

芽胞杆菌及其代谢物抑制包膜病毒感染的研究进展

姚俞洁^{1,2}, 孟广勋^{2,3}, 韩颖颖¹, 李娟^{2,3*}

(1. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093; 2. 中国科学院 上海巴斯德研究所微生物、发育与健康研究中心
中国科学院分子病毒与免疫重点实验室 中国科学院大学, 上海 200031; 3. 中科院南京生命健康高等研究院, 江苏 南京 211135)

摘要 包膜病毒指具有一层脂质双层膜的病毒, 如流感病毒、冠状病毒等, 这些包膜病毒每年在世界范围内导致许多严重的疾病, 严重威胁人类健康。使用抗病毒药物是预防与治疗病毒感染的主要策略, 芽胞杆菌 (*Bacillus*) 及其代谢物能够抑制多种包膜病毒的感染。本文综述了芽胞杆菌代谢的粗提物、肽、酶、胞外聚合物、小双链 RNA 和热灭活的枯草芽胞杆菌孢子在抗包膜病毒感染中发挥的重要作用, 其机制是通过直接破坏病毒包膜、阻止膜融合、与病毒基因组 RNA 直接配对、催化裂解病毒 RNA、激活天然免疫反应等对抗病毒, 期望为包膜病毒的持续预防和治疗提供参考。

关键词 包膜病毒; 芽胞杆菌; 代谢产物; 病毒感染; 抗病毒机制

中图分类号 Q939.93 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2024)02-0097-12

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2024.02.010

Advances in Inhibition of Enveloped Virus Infection by *Bacillus* and Its Metabolites

YAO Yu-jie^{1,2}, MENG Guang-xun^{2,3}, HAN Ying-ying¹, LI Juan^{2,3*}

(1. Schl. of Health Sci. & Engin., Uni. of Shanghai for Sci. & Tech., Shanghai 200093;

2. Pasteur Inst. of Shanghai, Ctr. for Microbes, Devel. & Health, CAS Key Lab. of Mol.

Virol. & Immun., Uni. of Chinese Acad. of Sci., Shanghai 200031; 3. Nanjing Advanced Acad. of Life & Health, Nanjing 211135)

Abstract Enveloped viruses refer to viruses with a lipid bilayer membrane, such as influenza viruses, coronaviruses, etc., which cause many serious diseases worldwide annually and seriously threaten human health. The use of antiviral drugs is the main strategy for the prevention and treatment of viral infections, and *Bacillus* and its metabolites can inhibit infection with a variety of enveloped viruses. This article reviews the important roles played by crude extracts, peptides, enzymes, extracellular polymers, small double-stranded RNA and heat-inactivated *Bacillus subtilis* spores in anti-enveloped virus infection, and the mechanism is to directly destroy the viral envelope, prevent membrane fusion, directly pair with viral genomic RNA, catalyze the lysis of viral RNA, activate the natural immune response, etc., hopefully to provide a reference for the continuous prevention and treatment of enveloped virus.

Keywords enveloped virus; *Bacillus*; metabolites; virus infection; antiviral mechanism

根据表面是否具有脂质双层膜, 病毒可分为包膜病毒 (Enveloped Virus) 和无包膜病毒 (Non-enveloped Virus)。包膜病毒的脂质包膜来源于宿主细胞的细胞膜, 用于保护衣壳蛋白和

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32000077, 81830049); 中国科学院战略先导研究计划项目 (XDB29030303); 国际合作重点项目 (153831KYSB20190008); 国家重点基础研究发展计划项目 (2018YFA0507300); 国家重点研发计划项目 (2022YFC2304700); 上海市科技重大专项 (#2019SHZDX02); 学术带头人计划项目 (#20XD1403900); 江苏省创新能力建设计划 (研发机构) — 新型研发机构建设项目 (BM2020019)

作者简介: 姚俞洁 男, 硕士研究生。主要研究方向为细胞生物学。Tel: 021-54923102, E-mail: yyj2331567453@163.com

* 通讯作者。女, 助理研究员, 博士。主要研究方向为微生物学。Tel: 021-54923102, E-mail: lijuan@ips.ac.cn

收稿日期: 2023-02-16

病毒基因组,并在传播过程中发挥“运输囊泡”的作用^[1]。包膜病毒表面的糖蛋白介导了病毒包膜与宿主细胞膜之间的融合,根据其在病毒表面的排列、结构以及融合肽的位置分为三种类型^[2]。Ⅰ类包膜病毒表面糖蛋白是单链前体的三聚体形式,这类包膜病毒包括人类获得性免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)、流感病毒(Influenza virus)、冠状病毒(Coronavirus, CoV)、埃博拉病毒(Ebola virus)等^[3];Ⅱ类包膜病毒表面糖蛋白与一个“伴侣”蛋白紧密折叠为一个异质二聚体,这类包膜病毒包括寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)、蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus, TBEV)、西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)等^[4]。Ⅲ类包膜病毒表面糖蛋白结合了前两者的某些特征,这类包膜病毒包括弹状病毒(Rhabdoviruses)、疱疹病毒(Herpes virus)等^[5]。包膜病毒引起许多严重的疾病,对人类健康产生了极大威胁,并对社会造成了沉重的经济负担。芽胞杆菌(*Bacillus*)是一类内生孢子的革兰阳性菌,其广泛存在于自然环境中,在食品工业、养殖业以及医药等领域均具有重要的应用价值。在食品工业上,许多芽胞杆菌广泛用于食品发酵,包括枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)、环状芽胞杆菌(*Bacillus circulans*)和短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)等^[6]。在中国的茅台发酵过程中,地衣芽胞杆菌是300多种微生物中最丰富的一种;在韩国发酵食品产业中,地衣芽胞杆菌与酿酒酵母联用也常常作为一种生物技术被使用^[7]。在畜牧业上,枯草芽胞杆菌被广泛应用于动物饲料加工,例如在猪饲料中添加枯草芽胞杆菌可以显著改善猪肉的肉质和风味^[8],使用枯草芽胞杆菌发酵的玉米麦麸可以有效减少肥育猪肠道中的纤维素分解菌^[9]。在医药领域中,芽胞杆菌衍生的抗菌物质也一直是过去研究的重点^[10],芽胞杆菌对治疗尿路感染具有益作用^[11];凝结芽胞杆菌(*Bacillus coagulans*)分泌的凝固素(Coagulin)具有抑制病原体 and 食品腐败微生物活性的作用^[12];芽胞杆菌产生的脂肽表面活性素(Surfactin)具有

显著的抗真菌能力^[13];另一种脂肽丰原素(Fengycin)也可以通过抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)群体感应来消除金黄色葡萄球菌在体内的定植^[14]。近年来,芽胞杆菌及其代谢物的抗病毒作用多有报道,在动物养殖和农业生产方面具有重要的应用潜力。在动物养殖中,解淀粉芽胞杆菌可以显著提高感染了白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的小龙虾的存活率^[15];使用添加了芽胞杆菌的饲料喂养的罗非鱼在感染罗湖病毒(Tilapia lake virus, TiLV)后,体内病毒载量显著降低^[16];饲料中添加芽胞杆菌也减缓了鸽子环状病毒(Pigeon circovirus, PCV)对鸽子的感染^[17]。在农业生产方面,芽胞杆菌的代谢物可以抑制马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)对马铃薯的感染^[18],并在帮助番茄抵抗花生芽病毒(Groundnut bud necrosis tospovirus, GBNV)感染中发挥了显著的抗病毒作用^[19]。包膜病毒的防治依然是当今世界的一个难点和热点问题,由严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)引起的新冠病毒肺炎已全球大流行,截止到2021年12月,全球已有超过1亿人被感染^[20]。该包膜病毒具有高突变率和快速传播的特点,新出现的变异毒株导致现有抗病毒药物的效力显著降低^[21]。因此,开发新一代高效、廉价的抗包膜病毒药物仍然刻不容缓。芽胞杆菌及其代谢物疗法具有廉价性、方便性等优点,在包膜病毒防治工作中可能具有光明的应用前景,但是目前关于芽胞杆菌及其代谢物对包膜病毒感染的抑制作用及机制尚未见报道,因此,本文综述了包膜病毒感染宿主的过程,并重点介绍了芽胞杆菌及其代谢物对包膜病毒的抗病毒作用及机制。

1 包膜病毒感染细胞的过程

包膜病毒与无包膜病毒两者结构上最大的区别就是包膜病毒在蛋白质衣壳外有一层脂质包膜,而无包膜病毒没有这一层包膜。包膜病毒想入侵靶细胞就必须先将其病毒包膜与目标宿主的细胞膜进行膜融合。部分包膜病毒能够在细胞表面就与细胞膜融合,但是大多数包膜病毒都是被

内吞之后发生膜融合。在膜融合前,病毒需要吸附在靶细胞表面进而发生内吞作用进入细胞。如硫酸软骨素蛋白聚糖(Chondroitin-sulfate proteoglycans)和乙酰肝素蛋白聚糖(Heparan-sulfate proteoglycans)是大多数包膜病毒的附着因子,广泛分布于动物组织的细胞外基质和细胞表面,用于促进病毒和细胞的结合^[1]。同时,包膜病毒表面的糖蛋白(Glycoprotein)与细胞受体结合,如流感病毒入侵细胞时,病毒表面的糖蛋白HA(Haemagglutinin)与 α -2,3-唾液酸(Sialic acid, SA)受体或 α -2,6-唾液酸受体相结合,随后触发内吞作用^[22]。

包膜病毒被内吞进入内体系统,其由几类内体组成:早期内体(Early endosomes)、晚期内体(Late endosomes)、循环内体(Recycling endosomes)和溶酶体(Lysosomes)^[23]。一般情况下,包膜病毒通过将膜与内体膜融合从而逃离内体,而无包膜病毒必须破坏内体膜才能进入细胞质。大多数包膜病毒都需要宿主蛋白酶对其融合蛋白进行酶处理。这些宿主蛋白酶包括半胱氨酸蛋白酶 furin、丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 以及一些组织蛋白酶。值得注意的是这些宿主蛋白酶在酸性环境中发挥最佳作用,因此需要膜质子泵 V-ATPase 参与其中^[24]。例如流感病毒在入侵过程中,其表面三聚体糖蛋白 HA 就是一种典型的融合蛋白。前体蛋白 HA0 经过宿主蛋白酶切割后,形成二硫键相连的 HA1 亚基和 HA2 亚基,HA2 N 端的融合肽插入细胞膜中,触发膜融合^[25];埃博拉病毒的糖蛋白也是一种三聚体融合蛋白,由受体结合亚基和融合亚基组成,被 furin 蛋白酶切割后,糖蛋白的融合肽随即暴露,进而介导膜融合^[26];新冠病毒(SARS-CoV-2)膜表面的刺突糖蛋白(Spike glycoprotein, S 蛋白)也是三聚体的形式,由 S1 结合蛋白和膜融合蛋白 S2 组成,S1 蛋白包含了一个受体结合域(Receptor-binding domain, RBD),可以特异性识别人类 ACE2(Angiotensin-converting enzyme 2)受体,S 蛋白被宿主蛋白酶水解,产生 S2 蛋白激活膜融合^[27]。最终,通过膜融合形成的融合孔,病毒基因组被释放到细胞质中,病毒基因开始转录和复制。包膜病毒感染目标细胞的过程见图 1。

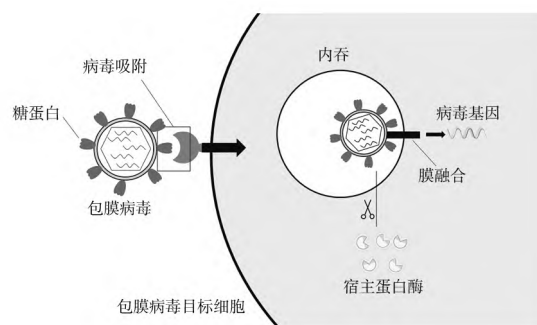


图 1 包膜病毒感染目标细胞的过程

Fig.1 The process of enveloped virus infecting target cells

根据参考文献[23-27]整理

modified according to references[23-27]

2 芽胞杆菌来源成分对包膜病毒的抑制作用

2.1 芽胞杆菌代谢粗提物对包膜病毒的抑制作用

Peng 等^[28]研究了地衣芽胞杆菌代谢粗提物对猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)的抗病毒活性。PEDV 是一种高传染性的猪包膜病毒,给猪养殖产业造成了巨大的经济损失。在动物实验中, PEDV 感染的仔猪饲喂在添加含有地衣芽胞杆菌发酵产品(*B. licheniformis*-fermented products, BLFP)的固态发酵培养物后,表现出较轻的临床症状。在毒性方面,饲喂添加 BLFP 的仔猪中没有明显的系统性病理病变,这表明在猪中使用 BLFP 是安全的。细胞毒性实验也表明地衣芽胞杆菌的粗提物对 Vero 细胞无毒性,在体外抗病毒功能性实验中,地衣芽胞杆菌粗提物与 PEDV 共孵育也显著降低了病毒的感染效率。Bastos 等^[29]研究发现,来自海洋的一种芽胞杆菌代谢提取物显著地抑制了丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)的吸附能力。关于这些芽胞杆菌代谢粗提物中具体的抗病毒活性成分尚未明确,还需要进一步研究。

2.2 芽胞杆菌代谢肽对包膜病毒的抑制作用

芽胞杆菌代谢肽可以抑制多种包膜病毒感染(表 1)。脂肽是芽胞杆菌分泌的一种小化合物,结构上包括由 7~10 个氨基酸形成的亲水环肽以及由 13~19 个碳原子形成的疏水脂肪酸链,根据其环肽的结构可以将其分为三种:表面活性素

(Surfactin)、丰原素 (Fengycin) 和伊枯草菌素 (Iturin)^[30]。其中,关于枯草芽胞杆菌的表面活性素的抗包膜病毒研究最为广泛。表面活性素的

两亲性结构可以同时与疏水的流感病毒包膜和其他亲水物质连接,与流感病毒包膜相互作用,达到破坏流感病毒包膜的目的^[31]。

表 1 抑制包膜病毒感染的芽胞杆菌代谢肽类

Table 1 *Bacillus* metabolic peptides inhibiting enveloped virus infection

代谢肽名称	代谢肽来源菌株	目标病毒	抗病毒机制	发表年份	参考文献
表面活性素 (Surfactin)	枯草芽胞杆菌 OKB105	西门利克森林病毒 (SFV)	直接破坏病毒包膜	1997	[32]
		单纯疱疹病毒 (HSV)			
		猪疱疹病毒 (SHV-1)			
		水泡性口炎病毒 (VSV)			
		猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)			
		猫嵌环状病毒 (FCV)			
		鼠脑心肌炎病毒 (EMCV)			
		猪流行性腹泻病毒 (PEDV)		抑制膜融合	2018
		传染性胃肠炎病毒 (TGEV)			
P18	枯草芽胞杆菌 UCM B-5007	流感病毒	类似于流感病毒中和抗体	2017	[31]
枯草菌素 (Subtilosin)	解淀粉芽胞杆菌 KATMIR A1933	单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1)	直接灭活病毒	2013	[34]
P34	芽胞杆菌 P34	马流感病毒 (EIV)	直接灭活病毒	2014	[35]

早在 1997 年,Vollenbroich 等^[32]就发现了枯草芽胞杆菌 OKB105 所分泌的表面活性素具有广谱的抗包膜病毒能力,对西门利克森林病毒 (Semliki Forest virus, SFV)、单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV)、猪疱疹病毒 (Suid herpes virus-1, SHV-1)、水泡性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV)、猿猴免疫缺陷病毒 (Simian immunodeficiency virus, SIV)、猫嵌环状病毒 (Feline calicivirus, FCV)、鼠脑心肌炎病毒 (Murine encephalomyocarditis virus, EMCV) 等包膜病毒均具有抗病毒活性。电子显微镜观察到,在经过表面活性素处理后,这些病毒的包膜和部分衣壳被破坏。有趣的是,Yuan 等^[33]报道了同样来自枯草芽胞杆菌 OKB105 的表面活性素可以在不破坏病毒包膜的情况下抑制猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 和传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastro enteritis virus, TGEV) 这两种包膜病毒在上皮细胞中的增殖,同时不会产生细胞毒性。体内实验也证明口服表面活性素可以降低 PEDV 对仔猪的感染。表面活性素具有一个较大的亲水头部和一个较小的疏水尾部,是一个天然的楔形脂质结构,可以像楔子一样插入病毒包膜中,Yuan 等^[33]

使用合成的相似荧光肽进行的光谱分析也证明了这一点。随后的膜融合抑制试验表明,表面活性素显著降低了包膜病毒与细胞膜融合的速度。膜融合是包膜病毒入侵的关键步骤,而脂质干 (Lipid stem) 是膜融合中间体的关键结构,该结构的形成需要病毒包膜的外小叶从不稳定的正曲率变为负曲率,膜曲率测定实验表明:表面活性素插入包膜后稳定了包膜外小叶的正曲率,从而抑制了膜融合。仅仅插入病毒包膜而不破坏包膜这一现象可能与表面活性素的浓度有关,Yuan 团队所用的表面活性素浓度为 20 μg/mL,在该浓度下,不会导致细胞死亡和抑制细胞增殖。而 Vollenbroich 等^[32]所报道的表面活性素虽然可以直接破坏病毒包膜,但是其浓度也足以导致细胞死亡。

除了常见的脂肽表面活性素之外,其他的抗病毒肽也逐渐被研究发现。解淀粉芽胞杆菌分泌的环状抗菌肽枯草菌素 (Subtilosin) 对单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes simplex virus-1, HSV-1) 具有显著的抗病毒作用^[34]; Starosila 等^[31]从枯草芽胞杆菌 UCM B-5007 中分离纯化得到一个新肽 P18, NCBI 蛋白序列分析结果表明,P18 的蛋白序列为 TVAAPSVFIFPPSDEQLK,其是流感病毒中和抗体的组成部分。P18 在 MDCK 细胞中显著抑制了流

感病毒的感染,即使是最高浓度 100 μg/mL 的 P18 也未造成细胞死亡。在动物实验中,P18 的抗病毒效果也与神经氨酸酶抑制剂(Tamiflu)相当。P18 的抗流感病毒机制可能与中和抗体相似,与病毒表面抗原结合后,激活补体,导致流感病毒的溶解; Silva 等^[35]研究发现,来自芽胞杆菌的抗病毒肽 P34 对马流感病毒(Equine influenza virus, EIV)具有杀病毒活性,对 EIV 复制的抑制率高达 99.9%。当 P34 与 EIV 在 37 ℃ 共孵育 6 h

后,TCID₅₀ 从 10^{4.5} 降至 10^{2.75}。

2.3 芽胞杆菌代谢酶对包膜病毒的抑制作用

芽胞杆菌属是酶的广泛来源^[7]。在食品业中,由芽胞杆菌产生的许多不同的食物酶,如 α-淀粉酶、β-淀粉酶、麦芽糖淀粉酶、乙酰乳酸脱羧酶和支链淀粉酶,最近都被评价为可以安全使用的食品酶^[36-38]。最近,许多研究表明,利用芽胞杆菌的代谢酶也可以抑制多种包膜病毒的感染(表 2)。

表 2 抑制包膜病毒感染的芽胞杆菌代谢酶类

Table 2 *Bacillus* metabolic enzymes that inhibit enveloped virus infection

代谢酶名称	代谢酶来源菌株	目标病毒	抗病毒机制	发表年份	参考文献
核糖核酸酶(Binase)	苏云金芽胞杆菌 Cb-527	甲型流感病毒 H3N2	催化裂解病毒 RNA;干扰核糖核蛋白的运输和细胞骨架的重构;调节免疫反应	2020	[39]
	短小芽胞杆菌 7P; 短小芽胞杆菌 B3073	甲型流感病毒 H1N1 中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV) 人冠状病毒 229E(HCoV-229E)		2017; 2020	[40-42]
脂肪酶(Lipase)	短小芽胞杆菌 SW41	家蚕核型多角体病毒(BmNPV)	与病毒包膜相互作用,破坏了病毒的完整性	2018	[43]

2.3.1 芽胞杆菌代谢的核糖核酸酶对包膜病毒的抑制作用 关于核糖核酸酶(Binase)的抗病毒研究,最早是使用胰腺核糖核酸酶治疗蝉传性脑炎^[44],但是人类细胞中的核糖核酸酶抑制蛋白会抑制哺乳动物来源的核糖核酸酶,而细菌来源的核糖核酸酶不会被抑制,并且在哺乳动物组织中仍然保留其酶活性。有研究发现来自苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的核糖核酸酶可以显著抑制甲型流感病毒 H3N2 的感染,预先接种核糖核酸酶保护了 50%感染甲型流感病毒 H3N2 的小鼠,其抗病毒能力与达菲(Tamiflu)相当^[39]。另外有研究也发现来自短小芽胞杆菌的核糖核酸酶对甲型流感病毒 H1N1 具有抗病毒作用且不会对 A549 细胞产生毒性。Binase 对甲型流感病毒预处理后,显著降低了病毒单周期复制后的病毒滴度。Binase 还降低了 A549 细胞中的 H1N1 病毒核蛋白(Nucleoprotein, NP)的 mRNA 表达水平和甲型流感病毒微基因组系统的 GFP 报告信号^[40]。此外,Binase 也具有广谱的抗冠状病毒作用,Muller 等^[42]研究表明 Binase 显著抑制了中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-

CoV)和人冠状病毒 229E(HCoV-229E)的感染且在分子水平上降低了病毒亚基因组 RNA 表达水平。这些研究结果暗示了病毒 RNA 很可能是 Binase 的一个重要靶点,Binase 催化裂解了病毒 RNA,从而阻断了病毒 mRNA 的转录,抑制了病毒蛋白的合成。除了降解感染细胞内 IAV RNA 的能力外,Binase 可能也会干扰核糖核蛋白的运输、细胞骨架的重构以及调节细胞内免疫反应等过程^[41]。除包膜 RNA 病毒外,Binase 对包膜 DNA 病毒也可能具有抗病毒作用。Mahmud 等^[45]研究结果显示,Binase 对含 DNA 的疱疹病毒也具有抗病毒作用,但其抗病毒机制尚未清楚,仍然需要进一步探索。

2.3.2 芽胞杆菌代谢的脂肪酶对包膜病毒的抑制作用 肠道微生物在宿主防御病毒入侵的过程中发挥着重要作用^[46]。家蚕核型多角体病毒(Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus, BmNPV)是一种属于杆状病毒的包膜双链 DNA 病毒,对世界范围内的蚕桑生产造成了巨大的危害。Liu 等^[43]从家蚕肠道内分离出一株短小芽胞杆菌 SW41,研究发现来自于该菌株的脂肪酶对 BmNPV 具有显

著的抗病毒作用。作者利用大肠埃希菌 BL21 (DE3) 表达系统表达并纯化重组了该脂肪酶, 体外抗病毒实验结果表明, 相对高浓度的重组脂肪酶降低了 BmNPV 的体外感染性, 其机制可能是直接作用于病毒包膜, 破坏了病毒的完整性, 从而导致宿主细胞中病毒 DNA 丰度和病毒阻断体 (Viral occlusion bodies) 的降低。

2.4 芽胞杆菌代谢胞外聚合物对包膜病毒的抑制作用

利用芽胞杆菌代谢的胞外聚合物可以通过不同机制抑制包膜病毒感染 (表 3)。Gugliandolo 等^[47]发现了一种新型的嗜热地衣芽胞杆菌 T14 所分泌的一种新胞外多糖 (EPS1) 具有抑制单纯疱疹病毒 2 型 (Herpes simplex virus-2, HSV-2) 感染的作用。EPS1-T14 可以抑制 HSV-2 在人外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中的复制, 研究结果表明, 新型 EPS1-T14 是一种水溶性、无细胞毒性的胞外聚合物, 可以作为一种免疫调节剂, 能够诱导辅助性 T 细胞 (Helper T cell, Th) 1 介导的细胞因子的分泌, 从而有助于细胞形成抗病毒免疫防御状态。

Lee 等^[48]发现 2 000 kDa 或 5 000 kDa 高分子量的聚- γ -谷氨酸 (Poly- γ -glutamic acid, γ -PGA) 是 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 信号通路的配体, γ -PGA 是由地衣芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌分泌的一种胞外聚合物, 通过激活 TLR4 介导的信号通路诱导各种促炎细胞因子和 I 型干扰素 (Interferon, IFN) 的产生。研究表明, 2 000 kDa 的 γ -PGA 在刺激人外周血单个核细胞 (PBMC) 和小鼠巨噬细胞 (Macrophage) 的 β -干扰素 (Interferon- β , IFN- β) 产生方面更加有效。在体外抗病毒功能性实验中, 通过严重急性呼吸道综合征冠状病毒 (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus, SARS-CoV) 的复制子证明了 2 000 kDa 的 γ -PGA 抑制了 SARS-CoV 的复制, 而在 HCV 感染期间, 经过 2 000 kDa 的 γ -PGA 处理过的 Huh7 细胞的 HCV 基因组滴度显著降低, 表明 2 000 kDa 的 γ -PGA 可以作为一种广谱抗病毒药物, 以对抗对 I 型 IFN 敏感的病毒, 如 SARS 冠状病毒、丙型肝炎病毒和流感病毒等包膜病毒。值得一提的是, Moon 等^[49]也证明了枯草芽胞杆菌产生的高分子量 γ -PGA 诱导了 I 型 IFN, 进而刺

激黏液病毒耐受蛋白 1 (Myxovirus resistant 1 protein, Mx1) 的表达。在一种模拟了人类先天免疫系统的 B6.A2G-Mx1 小鼠模型中, 高分子量 γ -PGA 治疗增强了小鼠的抗病毒状态, 并保护它们免受高致病性甲型流感病毒的感染。另有研究也发现, 霍氏芽胞杆菌 (*Bacillus horneckiae*) APA 产生的聚- γ -谷氨酸 (γ -PGA-APA) 在不影响细胞生长和死亡的浓度范围内, 在感染早期显著地抑制了 HSV-1 的入侵, 其抗病毒机制可能与核因子 κ B (Nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 驱动的先天免疫反应的激活有关^[50]。

当 NK 细胞与巨噬细胞一起培养时, γ -PGA 可以诱导 NK 细胞产生 γ -干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ)^[51]。这种免疫反应依赖于巨噬细胞来源的白介素-12 (Interleukin-12, IL-12) 以及通过自然杀伤细胞 (Natural killer cell, NK) 受体 NKG2D 及其配体 Rae-1 介导的 NK 细胞与巨噬细胞发生的细胞间相互作用。另一篇文章也证明了 γ -PGA 增加了小鼠体内抗病毒细胞因子的产生, 其中包括 IFN- β 和 IL-12, 同时增强了 NK 细胞和流感抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T lymphocytes, CTL) 活性^[52]。实验结果也表明, 小鼠在感染甲型流感病毒 H1N1 后, 鼻内注射 γ -PGA 显著提高了小鼠的生存率。

γ -PGA 在黏膜佐剂临床应用方面也具有一定的发展潜力。流感病毒血凝素 (HA) 疫苗在抗流感病毒方面发挥着重要作用, 其产生的靶向 HA 的特异性抗体可以拮抗流感病毒的入侵, 预防流感病毒感染^[53]。值得注意的是用流感病毒 HA 疫苗进行皮下免疫可以诱导病毒中和抗体的产生, 但是不能诱导细胞介导的免疫反应。研究发现, 相比单纯的流感病毒 HA 疫苗, 由 γ -PGA 疏水衍生物组成的纳米颗粒 (γ -PGA-NPs) 与流感病毒 HA 疫苗混合物在皮下进行免疫可以诱导更高的单核细胞 (Monocyte) 增殖以及 IFN- γ 、白介素-4 (Interleukin-4, IL-4) 和白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 的产生, 不仅增强了抗 HA 中和抗体的产生, 还增强了流感病毒特异性细胞介导的免疫反应, 包括细胞毒性 T 淋巴细胞的活性, 保护小鼠免受致死剂量的同源流感病毒的攻击^[54]。 γ -PGA-NPs 与流感病毒 HA 疫苗混合物在鼻内进行免疫也同样增强了小鼠对流感病毒感染的保护作用。

用^[55]。此外,γ-PGA 与明矾的结合产物(PGA/Alum)也显著增强了 H1N1 流感病毒疫苗抗原的免疫原性和 H1N1 疫苗对异源病毒的交叉保护效果^[56]。作者使用卵清白蛋白(Ovalbumin, OVA)作为模型抗原,研究发现,PGA/Alum 不仅显著增强了抗原到引流淋巴结的传递和抗原特异性免疫原性,还极大增加了 OVA 特异性抗体的产生以及细胞毒性 T 淋巴细胞活性和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)。这些结果提示了 γ-PGA 很可能是一种预防流感病毒很有潜力的疫苗佐剂组成成分。

Sanchez-Leon 等^[57]发现了一种由聚 γ-谷氨酸(γ-PGA)和细胞外磷壁酸(EC-TA)组成的新胞外聚合物(EPSp)。该 EPSp 从地衣芽胞杆菌 IDN-EC 中分离并鉴定。在体外抗病毒功能实验中,作者使用 EPSp 对四种包膜病毒,包括感染人

类的单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)、单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2)、感染动物的伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)和水疱型口炎病毒(VSV),以及一种感染动物的无包膜病毒进行了抗病毒功能测试。结果发现当 EPSp 用于抑制包膜病毒时,它显著降低了病毒的载量。同时, EPSp 在动物实验中被证明是无毒的。高分子量 γ-PGA(如 2 000 kDa 和 5 000 kDa)在之前的相关研究中已被证明具有抗病毒功能^[48],而 EPSp 的分子量(5 kDa)较小,这种具有大量负电荷的化合物已被证明对抑制包膜病毒的复制非常有效,而对无包膜病毒无效^[58],如戊聚糖聚硫酸盐(3 kDa)和葡聚糖硫酸盐(5 kDa)。此外,扫描电子显微镜结果发现, EPSp 的天然支架呈现为不均匀的形态,这种形态与其抗包膜病毒的机制可能有关,因为不均匀的表面可以与病毒包膜的相互作用,达到抑制包膜病毒感染的目的^[59]。

表 3 抑制包膜病毒感染的胞外聚合物
Table 3 Extracellular polymers that inhibit enveloped virus infection

胞外聚合物名称	胞外聚合物来源菌株	目标病毒	抗病毒机制	发表年份	参考文献
EPSI	地衣芽胞杆菌 T14	单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)	诱导 th1 型细胞因子	2014	[47]
聚-γ-谷氨酸(γ-PGA)	枯草芽胞杆菌 chungkookjang	SARS 冠状病毒;丙型肝炎病毒(HCV);甲型流感病毒 H1N1	激活 TLR4 信号通路,诱导 I 型 IFN;增强了 NK 细胞和流感抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞活性;	2012; 2013; 2017	[48-49, 52]
	霍氏芽胞杆菌 APA	单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)	在病毒复制的早期阶段抑制病毒	2017	[50]
	芽胞杆菌 natto	甲型流感病毒 H1N1	免疫佐剂,增强疫苗抗原免疫原性,诱导抗病毒因子产生	2009; 2007	[54-55]
EPSp	地衣芽胞杆菌 IDN-EC	疱疹病毒(HSV);伪狂犬病病毒(PRV);水疱型口炎病毒(VSV)	与病毒包膜相互作用	2020	[57]

2.5 芽胞杆菌小双链 RNA 对 HIV 的抑制作用

人类免疫缺陷病毒(HIV)是一种有包膜的逆转录病毒,人体免疫系统中的 CD4⁺T 淋巴细胞是其主要攻击目标,感染该病毒后,会使人体丧失免疫功能^[60]。抗 HIV 的天然产物大多数来源于植物和微生物的次生代谢产物^[61]。一株名为

MTCC5480 的枯草芽胞杆菌所产生的小双链 RNA 片段(3'-UUGGUACACGAGAUGGUUCGACUCGA-UGAAGGGC-5')被证明具有抗 HIV 的活性,其碱基互补性远高于之前报道的针对 HIV-1 的碱基 RNA^[62]。在 HIV-1 感染人外周血单个核细胞(PBMC)的过程中,纯化的小双链 RNA 可以在两

个阶段与 HIV-1 基因组 RNA 直接配对,首先在感染的早期阶段抑制逆转录,其次在整合后抑制病毒蛋白翻译,从而影响下游的复制过程,显著降低了病毒的产生。这个由枯草芽胞杆菌大量产生的具有抗 HIV 活性的 dsRNA (Double-stranded RNA) 片段具有成为新型抗 HIV 治疗药物的潜力。

2.6 热灭活的枯草芽胞杆菌孢子对包膜病毒的抑制作用

免疫佐剂是一种能增强机体对抗原的免疫应答能力或改变免疫应答类型的辅助物质,一般与抗原一起或预先注入机体。研究发现来自于枯草芽胞杆菌 PY79 的孢子在经过热灭活处理后,可以通过静电和疏水相互作用,以抗原载体的形式让灭活的 H5N1 (NIBRG-14) 流感病毒颗粒结合到表面^[63]。研究表明,相比于单独的病毒粒子,热灭活孢子和病毒粒子联用显著增强了体液和细胞介导的免疫应答,特异性免疫球蛋白 G1 (Immunoglobulin G1, IgG1), 免疫球蛋白 G2a (Immunoglobulin G2a, IgG2a) 和分泌性免疫球蛋白 A (Secretory immunoglobulin A, SIgA) 水平明显上升, Th1 细胞介导的白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 和 IFN- γ 以及 Th2 细胞介导的 IL-6 均显著增加。在动物实验中,小鼠在预先注射了吸附 20 ng NIBRG-14 血凝素的热灭活孢子后,完全抵御了 20 LD₅₀ 剂量的 H5N2 病毒感染。同时,在仅注射热灭活孢子的小鼠中,也观察到了 60% 的保护作用,并且完全抑制了 5 LD₅₀ 剂量的 H5N2 流感病毒感染。热灭活孢子对调节机体免疫反应也有重要作用,不仅可以刺激 TLR 介导的 NF- κ B 信号通路激活,而且可以招募 NK 细胞到肺部并且诱导树突状细胞 (Dendritic cell, DC) 成熟。另外,其他研究也发现枯草芽胞杆菌 HB3 的孢子可以作为禽流感 H9N2 的免疫佐剂,显著增强了 H9N2 流感病毒特异性免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 和促炎细胞因子白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 在先天免疫细胞中的表达^[64]。除了流感病毒以外,其他包膜病毒颗粒也已被证明可以有效的吸附在热灭活孢子的疏水表面^[65],因此,热灭活孢子可以作为一种有潜力的包膜病毒疫苗的免疫佐剂。

3 利用芽胞杆菌抑制包膜病毒感染的机制

3.1 直接灭活包膜病毒颗粒

不同于无包膜病毒,包膜病毒在结构上具有一层脂质双层膜,具有保护衣壳和病毒基因组的功能。芽胞杆菌来源的多种不同成分,包括肽、酶、胞外聚合物,可以与该脂质膜相互作用,破坏包膜病毒的结构和完整性,使其中的衣壳与核蛋白暴露出来,进而达到灭活包膜病毒的目的。值得注意的是,部分芽胞杆菌来源的成分在灭活包膜病毒的同时,也会对细胞产生毒性^[33]。

3.2 抑制包膜病毒在宿主细胞内增殖

抑制包膜病毒在宿主细胞内增殖可以分为三个阶段。第一个阶段是包膜病毒吸附阶段,芽胞杆菌来源的成分可以抑制包膜病毒的吸附能力,从而一开始就抑制了包膜病毒的感染^[29]。第二个阶段是“抑制包膜病毒发生膜融合”,膜融合是包膜病毒入侵宿主细胞的关键步骤,大多数包膜病毒都是在内体途径上发生膜融合,从而逃离内体^[23]。芽胞杆菌来源的成分可以通过稳定病毒包膜外小叶的正曲率来抑制膜融合,阻断了后续的病毒基因组释放,最终抑制包膜病毒的感染^[33]。第三个阶段是病毒逃离内体后,芽胞杆菌来源的成分可以通过直接催化裂解病毒 RNA 或与病毒基因组 RNA 直接配对来阻断包膜病毒感染中的逆转录、转录和翻译过程,阻止病毒基因组进行复制^[40,62]。芽胞杆菌通过这些机制能够有效抑制包膜病毒在宿主细胞内的增殖。

3.3 激活宿主免疫反应

在宿主细胞被病毒入侵感染之后,机体通过免疫系统启动天然免疫反应,病原体相关分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs)/损伤相关分子模式 (Damage associated molecular patterns, DAMPs) 被宿主病原体识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 识别,例如 RIG-I (RNA helicases retinoic acid-inducible gene-1)、TLRs (Toll-like receptors) 或 NLRs (NOD-like receptors) 等,导致先天性免疫信号激活,下游信号通路被启动,从而诱导各种抗病毒分子对抗入侵者^[66]。芽胞杆菌及其代谢物可以激活宿主的先天性免疫反应,更好地帮助宿主抵御病毒的入

侵。芽胞杆菌产生的新型胞外聚合物可以诱导大量的 Th1 型细胞因子,帮助细胞形成抗病毒状态或破坏被病毒感染的细胞来抑制病毒感染^[47]。

TLR4 是一种保守的 I 型跨膜蛋白 (Type I transmembrane protein), 与其配体结合后, 可以激活下游的两种不同的信号通路, 分别是髓系分化初级反应蛋白 88 (Myeloid differentiation primary-response protein 88, MyD88) 依赖性通路和由 β -干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β , TRIF) 转导的 Myd88 非依赖性通路, 最终诱导抗病毒因子的产生^[67-70]。芽胞杆菌代谢物是 TLR4 的配体, 在 TLR4 相关辅助蛋白髓系分化因子 2 (MD2) 和模式识别受体 (CD14) 的帮助下, 能够使干扰素调控因子 3 (Interferon regulatory factor-3, IRF-3) 形成二聚体, 进而诱导了 I 型 IFN 的产生, 最终抑制对

I 型 IFN 敏感的包膜病毒^[48]。

NK 细胞是一种淋巴细胞, 参与针对病毒、细菌和寄生虫的先天免疫反应, 在抵御病原体感染中发挥重要作用^[71]。在许多病原体入侵过程中, NK 细胞的激活需要辅助细胞的存在, 如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等。这些辅助细胞在病原体识别受体的帮助下, 能够识别不同的病原体, 并随后向 NK 细胞传递信号, 最终激活 NK 细胞^[72]。芽胞杆菌代谢物可以通过激活巨噬细胞产生 IL-12 来增强 NK 细胞的活化, 促进 NK 细胞分泌 IFN- γ ^[51]。

此外, 一些芽胞杆菌来源的成分也是具有发展潜力的免疫佐剂, 与疫苗一起进行免疫不仅显著增强了疫苗抗原的免疫原性, 还诱导了更高的单核细胞增殖以及细胞介导的 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4 和 IL-6 等抗病毒因子的产生^[54-56, 63]。芽胞杆菌对宿主免疫反应的激活见图 2。

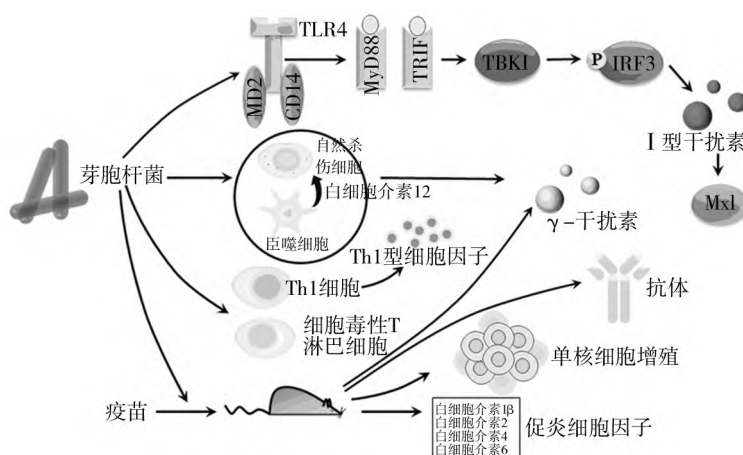


图 2 芽胞杆菌对宿主免疫反应的激活

Fig.2 Activation of the host immune response by *Bacillus*

根据参考文献[47,49,51-52,54-56,63,67-71]整理

modified according to references [47,49,51-52,54-56,63,67-71]

4 展 望

本文简要介绍了包膜病毒感染细胞的过程, 重点总结了芽胞杆菌及其代谢物对包膜病毒感染的抑制作用及其机制。不同芽胞杆菌及其代谢物的抗病毒机制和抗病毒谱各不相同, 如脂肽表面活性素等代谢产物通过破坏病毒包膜或阻止膜融合来抑制包膜病毒感染宿主细胞, 其对包膜病毒的抗病毒作用远强于无包膜病毒^[32]; 核糖核酸酶和部分胞外聚合物等代谢产物通过催化裂解病毒

RNA 或激活自身免疫反应来抑制包膜病毒感染, 这些代谢物的抗病毒谱并不限于包膜病毒; 而热灭活的孢子和 γ -PGA 作为两种有效的免疫佐剂, 显著地增强了包膜病毒疫苗抗原的免疫原性和细胞介导的免疫应答, 在预防包膜病毒感染中起到了重要作用。

包膜病毒种类繁多, 流感病毒作为最常见的包膜病毒, 其引发的季节性流感和全球流感大流行造成了相当高的发病率和死亡率, 据统计, 每年有超过 300 万人得重症, 约 25 万人死于流

感^[73]。冠状病毒也是较为常见的包膜病毒,2019 年爆发的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是一种具有包膜的正链 RNA 病毒^[74],全球已有超过 1 800 万人死于新型冠状病毒大流行^[75]。随着这些包膜病毒的突变和变异,新的抗病毒药物和疫苗需要持续更新以确保对新出现的病毒有效。近年来已有许多研究开始关注益生菌的抗病毒作用,一些口服益生菌可刺激呼吸道免疫系统并增加对病毒性呼吸道感染的抵抗力,益生菌在呼吸道感染中的有效性已在儿童、成人和老年人的临床试验中得到证实^[76]。芽胞杆菌及其代谢物对包膜病毒的抗病毒研究近年来逐渐增多,虽然许多体外实验和动物研究证明了芽胞杆菌对包膜病毒的抗病毒作用,但是其具体的抗病毒机制尚未十分深入,仍然需要进一步研究,为持续预防包膜病毒的感染提供科学严谨的实验依据和参考。总之,随着对芽胞杆菌代谢物研究的深入,病毒学、细菌学、药理毒理学方面的知识在逐步积累,医药卫生、产业界和公众对微生物互作相关的研究日渐重视,相信芽胞杆菌及其代谢物抗病毒的研究会逐步成熟并为公共卫生、维护健康、治疗疾病做出重要贡献。

致谢:感谢沈俊辰、陈梦丹博士及曹宪凯、姚羽慧、沈心语协助修正文本。

参考文献:

- [1] Marsh M, Helenius A. Virus entry: Open sesame[J]. Cell, 2006, 124(4): 729-740.
- [2] Falanga A, Tarallo R, Vitiello G, et al. Biophysical characterization and membrane interaction of the two fusion loops of glycoprotein B from herpes simplex type I virus[J]. PloS One, 2012, 7(2): e32186.
- [3] Harrison SC. Viral membrane fusion[J]. Virology, 2015, 479-480: 498-507.
- [4] Kielian M. Class II virus membrane fusion proteins[J]. Virology, 2006, 344(1): 38-47.
- [5] Backovic M, Jardetzky TS. Class III viral membrane fusion proteins[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2009, 19(2): 189-196.
- [6] Kimura K, Yokoyama S. Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 36-42.
- [7] Muras A, Romero M, Mayer C, et al. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(4): 609-627.
- [8] Du Y, Xu Z, Yu G, et al. A newly isolated *Bacillus subtilis* strain named WS-1 inhibited diarrhea and death caused by pathogenic *Escherichia coli* in newborn piglets[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1248.
- [9] Liu P, Zhao J, Guo P, et al. Dietary corn bran fermented by *Bacillus subtilis* MA139 decreased gut cellulolytic bacteria and microbiota diversity in finishing pigs[J]. Frontiers in Cellular & Infection Microbiology, 2017, 7: 526.
- [10] Tran C, Cock IE, Chen X, et al. Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and their mode of action[J]. Antibiotics, 2022, 11(1): 88.
- [11] Sourander L, Saarimaa H. Effect of long-term treatment of urinary tract infection with a single dose in the evening[J]. Chemotherapy, 1975, 21(1): 52-55.
- [12] Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85(1): 42-50.
- [13] Bartolini M, Cogliati S, Vileta D, et al. Stress-responsive alternative sigma Factor SigB plays a positive role in the antifungal proficiency of *Bacillus subtilis*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2019, 85(9): e00178-19.
- [14] Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference[J]. Nature, 2018, 562(7728): 532-537.
- [15] Lai Y, Luo M, Zhu F. Dietary *Bacillus amyloliquefaciens* enhance survival of white spot syndrome virus infected crayfish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 102(C): 161-168.
- [16] Waiyamtira P, Zoral MA, Saengtienchai A, et al. Probiotics modulate tilapia resistance and immune response against Tilapia Lake virus infection[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2020, 9(11): 919.
- [17] Tsai CY, Hu SY, Santos HM, et al. Probiotic supplementation containing *Bacillus velezensis* enhances expression of immune regulatory genes against pigeon circovirus in pigeons (*Columba livia*) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(5): 1695-1704.
- [18] Shen S, Li W. The inhibitory effects of metabolites from *Bacillus pumilus* on potato virus Y and the induction of early response genes in *Nicotiana tabacum*[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 152.
- [19] Vanthana M, Nakkeeran S, Malathi VG, et al. Induction of in planta resistance by flagellin (Flg) and elongation factor-TU (EF-Tu) of *Bacillus amyloliquefaciens* (VB7) against groundnut bud necrosis virus in tomato[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 137: 103757.
- [20] Boras B, Jones RM, Anson BJ, et al. Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL protease inhibitor for the potential treatment of COVID19[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6055.
- [21] Thomson EC, Rosen LE, Shepherd JG, et al. Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity[J]. Cell, 2021, 184(5): 1171-1187.e20.

- [22] Luo M. Influenza virus entry [J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2012, 726: 201-221.
- [23] Mercer J, Lee JE, Saphire EO, et al. SnapShot: Enveloped virus entry [J]. *Cell*, 2020, 182(3): 786-786.e1.
- [24] Benton DJ, Gamblin SJ, Rosenthal PB, et al. Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH [J]. *Nature*, 2020, 583(7814): 150-153.
- [25] Lear JD, Degrado WF. Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA-2 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(14): 6500-6505.
- [26] Lee JE, Fusco ML, Hessel AJ, et al. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor [J]. *Nature*, 2008, 454(7201): 177-182.
- [27] Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(21): 11727-11734.
- [28] Peng JY, Horng YB, Wu CH, et al. Evaluation of antiviral activity of *Bacillus licheniformis*-fermented products against porcine epidemic diarrhea virus [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 191.
- [29] Bastos JC, Kohn LK, Fantinatti-Carborggini F, et al. Antiviral activity of *Bacillus* sp. isolated from the marine sponge *Petromica citrina* against bovine viral diarrhea virus, a surrogate model of the hepatitis C virus [J]. *Viruses*, 2013, 5(5): 1219-1230.
- [30] Zhao H, Shao D, Jiang C, et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2017, 101(15): 5951-5960.
- [31] Starosila D, Rybalko S, Varbanetz L, et al. Anti-influenza activity of a *Bacillus subtilis* probiotic strain [J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2017, 61(7): e00539-17.
- [32] Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, et al. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis* [J]. *Biologicals*, 1997, 25(3): 289-297.
- [33] Yuan L, Zhang S, Wang Y, et al. Surfactin inhibits membrane fusion during invasion of epithelial cells by enveloped viruses [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(21): e00809-18.
- [34] Torres NI, Noll KS, Xu S, et al. Safety, formulation, and *in vitro* antiviral activity of the antimicrobial peptide subtilisin against herpes simplex virus type 1 [J]. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 2013, 5(1): 26-35.
- [35] Silva DSE, De Castro CC, Silva FDE, et al. Antiviral activity of a *Bacillus* sp. P34 peptide against pathogenic viruses of domestic animals [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 45(3): 1089-1094.
- [36] Silano V, Barat Baviera JM, Bolognesi C, et al. Safety evaluation of the food enzyme acetolactate decarboxylase from a genetically modified *Bacillus licheniformis* (strain NZYM-JB) [J]. *EFSA Journal*, 2018, 16(11): e05476.
- [37] Silano V, Bolognesi C, Castle L, et al. Safety evaluation of the food enzyme beta-amylase from genetically modified *Bacillus licheniformis* strain NZYM-JA [J]. *EFSA Journal*, 2017, 15(8): e04896.
- [38] Sewalt VJ, Reyes TF, Bui Q. Safety evaluation of two α -amylase enzyme preparations derived from *Bacillus licheniformis* expressing an α -amylase gene from *Cytophaga* species [J]. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 2018, 98: 140-150.
- [39] Andreeva IS, Mazurkova NA, Zakabunin AI, et al. Evaluation of the effectiveness of metabolites of bacterial strains *Bacillus thuringiensis* against human influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) *In Vitro* and *In Vivo* [J]. *Bulletin of Experimental Biology & Medicine*, 2020, 169(5): 653-656.
- [40] Shah Mahmud R, Muller C, Romanova Y, et al. Ribonuclease from *Bacillus* acts as an antiviral agent against negative- and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses [J]. *Biomed Research International*, 2017, 2017: 5279065.
- [41] Ulyanova V, Shah Mahmud R, Laikov A, et al. Anti-Influenza activity of the ribonuclease binase: Cellular targets detected by quantitative proteomics [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 8294.
- [42] Muller C, Ulyanova V, Ilinskaya O, et al. A novel antiviral strategy against MERS-CoV and HCoV-229E using binase to target viral genome replication [J]. *BioNanoScience*, 2017, 7(2): 294-299.
- [43] Liu R, Wang W, Liu X, et al. Characterization of a lipase from the silkworm intestinal bacterium *Bacillus pumilus* with antiviral activity against bombyx mori (Lepidoptera: Bombycidae) nucleopolyhedrovirus *In vitro* [J]. *Journal of Insect Science*, 2018, 18(6): 3.
- [44] Glukhov BN, Jerusalimsky AP, Canter VM, et al. Ribonuclease treatment of tick-borne encephalitis [J]. *Archives of Neurology*, 1976, 33(9): 598-603.
- [45] Shah Mahmud R, Efimova M, Mostafa A, et al. Antiviral activity of bacterial extracellular ribonuclease against single-, double-stranded RNA and DNA containing viruses in cell cultures [J]. *BioNanoScience*, 2016, 6(4): 561-563.
- [46] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(1): 55-71.
- [47] Gugliandolo C, Spano A, Lentini V, et al. Antiviral and immunomodulatory effects of a novel bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(4): 1028-1034.
- [48] Lee W, Lee SH, Ahn DG, et al. The antiviral activity of poly- γ -glutamic acid, a polypeptide secreted by *Bacillus* sp., through induction of CD14-dependent type I interferon responses [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(37): 9700-9708.
- [49] Moon HJ, Lee JS, Choi YK, et al. Induction of type I interferon by high-molecular poly-gamma-glutamate protects B6.A2G-Mx1 mice against influenza A virus [J]. *Antiviral Research*, 2012, 94(1): 98-102.
- [50] Marino-Merlo F, Papaiani E, Maugeri TL, et al. Anti-herpes simplex virus 1 and immunomodulatory activities of a poly-gam-

- ma- glutamic acid from *Bacillus horneckiae* strain APA of shallow vent origin [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2017, 101(20): 7487-7496.
- [51] Lee HR, Jeon JH, Rhie GE. The poly- γ -D-glutamic acid capsule of *Bacillus licheniformis*, a surrogate of *Bacillus anthracis* capsule induces interferon-gamma production in NK cells through interactions with macrophages[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 27(5): 1032-1037.
- [52] Kim EH, Choi YK, Kim CJ, et al. Intranasal administration of poly-gamma glutamate induced antiviral activity and protective immune responses against H1N1 influenza A virus infection [J]. *Virology Journal*, 2015, 12(1): 160.
- [53] Mallajosyula JK, Hiatt E, Hume S, et al. Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(3): 586-595.
- [54] Okamoto S, Yoshii H, Akagi T, et al. Influenza hemagglutinin vaccine with poly (gamma-glutamic acid) nanoparticles enhances the protection against influenza virus infection through both humoral and cell-mediated immunity[J]. *Vaccine*, 2007, 25(49): 8270-8278.
- [55] Okamoto S, Matsuura M, Akagi T, et al. Poly (gamma-glutamic acid) nano-particles combined with mucosal influenza virus hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice[J]. *Vaccine*, 2009, 27(42): 5896-5905.
- [56] Nguyen QT, Kwak C, Lee WS, et al. Poly- γ -glutamic acid complexed with alum induces cross-protective immunity of pandemic H1N1 vaccine[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1604.
- [57] Sanchez-Leon E, Bello-Morales R, Lopez-Guerrero JA, et al. Isolation and characterization of an exopolymer produced by *Bacillus licheniformis*: *In vitro* antiviral activity against enveloped viruses[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 248: 116737.
- [58] Mbemba E, Chams V, Gluckman JC, et al. Molecular interaction between HIV-1 major envelope glycoprotein and dextran sulfate[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1138(1): 62-67.
- [59] De Colli M, Massimi M, Barbetta A, et al. A biomimetic porous hydrogel of gelatin and glycosaminoglycans cross-linked with transglutaminase and its application in the culture of hepatocytes[J]. *Biomedical Materials*, 2012, 7(5): 055005.
- [60] Arenas-Pinto A, Judd A, Melvin D, et al. Learning and memory function in young people with and without perinatal HIV in England[J]. *PloS One*, 2022, 17(9): e0273645.
- [61] Huang YS, Lu Y, Chen CH, et al. Potent anti-HIV ingenane citerpenoids from *Euphorbia ebracteolata*[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(6): 1587-1592.
- [62] Imrat, Labala RK, Velhal S, et al. Small double-stranded RNA with anti-HIV activity abundantly produced by *Bacillus subtilis* MTCC5480 isolated from fermented soybean[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161: 828-835.
- [63] Song M, Hong HA, Huang JM, et al. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine[J]. *Vaccine*, 2012, 30(22): 3266-3277.
- [64] Lee JE, Kye YC, Park SM, et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 68.
- [65] Small DA, Moore NF, Entwistle PF. Hydrophobic interactions involved in attachment of a baculovirus to hydrophobic surfaces [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1986, 52(1): 220-223.
- [66] Chen X, Liu S, Goraya MU, et al. Host immune response to Influenza A virus infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 320.
- [67] Baccala R, Hoebe K, Kono DH, et al. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(5): 543-551.
- [68] Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling[J]. *Cell*, 2006, 125(5): 943-955.
- [69] Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, et al. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2008, 368(1): 94-99.
- [70] Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta[J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(4): 361-368.
- [71] Lanier LL. The origin and functions of natural killer cells[J]. *Clinical Immunology*, 2000, 95(1): S14-S18.
- [72] Newman KC, Riley EM. Whatever turns you on: Accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(4): 279-291.
- [73] Wang H, Li Z, Niu J, et al. Antiviral effects of ferric ammonium citrate[J]. *Cell Discovery*, 2018, 4(1): 14.
- [74] Wang MY, Zhao R, Gao LJ, et al. SARS-CoV-2: Structure, biology, and structure-based therapeutics development [J]. *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*, 2020, 10: 587269.
- [75] Wang H, Paulson KR, Pease SA, et al. Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: A systematic analysis of COVID-19-related mortality, 2020-21 [J]. *The Lancet*, 2022, 399(10334): 1513-1536.
- [76] Lehtoranta L, Pitkaranta A, Korpela R. Probiotics in respiratory virus infections[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2014, 33(8): 1289-1302.