

综 述

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002091

不可分型流感嗜血杆菌外膜蛋白的研究进展

马玉帅,赵 颖,陈 蕊,张玉妥

(河北北方学院病原生物学实验室,张家口 075000)

【摘 要】不可分型流感嗜血杆菌(nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi)是一种定植在人类鼻咽部常见的条件致病菌,常引起继发性感染,如支气管炎、鼻窦炎、儿童中耳炎和成人慢性阻塞性肺疾病急性加重等。研究发现该菌细胞壁外膜上表达多种具有免疫原性和抗原性的蛋白,其对该菌在宿主体内的定植、入侵和生存必不可少,有些蛋白还与该菌的耐药性和宿主免疫的清除机制有关。因此,研究外膜蛋白有利于开发有效的疫苗和抗感染药物来预防及治疗 NTHi 引起的感染,下面从蛋白的结构、功能及应用等方面对几种外膜蛋白作一综述。

【关键词】不可分型流感嗜血杆菌;外膜蛋白;免疫原性;抗原性;定植;耐药性

【中图分类号】R378;R392

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-25

Research progress in outer membrane proteins of
nontypeable *Haemophilus influenzae*

Ma Yushuai, Zhao Ying, Chen Rui, Zhang Yutuo

(Laboratory of Pathogenic Biology, Hebei North University)

【Abstract】Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a conditioned pathogen colonizing the human nasopharynx. It often causes secondary infections, such as bronchitis, sinusitis, otitis media in children, and acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in adults. It has been found that a variety of immunogenic and antigenic proteins are expressed on the outer membrane of the cell wall of NTHi, which are essential for its colonization, invasion, and survival in the host. In addition, some proteins are also associated with the drug resistance and host immune clearance mechanism of the bacterium. Therefore, the study of outer membrane proteins is beneficial to the development of effective vaccines and anti-infective drugs to prevent and treat infections caused by NTHi. In this paper, several outer membrane proteins are reviewed in terms of their structure, function and application.

【Key words】nontypeable *Haemophilus influenzae*; outer membrane protein; immunogenicity; antigenicity; colonization; resistance

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, Hi)是一类生长依赖 V 因子和 X 因子的革兰阴性杆菌,根据有无荚膜可分为荚膜型和无荚膜型,无荚膜型又称不可分型。不可分型流感嗜血杆菌(nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi)是一种定植在人类鼻咽部常见的条件致病菌,主要引起继发性感染,常继发于流感、麻疹、结核等,临床主要表现为儿童中耳炎、支气管炎、鼻窦炎、慢性阻塞性肺疾病急性加重等。因其无荚膜,所以国内以荚膜多糖为靶抗原的 Hib 荚膜多糖联合

疫苗对 NTHi 完全不起作用。因此, NTHi 细胞壁外膜上的蛋白成为国内外学者研究的焦点。另外,至今国内尚无针对 NTHi 的有效疫苗和抗感染药物,所以研究其外膜上的蛋白显得格外重要。本文通过对几种具有潜在优势的外膜蛋白 P2、P5、P6、蛋白 D、蛋白 E 和 Haps 蛋白结构、功能、应用等方面的综合分析,展望外膜蛋白在新型抗感染药物和疫苗研制方面的广阔前景。

1 蛋白 P6

1.1 结构

外膜蛋白 P6 是一种分子量为 16 kD 的脂蛋白,同时也是整合蛋白,锚定于 NTHi 外膜上,维持着细胞外膜的完整性。外膜蛋白 P6 不属于跨膜蛋白,类似大肠杆菌脂蛋白具有明显的双向定位^[1],一种是暴露于膜表面具有免疫原性能与抗

作者简介:马玉帅, Email: 1848872289@qq.com,

研究方向:感染性疾病的病原学诊断与防治。

通信作者:张玉妥, Email: ytuozhang@163.com

基金项目:河北省教育厅青年基金资助项目(编号:QN2015024);河北省高校科技研究重点资助项目(编号:ZD2016030)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190422.1531.008.html>
(2019-04-23)

体结合的膜脂蛋白,一种是面向周浆间隙不与抗体结合的肽聚糖相关脂蛋白,且以面向周浆间隙的蛋白为主。

1.2 抗原性与免疫原性

P6 蛋白在 NTHi 菌株间的核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别为 97%、100%,尽管 P6 抗原性高度保守,但仍然会存在变异,Chang A 等^[2]通过微生物培养和 PCR 技术从鼻腔、口咽及鼓室穿刺分离物中鉴定的 151 株 NTHi 中,有 14 株 (9.3%) 发生了氨基酸序列的变异,并发现 P6 单克隆抗体 7F3 与 59 和 61 位点 (P6 蛋白氨基酸序列的 59 和 61 位置是与单克隆抗体 7F3 结合的表位的一部分) 处发生氨基酸替换的 P6 蛋白不结合,但这些变异对蛋白结构的改变,以及对蛋白的抗原性和免疫原性的影响需进一步研究。Hua CZ 等^[3]通过检测不同年龄健康儿童抗 P6 蛋白及 T-B 细胞结合抗原肽表位的抗体效价,发现在 P6-61、P6-123 抗原肽表位处的抗体效价最高,即为 P6 蛋白的优势表位。且 NTHi 表面不存在与 P6 蛋白类似的结合位点^[4]。P6 蛋白经小鼠鼻黏膜免疫可诱导产生高滴度的特异性抗体 mIgA 和 IgG,诱导脾 CD4 T 细胞表达 P6 特异性 Th1 和 Th2 细胞因子,诱导鼻黏膜相关淋巴组织特异性 CD4 T 细胞产生 IL-17,诱导鼻咽和脾产生表达 IL-17 的 Th17 细胞^[5],从而提高机体的免疫性保护作用及对细菌的清除率。

1.3 致病性

P6 蛋白主要刺激机体产生炎症因子进而发挥促炎作用。暴露在细菌外膜表面的 P6 蛋白具有 Pam3Cys 末端序列,与 Toll 样受体信号传导系统偶联,从而激活细胞内核转录因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号传导通路产生炎症细胞因子白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α),引起对外膜蛋白的获得性免疫应答及诱发杀菌免疫活性。外膜蛋白 P6 又是人巨噬细胞促炎细胞因子的一种强有力的选择性诱导剂,并在低至 0.1 μ g/mL 下能在体外有效诱导人巨噬细胞效应因子 IL-8 和 TNF- α 的产生。

1.4 应用

由于 P6 抗原的高度保守性及其诱导抗体杀菌活性,将其作为无毒脂寡糖 (detoxified lipooligosaccharide, dLOS) 疫苗的蛋白载体, Wu T 等^[6]将 NTHi 无毒脂寡糖与 P6 蛋白共价结合,发现 dLOS-P6 共价结合物免疫小鼠后可同时诱导产生特异性抗 dLOS 抗体和抗 P6 抗体。另外,根据 P6 蛋白的优势表位,可对 P6 蛋白进行优势表位定点改造或合成优势表位肽,进而增强免疫保护,开发强有效的 P6 蛋白疫苗。基于 P6 基因的高度保守性,可用于鉴别流感嗜血杆菌和溶血性嗜血杆菌,利用 P6 基因设计引物,用 PCR 检测可极大提高其阳性检出率。

2 蛋白 D

2.1 结构

蛋白 D (protein D, PD) 分子量为 42 kD 的膜脂蛋白,是

膜相关免疫球蛋白 IgD 的结合蛋白,存在于 NTHi 外膜上。PD 通过与氨基末端半胱氨酸残基相连的脂肪酸而锚定于细菌外膜表面,且处于酰化状态的 PD 在疏水性中起着重要作用^[7]。当细菌氨基酸突变而失去半胱氨酸残基时,PD 不能发生酰化,非酰化的 PD 可分泌到细菌的胞浆间隙。

2.2 抗原性与免疫原性

PD 在所有菌株之间高度保守,其核苷酸和氨基酸序列同源性大于 97%,且 PD 并无抗原漂移。当 PD 与其诱导产生的特异性血清抗体结合,会抑制甘油磷酸二酯酶 (glycerophosphodiester phosphodiesterase, Glpq) 的活性,进而抑制磷酸胆碱的释放和磷酸胆碱-脂寡糖 (phosphorylcholine-decorated lipooligosaccharide, Pcho-LOS) 的形成,从而起到免疫保护作用^[8]。Akkoyunlu M^[9]研究发现 PD 的脂部分也参与诱导抗体产生,其脂化形式比去脂形式更具有免疫原性,当用去脂 D 蛋白与天然脂蛋白诱导产生的 IgG 抗体进行中和试验时,发现在 11 份血清中仍有 3 份血清有较强的杀菌活性。PD 免疫小鼠可诱导产生特异性抗体 IgG,同时又可诱导特异性细胞免疫反应,增强吞噬细胞的杀伤活性。诱导脾细胞分泌 Th1 和 Th2 细胞因子 γ 干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ)、IL-4 和 IL-10, IFN- γ 又可增强共刺激分子的表达,有利于 T 细胞识别并调节向 Th1 细胞的分化^[10]。另外, Th2 也能够激活体液免疫反应产生特异性抗体,细胞因子的产生也使抗体稳定增加^[11]。

2.3 致病性

PD 是一种脂蛋白,是具有 Glp 活性的一种毒力因子,在 NTHi 的致病机制中起着一定的作用,刺激宿主上皮细胞释放磷酸胆碱,经 Pcho-LOS 与支气管上皮细胞血小板活化因子 (PAF) 受体结合,以增强细菌的黏附作用和侵袭能力以及形成稳定的生物膜^[7,12-13];另外,PD 还可以增强细菌黏附和内化到人单核细胞中。

2.4 应用

由于 PD 的高度保守性和免疫原性,被用作蛋白载体与肺炎链球菌多糖共价结合制成 PHiD-CV 十价联合疫苗 (PCV10)。经临床应用显示,联合疫苗的使用使 NTHi 引起的中耳炎患病率下降,但不能消除 NTHi 介导的中耳炎,也不能降低鼻咽部 NTHi 的携带率^[14]。究其原因,或是由于不同研究人群中菌群的差异,或是 PD 免疫在减少鼻咽中 NTHi 细菌载量方面有不同的效果,特别是在病毒共感染时。因此,进一步增强 PD 的免疫保护性,开发多组分抗原疫苗、选择有效佐剂至关重要。除此之外,PD 还被用作 HBsAg 的协同抗原,通过体液免疫和细胞免疫同时增强 HBsAg 抗原在小鼠体内的免疫原性。Su Q 等^[15]将 PD 与酵母源性重组 HBsAg 共价结合,经肌肉免疫后发现 HBsAg 特异性抗体显著增高,且与商品化乙肝疫苗相比具有统计学差异。另外,以 PD 基因 (hpd) 为基础的 PCR 技术也可用于流感嗜血杆菌的鉴定。

3 蛋白 P2

3.1 结构

外膜蛋白 P2 分子量为 36~42 kD,是由 16 个跨膜区和 8

个外露表面环(loops)形成的三聚体膜孔蛋白,允许 1.4 kD 的分子通过。外膜蛋白 P2 在 NTHi 外膜含量十分丰富,约占所有外膜蛋白含量的一半。

3.2 抗原性与免疫原性

P2 蛋白具有很强的免疫原性,不论经黏膜免疫还是系统免疫都会产生高滴度抗体,但是,经全细菌 ELISA 和流式细胞仪分析显示,其表面暴露区主要诱导黏膜免疫应答,而非表面暴露区主要引起系统免疫应答;loop6 区暴露在细菌表面且存在所有菌株上,针对 loop6 的血清抗体有高度的特异性和补体杀菌功能。但 loop6 区域的稳定性是相对的,在短期感染该菌的宿主体内,loop6 区域呈高度保守;在持续感染该菌的宿主体内,该区域则会发生单碱基点突变而导致免疫逃避,产生抗原漂移^[16]。

3.3 致病性

P2 蛋白通过与宿主体内的层粘连蛋白受体结合介导细菌的黏附,还能诱导多种炎性细胞因子的释放。与 P2 蛋白环 loop7 相对应的合成肽能够激活 JNK(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路和 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路(p38MAPK),进而诱导细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的释放^[17]。有研究表明,在热应激反应时,外膜蛋白 P2 基因的调控作用与亚胺培南对 NTHi 的抗菌作用增强有关^[18]。

3.4 应用

就目前所知,P2 蛋白 loop6 区域相对保守,所以用它进行疫苗的研制也就有了局限性。基于此,很多学者进一步寻找 P2 结构中其他高度保守的区域来研制疫苗,或联合其他较保守的区域来制备疫苗,弥补外膜蛋白 P2 潜在的点突变和抗原异质性。Cantisani M 等^[17]通过互补肽的方法设计了一种能够选择性地与 P2 蛋白 loop7 环结合的肽,可以阻断 JNK、p38MAPK 信号通路,降低细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的释放,因此,loop7 互补肽可能被研发为 P2 蛋白 loop7 环的特异性拮抗剂,并为设计新的 NTHi 抗菌药物提供了新的方向。根据外膜蛋白 P2 基因的调控作用对亚胺培南抗菌作用影响的特性,可能有助于识别潜在的抗生素靶点。

4 蛋白 P5

4.1 结构

外膜蛋白 P5(P5 fimbriae, P5)是分子量约为 27 kD、具有 8 个跨膜区和 4 个外露表面环的一种热修饰蛋白,与大肠杆菌外膜蛋白有 50% 的同源性。

4.2 抗原性与免疫原性

基于 loop3 制备的 P5 蛋白疫苗,在南美栗鼠动物模型研究实验中,能够引起机体体液免疫和细胞免疫 2 种应答机制^[19]。

4.3 致病性

P5 蛋白虽然不是细菌生物膜生长所必需,但参与 NTHi 细菌黏附定植、与宿主细胞的相互作用,以及小鼠的肺部感染,曾认为 P5 蛋白通过癌胚抗原相关细胞黏附分子-1

(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, CEACAM1)和细胞黏附分子(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)介导黏附于上皮细胞,可能是宿主细胞表面 CEACAM1 和 ICAM-1 的细菌配体,但 Euba B 等^[20]用 HeLa-BGP 细胞进行黏附试验证明:P5 蛋白在细菌黏附中的作用与 CEACAM1 并没有关系。外膜蛋白 P5 是一种 DsbA 依赖蛋白,当 DsbA 突变导致缺乏二硫键,形成的 Hi 更容易被血清补体杀死^[21]。由于 P5 蛋白的存在遮蔽了 LOS 上与 IgM 结合的表位,从而限制了 IgM 与细菌表面的结合,抑制了补体系统经典途径杀伤活性的激活,但针对血清 IgM 的 P5 蛋白的抗原表位目前尚不清楚^[22]。另外,P5 蛋白还可以与人补体调节蛋白因子 H 直接结合,阻止补体因子 C3 在细菌表面沉积,抑制了补体旁路途径的激活。以上 2 种免疫逃避方式都可导致补体介导的溶细胞效应降低^[23]。

4.4 应用

Novotny LA 等^[24]根据 P5 蛋白 19-mer B 细胞表位合成了 40 聚体嵌合肽免疫原(LB1),用 LB1 和大肠杆菌不耐热肠毒素的双突变体(a double mutant of *E.coli* heat-labile enterotoxin, dmlt)佐剂共同经皮免疫小鼠,表明免疫后可提高对鼻咽和中耳炎 NTHi 的清除率,对 NTHi 引起的中耳炎有一定保护作用,因此 P5 蛋白可成为 NTHi 候选疫苗的抗原组成部分。基于 P5 蛋白抑制补体经典和旁路途径的激活诱导细菌耐药的机制也为开发 Hi 新型抗感染药物提供了方向。

5 蛋白 E

5.1 结构

蛋白 E(protein E, PE)分子量为 16 kD,是一种膜脂蛋白,以其共价键与氨基酸残基 Cys16 结合而锚定在 NTHi 的外膜上。PE 常以二聚体的形式存在形成桶状结构,二聚体的 N 端朝向细菌的膜侧而 C 端则面向外界^[25]。

5.2 抗原性与免疫原性

Ronander E 等^[26]对 200 株临床分离株进行检测,发现所有菌株均含有 pe 基因,其中 86 株表达了 PE 蛋白。对 126 株 NTHi pe 基因序列进行分析,表明 PE 高度保守,PE 全长蛋白同源率为 96.9%~100%(不含信号肽),而上皮细胞黏附结合区(氨基酸 84~108)100%同源^[27]。Behrouzi A 等^[28]用重组截短的 PE 与明矾佐剂混合免疫小鼠,可诱导产生较高的 IgG 和亚型 IgG2a 和 IgG1 抗体水平,血清杀菌试验可观察到对 NTHi 有较弱的杀菌作用。

5.3 致病性

PE 通过介导与宿主细胞层粘连蛋白、维托菌素(补体下游调节蛋白)的结合,参与 NTHi 的黏附,发挥促炎作用。与维托菌素 C 端结合的区域主要位于 84~108 氨基酸处^[27],其结合延迟了膜攻击复合物(C5b-9)的形成进而介导天然免疫逃避;与层粘连蛋白和纤溶酶原结合的区域主要位于残基 41~68 氨基酸处,且 PE 还可与层粘连蛋白 LG1-5 结构域相互作用,这种相互作用可被肝素所抑制。PE loop3 区含有少量酸

性残基(残基 d59 和 e62),可能参与了与层粘连蛋白 LG4-5 结构域的结合^[29]。PE 与纤溶酶原结合时可导致补体 C3 的降解,保护细菌免受补体介导的杀伤作用^[30]。结构域 PE22-160 可诱导促炎细胞反应,诱导宿主上皮细胞趋化因子 IL-8 和细胞间黏附分子 ICAM-1(CD54)分泌增加,增强中性粒细胞与上皮细胞的黏附^[26]。

5.4 应用

基于 PE 黏附结合域 PE84-108 的 100% 同源性,以及在 NTHi 感染发病机制中的重要作用,用合成肽 PE84-108 作为免疫原可提高小鼠对 NTHi 的清除率^[42];NTHi 感染往往不直接与宿主细胞表面结合,而是通过 PE 与结合在细胞表面的维托菌素结合,参与随后的 NTHi 细胞内侵袭,也许针对 PE-维托菌素的一种新的疫苗或治疗策略可以预防 NTHi 的感染,并可能产生更好的临床结果^[31]。用 SELEX 筛选 PE 适配体 2' F-RNA 可抑制 PE 与维托菌素结合以消除病原体的黏附,进一步研究有效的适配体抑制细菌黏附素与靶蛋白的相互作用,可能会有助于未来对 NTHi 感染的治疗^[32]。

6 蛋白 Haps

6.1 结构

Hap 是在所有 Hi 菌株外膜上都有表达的一种结合蛋白,分子量为 155 kD。Haps 蛋白属于 Hap 自体转运蛋白家族,通过与上皮细胞的相互作用定植于鼻咽部,且研究发现 Haps 发挥黏附活性主要与其 C 端 311 个氨基酸的细胞结合域(CBD)相关,Tabatabaee A 等^[33]根据 C 端 311 个氨基酸序列构建重组蛋白 rC-HapS,发现该序列保守性较高且同源性达 97%。

6.2 抗原性与免疫原性

重组蛋白 C-HapS 经皮下免疫小鼠,可诱导 Th1 和 Th2 相关抗体 IgG2a 和 IgG1 的产生,且抗体 IgG1 水平高于 IgG2a,说明细胞介导的免疫应答更倾向于 Th2 型;血清杀菌实验显示对 NTHi 有较强的杀菌作用^[34]。

6.3 致病性

Haps 蛋白通过与细胞外基质蛋白(层粘连蛋白、纤维连接蛋白、胶原等)结合而发挥黏附功能,促进 NTHi 在人体鼻咽部的聚集,但其具有自身蛋白水解功能可促进细菌分散以及在呼吸道内的传播。人呼吸道分泌物中发现的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂(SLPI)可抑制 Haps 自身蛋白水解活性进而增强 Haps 黏附活性。虽然 Haps 促进了 NTHi 在宿主体内的黏附性,但它与宿主的相互作用是有限的,并不是生物膜生长所必需^[35]。

6.4 应用

宿主免疫系统对 Th2 反应通常是结合疫苗免疫反应的一部分。另外,Haps 分子量较大易引起宿主免疫反应,重组蛋白 rC-HapS 诱导 Th2 型细胞免疫应答以及其较高的杀菌实验,可作为 NTHi 候选疫苗的靶抗原。因此,Haps 蛋白很有希望用作疫苗的研制,来预防 NTHi 的黏附、聚集及播散,降

低该菌的感染率。

综上所述,这些外膜蛋白,其功能各不相同。外膜蛋白 P2/P5/P6、脂蛋白 D 多用于研究制备疫苗,利用其优势表位合成肽作为疫苗靶抗原或多组分联合制备疫苗可能会增强其有效性。P2、P5、Haps 蛋白和 PE 是主要具有黏附功能的外膜蛋白,根据其与细胞黏附受体和 ECM 蛋白的结合黏附机制来研究黏附抑制剂,进而开发有效的抗感染药物来抑制 NTHi 在宿主呼吸道的定植。P2 也用于细菌耐药性的研究,基于 P2 基因的调控作用对亚胺培南抗菌作用影响的特性,可能有助于识别潜在的抗生素靶点。基于免疫调节剂 P5 蛋白的免疫逃避机制,用其作为疫苗靶抗原有可能会抑制其血清耐药。基于 dLOS-P6 和 PCV10 对小鼠的免疫保护性,P6 和 PD 可用作联合疫苗的多糖蛋白载体,用 P6 和 PD 作为 Hib 荚膜多糖的蛋白载体制备联合疫苗也许既能预防 Hib 引起的感染又能预防 NTHi 引起的感染,可能会成为当前疫苗研究的新热点。总之,对 NTHi 外膜蛋白的研究具有潜在的应用价值和十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Cowles CE, Li Y, Semmelhack MF, et al. The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*[J]. Mol Microbiol, 2011, 79(5):1168-1181.
- [2] Chang A, Kaur R, Michel LV, et al. *Haemophilus influenzae* vaccine candidate outer membrane protein P6 is not conserved in all strains[J]. Hum Vaccin, 2011, 7(1):102-105.
- [3] Hua CZ, Hu WL, Shang SQ, et al. Serum concentrations of antibodies against outer membrane protein P6, protein D and their T- and B-cell combined antigenic epitopes of nontypeable *Haemophilus influenzae* in children and adults of different ages[J]. Clin Vaccine Immunol, 2015, 23(2):155-161.
- [4] Michel LV, Snyder J, Schmidt R, et al. Dual orientation of the outer membrane lipoprotein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*[J]. J Bacteriol, 2013, 195(14):3252-3259.
- [5] Noda K, Kodama S, Umamoto S, et al. Th17 cells contribute to nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific protective immunity induced by nasal vaccination with P6 outer membrane protein and α -galactosylceramide[J]. Microbiol Immunol, 2011, 55(8):574-581.
- [6] Wu T, Chen JT, Green BA, et al. Investigation of non-typeable *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6 as a new carrier for lipooligosaccharide conjugate vaccines[J]. Vaccine, 2005, 23(44):5177-5185.
- [7] Behrouzi A, Vaziri F, Rahimijamni F, et al. Vaccine candidates against nontypeable *Haemophilus influenzae*: a review[J]. Iran Biomed J, 2017, 21(2):69-76.
- [8] Johnson RW, McGillivray G, Denoël P, et al. Abrogation of nontypeable *Haemophilus influenzae* protein D function reduces phosphorylcholine decoration, adherence to airway epithelial cells, and fitness in a chinchilla model of otitis media[J]. Vaccine, 2011, 29(6):1211-1221.

- [9] Akkoyunlu M. Detection of naturally occurring antibodies against protein D of *Haemophilus influenzae*[J]. Vaccine, 2011, 29(16):2834.
- [10] wasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system[J]. Nat Immunol, 2015, 16(4):343–353.
- [11] Davoudi AV, Siadat SD, Abedian SK, et al. Immunization with protein D from non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) induced cytokine responses and bioactive antibody production[J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9(10):e36617.
- [12] Behrouzi A, Bouzari S, Siadat SD, et al. Evaluation of the immunogenic property of NT *H. influenzae* protein D with *Neisseria meningitidis* OMV in BALB/c[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(12):1345–1351.
- [13] Farshid J, Kristian R. Update on non-typeable *Haemophilus influenzae*-mediated disease and vaccine development[J]. Expert Rev Vaccines, 2018, 17(6):503–512.
- [14] Andrade DC, Borges IC, Bouzas ML, et al. 10-valent pneumococcal conjugate vaccine(PCV10) decreases metabolic activity but not nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*[J]. Vaccine, 2017, 35(33):4105–4111.
- [15] Su Q, Yi Y, Qiu F, et al. Immune responses to HbsAg conjugated to protein D of non-typeable *Haemophilus influenzae* in mice[J]. PLoS One, 2015, 10(2):e0117736.
- [16] Ostberg KL, Russell MW, Murphy TF. Mucosal immunization of mice with recombinant OMP P2 induces antibodies that bind to surface epitopes of multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*[J]. Mucosal Immunol, 2009, 2(1):63–73.
- [17] Cantisani M, Vitiello M, Falanga A, et al. Peptides complementary to the active loop of porin P2 from *Haemophilus influenzae* modulate its activity [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7:2361–2371.
- [18] Cherkaoui A, Diene SM, Fischer A, et al. Transcriptional modulation of penicillin-binding protein 1b, outer membrane protein P2 and efflux pump(AcrAB-TolC) during heat stress is correlated to enhanced bactericidal action of imipenem on non-typeable *Haemophilus influenzae* [J]. Front Microbiol, 2018, 8:2676.
- [19] Novotny LA, Partida-Sanchez S, Munson RS Jr, et al. Differential uptake and processing of a *Haemophilus influenzae* P5-derived immunogen by chinchilla dendritic cells[J]. Infect Immun, 2008, 76(3):967–977.
- [20] Euba B, Moleres J, Viadas C, et al. Relative contribution of P5 and hap surface proteins to nontypeable *Haemophilus influenzae* interplay with the host upper and lower airways[J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0123154.
- [21] Rosadini CV, Wong SM, Akerley BJ. The periplasmic disulfide oxidoreductase DsbA contributes to *Haemophilus influenzae* pathogenesis [J]. Infect Immun, 2008, 76(4):1498–1508.
- [22] Rosadini CV, Ram S, Akerley BJ, et al. Outer membrane protein P5 is required for resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* to both the classical and alternative complement pathways[J]. Infect Immun, 2014, 82(2):640–649.
- [23] Langereis JD, Jonge MI, Weiser JN. Binding of human factor H to outer membrane protein P5 of non-typeable *Haemophilus influenzae* contributes to complement resistance[J]. Mol Microbiol, 2014, 94(1):89–106.
- [24] Novotny LA, Clements JD, Bakaletz LO. Transcutaneous immunization as preventative and therapeutic regimens to protect against experimental otitis media due to nontypeable *Haemophilus influenzae*[J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(4):456–467.
- [25] Singh B, Al-Jubair T, Morgelin M, et al. The unique structure of *Haemophilus influenzae* protein E reveals multiple binding sites for host factors[J]. Infect Immun, 2013, 81(3):801–814.
- [26] Ronander E, Brant M, Eriksson E, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhesin protein E: characterization and biological activity[J]. J Infect Dis, 2009, 199(4):522–531.
- [27] Singh B, Brant M, Kilian M, et al. Protein E of *Haemophilus influenzae* is a ubiquitous highly conserved adhesin[J]. J Infect Dis, 2010, 201(3):414–419.
- [28] Behrouzi A, Bouzari S, Vaziri F, et al. Recombinant truncated E protein as a new vaccine candidate against nontypeable *H. influenzae*; its expression and immunogenic evaluation[J]. Microb Pathog, 2017, 110:431–438.
- [29] Singh B, Aljubair TM, rgelin M, et al. The unique structure of *Haemophilus influenzae* protein E reveals multiple binding sites for host factors[J]. Infect Immun, 2013, 81(3):801–814.
- [30] Barthel D, Singh B, Riesbeck K, et al. *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity[J]. J Immunol, 2012, 188(1):379–385.
- [31] Ikeda M, Enomoto N, Hashimoto D, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells[J]. BMC Microbiol, 2015, 15(1):263–274.
- [32] Barfod A, Singh B, Johanson U, et al. *In vitro* selection of RNA aptamers directed against protein E; a *Haemophilus influenzae* adhesin [J]. Mol Biotech, 2014, 56(8):714–725.
- [33] Tabatabaee A, Siadat SD, Moosavi SF, et al. Overexpression and purification of C-terminal fragment of the passenger domain of hap protein from nontypeable *Haemophilus influenzae* in a highly optimized *Escherichia coli* expression system[J]. Avicenna J Med Biotech, 2013, 5(3):176–185.
- [34] Tabatabaee Bafroee A, Siadat SD, Moosavi SF, et al. Recombinant C-terminal 311 amino acids of HapS adhesin as a vaccine candidate for nontypeable *Haemophilus influenzae*; a study on immunoreactivity in Balb/C mouse[J]. Microb Pathog, 2016, 98:106–111.
- [35] Euba B, Moleres J, Viadas C, et al. Relative contribution of P5 and hap surface proteins to nontypeable *Haemophilus influenzae* interplay with the host upper and lower airways[J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0123154.

(责任编辑:唐秋姗)