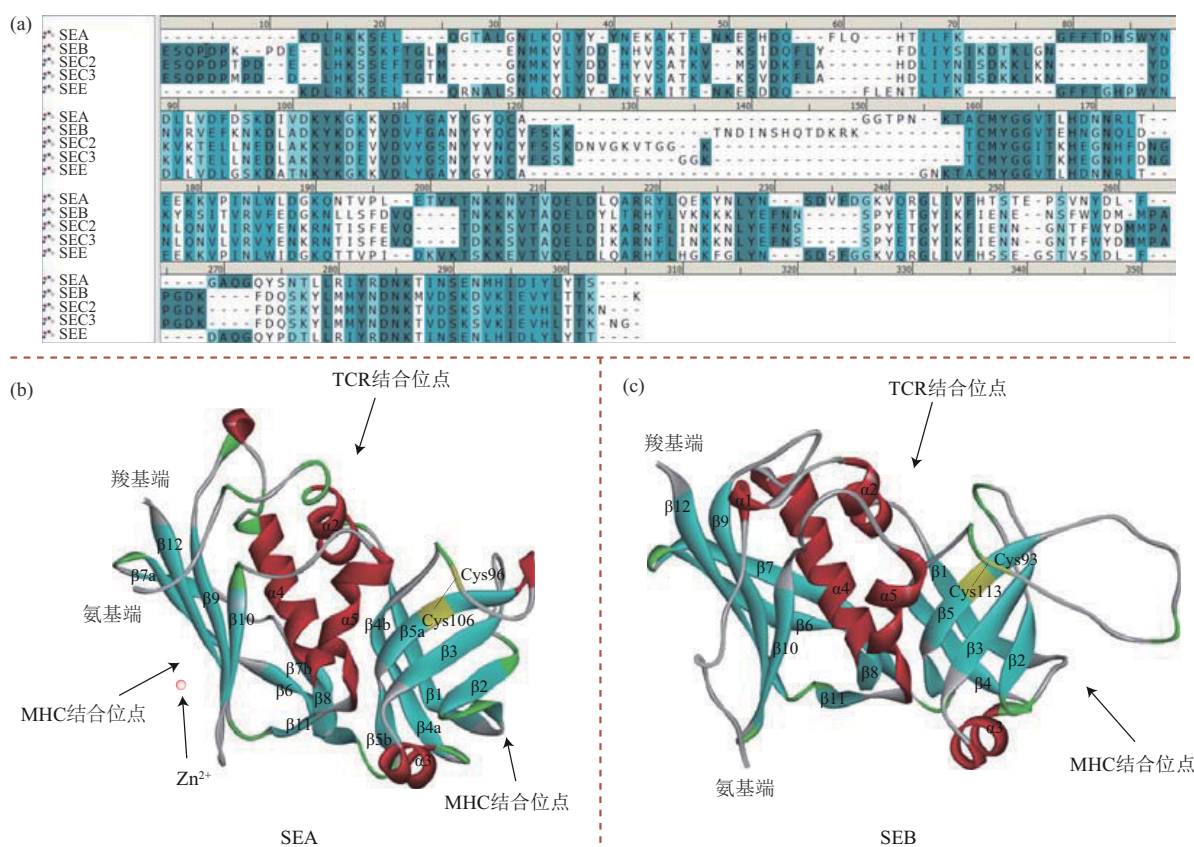


Fig. 1 Primary and tertiary structure of SEs

图1 SEs的一级结构和三级结构

(a) SEA (PDB ID: 1SXT)、SEB (PDB ID: 3SEB)、SEC2 (PDB ID: 1STE)、SEC3 (PDB ID: 1JWM) 和SEE (PDB ID: 5FKA) 的序列比对; 颜色越深表示氨基酸同源性越大; (b, c) SEA (b) 和SEB (c) 的三维结构以及活性位点分布, 不同的颜色表示不同的二级结构: 红色为螺旋, 青色为 β 折叠, 绿色为转角, 银色为卷曲, 黄色为半胱氨酸, 虚线为半胱氨酸间的二硫键。

(α -helix) $\alpha 3$ 覆盖。羧基端包含由 β 折叠构成的 β 抓握基序。两个半胱氨酸残基 (Cys96 和 Cys106) 在 β 桶状结构底部形成一个二硫键。SEB 氨基端包含由 β 折叠股 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 组成的 β 桶状结构和 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 等 3 个 α 螺旋 (图 1c)。两个半胱氨酸残基 (Cys93 和 Cys113) 在 β 桶状结构顶部形成一个二硫键。羧基端含有一个由 β 折叠股 $\beta 6$ 和 β 折叠股 $\beta 12$ 构成的反平行 β 折叠。SEA 和 SEB 都含有一个由上述二硫键构成的半胱氨酸环, 该环被认为与呕吐活性有关^[16]。SEA、SEC2 和 SED 的结构中存在 Zn^{2+} , 其在 SEs 与 MHC II 类分子相互作用中发挥着必不可少的作用^[17-18], 但 SEB、SEE 等与 MHC II 类分子相互作用时不依赖该 Zn^{2+} 。

2 金黄色葡萄球菌肠毒素的毒性作用

SEs 具有多种生物学活性, 主要包括超抗原性、诱导机体呕吐及胃肠炎活性。当 SEs 通过胃肠道或皮肤创口进入机体, 这些生物学活性在 SEs 产生毒性作用过程中发挥了巨大作用。超抗原与传统抗原刺激 T 细胞机制不同 (图 2)。传统抗原经抗原提呈细胞 (antigen-presenting cell, APC) 内化或处理后形成短的蛋白质水解肽, 可与 MHC I 或 II 类分子的多肽结合槽^[19]、TCR 的高变区形成特异性的 TCR-肽-MHC 复合物^[20] (图 2a)。而超抗原是完全的天然蛋白质, 不经 APC 的递呈与处理, 可直接与 MHC II 类分子多肽结合槽以外的位点结合^[21] (图 2b)。并且超抗原绕过与多肽结合的 TCR 特异性决定区, 与特异性的 TCR 结构域结合, 每一种超抗原都对应一种特异性的 TCR 结构域^[22]。超抗原与 MHC II 类分子、TCR 的这种作用方式导致更多的 T 细胞被刺激, 释放大量细胞因子^[23]。SEs 可以激活高达 30% 的 T 细胞, 导致肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 (interleukin, IL) -6、IL-2 和 γ 干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 等细胞因子大量释放, 最终导致机体产生 TSS 甚至败血症^[24]。其中 SEB 是超抗原活性最强的 SEs, 雾化 SEB 可导致动物肺部产生肺水肿和呼吸衰竭^[25]。SEB 在 20 世纪 60 年代被美国列为进攻性生物战剂, 在 2000 年被美国国家过敏和传染病研究所列为 B 类重点病原体^[26]。SEB 对公共卫生安全产生了巨大威胁。

人和动物肠道摄入高纳克或低微克数量级浓度

的 SEs, 会产生发烧、剧烈恶心呕吐、腹痛和腹泻等症状^[27-28]。但 SEs 导致机体呕吐的机制仍不清楚, 有学者认为, SEs 导致呕吐主要是引起机体产生 5-羟色胺进而刺激迷走神经, 但该假说并未得到进一步确证^[29]。据报道 70% 的肠毒素性食物中毒 (*S. aureus* food poisoning, SFP) 都是由 SEA 引起的^[30]。鉴于 SEA 和 SEB 的较强毒性, 临床主要围绕 SEA 和 SEB 的中毒治疗开展研究。

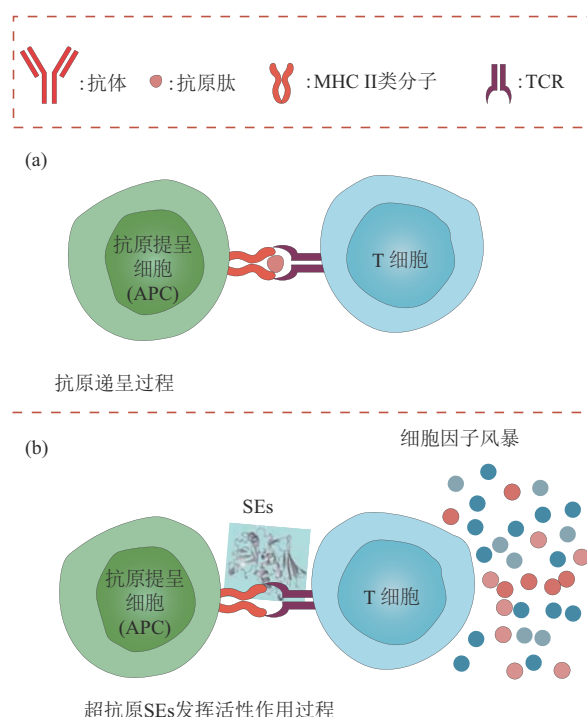


Fig. 2 TCR, MHC class II molecules interact with antigens and superantigens

图2 TCR、MHC II 类分子与抗原、超抗原相互作用

(a) 抗原经APC细胞处理后形成短肽, 与TCR、MHC II类分子相互作用。(b) 超抗原绕过APC细胞处理, 直接与TCR、MHC II类分子相互作用。

3 TCR-SEs-MHC II 类分子相互作用位点分析

SEs 主要与 MHC II 类分子、TCR 形成 TCR-SEs-MHC II 类分子三元复合物发挥超抗原活性, 因而了解 SEs 与 MHC II 类分子、TCR 相互作用的关键位点, 对于围绕这些关键作用位点开展针对性

的研究, 达到治疗目的具有重要意义。

所有 TCR-SEs-MHC II 类分子三元复合物存在两个相互作用界面, TCR-SEs 相互作用面和 SEs-MHC II 类分子相互作用面, 而 TCR-MHC II 类分子相互作用界面在不同 SEs 分子中存在情况不同^[31-32]。现有研究多是针对 TCR-SEs、SEs-MHC II 类分子两个作用面制备疫苗或中和抗体, 因此本文围绕 SEA、SEB, 针对这两个作用面的作用位点展开论述。

3.1 TCR-SEs相互作用位点分析

不同的 SEs 识别不同的 TCR 亚型, 与 SEs 相互作用的 TCR 结构域具有特异性^[22]。SEA 与人 TCR 亚型 $V_{\beta}5.2$ 、 $V_{\beta}5.3$ 、 $V_{\beta}7.2$ 、 $V_{\beta}9$ 、 $V_{\beta}16$ 、 $V_{\beta}18$ 和 $V_{\beta}22$ 链均存在相互作用^[22]。SEB 可与人 TCR 亚型 $V_{\beta}3$ 、 $V_{\beta}12$ 、 $V_{\beta}14$ 、 $V_{\beta}15$ 、 $V_{\beta}17$ 和 $V_{\beta}20$ 链结合^[15]。人 TCR V_{β} 利用互补决定区 (complementary determining region, CDR) 2、骨架区 (frame region, FR) 3、高变区 (hypervariable region, HV) 4 和 CDR1 与 SEA 羧基端与氨基端之间的浅槽相互作用, 分别占 SEA-TCR 复合物中的 TCR 埋藏面积的 37%、20%、23% 和 10%。SEA 有 4 个区域与 TCR 产生相互作用 (图 3a), 包括 $\alpha 2$ 螺旋 (残基 Gly20、Thr21、Gly24、Asn25、Lys27 和 Tyr32、Asn33、Glu34), $\beta 2$ - $\beta 3$ 和 $\beta 4$ - $\beta 5a$ 环组成的疏水区 (残基 Ser62、Trp63、Tyr64、Tyr91、Tyr92、Gly93 和 Tyr94), $\alpha 4$ - $\beta 9$ 环 (残基 Val174 和 Phe175), 以及 $\alpha 5$ 螺旋的氨基端一侧 (残基 Tyr205 和 Ser206)^[33]。人 TCR 与 SEB 氨基端 β 桶状结构和 $\alpha 2$ 螺旋之间的浅槽结合。SEB 中的残基 Asn23、Val26、Asn31、Val33、Asn60、Tyr61、Tyr90 和 Tyr91 残基在毒素分子与人 TCR 相互作用过程中均发挥了重要作用 (图 3b)^[32, 34]。小鼠 TCR $V_{\beta}8.2$ 结构域上 FR2 的残基 His47, CDR2 的残基 Tyr50、Ala52、Gly53、Ser54 和 Thr55, FR3 的残基 Glu56、Lys57、Tyr65、Lys66 和 Ala67, HV4 的 Pro70 和 Ser71, 都是与 SEB 相互作用的重要位点^[35]。

3.2 SEs-MHC II类分子相互作用位点分析

MHC II 类分子与不同的 SEs 分子结合时的位点不同, 但存在部分重叠^[36]。一些 SEs 结合 MHC II 类分子的 $\alpha 1$ 区域, 一些 SEs 结合 MHC II 类

分子的 $\beta 1$ 区域, 一些 SE 与 MHC II 类分子的 $\alpha 1$ 区域和 $\beta 1$ 区域同时结合。

SEA 既可与 MHC 的 α 或 β 同时结合, 但一个 SEA 分子不能与同一个 MHC II 类分子 α 、 β 同时结合, 可以与两个 MHC II 类分子的 α 或 β 同时结合^[28]。MHC II 类分子 β 链的 His81 对 SEA 的结合很重要^[37]。Hudson 等^[38] 发现了在与 MHC II 类分子的相互作用过程中, SEA 的两个作用位点。第一个高亲和力位点是由 Zn^{2+} 介导的 His187、His225、Asp227 三个关键氨基酸与 MHC II 类分子 β 链中的 His81 相互作用。第二个低亲和力位点的相互作用与 SEB 类似, 为 Phe47 与 MHC II 类分子 α 链相互作用。第一个高亲和力位点的相互作用可增强第二个低亲和力位点结合。这两个结合位点是 SEA 发挥最大活性所必须的, 两个位点的存在使得 SEA 能够跨越 APC 上的 MHC-II 分子, 增加超抗原活性^[39]。

SEB 与 MHC II 类分子 α 链相互作用^[28]。SEB 与 MHC II 类分子的结合面由 SEB 的两个保守结构组成, 包括由 β 桶状结构的 3 个 β 折叠股 1 (残基 Val33-Lys39)、2 (残基 Asp48-Ser52) 和 3 (残基 Asn63-Phe68) 衍生的极性结合袋和疏水性 β 转角。另外, 以亮氨酸残基为中心的疏水环在大多数 SEs 中是保守的 (SEA-Leu48, SEB-Leu45), 是与 MHC II 类分子相互作用的关键残基之一^[36, 40]。SEB 通过残基 Phe44 和 Leu45 结合 MHC II 类分子 $\alpha 1$ 区域的保守疏水结合袋^[41]。当突变了 SEB 分子中残基 Phe44 和 Leu45 时, SEB 与 MHC II 类分子的结合亲和力被破坏^[34]。SEB 的结合袋残基 Glu67、Tyr89 和 Tyr115, 结合 MHC II 类分子 α 亚基的 Lys39。

SEA、SEB 利用类似的蛋白质结合基序与 MHC II 类分子发生相互作用, 结合基序周围的结构对 MHC II 类分子与 SEs 的结合亲和力也至关重要^[42]。SEs 的极性结合袋与二硫键合环等保证了 SEs-MHC II 类分子复合物结合的稳定性与特异性。SEA 中有一个短二硫键合环, SEB 中有一个长的同源长环。SEB 长环中的残基 Tyr94 与 MHC II 类分子 α 亚基的 Leu60 和 Ala61 形成疏水相互作用, SEA 中的 Ala97 具有类似于 SEB 的 Tyr94 的作用。

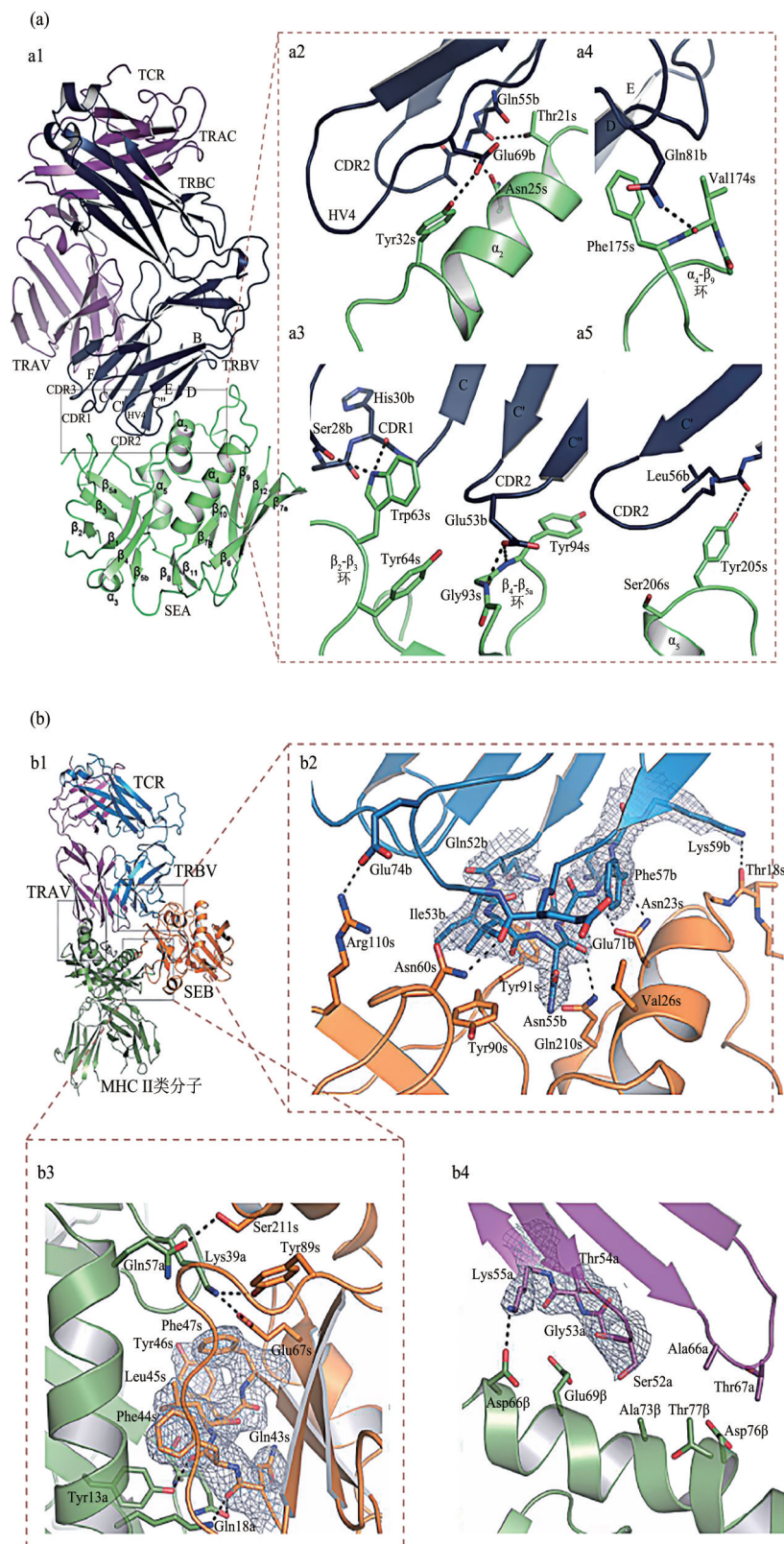


Fig. 3 The interaction of SEs with TCR and MHC class II molecules [31, 33]
图3 SEs与TCR、MHC II类分子相互作用 [31, 33]

(a) SEA^{F47A} (MHC II类分子结合位点被破坏)和TCR分子相互作用; a1: SEA^{F47A}-TCR复合物结构, 绿色为SEA, 浅紫色为TCR α链, 深紫色TCR β链; a2: SEA α₂螺旋与TCR残基相互作用; a3: SEA β₂-β₃环和β₄-β_{5a}环与TCR相互作用; a4: SEA α₄-β₆环与TCR相互作用; a5: SEA α₃螺旋的上部与TCR相互作用。(b) SEB与TCR、MHC II类分子相互作用; b1: TCR-SEB-MHC II类分子复合物, 橙色为SEB, 绿色为MHC II类分子, 紫色为TCR α链, 蓝色TCR β链; b2: SEB-TCR相互作用, 网格状区域为TCR β链残基52~59的电子密度; b3: SEB-MHC II类分子相互作用, 网格状区域为SEB分子残基43~47的电子密度; b4: TCR-MHC II类分子相互作用面, 网格状区域为TCR α链残基52~55的电子密度。

4 金黄色葡萄球菌肠毒素中毒的免疫治疗策略

目前尚没有针对SEs引起的致死性休克的有效疗法。免疫疗法是预防和治疗金黄色葡萄球菌相关疾病的一种非常有前景的治疗策略^[43]。针对SEs开展的治疗性研究也大多数是围绕抗体的主动免疫疗法和被动免疫疗法，主动诱导或被动给予机体针对SEs的中和性抗体（图4a, b）。免疫疗法产生的中和性抗体可以特异性地结合SEs，中和SEs的毒

性作用，减少促炎细胞因子的产生，从而产生保护作用。主动免疫疗法通常选择SEs发挥超抗原活性的某个表位，消除SEs的超抗原活性，用其制备疫苗，诱导机体产生保护作用的抗体（表1）。被动免疫疗法通常是给予机体中和性抗体，这些针对SEs的中和性抗体主要分为两类，一类是可识别MHC II类分子结合表位的抗体，一类是可识别TCR表位的抗体（表2）。这两类抗体都通过破坏TCR-SEs-MHC II类分子三元复合物的形成从而阻断SEs的超抗原作用以达到治疗目的。

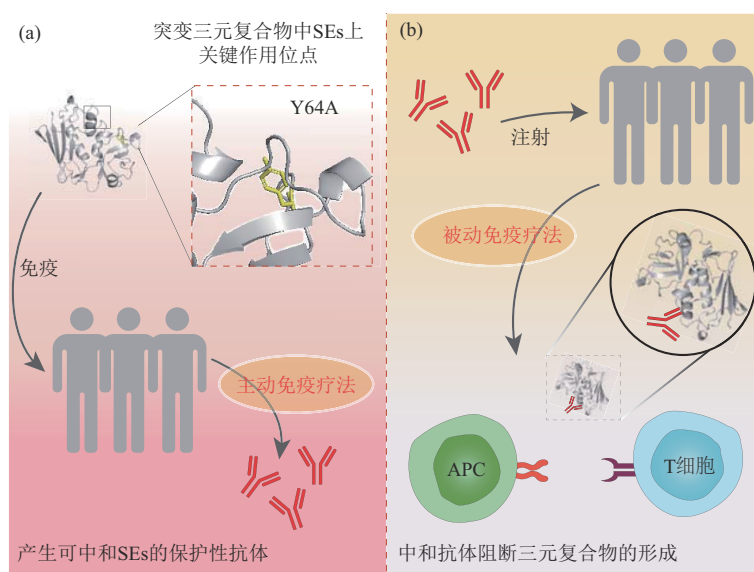


Fig. 4 Active and passive immunotherapy for SEs

图4 主动免疫疗法和被动免疫疗法治疗SEs

(a) 主动免疫疗法：通过突变SEs上的关键作用位点构建疫苗，免疫动物以产生中和抗体。(b) 被动免疫疗法：给予机体中和抗体以破坏三元复合物的形成。

4.1 主动免疫疗法在预防金黄色葡萄球菌肠毒素中毒中的应用

4.1.1 减毒疫苗

1996年，Bavari等^[44]通过定点突变分别将SEA上的64位和92位酪氨酸突变为丙氨酸（_{SEA}Y92A, _{SEA}Y64A），从而破坏TCR-SEA-MHC II类分子三元复合物的形成，将突变后的SEA作为疫苗免疫小鼠。_{SEA}Y92A降低了SEA与HLA (human leukocyte antigen)-DR1结合能力；_{SEA}Y64A降低了SEA与TCR的相互作用；体外实验表明，_{SEA}Y92A和_{SEA}Y64A不能诱导T细胞增殖。高

剂量_{SEA}Y92A或_{SEA}Y64A免疫的小鼠可完全抵抗WT SEA毒素攻击，所有接种疫苗的小鼠血清中均检测到较高水平的SEA抗体。1998年，该团队发现，通过单一定点突变SEB极性结合袋（Y89A、Y115A、E67Q）或疏水结合环（Q43P、F44P、L45R）上的关键氨基酸残基，构建的重组SEB可以破坏SEB与HLA-DR1的结合^[45]。这些突变体对T细胞无刺激性，不引起细胞因子生成，所有免疫小鼠均产生了持续时间较长的免疫应答。该疫苗在灵长类动物身上同样有很好的保护作用，接种重组SEB的小鼠可以承受WT SEB 10~30倍的LD₅₀攻

击, 接种重组 SEB 的非人灵长类动物恒河猴可以承受 30 倍的 LD_{50} 攻击。此外, 该疫苗具有一定的交叉保护作用, 可以引起较高水平的 SEC1 抗体产生, 以及一定程度的 SEA、TSST-1 抗体产生。随后, Boles 等^[46] 将 SEB 的 MHC II 类分子结合位点的 3 个氨基酸突变 ($_{\text{SEB}}\text{L45R/Y89A/Y94A}$), 制备了一种重组 SEB 减毒疫苗 STEBVax。该减毒疫苗在小鼠模型中产生了良好的保护作用。将该减毒疫苗免疫恒河猴后, 使用致死浓度的雾化 SEB 攻击恒河猴, 该减毒疫苗对恒河猴产生了剂量依赖性保护作用。目前, SEB 疫苗 STEBVax 已经完成了临床 I 期试验, 所有志愿者表现出良好的剂量耐受性^[47]。2017 年, Choi 等^[48] 基于以往研究基础和计算机模拟技术设计了 4 个重组 SEB 减毒疫苗: S2 ($_{\text{SEB}}\text{F44A/E67A}$)、S9 ($_{\text{SEB}}\text{N23A/Y90A}$)、S19 ($_{\text{SEB}}\text{N23A/Y90A/R110A/F177A}$) 和 S26 ($_{\text{SEB}}\text{F44A/E67A/Y90A/R110A/F177A}$)。除 S2 外, 其他 3 个重组 SEB 减毒疫苗均不表现 T 细胞刺激活性。S9 和 S19 在小鼠模型中具有 100% 的保护作用, 而 S26 仅产生 20% 的保护作用。其原因可能是 S26 的氨基酸取代改变了减毒疫苗发挥诱导中和抗体产生的原始结构, 影响免疫效果。

4.1.2 亚单位疫苗

2002 年, LeClaire 等^[49] 制备了 SEB 前 99 个氨基酸残基的重组 SEB 氨基端片段 (1~99) 和羧基端 (66~243) 氨基酸残基片段。将这两个蛋白质片段免疫小鼠后发现, 两个重组片段具有很高的免疫原性, 但产生的抗体没有中和作用, 无法保护小鼠免受 SEB 的致死性攻击, 说明 SEB 重组片段不是设计有效疫苗的理想选择。2012 年, Shylaja 等^[50] 构建了一个包含 SEB 的融合蛋白 (SEB-TSST-1), 该融合蛋白可诱导机体产生针对 SEB 的抗体。但该研究并未进一步探究该融合蛋白的疫苗保护作用。随后, Reddy 等^[51] 评估了一个包含 $_{\text{SEA}}\text{56~177}$ 的融合蛋白 (SEA-TSST-1) 在小鼠中的保护作用。将该融合蛋白免疫小鼠后 15 d 或 120 d 给予小鼠 4 倍 LD_{100} 的毒素, 小鼠存活率分别为 80% 和 50%, 空白对照存活率为 0%。可见该疫苗不仅可以诱导机体产生针对 SEA 的中和抗体, 还可以使机体产生针对 SEA 的免疫记忆。Kota 等^[52] 在 Shylaja 等和 Reddy 等的研究基础上, 设计了一个包含 SEA、SEB 和 α 溶血素的嵌合蛋白 r-HAB, 该融合蛋白可以在小鼠体内诱导强抗体反应, 在致死剂量的毒素攻击下对小鼠提供了 83%

的保护作用。用抗 r-HAB 抗体被动给予机体, 在致死剂量毒素攻击下可以对小鼠提供大约 50% 的保护率。这些疫苗设计均保留了 SEs 发挥毒性作用的作用位点, 在使用的过程中存在一定的生物安全隐患。Venkatasubramaniam 等^[53] 设计了一种由 TSST-1、SEB 和 SEA 突变体构建的毒素融合蛋白——TBA₂₂₅。首先改造 SEA、SEB 和 TSST-1 的 MHC II 类分子结合面, 分别产生 3 个突变毒素分子: $_{\text{SEA}}\text{L48R/D70R/Y92A}$ 、 $_{\text{SEB}}\text{L45R/Y89A/Y94A}$ 和 $_{\text{TSST-1}}\text{L30R/D27A/I46A}$ 。此前有报道, SEA 高亲和力 MHC 结合位点 H225 的突变可降低毒素激活 T 细胞的能力^[38]。因此将 H225A 作为额外的安全突变引入到 SEA 三重突变体中, 产生了 $_{\text{SEA}}\text{L48R/D70R/Y92A/H225A}$ 。SEA 突变体编码基因与 SEB、TSST-1 突变体编码基因融合构建了 TBA₂₂₅。该疫苗在小鼠体内可同时产生针对 SEA、SEB 和 TSST-1 的中和抗体。在致死性毒素联合 LPS 攻击实验中, TBA₂₂₅ 免疫对 SEB 和 TSST-1 的保护率为 100%, 对 SEA 的保护率为 90%。利用 TBA₂₂₅ 制备的兔多抗对 TSST-1、SEA、SEB、SEC-1、SEH、SEK、SEE、SED 都具有一定的中和作用。此外, TBA₂₂₅ 诱导的抗体可中和包括 USA300 在内的多个临床相关金黄色葡萄球菌培养上清液对人类外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的毒性作用。

B 细胞表位疫苗不包含毒素蛋白完整结构, 生物安全性高, 且易于生产。在 Boles 等^[46] 的研究基础上, Zhao 等^[54] 利用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 又进一步确定了 6 个可用于制备 B 细胞表位疫苗的免疫优势线性表位: $_{\text{SEB}}\text{31~48}$ 、 $_{\text{SEB}}\text{97~114}$ 、 $_{\text{SEB}}\text{133~150}$ 、 $_{\text{SEB}}\text{193~210}$ 、 $_{\text{SEB}}\text{205~222}$ 和 $_{\text{SEB}}\text{247~261}$ 。将 6 个线性表位分别偶联偶联钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 后免疫小鼠, 均在小鼠体内诱导出 SEB 特异性抗体, 并可对抗甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染产生部分保护作用, 其中 $_{\text{SEB}}\text{193-210-KLH}$ 联合弗氏佐剂与其他表位/佐剂组合相比表现出最好的保护作用 (70%)。6 个线性表位串联融合蛋白免疫后的小鼠在 MRSA 攻击后, 表现出比 STEBVax^[46] (85% 或 90%) 更好的保护效果 (90% 或 100%)。

4.1.3 其他疫苗

SEB 主要通过黏膜进入宿主, 因此与传统接种途径疫苗相比, 黏膜接种疫苗以及黏膜抗体 IgA 在

SEs中毒的免疫治疗中十分重要。Inskip等^[55]在Boles等^[46]的研究基础上,将STEBVax疫苗口服给予仔猪模型后,仔猪血清IgG和粪便IgA均可识别SEB。这一现象表明黏膜疫苗不仅能诱导机体黏膜免疫,还能诱导外周IgG产生。随后,Xiong等^[56]以枯草芽孢杆菌为载体,构建了表达STEBVax的疫苗。与空白对照相比,口服表达STEBVax的枯草芽孢杆菌孢子的小鼠粪便中出现SEB特异性IgA,血清中出现SEB特异性IgG1和IgG2a。与空白对照相比,口服接种该疫苗的小鼠模型存活率提高33.3%。

溶解微针(microneedles, MNs)是微米级结构体,其针头搭载的靶标分子及构成针头的全部成分均由对人体无害的生物分解性物质组成,通过完全溶解在使用部位内的方式将靶标分子输送到体内任何部位。皮肤中存在大量可用于抗原提呈的朗格汉斯细胞和组织树突细胞,因此Liu等^[57]评估了负载有STEBvax,由硫酸软骨素和海藻糖构成的MNs免疫效果。该疫苗不仅延长了体内抗原保留时间,还诱导出高水平的SEB特异性抗体反应,在致死剂量SEB攻击时可以提供80%的保护率。这一方法为SEs的疫苗制备提供了新的研究思路。

Table 1 Research on active therapy for SEs

表1 主动疗法治疗SEs的研究

靶标	年份	改造位点	改造位点作用面	免疫剂量 ($\mu\text{g}/\text{只}$)	保护率
SEA ^[44]	1996	SEA ^{Y92A}	SEA-MHC II类分子	2	对小鼠保护率20%
				10	对小鼠保护率100%
		SEA ^{Y64A}	SEA-TCR	2	对小鼠保护率60%
				10	对小鼠保护率100%
SEB ^[45]	1998	SEB ^{Y89A} 、SEB ^{Y115A} 、SEB ^{E67Q}	SEB-MHC II类分子	10	对小鼠保护率100%
		SEB ^{Q43P} 、SEB ^{F44P} 、SEB ^{L45R}		20	对恒河猴有保护率100%
SEB ^[46]	2003	SEB ^{L45R/Y89A/Y94A}	SEB-MHC II类分子	5	对恒河猴保护率62.5%
				20	对恒河猴保护率100%
SEB ^[48]	2017	SEB ^{F44A/E67A} 、	SEB-MHC II类分子	10~20	/
		SEB ^{N23A/Y90A} 、	SEA-TCR		对小鼠保护率100%
		SEB ^{N23A/Y90A/R110A/F177A}	SEA-TCR		对小鼠保护率100%
		SEB ^{F44A/E67A/Y90A/R110A/F177A}	SEB-MHC II类分子		对小鼠保护率20%
SEB ^[49]	2002	SEB ^{1~99}	/	10	对小鼠保护率0%
		SEB ^{66~243}	/	10	对小鼠保护率0%
SEB、TSST-1 ^[50]	2012	/	/	50	/
SEA、TSST-1 ^[51]	2015	SEA ^{56~177}	/	50	对小鼠保护率80%
		TSST-1 ^{38~163}			
SEA、SEB、 α 溶血素 ^[52]	2021	SEA ^{80~202}	/	50	对小鼠保护率83%
		SEB ^{28~249}			
SEA、SEB、TSST-1 ^[53]	2019	SEA ^{L48R/D70R/Y92A}	SEA-MHC II类分子	20	对小鼠保护率90%
		SEB ^{L45R/Y89A/Y94A}	SEB-MHC II类分子		对小鼠保护率100%
		TSST-1 ^{L30R/D27A/146A}	TSST-1-MHC II类分子		对小鼠保护率100%
SEB ^[54]	2015	SEB ^{31~48} 、SEB ^{97~114} 、SEB ^{133~150} 、	/	100	对小鼠保护率90%或100%
		SEB ^{193~210} 、SEB ^{205~222} 、SEB ^{247~261}			
SEB ^[55]	2010	/	/	1 000	/
SEB ^[56]	2020	/	/	10 ⁹ 孢子	对小鼠保护率33.3%
SEB ^[57]	2019	/	/	26	对小鼠保护率80%

4.2 被动免疫疗法在治疗金黄色葡萄球菌肠毒素中毒中的应用

4.2.1 单克隆抗体

近些年来一直有针对SEs中和抗体的研究报道。2010年, Tilahun等^[58]制备了一对识别不同表位的鼠源SEB中和抗体63.1.1和82M.1.2, 其与SEA、TSST-1无交叉反应, 这对抗体以协同作用抑制SEB诱导的T细胞增殖。2014年, Xia等^[18]制备了亚纳摩尔亲和力的抗SEB鼠源中和抗体3E2, 3E2具有阻断SEB和MHC II类分子相互作用的功能, 且3E2与SEA、SEC没有交叉反应。突变分析表明, SEB上的残基Y46和K71是3E2产生中和作用的关键结合残基, 其中Y46是3E2区分SEB和SEA所必需的。Drozdowski等^[59]利用电融合方法制备出分泌高亲和力SEB MAbs的人源杂交瘤细胞, 产生的HuMAb-154可以抑制SEB诱导的人原代淋巴细胞促炎细胞因子INF- γ 和INF- α 的分泌。预防给予抗体HuMAb-154的小鼠可以抵抗高达100 μ g的SEB攻击, 在SEB攻击后给予该抗体同样也可以提高动物的存活率。

与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA)菌株M11118相比, MRSA菌株SEB编码基因第703位点都发现一个额外的碱基, 从而导致235、236和238位的3个氨基酸发生变化(Y235T、N236T和Q238K), 影响中和性抗体结合^[60]。Varshney等^[60]将来源于MSSA的全长SEB免疫BALB/c小鼠, 获得4株特异性单克隆抗体(MAbs)——20B1、14G8、4C7和6D3。这4株MAbs不与SEB羧基端缺失11个氨基酸的SEB结合, 表明SEB羧基端存在介导SEB与这4株MAb特异性结合的B细胞表位。其中, 20B1、14G8和6D3与SEB有纳摩尔的结合亲和力, 可以抑制SEB诱导T细胞增殖以及人源T细胞体外分泌IL-2和IFN- γ 。在BALB/c小鼠和HLA-DR3小鼠模型(缺失小鼠内源性MHC II类分子, 表达HLA-DR3分子以及人源CD4分子)中研究MAb对SEB诱导的致死性休克(SEB-induced lethal shock, SEBILS)的保护作用, 发现高剂量MAb 20B1对两种小鼠模型的SEBILS均有高保护率, MAb 14G8对BALB/c小鼠无保护作用, MAb 6D3对BALB/c小鼠仅有部分保护作用, 高剂量MAb 14G8和MAb 6D3对HLA-DR3小鼠无保护作用。而同时给予一种保护性 and 一种非保护性MAb (20B1+14G8或20B1+6D3)或同时给予两种非保

护性MAb (14G8+6D3)对HLA-DR3小鼠也有保护作用。该团队利用核磁共振和结晶学来研究SEB和MAb 20B1、14G8、6D3之间的相互作用, 以确定MAb增强保护效力的机制^[61]。结果表明, MAb 20B1和TCR竞争性结合SEB, 20B1与SEB的结合亲和力是TCR与SEB结合亲和力的1 000倍, 因此阻断了TCR-SEB-MHC II类分子三元复合物的形成。MAb 14G8和6D3与SEB的结合表位距离TCR和MHC II类分子表位较远, 因此保护作用低。高剂量的MAb 20B1还可保护MRSA来源的SEB中毒。在MRSA感染的脓毒血症模型中, 预先使用MAb 20B1静脉注射小鼠, MAb 20B1可与感染组织中的SEB结合, 降低促炎细胞因子水平、淋巴细胞增殖和中性粒细胞募集, 同时降低皮肤浅层和深层组织中的细菌负荷, 提高动物存活率^[62]。

4.2.2 基因工程抗体

Tilahun团队^[58]将鼠MAb的轻链可变区(light chain variable region, VL)和重链可变区(heavy chain variable region, VH)的编码基因分别移植到编码人Ig κ 和IgG1恒定区的基因上, 制备出可适用于人类的人-鼠嵌合抗体Ch 63和Ch 82 M。在人PBMC或HLA-DR3小鼠脾细胞中进行测试发现, 人鼠嵌合抗体Ch 63和Ch 82 M以协同作用中和SEB。人鼠嵌合抗体Ch 63和Ch 82 M可以减弱由产SEB的金黄色葡萄球菌引起的全身炎症反应, 在金黄色葡萄球菌肺炎模型中可显著提高小鼠存活率^[63]。人鼠嵌合抗体Ch 82 M与具有免疫调节活性作用的洛伐他汀联用时, 对小鼠致死性TSS也产生协同保护作用^[64]。洛伐他汀或人鼠嵌合抗体Ch 82 M单独作用于HLA-DR3小鼠时, 对致死性TSS起到了部分保护作用(分别为50%、66%), 而洛伐他汀与Ch 82 M联用时, 保护率为100%。临床安全性他汀药物和低免疫原性嵌合抗体的联合使用为人体SEs中毒治疗提供新思路。

Varshney等^[65]将MAb 20B1的轻重链CDR区分别嫁接到人源胚系骨架IGKV1-39和IGHV3-7, 制备了两个人源化SEB抗体Hu-1.6/1.1和Hu-1.4/1.1。这两个人源化抗体对SEBILS的治疗水平与MAb 20B1相当, 经Hu-1.4/1.1或Hu-1.6/1.1处理后的小鼠存活率为80%, 而未处理的小鼠存活率为10%。用小鼠金黄色葡萄球菌败血症模型进一步探讨Hu-1.6/1.1和Hu-1.4/1.1的保护作用, 发现与MAb 20B1以及万古霉素相比, Hu-1.6/1.1可显著提高产

SEB MRSA 菌株引起的致命脓毒症小鼠存活率。Hu-1.6/1.1 治疗组小鼠的存活率为 90%，而同型对照单抗治疗的小鼠存活率为 10%，万古霉素治疗的小鼠存活率为 40%。此外，Hu-1.6/1.1 与万古霉素联合治疗进一步提高了动物存活率并改变了细胞因子反应，Hu-1.6/1.1 或万古霉素单独治疗小鼠的存活率为 40%，Hu-1.6/1.1 和万古霉素联用治疗小鼠的存活率为 90%，这种联合疗效的提高从 IFN- γ 、IL-10 等细胞因子水平上也得到了体现。在深部组织感染模型中，Hu-1.4/1.1 与 SEB 结合后可降低促炎细胞因子水平，缓解组织脓肿。

噬菌体展示技术是筛选 SEs 中和抗体的重要手段。2010 年，Larkin 等^[66] 利用噬菌体展示技术，制备出针对 STEBVax 的人源抗原结合片段 (antigen-binding fragment, Fab) 以及其全长 IgG，这些人源 MAb 可高亲和力、特异性地中和毒素，保护小鼠免受 SEBILS。当效力较弱的 Fab 转化为全长 IgG 时，效价可以得到明显提高。Larkin 等^[66] 认为可能是 Fc 区域在抗体中和作用中发挥了较大作用。但 MacIntyre 等^[67] 将 Fc 区域进行突变后证明，SEB 的中和不需要 Fc 受体结合发挥中和作用。全长 IgG 中 Fc 的存在可能通过增加 Fab 的构象稳定性，进而提高抗体效价。2012 年，Karauzum 等^[68] 利用基于噬菌体展示技术筛选出一组高亲和力的 SEB 人源 Fab。将 Fab 转化为全长的 IgG-GC121 与 SEB 有高结合亲和力，与 SEA、SEC-1 和 SED 也存在交叉反应。IgG-GC121 可以抑制 SEB 诱导的人 PBMC IFN- γ 的分泌。预防性使用 IgG-GC121 抗体 1 h 可以保护 SEB 对小鼠的致死性攻击。研究发现，IgG-GC121 不与 STEBVax 结合，可推测该抗体通过阻碍 SEB 与 MHC II 类分子结合抑制 SEB 毒性作用。随后，该团队利用同一个噬菌体文库筛选出另一类具有不同结合表位的 SEB 人源中和抗体 GC132，可以阻断 SEB 与 TCR 的结合^[69]。该抗体与 SEB 具有皮纳摩尔结合亲和力，体外毒素中和效果与 IgG-GC121 相当，在 TSS 模型中可以保护小鼠免受致死攻击。对 GC132 轻链和重链 CDR 区采用基于鸟枪同源扫描技术的基因工程抗体亲和力成熟研究，筛选出的 GC132a 在以 INF- γ 释放量为 SEB 毒性的衡量试验中，表现出优于亲本抗体 250 倍的效价。鉴于抗体 GC121 和 GC132a 分别识别 SEB 的 MHC II 类分子结合和 TCR 结合区，为了探

究这两个抗体是否存在协同效应，该团队将单链抗体 GC132a 融合在 IgG-GC121 Fc 端，构建的双特异性抗体 bsAb-121/132a 也展现了优于亲本的毒素中和效果，但不能与 IgG-GC132a 相媲美。该研究中的双特异性抗体建立是一种简单且可有效提高治疗效果的策略，对于不同抗体之间连接方式的优化可能会产生更好的治疗策略。2021 年，Hu 等^[70] 在人噬菌体抗体库中筛选出 3 个抗 SEB 人源抗体，LXY8、LXY9 和 LXY10，其中 LXY8 可有效抑制 PBMC 活化和细胞因子释放。在体内小鼠模型中，LXY8 剂量依赖性地提高了 BALB/c 小鼠的存活率。进一步研究发现，LXY8 与 TCR 竞争性结合 SEB，其中_{SEB}176~179 是 LXY8 结合地关键氨基酸位点。

此外，还有一些抗体筛选方法制备得到的 SEs 抗体也具有良好的中和性能。2014 年，Sully 等^[71] 将 SEB 的人-鼠嵌合抗体 19F1 转化到根瘤农杆菌中，制备出具有良好中和能力的植物来源 MAb c19F1。Verreault 等^[72] 研究了具有不同结合表位的 IgG-GC121 和 c19F1 在恒河猴气溶胶 SEB 中毒模型中的作用。所有实验组动物均存活，而对照组动物在暴露 30~48 h 后死亡。2020 年，Liu 等^[73] 利用流式筛选出一株人源 SEB 抗体 M0313，该抗体可以有效抑制 SEB 诱导的小鼠淋巴细胞和人 PBMC 细胞因子 IL-2、IL-6、INF- γ 和 TNF- α 的释放，并且在金黄色葡萄球菌引起的小鼠败血症模型中产生了较好的保护作用。在致死剂量 MRSA252 攻击前 24 h 或攻击后 1 h 给予小鼠抗体 M0313，可使小鼠分别获得 100% 或 50% 的保护率（空白对照死亡率为 20%）。注射抗体 M0313 的小鼠中有 77.8% 在 JN064（一株表达 SEA、SEC、SED、SEE 的金黄色葡萄球菌）诱导的败血症中存活，33.3% 在 JN028（一株表达 SEB 的金黄色葡萄球菌）诱导的败血症中存活（空白对照死亡率均为 10%）。其中，_{SEB}85~102 是 M0313 发挥关键作用的免疫优势表位。为了解决抗体治疗过程中使用量大的问题，Kroetsch 等^[74] 在 Xia 等^[18] 研究基础上，利用酵母展示技术以及合理设计和定向进化 MAb 3E2，筛选制备出 pH 依赖性抗体 L2、L6 和 L6.R。这些抗体在中性条件下与 SEB 结合亲和力高，在酸性条件下与 SEB 结合亲和力低，与亲本抗体 3E2 相比，显著降低了 SEB 的循环半衰期。

Table 2 Research on passive therapy for SEs
表2 被动疗法治疗SEs的研究

靶标	年份	抗体类型	作用机制
SEA ^[75]	1986	鼠源MAb B ₂ I	中和SEA
SEB ^[58]	2010	鼠源MAb 63.1.1、82M.1.2	中和SEB
SEB ^[18]	2014	鼠源MAb 3E2	阻断SEB-MHC II类分子相互作用
SEB ^[59]	2010	人源MAb HuMAb-154	/
SEB ^[60]	2011	鼠源MAb 20B1	阻断SEB-TCR相互作用
SEB ^[58]	2010	人-鼠嵌合抗体Ch 63、Ch 82M	中和SEB
SEB ^[65]	2014	人源化抗体Hu-1.6/1.1、Hu-1.4/1.1	阻断SEB-TCR相互作用
SEB ^[66]	2010	人源MAb	阻断SEB-TCR相互作用
SEB ^[68]	2012	人源MAb GC121	阻断SEB-MHC II类分子相互作用
SEB ^[69]	2019	人源MAb GC132a	阻断SEB-TCR相互作用
SEB ^[70]	2021	人源MAb LXY8	阻断SEB-TCR相互作用
SEB ^[71]	2014	人鼠嵌合抗体MAb c19F1	/
SEB ^[73]	2020	人源MAb M0313	可能阻断SEB与TCR、MHC II类分子相互作用
SEB ^[74]	2019	鼠源MAb L2、L6和L6.R	阻断SEB-MHC II类分子相互作用

5 挑战与展望

SEs 毒性作用主要包括超抗原活性和胃肠道活性，其中超抗原活性引起的细胞因子紊乱最终导致 TSS，胃肠道活性的致病机制目前尚无定论^[29]。TCR-SEs-MHC II 类分子三元复合物是 SEs 发挥超抗原活性的必需结构，因此目前针对 SEs 中毒的免疫治疗性研究大多围绕该三元复合物的形成和破坏。研究表明，主动免疫疗法所使用的疫苗可刺激机体免疫系统对可能的中毒产生较强的抵抗反应；被动免疫疗法所使用的抗体特异性强、体内稳定性高，可快速中和体内已有的毒素蛋白。这些研究表明，免疫治疗策略在 SEs 中毒临床治疗中可发挥巨大潜力。然而尽管早在 20 世纪 80 年代就已经有 SEs 中毒的免疫治疗策略，但是迄今为止仍然没有相关疫苗和抗体获得审批。由 Chen 等^[47] 研发的 SEB 疫苗 STEBVax 是唯一进入临床试验阶段的 SEs 候选疫苗，于 2015 年完成临床 I 期试验。目前尚无 SEs 中和抗体进入临床试验阶段。

限制免疫治疗策略发展的因素有以下几点。

a. 在主动免疫疗法中，疫苗主要包括传统的灭活疫苗、减毒活疫苗疫苗，以及基因工程亚单位疫苗、重组载体疫苗、核酸疫苗、合成肽疫苗等新型疫苗。已报道的 SEs 疫苗主要是围绕制备超抗原活性缺失、但仍保留关键作用位点免疫原性的减毒疫苗和基因工程亚单位疫苗。这些疫苗在动物体内都能

诱导中和抗体产生，但同时也能诱导非中和抗体产生。疫苗研究过程中发现，经过免疫的机体再次遇到抗原时，非中和抗体与中和抗体和抗原的竞争性结合可能削弱疫苗的保护作用^[76]。此外，一种成功的疫苗从研究阶段到临床应用阶段面临大量的挑战，包括抗原和佐剂对于人体的安全性威胁，疫苗设计和生产过程中的高成本需求，疫苗生产、运输、储存过程中的稳定性要求等^[77]。

b. 在被动免疫疗法中，尽管 SEs 发挥毒性作用的位点已基本清晰，但高效精准制备针对这些位点的特异性中和抗体仍然十分困难。目前 SEs 中和抗体的制备技术主要包括传统的杂交瘤技术和噬菌体展示技术。杂交瘤技术融合、筛选效率低，且获得的鼠源 MAbs 在人体内易被免疫系统识别并清除，因而制备的 MAb 需要额外复杂的人源化改造^[78]。噬菌体展示技术中的原核表达经常造成抗体蛋白难以正确折叠且轻重链随机配对，筛选到的抗体通常亲和力不高，往往还需体外进化^[79]。此外，已报道的 SEs 中和抗体均是通过盲筛制备，难以得到针对毒素关键毒性作用位点的高亲和力中和抗体。

针对上述制约因素，可从以下 3 个方面寻找突破。

a. 合成肽疫苗是将抗原中已知的或经预测得到的表位氨基酸序列，通过化学合成技术制备的疫苗，其安全性高、制备方式简单^[80]。利用已报道的 TCR-SEs-MHC II 类分子三元复合物晶体结构或计算机表位预测技术筛选三元复合物相互作用时发挥关键作用的 SEs 表位氨基酸序列，有望构建仅诱

导中和抗体产生的SEs合成肽疫苗。SEs的关键毒性作用位点表位氨基酸合成肽在被动免疫疗法抗体制备过程中也可用于筛选特异性SEs中和抗体。

b. 单B细胞抗体制备技术保留了重链和轻链可变区的天然配对, 不仅充分保留B细胞多样性, 且具有效率高、时间短的特点, 有望筛选出全新的鼠源或人源SEs中和抗体^[79]。c. 传统抗体是异源四聚体, 稳定性和异源性高。纳米抗体是在骆驼科及鲨鱼科动物血清中大量存在的一种天然轻链缺失的抗体, 其免疫原性低、人源化简单、稳定性高、亲和力高且可识别隐藏抗原表位, 在毒素中和过程中有很大的潜在应用价值^[81]。

SEB作为一种恐怖战剂通常为气雾状, 被人体吸入后造成多器官损伤, 严重者可导致休克或死亡^[25-26], 因此口鼻接种疫苗以及黏膜抗体IgA在SEs中毒的免疫治疗中十分重要。然而目前为止关于黏膜免疫接种途径SEs疫苗及IgA类中和抗体研究较少, 预防及治疗呼吸道感染SEs的效果有限。SEs的黏膜免疫研究在消除公共卫生安全威胁上有很大的前景。

参 考 文 献

- [1] Lina G, Bohach G A, Nair S P, *et al.* Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J Infect Dis, 2004, **189**(12): 2334-2336
- [2] Kong C, Neoh H M, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. Toxins, 2016, **8**(3): 72
- [3] Bohach G A. Staphylococcal enterotoxins B and C. Prep Biochem Biotech, 1997, **27**(2-3): 79-110
- [4] Garcia C, Briggs C, Zhang L, *et al.* Molecular characterization of the putative T-cell receptor cavity of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. Immunology, 1998, **94**(2): 160-166
- [5] Sundstrom M, Hallen D, Svensson A, *et al.* The co-crystal structure of staphylococcal enterotoxin type A with Zn²⁺ at 2.7 angstrom resolution-implications for major histocompatibility complex class II binding. J Biol Chem, 1996, **271**(50): 32212-32216
- [6] Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol, 2000, **61**(1): 1-10
- [7] Bergdoll M S, Surgalla M J, Dack G M. Staphylococcal enterotoxin-identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. J Immunol, 1959, **83**(3): 334-338
- [8] Ono H K, Sato'o Y, Narita K, *et al.* Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin. Appl Environ Microb, 2015, **81**(20): 7034-7040
- [9] Thomas D, Chou S, Dauwalder O, *et al.* Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem Immunol Allergy, 2007, **93**: 24-41
- [10] Wilson G J, Seo K S, Cartwright R A, *et al.* A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathog, 2011, **7**(10): e1002271
- [11] Varshney A K, Mediavilla J R, Robiou N, *et al.* Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York. Appl Environ Microb, 2009, **75**(21): 6839-6849
- [12] Swaminathan S, Furey W, Pletcher J, *et al.* Crystal-structure of staphylococcal enterotoxin-B, a superantigen. Nature, 1992, **359**(6398): 801-806
- [13] Swaminathan S, Furey W, Pletcher J, *et al.* Residues defining V_β specificity in staphylococcal enterotoxins. Nat Struct Biol, 1995, **2**(8): 680-686
- [14] Schad E M, Zaitseva I, Zaitsev V N, *et al.* Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. EMBO J, 1995, **14**(14): 3292-3301
- [15] Papageorgiou A C, Tranter H S, Acharya K R. Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 angstrom resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors. J Mol Biol, 1998, **277**(1): 61-79
- [16] Spaulding A R, Salgado-Pabon W, Kohler P L, *et al.* Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin Microbiol Rev, 2013, **26**(3): 422-447
- [17] Papageorgiou A C, Baker M D, McLeod J D, *et al.* Identification of a secondary zinc-binding site in staphylococcal enterotoxin C2-implications for superantigen recognition. J Biol Chem, 2004, **279**(2): 1297-1303
- [18] Xia T, Liang S Y, Wang H J, *et al.* Structural basis for the neutralization and specificity of staphylococcal enterotoxin B against its MHC Class II binding site. MAbs, 2014, **6**(1): 119-129
- [19] Germain R N, Margulies D H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. Annu Rev Immunol, 1993, **11**: 403-450
- [20] Jorgensen J L, Reay P A, Ehrich E W, *et al.* Molecular-components of T-cell recognition. Annu Rev Immunol, 1992, **10**: 835-873
- [21] Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, *et al.* Superantigens interact with MHC class-II molecules outside of the antigen groove. Cell, 1990, **62**(6): 1115-1121
- [22] Thomas D, Dauwalder O, Brun V, *et al.* *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. Infect Immun, 2009, **77**(5): 2043-2050
- [23] Herman A, Kappler J W, Marrack P, *et al.* Superantigens-mechanism of T-cell stimulation and role in immune-responses. Annu Rev Immunol, 1991, **9**: 745-772
- [24] Llewelyn M, Cohen J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. Lancet Infect Dis, 2002, **2**(3): 156-162
- [25] Mattix M E, Hunt R E, Wilhelmsen C L, *et al.* Aerosolized

- staphylococcal-enterotoxin B-induced pulmonary-lesions in rhesus-monkeys (macaca-mulatta). *Toxicol Pathol*, 1995, **23**(3): 262-268
- [26] Khan A S, Levitt A M, Sage M J, *et al.* Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC strategic planning workgroup. *MMWR CDC Surveill Summ*, 2000, **49**(RR-4): 1-14
- [27] Murray R J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *Intern Med J*, 2005, **35**: S106-S119
- [28] Jardetzky T S, Brown J H, Gorga J C, *et al.* 3-dimensional structure of a human class-II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, 1994, **368**(6473): 711-718
- [29] Barrera C A, Pinchuk I V, Saada J I, *et al.* Class II MHC-expressing myofibroblasts play a role in the immunopathogenesis associated with staphylococcal enterotoxins. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1029**(1): 313-318
- [30] Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2003, **2**(1): 63-76
- [31] Rodstrom K E J, Elbing K, Lindkvist-Petersson K. Structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin B in complex with TCR and peptide-MHC demonstrates absence of TCR-peptide contacts. *J Immunol*, 2014, **193**(4): 1998-2004
- [32] Saline M, Rodstrom K E J, Fischer G, *et al.* The structure of superantigen complexed with TCR and MHC reveals novel insights into superantigenic T cell activation. *Nat Commun*, 2010, **1**: 119
- [33] Rodstrom K E J, Regenthal P, Bahl C, *et al.* Two common structural motifs for TCR recognition by staphylococcal enterotoxins. *Sci Rep*, 2016, **6**: 25796
- [34] Kappler J W, Herman A, Clements J, *et al.* Mutations defining functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med*, 1992, **175**(2): 387-396
- [35] Li H M, Llera A, Tsuchiya D, *et al.* Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor beta chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Immunity*, 1998, **9**(6): 807-816
- [36] Chintagumpala M M, Mollick J A, Rich R R. Staphylococcal toxins bind to different sites on HLA-DR. *J Immunol*, 1991, **147**(11): 3876-3881
- [37] Herman A, Labrecque N, Thibodeau J, *et al.* Identification of the staphylococcal enterotoxin A superantigen binding site in the beta 1 domain of the human histocompatibility antigen HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(22): 9954-9958
- [38] Hudson K R, Tiedemann R E, Urban R G, *et al.* Staphylococcal enterotoxin A has 2 cooperative binding sites on major histocompatibility complex class-II. *J Exp Med*, 1995, **182**(3): 711-720
- [39] Kozono H, Parker D, White J, *et al.* Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II MHC molecules. *Immunity*, 1995, **3**(2): 187-196
- [40] Leder L, Llera A, Lavoie P M, *et al.* A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor beta chain and major histocompatibility complex class II. *J Exp Med*, 1998, **187**(6): 823-833
- [41] Hudson K R, Robinson H, Fraser J D. Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxin-A and enterotoxin-E determine T-cell receptor V-beta-specificity. *J Exp Med*, 1993, **177**(1): 175-184
- [42] Ulrich R G, Bavari S, Olson M A. Staphylococcal enterotoxin-A and enterotoxin-B share a common structural motif for binding class-II major histocompatibility complex-molecules. *Nat Struct Biol*, 1995, **2**(7): 554-560
- [43] Shinefield H R, Black S. Prospects for active and passive immunization against *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, **25**(2): 167-168
- [44] Bavari S, Dyas B, Ulrich R G. Superantigen vaccines: a comparative study of genetically attenuated receptor-binding mutants of staphylococcal enterotoxin A. *J Infect Dis*, 1996, **174**(2): 338-345
- [45] Ulrich R G, Olson M A, Bavari S. Development of engineered vaccines effective against structurally related bacterial superantigens. *Vaccine*, 1998, **16**(19): 1857-1864
- [46] Boles J W, Pitt M L M, LeClaire R D, *et al.* Generation of protective immunity by inactivated recombinant staphylococcal enterotoxin B vaccine in nonhuman primates and identification of correlates of immunity. *Clin Immunol*, 2003, **108**(1): 51-59
- [47] Chen W H, Pasetti M F, Adhikari R P, *et al.* Safety and immunogenicity of a parenterally administered, structure-based rationally modified recombinant staphylococcal enterotoxin B protein vaccine, STEBVax. *Clin Vaccine Immunol*, 2016, **23**(12): 918-925
- [48] Choi J Y, Shin S, Kim N Y, *et al.* A novel staphylococcal enterotoxin B subunit vaccine candidate elicits protective immune response in a mouse model. *Toxicon*, 2017, **131**: 68-77
- [49] LeClaire R D, Hunt R E, Bavari S. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infect Immun*, 2002, **70**(5): 2278-2281
- [50] Shylaja R, Thakasi D K K, Murali H S, *et al.* Application of a chimeric protein construct having enterotoxin B and toxic shock syndrome toxin domains of *S. aureus* in immunodiagnostics. *Indian J Microbiol*, 2012, **52**(3): 449-455
- [51] Reddy P N, Paul S, Sripathy M H, *et al.* Evaluation of recombinant SEA-TSST fusion toxoid for protection against superantigen induced toxicity in mouse model. *Toxicon*, 2015, **103**: 106-113
- [52] Kota R K, Kolla H B, Reddy P N, *et al.* Immunoinformatics analysis and evaluation of recombinant chimeric triple antigen toxoid (r-HAB) against *Staphylococcus aureus* toxemia in mouse model. *Appl Microbiol Biot*, 2021, **105**(21-22): 8297-8311
- [53] Venkatasubramanian A, Adhikari R P, Kort T, *et al.* TBA(225), a fusion toxoid vaccine for protection and broad neutralization of staphylococcal superantigens. *Sci Rep*, 2019, **9**: 13
- [54] Zhao Z, Sun H Q, Wei S S, *et al.* Multiple B-cell epitope vaccine induces a staphylococcus enterotoxin B-specific IgG1 protective response against MRSA infection. *Sci Rep*, 2015, **5**: 12371
- [55] Inskeep T K, Stahl C, Odle J, *et al.* Oral vaccine formulations

- stimulate mucosal and systemic antibody responses against staphylococcal enterotoxin B in a piglet model. Clin Vaccine Immunol, 2010, **17**(8): 1163-1169
- [56] Xiong Z L, Mai J L, Li F, *et al.* Oral administration of recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing mutant staphylococcal enterotoxin B provides potent protection against lethal enterotoxin challenge. Amb Express, 2020, **10**(1): 215
- [57] Liu S Q, Zhang S H, Duan Y Q, *et al.* Transcutaneous immunization of recombinant staphylococcal enterotoxin B protein using a dissolving microneedle provides potent protection against lethal enterotoxin challenge. Vaccine, 2019, **37**(29): 3810-3819
- [58] Tilahun M E, Rajagopalan G, Shah-Mahoney N, *et al.* Potent neutralization of staphylococcal enterotoxin B by synergistic action of chimeric antibodies. Infect Immun, 2010, **78**(6): 2801-2811
- [59] Drozdowski B, Zhou Y H, Kline B, *et al.* Generation and characterization of high affinity human monoclonal antibodies that neutralize staphylococcal enterotoxin B. J Immune Based Ther Vaccines, 2010, **8**: 9
- [60] Varshney A K, Wang X B, Cook E, *et al.* Generation, characterization, and epitope mapping of neutralizing and protective monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. J Biol Chem, 2011, **286**(11): 9737-9747
- [61] Dutta K, Varshney A K, Franklin M C, *et al.* Mechanisms mediating enhanced neutralization efficacy of staphylococcal enterotoxin B by combinations of monoclonal antibodies. J Biol Chem, 2015, **290**(11): 6715-6730
- [62] Varshney A K, Wang X B, Scharff M D, *et al.* Staphylococcal enterotoxin B-specific monoclonal antibody 20B1 successfully treats diverse *Staphylococcus aureus* infections. J Infect Dis, 2013, **208**(12): 2058-2066
- [63] Karau M J, Tilahun M E, Krogman A, *et al.* Passive therapy with humanized anti-staphylococcal enterotoxin B antibodies attenuates systemic inflammatory response and protects from lethal pneumonia caused by staphylococcal enterotoxin B-producing *Staphylococcus aureus*. Virulence, 2017, **8**(7): 1148-1159
- [64] Tilahun M E, Kwan A, Natarajan K, *et al.* Chimeric anti-staphylococcal enterotoxin B antibodies and lovastatin act synergistically to provide *in vivo* protection against lethal doses of SEB. PLoS One, 2011, **6**(11): e27203
- [65] Varshney A K, Wang X B, MacIntyre J, *et al.* Humanized staphylococcal enterotoxin B (SEB)-specific monoclonal antibodies protect from SEB intoxication and *Staphylococcus aureus* infections alone or as adjunctive therapy with vancomycin. J Infect Dis, 2014, **210**(6): 973-981
- [66] Larkin E A, Stiles B G, Ulrich R G. Inhibition of toxic shock by human monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxin B. PLoS One, 2010, **5**(10): 9
- [67] MacIntyre J L, Varshney A K, Wang X B, *et al.* Optimization of experimental conditions for functional *in vitro* characterization of humanized antibodies specific for staphylococcal enterotoxin B. Int Immunopharmacol, 2015, **28**(1): 354-358
- [68] Karauzum H, Chen G, Abaandou L, *et al.* Synthetic human monoclonal antibodies toward staphylococcal enterotoxin B (SEB) protective against toxic shock syndrome. J Biol Chem, 2012, **287**(30): 25203-25215
- [69] Chen G, Karauzum H, Long H, *et al.* Potent neutralization of staphylococcal enterotoxin B *in vivo* by antibodies that block binding to the T-cell receptor. J Mol Biol, 2019, **431**(21): 4354-4367
- [70] Hu N J, Qiao C X, Wang J, *et al.* Identification of a novel protective human monoclonal antibody, LXY8, that targets the key neutralizing epitopes of staphylococcal enterotoxin B. Biochem Biophys Res Commun, 2021, **549**: 120-127
- [71] Sully E K, Whaley K, Bohorova N, *et al.* A tripartite cocktail of chimeric monoclonal antibodies passively protects mice against ricin, staphylococcal enterotoxin B and *Clostridium perfringens* epsilon toxin. Toxicon, 2014, **92**: 36-41
- [72] Verreault D, Ennis J, Whaley K, *et al.* Effective treatment of staphylococcal enterotoxin B aerosol intoxication in rhesus macaques by using two parenterally administered high-affinity monoclonal antibodies. Antimicrob Agents Chemother, 2019, **63**(5): e02049-18
- [73] Liu Y Y, Song Z, Ge S, *et al.* Determining the immunological characteristics of a novel human monoclonal antibody developed against staphylococcal enterotoxin B. Hum Vacc Immunother, 2020, **16**(7): 1708-1718
- [74] Kroetsch A, Qiao C X, Heavey M, *et al.* Engineered pH-dependent recycling antibodies enhance elimination of staphylococcal enterotoxin B superantigen in mice. MAbs, 2019, **11**(2): 411-421
- [75] Edwin C, Tatini S R, Maheswaran S K. Nature and reactivity of staphylococcal-enterotoxin A monoclonal-antibodies. Appl Environ Microb, 1986, **52**(6): 1247-1252
- [76] Tsai Chih-Ming, Caldera J R, Hajam I A, *et al.* Non-protective immune imprint underlies failure of *Staphylococcus aureus* IsdB vaccine. Cell Host Microbe, 2022, **30**(8): 1163-1172.e6
- [77] Piot P, Larson H J, O'Brien K L, *et al.* Immunization: vital progress, unfinished agenda. Nature, 2019, **575**(7781): 119-129
- [78] Parray H A, Shukla S, Samal S, *et al.* Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. Int Immunopharmacol, 2020, **85**: 106639
- [79] Lu R M, Hwang Y C, Liu I J, *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. J Biomed Sci, 2020, **27**(1): 1
- [80] Rueckert C, Guzman C A. Vaccines: from empirical development to rational design. PLoS Pathog, 2012, **8**(11): e1003001
- [81] Jovcevska I, Muyldermans S. The therapeutic potential of nanobodies. Biodrugs, 2020, **34**(1): 11-26

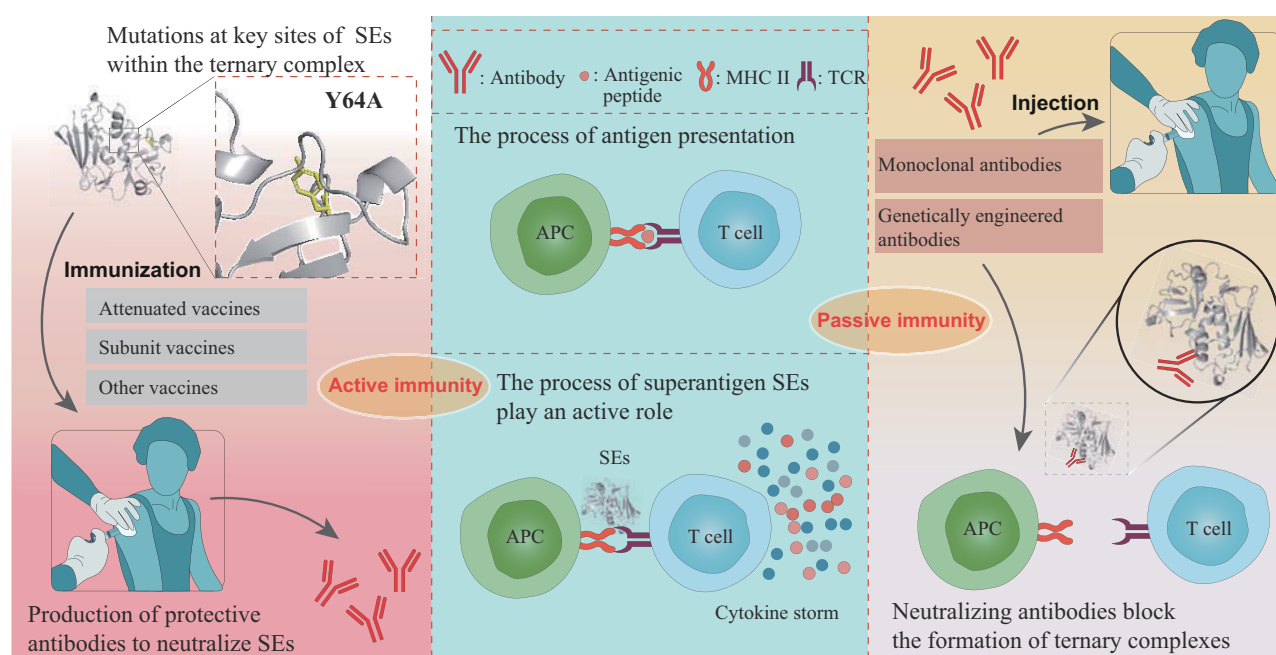
The Immunotherapy Strategies of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin Poisoning*

LI Qing, DOU Lei-Na, WEN Kai, YU Xue-Zhi, YU Wen-Bo,

SHEN Jian-Zhong**, WANG Zhan-Hui**

(Beijing Key Laboratory of Detection Technology for Animal-Derived Food Safety, College of Veterinary Medicine,
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Graphical abstract



Abstract Staphylococcal enterotoxins (SEs) are kinds of bacterial exotoxins with vomiting activity secreted by *S. aureus*, which can cause diseases such as inflammation and food poisoning. SEs possess superantigen activity and can form ternary complexes with the variable region of T-cell receptor (TCR) and MHC class II molecule, *i.e.*, TCR-SEs-MHC class II molecule, which could directly stimulate up to 30% of T lymphocytes to produce a large numbers of cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 2 (IL-2), IL-6, and interferon γ (IFN- γ), resulting in toxic shock syndrome (TSS). Among the common SEs, staphylococcal enterotoxin A (SEA) and staphylococcal enterotoxin B (SEB) are the most studied due to higher toxicity and frequency in reported incidents. Specially, about 70% of *S. aureus* food poisoning are caused by SEA, while, SEB was listed as

* This work was supported by grants from the Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z211100007021007) and National Key R&D Program of China (2018YFC1602900).

** Corresponding author.

SHEN Jian-Zhong. Tel: 86-10-62734565, E-mail: sjz@cau.edu.cn

WANG Zhan-Hui. Tel: 86-10-62734565, E-mail: wangzhanhui@cau.edu.cn

Received: July 14, 2022 Accepted: October 21, 2022

an offensive biological warfare agent in 1960s. At present, there are few comprehensive review paper on treatment strategies for SEs poisoning. Hence, the review firstly introduces the classification, structure, and toxic effects of SEs, and then the ternary complexes of TCR-SEs-MHC class II molecular interaction sites are analyzed focusing on SEA and SEB. Furthermore, we summarize the recent advance in the filed of active and passive immunotherapy for SEs poisoning around SEA and SEB. We highlight the state of art and new developments on active immunotherapy mainly includes attenuated vaccine, subunit vaccine and other vaccines and passive immunotherapy that is mainly based on monoclonal antibody and genetic engineering antibody. Finally, we discuss and prospect the current limitations and future development of immunotherapy for SEs including synthetic peptide vaccine, single cell technology and nanobody isolation.

Key words *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, interaction sites, immunotherapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0324