

动物源细菌性人兽共患病菌影疫苗研究进展

王龙喜, 董晨晖, 岳怀宁, 王豪杰, 王晓阁, 辛凌翔*, 朱良全*

中国兽医药品监察所, 北京 100081

王龙喜, 董晨晖, 岳怀宁, 王豪杰, 王晓阁, 辛凌翔, 朱良全. 动物源细菌性人兽共患病菌影疫苗研究进展[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 545-551.

WANG Longxi, DONG Chenhui, YUE Huaining, WANG Haojie, WANG Xiaoge, XIN Lingxiang, ZHU Liangquan. Research progress in bacterial ghost-based vaccines against bacterial zoonoses in animals[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 545-551.

摘要: 人兽共患病对人类健康构成严重威胁, 并对畜牧业和公共卫生安全造成重大影响。接种疫苗是预防这些疾病传播的重要手段。作为一种新型候选疫苗, 菌影疫苗因其能诱导更强的体液、细胞及黏膜免疫反应, 并且具有发酵生产、纯化工艺简单、安全性高等优点, 展现出广阔的应用前景。本文简要介绍细菌菌影的制备工艺、免疫机制, 重点阐述菌影技术在以布鲁氏菌病为主的重要动物细菌性人兽共患病中的研究进展, 以期为新型疫苗的开发提供有价值的参考。

关键词: 细菌菌影; 布鲁氏菌; 新型疫苗; 噬菌体

Research progress in bacterial ghost-based vaccines against bacterial zoonoses in animals

WANG Longxi, DONG Chenhui, YUE Huaining, WANG Haojie, WANG Xiaoge, XIN Lingxiang*, ZHU Liangquan*

China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

Abstract: Zoonoses pose a serious threat to human health and affect animal husbandry and public health security. Vaccination is an important means of preventing the spread of these diseases. As a novel type of candidate vaccines, bacterial ghost-based vaccines demonstrate broad application prospects because they can induce strong humoral, cellular, and mucosal immune responses. Moreover, they are praised for the simple fermentation production and purification processes and high safety. This paper briefs the preparation technology and immune

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800703); 中国兽医药品监察所第三批公益性专项(GY202403)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800703) and the Third Batch of Public Welfare Projects of China Institute of Veterinary Drug Control (GY202403).

*Corresponding authors. E-mail: XIN Lingxiang, xinxya@sina.com; ZHU Liangquan, 1367391894@qq.com

Received: 2024-08-30; Accepted: 2024-10-15; Published online: 2024-11-11

response-triggering mechanism of bacterial ghosts and reviews the research progress of bacterial ghosts in brucellosis, a major bacterial zoonosis in animals, aiming to provide valuable reference for the development of novel vaccines.

Keywords: bacterial ghost; *Brucella*; novel vaccine; bacteriophage

人兽共患病原可通过媒介或直接接触从动物传播给人类^[1], 如布鲁氏菌病、结核病、沙门氏菌病等在过去 20 多年, 每年造成约 270 万人死亡和 25 亿人患病, 对健康、经济和生态系统造成重大影响^[2-4]。我们团队对这类疫病已有研究, 如构建具有良好遗传稳定性的粗糙型减毒布鲁氏菌(*Brucella*)诱导株, 为新型弱毒疫苗的研制奠定基础^[5]; 制备犬种布鲁氏菌单克隆抗体, 有效提升犬种布鲁氏菌的血清学检测精度, 填补当前检测方法中缺乏特异性单抗的空白^[6]; 构建能够高效表达鸚鵡热衣原体外膜蛋白 MOMP 基因的重组布鲁氏菌 RA343-MOMP 株, 该重组疫苗株免疫动物后能同时实现对布鲁氏菌病和鸚鵡热衣原体病的双重免疫保护^[7]。

细菌菌影(bacterial ghost, BG)是通过噬菌体 PhiX174 基因 E 的表达在革兰氏阴性菌细胞膜上形成裂解孔道, 从而去除细胞质, 形成细菌空壳^[8]。最初, BG 的定义仅限于革兰氏阴性菌, 现已扩展到革兰氏阳性菌, 通过化学方法也可以诱导形成 BG^[9]。BG 因其保留完整的细胞壁抗原, 能够有效刺激先天免疫和获得性免疫, 并且可作为佐剂或药物递送载体^[8,10]。

现有灭活疫苗、减毒活疫苗和基因工程疫苗各有不足, 如免疫原性低、毒力返强或抗原性差^[11-13]。BG 因缺乏细胞质, 不具备毒力返强和基因重组的风险, 并且具有良好的免疫效果和安全性, 成为一种具有潜力的疫苗^[14]。本文简要阐述 BG 的制备工艺和免疫机制, 重点阐述菌影疫苗的开发现状, 以期为 BG 在防治布鲁氏菌病等重要人兽共患病中的应用提供思路。

1 菌影疫苗的制备技术

目前许多细菌已用于生产 BG, 如布鲁氏菌(*Brucella*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ST)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, SE)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)等^[15-16]。

裂解基因 E 的受控基因工程表达技术是生产 BG 的主要方法, 噬菌体 PhiX174 裂解基因 E 编码一种 N 末端具有疏水区域的蛋白质, 在与细菌细胞壁内膜结合后, N 端的疏水区域增强了内部渗透压, 形成直径为 40–200 nm 跨膜通道使细胞质外流, 进而制备 BG^[8,17] (图 1)。目前噬菌体 PhiX174 的裂解机制仍然存在争议, 主要有两种机制被广泛认可。一是“三阶段”裂解: 首先, 蛋白质 E 整合到细胞内膜中, 其 C 端面向细胞质; 其次, 在蛋白 E 构象变化的调控下改变其 C 端方向, 并通过横向扩散到达特定的黏附位点; 最后, C 端暴露到细胞外表面, 实现内膜与外膜的完全融合^[18]。二是近几年提出的裂解机制: 蛋白 E 通过抑制必需酶 *MraY* 来抑制细菌细胞壁的合成, 从而引起生长中的宿主细胞的裂解。*MraY* 又称转位酶 I, 催化脂质 I 前体的合成, 具有 10 个跨膜结构域, 它与蛋白 E 结合, 在宿主细菌表面形成跨膜通道, 释放宿主细胞内容物, 导致宿主细胞死亡^[19-20]。

除涉及蛋白 E 的常用方法, 化学方法可应用在革兰氏阴性和阳性细菌生长的任何阶段^[21]。常用化学试剂包括 NaOH、SDS、CaCO₃ 和 H₂O₂ 等, 这些试剂通过在细菌细胞壁上形成孔洞来

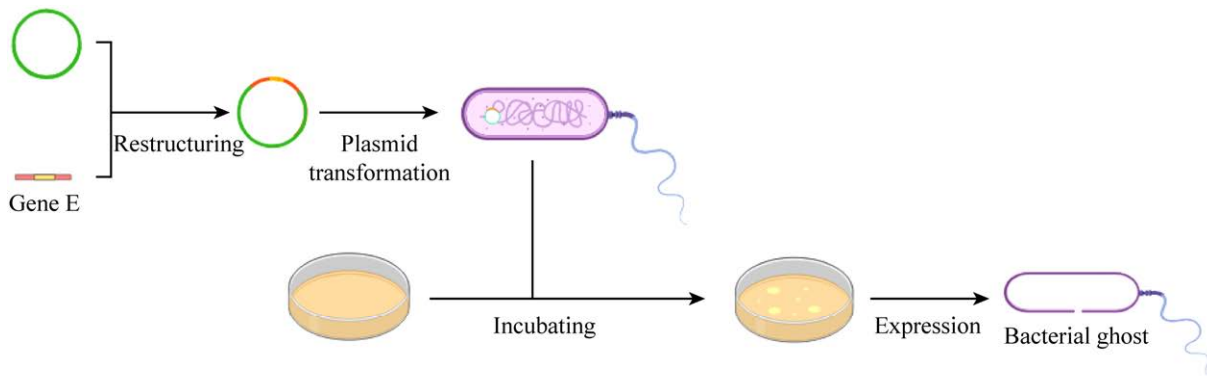


图 1 基因工程制备细菌菌影

Figure 1 Preparation of the bacterial ghost by genetic engineering.

进行处理，然后通过离心去除细胞内容物。所得的 BG 保留了原始细胞的结构和功能特性，如细胞壁、外膜，同时保持其抗原性^[8]。该方法关键是使用化学试剂的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 在细菌细胞壁上产生微孔^[22]。如 Amara 等^[23]使用 Plackett-Burman 设计来优化“海绵状”大肠杆菌 BG 的制备条件，如化学试剂 MIC、细菌最小生长浓度 (minimum growth concentration, MGC)。Aarthi 等^[24]利用温和洗涤剂 Triton X-100 和 NaCl 来改变细胞膜的通透性，随后通过热休克诱导来进一步增强通透性，该过程使细胞能在保持外部形态不变的情况下，排出内部的细胞质成分。

2 菌影疫苗的免疫机制

BG 具备独特的疫苗候选特征，其细胞形态和表面结构与自然细菌相似(图 2)，使其能够有效激活先天性和获得性免疫系统^[16]。细菌表面成分的存在可激活免疫细胞并促进促炎细胞因子的分泌^[8,25]。BG 具有完整脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)结构，能激活巨噬细胞的信号级联反应，促使其分泌如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6 (IL-6)等促炎细胞因子，从而进一步增

强细胞免疫和体液免疫^[26]。BG 能够有效增强树突状细胞上的主要组织相容性复合体 I 类分子 (major histocompatibility complex-I, MHC-I) 的表达，LPS 的存在有效地改善了树突状细胞的交叉递呈和成熟^[27]。BG 通过激活 B 细胞和 T 细胞来刺激获得性免疫反应，位于 BG 表面或内部的抗原促进其向免疫细胞的呈递，进而促进 B 细胞产生特异性抗体和 T 细胞激活，有助于长期免疫^[27-28]。菌毛蛋白能够激活 TLR5 和 NLRP4 通路，这 2 种通路不仅增强机体的先天免疫反应，还可通过诱导特异性抗体产生和提高 T 细胞应答来增强获得性免疫功能^[29-30]。巨噬细胞和树突状细胞表面的 TLR2 主要识别细菌的肽聚糖(peptidoglycan, PGN)和脂蛋白(lipoprotein, LPP)等病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)^[31]。细菌表面的黏附因子、LPS、PGN 及其他免疫刺激物质保持完整，可被不同抗原递呈细胞识别^[16]。

3 菌影疫苗开发现状

3.1 布鲁氏菌病

布鲁氏菌病是全球分布广泛的重要动物细菌性人兽共患病之一，但现有的布鲁氏菌病疫苗各有不足，为疫情防控工作带来了诸多困难。

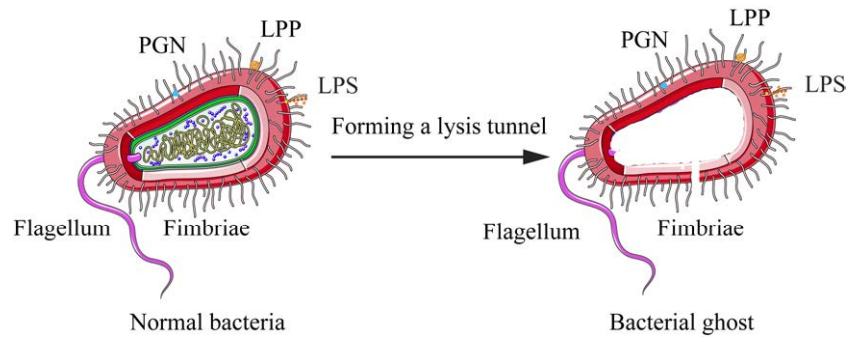


图 2 细菌菌影的结构 LPS: 脂多糖; PGN: 肽聚糖; LPP: 脂蛋白。

Figure 2 The structure of bacterial ghost. LPS: Lipopolysaccharide; PGN: Peptidoglycan; LPP: Lipoprotein.

Liu 等^[32]构建了一个重组温敏穿梭裂解质粒 pBBR1MCS-E, 该质粒被引入减毒的猪布鲁氏菌活疫苗 S2 中, 通过诱导裂解基因 E 的表达来生产猪布鲁氏菌菌影疫苗 (*Brucella suis* ghosts, BSG), 结果表明, BSG 组和 S2 疫苗组的免疫水平与接种 PBS 的对照组相比存在显著差异。Kwon 等^[33]使用名为 GI24 的猪髓类抗菌肽 36 (porcine myeloid antimicrobial peptide-36, PMPA-36) 片段进行牛种布鲁氏菌 (*B. abortus*) 的裂解, 制备了牛种布鲁氏菌菌影疫苗; 动物试验显示, 该疫苗在接种组与对照组之间的免疫水平存在显著差异, 并且口服和腹膜内免疫接种方式均能有效提升免疫反应。Wang 等^[34]构建了布鲁氏菌 2308 Δ GntR 菌影疫苗, 攻毒实验结果表明, 接种 2308 Δ GntR 菌影疫苗的小鼠在攻毒 2 周后, 其脾脏内的布鲁氏菌数量显著低于未免疫小鼠。该疫苗能够诱导针对布鲁氏菌的特异性 IgG、干扰素- γ (IFN- γ) 和白细胞介素-4 (IL-4) 的分泌, 显示出与 RB51 和 S19 疫苗相似的免疫效果^[34]。

He 等^[35]研制了一种布鲁氏菌 A19 菌影 (A19BG) 疫苗, 用蛋白质组学方法来研究其与亲本 A19 相比的整体蛋白质组学变化, 蛋白质组学分析确定了 2 014 种蛋白质, 其中 1 116 种与 A19 中的蛋白质表达差异显著, 主要的外膜

蛋白 (如 Bcsp31、Omp25、Omp10、Omp19、Omp28 和 Omp2a) 以及热休克蛋白 (如 DnaK、GroS 和 GroL) 在 A19BG 中富集, 此外, A19BG 还具有与 A19 相似的 LPS。上述研究表明, A19BG 保留了足够抗原, 能引发有效保护性免疫反应。贺笋等^[36]将含有噬菌体 PhiX174 裂解基因 E 的质粒转化至 A19 疫苗株, 构建了菌影疫苗, 接种该疫苗的小鼠未出现不良反应, 脾脏无可见的病理变化, 该疫苗在布鲁氏菌 2308 强毒株攻毒后的免疫保护率达 87.5%, 表现出良好的保护效果, 为布鲁氏菌菌影疫苗的进一步应用和推广奠定了基础。以上研究充分说明了 BG 具有良好的免疫原性, 能够在布鲁氏菌疫苗研发中发挥重要作用。目前有关布鲁氏菌菌影疫苗的研究已有很多, 但都处于实验室研究阶段, 尚未进行临床试验。

3.2 沙门氏菌病

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是重要的细菌性人兽共患病原体, 能感染鸟类、爬行动物和哺乳动物, 对人类和动物健康构成重大挑战。Senevirathne 等^[37]使用鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, ST) 的鞭毛蛋白抗原作为佐剂, 开发了一种针对肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*, SE) 的菌影疫苗, 数据显示, 在感染肠炎沙门氏菌后, 免疫组的脾脏和肝中的 SE 阳性样本显著低于对照

组,表明该疫苗能有效降低鸡感染 SE,并减少 SE 感染后的组织病变。Rabea 等^[9]利用吐温-80 制备了鼠伤寒沙门氏菌菌影疫苗,结果显示,皮下接种组(BG 1 mL)和口服接种组(0.5 mL BG+0.5 mL 铝佐剂)中大鼠存活率为 100%,证明该疫苗作为候选疫苗的有效性。Halder 等^[38]研发了一种针对伤寒沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌的二价疫苗,相较于未免疫的对照小鼠,接种该疫苗的小鼠获得了 80%–100%的保护,显著减少了炎症和组织损伤,展现出良好的抗菌效果。沙门氏菌菌影疫苗在实验室研究阶段展现出良好的免疫效果,有望开发成为新型的沙门氏菌疫苗。

3.3 其他人兽共患病

Li 等^[39]通过化学方法制备了猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS)菌影疫苗,攻毒实验表明,SS2 菌影疫苗组小鼠死亡率为 30%,而 SS2 灭活疫苗组的死亡率为 40%,SS9 菌影疫苗组小鼠死亡率降低至 20%,SS2 灭活疫苗组的死亡率为 30%。SS2 和 SS9 菌影疫苗在 BALB/c 小鼠模型中均表现出较高的免疫保护效果,为猪链球菌疫苗的开发提供了新的参考。Hu 等^[40]使用血清型 O2 禽致病性大肠杆菌缺失菌株 (DE17 Δ luxS Δ aroA)制备了菌影疫苗,接种后显示 100%的保护率,对同源株保护率也达到 90%。Dentovskaya 等^[41]构建了一个 pEYR'-E-Y-K 质粒,该质粒引入到低内毒素鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)中制备菌影疫苗,数据显示,EYK-BG 对豚鼠的保护率达到 100%,而 F1 抗原对豚鼠的保护率为 67%,EYK-BG 对豚鼠的保护作用明显增强。

4 展望

近年来,随着基因工程和生物信息技术的发展,基于较为成熟的制备技术及良好免疫应

答特点,研制新型更安全、免疫效力持久的细菌菌影疫苗前景广阔。如布鲁氏菌菌影疫苗和沙门氏菌菌影疫苗。

目前,菌影疫苗已取得了可喜的进展,但也面临着许多挑战。(1) 生产工艺参数有待优化。如化学诱导的方法可能会破坏细菌表面的某些抗原成分,从而降低其免疫原性。因此,需要寻找更高效稳定的化学试剂等来改进生产工艺。(2) BG 产量和生产效率有待提升。目前基因工程方法在制备 BG 时存在裂解效率低下的问题,并且 BG 的产率难以支持 BG 进行大规模生产,严重限制了 BG 的推广应用。若能改进 BG 的制备方法,如对裂解基因 E 进行修饰,以及探索新的裂解物质以提高 BG 制备效率并降低生产成本,可极大地推动 BG 的发展。(3) 联合防控效果有待拓展。Chen 等^[42]开发的基于多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)外膜蛋白 H 的大肠杆菌菌影疫苗,适用于牛大肠杆菌病和巴氏杆菌病预防。布鲁氏菌和猪链球菌都是重要的人兽共患菌,其都会引起发热、关节痛等症状,并可能发生混合感染,如能研发类似这样的联合菌影疫苗意义重大。(4) 安全性及有效性评价平台有待完善。尽管 BG 只是细菌的空壳,不具备细胞毒性或遗传毒性^[43],但其残留质粒、核酸的检测及验证需要具体方法或标准,此外其作为一种新型的灭活疫苗,持续诱导机体产生良好免疫应答能力有待进一步验证。总之,菌影疫苗尚处于实验室研究阶段,待上述问题得到科学合理的解决后,凭其良好的免疫原性和安全性优势,有望在公共卫生健康领域发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] DONG XP, SOONG L. Emerging and re-emerging zoonoses are major and global challenges for public health[J]. Zoonoses, 2021. DOI: 10.15212/ZOONOSES-2021-0001.

- [2] ERKYIHUN GA, ALEMAYEHU MB. One health approach for the control of zoonotic diseases[J]. *Zoonoses*, 2022, 2(1): 963.
- [3] CARPENTER A, WALTENBURG MA, HALL A, KILE J, KILLERBY M, KNUST B, NEGRON M, NICHOLS M, WALLACE RM, BEHRAVESH CB, McQUISTON JH. Vaccine preventable zoonotic diseases: challenges and opportunities for public health progress[J]. *Vaccines*, 2022, 10(7): 993.
- [4] RAHMAN MT, SOBUR MA, ISLAM MS, IEVY S, HOSSAIN MJ, EL ZOWALATY ME, RAHMAN AT, ASHOUR HM. Zoonotic diseases: etiology, impact, and control[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1405.
- [5] 孙浩杰, 任小侠, 秦玉明, 朱良全, 蒋卉, 孙石静, 丁家波, 辛凌翔, 王楠, 李晓宁, 李巧玲, 毛开荣, 蔡亚南, 徐磊. 一株粗糙型牛种布鲁氏菌诱导株的构建及鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11): 3445-3453.
- SUN HJ, REN XX, QIN YM, ZHU LQ, JIANG H, SUN SJ, DING JB, XIN LX, WANG N, LI XN, LI QL, MAO KR, CAI YN, XU L. Construction and identification of an induced strain of rough *Brucella abortus*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(11): 3445-3453 (in Chinese).
- [6] 朱良全, 丁家波, 秦玉明, 冯宇, 蒋卉, 彭小微. 一种犬种布鲁氏菌单克隆抗体及其应用: CN202010827265.4[P]. 2022-02-01.
- ZHU LQ, DING JB, QIN YM, FENG Y, JIANG H, PENG XW. A monoclonal antibody to *Brucella canines* and its application: CN202010827265.4[P]. 2022-02-01 (in Chinese).
- [7] 丁家波, 范学政, 朱良全, 冯宇, 彭小微, 秦玉明, 王芳, 许冠龙, 李秋辰, 蒋卉. 一株重组鸚鵡热衣原体外膜蛋白 MOMP 基因的粗糙型布鲁氏菌及其疫苗生产方法: CN201910284652.5[P]. 2022-04-26.
- DING JB, FAN XZ, ZHU LQ, FENG Y, PENG XW, QIN YM, WANG F, XU GL, LI QC, JIANG H. A rough type *Brucella* strain with recombinant outer membrane protein MOMP gene from *Chlamydia psittaci* and its vaccine production method: CN201910284652.5[P]. 2022-04-26 (in Chinese).
- [8] PARK SY. Chemically induced bacterial ghosts: a novel approach for advancing biomedical applications[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 2023, 19(4): 657-665.
- [9] RABEA S, YASSIN AS, MOHAMMED AF, SALEM-BEKHIT MM, ALANAZI FK, ESMAIL EA, MONEIB NA, HASHEM AEM. Immunological characterization of the chemically prepared ghosts of *Salmonella Typhimurium* as a vaccine candidate[J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18(1): 72.
- [10] HAN SW, SONG YF, WU XY, QU ZB, YU X, YANG X. Advances in bacteria-based drug delivery systems for anti-tumor therapy[J]. *Clinical & Translational Immunology*, 2024, 13(7): e1518.
- [11] LI XF, DONG HL, WANG HJ, HUANG XY, QIU YF, JI X, YE Q, LI CF, LIU Y, DENG YQ, JIANG T, CHENG G, ZHANG FC, DAVIDSON AD, SONG YJ, SHI PY, QIN CF. Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 673.
- [12] HEIDARY M, DASHTBIN S, GHANAVATI R, MAHDIZADE ARI M, BOSTANGHADIRI N, DARBANDI A, NAVIDIFAR T, TALEBI M. Evaluation of brucellosis vaccines: a comprehensive review[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 925773.
- [13] 刘晨芳, 翟景波, 梁晨, 德恩金, 张国庆, 王立军, 梁秀文. 布鲁氏菌病新型疫苗研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2022, 38(12): 1141-1146.
- LIU CF, ZHAI JB, LIANG C, DE EJ, ZHANG GQ, WANG LJ, LIANG XW. Research progress in new brucellosis vaccine types[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2022, 38(12): 1141-1146 (in Chinese).
- [14] MA Y, ZHU WJ, ZHU GS, XU Y, LI SY, CHEN R, CHEN LD, WANG JF. Efficient robust yield method for preparing bacterial ghosts by *Escherichia coli* phage ID52 lysis protein E[J]. *Bioengineering*, 2022, 9(7): 300.
- [15] BATAH AM, AHMAD TA. The development of ghost vaccines trials[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2020, 19(6): 549-562.
- [16] CHEN HJ, JI H, KONG XJ, LEI PY, YANG QS, WU W, JIN LB, SUN D. Bacterial ghosts-based vaccine and drug delivery systems[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1892.
- [17] WITTE A, WANNER G, BLÄSI U, HALFMANN G, SZOSTAK M, LUBITZ W. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(7): 4109-4114.
- [18] MA Y, CUI L, WANG M, SUN QL, LIU KS, WANG JF. A novel and efficient high-yield method for preparing bacterial ghosts[J]. *Toxins*, 2021, 13(6): 420.
- [19] MEZHYROVA J, MARTIN J, PEETZ O, DÖTSCH V, MORGNER N, MA Y, BERNHARD F. Membrane insertion mechanism and molecular assembly of the bacteriophage lysis toxin Φ X174-E[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(10): 3300-3316.
- [20] ORTA AK, RIERA N, LI YE, TANAKA S, YUN HG, KLAIC L, JR CLEMONS WM. The mechanism of the phage-encoded protein antibiotic from Φ X174[J]. *Science*, 2023, 381(6654): eadg9091.
- [21] ALI RH, ALI ME, SAMIR R. Production and characterization of bacterial ghost vaccine against *Neisseria meningitidis*[J]. *Vaccines*, 2022, 11(1): 37.
- [22] ABDELFATTAH A, SAMIR R, AMIN HM. Production of highly immunogenic and safe Triton X-100 produced bacterial ghost vaccine against *Shigella flexneri* 2b serotype[J]. *Gut Pathogens*, 2023, 15(1): 41.
- [23] AMARA AA, SALEM-BEKHIT MM, ALANAZI FK. Sponge-like: a new protocol for preparing bacterial ghosts[J]. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 545741.
- [24] AARTHI Y, ANJANA A, TEJAL G, SHANMUGARAJA M, RAMADEVI S, PRINCESS R. A simple and rapid method of probiotic bacterial ghost cell preparation to deliver *Mycobacterium tuberculosis* antigen[J]. *Molecular Biotechnology*, 2024: 1-12.
- [25] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [26] XIE SZ, LI S, ZHANG ZL, CHEN MH, RAN P, LI XH. Bacterial ghosts for targeting delivery and subsequent responsive release of ciprofloxacin to destruct

- intracellular bacteria[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 399: 125700.
- [27] HAJAM IA, DAR PA, WON G, LEE JH. Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 37.
- [28] DOBROVOLSKIENĖ N, PAŠUKONIENĖ V, DARINSKAS A, KRAŠKO JA, ŽILIONYTĖ K, MLYNSKA A, GUDLEVIČIENĖ Ž, MIŠEIKYTĖ-KAUBRIENĖ E, SCHIJNS V, LUBITZ W, KUDELA P, STRIOGA M. Tumor lysate-loaded bacterial ghosts as a tool for optimized production of therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines[J]. *Vaccine*, 2018, 36(29): 4171-4180.
- [29] YU HM, ZHOU XD, WEN S, XIAO Q. Flagellin/TLR5 responses induce mucus hypersecretion by activating EGFR via an epithelial cell signaling cascades[J]. *Experimental Cell Research*, 2012, 318(6): 723-731.
- [30] WEN JX, XUAN B, LIU Y, WANG LW, HE L, MENG XC, ZHOU T, WANG YM. Updating the NLRC4 inflammasome: from bacterial infections to autoimmunity and cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 702527.
- [31] BUWITT-BECKMANN U, HEINE H, WIESMÜLLER KH, JUNG G, BROCK R, ULMER AJ. Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level[J]. *The FEBS Journal*, 2005, 272(24): 6354-6364.
- [32] LIU J, LI Y, SUN Y, JI X, ZHU LW, GUO XJ, ZHOU W, ZHOU B, LIU S, ZHANG RA, FENG SZ. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2015, 166(3/4): 138-144.
- [33] KWON AJ, MOON JY, KIM WK, KIM S, HUR J. Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (GI24) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 78(10): 1541-1548.
- [34] WANG SL, LI ZQ, ZHANG JL, XI L, CUI YY, ZHANG WHH, ZHANG JB, ZHANG H. A safe non-toxic *Brucella abortus* ghosts induce immune responses and confer protection in BALB/c mice[J]. *Molecular Immunology*, 2020, 124: 117-124.
- [35] HE CY, YANG JH, YE YB, ZHAO HL, LIU MZ, YANG QL, LIU BS, HE S, CHEN ZL. Proteomic and antibody profiles reveal antigenic composition and signatures of bacterial ghost vaccine of *Brucella abortus* A19[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 874871.
- [36] 贺筭, 刘梦志, 赵海龙, 吴冬玲, 刘宝山, 何传雨. 布鲁氏菌 A19 株菌影疫苗的构建及其免疫效果评价[J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60(5): 71-77.
- HE S, LIU MZ, ZHAO HL, WU DL, LIU BS, HE CY. Construction of *Brucella* A19 strain bacterial ghost vaccine and evaluation of its immune effect[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(5): 71-77 (in Chinese).
- [37] SENEVIRATHNE A, HEWAWADUGE C, LEE JH. Immunization of chicken with flagellin adjuvanted *Salmonella enteritidis* bacterial ghosts confers complete protection against chicken salmonellosis[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(7): 101205.
- [38] HALDER P, MAITI S, BANERJEE S, DAS S, DUTTA M, DUTTA S, KOLEY H. Bacterial ghost cell based bivalent candidate vaccine against *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi A: a prophylactic study in BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2023, 41(41): 5994-6007.
- [39] LI SY, WANG D, GUO CY, TIAN MT, LIU Q, PAN ZH. Study on preparation of a *Streptococcus suis* ghost vaccine[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 154: 104865.
- [40] HU JG, ZUO JK, CHEN ZG, FU LX, LV XL, HU SJ, SHI XC, JING YW, WANG YL, WANG ZH, MI RS, HUANG Y, LIU DH, QI KZ, HAN XG. Use of a modified bacterial ghost lysis system for the construction of an inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* vaccine candidate[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 229: 48-58.
- [41] DENTOVSKAYA SV, VAGAIKAYA AS, PLATONOV ME, TRUNYAKOVA AS, KOTOV SA, KRASIL'NIKOVA EA, TITAREVA GM, MAZURINA EM, GAPEL'CHENKOVA TV, SHAIKHUTDINOVA RZ, IVANOV SA, KOMBAROVA TI, GERASIMOV VN, UVERSKY VN, ANISIMOV AP. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection[J]. *Vaccines*, 2021, 10(1): 51.
- [42] CHEN NN, JIANG DJ, LIU Y, ZHANG ZC, ZHOU YL, ZHU ZB. Preparation of *Escherichia coli* ghost of anchoring bovine *Pasteurella multocida* OmpH and its immunoprotective effect[J]. *BMC Veterinary Research*, 2023, 19(1): 192.
- [43] 焦红梅, 郑文浩, 杨慧, 堵嘉诚, 刘夕珑, 周芳鸣, 成伟. 肠炎沙门菌菌影的制备及其作为疫苗载体的特性分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(3): 315-318, 322.
- JIAO HM, ZHENG WH, YANG H, DU JC, LIU XL, ZHOU FM, CHENG W. Preparation and immunological characterization of *Salmonella enteritidis* ghosts as a vaccine vector[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2019, 14(3): 315-318, 322 (in Chinese).