

· 论著 ·

6 种新型 CpG 分子增强新型冠状病毒重组亚单位疫苗的免疫效果比较

李思奇 高孟 安彤 张柯欣 马培凯 沈钱通 朱赞 庄昉成 陈刚

杭州医学院基础医学与法医学院 浙江省医学生物工程疫苗研发重点实验室, 杭州 310053

通信作者: 陈刚, Email: chengang09@hotmail.com

【摘要】 目的 了解新设计的 6 组 CpG 分子在动物体内对新型冠状病毒(SARS-CoV-2)重组亚单位疫苗免疫效果的提升作用,以初步筛选出有潜力的新型 CpG 佐剂。**方法** 通过序列检索比对,确定人鼠同源的 CpG 基序,以不同的组合方式设计出 6 条不同的 CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG-ODN)序列,并人工合成相应 6 种 CpG,分别与 SARS-CoV-2 重组亚单位疫苗联用,已上市的佐剂 CpG1018 作为阳性对照。以间隔 2 周的方式免疫 BALB/c 小鼠 2 次,免疫后每周取眼眶血检测 IgG1 和 IgG2a 指标。2 针免疫后 21 d 处死小鼠,取眼球血检测结合抗体抑制率;取脾脏淋巴细胞进行酶联免疫斑点试验检测。**结果** 初次免疫后 14 d, CpG6 组小鼠血清 IgG2a 和 IgG1 水平分别为 3.63 ± 0.27 和 3.44 ± 1.03 , 显著高于 CpG1018 组的 2.06 ± 1.30 和 2.06 ± 0.39 。加强免疫后 14 d, CpG6 组小鼠血清 IgG2a 水平为 6.52 ± 0.21 , 高于 CpG1018 组的 6.33 ± 0.40 。在针对原型株的结合抗体抑制率指标上,初次免疫 14 d、加强免疫 21 d 后,各组间差异存在统计学意义($F=13.66, 12.58, 19.38$ 和 $19.38, P$ 均 <0.001)。初次免疫 14 d 后,稀释 10 倍血清中 CpG6 组小鼠血清抑制率为 $(64.67 \pm 20.41)\%$, 高于 CpG1018 组 $[(27.84 \pm 20.23)\%]$, 差异有统计学意义($t=2.70, P=0.031$);加强免疫 21 d 后,稀释 1 000 倍的血清中 CpG6 组小鼠血清抑制率针对原型株 $[(89.71 \pm 4.83)\%]$ 和 Delta 株 $[(79.04 \pm 6.32)\%]$ 的抑制率水平均显著高于 CpG1018 组 $[(70.84 \pm 17.20)\%]$ 和 $[(52.61 \pm 14.22)\%]$, 差异有统计学意义($t=2.36, P=0.046; t=3.80, P=0.005$)。酶联免疫斑点实验结果显示, CpG1018 组针对 SARS-CoV-2 原型株敏感和 Delta 突变株敏感的特异性 IFN- γ 分泌细胞数与 CpG6 组相比,差异均无统计学意义($t=0.76, P=0.469; t=0.78, P=0.459$);在特异性 IL-2 分泌细胞数上,两组差异亦无统计学意义($t=0.70, P=0.503; t=0.90, P=0.395$)。**结论** CpG6 与 SARS-CoV-2 重组亚单位疫苗联用,能在疫苗初次免疫后更快速地在小鼠体内产生体液免疫应答,且加强免疫后体液免疫和细胞免疫效果均不弱于已上市的 CpG1018 佐剂。CpG6 有望成为潜在的备选佐剂与疫苗联用。

【关键词】 佐剂;免疫;亚单位疫苗; CpG 寡核苷酸;增强免疫;体液免疫;细胞免疫

基金项目: 浙江省基础公益研究计划(LGD22C080002);浙江省重点研发计划应急攻关项目(2021C03202);浙江省教育厅一般科研项目(Y202045358);浙江省医学生物工程疫苗研发重点实验室(2008F3022)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20221115-00245

Comparative study on 6 novel CpG molecules in enhancing the immune effect of SARS-CoV-2 recombinant subunit vaccine

Li Siqi, Gao Meng, An Tong, Zhang Kexin, Ma Peikai, Shen Qiantong, Zhu Yun, Zhuang Fangcheng, Chen Gang
Zhejiang Key Laboratory of Bio-medical Vaccine Research and Development, School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China

Corresponding author: Chen Gang, Email: chengang09@hotmail.com

【Abstract】 Objective To understand the boosting effect of 6 newly designed CpG molecules on the immune efficacy of SARS-CoV-2 recombinant subunit vaccine in animals, so as to initially screen out the potential CpG adjuvants. **Methods** The human-mouse homologous CpG motifs were identified by sequence search and comparison, and 6 different CpG-oligodeoxynucleotide(ODN)molecules were designed and synthesized. These CpG molecules were used in combination with SARS-CoV-2 recombinant subunit vaccine, with the existing adjuvant CpG1018 as a positive control. BALB/c mice were immunized twice at two-week intervals, with weekly orbital blood sampling for IgG1 and IgG2a indicators. The mice were sacrificed at day 21 after the booster immunization, and the eye blood was

collected to detect binding antibody inhibition rate, and the lymphocytes were collected for enzyme-linked immunospot assay. **Results** At day 14 after the initial immunization, the serum levels of IgG2a and IgG1 in CpG6 group were 3.63 ± 0.27 and 3.44 ± 1.03 , which were both higher than those of 2.06 ± 1.30 and 2.06 ± 0.39 in CpG1018 group. At day 14 after the booster immunization, the serum level of IgG2a in CpG6 group was 6.52 ± 0.21 , which was higher than that of 6.33 ± 0.40 in CpG1018 group. The inhibition rates of conjugated antibodies against the prototype strain were significantly different in all groups after 14 days of initial immunization and 21 days of booster immunization ($F=13.66, 12.58, 19.38$ and $19.38, P \text{ all} < 0.001$). In CpG6 group, the serum inhibition rate in a 10-fold dilution was $(64.67 \pm 20.41)\%$ at day 14 after the initial immunization, which was significantly higher than that of $(27.84 \pm 20.23)\%$ in CpG1018 group ($t=2.70, P=0.031$). At day 21 after the booster immunization, the serum inhibition rates of conjugated antibodies against the prototype strain and Delta strain in a 1 000-fold dilution were $(89.71 \pm 4.83)\%$ and $(79.04 \pm 6.32)\%$ in CpG6 group, respectively, which were significantly higher than those of $(70.84 \pm 17.20)\%$ and $(52.61 \pm 14.22)\%$ in CpG1018 group ($t=2.36, P=0.046; t=3.80, P=0.005$). The results of enzyme-linked immunospot assay showed that there was no significant difference in the number of specific IFN- γ -secreting lymphocytes ($t=0.76, P=0.469; t=0.78, P=0.459$) and in the number of specific IL-2-secreting lymphocytes ($t=0.70, P=0.503; t=0.90, P=0.395$) between CpG1018 group and CpG6 group. **Conclusions** CpG6 combined with the SARS-CoV-2 recombinant subunit vaccine can produce a more rapid humoral immune response in mice after initial immunization. After the booster immunization, the effects of humoral immunity and cellular immunity induced by CpG6 are in non-inferiority to the marketed CpG1018 adjuvant. CpG6 is expected to be a potential alternative adjuvant in vaccines in future.

[Key words] Adjuvants, immunologic; Subunit vaccine; CpG oligodeoxynucleotide; Enhanced immune; Humoral immunity; Cellular immunity

Fund program: Zhejiang Basic Public Welfare Research Program (LGD22C080002); Key Research and Development Program Emergency Tackling Project of Zhejiang (2021C03202); General Research Project of Zhejiang Provincial Education Department (Y202045358); Zhejiang Key Laboratory of Medical Bioengineering Vaccine R&D (2008F3022)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20221115-00245

佐剂是一种非特异性免疫增强剂,在疫苗中广泛使用^[1]。寻找安全有效的新型佐剂一直是免疫学领域的热点之一。CpG 分子具有巨大的潜力^[2],它是模式识别受体——Toll 样受体 9(TLR9)的激动剂^[3],其作用机制是激活 TLR9 并引发下游炎症相关基因表达,从而达到激活和加强免疫应答的效果^[4]。CpG 根据其结构不同可以分为 A、B、C 三种类型^[5]。2017 年在美国上市的新型乙型肝炎疫苗由于和 CpG1018 联用,对不同年龄组人群的保护效果均优于传统疫苗^[6]。但是由于专利保护的原因,目前全球仅有个别公司可以使用 CpG1018。本研究在设计出多个新型 CpG 分子的基础上,评价其对重组亚单位疫苗的免疫增强作用,筛选出具有潜力的分子,为后续新型 CpG 佐剂的开发提供依据。

材料与方法

一、仪器与试剂

SPECTRAMAX 190 酶标仪 (Molecular Devices);

MCO-20AIC 二氧化碳培养箱(三洋电机株式会社厂)。

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)亚单位疫苗由浙江省医学生物工程疫苗研发重点实验室制备,主要成分为 SARS-CoV-2 受体结合域(RBD)抗原蛋白和铝佐剂^[7];CpG 寡核苷酸由擎科生物公司合成且经高效液相色谱(HPLC)纯化;血管紧张素转化酶 2 (ACE-2) 蛋白、SARS-CoV-2 RBD 蛋白以及辣根过氧化物酶(HRP)酶标的 SARS-CoV-2 RBD 蛋白均购自金斯瑞公司;HRP 酶标羊抗鼠 IgG1、羊抗鼠 IgG2a 抗体购自 Abcam 公司;小鼠 IFN- γ 酶联免疫斑点试验试剂盒购自达科为公司;小鼠 IL-2 酶联免疫斑点试验试剂盒购自 Mabtech 公司,SARS-CoV-2 RBD 原型株和 Delta 突变株肽刺激物由金斯瑞公司合成;磷酸盐缓冲液(PBS)粉剂购自索莱宝公司;TMB 显色液购自北京四正柏生物科技有限公司。

4 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司,饲养于浙江中医药大学实验动物中心[实验动物使用许可证号

SYXK(浙)2018-0012;合格证编号:20170005044109], SPF 环境下保持温度 20~25 ℃、相对湿度为 40%~70%。

二、实验方法

1. CpG 寡聚脱氧核苷酸(CpG-ODN)分子设计

目前的研究发现 CpG1018 只含有刺激基序 AACGTT,导致其效果有限^[8]。本实验将人鼠共源的 CpG 基序 TCGTT^[9]加入到所有设计的 CpG 序列之中,在 CpG1~CpG5 中只加入单一种类的刺激基序——TCGTT,并且都以 TCGTT 作为开头而后以 2 个胸腺嘧啶作为连接,以相同的序列 TCGTT 作为结尾,中间序列不含腺嘌呤核苷酸,通过不同的排列组合将 2~3 个 TCGTT 序列插入其中。CpG6 在引入 TCGTT 序列的同时还包含有 GACGTT 和 AACGTT 基序,所设计的 CpG 长度均为 19~26 bp,并采用全硫代修饰。由于 CpG-ODN 分子仍处于研发阶段,此处略去 CpG1~CpG6 的完整序列。

2. 动物分组及免疫

将 4 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠分为 9 组,每组 5 只。空白对照组小鼠只接种注射用水,疫苗对照组小鼠接种 SARS-CoV-2 亚单位疫苗(含铝佐剂成品),实验组小鼠接种 SARS-CoV-2 亚单位疫苗和 7 种不同的 CpG 佐剂,根据加入的 CpG 不同而分为 CpG1~CpG6 组以及 CpG1018 组。免疫途径均为腹腔注射,体积为 0.5 mL。SARS-CoV-2 疫苗抗原蛋白剂量为 50 μg/剂,根据前期的研究结果,CpG 剂量采用 20 μg/剂,铝佐剂用量为 0.5 mg/剂。

免疫程序为初次免疫当天计为第 0 天,第 14 天加强免疫。2 次免疫的疫苗均来自浙江省医学生物工程疫苗研发重点实验室。初次免疫后 7 d 小鼠眼眶采血收集血清,14 d 后免疫前采血同时进行加强免疫。加强免疫后每周继续采集眼眶血,收集血清,加强免疫 21 d 后脱颈处死小鼠,取眼球血收集血清,取脾脏收集淋巴细胞。

3. 不同亚型血清结合抗体效价检测

取商品化 SARS-CoV-2 RBD 蛋白(浓度为 1.22 mg/mL),稀释 1 500 倍后包被 96 孔板,用含 1%牛血清白蛋白的 PBS 溶液稀释小鼠血清,每孔

100 μL 梯度倍比稀释,以 1%牛血清白蛋白的 PBS 溶液作为本底,每个样本同时设置平行复孔。37 ℃ 孵育 1 h 后洗板,将 HRP 酶标的抗小鼠 IgG1、IgG2a 抗体分别稀释 5 000 倍,加入 96 孔板 37 ℃ 孵育 0.5 h,再次洗板,加入 TMB 显色液,室温避光孵育后终止显色,酶标仪读取 450 nm 处的 OD 值。cut-off 值为本底孔 OD 平均值的 2.1 倍,且 ≥ 0.105 。选择结合抗体水平最高的 CpG 组的血清做后续免疫学检测。

4. 竞争抑制法检测结合抗体效价

将商品化的 ACE-2 蛋白(浓度为 0.65 mg/mL)稀释 700 倍,包被在 96 孔板上。参照试剂盒说明书用稀释液稀释小鼠血清,并与 1 000 倍稀释的酶标 HRP 的 SARS-CoV-2 RBD 蛋白 1:1 充分混合均匀,37 ℃ 水浴锅孵育 30 min,取出后加入到包被 ACE-2 蛋白的 96 孔板中,37 ℃ 水浴锅孵育 15 min,洗板后加入 TMB 显色液室温避光显色 15 min 后终止并读数。酶标仪读取 450 nm 处的 OD 值,用各个稀释度下血清的抑制率表示其中和能力,计算公式为抑制率=(1-样本读数的平均值/阴参读数的平均值)×100%。

5. 小鼠细胞免疫水平检测

取加强免疫后 21 d 的小鼠脱颈处理,并在无菌环境下取出小鼠脾脏,置于滤网中碾磨经过洗涤、裂解红细胞等处理后得到小鼠脾淋巴细胞悬液,混匀后细胞计数,参照试剂说明书将细胞浓度稀释到 5×10^6 个/mL,每孔 100 μL 加入到预包被小鼠 IFN-γ 和 IL-2 的板子上,然后加入 SARS-CoV-2 RBD 肽库作为刺激物。酶联免疫斑点试验检测参考文献[10]的方法并参照试剂说明书进行。

三、统计学方法

采用 Graphpad Prism 8.3.0 统计软件处理分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 S-N-K 法进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异存在统计学意义。

结 果

一、血清结合抗体水平

在初次免疫后 14 d,CpG6 组小鼠血清 IgG2a 和

IgG1 水平分别为 3.63 ± 0.27 和 3.44 ± 1.03 , 显著高于 CpG1018 组的 2.06 ± 1.30 和 2.06 ± 0.39 。加强免疫后除空白对照组之外, 所有组别的血清 IgG2a 和 IgG1 水平均大幅提高, 且接种了 CpG 佐剂组均高于疫苗对照组。加强免疫后 14 d, CpG6 组 IgG2a 水平为 6.52 ± 0.21 , 高于 CpG1018 组的 6.33 ± 0.40 。根据结合抗体的结果, 选择效果较好的 CpG6 组, 做后续的免疫学指标检测。具体结果见图 1。

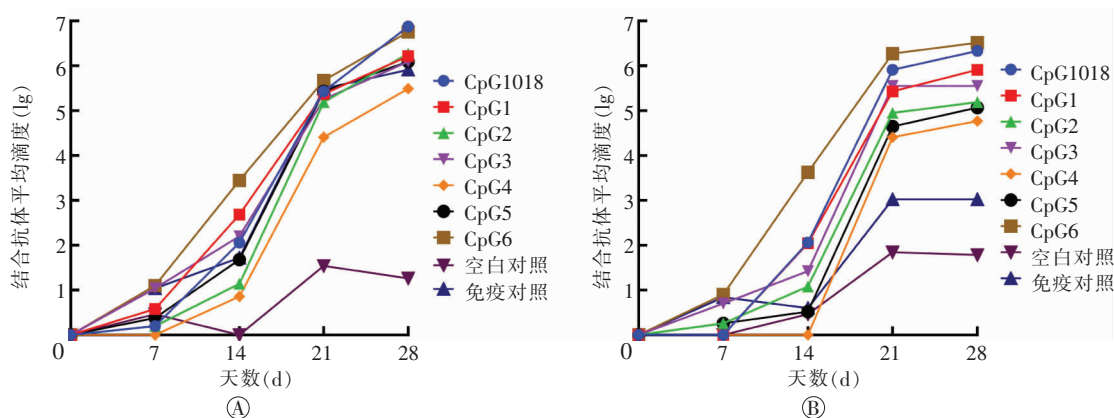
二、血清结合抗体抑制率

采用竞争性 ELISA 法检测血清结合抗体水平, 在初次免疫 14 d、加强免疫 21 d 后, 各组间差异均有统计学意义 ($F=13.66, 12.58, 19.38$ 和 19.38 , 均 $P < 0.001$)。初次免疫后第 14 天将 CpG6 组小鼠血清稀释 10 倍, 对 SARS-CoV-2 原型株的抑制率为 $(64.67 \pm 20.41)\%$, 高于 CpG1018 组的 $(27.84 \pm 20.23)\%$, 差异有统计学意义 ($t=2.70, P=0.031$); 并且高于疫苗对照组和空白对照组, 差异均有统计学意义 ($t=5.42, P=0.001; t=5.07, P=0.001$), 结果如表 1 所示。对加强免疫后 21 d 处死的小鼠眼球血血清稀释 150 倍后发现 CpG6 组和 CpG1018 组的结合抗体抑制率分别为 $(88.21 \pm 1.47)\%$ 和 $(78.09 \pm 8.20)\%$, 且 CpG6 组抑制率明显高于疫苗对照组和空白对照组, 差异均有统计学意义 ($t=2.78$ 和 39.51 , 均 $P < 0.001$)。将血清稀释 1 000 倍后 CpG6 组和 CpG1018 组对 SARS-CoV-2 原型株的抑制率仍然维持在很高的水平, 其中 CpG6 组血清抑制率为 $(89.71 \pm 4.83)\%$, 高于 CpG1018 组的 $(70.84 \pm 17.20)\%$, 差异有统计学

意义 ($t=2.36, P=0.046$), 也高于疫苗对照组和空白对照组, 差异均有统计学意义 ($t=4.35, P=0.002; t=30.56, P<0.001$)。对 SARS-CoV-2 Delta 突变株的抑制率上, CpG6 组为 $(79.04 \pm 6.32)\%$, 高于 CpG1018 组的 $(52.61 \pm 14.22)\%$, 差异有统计学意义 ($t=3.80, P=0.005$), 并且 CpG6 组抑制率明显高于疫苗对照组和空白对照组, 差异均有统计学意义 ($t=3.94, P=0.004; t=19.61, P<0.001$)。

三、细胞免疫水平检测结果

利用酶联免疫斑点试验检测小鼠特异性细胞水平, 结果如表 2 所示, CpG1018、CpG6、疫苗对照和空白组细胞数差异有统计学意义 ($F=14.08, 14.71, 17.37$ 和 13.85 , 均 $P < 0.001$)。CpG6 组针对 SARS-CoV-2 原型株敏感 $[(795.06 \pm 332.09) \text{ 个}/5 \times 10^5 \text{ 个细胞}]$ 和 Delta 突变株敏感的特异性 IFN- γ 分泌 T 细胞 $[(678.53 \pm 269.60) \text{ 个}/5 \times 10^5 \text{ 个细胞}]$ 均明显高于疫苗对照组 ($t=4.74, P=0.001; t=4.74, P=0.001$) 和空白对照组 ($t=3.95, P=0.008; t=3.93, P=0.008$)。CpG1018 组针对 SARS-CoV-2 原型株敏感和 Delta 突变株敏感的特异性 IFN- γ 分泌细胞数分别为 $(947.62 \pm 300.92) \text{ 个}/5 \times 10^5 \text{ 个细胞}$ 和 $(825.67 \pm 326.11) \text{ 个}/5 \times 10^5 \text{ 个细胞}$, 与 CpG6 组相比, 差异均无统计学意义 ($t=0.76, P=0.469; t=0.78, P=0.459$)。在特异性 IL-2 分泌 T 细胞数量上 CpG6 组无论针对 SARS-CoV-2 原型株 $[(874.75 \pm 402.28) \text{ 个}/5 \times 10^5 \text{ 个细胞}]$, 还是针对 Delta 突变株 $[(743.68 \pm 332.07) \text{ 个}/5 \times 10^5 \text{ 个细胞}]$, 均高于疫苗对照组 ($t=2.98, P=0.018; t=2.02, P=$



注: ①为 IgG1 结合抗体水平随时间变化图; ②为 IgG2a 结合抗体水平随时间变化图

图 1 不同佐剂联用的新型冠状病毒亚单位疫苗注射后小鼠血清 IgG 结合抗体亚型水平

表 1 免疫后各组小鼠在不同免疫天数的血清结合抗体抑制率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数(只)	初次免疫 14 d	加强免疫 21 d		
		原型株 ^a	原型株 ^b	原型株 ^c	Delta 株 ^c
CpG1018	5	27.84±20.23 ^d	78.09±8.20	70.84±17.20 ^d	52.61±14.22 ^e
CpG6	5	64.67±20.41	88.21±1.47	89.71±4.83	79.04±6.32
疫苗对照	5	8.46±1.22 ^e	46.49±33.53 ^e	33.18±28.66 ^e	31.30±26.34 ^e
空白对照	4	11.82±2.71 ^e	21.80±3.43 ^e	9.88±2.07 ^e	14.67±1.59 ^e
<i>F</i> 值		13.66	12.58	19.38	19.38
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a:血清稀释 10 倍;^b:血清稀释 150 倍;^c:稀释 1 000 倍;与 CpG6 组比较,^d: $P<0.05$,^e: $P<0.01$

0.019)和空白对照组($t=4.30$, $P=0.004$; $t=4.30$, $P=0.004$);而 CpG1018 组与 CpG6 组相比,差异没有统计学意义($t=0.70$, $P=0.503$; $t=0.90$, $P=0.395$)。

讨 论

一、新型 CpG 佐剂分子的设计思路

佐剂在保证及提升疫苗免疫效果中扮演了重要角色。CpG 佐剂具有作用机制明确、不良反应小、对细胞免疫提升大等优点,目前已在一些商业化重组蛋白疫苗中获得使用批准。

本研究在设计新型 CpG1~CpG6 分子时,参考 CpG1018 加入了 TCGTT 基序,突出其免疫增强效果,并希望在后续灵长类动物体内和临床试验中能体现出相应的效果。CpG 存在种属特异性,人和鼠的 TLR9 受体在氨基酸水平上只有 76%的同源性^[11]。由于针对不同的物种产生的效果不一致,目前上市的疫苗中,CpG1018 用量较大(达到 3 mg/剂)。TCGTT 基序可以同时增强小鼠和人免疫应答水平。相对于小鼠来说,TCGTT 基序对人的免疫提升作用更佳^[9]。CpG1018 序列中不含有 TCGTT 基序,因此

CpG1018 虽然可以较好地激活小鼠免疫应答,但在灵长类动物体内的效果可能弱于含该序列的 CpG 分子。

二、CpG6 佐剂分子的特点

本实验中,CpG6 和 CpG1018 两组对小鼠免疫增强效果都较为明显,均高于疫苗对照组和空白对照组。本文在细胞免疫水平的评估中选择了 IL-2 和 IFN- γ 这两项指标。IFN- γ 可以作用于多种 APC,通过受体-配体相互作用,启动信号级联反应,触发 STAT1 磷酸化,并最终激活转录因子 T-bet 使 T 细胞向 Th1 类细胞分化,是反映细胞免疫水平的重要因子^[12-14]。IL-2 是 T 细胞生长因子,对于 T 细胞的生长增殖以及发挥效应起重要作用,是重要的细胞免疫因子^[15]。在本研究中,CpG6 诱导的细胞免疫激活水平与 CpG1018 组相比无显著性差异。相比于 CpG1018,自行设计的新型 CpG,特别是 CpG6 在初次免疫后的体液免疫和细胞免疫方面保护效果更显著,能更快地激活特异性淋巴细胞产生抗体和刺激细胞免疫等相关应答。同时,加强免疫后 CpG6 组的 IgG2a 抗体滴度高于 CpG1018 组。以上结果表明

表 2 酶联免疫斑点试验检测小鼠特异性细胞水平($\bar{x} \pm s$)

组别	只数(只)	分泌 IL-2 的特异性细胞(个/5×10 ⁵ 个细胞)		分泌 IFN- γ 的特异性细胞(个/5×10 ⁵ 个细胞)	
		原型株肽库刺激	Delta 株肽库刺激	原型株肽库刺激	Delta 株肽库刺激
CpG1018	5	1 030.44±291.33 ^{ab}	915.74±270.03 ^{ab}	947.62±300.92 ^{ab}	825.67±326.11 ^{ab}
CpG6	5	874.75±402.28 ^{ab}	743.68±332.07 ^{ab}	795.06±332.09 ^{ab}	678.53±269.60 ^{ab}
疫苗对照	5	290.95±175.17	259.12±165.53	82.12±48.73	92.43±62.60
空白对照	4	18.89±7.66	19.80±3.58	10.11±8.28	15.16±11.57
<i>F</i> 值		14.08	14.71	17.37	13.85
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a:与疫苗对照组比较, $P<0.05$;^b:与空白对照组比较, $P<0.05$

CpG6 和 CpG1018 佐剂一样,能引起相应的机体免疫应答。不过在面对新发、突发传染病,需要尽快诱导特异性高水平免疫应答时,CpG6 在初次免疫时即可表现出的良好作用,使其效果极有可能优于 CpG1018。

总体来说,本实验设计的新型佐剂分子 CpG6 在初次免疫后表现出超越 CpG1018 的良好效果,在加强免疫后诱导的体液免疫强于 CpG1018,细胞免疫效果也不弱于 CpG1018。有待对其免疫增强的机制做进一步研究,并且探究 CpG6 对于其他类型的疫苗(如治疗性疫苗)是否也具有显著的免疫效果提升作用。本研究存在一定的局限性:(1)实验中所用到的疫苗为原核表达,其抗原分子与目前主流的真核疫苗有一定区别;(2)研究所用到的 CpG 分子的计量单位为质量而不是摩尔数,可能由于 CpG 分子量的不同而加入不同摩尔数的 CpG 分子;(3)实验中使用的重组亚单位疫苗剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{剂}$,高于已上市的重组亚单位疫苗,后续研究中,将对其剂量探究。在保证免疫效果的情况下,降低 CpG 自身及抗原蛋白的用量,并针对铝佐剂做一定的优化,这对于降低疫苗不良反应、提升安全性具有重要的现实意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李思奇: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析;高孟: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、技术和材料支持、指导;安彤、张柯欣: 实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计分析;马培凯: 采集数据、分析/解释数据、统计分析;沈钱通: 实施研究、采集数据、分析/解释数据;朱赞: 分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、技术和材料支持、指导;庄昉成: 对文章的知识性内容作批评性审阅、技术和材料支持、指导;陈刚: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析、获取研究经费、技术和材料支持、指导

参 考 文 献

[1] Bastola R, Noh G, Keum T, et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system [J]. Arch Pharm Res, 2017, 40(11): 1238-1248. DOI: 10.1007/s12272-017-0969-z.

[2] Kaur A, Baldwin J, Brar D, et al. Toll-like receptor (TLR) agonists

as a driving force behind next-generation vaccine adjuvants and cancer therapeutics[J]. Curr Opin Chem Biol, 2022, 70: 102172. DOI: 10.1016/j.cbpa.2022.102172.

[3] Jin Y, Zhuang Y, Dong X, et al. Development of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists in anti-cancer therapy[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2021, 21(8): 841-851. DOI: 10.1080/14737140.2021.1915136.

[4] Zhou B, Yan J, Guo L, et al. Hepatoma cell-intrinsic TLR9 activation induces immune escape through PD-L1 upregulation in hepatocellular carcinoma[J]. Theranostics, 2020, 10(14): 6530-6543. DOI: 10.7150/thno.44417.

[5] Kayraklioglu N, Horuluoglu B, Klinman DM. CpG oligonucleotides as vaccine adjuvants[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2197: 51-85. DOI: 10.1007/978-1-0716-0872-2_4.

[6] Campbell JD. Development of the CpG adjuvant 1018: A case study[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1494: 15-27. DOI: 10.1007/978-1-4939-6445-1_2.

[7] 沈钱通, 安彤, 李思奇, 等. 原核表达新型冠状病毒受体结合蛋白的制备及免疫原性研究[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2022, 49(1): 6-11. DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20211103-00210.

[8] 许洪林, 王四清, 王世峰, 等. 两种 CpG 基序能高度活化人免疫细胞 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(5): 471-475.

[9] 许洪林, 杨春亭. CpG-ODNs 疫苗佐剂的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(1): 36-43, 51.

[10] Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, et al. Quantification of antigen specific CD8⁺ T cells using an ELISPOT assay[J]. J Immunol Methods, 1995, 181(1): 45-54. DOI: 10.1016/0022-1759(94)00327-s.

[11] Zhou J, Deng GM. The role of bacterial DNA containing CpG motifs in diseases[J]. J Leukoc Biol, 2021, 109(5): 991-998. DOI: 10.1002/JLB.3MR1220-748RRRRR.

[12] Xu C, Feng C, Huang P, et al. TNF α and IFN γ rapidly activate PI3K-AKT signaling to drive glycolysis that confers mesenchymal stem cells enhanced anti-inflammatory property[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 491. DOI: 10.1186/s13287-022-03178-3.

[13] Ai K, Li K, Jiao X, et al. IL-2-mTORC1 signaling coordinates the STAT1/T-bet axis to ensure Th1 cell differentiation and anti-bacterial immune response in fish[J]. PLoS Pathog, 2022, 18(10): e1010913. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010913.

[14] Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- γ): exploring its implications in infectious diseases[J]. Biomol Concepts, 2018, 9(1): 64-79. DOI: 10.1515/bmc-2018-0007.

[15] Abbas AK, Trotta E, R Simeonov D, et al. Revisiting IL-2: biology and therapeutic prospects[J]. Sci Immunol, 2018, 3(25): eaat1482. DOI: 10.1126/sciimmunol.aat1482.

(收稿日期: 2022-11-15)