

DOI:10.13350/j.cjpb.230701

• 论著 •

SARS-CoV-2 细菌样颗粒对小鼠的免疫原性及攻毒保护效果评价

苏日娜^{1,2}, 石壮壮^{1,2}, 任娟^{2,3}, 罗敏^{2,3}, 王铁成², 冯娜², 王建忠¹, 夏咸柱², 孙伟洋^{2*}, 高玉伟^{2*}

(1. 吉林农业大学, 吉林长春 130000; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 山东师范大学)

【摘要】 **目的** 本研究以 C57BL/6N 小鼠为模型, 评价 SARS-CoV-2 细菌样颗粒(Bacterium-Like Particles, BLPs)的免疫原性和攻毒保护效果, 为新型冠状病毒感染(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)疫苗研发提供新思路。 **方法** 使用 SARS-CoV-2 细菌样颗粒 Trim-RBD-GEM 分别在第 0、21 d 滴鼻免疫 C57BL/6N 小鼠, 在第 7、14、21、28、35 d 采小鼠血, 分离血清, 采用 ELISA 检测特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平。在免疫后第 35 d 使用 50 LD₅₀ 的 C57MA14 毒株对 C57BL/6N 小鼠进行攻毒, 记录攻毒后 14 d 内小鼠体重变化及存活情况; 在攻毒后第 3 d 取小鼠的鼻甲骨和肺脏组织, 测定鼻甲骨和肺脏组织中的病毒滴度和病毒载量。另取肺脏组织, 使用 4% 多聚甲醛固定后制作病理切片并染色, 观察肺脏组织病理变化, 免疫组化法检测病毒蛋白的表达。 **结果** Trim-RBD-GEM 滴鼻免疫小鼠后诱导产生特异性抗体, IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平均显著升高。从攻毒后第 1 d 开始 Trim-RBD-GEM 组小鼠体重出现下降, 第 4 d 体重逐步回升, 观察期小鼠均存活, 存活率为 100%; Mock 组小鼠在攻毒后第 7 d 体重均下降至 75% 以下, 且所有小鼠均死亡, 存活率为 0。攻毒后 Trim-RBD-GEM 组小鼠肺脏组织中病毒滴度显著低于 mock 组 ($P < 0.05$)。攻毒后第 3 d 取各组小鼠肺脏做组织病理学检查, Trim-RBD-GEM 组小鼠局部支气管管腔内可见少量巨噬细胞浸润, mock 组小鼠肺脏切片中多处支气管管腔内可见坏死细胞碎片; 免疫组化试验显示 mock 组小鼠肺脏切片检测到 SARS-CoV-2 的 N 蛋白。

结论 Trim-RBD-GEM 滴鼻免疫小鼠可诱导产生特异性 IgG 抗体, 可为 COVID-19 疫苗的研发提供参考。

【关键词】 SARS-CoV-2 细菌样颗粒; C57BL/6N 小鼠; 滴鼻免疫; 免疫原性; 攻毒保护

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)07-0745-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jul;18(7):745-749,758.]

Evaluation of immunogenicity and protection of SARS-CoV-2 bacterial-like particles vaccine in mice

SU Rina^{1,2}, SHI Zhuangzhuang^{1,2}, REN Juan^{2,3}, LUO Min^{2,3}, WANG Tiecheng², FENG Na², XIA Xianzhu², SUN Weiyang², GAO Yuwei² (1. *Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130000, China*; 2. *Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences*; 3. *Shandong Normal University*)*

【Abstract】 **Objective** To evaluate the immunogenicity and protective efficacy of SARS-CoV-2 bacterium-like particles (BLPs), our study used C57BL/6N mice as the animal model and provide new ideas for the development of COVID-19 vaccine. **Methods** C57BL/6N mice were immunized intranasally with SARS-CoV-2 BLPs Trim-RBD-GEM on day 0 and 21, respectively. Blood was collected from mice on days 7, 14, 21, 28 and 35, and the serum was isolated for the detection of specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies by ELISA. On day 35 after immunization, C57BL/6N mice were challenged with the 50 LD₅₀ of C57MA14 strain, and the body weight changes and survival of the mice were recorded for 14 days after the challenge. The lungs were fixed with 4% paraformaldehyde and stained to observe the pathological changes of lung tissues, and the expression of viral proteins was detected by immunohistochemistry. **Results** Trim-RBD-GEM intranasally immunized mice induced specific antibody levels, and the levels of IgG, IgG1 and IgG2a antibodies were significantly increased. The body weight of the mice in the Trim-RBD-GEM group decreased from day 1 after the challenge and gradually increased on day 4, and all mice survived during the observation period, with a survival rate of 100%. The virus titer in the lungs of Trim-RBD-GEM group was significantly lower than that of the mock group ($P < 0.05$). A small number of macrophages were found in the local bronchial lumen of the mice in the Trim-RBD-GEM group, while necrotic cell fragments were seen in the lung sections of the mock group. **Conclusion** Trim-RBD-GEM intranasal immunization of mice induces the production of specific IgG antibodies, which may provide a reference for COVID-19 vaccine development.

【Key words】 SARS-CoV-2 bacterium-like particles; C57BL/6N mice; intranasal immunization; immunogenicity; protection

* **【通讯作者】** 孙伟洋, E-mail: sunweiyang1987@163.com; 高玉伟, E-mail: yuwei0901@outlook.com

【作者简介】 苏日娜(1996-), 女, 内蒙古自治区呼伦贝尔人, 硕士, 主要从事病毒学与人兽共患病学研究。E-mail: surina7234@163.com

自2020年新冠肺炎疫情大流行以来,全球已有7.5亿COVID-19确诊病例,死亡人数达到680万例,亟需安全有效的疫苗预防和减少疾病的传播^[1-2]。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)公布的数据,截止到2023年1月3日,176种COVID-19疫苗正在临床研究中,包括亚单位疫苗、病毒载体疫苗、DNA疫苗、灭活疫苗、RNA疫苗和病毒样颗粒疫苗,其中COVID-19亚单位疫苗有57种,占比33%^[3]。

亚单位疫苗有很多优势:具有较高的安全性和稳定性,可诱导强大的体液免疫;易于大规模生产,且副作用较小^[4]。目前COVID-19亚单位疫苗大部分免疫方式为肌肉注射,可诱导全身体液免疫的产生,但在粘膜免疫水平上效果欠佳,并且在受到病毒攻击后,病毒会在上呼吸道进行复制,增加了传播和感染的风险^[5]。滴鼻免疫不仅可以诱导全身免疫,还可诱导局部粘膜免疫。COVID-19最主要的传播途径是呼吸道,滴鼻免疫可以最大程度地减少病毒的传播^[6]。滴鼻免疫可以减少接种疼痛来扩大疫苗接种规模,降低COVID-19确诊率及病死率^[7]。

GEM-PA表面展示系统广泛应用于疫苗研究,例如裂谷热病毒、中东呼吸综合征冠状病毒以及寨卡病毒疫苗均应用了此系统^[8-10]。GEM-PA表面展示系统可将外源蛋白展示在GEM颗粒的表面,外源蛋白通过锚定蛋白(Protein Anchor, PA)与革兰氏阳性增强基质(Gram-positive enhancer matrix, GEM)结合,其中PA以非共价形式锚定在细胞壁的表面^[11]。GEM-PA表面展示系统由GEM和PA组成,GEM颗粒由乳酸乳球菌经过三氯乙酸煮沸处理得到,去除了大部分细胞质,并保留肽聚糖结构^[12-13]。GEM-PA表面展示系统作为一种疫苗载体有很多优点:首先,乳酸乳球菌是一种食品级细菌,不含核酸物质,所以安全性较高^[14-15];第二,它的外源蛋白表达水平高^[16];第三,可作为粘膜佐剂,提高免疫原性^[17]。

本研究使用一种基于GEM-PA表面展示系统的SARS-CoV-2细菌样颗粒 Trim-RBD-GEM滴鼻免疫C57BL/6N小鼠,然后用SARS-CoV-2攻毒,观察该疫苗对小鼠的保护效果,为COVID-19的控制和预防提供新的选择。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 毒株和细胞 SARS-CoV-2小鼠适应株(C57MA14)和Vero-E6细胞均由本实验室保存。

1.2 实验动物 SPF级8~9周龄C57BL/6N雌性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.3 主要试剂 DMEM培养基,胎牛血清,青霉素-链霉素(10000 U/mL)均购自美国Thermo Fisher SCIENTIFIC公司;SARS-CoV-2 Spike RBD-His Recombinant Protein购自北京义翘神州科技股份有限公司;BSA和TMB购自默克有限公司;Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP购自南京巴傲得生物科技有限公司;Goat Anti-Mouse IgG1-HRP和Goat Anti-Mouse IgG2a-HRP购自美国Southern Biotech公司;异氟烷购自瑞普生物药业有限公司。

1.4 主要仪器设备 酶标仪购自美国Thermo Fisher SCIENTIFIC公司;生物安全柜购自中国北京东联哈尔仪器制造有限公司;冷冻离心机购自大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;TGuide S96全自动核酸提取纯化仪购自天根生化科技(北京)有限公司;CFX96 Touch Deep Well实时PCR检测系统购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

2 方法

2.1 动物分组、免疫及血标本采集 将8~9周龄C57BL/6N雌性小鼠随机分为3组,Trim-RBD组、Trim-RBD-GEM组和mock组,每组各5只。分别于第0、21 d在生物安全柜中使用异氟烷对小鼠进行麻醉,Trim-RBD组、Trim-RBD-GEM组分别滴鼻免疫含有5 μg的Trim-RBD和Trim-RBD-GEM, mock组滴鼻等量PBS。在第7、14、21、28、35 d经颌下采血,分离血清,冷冻保存。为了进一步评估Trim-RBD-GEM滴鼻免疫小鼠后的攻毒保护效果,将8~9周龄C57BL/6N雌性小鼠随机分为2组,Trim-RBD-GEM组和mock组,每组各8只。

2.2 血清中SARS-CoV-2 RBD特异性抗体检测 采用间接ELISA方法检测免疫小鼠血清中SARS-CoV-2 RBD特异性IgG、IgG1和IgG2a抗体水平。SARS-CoV-2 RBD蛋白包被浓度为2 μg/mL,封闭液为1% BSA。待检血清用1% BSA从1:10开始作倍比稀释,HRP标记的IgG抗体用1% BSA作1:25000稀释,HRP标记的IgG1和IgG2a抗体作1:5000稀释。显色液为TMB,加入终止液终止显色后使用酶标仪读取各孔450 nm处吸光度值。试验设PBS对照和空白对照。

2.3 攻毒试验 在首次免疫后第35 d用C57MA14鼠适应株(50 LD₅₀/50 μL)对小鼠进行攻毒,连续14 d观察小鼠的体重变化和存活情况,计算存活率。小鼠体重下降25%以上判定为死亡,试验在生物安全三级实验室中进行。

2.4 攻毒小鼠组织病毒滴度检测 在攻毒后第3 d每组解剖3只小鼠,取鼻甲骨和肺组织,放入组织研磨机中加适量钢珠研磨400 s,4 ℃、17 000 r/min(离心

半径 86.77 mm)离心 10 min,收集上清液,用 DMEM 培养液作 10 倍倍比稀释。在光学显微镜下观察 Vero-E6 细胞的生长状态,接种至 96 孔细胞培养板中培养至 80%~90%汇合度,用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次。将 10 倍倍比稀释的组织液接种到 96 孔细胞中,培养板置 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中孵育 1 h,用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次;每孔加入 100 μL 完全培养基(10%FBS、1%Anti-Anti),继续培养 72 h,在光学显微镜下观察细胞病变情况,使用 Reed-Muench 法计算半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)。

2.5 攻毒小鼠组织病毒载量检测 另取小鼠肺组织和鼻甲骨研磨上清液,使用天根磁珠法总 RNA 提取试剂盒和 TGuide S96 全自动核酸提取纯化仪(YOSE-S96)提取 RNA。然后使用新型冠状病毒核酸检测试剂盒,利用 SARS-CoV-2 N 基因引物及探针进行实时荧光定量 PCR,检测病毒载量。

2.6 攻毒小鼠肺脏组织病理学检查和免疫组化检测

在攻毒后第 3d 取各组小鼠肺组织,用 4%多聚甲醛室温固定 3d 后石蜡包埋,然后依次放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中各 20 min,放入无水乙醇 I 和无水乙醇 II 各 5 min,再放入 75%酒精中,用自来水冲洗;将切片放入苏木素染液中染色 5 min,用自来水冲洗;将切片放入苏木素分化液中数秒,用自来水冲洗;将切片放入返蓝液中返蓝,自来水冲洗;将切片依次放入 85%酒精和 95%酒精中各 5 min,放入伊红染液中染色 5 min,再依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II 和无水乙醇 III 中各 5 min,放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中各 5 min 至切片变透明,使用中性树胶封片,于显微镜下采集图像。

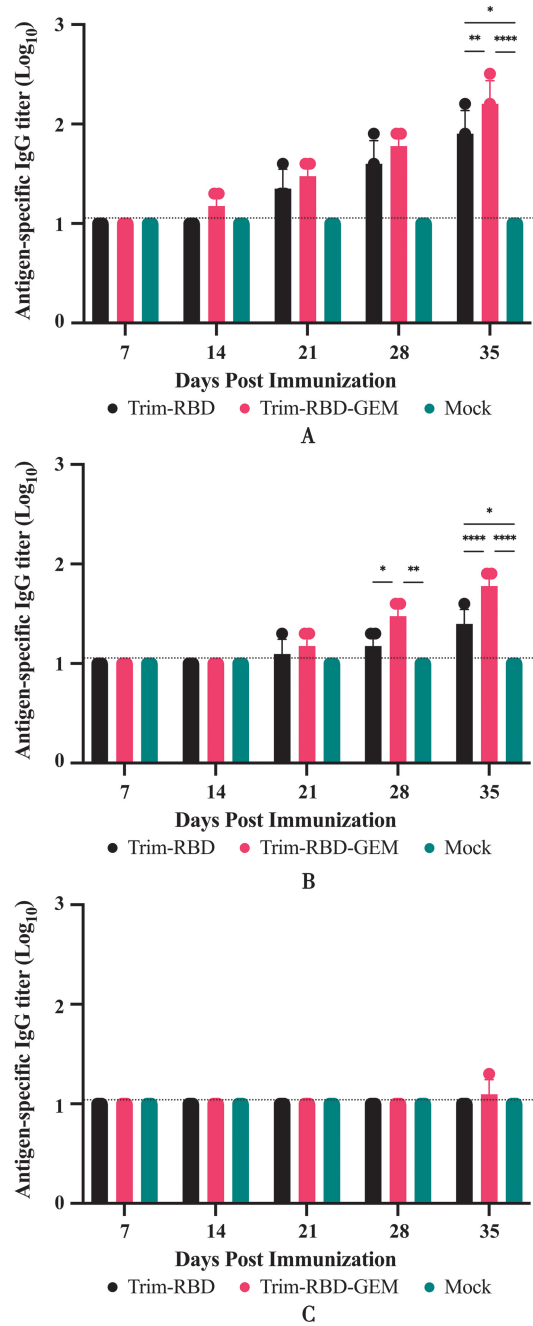
另将石蜡切片放入环保型脱蜡液 I、环保型脱蜡液 II 和环保型脱蜡液 III 中各 10 min,再放入无水乙醇 I、无水乙醇 II 和无水乙醇 III 中各 5 min,使用蒸馏水冲洗;将切片放入 3%双氧水中,避光孵育 20 min,用 pH7.4 的 PBS 冲洗 3 次;加入 3%BSA,室温封闭 30 min;加入一抗,4 °C 孵育过夜,PBS 冲洗 3 次;加入二抗,37 °C 孵育 30 min,冲洗;加入 DAB 显色,用蒸馏水冲洗终止显色反应;用苏木素染色 3 min,蒸馏水冲洗;加入苏木素分化液分化数秒,用蒸馏水冲洗;加入苏木素返蓝液返蓝,用蒸馏水冲洗;将切片脱水、封片,在显微镜下采集图像。

结果

1 血清 SARS-CoV-2 RBD 特异性抗体水平

间接 ELISA 检测结果见图 1, Trim-RBD-GEM 组和 Trim-RBD 组小鼠血清中特异性 IgG、IgG1 抗体水平均显著高于 mock 组, Trim-RBD-GEM 组小鼠血清中特异性 IgG 抗体水平极显著高于 Trim-RBD 组

($P < 0.05$)(图 1)。



注:组间比较,^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ 。

图 1 血清中 SARS-CoV-2 RBD 特异性抗体水平
Notes: Comparison between groups, ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ 。
Fig. 1 SARS-CoV-2 RBD specific antibody levels in serum

2 攻毒小鼠的体重变化及存活情况

攻毒后连续观察小鼠体重 14 d,计算的体重变化率见图 2。Mock 组小鼠体重变化率第 7 d 全部低于 75%; Trim-RBD-GEM 组小鼠攻毒后体重有所下降,至第 4 d 体重开始回升。

同时观察和记录各组小鼠死亡情况,计算存活率,结果如图 3。Mock 组小鼠攻毒后第 7d 全部死亡,存活率为 0; Trim-RBD-GEM 组小鼠均存活,存活率为 100%。

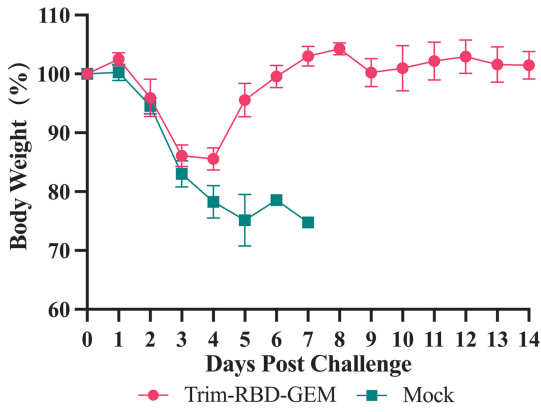


图 2 攻毒小鼠体重变化率(%)

Fig. 2 Changes in body weight of mice after challenge(%)

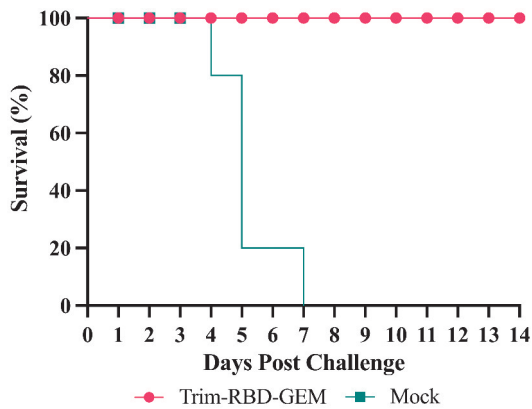
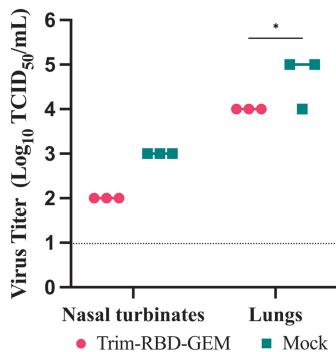


图 3 攻毒后小鼠存活率(%)

Fig. 3 Survival rate of mice after challenge(%)

3 攻毒小鼠肺脏等组织病毒滴度

攻毒后检测小鼠鼻甲骨和肺脏组织研磨上清中的病毒滴度(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀),结果如图4。滴鼻免疫组小鼠攻毒后鼻甲骨中病毒的TCID₅₀显著低于肺脏组织中病毒TCID₅₀, Trim-RBD-GEM组肺脏组织中的病毒TCID₅₀显著低于mock组($P < 0.05$)。



注:a组间比较, $P < 0.05$ 。

图 4 攻毒小鼠鼻甲骨和肺脏组织中病毒的TCID₅₀

Notes: Comparison between groups, $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Virus titer levels in nasal turbinate and lung tissue after attack

4 攻毒小鼠肺脏等组织病毒载量

攻毒后采用实时荧光定量PCR检测各组小鼠鼻甲骨和肺脏组织病毒载量,结果如图5。Trim-RBD-GEM组和mock组小鼠鼻甲骨和肺脏组织中病毒拷贝数差异无统计学意义($P > 0.05$)。

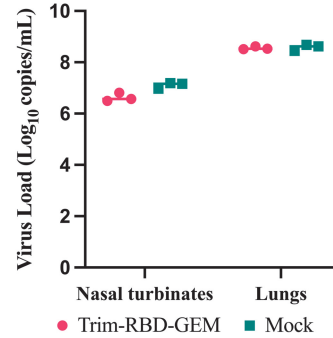


图 5 攻毒小鼠鼻甲骨和肺脏组织病毒载量

Fig. 5 Virus loads of nasal turbinate and lung tissue after challenge

5 攻毒小鼠肺脏病理变化

攻毒后第3d取小鼠肺脏进行组织病理学检查和免疫组化检测,结果如图6。Trim-RBD-GEM组小鼠肺脏切片中局部支气管管腔内可见少量巨噬细胞浸润, mock组小鼠肺脏切片中多处支气管管腔内可见坏死细胞碎片;免疫组化结果显示 mock组小鼠肺脏切片中检测到SARS-CoV-2的N蛋白。

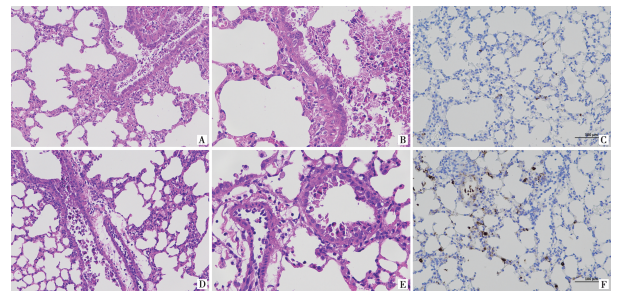


图 6 攻毒小鼠肺脏组织病理变化及免疫组化检测

Fig. 6 Pathological changes in the lungs after challenge

讨论

近三年来,全世界超过200个国家有COVID-19确诊病例,严重影响了世界经济的发展及人民的健康和生活,亟需通过加强疫苗接种来预防和减少疾病传播^[18]。免疫途径可能会影响疫苗对人体的保护效果,目前大部分COVID-19疫苗均为肌肉注射,主要产生IgG特异性反应,但缺乏粘膜免疫,无法全面预防和减少COVID-19的传播^[19]。

SARS-CoV-2主要通过呼吸道传播,血管紧张素转化酶2(Angiotensin converting enzyme 2, ACE-2)通过与人体细胞结合引发感染,而粘膜免疫是人体抵抗病原体入侵的第一防线。滴鼻免疫可诱导粘膜免

疫,产生特异性 IgA 抗体,并且滴鼻免疫无需使用注射针,不仅减少疼痛、降低成本,还为群体免疫提供了便利性^[7,20-21]。目前正在研制中的 SARS-CoV-2、流感病毒和腺病毒鼻内疫苗取得了重大进展,但进入临床试验的鼻内 COVID-19 疫苗公开的数据尚少,初步认为粘膜免疫的动物模型可以充分预防 SARS-CoV-2 的严重病症,ChAdOx1 nCoV-19 鼻内免疫小鼠中和抗体水平显著高于肌肉注射免疫,攻毒后病毒载量显著低于肌肉注射免疫,并且可预防仓鼠模型和非人灵长类动物模型感染 SARS-CoV-2 后的严重症状^[22-25]。

乳酸乳球菌虽主要应用于食品行业,但可表达同源和异源蛋白,作为载体系统在疫苗研究领域得到了应用,不仅生长条件简单,而且价格低廉^[26-28]。目前革兰阴性菌的表达系统有安全风险,细菌中的重组 DNA 释放到空气中有可能造成传播,而 GEM-PA 表面展示系统是以一种无生命、非重组的乳酸乳球菌作为载体,经过热酸处理后去除表面脂磷壁酸及细胞质内容物,不仅安全,而且能刺激机体产生免疫反应^[29]。GEM-PA 表面展示系统应用在动物模型中,通过粘膜免疫可提高全身及粘膜的免疫反应,并且更偏向于产生 Th1 型免疫反应,Th1 型免疫反应可促进机体释放炎症和抗病毒相关细胞因子,如 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 等^[9]。有研究表明乳酸乳球菌可促进小鼠的树突状细胞成熟并诱导产生 IL-10 和 IL-12 细胞因子,还可促进小鼠巨噬细胞促炎性因子的产生^[30]。

本研究用 SARS-CoV-2 细菌样颗粒 Trim-RBD-GEM 滴鼻免疫 C57BL/6N 小鼠后诱导产生了高水平的特异性抗体,进一步证明 GEM-PA 表面展示系统与抗原结合后,经粘膜免疫可提高机体的特异性免疫反应。而通过特异性 IgG 抗体检测结果可以看出 Trim-RBD-GEM 滴鼻免疫诱导产生的 IgG 抗体水平显著高于 Trim-RBD 免疫,表明 GEM 颗粒作为粘膜佐剂,显著提高了粘膜系统诱导免疫反应的能力,使免疫小鼠血清特异性 IgG 抗体水平显著升高^[17]。

研究表明 SARS-CoV-2 细菌样颗粒 Trim-RBD-GEM 作为一种 COVID-19 候选疫苗可以在小鼠模型试验中产生免疫反应和攻毒保护效果。同时,GEM 颗粒可在 2~8 °C 保存 2 年以上,为群体接种提供了便利。细菌样颗粒可作为一种重要的技术应对未来可能出现的病毒所造成的威胁^[9]。

【参考文献】

[1] Edison P. Brain connectivity:advancing the field of neuroscience in the Era of COVID-19[J]. Brain Connect,2021,11(1):1-2.
[2] Tian JH,Patel N,Haupt R,et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice[J]. Nat Commun,2021,12(1):372.

[3] WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape [J].
[4] Pollet J,Chen WH,Strych U. Recombinant protein vaccines,a proven approach against coronavirus pandemics[J]. Adv Drug Deliv Rev,2021,170:71-82.
[5] Lei H,Alu A,Yang J,et al. Intranasal administration of a recombinant RBD vaccine induces long-term immunity against Omicron-included SARS-CoV-2 variants[J]. Signal Transduct Target Ther,2022,7(1):159.
[6] Alu A,Chen L,Lei H,et al. Intranasal COVID-19 vaccines:From bench to bed[J]. EBioMed,2022,76:103841.
[7] van der Ley PA,Zariri A,van Riet E,et al. An intranasal OMV-Based vaccine induces high mucosal and systemic protecting immunity against a SARS-CoV-2 infection [J]. Front Immunol, 2021,12:781280.
[8] 张胜男. 裂谷热病毒 eGn 蛋白重组狂犬病病毒及细菌样颗粒免疫原构建与实验免疫研究[D]. 东北林业大学,2020.
[9] 李恩涛. MERS 疫苗免疫佐剂的筛选及细菌样颗粒疫苗的研究 [D]. 华南农业大学,2020.
[10] 金宏丽. 寨卡病毒基因重组狂犬病病毒和细菌样颗粒的制备与实验免疫研究[D]. 吉林大学,2022.
[11] Michon C,Langella P,Eijsink VG,et al. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria:strategies and applications[J]. Microb Cell Fact,2016,15:70.
[12] Li E,Chi H,Huang P,et al. A Novel bacterium-like particle vaccine displaying the MERS-CoV receptor-binding domain induces specific mucosal and systemic immune responses in mice[J]. Viruses. 2019;11(9):799.
[13] Buist G,Steen A,Kok J,et al. LysM,a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans[J]. Mol Microbiol, 2008,68(4):838-847.
[14] Raha AR,Varma NR,Yusoff K,et al. Cell surface display system for *Lactococcus lactis*:a novel development for oral vaccine [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2005,68(1):75-81.
[15] Li L,Qiao X,Chen J,et al. Surface-displayed porcine reproductive and respiratory syndrome virus from cellculture onto gram-positive enhancer matrix particles[J]. J Ind Microbiol Biotechnol,2018,45(10):889-898.
[16] Steen A,Buist G,Leenhouts KJ,et al. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain ishindered by cell wall constituents [J]. J Biol Chem,2003,278(26):23874-23881.
[17] Audouy SA,van Selm S,van Roosmalen ML,et al. Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines[J]. Vaccine, 2007, 25: 2497-2506.
[18] Wu Y,Huang X,Yuan L,et al. A recombinant spike protein subunit vaccine confers protective immunity againstSARS-CoV-2 infection and transmission in hamsters [J]. Sci Translat Med, 2021,13(606).
[19] Miteva D,Peshevska-Sekulovska M,Snegarova V,et al. Mucosal COVID-19 vaccines:Risks,benefits and control of the pandemic [J]. World J Virol,2022,11(5):221-236.
[20] Hoffmann M,Kleine-Weber H,Schroeder S,et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinicallyproven protease inhibitor [J]. Cell,2020,181(2):271-280.

- [5] 王中浩,张可依,丰姝,等. EB病毒潜伏性感染相关基因在其所致肿瘤中的作用机制[J]. 华西医学, 2021, 36(8): 1108-1114.
- [6] Luo X, Hong L, Cheng C, et al. DNMT1 mediates metabolic reprogramming induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and reversed by grifolin in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 619.
- [7] Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors[J]. J Clin Pathol, 2019, 72(10): 651-658.
- [8] Wang L, Ning S. New look of EBV LMP1 signaling landscape [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(21): 5451.
- [9] Wang LW, Jiang S, Gewurz BE. Epstein-Barr virus lmp1-mediated oncogenicity[J]. J Virol, 2017, 91(21): e01718-16.
- [10] Wakae K, Kondo S, Pham HT, et al. EBV-LMP1 induces APO-BEC3s and mitochondrial DNA hypermutation in nasopharyngeal cancer[J]. Cancer Med. 2020 Oct; 9(20): 7663-7671.
- [11] Geiger TR, Martin JM. The Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 oncoprotein negatively affects Tyk2 phosphorylation and interferon signaling in human B cells[J]. J Virol, 2006, 80(23): 11638-11650.
- [12] Zhu J, Kamara S, Cen D, et al. Generation of novel affibody molecules targeting the EBV LMP2A N-terminal domain with inhibiting effects on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 213.
- [13] Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W24-W29.
- [14] Bentz GL, Whitehurst CB, Pagano JS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9[J]. J Virol, 2011, 85(19): 10144-10153.
- [15] Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, et al. BS69 negatively regulates the canonical NF- κ B activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1[J]. FEBS Lett, 2009, 583(10): 1567-1574.
- [16] Schneider F, Neugebauer J, Griese J, et al. The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity[J]. PLoS Biol, 2008, 6(1): e8.
- [17] Shkoda A, Town JA, Griese J, et al. The germinal center kinase TNK1 is required for canonical NF- κ B and JNK signaling in B-cells by the EBV oncoprotein LMP1 and the CD40 receptor[J]. PLoS Biol, 2012, 10(8): e1001376.
- [18] Song YJ, Izumi KM, Shinnars NP, et al. IRF7 activation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 requires localization at activation sites and TRAF6, but not TRAF2 or TRAF3[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(47): 18448-18453.
- [19] Gauthier J, Vincent AT, Charette SJ, et al. A brief history of bioinformatics[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(6): 1981-1996.
- [20] Van Sciver N, Ohashi M, Pauly NP, et al. Hippo signaling effectors YAP and TAZ induce Epstein-Barr Virus (EBV) lytic reactivation through TEADs in epithelial cells[J]. PLoS Pathog, 2021, 17(8): e1009783.
- [21] Zhang N, Zuo Y, Jiang L, et al. Epstein-Barr Virus and Neurological Diseases[J]. Front Mol Biosci. 2022 Jan 10; 8: 816098.
- [22] Liu L, Yang J, Ji W, et al. Curcumin inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-associated human nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting EBV nuclear antigen 1 expression[J]. Biomed Res Int, 2019(2019): 8592921.
- [23] Lee CR, Park YH, Min H, et al. Determination of protein phosphorylation by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. J Microbiol, 2019, 57(2): 93-100.
- [24] Singh V, Ram M, Kumar R, et al. Phosphorylation: Implications in Cancer[J]. Protein J, 2017 Feb; 36(1): 1-6.
- [25] Wan J, Zhang W, Wu L, et al. BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(2): 448-56.
- [26] Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(1): 193-209.
- 【收稿日期】 2023-01-16 【修回日期】 2023-03-30
-
- (上接 749 页)
- [21] Lukassen S, Chua R L, Trefzer T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells[J]. Embo J, 2020, 39(10): e105114.
- [22] van Doremalen N, Purushotham JN, Schulz JE, et al. Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models[J]. Sci Translat Med, 2021; 13(607): eabh0755.
- [23] Ku MW, Bourguin M, Authie P, et al. Intranasal vaccination with a lentiviral vector protects against SARS-CoV-2 in preclinical animal models[J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(2): 236-249.
- [24] Hassan AO, Kafai NM, Dmitriev IP, et al. A single-dose intranasal chAd vaccine protects upper and lower respiratory tract against SARS-CoV-2[J]. Cell, 2020, 183(1): 169-184.
- [25] Madhavan M, Ritchie AJ, Aboagye J, et al. Tolerability and immunogenicity of an intranasally-administered adenovirus-vectored COVID-19 vaccine: An open-label partially-randomised ascending dose phase I trial[J]. EBioMed, 2022, 85: 104298.
- [26] Frelet-Barrand A. *Lactococcus lactis*, an attractive cell factory for the expression of functional membrane proteins[J]. Biomolecules, 2022; 12(2): 180.
- [27] Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D, et al. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2008, 14(1-3): 48-58.
- [28] Song AA, In L, Lim S, et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 55.
- [29] Bosma T, Kanninga R, Neef J, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 880-889.
- [30] Yam KK, Pouliot P, N'Diaye MM, et al. Innate inflammatory responses to the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis* [J]. Vaccine, 2008, 26(22): 2689-2699.
- 【收稿日期】 2023-01-31 【修回日期】 2023-04-20