

· 基础研究 ·

干扰素受体 1 沉默的人二倍体 MRC-5 细胞系对水痘-带状疱疹病毒复制的影响

杨骁^{1△}, 姜承瀚^{2△}, 孙博¹, 谷铁军¹, 万明明¹, 孙捷¹, 丁雪¹,
王岑嵘¹, 周恩同¹, 姜皓³, 苏维恒¹

1. 吉林大学生命科学学院艾滋病疫苗国家工程实验室, 吉林 长春 130012;
2. 延边大学农学院园艺园林系, 吉林 延边朝鲜族自治州 133002;
3. 吉林大学中日联谊医院手术室, 吉林 长春 130033

摘要: 目的 通过优化人二倍体细胞系 MRC-5 降低其干扰素(interferon, IFN)相关基因表达水平, 以提高水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)在该细胞系中的复制水平, 并提高 VZV 疫苗产量。方法 通过 CRISPR / Cas9 基因编辑技术, 构建 IFN 受体 1(interferon receptor 1, *IFNAR1*) 沉默的 MRC-5 细胞系(MRC-5^{*IFNAR1*-})。采用 qRT-PCR 法检测 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系 *IFNAR1* mRNA 相对表达量, 同时检测 VZV 感染后 IFN 相关基因 *IFNβ* 和 *OAS1* mRNA 相对表达量, 评价基因沉默效果。通过沉默位点的基因测序进一步鉴定基因突变序列。采用 qRT-PCR 法和空斑形成单位(plaque formation unit, PFU) 试验, 对比 VZV 感染后 168 h 病毒在 MRC-5 和 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系中的复制情况, 评价 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系对 VZV 复制的影响。结果 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系生长状态与 MRC-5 细胞一致, *IFNAR1* mRNA 相对表达量降低 73%; VZV 感染后 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系中 IFN 相关基因 *IFNβ* 和 *OAS1* mRNA 相对表达量比 MRC-5 细胞分别降低了 61% 和 90%; VZV 感染后 168 h, 病毒 DNA 复制水平增加 5.7 倍, 病毒滴度增加 4 倍。结论 成功建立了 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系, 可作为增加基于人二倍体细胞疫苗产量的潜在方案, 为扩大 VZV 疫苗生产提供了参考。

关键词: 水痘-带状疱疹病毒; 人二倍体 MRC-5 细胞; 干扰素应答; 基因沉默

中图分类号: R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0021-06

Effect of interferon receptor 1 silenced human diploid MRC-5 cell line on replication of varicella-zoster virus

YANG Xiao^{*}, JIANG Cheng-han, SUN Bo, GU Tie-jun, WAN Ming-ming, SUN Jie, DING Xue,
WANG Cen-rong, ZHOU En-tong, JIANG Hao, SU Wei-heng

^{*}National Engineering Laboratory for AIDS Vaccine, College of Life Science,
Jilin University, Changchun 130012, Jilin Province, China

Corresponding author: JIANG Hao, E-mail: 1146842152@qq.com;

SU Wei-heng, E-mail: suweiheng@jlu.edu.cn

Abstract: Objective To improve the replication level of varicella-zoster virus (VZV) in human diploid cell line MRC-5 and increase the yield of VZV vaccine by reducing the expression of interferon (IFN) related genes via optimizing the cell line MRC-5. **Methods** Interferon receptor 1 (*IFNAR1*) silenced MRC-5 cell line (MRC-5^{*IFNAR1*-}) was constructed by CRISPR / Cas9 gene editing technology, which was determined for the relative expression of *IFNAR1* mRNA, and for those of mRNA of IFN related genes *IFNβ* and *OAS1* after VZV infection by qRT-PCR to evaluate the effect of gene silencing. Gene mutation sequences were further identified by sequencing of the silenced sites. The replication of VZV in MRC-5 and MRC-5^{*IFNAR1*-} cell lines was compared 168 h after VZV infection by using qRT-PCR and plaque formation unit (PFU) assay, to evaluate the effect of MRC-5^{*IFNAR1*-} cell line on VZV replication. **Results** The growth status of MRC-5^{*IFNAR1*-} cell line was

基金项目: 国家自然科学基金(32170944, 32070932, 31770184); 吉林省科技发展计划基金(20220402044GH); 内蒙古自治区科技攻关计划(2020GG0233).

通信作者: 姜皓, E-mail: 1146842152@qq.com; 苏维恒, E-mail: suweiheng@jlu.edu.cn

△: 共享第一作者

consistent with that of MRC-5 cells, and the relative expression of *IFNAR1* mRNA decreased by 73%; The relative expressions of *IFN β* and *OAS1* mRNA in MRC-5^{*IFNAR1*-} cell line were 61% and 90% lower than those in MRC-5 cells respectively after VZV infection; In addition, 168 h after VZV infection, the level of DNA replication and the titer of VZV increased by 5.7 folds and 4 folds respectively. **Conclusion** The successful establishment of MRC-5^{*IFNAR1*-} cell line may be a potential scheme to increase the yield of vaccines based on human diploid cells, and provided a reference for expanding production of VZV vaccine.

Keywords: Varicella-zoster virus (VZV); Human diploid MRC-5 cell; IFN response; Gene silencing

水痘和带状疱疹是全球范围内广泛流行的两种疾病,均由水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)引起^[1]。VZV 是一种双链 DNA 病毒,该病毒在人群中通过接触飞沫感染,通常初次感染于儿童时期,临床表现为水痘。水痘患者痊愈后,病毒会潜伏于患者神经节中,并有一定几率重新激活,导致带状疱疹。该疾病会导致不同程度的疱疹后神经痛,并且可能引起较为严重的并发症,甚至导致死亡^[2]。

疫苗是防控 VZV 的最好手段之一。自 20 世纪 60 年代以来,基于细胞培养的疫苗逐渐成为病毒性疫苗的主要生产方式。可用于疫苗生产的细胞系包括原代细胞系(地鼠肾细胞、鸡胚细胞)、二倍体细胞系(人二倍体细胞、猴二倍体细胞)、传代细胞系(Vero 细胞等)。目前常见的 VZV 疫苗包括美国 Merck 公司的 Varivax 和 Zostavax 以及英国 GSK 的 Varilrix 等^[3]。基于人二倍体细胞的生产模式,在安全性上优势明显,特别在去除疫苗中宿主细胞的 DNA 污染上^[4-5]。如 1995 年批准上市的针对水痘的减毒活疫苗 Varivax (Merck) 和 2006 年批准上市的针对带状疱疹的减毒活疫苗 Zostavax (Merck) 均使用人二倍体细胞生产^[6-7]。但人二倍体细胞培养技术难度较大,疫苗产量低,生产成本较高,造成疫苗价格昂贵,在发展中国家发展缓慢难以普及^[8-9]。面对人二倍体细胞在疫苗生产中的困境,一些病毒疫苗选择使用非洲绿猴肾 Vero 细胞生产,虽然增加了疫苗因非人 DNA 污染带来的安全隐患,但大幅提高了疫苗产量。如狂犬病病毒在 Vero 细胞中的复制水平较人二倍体细胞 MRC-5 高 10 倍左右^[10]; 流感病毒在 Vero 细胞中的复制水平也显著高于人二倍体细胞^[11]。但对于 VZV, 由于 Vero 细胞 VZV 受体的缺失,无法使用 Vero 细胞提高其疫苗产量,人二倍体细胞成为重要的 VZV 减毒活疫苗生产细胞系。因此,探索病毒在人二倍体细胞中复制水平低的原因,寻找合适的方法提高病毒在人二倍体细胞中的复制水平,增加疫苗尤其是 VZV 减毒活疫苗产量,成为急需解决的问题。

1957 年,科学家发现了一个非常重要的细胞因子——干扰素(interferon, IFN),不仅具有直接抗病

毒作用,还具有免疫增强作用^[12-14]。IFN 应答作为重要的先天免疫途径,主要通过识别病毒的特定特征而被激活,最终产生抗病毒因子,达到清除病毒的目的。病毒进入机体后,其不同于宿主的特点如双链 RNA、三磷酸末端的 RNA、逆转录 RNA 和 CpG 被特定模式识别受体识别,激活 IFN α / β 表达^[15]。IFN α / β 分泌并被周边细胞的 IFN 受体识别,激活细胞内部的 IFN 信号传导,最终诱导产生如蛋白激酶 RNA (protein kinase RNA, PKR)、2', 5'-寡腺苷酸合成酶 1 (2', 5'-oligoadenylate synthetase 1, OAS1) 等病毒剪切因子^[16-17]。通过细胞吞噬、病毒基因组剪切等方式,清除病毒^[18-20]。IFN 应答的抗病毒机制抵御病毒入侵的同时,也成为基于细胞生产的疫苗发展的障碍。

如果克服了人二倍体细胞病毒疫苗产量低、价格高的劣势,将对我国基于人二倍体细胞病毒疫苗发展意义重大。本研究通过 CRISPR / Cas9 基因编辑技术构建 IFN 受体 1 (interferon receptor 1, *IFNAR1*) 沉默的 MRC-5 细胞系 (MRC-5^{*IFNAR1*-}), 利用其提高 VZV 的复制水平, 为基于 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系的疫苗生产模式奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒及质粒 人胚肺成纤维细胞 MRC-5、非洲绿猴肾 Vero 细胞购自 ATCC (American Type Culture Collection); VZV 减毒活病毒疫苗原液 (voka 株, 病毒滴度为 10⁵ PFU / mL) 由长春百克生物科技股份有限公司提供, 于 -80 °C 保存; 质粒 PX458、PX458-gRNA 购自美国 Addgene 公司。

1.2 主要试剂及仪器 1% 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; RNAPrep pure 细胞总 RNA 提取试剂盒购自中国 TIANGEN 公司; MiniBEST Viral RNA Extraction Kit、qPCR 试剂盒购自中国 TaKaRa Bio 公司; PCR 操作系统 CFX96 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 MRC-5^{*IFNAR1*-} 细胞系的构建 通过对 MRC-5 细胞基因组 *IFNAR1* (Gene ID: 3454) 区的分析, 使用遗传扰动平台 (Genetic Perturbation Platform, GPP) 网络

工具设计靶向的 *gRNA*, 并通过 CRISPR 分析工具 (CRISPR Analysis Tool, CAT) 评估 *gRNA* 的切割效率。将 *gRNA* 克隆至含 Cas9 蛋白序列的 PX458 质粒中 (克隆位点在 U6 启动子之后), 电转 (680 V) 入 MRC-5 细胞, 设原始细胞对照 (MRC-5) 组和 PX458 空质粒电转对照 (MRC-5^{NC}) 组; 电转后的细胞接种 96 孔板, 0.8 个 / 孔, 用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素和 1% L-谷氨酰胺的 MEM 培养基, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 7 ~ 10 d, 每 3 d 更换新鲜培养基, 培养过程中添加嘌呤霉素 (0.6 μg / mL)。通过 Sanger 测序 (由库美生物科技有限公司完成) 鉴定同基因敲除细胞克隆。测序结果中产生突变的 MRC-5 细胞被分离并传代最终形成 3 株原始的 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系。细胞系稳定传代 5 次后, 用 RNAprep pure 细胞总 RNA 提取试剂盒提取细胞总内源性 mRNA, 利用 *IFNAR1* 引物 qRT-PCR 法检测 *IFNAR1* mRNA 相对表达量。引物序列见表 1, 引物由库美生物科技有限公司合成。反应条件为: 42 °C 5 min, 95 °C 10 s, 95 °C 5 s, 循环 40 次; 60 °C 30 s。所有反应设 3 个复孔, 并使用 2^{-ΔΔCt} 法量化。

1.4 MRC-5 细胞的感染 将 MRC-5 或 MRC-5^{IFNAR1} 细胞接种 6 孔板, 1.3 × 10⁶ 个 / 孔, 按 0.1 MOI 感染 VZV, 于 32 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h; 无血清 MEM 培养基洗涤细胞 3 次, 用含 1% 胎牛血清的 MEM 培养基继续培养细胞。感染后 24 和 168 h 收集细胞和培养上清液, 于 -80 °C 保存。设原始细胞对照组 (MRC-5 和 MRC-5^{IFNAR1} 组), 病毒感染组 (MRC-5⁺ 和 MRC-5^{IFNAR1+} 组)。

1.5 VZV 感染 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系对 IFN 应答水平影响的检测 用 RNAprep pure 细胞总 RNA 提取试剂盒提取感染后 24 h 细胞总 mRNA, 利用 *IFNβ* 和 *OAS1* 引物 qRT-PCR 法检测 IFN 应答因子 *IFNβ* 和 *OAS1* mRNA 相对表达量。引物序列见表 1, 反应条件同 1.3 项。

1.6 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系对 VZV 基因组复制水平影响的检测 利用 MiniBEST Viral RNA Extraction Kit 提取病毒感染 168 h 后细胞培养上清中病毒 DNA, 利用 VZV *ORF62* 引物 qRT-PCR 法检测病毒 DNA 拷贝数。引物序列见表 1, 反应条件同 1.3 项。

1.7 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系对 VZV 子代病毒滴度影响的检测 采用空斑形成单位 (plaque formation unit, PFU) 试验。将病毒感染 168 h 后细胞培养上清经 10 倍梯度稀释后, 感染 Vero 细胞, 37 °C, 5% CO₂ 条件下吸附 4 h 后, 覆盖一层融化的半固体营养琼脂, 使病毒在单层细胞培养中有限扩散, 通过统计空斑计算病毒滴度 (PFU / mL)。

1.8 统计学分析 使用 Prism 9 软件单向方差分析 (ANOVA) 进行统计学分析, 组间比较采用 *t* 检验。所

有试验重复 3 次, 试验数据用均值 ± 标准偏差 (*Mean* ± *SD*) 表示。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物

Tab. 1 Primers for qRT-PCR

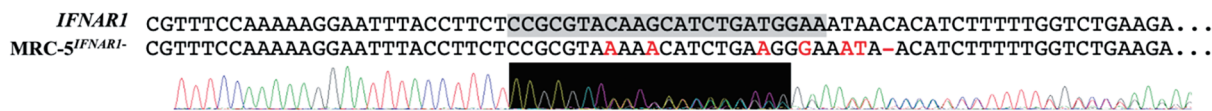
基因	引物 (5'→3')
<i>IFNβ</i>	上游: GTCTCTCCAAATTGCTCTC
	下游: ACAGGAGCTTCTGACACTGA
<i>OAS1</i>	上游: AGAAGGCAGCTCACGAAACC
	下游: CCACCACCCAAGTTTCCTGTA
<i>18S</i>	上游: CTTAGAGGGACAAGTGGCG
	下游: ACGCTGAGCCAGTCACTGTA
<i>IFNAR1</i>	上游: GTAGAGGGCGGTGAGAGCTA
	下游: CGCCATCGCCCGTCTTAAG
VZV <i>ORF62</i>	上游: TCTCCCTAATCTTGTGAGG
	下游: ACACCTTATCTACAGACTCTCC

2 结果

2.1 *IFNAR1* 沉默的 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系的鉴定 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系连续传 5 代后, 对 *IFNAR1* 基因的测序结果显示, MRC-5^{IFNAR1} 细胞系含有稳定的移码突变, 突变位点发生在 *IFNAR1* IFNβ 结合域, 这些移码突变是 *IFNAR1* 彻底沉默的前提条件, 见图 1。MRC-5^{IFNAR1} 细胞系 *IFNAR1* mRNA 相对表达量为 MRC-5 细胞的 27% (*t* = 24.50, *P* < 0.01), 为 MRC-5^{NC} 细胞的 24% (*t* = 28.33, *P* < 0.01), 差异均有统计学意义, 见图 2。表明 MRC-5^{IFNAR1} 产生了 *IFNAR1* 基因的移码突变, 并直接影响细胞内 *IFNAR1* mRNA 的相对表达量, 证明了 MRC-5^{IFNAR1} 的稳定性。

2.2 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系生长状态观察 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系在细胞生长速度、细胞形态等方面与 MRC-5 细胞无明显差别, 见图 3。细胞传代至 50 代左右, 出现贴壁困难、生长缓慢、细胞代谢物增多、细胞死亡等现象。表明 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系极限代次与 MRC-5 细胞一致, *IFNAR1* 基因沉默对 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系的正常传代无明显影响。

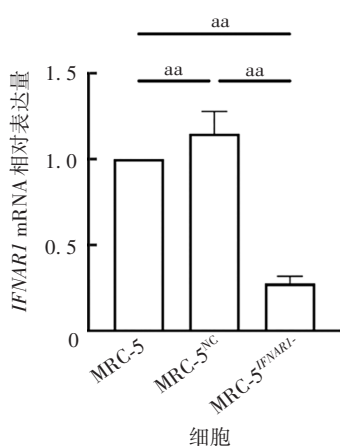
2.3 VZV 感染 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系对 IFN 应答水平的影响 VZV 感染后 24 h, 与 MRC-5 组相比, MRC-5⁺ 组 IFN 应答水平显著增加, *IFNβ* 和 *OAS1* mRNA 相对表达量分别增加了 92 和 133 倍, 差异有统计学意义 (*t* 分别为 16.28 和 66.78, *P* 均 < 0.01), 见图 4。同时 VZV 感染后 24 h, 与 MRC-5⁺ 组相比, MRC-5^{IFNAR1+} 组 IFN 应答水平显著降低, *IFNβ* 和 *OAS1* mRNA 相对表达量分别降低了 61% 和 90%, 差异有统计学意义 (*t* 分别为 18.82 和 16.75, *P* 均 < 0.01), 见图 4。表明 MRC-5^{IFNAR1} 细胞系有效沉默了病毒感染引起的 IFN 应答。



注:图中灰色代表 *gRNA* 靶向区域;红色代表突变。

图 1 MRC-5^{IFNARI}-细胞系测序

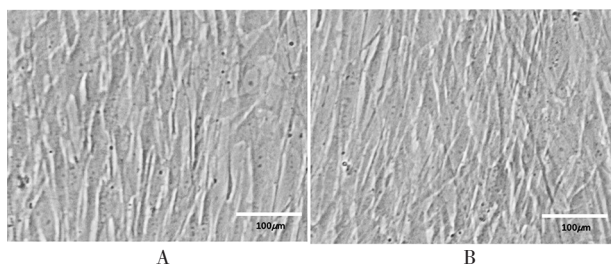
Fig. 1 Sequencing of MRC-5^{IFNARI}- cell line



注:aa 表示 $P < 0.01$ 。

图 2 *IFNARI* mRNA 相对表达量的 qRT-PCR 检测

Fig. 2 Determination of relative expression of *IFNARI* mRNA by qRT-PCR



A: MRC-5 细胞 38 代; B: MRC-5^{IFNARI}- 细胞 38 代。

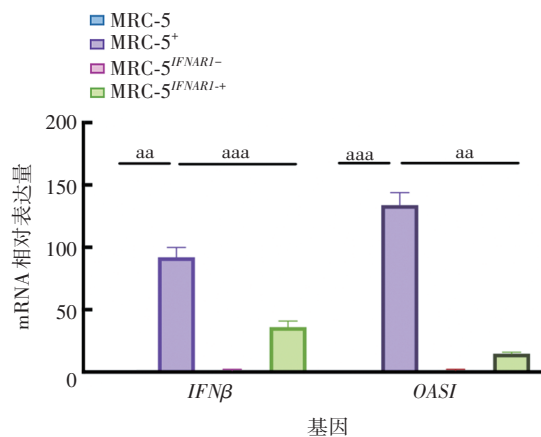
图 3 MRC-5^{IFNARI}-细胞系生长状态的显微镜观察

Fig. 3 Microscopy of growth state of MRC-5^{IFNARI}- cell line

2.4 MRC-5^{IFNARI}-细胞系对 VZV 基因组复制水平的影响 VZV 感染后 168 h, 与 MRC-5⁺ 组(2 600)相比, MRC-5^{IFNARI}- 组中 VZV DNA 拷贝数(14 912)增加 5.7 倍, 差异有统计学意义($t = 10.51, P < 0.01$)。表明 MRC-5^{IFNARI}- 细胞系 IFN 应答水平的降低有效增加了病毒在 MRC-5 细胞中的 DNA 复制水平。

2.5 MRC-5^{IFNARI}-细胞系对 VZV 子代病毒滴度的影响 VZV 感染后 168 h, 与 MRC-5⁺ 细胞组相比(47 500 PFU / mL), MRC-5^{IFNARI}- 细胞组培养上清中 VZV 病毒滴度(207 500 PFU / mL)增加 4.3 倍, 差异

有统计学意义($t = 20.24, P < 0.01$)。表明 *IFNARI* 沉默引起的低 IFN 应答水平, 提高了 VZV 在 MRC-5 细胞中的产量。



注:aa 表示 $P < 0.01$; aaa 表示 $P < 0.001$ 。

图 4 病毒感染后 24 h MRC-5^{IFNARI}-细胞系 IFN 相关基因相对表达量

Fig. 4 Relative expression of IFN related genes in MRC-5^{IFNARI}- cell line 24 h after virus infection

3 讨论

近年来, 基于细胞生产的疫苗成为全球预防病毒感染的最有效方法之一^[21]。可以用于疫苗生产的细胞系很多, 其中基于 Vero 细胞生产的灭活病毒疫苗存在非人源 DNA 污染物的安全问题。导致这种疫苗产品对质量控制中残留的 DNA 要求极高^[22]。对更安全疫苗的需求使采用人二倍体细胞如 MRC-5 细胞生产疫苗的策略意义重大^[23]。但大多数病毒在人二倍体细胞中复制水平较低, THOULOZE 等^[24]报道了狂犬病病毒对二倍体细胞的感染效率仅为 Vero 细胞的 30%。目前市售的 VZV 疫苗多采用人二倍体细胞生产。研究表明, VZV 在 MRC-5 细胞中的复制水平仅为 Vero 细胞的 1 / 5^[25]。这导致疫苗成本高、产量低, 在发展中国家的发展受到一定程度的

制约。因此,如何提高病毒在人二倍体细胞中的复制水平,成为基于细胞生产的病毒疫苗的研究热点之一。

通过比较 Vero 和 MRC-5 细胞的不同,关注点集中到 IFN 应答系统上^[26,12]。IFN 应答作为先天免疫系统重要的组成部分,其中 I 型 IFN 主要被病毒感染激活,行使抗病毒功能。其主要特点为对病毒识别的广谱性和抗病毒因子快速产生。IFN 应答的抗病毒作用可能在人二倍体细胞生产疫苗过程中变成阻碍,尤其是对一些感染早期病毒复制水平较低的病毒,如 VZV 和甲型肝炎病毒(HAV)。通过抑制 IFN 应答的手段,提高这些病毒在人二倍体细胞中复制水平的研究较多。如 2003 年, YOUNG 等^[27]阐明了 IFN 无应答细胞在疫苗开发和制造中的实际应用。2014 年, STEWART 等^[28]同样通过使用 IFN 抑制剂的方法增加了呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)在人二倍体细胞中的复制能力。HAMA-MOTO 等^[11]通过使用 siRNA 沉默 *IRF7* 基因表达来增加 MDCK 细胞中流感病毒的产量。使用抑制 IFN 应答手段提高 VZV 在人二倍体细胞中的复制水平研究较少,多数增加 VZV 复制水平的研究仅关注毒种的筛选和病毒培养条件的优化^[29-30]。但这些研究对于病毒复制水平的提高有限,因此,本研究采用抑制 IFN 应答的方式来提高 VZV 在 MRC-5 细胞中的复制水平。

在对抑制 IFN 应答手段的选择中,本研究面向生产考虑到传统 IFN 抑制剂和 siRNA 在生产应用中的缺陷,这些外源物质的加入难以在疫苗后续生产过程中去除,增加了质量控制的难度,并且将作为成本的一部分提高了疫苗价格。因此,本研究重点探讨 IFN 应答沉默 MRC-5 细胞系对病毒复制的影响。

本研究使用 CRISPR / Cas9 编辑技术成功构建了 *IFNARI* 沉默的 MRC-5^{*IFNARI*}-细胞系。结果显示, CRISPR / Cas9 编辑后 *IFNARI* 基因发生了移码突变,且 *IFNARI* mRNA 相对表达量显著降低。这种降低可能是由无意义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)或无终止密码子引起的 mRNA 降解(no-stop decay, NSD)导致的^[31-33]。病毒感染后 MRC-5^{*IFNARI*}-细胞系 IFN 应答水平显著降低, VZV 在 MRC-5^{*IFNARI*}-细胞系中的 DNA 复制水平和子代病毒滴度均显著增加。这些结果均证明了 MRC-5^{*IFNARI*}-细胞系对 IFN 应答的有效沉默,提高了 VZV 在 MRC-5 细胞中的复制水平,为人二倍体细胞在疫苗生产中的应用提供了新的思路。

MRC-5^{*IFNARI*}-细胞系的成功建立,解决了多种病

毒在 MRC-5 细胞中产量低的问题。与同类研究抑制 IFN 的方法如 IFN 抑制剂、siRNA 比较,减少了二次污染,使用方法更为简单。MRC-5^{*IFNARI*}-细胞系不需要改变传统的疫苗生产方法,明显节约了生产工艺的研发时间和成本,降低了质检检测压力。本研究为改进基于 MRC-5 细胞制备的病毒疫苗提供了新的思路和策略。

参考文献

- [1] KENNEDY P G E, GERSHON A A. Clinical features of varicella-zoster virus infection [J]. *Viruses*, 2018, 10 (11): 609.
- [2] LAING K J, OUWENDIJK W J D, KOELLE D M, *et al.* Immunobiology of varicella - zoster virus infection [J]. *J Infect Dis*, 2018, 218 (suppl_2): S68-S74.
- [3] WUTZLER P P, BONANNI M, BURGESS, *et al.* Varicella vaccination-the global experience [J]. *Expert Rev Vaccin*, 2017, 16 (8): 833-843.
- [4] FISHBEIN D B, YENNE K M, DREESEN D W, *et al.* Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: a nationwide prospective study [J]. *Vaccine*, 1993, 11 (14): 1390-1394.
- [5] FAYAZ A, SIMANI S, JANANI, *et al.* Antibody persistence, 32 years after post-exposure prophylaxis with human diploid cell rabies vaccine (HDCV) [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (21): 3742-3745.
- [6] JONES T. Varivax (Merck & Co) [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3 (1): 54-57.
- [7] SULLIVAN N L, EBERHARDT C S, WIELAND A, *et al.* Understanding the immunology of the Zostavax shingles vaccine [J]. *Curr Opin Immunol*, 2019, 59: 25-30.
- [8] AGGARWAL R, GOEL A. Hepatitis A: epidemiology in resource-poor countries [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2015, 28 (5): 488-496.
- [9] WARREN - GASH C, FORBES H, BREUER J. Varicella and herpes zoster vaccine development: lessons learned [J]. *Expert Rev Vaccin*, 2017, 16 (12): 1191-1201.
- [10] HURLEY D J, BARBER C E, ADKINS M, *et al.* An immunomodulatory feed additive enhances in vitro viral vaccine recall antigen responses in dairy heifers [J]. *Res Vet Sci*, 2019, 127 (1): 11-17.
- [11] HAMAMOTO I, TAKAKU H, TASHIRO M, *et al.* High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7 [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e59892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059892>.
- [12] KIM B, SHENOY A, KUMAR P, *et al.* IFN-inducible GTPases in host cell defense [J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12 (4): 432-444.
- [13] PESTKA S, KRAUSE C D, WALTER M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors [J]. *Immunol Rev*, 2004, 202 (1): 8-32.

(下转第 31 页)

- [6] YANG H, CROMLEY D, WANG H, *et al.* Functional expression of a cDNA to human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in yeast. Species - dependent substrate specificity and inhibitor sensitivity [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (7): 3980-3985.
- [7] ROGERS M A, LIU J, SONG B L, *et al.* Acyl-CoA: cholesterol acyltransferases (ACATs / SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 151 (1): 102-107.
- [8] LONG T, SUN Y, HASSAN A, *et al.* Structure of nevanimibe-bound tetrameric human ACAT1 [J]. *Nature*, 2020, 581 (7808): 339-343.
- [9] CHANG T Y, LI B L, CHANG C C, *et al.* Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297 (1): E1-E9. DOI: 10.1152 / ajpendo.90926.2008.
- [10] CHANG C. Molecular cloning and functional expression of human acyl-coA: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (28): 20747-20755.
- [11] AYYAGARI V N, WANG X, DIAZ-SYLVESTER P L, *et al.* Assessment of acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT-1) role in ovarian cancer progression - An in vitro study [J]. *PLoS ONE*, 2020, 15 (1): e0228024. DOI: 10.1371 / journal.pone.0228024.
- [12] LIU Q, LUO Q, HALIM A, *et al.* Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 401 (10): 39-45.
- [13] LI J, GU D, LEE S S, *et al.* Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35 (50): 6378-6388.
- [14] BEMLIH S, POIRIER M D, EL ANDALOUSSI A. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor Avasimibe affect survival and proliferation of glioma tumor cell lines [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9 (12): 1025-1032.
- [15] KIM H, GEORGE E, RAGLAND R, *et al.* Targeting the ATR / CHK1 axis with PARP inhibition results in tumor regression in BRCA - mutant ovarian cancer models [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (12): 3097-3108.
- [16] EZZIKOURI S, KIMURA K, SUNAGOZAKA H, *et al.* Serum DHCR24 auto-antibody as a new biomarker for progression of hepatitis C [J]. *Ebio Med*, 2015, 2 (6): 604-612.

收稿日期:2022-01-07

编辑:何巍

(上接第 25 页)

- [14] STANTON G J, WEIGENT D A, FLEISCHMANN W R, *et al.* Interferon review [J]. *Invest Radiol*, 1987, 22 (3): 259-273.
- [15] RANDALL R E, GOODBOURN S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (Pt 1): 1-47.
- [16] CHENG L, MA J, LI J, *et al.* Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127 (1): 269-279.
- [17] HOUGLUM J E. Interferon: mechanisms of action and clinical value [J]. *Clin Pharm*, 1983, 2 (1): 20-28.
- [18] SHIM J M, KIM J, TENSON T, *et al.* Influenza virus infection, interferon response, viral counter-response, and apoptosis [J]. *Viruses*, 2017, 9 (8): 223.
- [19] ESSAIDI-LAZIOSI M, GEISER J, HUANG S, *et al.* Interferon-dependent and respiratory virus - specific interference in dual infections of airway epithelia [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 10246.
- [20] KORTH M J, KASH J C, FURLONG J C, *et al.* Virus infection and the interferon response: a global view through functional genomics [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 116 (3): 37-55.
- [21] PLOTKIN S. History of vaccination [J]. *Proceedings Nat Academy Sci United States Am*, 2014, 111 (34): 12283-12287.
- [22] HUANG S, ZHU Z, HU Q. Response to letter to the editor on analysis [J]. *Hum Vaccin & Immunotherapeutics*, 2019, 15 (9): 2127-2128.
- [23] ZHU S, GUO C. Rabies control and treatment: from prophylaxis to strategies with curative potential [J]. *Viruses*, 2016, 8 (11): 279.
- [24] THOULOUBE M I, LAFAGE M, SCHACHNER M, *et al.* The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus [J]. *J Virol*, 1998, 72 (9): 7181-7190.
- [25] HUANG Y T, HITE S, DUANE V, *et al.* CV - 1 and MRC - 5 mixed cells for simultaneous detection of herpes simplex viruses and varicella zoster virus in skin lesions [J]. *J Clin Virol*, 2002, 24 (1-2): 37-43.
- [26] BEUTLER B, JIANG Z, GEORGE P, *et al.* Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large [J]. *Annual Rev Immunol*, 2006, 24 (1): 353-389.
- [27] YOUNG D F, ANDREJEVA L, LIVINGSTONE A, *et al.* Virus replication in engineered human cells that do not respond to interferons [J]. *J Virol*, 2003, 77 (3): 2174-2181.
- [28] STEWART C E, RANDALL R E, ADAMSON C S. Inhibitors of the interferon response enhance virus replication in vitro [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (11): e112014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112014>.
- [29] FUNKHOUSER A W, SCHULTZ D E, LEMON S M, *et al.* Hepatitis A virus translation is rate-limiting for virus replication in MRC-5 cells [J]. *Virology*, 1999, 254 (2): 268-278.
- [30] DE CHASTONAY J, SIEGL G. Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells [J]. *Virology*, 1987, 157 (2): 268-275.
- [31] LINDEBOOM R G, SUPEK F, LEHNER B. The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers [J]. *Nat Genet*, 2016, 48 (10): 1112-1118.
- [32] SMITS A H, ZIEBELL F, JOBERTY G, *et al.* Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs [J]. *Nat Methods*, 2019, 16 (11): 1087-1093.
- [33] LYKKE-ANDERSEN J, BENNETT E J. Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204 (4): 467-476.

收稿日期:2022-08-09

编辑:王佳凤