DOI: 10. 13350/j. cjpb. 241207

论著。

雌激素水平下降对小鼠接种狂犬疫苗后的 免疫作用影响*

张军杰1,钱华2,田莉1,吴鑫宇1,刘乐乐1,蒋玉芬1,徐琳乐1,李梦华1,郑文文1,郑学星1** (1. 山东大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系,山东济南 250012; 2. 山东大学第二医院口腔医学中心)

【摘要】 目的 探索绝经后雌激素水平下降对狂犬疫苗免疫效果的影响。 方法 通过卵巢切除术(OVX)建立雌激 素缺乏小鼠模型,术后2周检测小鼠的雌激素水平和子宫重量验证模型。将狂犬病毒株 LBNSE 株免疫 OVX 小鼠和正 常小鼠,连续观察 21 d 临床指征,评估疫苗的安全性。通过 FVAN 试验测定免疫后 2、4、8 周时中和抗体水平,并使用 ELISA 测定血清中狂犬病毒特异性 IgG1 与 IgG2a 抗体亚型的比例;采用流式细胞术检测小鼠淋巴结中 B 细胞和树突 状细胞(DC)募集/活化情况。 结果 卵巢切除后小鼠雌激素水平和子宫重量显著低于对照组,表明成功构建雌激素 缺乏小鼠模型;接种疫苗后,OVX 小鼠未出现明显临床症状,并在攻毒保护实验中全部存活;4 周和 8 周的中和抗体水 平低于对照组,但高于有效保护水平 0.5 IU/mL 可 100%保护小鼠; IgG1 与 IgG2a 抗体亚型的比例显示, OVX 小鼠偏 向 Th2 型免疫应答;在早期免疫反应阶段,OVX 小鼠淋巴结募集和活化的 CD19CD40 B 细胞和 CD86CD11c Dc 细胞的 结论 雌激素缺乏小鼠接种狂犬疫苗后无不良反应,抗体水平虽低于对照组,但能 比例上升与下降速度快于对照组。 够保护病毒攻击。本研究为绝经期女性接种狂犬疫苗免疫效果提供相关的理论依据,有助于缓解绝经期妇女暴露于狂 犬病毒时的恐慌焦虑。

【关键词】 狂犬病疫苗;中和抗体;卵巢切除;绝经期

【文献标识码】

【文章编号】 1673-5234(2024)12-1425-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Dec.;19(12):1425-1430.]

Estrogen deficiency affects the immune responses induced by rabies vaccination

ZHANG Junjie¹, QIAN Hua², TIAN Li¹, WU Xinyu¹, LIU Lele¹, JIANG Yufen¹, XU Linyue¹, LI Menghua¹, ZHENG Wenwen¹, ZHENG Xuexing¹ (1. School of public health, Cheeloo Collage Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Center of Stomatology, the Second Hospital of Shandong University) * **

[Abstract] Objective To investigate whether immune alterations due to estrogen deficiency in postmenopausal women affect infection protection after rabies vaccination. Methods Female BALB/c mice aged 8-10 weeks were randomized into LBNSE-OVX, LBNSE and Mock groups. The LBNSE-OVX group underwent bilateral ovariectomy, while sham surgery was carried out in the LBNSE group, both of which were immunized with recombinant RABV LBNSE. Then, the pathogenicity of LBNSE in the three groups were monitored. After immunization, the titers of rabies virus neutralizing antibodies were measured by the fluorescent antibody virus neutralization assay(FVAN) and the levels of IgG1and IgG2a antibodies against RABV were determined by the Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) The proportions of activated dendritic cells or B cells in the lymph nodes of three groups were detected by flow cytometry. Results The serum estrogen levels and uterine weights of the OVX mice were significantly lower than those underwent sham sugery. All the three groups mice showed no abnormal behaviour or neurological signs during the observation period. The average titers of neutralizing antibodies in the LBNSE-OVX group were slightly lower(p>0.05) than LBNSE group at 4 weeks, but still showed 100% protection against RABV. Moreover, the LBNSE mice exhibited more even Th1- and Th2-type immune responses, while LBNSE-OVX mice tended to exhibit Th2-dominant humoral immune responses in the later stage of immunity. The percentage of CD19+CD40+ B cells and CD86+CD11c+ DCs in the lymph nodes of the LBNSE-OVX group grew and declined at a rapider rate than that of the other two groups. Conclusion In this study, our data

[【]基金项目】 国家重点研发计划项目(No. 2022YFC2305005);国家自然科学基金项目(No. 82272335);山东省自然科学基金项目(No. ZR2021MC010, ZR2021QH140);济南市临床医学科技创新计划项目(No. 202328045);山东省口腔组织再生重点实验室开放课题(No. SDDX202103).

[【]通讯作者】 郑学星, E-mail: zhengxuexing@sdu. edu. cn

illustrated that the protective efficacy of rabies vaccination was slightly decreased by estrogen deficiency, but it offered sufficient protection against RABV, helping alleviate fears and anxieties related to rabies virus exposure during menopause.

[Keywords] rabies vaccine; neutralizing antibodies; ovariectomy; menopause

狂犬病是狂犬病病毒(Rabies virus, RABV)引起 的,感染谱广,病死率100%,被列为我国国家法定乙 类传染病[1]。狂犬病每年给全球造成约 59 000 人死 亡[2]和29~215亿美元的经济损失[3],在亚洲每年约 3.5万人死于犬介导的狂犬病,约占全球死亡人数的 60%[4]。目前尚无有效的狂犬病治疗方法,在暴露前 或暴露后及时进行疫苗接种,是现有的对抗该疾病的 有效策略[5]。狂犬病疫苗有效性主要是通过快速产生 的中和抗体滴度水平检测确定,细胞免疫也被证实参 与相关的免疫过程[6]。

大多数疫苗临床试验都集中在年龄 18~65 岁的 健康人群中,不包括老年人、孕妇、绝经后女性和儿 童[7]。然而,绝经期是每个女性一生中都要经历的过 程,约占女性生命周期中的1/3,由于卵巢功能衰退, 雌激素水平减低伴发一系列的生理病理性变化。女性 绝经后免疫功能发生重要变化,随着雌激素水平下降, 细胞和体液免疫功能呈现衰退趋势[8-9],同时炎症反应 增加,促炎细胞因子 $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ 等表达增加^[10]。 目前绝经后女性雌激素水平缺乏及免疫功能的变化是 否会影响狂犬疫苗接种后中和抗体的及时产生,是否 影响狂犬病疫苗的接种效果尚不清楚。

为了明确绝经后雌激素缺乏对狂犬疫苗免疫效果 的影响,本研究通过构建卵巢切除(Ovariectomy, OVX)小鼠模型来模拟并探索绝经后女性接种狂犬疫 苗后体液和细胞免疫反应,为绝经期妇女接种狂犬疫 苗提供一定的理论依据。

材料与方法

1 材料

- 1.1 细胞、病毒株 BHK-21细胞(乳仓鼠肾细胞)和 LBNSE病毒株为山东大学公共卫生学院卫生检验学 实验室保存;小鼠神经瘤母细胞(Neuro-2a)购自中国 医学科学院基础医学研究所。
- 1.2 主要试剂 细胞培养基 DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(赛默飞世尔科技(中国)有限公 司);红细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司);丙酮 (国药集团化学试剂有限公司);即用型 1.25%阿佛丁 溶液(南京爱贝生物科技有限公司); 鼠源 FITC 标记 的 RABV N 蛋白单抗(美国 Fu-jirebio 公司); 鼠源 APC-CD19、FITC-CD40、PE-Cy7-CD11c、PE-CD86 单 克隆抗体(美国 BD 公司); TruStain FcX™ 抗鼠

CD16/32 抗体(美国 BioLegend 公司); Elisa 雌激素检 测试剂盒(武汉伊莱瑞特有限公司); HRP 标记的羊抗 鼠 IgG1、IGg2a(艾博抗(上海)贸易有限公司); BALB/c 小鼠(济南星康生物技术有限公司)。

2 方法

- 2.1 卵巢切除(OVX)小鼠模型的建立 术前高压消 毒手术器械,选取6~8周龄的雌性BALB/c小鼠,按 体重腹腔注射 1.25%阿佛丁溶液行全身麻醉。小鼠 麻醉后,剃毛、消毒,切开背部皮肤,结扎卵巢血管,切 除卵巢,对照组切除卵巢周围相同大小的脂肪,缝合伤 口,术后送回原环境,持续观察2周以确保康复。术后 处死小鼠(n=4/组)ELISA 检测血清雌激素水平和子 宫重量。
- 2.2 动物免疫分组 将6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 随机分成三组: Mock 组、LBNSE 组和 LBNSE-OVX 组。三组小鼠都通过后肢肌肉注射进行免疫处理。其 中, Mock 组注射 100 µL 无血清 DMEM, 而 LBNSE 组和 LBNSE-OVX 组注射 100 μL LBNSE 毒株(等同 于 $1 \times 10^{8.5} \text{ TCID}_{50}$)。
- 2.3 疫苗安全性评估 方法 2.2 中 Mock 组、 LBNSE 组和 LBNSE-OVX 组小鼠(n=8/组)免疫后 21 d 持续监测每组小鼠进食及精神状态,记录体重变 化,并绘制相应的体重变化曲线,初步评价疫苗的安全 性。
- 2.4 感染保护实验 在疫苗免疫后第4周,每只小鼠 后肢肌肉注射 100 μL 100 IMLD₅₀ RABV 攻击毒株, 随后连续观察 21 d,在 21 d 内密切观察三组小鼠的饮 食状况、精神状态、狂犬病相关临床症状并绘制临床症 状评分图和生存曲线
- 2.5 中和抗体水平测定 方法 2.2 中 Mock 组、 LBNSE 组和 LBNSE-OVX 组小鼠免疫后第 2、4、8 周,每个时间点每组取8只小鼠眼眶采血,收集血清, 采用荧光抗体病毒中和试验(FVAN)测定抗 RABV 病毒中和抗体(VNAs)水平[11]
- 2.6 特异性抗体 IgG1、IgG2a 亚型检测 免疫后 2、 4、8周,每个时间点每组取5只眼眶采血分离血清。 96 孔板用特异性灭活全蛋白 SRV9 包被,将小鼠血清 2 倍倍比稀释,加入 IgG1-HRP、IgG2a-HRP 抗体,4 ℃孵育过夜后用 PBST 洗涤,加入 ABTS,柠檬酸, 30 % H₂O₂ 配成显色液,37 ℃避光显色 30 min,1% SDS 中止显色,在 405 nm 波长检测吸光度值。

2.7 腹股沟淋巴结 DC 细胞和 B 募集活化检测 免疫后第 3、6、9 天,每组取 5 只 BALB/c 小鼠腹股沟淋巴结研磨成单细胞悬液,加入 APC-CD19、FITC-CD40 抗体检测 B 细胞募集/活化情况,加入 PE-Cy7-CDllc、PE-CD86 抗体检测 DC 募集/活化情况,用流式细胞仪进行检测。

3 统计分析

采用 SPSS24.0 软件对数据进行分析,组间比较采用单因素方差分析、独立样本 t 检验等检验统计方法,P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 成功构建 OVX 小鼠模型

为了观察卵巢切除后雌激素缺乏小鼠模型构建成功与否,术后2周检测血清雌激素水平和子宫重量。实验结果如图1所示,与对照组相比,OVX组小鼠血清雌激素水平和子宫重量显著降低,提示雌激素缺乏小鼠模型构建成功。

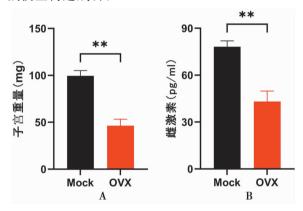


图 1 术后小鼠血清雌激素水平和子宫重量变化(n=4,**P<0.01)
Fig. 1 Changes in serum estrogen levels and uterine weight
in mice after ovariectomy

2 OVX 小鼠免疫接种的安全性评价

三组小鼠分别免疫后连续观察 21 d,结果显示三组小鼠精神活动状态和进食情况表现良好,行为正常,没有出现狂犬狂犬病体征,所有的小鼠体重均呈现增长趋势。LBNSE-OVX组小鼠的体重变化与其它两组比较,未见明显统计学差异。这一结果初步表明接种狂犬疫苗后OVX小鼠生长未受到不良影响,对小鼠无明显致病性(图 2,3)。

3 感染保护性评价

为了研究卵巢切除是否会影响小鼠的感染保护率,免疫后第4周进行了攻毒实验,对小鼠的临床状态进行评分,每天记录小鼠的死亡状况,持续21d,结果见图4和图5。Mock组小鼠先后出现双眼紧闭、后肢瘫痪、饮食减少、弓背蜷缩、精神萎靡等临床症状,且在21d内全部死亡。LBNSE组和LBNSE-OVX组小鼠

饮食活动、精神状态一切正常,未出现狂犬病毒发病体征,且在观察期内全部存活,表明 OVX 小鼠接种疫苗后可以完全保护免受 RABV 的攻击。

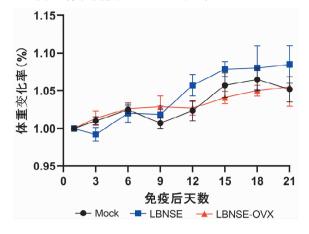


图 2 免疫小鼠体重变化率(n=8)
Fig. 2 Body weight change rate in the vaccinated mice

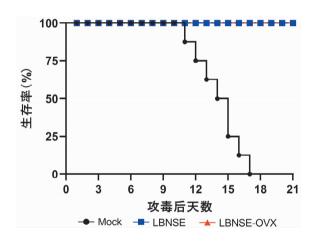


图 3 RABV 感染保护生存曲线(n=8) Fig. 3 survival numbers of the mice were recorded after RABV challenge

4 中和抗体水平测定

为了确定雌激素缺乏是否会影响狂犬疫苗接种后的免疫反应,在免疫后2周、4周、8周采血检测小鼠血清中特异性中和抗体水平。结果如图5所示,LBNSE组小鼠在2周、4周、8周时的中和抗体均值分别为3IU/mL,4.93IU/mL,1.29IU/mL;抗体效价先上升后下降,在4周时最高,8周时降低。OVX小鼠在2周、4周、8周时的中和抗体均值分别为3.375IU/mL,2.017IU/mL,1.126IU/mL;抗体效价在2周时最高,4周、8周逐渐降低,三个时间点效价均高于0.5IU/mL。与对照小鼠相比,OVX小鼠在4周时抗体相比对照组略低,但差异无统计学意义。这些数据表明绝经后雌激素缺乏不会影响小鼠快速产生保护性水平的RABV中和抗体。

5 RABV 特异性抗体 IgG1、IgG2a 亚型检测

采用 ELISA 法测定免疫后 2、4、8 周小鼠血清中

RABV 特异性 IgG1、IgG2a 抗体亚型。结果如图 6 所示,在免疫后 2、4、8 周,两组小鼠 IgG1 和 IgG2a 没有显著差异,表明 OVX 小鼠狂犬疫苗接种后 RABV 特异性 IgG1、IgG2a 的产生没有影响。免疫球蛋白亚型是反应 Th 细胞介导的免疫反应潜在倾向的指标,Th1型细胞分泌 IFN-γ诱导 B 细胞产生 IgG2a,Th2 型分泌 IL-4 诱导产生 IgG1,结果显示 OVX 小鼠可以诱导产生 Th1型和 Th2型免疫应答。比较免疫后 2、4、8周三个时间点 IgG1和 IgG2a的效价发现,对照组小鼠诱导的 Th1、Th2型免疫反应较为均衡,而 OVX 小鼠免疫后期更倾向于 Th2型体液免疫应答。

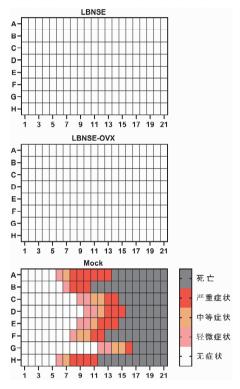


图 4 小鼠感染后临床症状评分图(n=8)

Fig. 4 The scores of clinical signs of the mice were recorded after RABV challenge

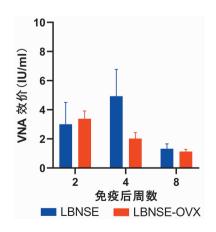
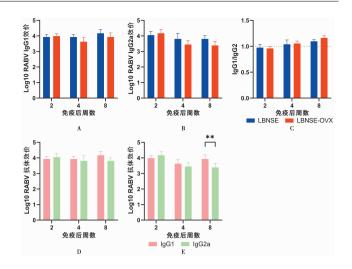


图 5 免疫小鼠后的中和抗体效价水平(n=8) Fig. 5 VAN titer(IU/ML)of immunized weeks



A~D ELISA 法测 LBNSE、LBNSE-OVX 组小鼠血清中 IgG1、IgG2a 抗体效价水平,** P<0.01,n=5

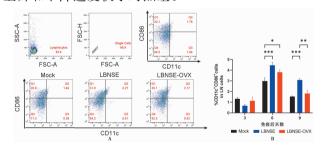
图 6 免疫小鼠血清中 RABV 特异性 IgG1 和 IgG2a 亚型抗体

A-D ELISA method was used to measure the levels of IgG1 and IgG2a antibody titers in the serum of LBNSE and LBNSE-OVX groups of mice

Fig. 6 Levels of RABV-specific IgG1 and IgG2a subtype antibodies in serum of immunized mice

6 DC 的募集活化情况

树突状细胞是专业的抗原呈递细胞,对免疫反应的启动和协调至关重要。CD11c分子是树突状细胞表面的典型标志分子,当树突状细胞活化成熟,表面的CD86分子表达上调。图7A是圈门策略,图7B是代表性流式图,图7C是淋巴结CD86、CD11cDc细胞募集/活化水平比较。从图7C可以看出,与对照组相比,免疫后第3天OVX小鼠CD86CD11cDC细胞迅速活化,到第9天显著下降,表明OVX小鼠在免疫反应早期淋巴结募集活化CD86CD11cDC细胞的比例上升和下降速度快于对照组。



A 圈门策略 B 代表性流式图 C DC 细胞活化水平图,* P < 0.05,* * P < 0.01,* * * P < 0.001,n = 5。

图 7 淋巴结 DC 细胞活化水平比较(n=5)

A The gating strategies of DC cells from Lymph node B The presentative flow cytometric plot C Percentages of activated DC cells, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, n=5.

Fig. 7 Activations of Dc cells in inguinal lymph nodes (LNs) from the immunized mice

7 B细胞募集与活化情况

为了研究 OVX 小鼠接种狂犬疫苗后的体液免疫 反应,采用流式细胞术检测免疫反应早期淋巴结 CD19CD40 B细胞的应答情况。结果如图七所示,与对照组相比,免疫后 OVX 小鼠迅速募集活化更高比例 CD19CD40 B细胞,随后活化 B细胞比例逐渐下降,至第9天与对照组达到显著性差异(图 8)。表明在免疫反应早期 OVX 小鼠淋巴结募集活化的 CD19CD40B细胞的比例产生和下降速度快于对照组。

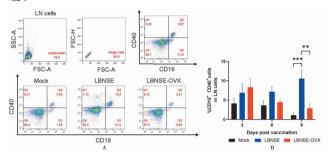


图 8 腹股沟淋巴结 B细胞活化水平比较

A The gating strategies of B cells from Lymph node B The presentative flow cytometric plot C Percentages of activated B cells, **P<0.01, ***P<0.001, n=5

Fig. 8 Activations of B cells in inguinal lymph nodes (LNs) from the immunized mice

讨论

女性进入绝经期后,随着卵巢功能衰退和雌激素水平显著下降,免疫系统重塑导致免疫功能减弱^[12-13]。研究发现,绝经后女性的总淋巴细胞数量减少,特别是B淋巴细胞和 CD4⁺T 淋巴细胞数量降低^[14],而接受卵巢切除手术的女性 CD8⁺细胞的比例有所增加^[15], CD19 B细胞^[16]、血清 IL-4 和 IFN-γ 浓度以及 CD4 与CD8 细胞比值均有所下降^[17]。另一项研究显示,绝经后女性的循环 T细胞和单核细胞数量有所增加^[18]。此外,一些临床研究显示雌二醇在免疫功能调节中发挥重要作用,向体外培养的人淋巴细胞中添加雌二醇可以增加免疫球蛋白的分泌^[19]。最近有研究称,绝经期是重症 COVID-19 危险因素^[20],年轻女性或雌激素水平较高的女性不太可能出现严重的 COVID-19 并发症^[21],与疾病预后有一定相关^[22]。

考虑到女性绝经期免疫功能的改变,那么这一生理变化是否也会影响到疫苗接种后的免疫效果? 既往研究显示,与年龄匹配的接种改良型痘苗病毒安卡拉株(MVA)对照组相比,卵巢切除手术降低了雌性恒河猴的特异性 T 细胞、B 细胞和 IgG 的产生^[23]。类似地,在 HSV-2 感染的小鼠模型中,卵巢切除减弱了疫苗的保护效果,并降低了对阴道攻击的防御^[24]。对于接种季节性流感疫苗的小鼠,观察到卵巢切除对疫苗效果产生了负面调节作用^[25]。与此同时,年轻成年女性产生的抗体和 T 细胞反应比绝经后女性更强,且激

素治疗后,血浆雌激素水平与 IgG 滴度呈现正相 关^[26]。在接种 H1N1 疫苗的研究中,成年女性相较于 成年男性或老年女性,展现出更强的 IL-6 和抗体反 应,且这些女性产生的抗体水平与雌二醇浓度呈正相 关^[27]。但是上述研究使用的动物模型不同、模型免疫 时间不同、病毒类型与疫苗类型不同等,仍不能得出普 适性的免疫理论。

绝经期相关的雌激素水平衰减是否会影响狂犬病疫苗接种后的免疫效果,特别是能否快速产生足够的中和抗体来抵御病毒侵袭,目前仍不清楚。我们的研究中,卵巢切除的小鼠接种狂犬疫苗后行为活动表现一切正常,并且在面对狂犬病毒感染时能够快速产生保护性水平的中和抗体来进行防御,产生的中和抗体高于WHO设定的保护性阈值(0.5 IU/mL)。虽然卵巢切除的小鼠在接种狂犬疫苗后产生的中和抗体水平随着时间逐渐下降,并且在免疫后第四周与对照组成年雌性小鼠之间产生抗体水平的差距最大,但这种差异在统计学上并不显著。

树突状细胞(Dendritic cell, DC)是疫苗接种的重 要决定因素[28],它们在抗原特异性的细胞免疫中发挥 重要作用。当外来抗原进入机体,DC会识别结合抗 原后成熟活化转移至淋巴结通过 MHC I 型和 MHC Ⅱ型分子呈递给 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞,启动特异性免 疫反应,活化的 CD4+T 细胞诱导 Th1 和 Th2 型免疫 反应[29],诱导 B 细胞增殖和分化为浆细胞产生特异性 抗体[30]。与对照组相比,LBNSE-OVX组小鼠免疫后 腹股沟淋巴结 CD86CD11cDC 细胞和 CD19CD40B 细 胞活化比例上升和下降速度更快在。Th1 型细胞分泌 IFN-γ诱导 B细胞产生 IgG2a, Th2 型细胞分泌 IL-4 诱导产生 IgG1, IgG2a 在 Th1 型免疫应答中受到刺 激,被认为是狂犬病疫苗诱导的免疫球蛋白的主要形 式[31]。ELISA 结果显示,免疫后 2、4、8 周 IgG1、 IgG2a 抗体效价,发现 OVX 小鼠接种疫苗免疫反应 后期更偏向 Th2 型免疫应答, 而对照组 Th1 和 Th2 型免疫应答较为均衡。

综上所述,本研究发现卵巢切除小鼠雌激素缺乏会影响到狂犬病疫苗接种后的免疫反应,但可以产生达到保护性水平的中和抗体,这对于缓解绝经期女性在面临狂犬病毒攻击时的焦虑和恐慌情绪十分有益。本研究为绝经期女性狂犬病疫苗接种后的免疫反应提供了一定的理论参考。

【参考文献】

- [1] Cao H, Li H, Luan N, et al. A rabies mRNA vaccine with H270P mutation in its glycoprotein induces strong cellular and humoral immunity[J]. Vaccine, 2024, 42(5):1116-1121.
- [2] Li M, Fang E, Wang Y, et al. An mRNA vaccine against rabies

- provides strong and durable protection in mice [J]. Front Immunol, 2023:14:1288879.
- [3] Hampson K, Coudeville L, Lembo T, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies[J]. PLoS Neglect Trop D, 2015, 9(4):e0003709.
- [4] WHO. WHO expert consultation on rabies: third report[M]. World Health Organization, 2018:1012.
- [5] Yu PC, Dan M, He Y, et al. A novel mRNA rabies vaccine as a promising candidate for rabies post-exposure prophylaxis protects animals from different rabies viruses[J]. Microb Pathog, 2023, 185;106425.
- [6] Zhang H, Jin H, Yan F, et al. An inactivated recombinant rabies virus chimerically expressed RBD induces humoral and cellular immunity against SARS-CoV-2 and RABV[J]. Virol Sin, 2023, 38(2):244-256.
- [7] Ciarambino T, Barbagelata E, Corbi G, et al. Gender differences in vaccine therapy: where are we in COVID-19 pandemic [J]. Monaldi Arch Chest D, 2021, 91(4).
- [8] Hoffmann JP, Liu JA, Seddu K, et al. Sex hormone signaling and regulation of immune function[J]. Immunity, 2023, 56(11):2472-2491
- [9] Zhang C, Yu D, Mei Y, et al. Single-cell RNA sequencing of peripheral blood reveals immune cell dysfunction in premature ovarian insufficiency[J]. Front Endocrinol, 2023, 14:1129657.
- [10] Han A.Kim JY, Kwak-Kim J, et al. Menopause is an inflection point of age-related immune changes in women [J]. J Rep Immunol, 2021, 146:103346.
- [11] Wan J, Yang J, Wang Z, et al. A single immunization with core shell structured lipopolyplex mRNA vaccine against rabies induces potent humoral immunity in mice and dogs[J]. Eme Microb Infect, 2023, 12(2):2270081.
- [12] Reame NE, Lukacs JL, Olton P, et al. Differential effects of aging on activin A and its binding protein, follistatin, across the menopause transition[J]. Fert Steril, 2007, 88(4):1003-1005.
- [13] Gameiro CM, Romao F, Castelo-Branco C. Menopause and aging:changes in the immune system-a review[J]. Maturitas, 2010,67(4):316-320.
- [14] Kamada M, Irahara M, Maegawa M, et al. Transient increase in the levels of T-helper 1 cytokines in postmenopausal women and the effects of hormone replacement therapy [J]. Gynecologic Obs Investigat, 2001. 52(2):82-88.
- [15] Patel MV, Shen Z, Rodriguez-Garcia M, et al. Endometrial cancer suppresses CD8 + T cell-mediated cytotoxicity in postmenopausal women[J]. Front Immunol, 2021, 12:657326.
- [16] Fischer V, Haffner-Luntzer M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis[J]. Seminars Cell Developmental Biol, 2022. Elsevier.
- [17] Kumru S, Godekmerdan A, Y? lmaz B. Immune effects of

- surgical menopause and estrogen replacement therapy in perimenopausal women[J]. J Rep Immunol, 2004, 63(1);31-38.
- [18] Abildgaard J, Tingstedt J, Zhao Y, et al. Increased systemic inflammation and altered distribution of T-cell subsets in postmenopausal women[J]. PLoS One, 2020, 15(6); e0235174.
- [19] Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs[J]. J All Clin Immunol, 1999, 103 (2):282-288.
- [20] Liu Y, Li H, Peng Y, et al. Impacts of pregnancy and menopause on COVID-19 severity: a systematic review and meta-analysis of 4.6 million women[J]. QJM: Internat J Med, 2023. 116(9): 755-765.
- [21] Dambha-Miller H, Hinton W, Wilcox CR, et al. Mortality in COVID-19 among women on hormone replacement therapy: A retrospective cohort study[J]. Family Practice, 2022, 39(6): 1049-1055.
- [22] Ding T.Zhang J.Wang T.et al. Potential influence of menstrual status and sex hormones on female severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection: a cross-sectional multicenter study in Wuhan, China[J]. Clin Infect Dis, 2021, 72(9): e240-e248.
- [23] Engelmann F, Barron A, Urbanski H, et al. Accelerated immune senescence and reduced response to vaccination in ovariectomized female rhesus macaques[J]. Age, 2011, 33:275-289.
- [24] Pennock JW, Stegall R, Bell B, et al. Estradiol improves genital herpes vaccine efficacy in mice[J]. Vaccine, 2009, 27(42):5830-5836.
- [25] Nguyen DC, Masseoud F, Lu X, et al. 17β-Estradiol restores antibody responses to an influenza vaccine in a postmenopausal mouse model[J]. Vaccine, 2011, 29(14):2515-2518.
- [26] Engelmann F, Rivera A, Park B, et al. Impact of estrogen therapy on lymphocyte homeostasis and the response to seasonal influenza vaccine in post-menopausal women [J]. PloS one, 2016,11(2):e0149045.
- [27] Potluri T, Fink AL, Sylvia KE, et al. Age-associated changes in the impact of sex steroids on influenza vaccine responses in males and females[J]. Npj Vaccines, 2019, 4(1):1-12.
- [28] Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy[J]. Cell Res, 2017, 27(1):74-95.
- [29] Yin X, Chen S, Eisenbarth SC. Dendritic cell regulation of T helper cells[J]. Ann Rev Immunol, 2021, 39:759-790.
- [30] Ruterbusch M, Pruner KB, Shehata L, et al. In vivo CD4+ T cell differentiation and function: revisiting the Th1/Th2 paradigm[J]. Ann Rev Immunol, 2020, 38:705-725.
- [31] Singh M, O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(11):1075-1081.

【收稿日期】 2024-05-21 【修回日期】 2024-08-14