

· 导 读 ·

本期主要选择益生菌活载体疫苗、肌肉因子和肌肉特异性启动子、纳米抗体及纳米颗粒疫苗、动物病毒致病机理及免疫机理等方面的文章进行重点推介。

朱瑞良 《生物工程学报》编委

(山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安 271018)

益生菌活载体疫苗的构建成功 将会给传染病及癌症的预防 和治疗带来革命性的进展

益生菌是指对宿主健康产生有益作用的活的微生物,通过调节宿主黏膜与系统免疫功能或通过调节肠道内菌群平衡,促进营养吸收保持肠道健康的单微生物或组成明确的混合微生物。目前常用的益生菌主要有乳酸菌、酵母菌和芽孢菌等。自从 1857 年法国微生物学家巴斯德从变酸的牛奶中发现乳酸菌以来,揭开了益生菌研究的序幕,对益生菌的研究更加深入,充分认识了益生菌的特点、功能和作用。2002 年,微生物学教授 Savage 宣布把正常菌群列为人体的第十大系统——微生态系统^[1]。益生菌可刺激肠道产生分泌性球蛋白 A (Secretory Immunoglobulin A, SIgA),保护机体健康。另外,益生菌还是非常好的基因工程活载体。益生菌作为载体具有公认的安全性,并且能够被机体较好地吸收和利用;益生菌蛋白表达技术的成熟使得它们可以作为蛋白质、抗原或抗体的释放载体;通过基因工程技术,益生菌可以被改造为表达和递送病原微生物抗原或者肿瘤新抗原的疫苗平台,

提高抗原呈递效率,减少系统性副作用。益生菌作为载体菌在疫苗开发、疾病预防和治疗等方面具有巨大的潜力。

针对将益生菌作为病原微生物抗原疫苗平台,国内外学者开展了多种细菌、病毒及其他微生物的口服益生菌基因工程疫苗研究,取得了突出成绩。枯草芽孢杆菌作为益生菌广泛用于养殖业,可以通过基因整合的方式构建重组菌株,在芽孢及菌体表面表达抗原分子。枯草芽孢杆菌的芽孢具有独特的抗逆性,是内生性的,形成过程中不需要穿过细胞膜,有利于表达外源抗原分子的正确折叠,由于其表面有 CotC、CotB 等多个锚定蛋白,每个锚定蛋白可以融合表达几千个抗原分子,现广泛用于构建口服活载体疫苗。程中林等以益生性枯草芽孢杆菌 KC 菌株为载体,成功构建了表达红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 蛋白的口服重组枯草芽孢杆菌活载体疫苗,为猪丹毒口服活载体疫苗的研究奠定了基础^[2]。这种疫苗口服免疫后既能诱导机体产生特异性免疫应答,又具有益生菌的作用。该研究成果也为其他口服益生菌活载体疫苗的研究提供了借鉴。

益生菌原本以其对肠道健康的有益作用而

被人们所熟知，但现在它正以一种全新的方式参与到癌症的“斗争”中，为癌症患者带来了新的希望。通过合成生物学技术，将益生菌转变为一种递送肿瘤新抗原的疫苗载体，并利用益生菌天然的免疫刺激特性及其在体内自然靶向肿瘤的趋势。这些设计策略为发展高效且特异的癌症免疫疗法提供了新路径和新策略。针对将益生菌作为肿瘤新抗原的疫苗平台，国内外学者开展了深入研究。2024年10月，哥伦比亚大学的研究团队使用益生菌纳瑟尔氏大肠杆菌(*Escherichia coli*) Nissle 1917作为载体，精准传递肿瘤新抗原，成功地将益生菌改造成个性化癌症疫苗^[3]。这项研究具有重要意义，探讨了一种全新的益生菌疫苗平台。刘玉梅等也以EcN为载体，利用噬菌体整合技术将5-氨基乙酞丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)合成的关键基因 *hemAM*、*hemL* 单拷贝整合至 EcN 基因组，然后利用化学诱导染色体进化(chemically inducible chromosomal evolution, CICHE)的方法提高 *hemAM*、*hemL* 拷贝数，进而促进 5-ALA 的稳定合成；通过体外细胞实验初步验证 EcN 工程菌能将稳定合成的 5-ALA 递送至肿瘤细胞并抑制其生长，为 EcN 工程菌应用于肿瘤光动力治疗提供了理论基础^[4]。该项研究为益生菌癌症疫苗的成功奠定了基础。益生菌癌症疫苗具有较突出的优势：可以根据癌症患者的肿瘤新抗原提供更有针对性的个性化治疗方案，具有多靶点治疗的潜力以及相对较低的毒副作用，有望提高癌症治疗的精准性和有效性。益生菌癌症疫苗有望成为癌症预防和治疗的重要手段之一，为广大癌症患者带来了新的生机与希望。

肌肉因子和肌肉特异性启动子的研究

骨骼肌是机体的重要组成成分，在机体生长发育、代谢、运动等方面具有重要作用。肌纤维是骨骼肌的基本组成单位，不同类型肌纤维的代谢模式和生理特征不同，并受遗传、环境、营养和生理状态等多种因素的影响而发生相互转化，肌纤维类型在机体中所占比例与家畜肉质及人类神经肌肉疾病密切相关。肌肉因子是指由骨骼肌分泌的蛋白或多肽等细胞因子，对骨骼肌纤维类型转化具有重要作用，主要通过自分泌和旁分泌的形式作用于骨骼肌，参与骨骼肌内信号传导，调控肌纤维类型转化。骨骼肌纤维类型转化是极其复杂且重要的生理过程，深刻影响骨骼肌肌肉功能和代谢水平，不仅受外界环境变化的影响，还受内在生理机制的调控。探究肌纤维类型转化的生理过程对于治疗人类神经肌肉疾病以及提高家畜肉质具有重要意义。黄博宇等^[5]对不同骨骼肌纤维类型的功能差异以及不同肌肉因子调控肌纤维类型转化的作用和机制进行了综述，并对肌肉因子的未来研究方向进行展望，为改善家畜肉质及治疗骨骼肌相关疾病提供了理论依据。

随着合成生物学的快速发展，合成的功能元件在基因工程代谢领域表现出较大的应用潜力。启动子是基因表达过程中控制转录水平的重要元件，为显著提升基因表达量，可通过人工合成启动子文库对基因工程的代谢途径进行精细调控，使代谢途径最优化。启动子作为基因表达载体的重要组成元件之一，在提高外源基因表达效率方面发挥着重要作用，在基因工程领域的开发和利用上具有重要的研究意义。

因此,对启动子结构和功能的深入研究是相当重要的,一方面能更利于阐明基因转录模式和调控机制,另一方面有助于对外源基因的表达进行合理调控。王泽宁等^[6]首次构建成功了合成肌肉特异性启动子库,验证了部分启动子的肌肉特异性,并对启动子元件组成与启动子活性进行相关性分析,有利于进一步阐述不同来源启动子元件含量高低对启动子活性的影响,为合成新型高效启动子提供了理论基础,为基因治疗中靶基因在肌肉组织的高效特异性表达提供了更有效的方案。

纳米技术促进了纳米抗体及纳米颗粒疫苗的研究

纳米技术(nanotechnology)是研究结构尺寸在 1 nm 至 100 nm 范围内材料的性质和应用的一种技术,是用单个原子、分子制造物质的科学技术。从迄今为止的研究来看,关于纳米技术分为 3 种不同层次的概念:第一种是分子纳米技术;第二种是微加工技术极限的纳米技术;第三种是从生物角度出发提出的纳米技术。本来生物在细胞和生物膜内就存在纳米级的结构,DNA 分子计算机、细胞生物计算机的开发,成为纳米生物技术的重要内容。近些年越来越多的科学家致力于纳米材料的相关研究,并在制备、性质和应用方面都取得了丰硕的研究成果。纳米抗体(nanobodies, Nbs)是在骆驼科动物和鲨鱼中发现的一种独特的单域抗体,即重链抗体可变区具有很强的抗原靶向性和结合能力,规避了传统抗体体积大、稳定性低、免疫原性高以及清除速度慢的缺点。抗原特异性 Nbs 的鉴定高度依赖于 Nbs 文库的构建,目前应用最广泛的仍然是通过动物免疫建立的免疫

纳米抗体库,但这种方法需要针对不同的抗原建立不同的免疫文库,同时天然纳米抗体库缺乏体细胞成熟过程,而合成纳米抗体库避免了免疫动物以及血液样本的采集,通过分子克隆的方式便可以获得高亲和力的 Nbs,这种方法为 Nbs 的建库提供了新的途径。随着生物与技术的快速发展,特异性 Nbs 的筛选技术逐渐得到完善,将筛选技术与高通量测序以及细胞分选技术相结合,极大地提高了筛选高亲和力 Nbs 的效率,使其在人与动物疾病诊断和治疗方面展现出潜在的应用价值。董新莹等^[7]综述了 Nbs 的结构特性,Nbs 库的构建、筛选以及亲和力成熟策略,概述了 Nbs 在诊断和治疗中的应用现状,Nbs 也已成为兽医领域的研究热点,有望为动物疫病的治疗和诊断试剂研发提供新的解决方案。

基因工程亚单位疫苗是包含病原体的一种或多种抗原成分的疫苗,免疫原性通常低于病毒全组分疫苗,需要借助佐剂或纳米载体来增强疫苗的免疫效果。由于纳米尺寸的抗原与病毒粒子大小接近,更容易被巨噬细胞和树突状细胞捕获,所以抗原递呈细胞对纳米颗粒抗原识别和提呈效率更高。因此,将抗原正确地展示在纳米材料表面,可以提高或改善抗原的免疫原性,纳米颗粒疫苗也是当前新型疫苗研发的主要方向之一。铁蛋白纳米颗粒具有高度的稳定性、良好的生物相容性和独特的自组装能力,是一种理想的抗原递呈和疫苗开发平台。张越等^[8]利用铁蛋白制备携带非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的纳米颗粒抗原,并对其免疫原性进行评价,为非洲猪瘟纳米颗粒疫苗的开发奠定了基础。

用于基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体。病毒载体虽然转染效率高,但制备

过程复杂、成本较高,且具有免疫原性以及致癌性等安全隐患。非病毒载体具有生物安全性高、结构稳定以及易获取等特点。因此非病毒载体成为当前的研究热点。非病毒载体主要包括脂质纳米颗粒、阳离子聚合物和无机纳米颗粒等。脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)是由脂质双分子层形成的具有双层膜结构的中空囊泡,修饰脂质纳米颗粒后表现出良好的生物相容性,而且还具有靶向目标器官和低毒性等优势,可以包裹脂溶性或者水溶性药物,是一种新型的给药系统,具有在临床治疗中发挥重要作用的潜力。麻玉清等^[9]综述了多糖修饰脂质纳米颗粒的制备及应用,为进一步研究与开发新型脂质纳米颗粒提供了参考。

动物病毒致病机理及免疫机理的研究

病毒的致病过程主要是在侵入机体的细胞内增殖,导致细胞破坏或诱发免疫应答,使机体出现病理反应。病毒进入宿主细胞使细胞代谢紊乱,最终溶解死亡;引起宿主细胞发生改变,包括引起宿主细胞膜出现新的抗原,引起宿主细胞膜通透性改变等;病毒自身核酸与宿主细胞核酸整合过程中引起细胞癌变等。病毒感染宿主细胞后,机体免疫系统发生病理性免疫应答,导致组织细胞的损伤;有些病毒细胞甚至直接杀死免疫细胞,如 HIV 病毒侵犯巨噬细胞和 T 淋巴细胞。抗病毒免疫是机体针对病毒的免疫,包含细胞免疫、体液免疫等机体免疫模式,它们在抗病毒感染中各有特定作用。病毒进入机体后,能刺激机体的巨噬细胞、淋巴细胞以及体细胞产生干扰素。干扰素具有广谱抗病毒作用,能诱生抗病毒白蛋白来阻断新

病毒的产生,故有阻止病毒增殖和扩散作用。

病毒复制过程改变了宿主细胞的代谢过程,包括糖酵解、脂肪酸合成和谷氨酰胺分解,不同的病毒诱导宿主细胞代谢途径有差异,葡萄糖作为细胞供能和大分子物质合成重要碳源,在细胞代谢重构中的作用重大。目前研究发现宿主细胞糖代谢改变在病毒复制过程中起重要作用,如新型冠状病毒、塞内卡病毒 A、鸡新城疫病毒诱导糖酵解过程升高都会促进病毒复制。段滇宁等^[10]探究了糖酵解在猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)复制过程中的作用,揭示了糖酵解促进 PRRSV 复制,在 PRRSV 感染过程中起重要作用,发现了一种潜在的新的抗 PRRSV 方法;进一步揭示了 PRRSV 感染增殖的机制,为探索糖酵解在 PRRSV 复制过程中的功能提供了重要信息。

RNA 高通量测序技术已经广泛应用于生物学研究领域,其中转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)技术可以从单个转录组获得数百万个核苷酸序列,是研究 RNA 功能的重要手段。郑紫萱等^[11]将灭活纯化的口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)与塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA)抗原免疫 C57BL/6 小鼠,采用流式细胞染色分析免疫后小鼠脾脏淋巴细胞中 Th1 与 Th2 细胞比例差异,对免疫后小鼠与猪脾脏进行转录组测序,探究了 C57BL/6 小鼠免疫与 2 种病原的免疫应答差异,为进一步研究 FMDV 和 SVA 免疫应答机制奠定了重要的分子基础,为解析体液免疫与细胞免疫的协同机制提供了思路。

细胞中各种基本功能的发挥主要通过蛋白间相互作用完成,随着蛋白互作研究的深入,

研究方法也日趋成熟,常用的有酵母双杂交技术、免疫共沉淀技术、pull-down 技术等。冠状病毒的发病与病毒和宿主蛋白之间存在复杂而广泛的相互作用有关,病毒和宿主蛋白间的相互作用可以帮助预防及控制由病原体引起的疾病。为了筛选和鉴定与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)非结构蛋白 15 (Nsp15)互作的关键宿主蛋白,孙金磊等^[12]鉴定了 Nsp15 的互作蛋白,初步研究了 PEDV Nsp15 及其互作蛋白 SLC25a3 的功能,对于揭示病毒的致病分子机理、进行抗病毒药物的研发具有重要的意义,为预防猪流行性腹泻病毒和抗病毒药物的研发提供了新的思路。

天然免疫系统是机体抗病毒免疫应答的重要防线,对于病毒性传染病的防控,疫苗仍然是最有效的手段。目前,使用改良活病毒疫苗或灭活疫苗进行疫苗接种是控制蓝舌病病毒(bluetongue virus, BTV)传播和预防重症的最有效方法。此外,加强对 BTV 发病机制、感染与宿主细胞抗病毒免疫应答、快速便捷特异的检测方法及其新型疫苗研发等方面的深入研究,对我国 BTV 防控具有重要意义。李其沙等^[13]针对 BTV 侵染及其编码蛋白拮抗宿主 IFN 免疫应答反应的调控机制进行综述,介绍了 BTV 结构及其细胞侵入,BTV 侵染与宿主细胞抗 BTV 免疫应答,BTV 非结构蛋白 NS3、NS4 及结构蛋白 VP3、VP4 等拮抗宿主细胞天然免疫应答机制,为深入了解 BTV 拮抗宿主细胞 IFN 免疫应答的分子机制及研究 BTV 致病机制和新型疫苗提供了参考。

21 世纪以来,冠状病毒引发了多种类型的传染病,特别是新冠疫情的暴发,使得感染人类的冠状病毒更加受到科研人员的重视。然而,

对动物冠状病毒的研究仍然较少。截至目前,仍然缺少有效的疫苗和抗病毒药物对猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)进行防治。非结构蛋白 NSP13 是冠状病毒编码的一种解旋酶,不同冠状病毒的 NSP13 在序列上高度保守。NSP13 是调控病毒复制的关键蛋白,被视为研发广谱抗冠状病毒药物的理想靶点,筛选能够靶向 NSP13 从而抑制病毒复制的小分子化合物或天然提取物成为药物研发的重要策略。陶丽寒等^[14]获得了重组表达的 PDCoV NSP13 蛋白,并对其解旋酶活性进行了初步探究,为进一步深入揭示 NSP13 调控 PDCoV 病毒复制的作用机制,研发以 NSP13 为靶点的抗冠状病毒药物提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] DEHAL P, SATOU Y, CAMPBELL RK, CHAPMAN J, DEGNAN B, DE TOMASO A, DAVIDSON B, DI GREGORIO A, GELPKKE M, GOODSTEIN DM, et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins[J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2157-2167.
- [2] 程中林, 黄浩, 曹思艺, 石华辉, 高继业, 李继祥. 表达红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 蛋白的重组枯草芽孢杆菌的构建及其在小鼠上的免疫原性评价[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(12): 4521-4532.
CHENG ZL, HUANG H, CAO SY, SHI HH, GAO JY, LI JX. Construction of a recombinant *Bacillus subtilis* strain expressing SpaA and CbpB of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and evaluation of the strain immunogenicity in a mouse model[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(12): 4521-4532 (in Chinese).
- [3] REDENTI A, IM J, REDENTI B, LI FD, ROUANNE M, SHENG ZR, SUN W, GURBATRI CR, HUANG SY, KOMARANCHATH M, et al. Probiotic neoantigen delivery vectors for precision cancer immunotherapy[J]. *Nature*, 2024, 635(8038): 453-461.
- [4] 刘玉梅, 张庆利, 邵丽军, 柳晓婧, 于晓丽. 化学诱导大肠杆菌 Nissle 1917 染色体进化及其应用[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(12): 4594-4604.

- LIU YM, ZHANG QL, SHAO LJ, LIU XJ, YU XL. Establishment and application of chemically inducible chromosomal evolution in *Escherichia coli* Nissle 1917[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4594-4604 (in Chinese).
- [5] 黄博宇, 张孜怡, 庞卫军. 肌肉因子对骨骼肌纤维类型转化的作用及机制研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4365-4381.
- HUANG BY, ZHANG ZY, PANG WJ. Progress and prospects of the effects and mechanisms of myokines in regulating fiber type transition of skeletal muscle[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4365-4381 (in Chinese).
- [6] 王泽宁, 江明锋, 道杰日庆, 曲久, 李小伟, 旦巴次仁, 刘益丽. 肌肉特异性合成启动子文库构建及其高活性启动子元件组成与活性的关联性分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4616-4627.
- WANG ZN, JIANG MF, Daojierqing, QU J, LI XW, Danbaciren, LIU YL. Construction of a muscle-specific synthetic promoter library and correlation analysis of the element composition and activity of highly active promoters[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4616-4627 (in Chinese).
- [7] 董新莹, 高晓薇, 宋浩, 仇华吉, 罗玉子. 纳米抗体的研究进展及其应用现状[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4324-4338.
- DONG XY, GAO XW, SONG H, QIU HJ, LUO YZ. Research progress and application of nanobodies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4324-4338 (in Chinese).
- [8] 张越, 茹毅, 郝荣增, 杨洋, 赵陇和, 李亚军, 杨锐, 卢炳州, 郑海学. 偶联非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒制备及免疫原性评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4509-4520.
- ZHANG Y, RU Y, HAO RZ, YANG Y, ZHAO LH, LI YJ, YANG R, LU BZ, ZHENG HX. Preparation and immunogenicity evaluation of ferritin nanoparticles conjugated with African swine fever virus p30 protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4509-4520 (in Chinese).
- [9] 麻玉清, 柳海云, 王晓强, 孙世琪, 郭慧琛. 多糖修饰脂质纳米颗粒递药系统的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4339-4350.
- MA YQ, LIU HY, WANG XQ, SUN SQ, GUO HC. Research progress in polysaccharide-modified lipid nanoparticles for drug delivery[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4339-4350 (in Chinese).
- [10] 段滇宁, 李雅楠, 梁燕娇, 黄诗婷, 刘建奎, 邱龙新, 陈洪博. 猪繁殖与呼吸综合征病毒诱导巨噬细胞糖酵解促进病毒复制[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4546-4556.
- DUAN DN, LI YN, LIANG YJ, HUANG ST, LIU JK, QIU LX, CHEN HB. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection induces glycolysis of macrophages to facilitate viral replication[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4546-4556 (in Chinese).
- [11] 郑紫萱, 马雪青, 李坤, 孙普, 黄书伦, 董开恒, 赵琼琼, 卢曾军, 钱平. 口蹄疫病毒与塞内卡病毒灭活抗原免疫小鼠脾脏的转录组学差异分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4493-4508.
- ZHENG ZX, MA XQ, LI K, SUN P, HUANG SL, DONG KH, ZHAO QQ, LU ZJ, QIAN P. Transcriptomic differences between the spleens of mice immunized with inactivated antigens of foot-and-mouth disease virus and Senecavirus A[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4493-4508 (in Chinese).
- [12] 孙金磊, 于瑞明, 张莉萍, 张中旺, 王永录, 潘丽, 张全伟, 刘新生. 猪流行性腹泻病毒非结构蛋白 Nsp15 互作宿主蛋白的筛选及鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4533-4545.
- SUN JL, YU RM, ZHANG LP, ZHANG ZW, WANG YL, PAN L, ZHANG QW, LIU XS. Screening and identification of host proteins interacting with the non-structural protein 15 (Nsp15) of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4533-4545 (in Chinese).
- [13] 李其沙, 蔡旭研, 罗世美, 陈韵伊, 易华山, 马鲜平. 蓝舌病病毒抗宿主干扰素免疫应答机制研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4439-4451.
- LI QS, CAI XY, LUO SM, CHEN YY, YI HS, MA XP. Advances in the anti-host interferon immune response of bluetongue virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4439-4451 (in Chinese).
- [14] 陶丽寒, 吴诚诚, 林翠, 康昭风, 黄建珍. 猪德尔塔冠状病毒 NSP13 蛋白原核表达与解旋活性分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4573-4585.
- TAO LH, WU CC, LIN C, KANG ZF, HUANG JZ. Prokaryotic expression and helicase activity analysis of PDCoV NSP13[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4573-4585 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)