



曾木圣教授现任中山大学肿瘤防治中心副主任/副院长,“国际EB病毒及相关疾病研究协会”主席、中国抗癌协会肿瘤微环境专业委员会主委、广东省肿瘤免疫与疫苗工程技术研究中心主任及2024 Gordon Research Conference鼻咽癌国际会议主席。入选“南粤百杰”项目,获第九届国家卫生健康突出贡献中青年专家等称号。主持国家杰出青年科学基金、国家重点研发计划及多项国家自然科学基金重点项目。长期专注于EB病毒致癌机制与靶向干预研究,首次发现EB病毒感染上皮细胞受体,阐明EB病毒感染和致癌机制,建立EB病毒创新疫苗体系,研发出多个候选疫苗并签署成果转化协议,发现并鉴定上皮-免疫双特征肿瘤细胞新亚型。以通信或共同通信作者身份在*Nat Microbiol*、*Cell Host Microbe*、*Cell Res*、*Cancer Cell*、*Lancet Digit Health*、*PNAS*、*J Clin Invest*等国际主流期刊上发表论文60多篇。以第一完成人身份分别获国家自然科学基金二等奖(2023)、教育部自然科学一等奖(2022)、广东省自然科学一等奖(2018和2023)和中国抗癌协会科技奖一等奖。H指数为70。

EBV感染和致癌机制与防治策略

张涛[#] 孙聪[#] 冯国开 徐森 钟茜* 曾木圣*

(华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 广东省鼻咽癌诊治研究重点实验室,
广东省恶性肿瘤临床医学研究中心, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060)

摘要 EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)在全世界范围内广泛感染人,可引起鼻咽癌、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、NK/T淋巴瘤等多种恶性肿瘤,给公共健康带来了极大的负担,但目前尚无针对EBV的有效药物和疫苗获批上市,这为EBV防治带来较大困难。为此,20年来实验室依托国家重点实验室平台、围绕EBV感染及干预研究主线,集中攻关突破瓶颈,建立了鼻咽上皮细胞易感染模型,通过深入研究EBV感染机制,发现了NRP1、NMHC-IIA及EphA2等多个病毒受体。同时,实验室还对EBV的致癌机制进行了探索和鉴定,发现了LMP2A、LMP1、BART2-5P等EBV转录产物与肿瘤形成、侵袭和转移相关,为EBV相关肿瘤的防治提供了重要科学依据。通过对EBV序列的分析,实验室鉴定出与鼻咽癌高风险相关的病毒亚型,为后续疫苗研发和肿瘤预防打下基础。近些年,实验室在EBV疫苗研发和高效中和抗体鉴定方面做了大量工作,先后研发了Fc gp350疫苗、Fc gp350二聚体疫苗、VLPs gp350三肽疫苗、gp350纳米颗粒疫苗、VSV gB疫苗、gH/gL疫苗、gB纳米颗粒疫苗、mRNA治疗性疫苗(trunc-LMP2A/EBNA1/EBNA3A)、gH/gL疫苗、gB疫苗、gp42鸡尾酒纳米颗粒疫苗,建立了EBV抗体噬菌体库,发现了多种针对gB、gH、gp42的高效中和抗体,为EB病毒防治提供了重要的策略。

关键词 EB病毒; 鼻咽癌; 感染机制; 疫苗

收稿日期: 2024-12-04

接受日期: 2025-01-06

国家重点研发计划(批准号: 2022YFC3400900)、国家自然科学基金(批准号: 82072982、U22A20322、82373092、82203231)、广东省创新创业团队计划(批准号: 2019BT02Y198)、广东省基础与应用基础研究基金(批准号: 2020B1212030004、2023A1515011790、2019A1515110140、2023A1515030229、2024A1515012812)、广东省科技创新战略专项资金(批准号: M202102)和中山大学人才计划(批准号: 22yklj08)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 020-87343790, E-mail: zhongqian@sysucc.org.cn; zengmsh@sysucc.org.cn

Received: December 4, 2024

Accepted: January 6, 2025

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2022YFC3400900), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82072982, U22A20322, 82373092, 82203231), the Guangdong Innovative and Entrepreneurial Research Team Program (Grant No.2019BT02Y198), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (Grant No.2020B1212030004, 2023A1515011790, 2019A1515110140, 2023A1515030229, 2024A1515012812), the Guangdong Special Support Program for Science and Technology Innovation (Grant No.M202102), and the Sun Yat-sen University Talent Program (Grant No.22yklj08)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-20-87343790, E-mail: zhongqian@sysucc.org.cn; zengmsh@sysucc.org.cn

The Mechanisms of EBV Infection and Carcinogenesis, and Strategies for Prevention and Treatment

ZHANG Tao[#], SUN Cong[#], FENG Guokai, XU Miao, ZHONG Qian^{*}, ZENG Musheng^{*}

(State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Key Laboratory of Nasopharyngeal Carcinoma Diagnosis and Therapy, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract EBV (Epstein-Barr virus) infection is highly prevalent in the population and has been linked to various malignant tumors, including nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, NK/T lymphoma, and others. These tumors have a significant impact on public health, underscoring the need for further research and intervention strategies. However, due to the unclear mechanism of infection and the lack of suitable epithelial cell infection models and animal models, no effective drugs or vaccines against EBV have been approved and marketed. This poses a significant challenge to the prevention and treatment of EBV. For this reason, considerable efforts have been focused on the study of EBV infection and intervention over the past two decades. This has involved establishing a model of NPECs (nasopharyngeal epithelial cells) susceptibility to infection, conducting an in-depth study of the EBV infection mechanism, and identifying NRP1, NMHC-IIA, and EphA2, along with other viral receptors. Additionally, the laboratory investigated and identified the oncogenic mechanism of EBV. The findings indicate that EBV transcription products, including LMP2A, LMP1, and BART2-5P, are associated with tumor formation, invasion, and metastasis. This provides a crucial scientific foundation for the prevention and treatment of EBV-related tumors. By analyzing EBV sequences, the laboratory has identified virus subtypes associated with a high risk of nasopharyngeal carcinoma, thereby establishing a foundation for subsequent vaccine development and tumor prevention. In recent years, the laboratory has conducted extensive research in the development of an EBV vaccine and the identification of efficient neutralizing antibodies. The contributions include the development of the Fc gp350 vaccine, the Fc gp350 dimer vaccine, the VLPs gp350 tripeptide vaccine, and the gp350 nanoparticle vaccine. Additionally, the laboratory has made significant advancements in the field of vaccine technology through the work on the VSV gB, gH/gL vaccine. The laboratory developed a gB nanoparticle vaccine, an mRNA therapeutic vaccine (trunc-LMP2A/EBNA1/EBNA3A), a gH/gL vaccine, a gB vaccine, and a gp42 cocktail nanoparticle vaccine as well. Additionally, the laboratory established a phage library of EBV antibodies and discovered a variety of highly effective neutralizing antibodies against gB, gH, and gp42, providing an important strategy for the prevention and treatment of EBV.

Keywords Epstein-Barr virus; nasopharyngeal carcinoma; infection mechanisms; vaccine

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是人类疱疹病毒家族的成员,属于 γ 疱疹病毒亚科。EBV是最早被发现与人类肿瘤相关联的病毒之一,也是全球最常见的病毒之一,90%以上的成年人在一生中感染过EBV^[1]。EBV最早于1964年从伯基特淋巴瘤细胞中分离出来^[2]。EBV是首个被确认与人类恶性肿瘤密切相关的病毒之一,它不仅是传染性单核细胞增多症的主要致病因素,还与多种癌症如鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)、伯基特淋巴瘤、

霍奇金淋巴瘤和胃癌密切相关^[3-6]。此外,EBV还能引发其他多种与免疫系统失调有关的疾病^[7]。

1964年,英国病理学家安东尼·爱泼斯坦(Anthony EPSTEIN)受到乌干达外科医生丹尼斯·伯基特(Denis BURKITT)的启发,从伯基特淋巴瘤细胞中分离出了一种新的病毒特征性的病毒颗粒,首次发现了EBV的存在^[2,8]。1973年,研究者在伯基特淋巴瘤和鼻咽癌患者的肿瘤组织中检测到EBV的存在,发现在几乎所有患者的肿瘤样本中都可检

出EBV DNA^[5]。Lloyd OLD及其同事^[9-11]开展相关流行病学研究,发现EBV抗体在伯基特淋巴瘤患者中的水平显著高于健康对照组。1978年,另一项流行病学研究检测了约42 000名乌干达儿童患伯基特淋巴瘤前的血清,发现之后罹患伯基特淋巴瘤的儿童大多数在确诊前EBV抗体滴度就已经升高,这为EBV可能导致伯基特淋巴瘤发生提供了初步线索^[12]。此外,血清学研究还发现,鼻咽癌患者血清中抗EBV抗体水平显著升高。这种高水平抗体的存在表明患者可能经历了EBV的持续感染^[13-14]。鼻咽癌的高发区集中在中国南部和东南亚等地区,而这些地区的患者常常显示出EBV感染的特征^[15]。在分子生物学和病毒学研究的推动下,近年来对于EBV的了解逐步深入。EBV感染人体后主要在B细胞中建立潜伏感染,这种潜伏状态使病毒能够长期存在并在免疫系统受到抑制时被重新激活^[12,16]。然而,EBV感染动物模型的缺乏极大地限制了EBV感染和致癌机制研究。EBV的感染机制目前尚未被完全阐明。EBV主要感染B细胞和上皮细胞,涉及病毒多个表面糖蛋白及多个细胞受体,且包括多个步骤。目前尚未明确EBV进入细胞所需的充分必要条件^[17]。此外,EBV的致癌机制至今尚未被完全阐明,尤其是在不同的细胞环境和组织中,病毒的致癌性有不同的表现。尽管目前已有疫苗开发的尝试,但尚无针对EBV的有效疫苗,这成为EBV预防的一个主要挑战^[18]。

我国是鼻咽癌的高发地区,EBV的感染与致癌机制研究是预防和治疗鼻咽癌的重要基础。深入了解EBV在鼻咽癌发生发展中的作用,有助于指导鼻咽癌的预防和治疗。本文将阐述我们实验室20年来的研究主线和工作成果,以期对未来EBV防治研究提供新的思路。

1 EBV感染机制

EBV感染与鼻咽癌的关系已经被普遍认可,为了减轻鼻咽癌对我国广大人民带来的疾病负担,有效的预防和干预措施亟待被提出。EBV受体的鉴定是早日实现鼻咽癌预防性疫苗研发、药物干预的突破口。缺乏体外高效感染EBV的上皮细胞模型是限制EBV感染机制的研究进展的一个重要原因^[19-20]。2009年,我们发现一种在鼻咽癌细胞和标本中过度表达的致癌基因*Bmi-1*,该基因可能通过抑制抑癌基因*PTEN*

诱导人鼻咽上皮细胞的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并增强其迁移性和侵袭性^[21]。实验室通过引入*Bmi-1*建立了两种永生的鼻咽癌上皮细胞(NPEC1-*Bmi1*和NPEC2-*Bmi1*)。与病毒基因诱导的永生化细胞不同,NPEC1-*Bmi1*和NPEC2-*Bmi1*可保留正常的p53检查点,避免了由病毒癌基因引起的一系列与鼻咽癌发生不相关的分子改变,可以更好地应用于鼻咽癌发病机制的研究,尤其是用于研究EBV在鼻咽癌发展中起到的作用^[22]。2012年,我们基于一例来自广东的未分化鼻咽癌患者建立了一个新的鼻咽癌细胞系——SUNE2,这个细胞系早期低表达LMP1、LMP2A、BARF1、EBER1和EBER2,并且显现出较强的成瘤能力,可用于研究鼻咽癌发生发展机制及其与EBV的关联^[23]。

建立永生化鼻咽上皮细胞模型后,我们开展了一系列EBV受体鉴定工作及相关感染机制的研究,先后发现了EBV糖蛋白(EBV gB)受体NRP1、EBV gH/gL受体NMHC-IIA和EphA2等。2015年,我们团队发现神经纤毛蛋白1(neuropilin 1, NRP1)可直接与EBV gB相互作用并促进EBV感染上皮细胞^[24]。NRP1可介导EBV与上皮细胞的融合,促使EBV通过巨胞饮作用和脂筏依赖性内吞作用进入鼻咽上皮细胞。同时,NRP1部分介导EBV激活的EGFR/RAS/ERK信号转导和NRP1依赖的受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)信号转导,从而促进EBV感染鼻咽上皮细胞。同年,我们发现引入*Bmi1*的永生化细胞在培养至高密度状态时,会有部分细胞突出形成球样细胞(sphere-like cells, SLCs)。这些SLCs能够被EBV高效感染,感染效率提升近100倍^[25]。基于这种高效感染的上皮细胞模型,我们发现gH/gL抗体能够有效阻断EBV感染SLCs,说明gH/gL对于EBV感染鼻咽上皮细胞(nasopharyngeal epithelial cells, NPECs)至关重要。之后我们通过免疫沉淀和液相色谱串联质谱蛋白质组学分析,发现gH/gL与非肌肉肌球蛋白重链IIA(non-muscle myosin heavy chain IIA, NMHC-IIA)存在相互作用。进一步研究发现NMHC-IIA密集聚集于NPEC SLCs表面,对EBV感染NPECs具有重要作用。2018年,在前期鉴定EBV感染受体的基础上,团队整合基因表达谱芯片和RNA沉默技术,发现肝配蛋白A型受体2(Ephrin receptor A2, EphA2)是EBV感染上皮细胞的重要受体,经CRISPR-Cas9技术敲除EphA2的上皮细胞几乎完全丧失对EBV的易感性,此外EphA2的中和抗体、配体EphrinA1及

抑制剂2,5-二甲基吡咯基苯甲酸均能显著阻断EBV感染,过表达EphA2可显著增强EBV感染。EphA2可以直接结合EBV gB和gH/gL,并促进EBV内吞和融合^[26]。这些有关病毒受体的研究为EBV相关疾病的干预提供了新靶点,完善了我们对EBV感染机制的理解。

2 EBV致癌机制

作为一种致癌病毒,EBV与鼻咽癌、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、胃癌等多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。EBV的致癌机制复杂,涉及多种途径。EBV能够通过其编码的多种基因例如*LMP1*、*EBNA1*等与宿主的基因组相互作用,从而促进细胞转化^[27-28]。*LMP1*可通过模拟肿瘤坏死因子受体的功能,激活下游的NF- κ B信号通路,从而促进细胞增殖、抑制凋亡,并促使肿瘤发生。同时,EBV还可以通过多种机制逃避宿主的免疫监视,例如通过表达*LMP1*和*LMP2A*,抑制T细胞和B细胞活化,从而使病毒能够在宿主体内长期存在,进而促进肿瘤发生^[29]。此外,EBV通过抑制宿主细胞内*p53*和*pRb*等抑癌基因的功能,抑制宿主细胞凋亡和促进肿瘤发生^[30]。

NPC是一种起源于鼻咽部上皮细胞的恶性肿瘤,高发于我国华南地区。EBV作为人类疱疹病毒,与鼻咽癌的发生和发展密切相关,绝大多数鼻咽癌患者的肿瘤细胞中均可检测到EBV的基因组。EBV的分布没有地域性,全球感染率超过90%,然而鼻咽癌的发病却呈现出明显的地域特征。为探索其中原因,实验室对EBV致癌机制进行了一系列相关研究。为了找到EBV的高危亚型,本实验室于2005年完成了首株鼻咽癌来源EBV的全基因组测序^[31]。2007年,本实验室发现EB病毒核抗原1(Epstein-Barr nuclear antigen 1, EBNA1)的一种亚型(V-val)具有功能优势,更倾向于感染鼻咽癌细胞,可通过增加自身或其他EB病毒及宿主基因表达水平来促进鼻咽癌发生^[32]。之后,随着测序技术的发展,本实验室继续深入研究EBV与鼻咽癌之间的因果关系,对270株EBV分离物进行大规模基因组测序,于2019年发现了两种高危EBV亚型,进一步证实了EBV是引发鼻咽癌的关键病因,为后续鼻咽癌发病风险早期检测和EBV疫苗的研发打下了重要基础^[33]。同年,实验室采用靶向测序技术,对EBV相关恶性肿瘤的病毒基因组整合情况进行全基因组分析,发现EBV整合富集在人类基因组的脆弱区域,整合区域靠近肿瘤抑制基因和

炎症相关基因,EBV整合到人类基因组内含子,可降低鼻咽癌肿瘤中炎症相关基因*TNFAIP3*、*PARK2*和*CDK15*的表达水平。这些发现为研究EBV介导恶性肿瘤发生的机制提供了另一种思路^[34]。2020年,我们通过对鼻咽癌组织和正常鼻咽组织的单细胞测序分析,发现一类具有上皮-免疫双重特征的肿瘤细胞,这类细胞与CD8⁺ T细胞抑制受体的表达呈正相关,且可以抑制T细胞产生IFN- γ ,具有免疫抑制特性,为进一步理解鼻咽癌微环境和鼻咽癌发生发展机制提供了全新视角^[35]。

EBV表达的潜伏膜蛋白2(latent membrane protein 2, LMP2)是鼻咽癌检测和治疗的理想靶点,100%鼻咽癌患者样本中可检出*LMP2A* mRNA。本实验室在2006年对鼻咽癌活检样本和正常鼻咽活检样本进行CTL表位序列分析,发现EBV存在地域相关的LMP2多态性^[36]。2010年,我们分析了33例鼻咽癌样本,发现在57.6%的样本中存在LMP2A过表达,且其主要分布于肿瘤浸润前沿。过表达LMP2A可提高鼻咽癌细胞的侵袭/迁移能力,诱导EMT,并刺激干细胞样肿瘤细胞的形成从而促进肿瘤的更新^[37]。之后,本实验室对LMP诱导鼻咽癌EMT的机制开展了进一步的研究,发现LMP1和LMP2A可通过协调作用,在EMT谱中产生一系列中间亚群,诱导鼻咽癌细胞从上皮样状态向上皮-间质混合状态转变,并促使细胞亚群表现出与肿瘤启动、血管生成、转移相关的一系列致癌特征^[38]。

2021年,我们发现在鼻咽癌活检组织、患者异种移植组织和处于不同EBV感染阶段的细胞中,EBV转录本表现出不同的m⁶A修饰。YTHDF1蛋白可识别m⁶A修饰的EBV转录本并破坏其稳定性,从而抑制EBV感染和复制,这项发现为治疗EBV相关癌症提供了新的靶点^[39]。Kruppel样因子4(Kruppel-like factor 4, KLF4)是一种锌指转录因子,可能与病毒感染相关。我们在研究中发现EBV感染后表达的即刻早期蛋白BZLF1可与METTL3相互作用,并抑制其表达。METTL3被抑制导致了KLF4转录因子对应的mRNA m⁶A修饰水平降低,减少了m⁶A阅读蛋白YTHDF2对KLF4的降解,从而促进了病毒感染。这一研究表明,EBV和宿主之间存在正反馈通路,EBV表达的即刻早期蛋白BZLF1可通过调控KLF4 mRNA m⁶A修饰水平,促进病毒感染,这进一步揭示了EBV介导鼻咽癌发生的促癌机制^[40]。

3 EBV预防与治疗

此前,国内外专家一直致力于开发EBV疫苗,但由于EBV感染和免疫机制不清晰,研发进展并不理想。在对EBV感染机制和致癌机制进行深入探索,并建立相关的细胞模型之后,本实验室展开了一系列EBV预防治疗策略研究及疫苗开发的工作。

实验室对gp350靶点进行了探索。2018年,实验室以Fc为基础构建了gp350二聚体抗原,与野生型gp350相比,我们构建的gp350二聚体抗原的免疫原性显著增强,且gp350二聚体抗原可诱导出针对EBV的高效中和抗体,有望成为预防EBV感染的有效候选疫苗^[41]。2020年,我们基于乙型肝炎核心抗原(HBc149)构建嵌合病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs),用以呈递EBV gp350受体结合域(receptor-binding domain, RBD)的三种肽段组合。结果显示,所有嵌合蛋白都能自组装成VLPs,且不同排列顺序的嵌合蛋白表位会诱导小鼠产生不同的免疫反应,其中的两种VLPs(149-3A和149-3B)可在小鼠体内诱导出针对EBV的高滴度中和抗体,从而有效阻止细胞被EBV感染^[42]。2021年,我们将60个拷贝的gp350以重复阵列的形式呈现在自组装纳米颗粒上,构建了gp350D123-LS和gp350D123-I3-01两种构建体。结果显示,在小鼠模型中诱导出的中和抗体滴度比相应的gp350单体高出65~133倍。此外,gp350D123-LS和gp350D123-I3-01疫苗可诱导Th2优势的免疫反应,gp350D123-LS可诱导出较单体gp350D123高滴度的总IgG和中和抗体。这些结果表明,基于gp350D123的纳米颗粒疫苗是一种较有前途的候选疫苗^[43]。

随后,本实验室围绕EBV gB进行了疫苗开发。gB是EBV感染B细胞和上皮细胞的重要融合蛋白,也是EBV预防性疫苗的理想靶抗原。我们筛选了健康EBV携带者和鼻咽癌患者中EBV gB的T细胞表位,基于亚洲人群中常见的7种HLA限制位点,发现了12种新型T细胞表位。这些表位在不同地域的EBV毒株中高度保守,为后续gB亚单位疫苗的开发奠定了基础^[44]。之后,我们分离了EBV gB的两种特异性中和抗体3A3和3A5并通过冷冻电镜解析了它们与EBV的结合位点,发现了这两种抗体能够通过干扰gB和细胞相互作用、激活gB等机制抑制膜融合,有效防止EBV感染B细胞和上皮细胞,避免人源化小鼠罹患EBV引起的淋巴细胞增生性疾病^[45]。这些

中和抗体的发现为EBV抗病毒疗法和疫苗研发提供了潜在的靶点。gB是EBV的理想靶标,但其免疫原性较弱。前期研究表明,纳米疫苗可较高效地诱导出针对EBV的中和抗体,因此,我们利用计算机辅助设计了表面展示gB的纳米颗粒gB-I53-50 NP,与可溶性gB蛋白相比,该疫苗在提高gB抗原的免疫原性的同时,还具有结构稳定性。动物免疫实验表明,该疫苗能够诱导更高效的EBV中和抗体,同时抑制上皮细胞和B细胞感染,并诱导更强的T细胞激活杀伤能力。在人源化小鼠模型中,gB纳米颗粒疫苗能够显著地保护人源化小鼠,防止其被EBV感染及罹患淋巴瘤^[46]。

gH/gL复合物是EBV进入上皮细胞和B细胞的关键糖蛋白,gp42在EBV交替感染上皮细胞和B细胞的过程中发挥着关键作用。因此,发现靶向gp42和gH/gL的高效中和抗体、针对gp42和gH/gL研发疫苗,对于阻断EBV感染意义重大。2022年,我们以gH为靶点,诱导并分离抗gH抗体6H2及其嵌合型C6H2,它们在上皮细胞中具有完全中和活性,在B细胞中具有部分中和活性,并在人源化小鼠中展现出显著的保护小鼠免受EBV感染的作用^[47]。gp42的C型凝集素结构域(C-type lectin domain, CTLD)在受体结合中起着关键作用,是中和抗体的主要靶标。2023年,我们分离了两种针对gp42 CTLD的兔抗体1A7和6G7,这两种抗体在EBV对B细胞的感染中显示出较好的中和活性,且6G7能有效保护人源化小鼠免受EBV诱导的淋巴瘤侵袭。在免疫血清中,1A7和6G7样抗体是防止EBV感染细胞的主要中和抗体^[48]。之后,我们基于EBV阳性个体构建了一个抗体噬菌体文库,从而鉴定出了两种针对gp42的人类单克隆抗体2B7和2C1。这些抗体可在保留gp42与人类白细胞抗原II类(human leukocyte antigen class II, HLA-II)受体的相互作用的同时有效中和体外和体内的EBV感染,且能够有效中和HLA-II阳性上皮细胞中的EBV感染^[49]。

针对不同糖蛋白的抗体组合可能在阻断EBV感染中发挥协同增效的作用,因此,我们研究了针对gH/gL-gp42复合物中不同糖蛋白的三种nAbs(抗gp42 5E3、抗gH/gL 6H2和抗gH/gL 10E4),发现5E3+6H2+10E4能够协同中和体外B细胞的感染,6H2+10E4能够协同中和上皮细胞的感染。此外,单用5E3或5E3+6H2+10E4鸡尾酒组合均可以保护人源

化小鼠免受EBV感染带来的致命威胁。对于中和抗体的前期研究为开发以gH/gL及gp42为靶点的EBV疫苗提供了重要基础。在gH/gL及gp42EBV疫苗的开发中,我们利用VSV载体展示EBV gB(VSV-ΔG-gB/gB-G)或gH/gL(VSV-ΔG-gH/gL),在小鼠模型中诱导出强烈的体液免疫反应,且VSV-ΔG-gB/gB-G、VSV-ΔG-gH/gL诱导产生的中和抗体分别可以阻止B细胞和上皮细胞被EBV感染^[50]。随后,我们以CpG寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotides, CpG)和单磷酸脂质A(monophosphoryl lipid A, MPLA)为分子佐剂联合递送gH/gL、gB和gp42,开发了一种鸡尾酒疫苗,这种疫苗可以高效激活树突状细胞和生发中心,诱导强烈的体液和细胞免疫。与单个gH/gL、gB和gp42纳米疫苗所诱导的IgG相比,含有三种纳米疫苗的鸡尾酒疫苗所诱导的IgG能使人源化小鼠感染致死剂量的EBV时获得更强的保护,且能持久保护小鼠免受EBV相关的淋巴瘤侵袭。

我们还对EBV相关肿瘤治疗性疫苗进行了探索。EBV在90%以上的人群中建立潜伏感染,在潜伏期间仅表达少数基因,免疫原性较低,不易被机体免疫系统所识别。其中,LMP2A、EBNA1、EBNA3A等能在肿瘤组织中表达的EBV潜伏蛋白是治疗疫苗的潜在靶点。我们针对EBV潜伏蛋白的丰富T细胞抗原区域设计了LMP2A、EBNA1和EBNA3A的截短型抗原(Trunc-LMP2A、Trunc-EBNA1和Trunc-EBNA3A),并采用了一种基于脂质体的mRNA传递系统实现了针对脾脏的特异性输送。结果显示,与全长抗原相比,截短型抗原在激活特异性免疫应答方面更为有效,且这些疫苗能有效激活小鼠的细胞和体液免疫并显著抑制肿瘤发展、延长小鼠生存时间^[51]。

4 总结与展望

EBV又称人类疱疹病毒4型,是一种广泛分布的疱疹病毒,可引起传染性单核细胞增多症,并与多种恶性肿瘤(如鼻咽癌、霍奇金淋巴瘤和Burkitt淋巴瘤)密切相关^[52]。EBV为双链DNA病毒,能够在宿主体内实现潜伏和裂解两种感染周期^[53]。EBV主要通过唾液传播,感染B细胞和上皮细胞。在感染过程中,病毒通过其外膜上的糖蛋白(如gp350、gH/gL和gp42)与宿主细胞表面受体(如CD21、EphA2和HLA II分子)结合,从而进入细胞^[54]。感染后的EBV可以潜伏于B细胞中,并通过调控宿主基因表达来维持

其潜伏状态,也可以诱导病毒裂解,导致病毒颗粒释放^[53]。EBV通过其合成的潜伏膜蛋白(如LMP1、LMP2)和核抗原(如EBNA1、EBNA2)调节宿主细胞的增殖和凋亡过程。这些病毒蛋白可以激活细胞内的信号转导通路(如NF-κB和PI3K/Akt通路),引起细胞不正常的增殖和免疫逃逸^[55-59]。此外,EBV感染还可以通过改变宿主的基因组稳定性和表观遗传修饰,进一步促进肿瘤的形成^[60]。

20年来,实验室围绕EBV感染及干预研究主线,建立了NPEC易感染模型,深入研究了EBV感染机制,发现了NRP1、NMHC-IIA和EphA2等病毒受体。同时,实验室还对EBV的致癌机制进行了探索和鉴定,并在EBV疫苗研发和EBV防治策略方面进行了探索。目前,EBV的感染机制和致癌机制尚不清楚,一方面,EBV感染上皮细胞和B细胞的必要受体及其时空关系还未被确证,另一方面,不同亚型的EBV相关癌症在不同地理区域的发病率差异显著,需要进一步探索研究以开发针对不同亚型EBV感染的靶向治疗策略。EBV的疫苗研发主要集中在预防初次感染和降低病毒相关疾病的发病率上,已有几种候选疫苗进入临床试验阶段,包括基于gp350的重组蛋白疫苗和mRNA疫苗。尽管一些疫苗在动物实验和初步的人体试验中表现出免疫反应,但疫苗的有效性和持久性仍需进一步研究。

EBV的防治工作任重道远,未来,我们将继续探索EBV感染机制,确定EBV感染上皮细胞及B细胞过程中必需的抗体和确切的抗体组合,并研究受体之间的时空互作关系,从而基于此确定EBV预防性疫苗的最佳免疫原。我们还将持续关注EBV不同亚型在致病性和感染性等方面的特征及其保守序列,从而针对性地开发疫苗。通过分析不同人群的EBV感染滴度和抗体特征,我们可以更好地确定疫苗接种条件和最佳接种时间,并针对不同人群开发相应的EBV预防性或治疗性疫苗。另外,EBV感染动物模型的建立也是未来的一个重要方向。EBV的致癌机制和其在肿瘤患者的疾病进展过程中的影响也是值得探索的一个方向。总之,EBV感染及相关疾病的预防与诊治意义重大,期待未来在各方协同努力下攻克难关,取得突破。

参考文献 (References)

- [1] YOUNG L S, RICKINSON A B. Epstein-Barr virus: 40 years on

- [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(10): 757-68.
- [2] EPSTEIN M A, ACHONG B G, BARR Y M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. [J]. *Lancet*, 1964, 1(7335): 702-3.
- [3] TAKADA K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma [J]. *Mol Pathol*, 2000, 53(5): 255-61.
- [4] HJALGRIM H, ASKLING J, ROSTGAARD K, et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(14): 1324-32.
- [5] ZUR HAUSEN H, SCHULTE-HOLTHAUSEN H, KLEIN G, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx [J]. *Nature*, 1970, 228(5276): 1056-8.
- [6] BURKITT D. A sarcoma involving the jaws in African children [J]. *Br J Surg*, 1958, 46(197): 218-23.
- [7] CAPONE G, FASANO C, LUCCHESI G, et al. EBV-associated cancer and autoimmunity: searching for therapies [J]. *Vaccines*, 2015, 3(1): 74-89.
- [8] SUN C, FANG X Y, BU G L, et al. Structural basis of Epstein-Barr virus gp350 receptor recognition and neutralization [J]. *Cell Rep*, 2025, 44(1): 115168.
- [9] HENLE G, HENLE W, CLIFFORD P, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1969, 43(5): 1147-57.
- [10] LEVY J A, HENLE G. Indirect immunofluorescence tests with sera from African children and cultured Burkitt lymphoma cells [J]. *J Bacteriol*, 1966, 92(1): 275-6.
- [11] OLD L J, BOYSE E A, OETTGEN H F, et al. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, 56(6): 1699-704.
- [12] DE-THÉ G, GESER A, DAY N E, et al. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study [J]. *Nature*, 1978, 274(5673): 756-61.
- [13] DE-THÉ G, DAY N E, GESER A, et al. Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study: a review [J]. *IARC Sci Publ*, 1975(11 Pt 2): 3-16.
- [14] HENLE W, HENLE G, HO H C, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1970, 44(1): 225-31.
- [15] JIA W H, FENG B J, XU Z L, et al. Familial risk and clustering of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China [J]. *Cancer*, 2004, 101(2): 363-9.
- [16] MUNZ C. Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(11): 691-700.
- [17] COHEN J I. Epstein-Barr virus infection [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(7): 481-92.
- [18] CUI X, SNAPPER C M. Epstein Barr virus: development of vaccines and immune cell therapy for EBV-associated diseases [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 734471.
- [19] SHANNON-LOWE C D, NEUHIERL B, BALDWIN G, et al. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 7065-70.
- [20] TSAO S W, TSANG C M, PANG P S, et al. The biology of EBV infection in human epithelial cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(2): 137-43.
- [21] SONG L B, LI J, LIAO W T, et al. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3626-36.
- [22] KONG Q L, GUAN S, GUO B H, et al. Pre-malignant nasopharyngeal epithelial cell models [J]. *Ai Zheng*, 2009, 28(10): 1012-5.
- [23] DONG J Q, LI M Z, LIU Z G, et al. Establishment and characterization of a novel nasopharyngeal carcinoma cell line (SUNE2) from a Cantonese patient [J]. *Chin J Cancer*, 2012, 31(1): 36-44.
- [24] WANG H B, ZHANG H, ZHANG J P, et al. Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6240.
- [25] XIONG D, DU Y, WANG H B, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(35): 11036-41.
- [26] ZHANG H, LI Y, WANG H B, et al. Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(2): 1-8.
- [27] LAM K M, CRAWFORD D H. The oncogenic potential of Epstein-Barr virus [J]. *Crit Rev Oncog*, 1991, 2(3): 229-45.
- [28] SAHA A, ROBERTSON E S. Mechanisms of B-cell oncogenesis induced by Epstein-Barr virus [J]. *J Virol*, 2019, 93(13): e00238-19.
- [29] BAUER M, JASINSKI-BERGNER S, MANDELBOIM O, et al. Epstein-Barr virus-associated malignancies and immune escape: the role of the tumor microenvironment and tumor cell evasion strategies [J]. *Cancers*, 2021, 13(20): 5189.
- [30] FIERTI A O, YAKASS M B, OKERTCHIRI E A, et al. The role of Epstein-Barr virus in modulating key tumor suppressor genes in associated malignancies: epigenetics, transcriptional, and post-translational modifications [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(1): 127.
- [31] ZENG M S, LI D J, LIU Q L, et al. Genomic sequence analysis of Epstein-Barr virus strain GD1 from a nasopharyngeal carcinoma patient [J]. *J Virol*, 2005, 79(24): 15323-30.
- [32] MAI S J, OOKA T, LI D J, et al. Functional advantage of NPC-related V-val subtype of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 compared with prototype in epithelial cell line [J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(1): 141-6.
- [33] XU M, YAO Y, CHEN H, et al. Genome sequencing analysis identifies Epstein-Barr virus subtypes associated with high risk of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(7): 1131-6.
- [34] XU M, ZHANG W L, ZHU Q, et al. Genome-wide profiling of Epstein-Barr virus integration by targeted sequencing in Epstein-Barr virus associated malignancies [J]. *Theranostics*, 2019, 9(4): 1115-24.
- [35] JIN S, LI R, CHEN M Y, et al. Single-cell transcriptomic analysis defines the interplay between tumor cells, viral infection, and the microenvironment in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cell Res*, 2020, 30(11): 950-65.
- [36] ZHANG N H, ZHANG X S, LI J, et al. Sequence analysis of the CTL epitopes in transmembrane region of latent membrane protein 2 of Epstein-Barr virus derived from nasopharyngeal car-

- cinoma cells [J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(5): 566-9.
- [37] KONG Q L, HU L J, CAO J Y, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(6): e1000940.
- [38] ZHU N, XU X, WANG Y, et al. EBV latent membrane proteins promote hybrid epithelial-mesenchymal and extreme mesenchymal states of nasopharyngeal carcinoma cells for tumorigenicity [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(8): e1009873.
- [39] XIA T L, LI X, WANG X, et al. *N*⁶-methyladenosine-binding protein YTHDF1 suppresses EBV replication and promotes EBV RNA decay [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(4): e50128.
- [40] DAI D L, LI X, WANG L, et al. Identification of an *N*⁶-methyladenosine-mediated positive feedback loop that promotes Epstein-Barr virus infection [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100547.
- [41] ZHAO B, ZHANG X, KRUMMENACHER C, et al. Immunization with Fc-based recombinant Epstein-Barr virus gp350 elicits potent neutralizing humoral immune response in a BALB/c mice model [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 932.
- [42] ZHANG X, ZHAO B, DING M, et al. A novel vaccine candidate based on chimeric virus-like particle displaying multiple conserved epitope peptides induced neutralizing antibodies against EBV infection [J]. *Theranostics*, 2020, 10(13): 5704-18.
- [43] KANG Y F, ZHANG X, YU X H, et al. Immunization with a self-assembled nanoparticle vaccine elicits potent neutralizing antibody responses against EBV infection [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(6): 2476-86.
- [44] CHEN H, ZHANG X, ZHANG S, et al. T cell epitope screening of Epstein-Barr virus fusion protein gB [J]. *J Virol*, 2021, 95(10): e00081-21.
- [45] ZHANG X, HONG J, ZHONG L, et al. Protective anti-gB neutralizing antibodies targeting two vulnerable sites for EBV-cell membrane fusion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(32): e2202371119.
- [46] SUN C, KANG Y F, FANG X Y, et al. A gB nanoparticle vaccine elicits a protective neutralizing antibody response against EBV [J]. *Cell Host Microbe*, 2023, 31(11): 1882-97, e10.
- [47] HONG J, ZHONG L, ZHENG Q, et al. A neutralizing antibody targeting gH provides potent protection against EBV challenge *in vivo* [J]. *J Virol*, 2022, 96(8): e0007522.
- [48] WU Q, ZHONG L, WEI D, et al. Neutralizing antibodies against EBV gp42 show potent *in vivo* protection and define novel epitopes [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12(2): 2245920.
- [49] ZHAO G X, FANG X Y, BU G L, et al. Potent human monoclonal antibodies targeting Epstein-Barr virus gp42 reveal vulnerable sites for virus infection [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(5): 101573.
- [50] KONG X W, ZHANG X, BU G L, et al. Vesicular stomatitis virus-based Epstein-Barr virus vaccines elicit strong protective immune responses [J]. *J Virol*, 2022, 96(9): e0033622.
- [51] ZHAO G X, BU G L, LIU G F, et al. mRNA-based vaccines targeting the T-cell epitope-rich domain of Epstein Barr virus latent proteins elicit robust anti-tumor immunity in mice [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(35): e2302116.
- [52] DAMANIA B, KENNEY S C, RAAB-TRAUB N. Epstein-Barr virus: biology and clinical disease [J]. *Cell*, 2022, 185(20): 3652-70.
- [53] MÜNZ C. Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(11): 691-700.
- [54] ESCALANTE G M, MUTSVUNGUMA L Z, MUNIRAJU M, et al. Four decades of prophylactic EBV vaccine research: a systematic review and historical perspective [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 867918.
- [55] ZIMMER-STROBL U, STROBL L J. EBNA2 and Notch signaling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes [J]. *Semin Cancer Biol*, 2001, 11(6): 423-34.
- [56] WOOD V H, O'NEIL J D, WEI W, et al. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFβ signaling pathways [J]. *Oncogene*, 2007, 26(28): 4135-47.
- [57] MA N, LU J, PEI Y, et al. Transcriptome reprogramming of Epstein-Barr virus infected epithelial and B cells reveals distinct host-virus interaction profiles [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10): 894.
- [58] SCHOLLE F, BENDT K M, RAAB-TRAUB N. Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt [J]. *J Virol*, 2000, 74(22): 10681-9.
- [59] HENDERSON S, ROWE M, GREGORY C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death [J]. *Cell*, 1991, 65(7): 1107-15.
- [60] TEMPERA I, LIEBERMAN P M. Epigenetic regulation of EBV persistence and oncogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 26: 22-9.