

基于流感病毒 M2 蛋白胞外区的双层蛋白质纳米颗粒的制备及免疫学效果评价

马淑敏 项婷婷 何泳愉 郭湘潭 杨灿 杨新燕 胡珂昕 沃恩康

杭州医学院检验医学院、生物工程学院, 杭州 310013

通信作者: 沃恩康, Email: woenkang@163.com

【摘要】目的 通过两步脱溶剂-交联法制备携带流感病毒血凝素茎部 α 螺旋区 (HA α)、6 个串联重复的 M2 蛋白胞外域 (6M2e) 和鞭毛蛋白 (Flg) 的双层蛋白质纳米颗粒, 探究其在小鼠体内的免疫效果。**方法** 采用脱溶剂-交联法将融合蛋白 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 和 HA α -6M2e 制备成双层蛋白质纳米颗粒。通过透射电镜和纳米颗粒跟踪分析仪进行物理表征后评估其细胞毒性。免疫小鼠后采用 ELISA 方法进行特异性抗体效价测定, ELISPOT 检测细胞免疫水平, CCK-8 法检测脾细胞的增殖情况。**结果** 本研究成功制备了粒径为 (130.03 \pm 2.96) nm 的双层蛋白质纳米颗粒 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α /HA α -6M2e。免疫小鼠后产生的抗 M2e-IgG 抗体效价为 1:25 600, 抗 HA α -IgG 抗体效价为 1:12 800, 高于对照组小鼠, 差异均具有统计学意义 ($t=3.051$ 和 3.780 , $P=0.038$ 和 0.019)。与对照组相比, 多肽刺激可以使小鼠脾细胞显著增殖 [M2e 刺激增殖率: (154.18 \pm 2.34)%, HA α 刺激增殖率: (151.51 \pm 1.56)%] ($t=12.942$ 和 24.591 , P 均 <0.001), 并且诱导产生分泌更多 IL-4 和 IFN- γ 的淋巴细胞 (M2e 刺激: $t=5.477$ 和 6.571 , $P=0.005$ 和 0.013 ; HA α 刺激: $t=9.239$ 和 7.671 , $P=0.001$ 和 0.013)。多种细胞因子的 mRNA 水平显著升高, IFN- γ 和 IL-4 的转录水平均高于对照组 (IFN- γ : $t=13.253$ 和 20.847 , P 均 <0.001 ; IL-4: $t=6.032$ 和 4.824 , $P=0.004$ 和 0.009)。**结论** 本研究所制备的双层蛋白质纳米颗粒可以刺激小鼠产生较高水平的体液和细胞免疫应答, 为开发多表位流感通用疫苗提供了有效依据。

【关键词】 正黏病毒科; 流感病毒; 纳米疫苗; 鞭毛蛋白佐剂; 免疫原性

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY18H100005); 浙江省医药卫生科技计划 (2021KY637、2021KY636、2020KY098); 浙江省教育厅一般科研项目 (Y202249202)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20230627-00097

Preparation and immunological evaluation of bilayer protein nanoparticles based on influenza virus M2 protein extracellular domain

Ma Shumin, Xiang Tingting, He Yongyu, Guo Chaotan, Yang Can, Yang Xinyan, Hu Kexin, Wo Enkang

School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China

Corresponding author: Wo Enkang, Email: woenkang@163.com

【Abstract】Objective To prepare the double-layer protein nanoparticles carrying influenza virus hemagglutinin stem α helix region (HA α), 6 tandem repeats of M2 protein extracellular domain (6M2e) and flagellin (Flg) by a two-step desolvent-crosslinking method, and to investigate their immune effects in mice. **Methods** Double-layer protein nanoparticles were prepared from the fusion proteins FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α and HA α -6M2e by desolvent-crosslinking method. The cytotoxicity was evaluated after physical characterization by transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis. After immunizing mice, the levels of specific antibody titer, cellular immunity and splenic cell proliferation were determined by ELISA, ELISPOT, and CCK-8, respectively. **Results** The bilayer protein nanoparticles FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α /HA α -6M2e with a particle size of (130.03 \pm 2.96) nm were prepared successfully. The titers of anti-M2e-IgG antibody and anti-HA α -IgG antibody produced by immunizing mice were 1:25 600 and 1:12 800, which were significantly higher than those of control mice ($t=3.051$ and 3.780 , $P=0.038$ and 0.019). Compared with the control mice, polypeptide stimulation significantly increased the proliferation of spleen cells in mice [proliferation rate of M2e: (154.18 \pm 2.34)%, proliferation rate of HA α : (151.51 \pm 1.56)%] ($t=12.942$ and

24.591, both $P < 0.001$), and induced the production of lymphocytes that secreted more IL-4 and IFN- γ (M2e stimulation: $t=5.477$ and 6.571 , $P=0.005$ and 0.013 ; HA α stimulation: $t=9.239$ and 7.671 , $P=0.001$ and 0.013). The mRNA levels of various cytokines significantly increased, and the transcription levels of IFN- γ and IL-4 were higher than those in the control mice (IFN- γ : $t=13.253$ and 20.847 , both $P < 0.001$; IL-4: $t=6.032$ and 4.824 , $P=0.004$ and 0.009). **Conclusions** The double-layer protein nanoparticles prepared in this study can stimulate mice to produce higher levels of humoral and cellular immune response, which provide an effective basis for the development of multi-epitope universal influenza vaccine.

[Key words] Orthomyxoviridae; Influenza virus; Nanovaccines; Flagellin adjuvant; Immunogenicity

Fund program: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LY18H100005); Zhejiang Medical Science and Technology Program (2021KY637, 2021KY636, 2020KY098); General Research Project of Education Department of Zhejiang Province (Y202249202)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20230627-00097

流感病毒变异速度快,导致目前的流感疫苗无法有效应对新的流行株,亟需研发一种安全、有效,能广泛使用的通用型流感疫苗。流感病毒蛋白抗原的保守决定簇是通用流感疫苗潜在免疫原,且多个抗原表位比单个抗原表位产生更强免疫原性^[1]。流感病毒的血凝素(HA)蛋白的茎部比球状头部结构域更加保守且可产生广谱中和抗体,尤其是 HA2 的第 76~130 位氨基酸处的 α 螺旋区 (HA α)^[2]。M2 蛋白胞外区 (M2e) 同样具有高度保守的氨基酸序列,但其含量低,相对分子质量小,免疫原性较弱^[3]。鞭毛蛋白是 Toll 样受体 5 的天然配体,既有抗原性又具有佐剂效应^[4]。纳米颗粒可增强所含蛋白质的免疫原性,制备疫苗无需自装配蛋白的参与,能有效避免脱靶免疫反应,在新型流感疫苗的制备中极具开发潜力^[5]。因此本研究选用人源 M2e(h M2e)、禽源 M2e(a M2e)和猪源 M2e(s M2e)各 2 拷贝串联表达形成的 6M2e 结构,HA α 和鞭毛蛋白采用脱溶剂-交联法制备双层纳米颗粒并进行免疫原性研究,为开发多表位流感通用疫苗提供新的思路。

材料与方法

一、材料

1.材料与仪器

小鼠单核巨噬细胞系 Raw264.7 细胞株,含去除高变区的鞭毛蛋白(缺失 171~400 位氨基酸)、HA α 和 6M2e 序列的质粒 pET28a-FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 和 pET28a-HA α -6M2e 的表达菌株 BL21(DE3),

抗 M2e 的单克隆抗体 3G3^[6]均由本课题蛋白组学实验室制备并保存;多肽 HA α 1、HA α 2、a M2e、s M2e、h M2e 委托合肥国肽生物科技有限公司合成;引物委托上海捷瑞生物公司合成(表 1);Trizol、逆转录试剂、SYBR Green 荧光定量试剂盒均购自上海翌圣生物科技有限公司;BCA 试剂盒、四甲基联苯胺(TMB)显色液、CCK-8 试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司;HRP 标记的羊抗鼠抗体 IgG 购自康为世纪生物技术公司;ELISPOT 检测试剂盒购自达科为公司;ELISA 试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司;3,3'-二硫双磺基琥珀酰亚胺丙酸酯(DTSSP)购自赛默飞世尔科技公司;RPMI-1640 培养基购自北京索莱宝科技有限公司。

仪器包括透射电镜(日本日立公司)、多功能酶标检测仪(BioTek 公司)、ABI QuantStudio3 PCR 仪(美国赛默飞公司),纳米颗粒跟踪分析仪(德国 Partical Metrix 公司)。

2.实验动物

雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠共 18 只,6~8 周龄,购自杭州医学院实验动物中心,已通过杭州医学院实验动物伦理会审查(审批号:2021-008)。

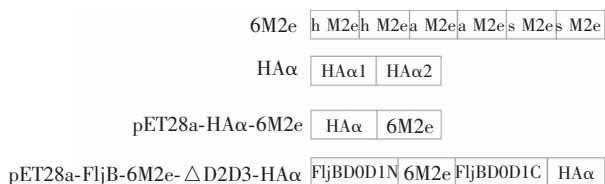
表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

目的基	上游(5'-3')	下游(3'-5')
IL-2	CACTTGTGCTCCTTGTC	GCTCCTGTAGGTCCATCA
IL-4	GCTTGAAGAAGCTCTAGTG	TGTGGACTTGGACTCATTG
IFN- γ	GCCATAAGGACCAGAAGTG	GTGAATGCTGCCATAACG
GAPDH	GAAGGTCGGTGTGAACG-GATTTG	CATGTAGACCATG-TAGTTGAGGTCA

二、双层蛋白质纳米颗粒的制备及表征

1. 融合蛋白的表达

含去除高变区的鞭毛蛋白(缺失 171~400 位氨基酸)、HAα 和 6M2e 序列的质粒 pET28a-FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα 和 pET28a-HAα-6M2e 的表达菌株 BL21(DE3)(见图 1)分别加入到含卡那霉素的 Luria-Bertani 培养基的培养瓶中,用终浓度为 1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 37 °C 震荡培养 10 h,收集菌体超声破碎,镍柱分离纯化,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳确定蛋白表达纯度。

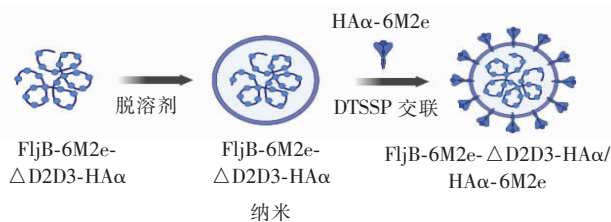


注:M2e:M2 蛋白胞外域;h M2e:人源 M2 蛋白胞外域;a M2e:禽源 M2 蛋白胞外域;s M2e:猪源 M2 蛋白胞外域;HAα:血凝素茎部 α 螺旋区

图 1 质粒 pET28a-FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα 和 pET28a-HAα-6M2e 构建示意图

2. 双层蛋白质纳米颗粒的制备

融合蛋白 FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα 溶解于 DPBS 中,缓慢滴加 4 倍体积的无水乙醇,4 °C 搅拌 2 h。15 000×g 离心 10 min 后超声重悬于含有融合蛋白 HAα-6M2e 的 DPBS 中,加入 1 mmol/L DTSSP 交联剂固定,4 °C 搅拌 2 h,加入 50 mmol/L pH7.4 Tris-HCl 后淬灭 15 min,15 000×g 离心 30 min,再次超声重悬于 DPBS,获得双层蛋白质纳米颗粒 FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα/ HAα-6M2e。见图 2。



注:DTSSP:3,3'-二硫双磺基琥珀酰亚胺丙酸酯

图 2 双层蛋白质纳米颗粒制备示意图

3. 纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径和 Zeta 电位

使用 DPBS 缓冲溶液将蛋白溶液稀释至适宜浓

度装入 5 mL 注射器后注入仪器内,利用光散射和布朗运动的特性来获得悬浮液中纳米颗粒的粒度分布检测,采用微电泳的技术方法检测其 Zeta 电位。

4. 透射电镜观察形态及大小

取适量浓度的蛋白纳米颗粒溶液于干燥的铜网上,待干燥后滴入 1 滴 1 % 的磷钨酸进行负染,5 min 后吸去染液,干燥后即可放入透射电镜中进行观察并记录。

三、双层蛋白质纳米颗粒的 Western 印迹法验证与细胞毒性测定

1. 双层蛋白质纳米颗粒 Western 印迹法验证

融合蛋白 FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα, HAα-6M2e 和双层蛋白质纳米颗粒 FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα/ HAα-6M2e 与上样缓冲液按照一定比例混匀变性后上样,使用抗 His 标签抗体和抗体 3G3 进行变性条件下的 Western 印迹法验证。

2. 细胞毒性实验

将蛋白溶液配制浓度为 400、200、100、50 和 25 ng/μL,每孔 100 μL,分别加入长成单层的 Raw264.7 细胞的 96 孔板中,每个浓度 3 个副孔,同时设立实验组(双层蛋白质纳米颗粒)、对照组(可溶性蛋白 FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα, HAα-6M2e)、阴性对照组(正常细胞,加无血清 DMEM 培养液)和空白组(不含细胞,加无血清 DMEM 培养液)。置于 37 °C,5 %CO₂ 培养箱中与细胞共同孵育 24 h。弃去培养液后,每孔加入 100 μL 含有 10 % 的 CCK-8 溶液的培养液。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,细胞存活率=(OD_{蛋白}-OD_{空白})/(OD_{阴性对照}-OD_{空白})×100%。

四、小鼠免疫及效果评价

1. 小鼠免疫

将 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠按随机数字表法分配 3 组,每组 6 只,设定为实验组(双层蛋白纳米颗粒 FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα/ HAα-6M2e)、对照组(可溶性蛋白 FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα, HAα-6M2e)和 PBS 组。免疫方式采用皮下五点免疫法,免疫剂量为 40 μg/只,免疫间隔为 2 周,共免疫 3 次。每次免疫后 7 d 采集血清样本。

2. ELISA 测定体液免疫水平

小鼠眼眶取血,离心取血清检测特异性抗体(抗 M2e-IgG 和抗 HA α -IgG)。采用间接 ELISA 方法检测其血清特异性抗体滴度。将合成的多肽 M2e (a M2e、s M2e、h M2e 等量混合)和 HA α (HA α 1、HA α 2 等量混合)用 PBS 进行包被,过夜后用 3% 牛血清白蛋白封闭 2 h,用稀释后的血清孵育 2 h,然后分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 孵育 2 h。最后 TMB 显色后终止液停止反应,用酶标仪测定 OD₄₅₀。OD₄₅₀ 读数平均值/空白对照组 OD₄₅₀ 平均值 ≥ 2.1 的最大稀释倍数即为抗体效价。

将合成多肽 aM2e、s M2e、hM2e 和 HA α 1、HA α 2 分别用 PBS 进行包被,用稀释后的血清孵育 2 h,然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 孵育 2 h。显色后测定 OD₄₅₀。

3. 脾细胞增殖实验

小鼠取血处死后分离脾脏,将其放入含 RPMI-1640 培养基的细胞筛网中充分研磨,吸取脾细胞悬液于离心管中离心,弃上清,再加入红细胞裂解液裂解红细胞,离心后用培养基重悬,接种到 96 孔板中,10⁵ 个/孔。每组重复 3 次。每只小鼠实验孔 2 孔分别加入终浓度为 10 μ g/mL 的 M2e 和 HA α , 正负对照孔各 1 孔分别加入终浓度为 10 μ g/mL 的刀豆蛋白和培养液,刺激脾细胞增殖。细胞在 37 $^{\circ}$ C 下培养 72 h 后加入 CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,细胞增殖率=(刺激孔 OD 值-空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值) $\times 100\%$ 。

4. ELISPOT 测定细胞免疫水平

将免疫后脾细胞接种到 96 孔板中,3 $\times 10^5$ 个/孔。每组重复 3 次。每只小鼠设立实验孔 2 孔,分别加入终浓度为 10 μ g/mL 的多肽 M2e 和 HA α , 正负对照孔各 1 孔,分别加入终浓度为 10 μ g/mL 的佛波酯和培养液。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后按照试剂盒说明操作,记录斑点数。

5. 脾细胞分泌细胞因子的 mRNA 水平

将免疫后脾细胞接种到 6 孔板中。每组重复 3 次。每只小鼠设立实验孔 2 孔,分别加入终浓度为

10 μ g/mL 的多肽 M2e 和 HA α 。刺激实验组、对照组和空白组 48 h 后,采用实时荧光 PCR 检测各组脾细胞产生的细胞因子 IL-2、IL-4、IFN- γ 的 mRNA 水平。

五、统计学方法

采用 SPSS 23 软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差表示,两组之间比较采用独立样本 *t* 检验,多组之间比较采用方差分析,方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、双层蛋白质纳米颗粒的物理表征

1. 双层蛋白质纳米颗粒的粒径和 Zeta 电位

融合蛋白用镍柱分离纯化得到高纯度蛋白后制备出双层蛋白纳米颗粒。纳米颗粒跟踪分析仪测定结果显示未交联 HA α -6M2e 的纳米颗粒核心 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 平均粒径为 (105.00 \pm 4.58) nm, Zeta 电位为 (43.88 \pm 0.80) mV; 双层蛋白质纳米颗粒 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α /HA α -6M2e 平均粒径为 (130.03 \pm 2.96) nm, Zeta 电位为 (67.18 \pm 0.78) mV, 表明成功制备了稳定的以 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 为核心并交联 HA α -6M2e 的双层蛋白质纳米颗粒。

2. 双层蛋白质纳米颗粒的形态和大小

透射电镜照片(见图 3)显示融合蛋白可以通过去溶剂化以及交联的方法自组装成蛋白质纳米颗粒,结构稳定,对照比例尺可知约 60% 的纳米颗粒大小在 84.25~160.00 nm 之间,且颗粒是相对球形的。

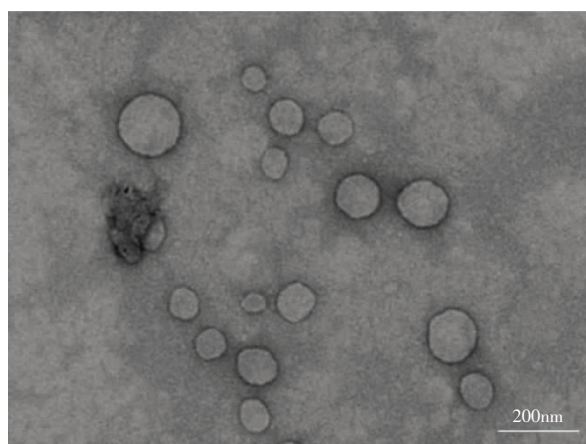
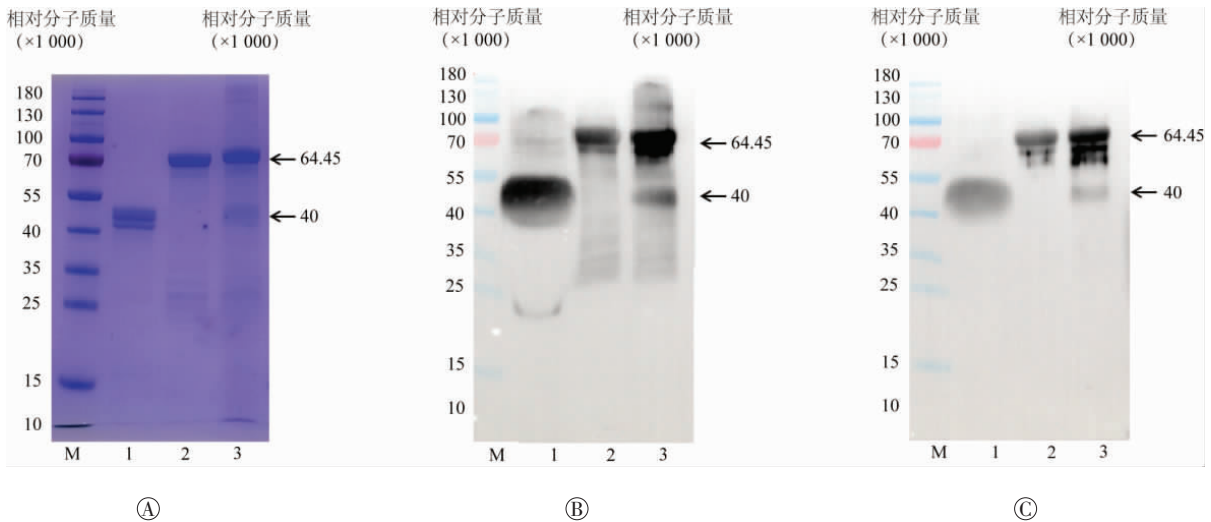


图 3 双层蛋白纳米颗粒的透射电镜图像($\times 25\ 000$)



注:SDS-PAGE;十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳;①为融合蛋白和双层蛋白质纳米颗粒的表达结果;②为融合蛋白和双层蛋白质纳米颗粒的 Western 印迹法检测,使用 3G3 抗体;③为融合蛋白和双层蛋白质纳米颗粒的 Western 印迹法检测,使用 His 抗体;M 为蛋白标记物;1 为融合蛋白 HA α -6M2e;2 为融合蛋白 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α ;3 为双层蛋白质纳米颗粒 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α /HA α -6M2e

图 4 融合蛋白和纳米颗粒的 SDS-PAGE 诱导表达结果及 Western 印迹法验证

二、双层蛋白质纳米颗粒的 Western 印迹法验证与细胞毒性测定

1. 双层蛋白质纳米颗粒的蛋白组成

如图 4 所示,融合蛋白和纳米颗粒进行变性条件下的 Western 印迹法检测,得到融合蛋白 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α , HA α -6M2e 的特异性产物带,相对分子质量分别约为 65 000 和 40 000,双层蛋白质纳米颗粒的特异性产物带相对分子质量也约为 65 000 和 40 000。根据蛋白质条带的灰度分析,估计外层蛋白 HA α -6M2e 在所得双层蛋白纳米颗粒的总百分比约为 15%。

2. 双层蛋白质纳米颗粒对细胞的安全性

通过 CCK-8 检测试剂盒检测融合蛋白 FljB-

6M2e- Δ D2D3-HA α , HA α -6M2e 和双层蛋白质纳米颗粒 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α / HA α -6M2e 对 Raw264.7 细胞的细胞毒作用。当蛋白含量达到 40 μ g 时,两组巨噬细胞存活率分别为 (101.35 \pm 1.12)% 和 (103.41 \pm 2.79)%, 阴性对照组的巨噬细胞存活率为 (105.36 \pm 2.42)%, 细胞毒性不明显 ($t=2.602$ 和 0.911 , $P=0.060$ 和 0.414), 可见 40 μ g 的蛋白含量对细胞的安全性高。

三、双层蛋白质纳米颗粒的免疫效果评价

1. 双层蛋白质纳米颗粒可提高体液免疫水平

通过 ELISA 法检测不同免疫原的小鼠血清中产生抗 M2e 和 HA α 的特异性抗体效价, 如表 2 所示, 随着免疫次数的增加, 其抗体效价也随之增加。不同组之间免疫后小鼠血清抗体效价差异均有统

表 2 蛋白免疫小鼠后血清特异性抗体效价水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	重复次数	M2e-IgG 滴度 (lg)		HA α -IgG 滴度 (lg)	
		2 次免疫	3 次免疫	2 次免疫	3 次免疫
实验组	3	3.70 \pm 0.23	4.65 \pm 0.10 ^a	3.05 \pm 0.40	4.10 \pm 0.15 ^a
对照组	3	3.70 \pm 0.17	4.10 \pm 0.30	3.10 \pm 0.17	3.60 \pm 0.17
空白组	3	1.30 \pm 0.03 ^a	1.23 \pm 0.02 ^a	1.29 \pm 0.04 ^a	1.22 \pm 0.02 ^a
F 值		178.588	303.554	50.354	402.896
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:实验组为双层蛋白纳米颗粒 (FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α / HA α -6M2e) 免疫组, 对照组为可溶性蛋白 (FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 和 HA α -6M2e) 免疫组, 空白组为 PBS 免疫组; M2e: M2 蛋白胞外域; HA α : 血凝素茎部 α 螺旋区; 组间两两比较数据均为方差齐性, 采用 LSD 检验; ^a: 表示与对照组相比, $P<0.05$

计学意义 ($F=178.588、303.554、50.354$ 和 $402.896, P$ 均 <0.001)。第 3 次免疫后, 实验组小鼠产生的抗体效价 (抗 M2e-IgG:1:25 600; 抗 HA α -IgG:1:12 800) 高于对照组的小鼠血清抗体效价 (抗 M2e-IgG:1:12 800; 抗 HA α -IgG:1:3 200), 其差异均具有统计学意义 (抗 M2e-IgG: $t=3.051, P=0.038$; 抗 HA α -IgG: $t=3.780, P=0.019$), 表明蛋白质纳米颗粒可以使小鼠产生较好的免疫应答。

如表 3 所示, 选用 h M2e、a M2e、s M2e、HA α 1 和 HA α 2 分别作为包被抗原来检测免疫小鼠后血清抗体对不同抗原组分效价水平, 不同组之间的小鼠血清对抗原组分的抗体效价差异均有统计学意义 ($F=558.939、178.588、244.294、234.974$ 和 $507.089; P$ 均 <0.001)。如表 3 所示, 实验组和对照组的小鼠血清对 5 种不同抗原组分均可产生特异性抗体, 以实验组抗体效价最高。与对照组相比, 实验组 h M2e 和 HA α 1 抗原产生的抗体效价差异具有统计学意义 ($t=4.811$ 和 $5.657; P=0.009$ 和 0.005)。

2. 双层蛋白质纳米颗粒可有效诱导脾细胞增殖

在第 3 次免疫后 2 周, 收集各组的脾细胞, 在体外用刺激物刺激后, 通过 CCK-8 实验检测其增殖情况。如表 4 所示, 不同组之间免疫后小鼠的脾细胞用多肽和刀豆蛋白刺激后增殖差异均有统计学意义 (M2e 刺激: $F=266.369, P<0.001$; HA α 刺激: $F=599.962, P<0.001$; 刀豆蛋白刺激: $F=56.045, P<0.001$)。与对照组相比, 实验组小鼠脾细胞多肽刺激明显 (M2e 刺激: $t=12.942, P<0.001$; HA α 刺激: $t=24.591, P<0.001$)。表明纳米颗粒可有效帮助可溶性蛋白诱导脾细胞增殖, 激发更强烈的细胞免疫。

表 3 蛋白免疫小鼠后血清抗体对不同抗原组分效价水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	重复次数	h M2e-IgG 滴度 (lg)	a M2e-IgG 滴度 (lg)	s M2e-IgG 滴度 (lg)	HA α 1-IgG 滴度 (lg)	HA α 2-IgG 滴度 (lg)
实验组	3	4.57 \pm 0.15 ^a	3.40 \pm 0.17	4.60 \pm 0.17	3.90 \pm 0.17 ^a	3.83 \pm 0.15
对照组	3	3.97 \pm 0.15	3.03 \pm 0.15	4.40 \pm 0.30	3.10 \pm 0.17	3.70 \pm 0.10
空白组	3	1.29 \pm 0.05 ^a	1.37 \pm 0.08 ^a	1.37 \pm 0.03 ^a	1.33 \pm 0.08 ^a	1.37 \pm 0.03 ^a
<i>F</i> 值		558.939	178.588	244.294	234.974	507.089
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 实验组为双层蛋白纳米颗粒 (FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α /HA α -6M2e) 免疫组, 对照组为可溶性蛋白 (FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 和 HA α -6M2e) 免疫组, 空白组为 PBS 免疫组; h M2e: 人源 M2 蛋白胞外域; a M2e: 禽源 M2 蛋白胞外域; s M2e: 猪源 M2 蛋白胞外域; HA α : 血凝素茎部 α 螺旋区; 组间两两比较数据均为方差齐性, 采用 LSD 检验; ^a: 表示与对照组相比, $P<0.05$

表 4 多肽刺激小鼠脾细胞的增殖结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	重复次数	细胞增殖率 (%)		
		多肽 M2e 刺激	多肽 HA α 刺激	刀豆蛋白刺激
实验组	3	154.18 \pm 2.34 ^a	151.51 \pm 1.56 ^a	640.44 \pm 48.82
对照组	3	119.53 \pm 4.00	122.94 \pm 1.27	577.86 \pm 23.68
空白组	3	103.28 \pm 1.16 ^a	94.79 \pm 2.83 ^a	372.95 \pm 14.12 ^a
<i>F</i> 值		266.369	599.962	56.045
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 实验组为双层蛋白纳米颗粒 (FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α /HA α -6M2e) 免疫组, 对照组为可溶性蛋白 (FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 和 HA α -6M2e) 免疫组, 空白组为 PBS 免疫组; M2e: M2 蛋白胞外域; HA α : 血凝素茎部 α 螺旋区; 组间两两比较采用 LSD 检验; ^a: 表示与对照组相比, $P<0.05$

3. 双层蛋白质纳米颗粒可诱导 Th1 和 Th2 型细胞免疫应答

采用 ELISPOT 方法检测免疫后的小鼠分泌细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的淋巴细胞数量。如表 5 所示, 不同组间免疫后小鼠分泌细胞因子的淋巴细胞数差异均有统计学意义 (M2e 刺激: $F=256.132$ 和 $60.346, P$ 均 <0.001 ; HA α 刺激: $F=113.083$ 和 $79.836, P$ 均 <0.001)。实验组免疫后小鼠分泌细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的淋巴细胞数量均高于对照组 (M2e 刺激: $t=5.477$ 和 $6.571, P=0.005$ 和 0.013 ; HA α 刺激: $t=9.239$ 和 $7.671, P=0.001$ 和 0.013), 表明双层蛋白质纳米颗粒可有效诱导 Th1 型和 Th2 型免疫应答。

4. 免疫后细胞因子 mRNA 水平显著升高

如表 6 所示, 多肽 M2e 和 HA α 刺激实验组和对照组免疫后的小鼠脾细胞均可分泌 IL-2、IL-4、IFN- γ 细胞因子, 其中实验组小鼠脾细胞分泌 IL-4 和 IFN- γ 细胞因子程度更高, 差异具有统计学意义 (IL-4: $t=6.032$ 和 $4.824, P=0.004$ 和 0.009 ; IFN- γ : $t=13.253$ 和 $20.847, P$ 均 <0.001), 进一步证明纳米颗粒可以使机体产生更强的细胞免疫。

表 5 多肽刺激免疫后小鼠脾细胞分泌细胞因子的细胞数($\bar{x}\pm s$)

组别	重复次数	IL-4(个/3×10 ⁵)			IFN-γ(个/3×10 ⁵)		
		未刺激	M2e 刺激	HAα 刺激	未刺激	M2e 刺激	HAα 刺激
实验组	3	7.00±2.00	113.00±5.57 ^a	167.33±16.50 ^a	4.00±2.65	69.33±12.10 ^a	84.00±13.75 ^a
对照组	3	7.00±1.00	93.00±3.00	71.67± 7.02	2.00±1.00	21.00± 4.00	22.00± 2.65
空白组	3	10.67±3.05	38.00±3.61 ^a	43.33± 3.79 ^a	2.67±2.10	5.67± 1.53 ^a	4.33± 1.15 ^a
<i>F</i> 值		2.814	256.132	113.083	0.757	60.346	79.836
<i>P</i> 值		0.137	<0.001	<0.001	0.509	<0.001	<0.001

注:实验组为双层蛋白纳米颗粒(FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα/ HAα-6M2e)免疫组,对照组为可溶性蛋白(FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα 和 HAα-6M2e)免疫组,空白组为 PBS 免疫组;M2e:M2 蛋白胞外域;HAα:血凝素茎部 α 螺旋区;M2e 和 HAα 刺激脾细胞产生 IFN-γ 的数据方差不齐,两两比较采用 Dunnett T3 检验,其余组间两两比较采用 LSD 检验;^a:表示与对照组相比,*P*<0.05

表 6 多肽刺激小鼠脾细胞分泌细胞因子的 mRNA 水平结果($\bar{x}\pm s$)

组别	重复次数	多肽 M2e 刺激			多肽 HAα 刺激		
		IL-2	IL-4	IFN-γ	IL-2	IL-4	IFN-γ
实验组	3	1.47±0.10	3.28±0.19	9.44±0.60	1.39±0.13	4.60±0.14	8.28±0.15
对照组	3	1.68±0.04	2.60±0.06	3.85±0.42	1.67±0.15	3.53±0.36	3.70±0.35
<i>t</i> 值		-3.610	6.032	13.253	-2.428	4.824	20.847
<i>P</i> 值		0.023	0.004	<0.001	0.072	0.009	<0.001

注:两种多肽刺激下的空白组(PBS 组)的 Ct 平均值等于 1;实验组为双层蛋白纳米颗粒(FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα/ HAα-6M2e)免疫组,对照组为可溶性蛋白(FljB-6M2e-ΔD2D3-HAα 和 HAα-6M2e)免疫组;M2e:M2 蛋白胞外域;HAα:血凝素茎部 α 螺旋区

讨 论

由于流感病毒通过抗原漂移和转换可以逃避普遍群体免疫对全球公共卫生构成严重风险,因此流感疫苗必须每年更新一次,与预测的流行病毒的抗原性相匹配^[7]。目前广泛使用的传统流感疫苗接种会使机体产生体液免疫反应,却很少刺激细胞免疫,但细胞免疫是对抗细胞内病原体感染的长期有效保护所必需的^[8]。之前报道 HAα 和 M2e 相对分子质量小,免疫原性弱,但使用鞭毛蛋白和纳米颗粒会增强疫苗的免疫原性^[9-11],基于此我们通过合理的设计,将 h M2e、a M2e 和 s M2e 各 2 拷贝串联为 6M2e、HAα 和鞭毛蛋白构建为融合蛋白,将其制备为纳米颗粒核心,再通过交联剂 DTSSP 交联其纳米颗粒的外壳蛋白,模仿流感病毒发出生物信号。双层蛋白质纳米颗粒与无机纳米颗粒、聚合物纳米颗粒等相比,具有高密度的靶抗原和高度的生物相容性,避免了脱靶免疫应答^[12]。本研究证实了双层蛋白质纳米颗粒可诱发 B 淋巴细胞产生免疫应答,并与免疫 T 细胞协同作用,增强其免疫原性。

有报道,基于蛋白质的纳米颗粒疫苗可以充当抗原载体和先天刺激物,激活先天免疫应答,提高免疫应答的整体水平^[13]。有研究表明,与可溶性抗原相比,纳米颗粒由于其大小与病原体相当,吞噬细胞可以更有效地吸收纳米颗粒抗原,诱导 DC 成熟,分泌促炎细胞因子和趋化因子,诱导体液和细胞免疫应答^[5]。本研究 ELISA 实验结果分析,实验组小鼠血清产生的抗体效价优于对照组,对不同的抗原组分也均可产生特异性抗体,表明蛋白质纳米颗粒疫苗免疫小鼠后,其抗原成分通过受体介导的内吞作用直接穿过淋巴管到达淋巴结,有效改善了 DC 的抗原提呈,从而使 B 细胞更快的诱导分化为效应 B 细胞,并产生特异性抗体,预防流感病毒的感染。

Wang 等^[14]研究发现,随着 IFN-γ 分泌的增加,CD8⁺杀伤 T 细胞和 CD4⁺辅助 T 细胞分化并增殖为效应细胞来参与细胞免疫应答。本文通过脾细胞增殖实验和 ELISPOT 实验分析,表明可溶性蛋白和双层蛋白质纳米颗粒均可以诱导细胞免疫,其中纳米颗粒免疫后的小鼠分泌 IFN-γ 的效应 T 细胞的数量是对照组的 3 倍,触发了更强的 T 细胞免疫应

答,有助于交叉保护性免疫。此外与对照组相比,IFN- γ 和 IL-4 等细胞因子转录水平的提高也表明纳米颗粒可以诱导更强的 Th1 和 Th2 型反应来抵抗高致病性流感病毒的攻击。这可能是由于纳米颗粒刺激骨髓来源的 DC 中 IL-1 β 的产生,诱导 T 细胞增殖和分化为 Th1 和 Th2 免疫细胞,从而分泌大量细胞因子^[15]。此外由于 DTSSP 交联剂中的二硫键可以被切割,细胞摄取后,在胞质的还原条件中进行抗原的持续释放。有研究证明持续的抗原释放会使 T 细胞增殖分化为记忆 T 细胞,负责长期免疫^[16]。

本研究将目的蛋白 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α 和 HA α -6M2e 成功在原核系统中表达纯化,并通过脱溶剂-交联法制备了粒径约为 130 nm 的双层蛋白质纳米颗粒 FljB-6M2e- Δ D2D3-HA α /HA α -6M2e,经过实验验证后皮下注射免疫小鼠,可以产生抗 M2e-IgG 抗体和抗 HA α -IgG 抗体,促进多种细胞因子表达,诱导机体产生更强的细胞免疫,具有良好的免疫原性。今后将尝试探索特异性抗体发挥免疫保护作用的途径,并进行动物攻毒实验来探索其能否有效保护多种亚型流感病毒的攻击。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 马淑敏:实验研究、采集、分析数据、统计分析、论文撰写及修改;项婷婷、何泳愉、郭潮潭、杨灿、杨新燕、胡珂昕:论文修改;沃恩康:研究指导、论文指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] 赵淑敏. 通用流感疫苗研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2023, 51(2): 60-68. DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2023.02.009.
- [2] Stepanova LA, Mardanova ES, Shuklina MA, et al. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes[J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1):33. DOI: 10.1186/s12929-018-0433-5.
- [3] Ding P, Zhang G, Chen Y, et al. Reasonable permutation of M2e enhances the effect of universal influenza nanovaccine[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 173: 244-250. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.132.
- [4] Cui B, Liu X, Fang Y, et al. Flagellin as a vaccine adjuvant[J]. Expert Rev Vaccines, 2018, 17(4): 335-349. DOI: 10.1080/14760584.2018.1457443.
- [5] Khalaj-Hedayati A, Chua CLL, Smooker P, et al. Nanoparticles in influenza subunit vaccine development: Immunogenicity enhancement[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2020, 14(1): 92-101. DOI: 10.1111/irv.12697.
- [6] 刘亚辉,沃恩康,杨新燕,等. 甲型流感病毒 M2 蛋白胞外域单克隆抗体的制备及其生物特性[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2018, 45(6): 395-400. DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4149.2018.06.005.
- [7] Heaton NS, Sachs D, Chen CJ, et al. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(50): 20248-20253. DOI: 10.1073/pnas.1320524110.
- [8] Jang YH, Seong BL. The quest for a truly universal influenza vaccine[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9:344. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00344.
- [9] Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: Monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions [J]. J Virol, 1988, 62(8): 2762-2772. DOI: 10.1128/JVI.62.8.2762-2772.1988.
- [10] Mardanova ES, Kotlyarov RY, Kuprianov VV, et al. High immunogenicity of plant-produced candidate influenza vaccine based on the M2e peptide fused to flagellin[J]. Bioengineered, 2016, 7(1): 28-32. DOI: 10.1080/21655979.2015.1126017.
- [11] Chakravarty M, Vora A. Nanotechnology-based antiviral therapeutics [J]. Drug Deliv Transl Res, 2021, 11(3): 748-787. DOI: 10.1007/s13346-020-00818-0.
- [12] Deng L, Mohan T, Chang TZ, et al. Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 359. DOI: 10.1038/s41467-017-02725-4.
- [13] Hong JY, Chen TH, Chen YJ, et al. Highly immunogenic influenza virus-like particles containing B-cell-activating factor (BAFF) for multi-subtype vaccine development[J]. Antiviral Res, 2019, 164:12-22. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.02.004.
- [14] Wang Y, Deng L, Gonzalez GX, et al. Double-layered M2e-NA protein nanoparticle immunization induces broad cross-protection against different influenza viruses in mice[J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9(2): e1901176. DOI: 10.1002/adhm.201901176.
- [15] Wang L, Chang TZ, He Y, et al. Coated protein nanoclusters from influenza H7N9 HA are highly immunogenic and induce robust protective immunity[J]. Nanomedicine, 2017, 13(1):253-262. DOI: 10.1016/j.nano.2016.09.001.
- [16] Demento SL, Cui W, Criscione JM, et al. Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype[J]. Biomaterials, 2012, 33(19): 4957-4964. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.041.

(收稿日期:2023-06-27)