

以II型单纯疱疹病毒 gD 为免疫原的 circRNA 疫苗制备及药效分析

张绥欣¹, 郑小迪¹, 倪鹏², 汪众², 刘彪², 汪洋¹, 胡翰¹, 刘滨磊^{1*}

1 湖北工业大学 生命科学与健康工程学院, 湖北 武汉 430068

2 武汉滨会生物科技股份有限公司, 湖北 鄂州 436000

张绥欣, 郑小迪, 倪鹏, 汪众, 刘彪, 汪洋, 胡翰, 刘滨磊. 以II型单纯疱疹病毒 gD 为免疫原的 circRNA 疫苗制备及药效分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1354-1371.

ZHANG Suixin, ZHENG Xiaodi, NI Peng, WANG Zhong, LIU Biao, WANG Yang, HU Han, LIU Binlei. Preparation and efficacy of a circRNA vaccine with herpes simplex virus type II gD as immunogen[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1354-1371.

摘要: 为研究以II型单纯疱疹病毒 gD 胞外域(ectodomain)为免疫原的 circRNA 疫苗诱导 BALB/c 小鼠出现的特异性免疫反应, 并进行免疫研究评价, 为单纯疱疹病毒 mRNA 疫苗的研发提供实验依据和技术参考, 本研究通过 PCR 技术和同源重组技术, 从 pT7AMP-gD Ectodomain 质粒中获得 gD 基因, 将 gD 基因克隆至 pUC57 载体, 获得重组 pUC57-circ-gD 质粒并进行测序鉴定。进行 PCR 获得后续实验模板 DNA 后, 以单纯疱疹病毒囊膜糖蛋白 gD Ectodomain 为免疫原, 并同时模板 DNA 进行体外转录(*in vitro* transcription, IVT)及环化, 将得到的 pUC57-circ-gD mRNA 进行 RNase R 酶切验证、反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)成环验证, 以确定是否成环; 转染 293T 细胞, 72 h 后收集细胞上清, 进行蛋白免疫印迹法(Western blotting, WB)以鉴定蛋白表达; 采用脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)对合成的 mRNA 以微流控包封法进行包封; 包封后, 将其应用于模型动物 BALB/c 小鼠中实验, 在第 21、35 天于眼底静脉丛采血, 第 49 天麻醉后摘除眼球采血, 后续进行酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)抗体检测, 并对病毒中和抗体进行测定, 在第 49 天取脾脏, 后续通过固相酶联免疫斑点技术(enzyme-linked immunospot, ELISpot)检测细胞因子 IFN- γ 的分泌情况。结果表明成功构建了重组质粒, 测序结果正确; RNase R 酶切验证后证实了环状 RNA 的存在, mRNA 转染 293T 细胞后 Western blotting 验证有清晰的特异性条带; 对疫苗进行质量检测, 通过尺寸排阻高效液相色谱法(size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)检测到疫苗的纯度约为 90%, 测量 mRNA-LNP 的粒径为 82.76 nm, 包封率达到 98%左右; 小鼠进行 3 次免疫后, 在观察期内小鼠体重的增加和良好的存活率证明了该疫苗的安全性; 在免疫后的小鼠血清中, IgG 抗

资助项目: 国家自然科学基金(32270969); 湖北省重大科技专项(2022ACA001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270969) and the Major Science and Technology Special Project of Hubei Province (2022ACA001).

*Corresponding author. E-mail: liubl@hbut.edu.cn

Received: 2024-07-10; Accepted: 2024-09-25; Published online: 2024-09-26

体滴度增加; 在脾脏细胞中, 检测到分泌特异性 IFN- γ 的 T 细胞数量升高。后续 ELISA、中和抗体检测、ELISpot 实验及攻毒实验说明 pUC57-circ-gD mRNA 免疫原性及持久性良好, 并且可以抵御病毒的攻击。本研究为 circRNA 疫苗相关研究提供了参考。

关键词: II型单纯疱疹病毒; gD 胞外域基因; 环状 RNA; mRNA 疫苗; 免疫原性

Preparation and efficacy of a circRNA vaccine with herpes simplex virus type II gD as immunogen

ZHANG Suixin¹, ZHENG Xiaodi¹, NI Peng², WANG Zhong², LIU Biao², WANG Yang¹, HU Han¹, LIU Binlei^{1*}

¹ School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

² Wuhan Binhui Biopharmaceutical Co., Ltd., Ezhou 436000, Hubei, China

Abstract: This study investigated the specific immune response of BALB/c mice that was induced by a circular RNA (circRNA) vaccine expressing the herpes simplex virus type II (HSV-2) glycoprotein D (gD). The aim was to evaluate the immunological potential of this vaccine and lay a foundation for developing an mRNA vaccine against HSV-2. PCR and homologous recombination were employed to integrate the gD gene obtained from the pT7AMP-gD ectodomain plasmid into pUC57 to generate the recombinant plasmid pUC57-circ-gD, which was then sequenced and characterized. *In vitro* transcription and cyclization were performed on the template DNA to generate pUC57-circ-gD mRNA. To validate the formation of circular RNA, we cleaved the pUC57-circ-gD mRNA with RNase R and employed RT-PCR to validate the cyclization. The pUC57-circ-gD mRNA was then transfected into 293T cells. After 72 h, the cell supernatant was collected, and Western blotting was employed to measure the protein level of gD. Subsequently, the mRNA was encapsulated in lipid nanoparticles (LNPs) by microfluidic encapsulation. BALB/c mice were administrated with the encapsulated mRNA, and blood was collected from the fundus venous plexus after 21 and 35 days, and from the enucleated eyeballs after 49 days. Enzyme-linked immunosorbent assay was employed to measure the titers of antibodies, including virus-neutralizing antibodies. After 49 days, spleens were harvested and assessed for secretion of interferon-gamma (IFN- γ) by solid-phase enzyme-linked immunospot. The results showed successful construction and sequencing of the recombinant plasmid. RNase R digestion confirmed the presence of circular RNAs. Western blotting of the 293T cells transfected with the mRNA showed clear specific bands. The quality of the vaccine was tested by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography, which showed that the purity of the vaccine was about 90%. The mRNA-LNP showcased the particle size of 82.76 nm and an encapsulation rate of approximately 98%. Following three-dose vaccination, all immunized mice exhibited steady weight gain with 100% survival rate throughout the 28-day observation period, indicating no significant acute toxicity associated with the vaccine formulation. The immunized mice showed dose-dependent increases in serum IgG antibody titer and IFN- γ secretion by splenocytes and they were resistant to virus attacks. These

findings indicate good immunogenicity and persistence of the pUC57-circ-gD mRNA vaccine, providing a reference for further studies on circRNA vaccines.

Keywords: herpes simplex virus type II (HSV-2); *glycoprotein D (gD) ectodomain* gene; circRNA; mRNA vaccine; immunogenicity

环状 RNA(circular RNA, circRNA)不具有 5'端帽子和 3'端 poly(A)尾, circRNA 的共价闭环结构使其具有更高的稳定性, 与其他线性 RNA 相比, 更耐核酸外切酶及核糖核酸酶降解^[1], 在体内表达时间长, 且能在细胞中稳定存在^[2]。环状 RNA 也能够进行蛋白质编码和翻译, 这为疫苗的开发提供了便利条件^[3]。北京大学魏文胜团队研究发现, 与传统的线性 mRNA 疫苗相比, 环状 RNA 疫苗能够更有效地诱导机体产生中和抗体, 并且能够引发更强有力的 T 细胞反应^[4]。

体外制备环状 RNA 有许多方法, 其中通过排列内含子-外显子元件(permuted intron-exon, PIE) I 类内含子和 II 类内含子自剪接系统方法, 催化内含子的 5'和 3'环化臂配对进行自剪接反应, 5'内含子(5' intron)和 3'内含子(3' intron)脱落, 完成环化, 从而制备具有内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)和已优化的附属序列的 circRNA (图 1)。该方法相对简单, 需要 GTP 供能, 无需蛋白酶参与, 环化产物均一旦效率高, 在真核细胞中蛋白表达量高且表达稳定^[2]。更重要的是, circRNA 稳定性高, 可以延长体内翻译持续时间^[5]。

单纯疱疹病毒 (herpes simplex viruses, HSV)是有包膜的双链 DNA 病毒^[6], 属于人类疱疹病毒家族的 α 亚家族^[7], 分为 I 型疱疹病毒

(HSV-1)和II型疱疹病毒(HSV-2), 其中 HSV-2 主要感染生殖器, 生殖道疱疹病毒还会增加人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)感染和传播的风险。即使接受抗病毒治疗, 发病率和死亡率也依旧较高^[8]。HSV 外壳由 16 种膜蛋白组成, 其中 12 种是糖蛋白; gD 作为其中一种免疫原性较强的糖蛋白, 是抗 HSV 感染中重要的保护性抗原。作为免疫原, gD 在其他几种疫苗平台上的应用已显示出良好的临床免疫原性结果^[9]。在 mRNA 疫苗中, mRNA 编码的 gD 蛋白由宿主细胞表达, 诱导免疫系统产生抗体。gD 与病毒胞外域(ectodomain)结合, 协助病毒进入宿主细胞并触发膜融合。外源性 gD 蛋白通过竞争性占据受体, 阻断病毒入侵, 从而有效抑制潜伏感染, 具有成为 HSV 疫苗靶点的优势^[10]。

mRNA 的递送是通过脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)对合成的 mRNA 采用微流控封装法进行封装, LNP 可以减少毒性和免疫原性问题, 并实现体外及体内的高效率转染^[11]。LNP 由 4 种成分组成: 可电离阳离子脂质(cationic lipids)、辅助脂质(helper lipids)、胆固醇(cholesterol)和聚乙二醇化脂质(pegylated lipids, PEG-lipids), 已被证明具有出色的体内递送效率^[12], 应用 LNP 进行递送可增强药物的疗效^[13], 而且可以增加 mRNA 的稳定性, 提高体外和体内蛋白质表达的效率^[14]。

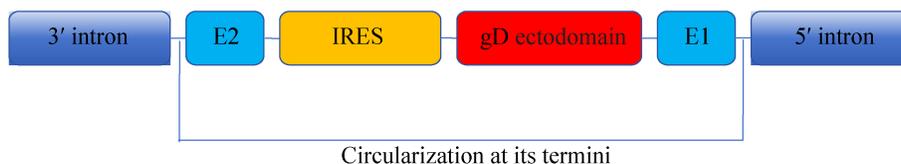


图 1 环状 RNA 环化原理

Figure 1 Principles of circular RNA.

本研究基于环状 RNA 的抗核糖核酸酶的特性和糖蛋白 gD Ectodomain 的免疫原性优势,使用 LNP 对合成的 mRNA 进行包封后递送,并在模型动物 BALB/c 小鼠中进行实验,以II型单纯疱疹病毒 gD Ectodomain 为免疫原进行体外转录并包封后制成 circRNA 疫苗,并在确认疫苗的安全性及有效性后,将其用于控制单纯疱疹病毒的感染。

1 材料与方法

1.1 实验材料

pT7AMP-gD Ectodomain 质粒、pUC57-circ-eGFP 质粒由武汉滨会生物科技股份有限公司提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top 10 感受态细胞、人肾上皮 293T 细胞系、非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)均购自美国典型培养物保藏中心(American Typical Culture Collection, ATCC)。

质粒提取试剂盒、凝胶 DNA 提取试剂盒、重组酶 Exnase II、cDNA 第一链合成试剂盒、ChamQ SYBR qPCR Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性内切酶 *Asc* I、*Pac* I 购自 NEB 公司;T7 高产 RNA 转录试剂盒购自近岸蛋白科技股份有限公司;组织 DNA 提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司;Lipid 6、二硬脂酰磷脂酰胆碱(distearoylphosphatidylcholine, DSPC)、胆固醇、二肉豆蔻酰甘油-聚乙二醇 2000 (DMG-PEG2000)购自武汉滨会生物科技股份有限公司;重组 II 型单纯疱疹病毒(oHSV-2)、HSV-2 MS 病毒由自武汉滨会生物科技股份有限公司提供;RNase R 购自广州吉赛生物科技有限公司;Mouse IFN- γ ELISPOT Kit 购自 Mabtech 公司;TMB 单组分显色液购自北京索莱宝科技有限公司;彩色预染蛋白分子量标准(10–170 kDa)购自上海碧云天生物技术股

份有限公司;ECL 化学发光底物试剂购自 Bio-sharp 公司;无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司;异氟烷购自江苏恒丰强生物技术有限公司;Anti-HSV1+HSV2 gD antibody、Recombinant HSV2 gD protein、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L) 购自 abcam 公司;ELISA 酶标板购自 Thermo Fisher Scientific 公司;BSA 购自 BioFroxx 公司。

1.2 实验仪器

CO₂ 培养箱, SANYO 公司;PCR 仪, 东胜龙公司;核酸电泳仪, 六一生物公司;凝胶成像系统, 君意电泳公司;纳米制药包封仪, 武汉滨会生物公司;Zetasizer Pro 纳米粒度电位仪, Malvern 公司;小型垂直电泳套装, Bio-Rad 公司;化学发光仪, 伯兰特公司;Qubit 4 荧光仪 Varioskan LUX 多功能酶标仪和实时荧光定量 PCR 仪, Thermo Fisher 公司;麻醉仪, Midmark。

1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 150 只, 6–8 周龄, 雌性, 购自湖北省疾病预防控制中心[生产许可证号: SCXK(鄂)2020-0018]。本研究所有动物实验均经湖北工业大学动物伦理委员会批准(批准号: HBUT No. 2020016)。培养温度控制在 25 °C 左右, 保持湿度在 50%, 光照设置为 12 h 亮 12 h 暗。

1.4 质粒的构建及鉴定

通过 PCR 从 pT7AMP-gD Ectodomain 质粒上获得 HSV2 gD Ectodomain 目的片段, 并在 NCBI 上查找获得 II 型单纯疱疹病毒(HSV-2)的 D 型囊膜蛋白序列(GenBank 登录号: 1487358)。使用限制性内切酶 *Asc* I、*Pac* I 将 pUC57-circ-eGFP 载体进行双酶切, 胶回收并纯化后获得载体片段, 而后通过重组酶 Exnase II 将目的片段

和载体连接, 获得重组 pUC57-circ-gD 质粒, 进行测序鉴定。

1.5 引物的设计与合成

使用软件 CE Design V1.03 和 Snap gene 设计载体引物和目的片段引物, 引物由武汉擎科生物科技有限公司合成, 序列信息见表 1。

1.6 重组质粒菌落 PCR 扩增与鉴定 II

将重组产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 经氨苄青霉素抗性筛选后, 挑取 8 个单菌落至

含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中过夜培养。以 *gD*-F、*neweGFP*-R 为引物进行菌落 PCR 扩增, 观察其核酸胶条带大小, 初步鉴定重组是否成功, 将阳性重组质粒菌送至武汉擎科生物科技有限公司测序。

1.7 体外转录及环化

以质粒为模板, 用引物 *neweGFP*-F 和 *neweGFP*-R 扩增获得 5'端带有 T7 启动子、5'intron 及 IRES 序列, 3'端带有 3'intron 及 *gD*

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer name | Primer sequence (5'→3') |
|-------------------|--|
| <i>gD</i> -F | AATACAGCAAAGgcgcccattggcagactgacaagcggc |
| <i>gD</i> -R | GTTTTTTGTTTTTattaattaatcactccagcaggcggagtc |
| <i>neweGFP</i> -F | CGGACCGTAATACGACTCACTATAGGGG |
| <i>neweGFP</i> -R | CCgcgccgcCTAGATATGCTGTTAT |
| <i>gDrt</i> PCR-F | tgctgccacctgaactttct |
| <i>gDrt</i> PCR-R | GCTCTATTAGTCACCGGA |
| qPCR-F | CTCCACAAATGGATCCGGCTT |
| qPCR-R | CGAACCAAAGGTGGTGAGCG |
| 18s RNA-F | CGGCTACCACATCCAAGGAA |
| 18s RNA-R | GCTGGAATTACCGCGCT |

Uppercase letters represent the functional sequence of the primer, which is the key part specifically binding to the target DNA sequence. Lowercase letters represent modifications used to indicate the primer sequence (such as restriction enzyme sites, addition of specific groups, etc.).

Ectodomain 基因的片段。扩增条件为: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 10 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 1 min。线性化 DNA 模板经过胶回收法进行纯化。

使用 T7 高产 RNA 转录试剂盒对 DNA 模板进行体外转录(*in vitro* transcription, IVT)及环化。采用加倍 GTP 用量、延长 IVT 反应时间的方法同时进行 mRNA 的体外环化, 于 37 °C 反应 14–16 h, 具体反应体系见表 2, 反应结束后加入 5 μL DNase I 及 10 μL RNase R, 混匀后 37 °C 反应 15 min。经 7.5 mol/L LiCl 沉淀后用 RNase Free ddH₂O 溶解, 从而获得大量的 mRNA 片段, 并进行测序分析。

表 2 IVT 及成环反应体系

Table 2 IVT and cyclization reaction transcription reaction system

| Component | Final concentration | Addition volume |
|---------------------------|---------------------|-----------------|
| ATP | 5 mmol/L | 50 μL |
| UTP | 5 mmol/L | 50 μL |
| CTP | 5 mmol/L | 50 μL |
| GTP | 10 mmol/L | 100 μL |
| 10× buffer | 1× | 100 μL |
| DNA template | 50 μg | 178 μL |
| RNase inhibitor | 1 U/μL | 30 μL |
| Inorganic pyrophosphatase | 0.002 U/μL | 20 μL |
| T7 RNA polymerase | 50 U/μL | 6 μL |
| ddH ₂ O | – | 416 μL |

1.8 环化验证

1.8.1 IVT 后 circRNA 抵抗 RNase R 消化

使用 Qubit 4 荧光仪进行浓度测定,取 3 μg pUC57-circ-gD mRNA 作为模板进行 RNase R 消化验证,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 10、15、20、25 min 后,70 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 10 min;将 3 μg pUC57-circ-gD mRNA 作为模板分别取 0.4、0.6、0.8、1 μL RNase R 进行消化验证,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后,70 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 10 min。取 9 μL 产物及 0.5 μL 原始模板 mRNA 在 1% 的琼脂糖凝胶中以 120 V 电泳 15 min,观察条带;取 3 μg 线性 pT7AMP-gD Ectodomain IVT mRNA 产物和 pUC57-circ-gD mRNA 产物同样进行 RNase R 消化验证,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后,70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,各取 9 μL 产物及 0.5 μL 原始模板 mRNA 在 1% 的琼脂糖凝胶以 120 V 电泳 15 min,观察条带。

1.8.2 RT-PCR 验证并测序

经过测序鉴定,可确定环化位点。将得到的 circRNA 作为模板,参照诺唯赞 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行操作。首先逆转录为 cDNA,以其为模板,通过跨环化位点法设计特异性的反向引物 gDrtPCR-F、gDrtPCR-R,PCR 扩增合成目的片段(图 2)。其中扩增条件为:98 $^{\circ}\text{C}$

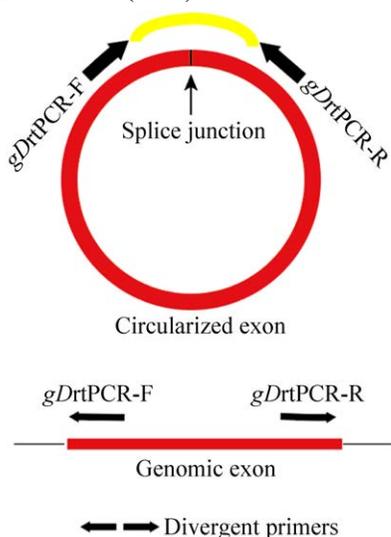


图 2 RT-PCR 验证环化原理图

Figure 2 Principles of circular RNA cyclization.

预变性 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 47 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 1 min。之后将 PCR 产物送至武汉擎科生物科技有限公司测序。

1.9 Western blotting 检测

将 pUC57-circ-gD mRNA 转染 293T 细胞,未加 mRNA 的细胞上清作阴性对照,转染 72 h 后收集细胞上清。取 20 μL 转染后的细胞上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后半干转膜 30 min。使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,将 Recombinant HSV2 gD protein 按 1:5 000 的比例稀释作为一抗,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,次日使用 0.05% 吐温-PBS 将聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)洗涤 3 次后,将 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)按 1:5 000 的比例稀释作为二抗,置于摇床室温孵育 1 h,使用 0.05% 吐温-PBS 将膜洗涤 3 次后,进行显影观察条带。

1.10 mRNA-LNP 的质量控制

1.10.1 包封及浓度测定

将 mRNA 溶于醋酸钠(25 mmol/L, pH 5.0)中。通过纳米制药包封仪将 LNP 和稀释后的 mRNA 按照体积比 1:4 混合,即可得到脂质纳米颗粒 mRNA-LNP,转移至 50 kDa 超滤离心管中,添加含有 8% 蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)进行换液浓缩,直至浓缩液 pH 值在 7.0–7.5 之间。通过 Qubit 4 荧光计、纳米粒度电位仪检测 mRNA-LNP 的包封率、粒径(Z-average)及聚合物分散性指数(polydispersity index, PDI),其中包封率的计算公式为 $(1-C_f/C_t) \times 100\%$ (C_f 为游离样品的 mRNA 量、 C_t 为总 mRNA 量)。

1.10.2 脂质组成分析

经过反相超高效液相色谱-荷电气溶胶检测(reversed phase ultra-performance liquid chromatography with charged aerosol detection, RP-UPLC-CAD)可用于确定 pUC57-circ-gD

mRNA 样品中每个单独的脂类成分及其相关杂质和降解产物,在 260 nm 波长下进行检测,设置流速为 0.3 mL/min,使用无水乙醇分别溶解 4 个 LNP 样本,收集上清液,分别稀释 7 种纯净的已知脂质标准品(阳离子脂、辅助脂、胆固醇和聚乙二醇组分 Lipid 6、DSPC、胆固醇和 DMG-PEG2000),用来识别和量化脂质成分,各取 10 μ L 上清液检测 LNP 组分,测量脂峰的面积并计算每个峰的百分比,使用外标法定量各组分。

1.10.3 纯度

使用 SEC-HPLC 验证纯度,以磷酸缓冲盐溶液(PBS, 150 mmol/L)为流动相,在 260 nm 波长下进行检测,设置流速为 0.5 mL/min,将色谱柱接入系统管线中,并使用流动相平衡色谱柱 30 min 以确保系统稳定。使用 150 mmol/L PBS 将 mRNA 稀释至 100 ng/ μ L,稀释后的 mRNA 溶液通过 0.22 μ m 孔径的滤器进行过滤,注入上样口。上样 100 μ L,上样时间 20 min。

1.11 免疫后小鼠称重检测 pUC57-circ-gD 疫苗的安全性

取 BALB/c 小鼠 18 只,分为 6 组,每组 3 只,注射前每只小鼠称体重,分别以 pUC57-circ-gD mRNA 和 Lipid 6 为免疫原,设置 PBS 组为阴性对照组,设置线性 pT7AMP-gD Ectodomain mRNA 为免疫原作为阳性对照组,免疫时间及采血、取脾时间见图 3,给药浓度及体积见表 3。每次免疫 7 d 后与注射前小鼠体重对比,共观

察 21 d,确认疫苗的安全性。

1.12 pUC57-circ-gD mRNA-LNP 疫苗的免疫原性评价

1.12.1 分组及免疫

将 30 只小鼠分为 6 组,每组 5 只,分别以 pUC57-circ-gD mRNA 和 Lipid 6 为免疫原,设置 PBS 组为阴性对照组,设置线性 pT7AMP-gD Ectodomain mRNA 为免疫原作为阳性对照组,免疫时间及采血、取脾时间见图 4,给药浓度及体积见表 4。

1.12.2 ELISA 法检测小鼠血清抗体滴度

使用每孔 100 ng 的 Recombinant HSV2 gD 蛋白包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}$ C 过夜,次日使用 0.05%吐温-PBS 洗板 3 次;每孔 200 μ L 的 1.5% BSA 封闭 2 h;取出后洗板 3 次;0.2% BSA 作为稀释液先将血清稀释 500 倍,后 4 倍倍比稀释,作为一抗加入,孵育 1 h;洗板 3 次;加入使用稀释液 1:2 000 稀释的 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)作为二抗,孵育 1 h;洗板 6 次,加入 TMB 显色液,避光室温显色约 5 min 后,加入 2 mol/L 浓硫酸终止显色,颜色由蓝变黄。终止显色后 30 min 内测量 OD_{450} 值。

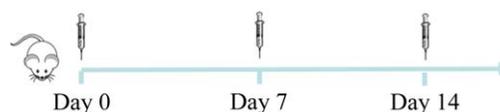


图 3 小鼠免疫时间轴 注射器标志代表免疫时间
Figure 3 Timeline of immunization in mice. Syringe markers represent the time of immunization.

表 3 动物实验分组及免疫

Table 3 Animal grouping and immunization

| Test group | Immunization method | Immunization dose | Number | Number of immunizations |
|--|---------------------|------------------------------|--------|-------------------------|
| Lipid 6-pUC57-circ-gD (experimental group) | i.p. | 50 μ g (high dose group) | 3 | 3 |
| Lipid 6-gD-mRNA (positive control group) | i.p. | 10 μ g (low dose group) | 3 | 3 |
| Lipid 6 | i.p. | 30 μ g | 3 | 3 |
| PBS (negative control group) | i.p. | 100 μ L | 3 | 3 |
| | i.p. | 100 μ L | 3 | 3 |

i.p. means intraperitoneal injection.

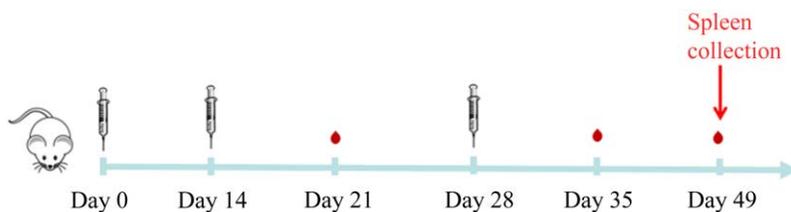


图4 小鼠免疫、取血、收集脾脏时间轴 注射器标志代表免疫时间，点代表采血时间，箭头代表取脾时间。

Figure 4 Timeline of immunization, blood collection and spleen collection in mice. Syringe markers represent the time of immunization, the dots represent the time of blood collection, and the arrows represent the time of spleen extraction.

表4 动物实验分组及免疫

Table 4 Animal grouping and immunization

| Test group | Immunization method | Immunization dose | Number | Number of immunizations |
|--|---------------------|--------------------------------|--------|-------------------------|
| Lipid 6-pUC57-circ-gD (experimental group) | i.m. | 50 μ g (high dose group) | 5 | 3 |
| | i.m. | 30 μ g (medium dose group) | 5 | 3 |
| | i.m. | 10 μ g (low dose group) | 5 | 3 |
| Lipid 6-gD-mRNA (positive control group) | i.m. | 30 μ g | 5 | 3 |
| Lipid 6 | i.m. | 100 μ L | 5 | 3 |
| PBS (negative control group) | i.m. | 100 μ L | 5 | 3 |

i.m. means intramuscular injection.

1.12.3 中和抗体检测

采用固定病毒-血清稀释法，用1 000细胞培养半数感染剂量/毫升(cell culture infective dose 50%, CCID₅₀/mL)的病毒接种量检测小鼠血清中和抗体滴度。病毒为本实验室构建的 α HSV2^{GFP}[15]。提前1 d于96孔板中铺 2×10^5 cells/mL Vero细胞，次日观察细胞密度在80%–90%为宜。从–80 °C冰箱中取出已分装好的血清化冻，化冻后用DMEM/F-12进行8倍稀释后，再2倍梯度稀释至512倍。稀释后的病毒液(50 μ L)与等体积的血清稀释液(50 μ L)于96孔板混合，并做好标记，放置在二氧化碳培养箱中孵育1 h。取出铺有细胞的96孔板，弃去细胞上清，按照孔板标记加入孵育后的病毒血清混合液，放置在二氧化碳培养箱中

孵育48 h。最终，通过计算其中和抗体滴度的半数有效浓度(neutralizing titers at 50%, NT₅₀)，评估抗体的中和效果。

1.12.4 IFN- γ 细胞因子检测

在第一次免疫49 d后，分离小鼠脾脏，研磨细胞，离心后弃上清，加入红细胞裂解液裂解。加入PBS终止裂解并洗涤细胞，再次离心重悬细胞，将细胞浓度调至 2×10^5 cells/孔。使用特异性刺激原(紫外处理的 α HSV-2病毒)体外刺激脾细胞；阳性对照孔使用非特异性刺激原[1 μ g/孔的佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)+离子霉素(lonomycin)]体外刺激脾细胞，置于37 °C CO₂培养箱中孵育48 h。弃去细胞液，使用PBS洗涤5次，在含有0.5%胎牛血清的PBS中将检测

抗体(R4-6A2-生物素)稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔加入 100 μL , 孵育 2 h, 使用含有 0.5%胎牛血清的 PBS 以 1:1 000 稀释链霉亲和素-碱性磷酸酶偶联物(streptavidin-ALP), 每孔加入 100 μL , 孵育 1 h, 洗板 5 次, 加入显色液显色。终止显色晾干后使用自动 ELISpot 读板机对斑点进行计数。

1.13 有效性检测

1.13.1 病毒半数致死量(lethal dose 50, LD_{50})测定

使用 PBS 将 HSV-2 MS 病毒分别进行梯度稀释至病毒滴度 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 , 每组 8 只 BALB/c 小鼠, 共 5 组, 分别腹腔注射 50 μL 的 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 的病毒, 连续观察 14 d, 每天记录小鼠状态和死亡情况, 每 3 d 记录小鼠体重。根据小鼠死亡情况, 使用改进寇氏法公式 $\log LD_{50} = X_K - i \times (\sum P - 0.5)$ 计算 LD_{50} , 其中 X_K 为最高对数剂量; i 为相邻两对数剂量的差值; P 为各剂量组的死亡率。

1.13.2 致死剂量病毒攻击检测疫苗对小鼠的保护力

将 60 只小鼠分为 6 组, 每组 10 只, 分别以 pUC57-circ-gD mRNA 和 Lipid 6 为免疫原, 设置 PBS 组为阴性对照组, 设置 pT7AMP-gD Ectodomain mRNA 为免疫原作为阳性对照组, 免疫时间及攻毒时间见图 5, 给药浓度及体积

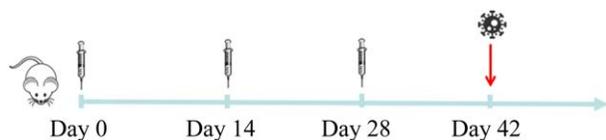


图 5 小鼠免疫、攻毒时间轴 注射器标志代表免疫时间, 箭头代表攻毒时间。

Figure 5 Timeline of immunization and virus injection. Syringe markers represent the time of immunization, the arrow represents the time of virus injection.

见表 4, 第 3 针免疫 14 d 后, 进行攻毒实验, 每只腹腔注射 50 μL 的 $10 \times LD_{50}$ 为 $10^{6.75}$ 的 HSV-2 MS 病毒, 攻毒后每天记录小鼠状态和死亡情况。

1.13.3 攻毒后病毒载量测定

在 HSV-2 MS 病毒攻毒后, 于观察期最后一天将各组 5 只小鼠脱颈处死, 取小鼠阴道组织, 使用组织 DNA 提取试剂盒提取阴道组织 DNA, 利用该病毒中 *gE* 基因上的特异性引物(图 6), 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)的方法对攻毒后小鼠阴道组织的病毒 *gE* 基因的拷贝数差异进行检测, 反应体系为 1 ng 的 DNA 模板 1 μL , 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的上、下游引物各 1 μL , SYBR Green Realtime PCR Master Mix 5 μL , 使用 ddH₂O 补齐至 10 μL 。

1.14 统计学处理

数据统计采用 Graph Pad Prism 8 软件进行处理, 数据以平均值 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示。两组组间差异性采用独立样本 *t*-test 分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

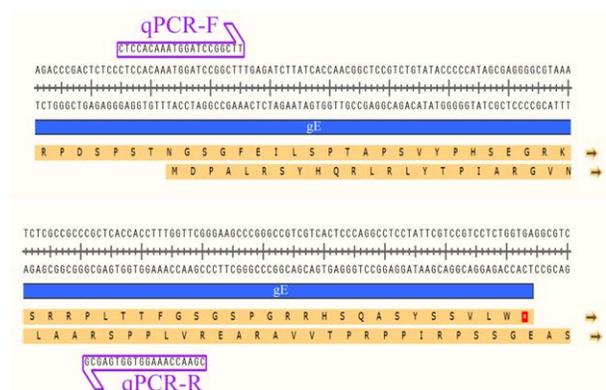


图 6 qPCR 引物设计图

Figure 6 qPCR primer design diagram

2 结果与分析

2.1 质粒的构建及鉴定

以本实验室保存的 pT7AMP-gD Ectodomain 质粒为模板,通过 PCR 扩增成功获得 HSV-2 gD Ectodomain 目的片段(GenBank 登录号:1487358),以本实验室保存的 pUC57-circ-eGFP 质粒为模板,通过双酶切、胶回收后成功获得载体片段,使用由重组质粒转化的单菌落的培养菌液作为模板进行菌落 PCR 扩增,条带大小正确,送公司测序,比对序列正确,即得到成功构建的 pUC57-circ-gD 质粒。

2.2 体外转录及环状 RNA 的获得

以 pUC57-circ-gD 质粒为模板,使用引物 neweGFP-F 和 neweGFP-R 进行扩增,得到的 PCR 产物作为后续体外转录及环化的模板。使用 T7 高产 RNA 转录试剂盒进行对 DNA 模板的 IVT 及环化,得到了大量的 pUC57-circ-gD mRNA (图 7)。

2.3 环状 RNA 的稳定性与特异性验证

2.3.1 RNase R 酶验证显示环状 RNA 成功环化

使用 RNase R 消化可用于去除线性 RNA 分

子而保留环状 RNA。通过对消化时间和酶的用量进行研究,发现同样的消化时间内,加入更多的酶也不会造成环状 RNA 的过度消化,而线性 RNA 会被降解;而不同的酶消化时间对结果影响不大(图 8)。这意味着相较于线性 RNA,环化后的 mRNA 时展现出对 RNase R 酶的高耐受性和稳定性;而适宜的酶量及消化时间对环状 RNA 的稳定性和降解程度影响较小,进一步验证了环状 RNA 的稳定性特征。

2.3.2 特异性连接位点验证环状 RNA 成功环化

以得到的 circRNA 作为模板,逆转录为 cDNA,以其为模板,通过跨环化位点法设计特异性的引物 gDrtPCR-F、gDrtPCR-R,然后 PCR 扩增合成目的片段。测序结果使用 Snap gene 比对正确(图 9),证明环化成功。

2.4 Western blotting 显示目的蛋白成功表达

转染 72 h 后收集上清进行蛋白印迹检测,鉴定目的抗原蛋白表达情况。Western blotting 结果显示,该条带大小与 gD Ectodomain 蛋白的理论大小(约 37 kDa)相符(图 10)。

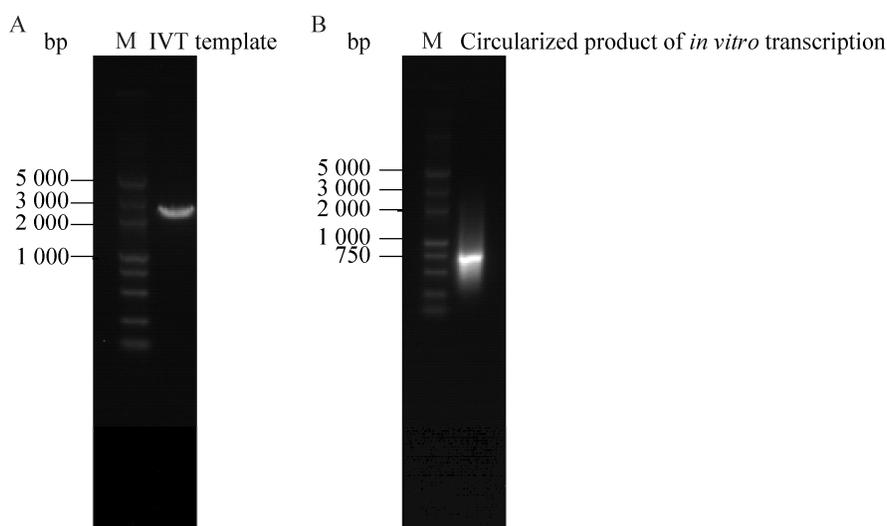


图 7 PCR 扩增的 IVT 模板(A)和转录的 pUC57-circ-gD mRNA (B)

Figure 7 PCR-amplified IVT template (A) and transcribed pUC57-circ-gD mRNA (B). M: DL5000 marker.

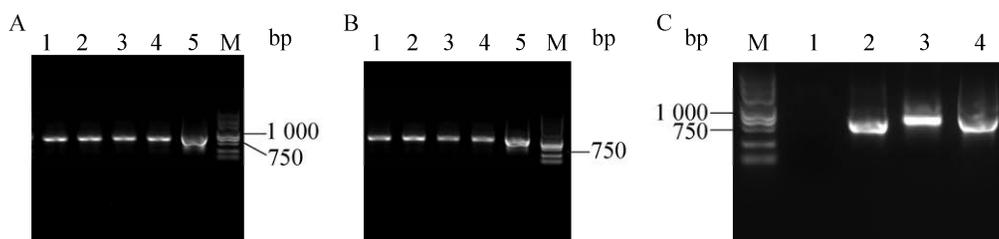


图 8 琼脂糖凝胶电泳检测 RNase R 消化对 circRNA 的影响 A: RNase R 消化酶用量。M: DL5000 marker; 3 μg circRNA 作为模板进行 RNase R 消化验证, 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 10 (Lane 1)、15 (Lane 2)、20 (Lane 3)、25 (Lane 4) min 后, 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后与原始模板 mRNA (Lane 5) 的电泳结果。B: 反应时间。M: DL5000 marker; 将 3 μg circRNA 作为模板分别取 0.4 (Lane 1)、0.6 (Lane 2)、0.8 (Lane 3)、1 μL (Lane 4) RNase R 进行消化验证, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后与原始模板 mRNA (Lane 5) 的电泳结果。C: 线性 RNA 与环状 RNA 进行 RNase R 消化对比。M: DL5000 marker; Lane 1: 线性 mRNA 进行 RNase R 消化验证; Lane 2: 线性 mRNA IVT 产物; Lane 3: 环状 RNA 进行 RNase R 消化验证; Lane 4: 环状 RNA 产物。

Figure 8 Effect of RNase R digestion on circRNA detected by agarose gel electrophoresis. A: RNase R digestive enzyme dosage. M: DL5000 marker; 3 μg circRNA was used as template for RNase R digestion validation and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 10 (Lane 1), 15 (Lane 2), 20 (Lane 3), 25 min (Lane 4), respectively, followed by incubation at 70 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min; B: RNase R digestion reaction time. M: DL5000 marker; 3 μg circRNA was used as template to take 0.4 (Lane 1), 0.6 (Lane 2), 0.8 (Lane 3), 1 μL (Lane 4) of RNase R for digestion verification, and the results of electrophoresis were obtained after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min, followed by incubation at 70 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. C: Comparison of RNase R digestion of linear RNA versus circRNA. M: DL5000 marker; Lane 1: Linear mRNA for RNase R digestion validation; Lane 2: Linear mRNA IVT product; Lane 3: Circular RNA for RNase R digestion validation; Lane 4: Circular RNA product.

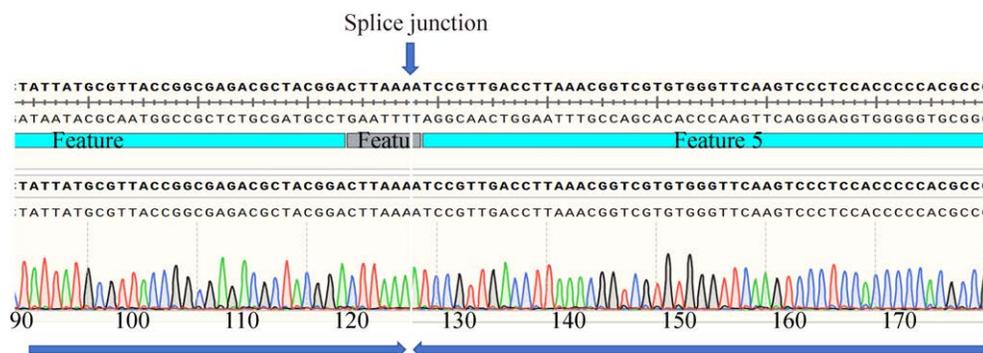


图 9 测序验证环化位点对比序列图

Figure 9 Sequencing verification of cyclization site alignment sequence diagram.

2.5 mRNA-LNP 疫苗制剂的包封效率与质量分析

2.5.1 包封率测定与浓度分析

LNP 与 pUC57-circ-gD mRNA 结合牢固, 在加样孔原位成像处可见亮带。通过纳米药物

制造系统进行包封, 包封产物 pUC57-circ-gD mRNA 经 Qubit 4 荧光计检测 C_i 值为 560 $\text{ng}/\mu\text{L}$, C_f 值为 11.1 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 计算得出包封率为 98.0%。纳米粒度电位仪显示 mRNA-LNP Z-average 为 82.76 nm, PDI 为 0.034 88 (图 11)。

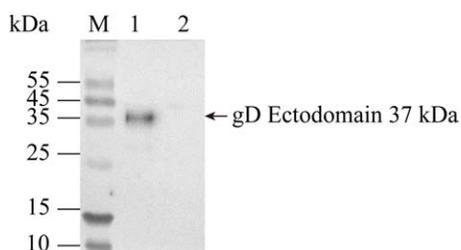


图 10 Western blotting 检测目的蛋白表达 M: 彩色预染蛋白 marker (10–170 kDa); Lane 1: pUC57-circ-gD mRNA 转染 293T 细胞后上清中的目的蛋白; Lane 2: 未经转染的 293T 细胞上清(阴性对照)。

Figure 10 Western blotting analysis of target protein expression. M: Color pre-stained protein marker (10–170 kDa); Lane 1: Target protein in the supernatant of 293T cells transfected with pUC57-circ-gD mRNA; Lane 2: Supernatant of untransfected 293T cells (negative control).

2.5.2 脂质组成定量分析

测量各脂质组分的峰面积并计算其百分比(图 12), 使用外标法定量各组分, 精确量化了各组分的含量, 具体检测结果为样品中 Lipid 6 含量为 4.96 mg/mL, DSPC 含量为 0.99 mg/mL, 胆固醇含量为 1.82 mg/mL, DMG-PEG2000 含量为 0.47 mg/mL。

2.5.3 SEC-HPLC 法评估 mRNA 纯度

经 SEC-HPLC 验证纯度可知, 最高峰为 pUC57-circ-gD mRNA (图 13), 高效液相色谱仪显示该 mRNA 峰的面积比(即纯度)约为 90%。

2.6 疫苗的安全性评估

在 21 d 观察期内, 小鼠全部存活, 且无异常反应, 每次免疫 7 d 后与注射前小鼠体重对比体重增加(图 14), 证明了 pUC57-circ-gD mRNA 疫苗的安全性。

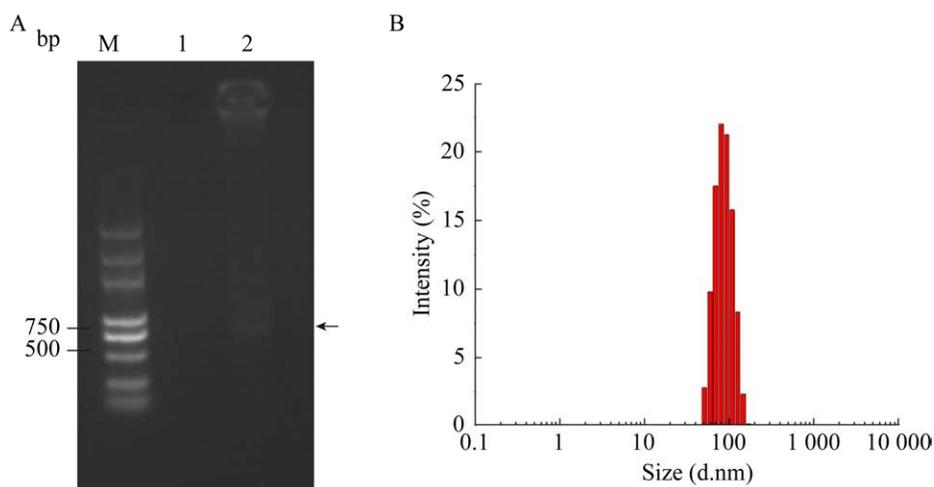


图 11 pUC57-circ-gD mRNA-LNP 电泳图及粒径分布图 A: pUC57-circ-gD mRNA-LNP 电泳图。M: DL5000 marker; Lane 1: LNP; Lane 2: 经 LNP 包封后的 pUC57-circ-gD mRNA。B: pUC57-circ-gD mRNA-LNP 粒径分布图。纳米粒度电位仪检测 pUC57-circ-gD mRNA-LNP 水合直径。

Figure 11 pUC57-circ-gD mRNA-LNP electrophoresis map and particle size distribution map. A: pUC57-circ-gD mRNA-LNP electropherogram. M: DL5000 marker; Lane 1: Negative control; Lane 2: pUC57-circ-gD mRNA after LNP encapsulation; B: pUC57-circ-gD mRNA-LNP particle size distribution. Nano-particle size potentiostat to detect pUC57-circ-gD mRNA-LNP hydration diameter.

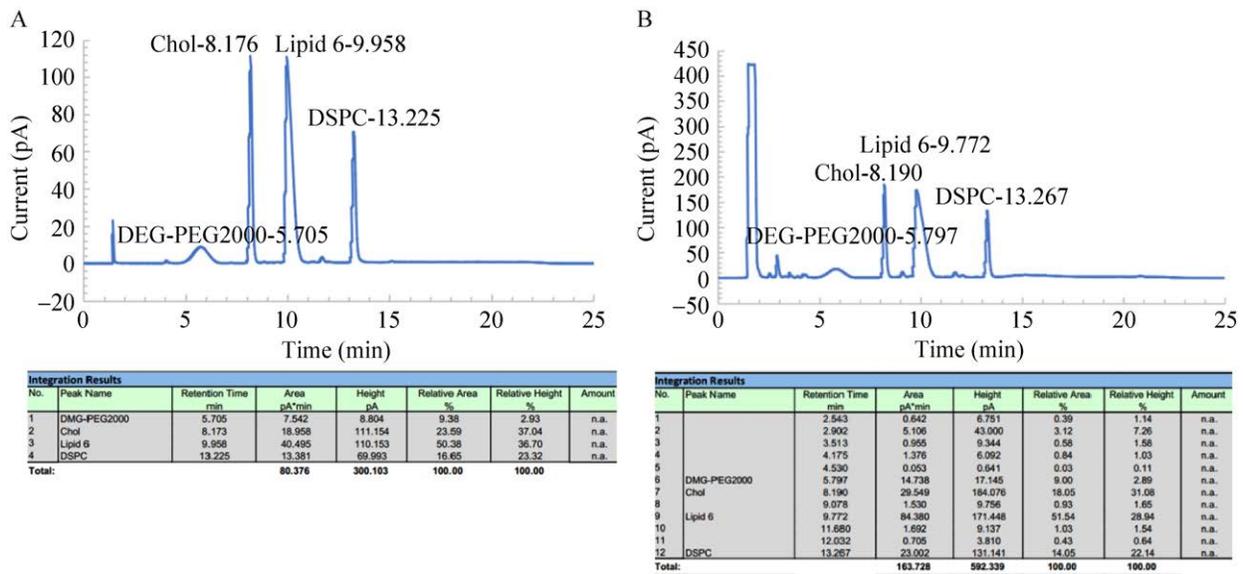


图 12 对照品(A)及 pUC57-circ-gD mRNA 色谱图(B)

Figure 12 Chromatogram of reference substance (A) and pUC57-circ-gD mRNA (B).

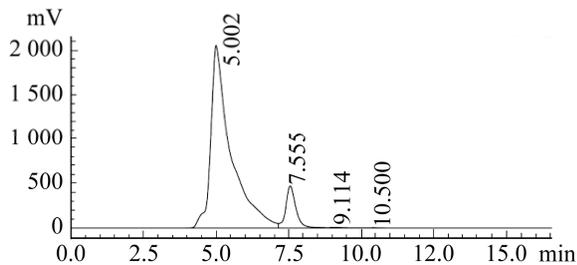


图 13 pUC57-circ-gD mRNA 色谱图

Figure 13 Chromatography of pUC57-circ-gD mRNA.

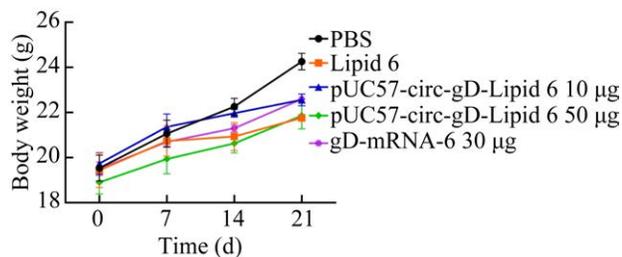


图 14 免疫后小鼠体重变化图

Figure 14 Changes in body weight of mice after immunization.

2.7 疫苗的免疫原性评价

2.7.1 ELISA 法检测小鼠体液免疫应答血清抗体滴度

分别在免疫后 21 d、35 d 于小鼠眼底静脉丛采血，在 49 d 麻醉后摘除眼球采血，以 pUC57-circ-gD、pT7AMP-gD Ectodomain mRNA 和 Lipid 6 为免疫原，PBS 组为阴性对照，每组 5 只 6-8 周龄 BALB/c 雌性小鼠进行免疫实验。使用间接 ELISA 法、中和抗体检测分别评价其经过 1、2、3 次免疫后，在体液免疫中的免疫原性。

采用间接 ELISA 对 pUC57-circ-gD mRNA 第 1 次免疫 21、35、49 d 后的小鼠血清中特异性抗体的特性进行检测。实验结果显示第 2、3 次免疫 7 d 后，实验组中，高剂量组的抗体水平最高，其次为中剂量组和低剂量组，均与 Lipid 6 组和 PBS 组存在显著差异，阳性对照组的抗体水平与中剂量组相近。第 2、3 次加强免疫后，抗体水平明显提升(图 15)。第 3 次免疫 21 d 后实验组中剂量组的抗体效价降幅小于阳性对照组，说明环状 RNA 相较于线性更持久且效果更优。

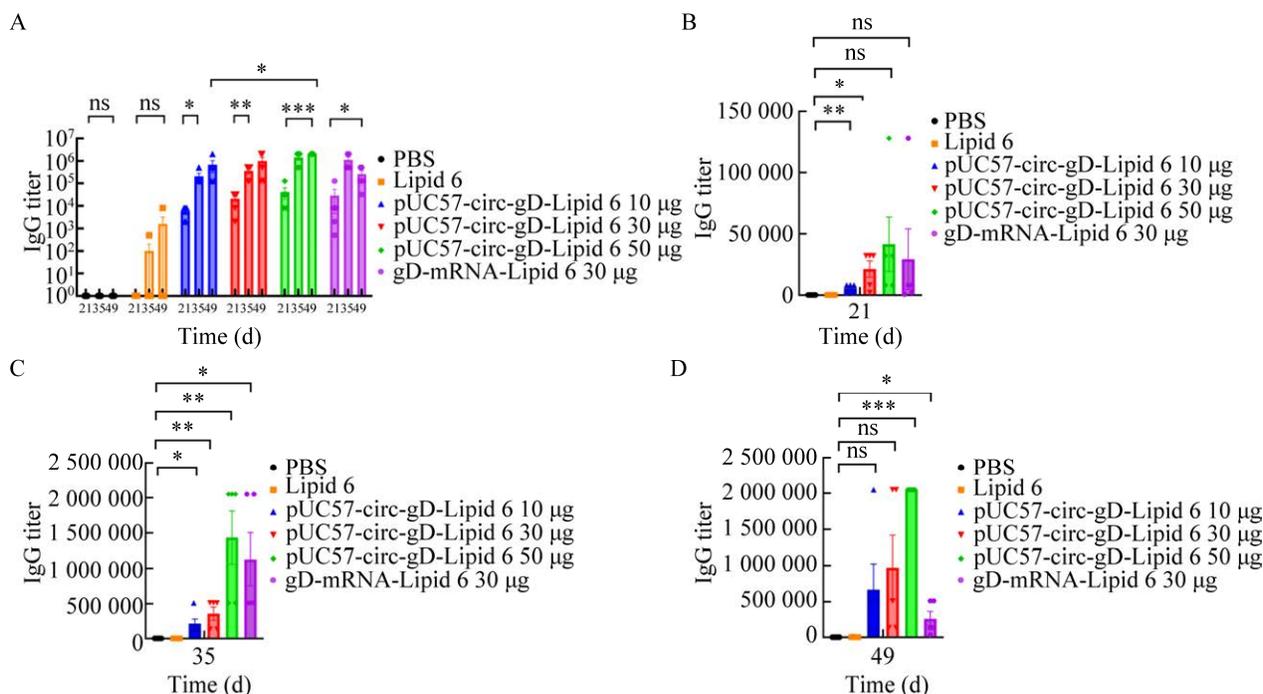


图 15 ELISA 法检测血清特异性 IgG 抗体 A: 3 次采血后血清稀释分别检测 IgG 抗体滴度; B: 首次免疫后 21 d 血清稀释检测 IgG 抗体滴度; C: 首次免疫后 35 d 血清稀释检测 IgG 抗体滴度; D: 首次免疫后 49 d 血清稀释检测 IgG 抗体滴度。*代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$, ns 代表“无统计学意义”。

Figure 15 ELISA for antigen-specific IgG antibodies in serum. A: IgG antibody titer by serum dilution after three blood collections. B: IgG antibody titer by serum dilution after 21 d of first immunization. C: IgG antibody titer by serum dilution after 35 d of first immunization. D: IgG antibody titer by serum dilution after 49 d of first immunization. * represents $P < 0.05$, ** represents $P < 0.01$, *** represents $P < 0.001$, and ns represents not statistically significant.

2.7.2 中和抗体检测评估小鼠体液免疫应答血清抗体滴度

经中和抗体检测对 pUC57-circ-gD mRNA 第 1 次免疫 21、35、49 d 后的小鼠血清中特异性抗体的特性进行了检测。实验结果显示, 第 2、3 次免疫后, 分别检测中和抗体水平, 实验组中高剂量组的抗体水平最高, 其次为中剂量组和低剂量组, 阳性对照与中剂量组抗体水平相近, 均与 Lipid 6 组和 PBS 组存在显著差异。第 2、3 次加强免疫后, 抗体水平明显提升(图 16)。

间接 ELISA 及中和抗体检测的结果说明了 pUC57-circ-gD mRNA 疫苗可以诱导良好的体

液免疫应答。这也进一步表明 pUC57-circ-gD mRNA 疫苗的免疫原性与给药剂量成正比, 可以刺激机体产生特异性的抗体。

2.7.3 IFN- γ 检测评估小鼠细胞免疫应答细胞因子水平

小鼠免疫 3 次后, 于第 21 天取脾, 研磨后进行 ELISpot 实验来评估 IFN- γ 的分泌情况, 在实验组中, pUC57-circ-gD 疫苗的低、中、高剂量组与 PBS 组和 Lipid 6 组相比, IFN- γ 细胞因子形成的平均斑点数存在显著差异(图 17)。

ELISpot 的实验结果表明 pUC57-circ-gD mRNA 疫苗可以诱导良好的细胞免疫应答。

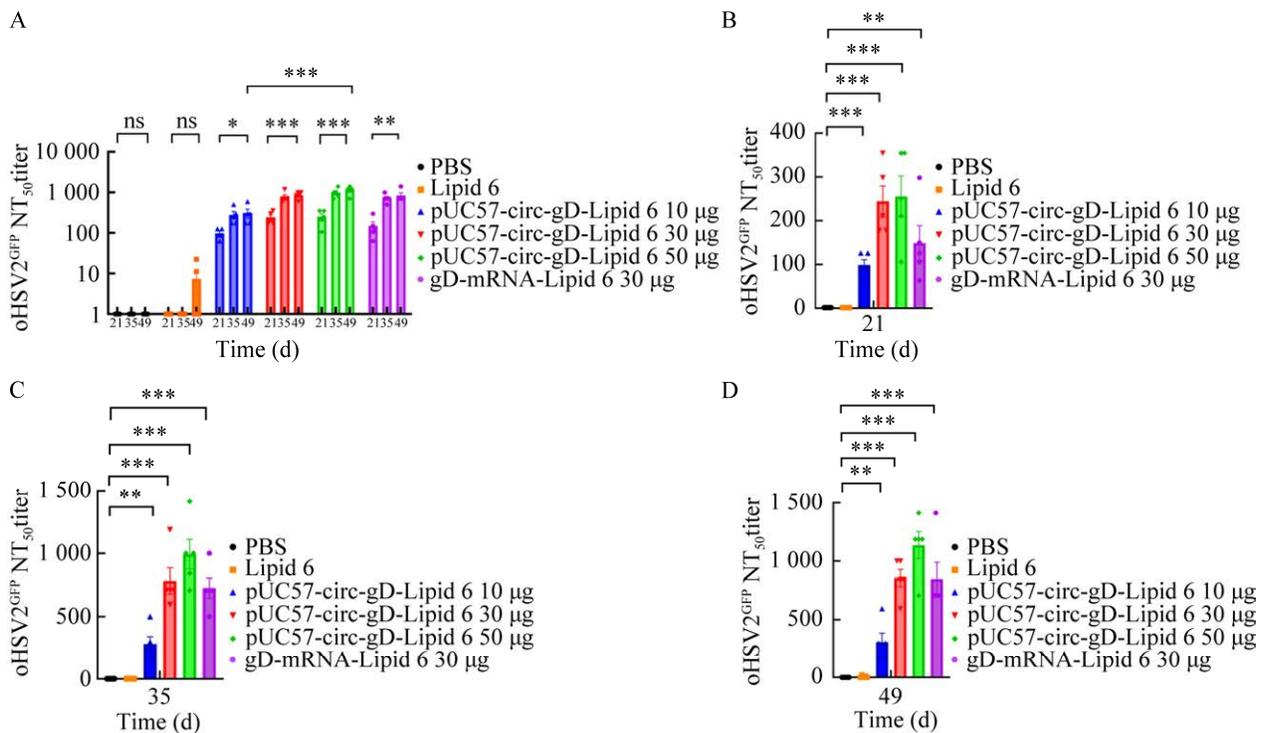


图 16 抗原基因的中和抗体滴度检测 A: 3 次采血后血清稀释分别检测结合抗体滴度; B: 首次免疫后 21 d 血清稀释检测结合抗体滴度; C: 首次免疫后 35 d 血清稀释检测结合抗体滴度; D: 首次免疫后 49 d 血清稀释检测结合抗体滴度。*代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$, ***代表 $P<0.001$, ns 代表无统计学意义。

Figure 16 Neutralizing antibody titer detection of antigen genes. A: After three rounds of blood collection, serum dilution was used to test the titer of binding antibodies. B: Titer of binding antibodies 21 days after the initial immunization. C: Titer of binding antibodies 35 days after the initial immunization. D: Titer of binding antibodies 49 days after the initial immunization. * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$, *** represents $P<0.001$, and ns represents not statistically significant.

2.8 疫苗的有效性检测

2.8.1 小鼠病毒半数致死量 (LD_{50}) 与攻毒致死剂量的计算

连续观察 14 d 后, 记录小鼠体重及生存情况见图 18, 使用公式 $\log LD_{50} = X_K - i \times (\sum P - 0.5) = 7 - 1 \times (1.75 - 0.5) = 5.75$ 计算 LD_{50} 。计算出 LD_{50} 为 5.75, 并确定后期攻毒致死剂量为 $10 \times LD_{50} = 10^{6.75}$ 。

2.8.2 致死剂量病毒攻击实验评估疫苗对小鼠的保护作用

攻毒后每 2 d 称取小鼠体重, 发现接受病毒攻击后第 6 天开始, PBS 组、Lipid 6 组、低剂量组中小鼠的体重均出现了下降趋势, 其余组体重仍上升, 且 PBS 组及 Lipid 6 组均出现

小鼠死亡; 第 10 天开始, 各组中的小鼠均出现体重下降的症状, 但仍只有 PBS 组及 Lipid 6 组出现小鼠死亡, 且这 2 组小鼠阴道处均出现轻微脓液渗出的现象。攻毒后, PBS 组小鼠在 12 d 内全部死亡, 未产生保护力; Lipid 6 组小鼠 14 d 时仅有 1 只存活, 该组小鼠的生存状况表明, 其产生的保护效果极为有限, 几乎未能提供有效的保护; 3 种免疫剂量实验组小鼠生存率均为 100%, 全部存活, 证明疫苗产生了保护力(图 19)。

本研究检测攻毒后疫苗的保护力情况, 实验结果说明 pUC57-circ-gD mRNA 疫苗可以有效对病毒感染和攻击起到保护作用, 证明了

该疫苗的有效性。

2.8.3 攻毒后小鼠阴道组织病毒载量检测 评估疫苗保护效果

攻毒实验后, 取各组小鼠阴道组织进行实时 qPCR 实验, 检测到 PBS 组及 Lipid 6 组中病毒 *gE* 基因拷贝数即病毒载量最高, 与实验组中 pUC57-circ-gD mRNA 疫苗低、中、高剂量组的病毒 *gE* 基因的拷贝数均存在明显差异, 实验组中低剂量组的病毒 *gE* 基因的拷贝数最高, 其次为中剂量组和低剂量组(图 20)。说明 pUC57-circ-gD 疫苗在机体内可以有效对病毒感染、攻击起到保护作用, 保护效力与免疫剂量成正比, 可有效抑制病毒复制, 使得病毒载量下降, 再次证明了该疫苗的有效性。

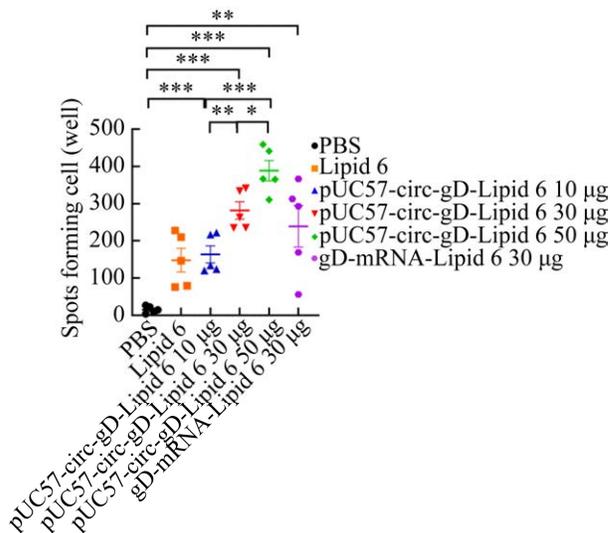


图 17 IFN- γ 细胞因子分泌水平检测
Figure 17 Detection of IFN- γ cytokine secretion levels. * represents $P < 0.05$, ** represents $P < 0.01$, *** represents $P < 0.001$.

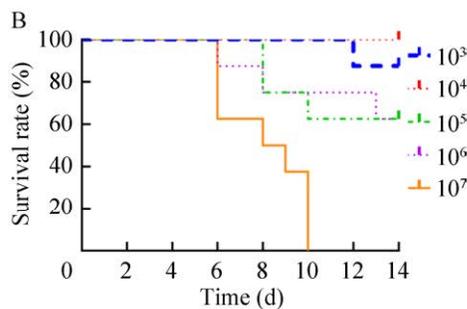
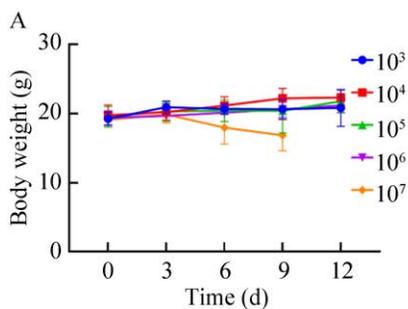


图 18 注射病毒后小鼠体重变化(A)及小鼠生存曲线(B)

Figure 18 Changes in body weight of mice after virus injection (A) and survival curve of mice (B).

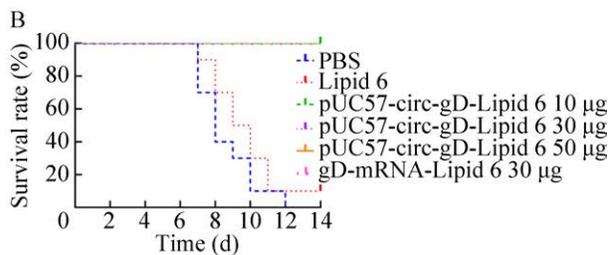
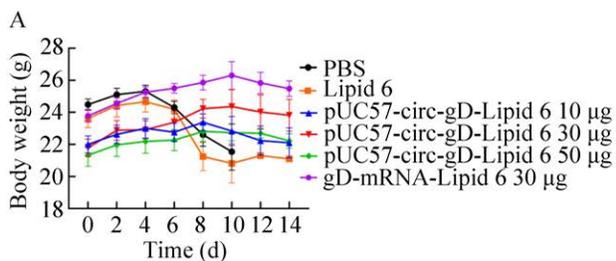


图 19 攻毒后小鼠体重变化(A)与小鼠生存曲线(B)

Figure 19 Changes in body weight of mice after virus injection (A) and survival curve of mice (B).

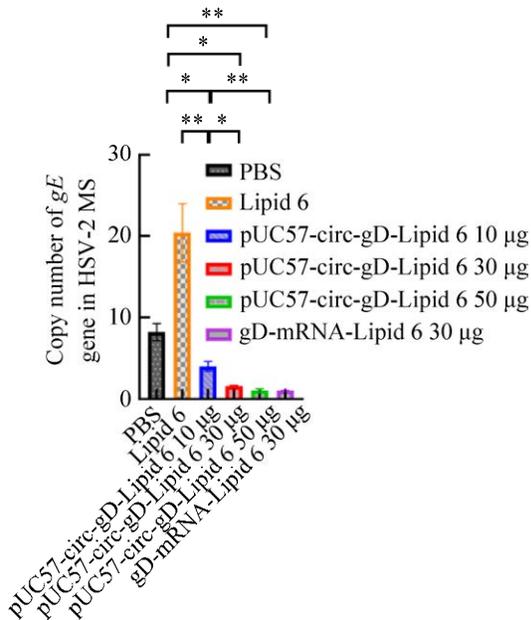


图 20 qPCR 检测小鼠阴道组织中病毒 *gE* 基因的拷贝数

Figure 20 Quantification of viral *gE* gene copies in mouse vaginal tissue by qPCR. * represents $P < 0.05$, ** represents $P < 0.01$.

3 讨论与结论

II型单纯疱疹病毒(HSV-2)是一种全球普遍存在的性传播病原,可引起一系列症状和不良健康后果,如复发性生殖器病变和严重的新生儿感染^[16],还会增加 HIV 感染和传播的风险^[17]。

mRNA 固有的不稳定性和蛋白表达持续时间不足限制了 mRNA 疫苗的有效性和广泛应用^[18],为解决这一问题,研究人员聚焦于解决 mRNA 的易降解问题和易被核酸酶破坏的缺陷^[19-21],使用具有双重佐剂和载体特性的 LNP 已被证实可以增加 mRNA 候选疫苗的稳定性^[13]、增强细胞摄取效率^[22]以及对抗实体肿瘤和传染病等^[23],从而拓展了 mRNA 疫苗的有效性与应用范围。外源性环状 RNA 作为佐剂,和抗原表达模板的双重作用结合,表明环状 RNA 可以作为递送系统和免疫增强剂。结合环状 RNA 具有持久的抗

原表达、稳定性和安全给药的特点,作为编程抗原特异性 T 细胞反应的工具,它有可能推进预防性或治疗性疫苗的研究^[23]。本研究建立了一种以 *gD* 为免疫原的 circRNA 疫苗接种策略,以引发针对 HSV-2 的有效中和抗体和 T 细胞免疫反应^[4],对病毒的感染、攻击起到保护作用。

本研究选择使用 PIE 元件通过体外反剪接生成 circRNA^[2],将线性模板体外环化,这种方法能够产生足够长度的 circRNA,以结合高效的 CVB3 IRES 元件和 *gD Ectodomain* 抗原编码序列。验证环化成立后进行蛋白印迹检测,以确定目的抗原蛋白体外表达情况;使用 LNP 有效包装和递送 circRNA 分子,实现其在体内的翻译,由此使得高度稳定的 circRNA 疫苗发挥作用。本研究的结果表明,以 II 型单纯疱疹病毒 *gD Ectodomain* 为免疫原的 circRNA 疫苗体外及体内表达效果均良好,与 mRNA 疫苗相比, circRNA 疫苗引发了更持久的免疫反应,其免疫效果与给药剂量成正比,可以在小鼠体内中成功诱导针对 HSV-2 显著的体液免疫应答和细胞免疫应答;免疫后攻毒,小鼠均存活,体内病毒载量较低,证明其可以有效对病毒感染和攻击起到保护作用,为后续 circRNA 疫苗的研究奠定了基础。

综上所述,本研究表明 circRNA 疫苗在治疗 HSV-2 方面具有潜在价值,为未来的疫苗研发和临床应用提供了重要的参考和依据。

REFERENCES

- [1] BAI Y, LIU D, HE Q, LIU JY, MAO QY, LIANG ZL. Research progress on circular RNA vaccines[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 13: 1091797.
- [2] WESSELHOEFT RA, KOWALSKI PS, ANDERSON DG. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2629.
- [3] ZHOU WY, CAI ZR, LIU J, WANG DS, JU HQ, XU RH. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 172.
- [4] QU L, YI ZY, SHEN Y, LIN LR, CHEN F, XU YY, WU ZG, TANG HX, ZHANG XX, TIAN F, WANG CH,

- XIAO X, DONG XJ, GUO L, LU SY, YANG CY, TANG C, YANG Y, YU WH, WANG JB, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1728-1744.
- [5] WESSELHOEFT RA, KOWALSKI PS, PARKER-HALE FC, HUANG YX, BISARIA N, ANDERSON DG. RNA circularization diminishes immunogenicity and can extend translation duration *in vivo*[J]. *Molecular Cell*, 2019, 74(3): 508-520.e4.
- [6] LAMERS SL, NEWMAN RM, LAEYENDECKER O, TOBIAN AAR, COLGROVE RC, RAY SC, KOELLE DM, COHEN J, KNIPE DM, QUINN TC. Global diversity within and between human herpesvirus 1 and 2 glycoproteins[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(16): 8206-8218.
- [7] XU XL, ZHANG Y, LI QH. Characteristics of herpes simplex virus infection and pathogenesis suggest a strategy for vaccine development[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2019, 29(4): e2054.
- [8] POOLE CL, KIMBERLIN DW. Antiviral approaches for the treatment of herpes simplex virus infections in newborn infants[J]. *Annual Review of Virology*, 2018, 5(1): 407-425.
- [9] SEEPHETDEE C, BHUKHAI K, BUASRI N, LEELUKKANAVEERA P, LERDWATTANASOMBAT P, MANOPWISDJAROEN S, PHUEAKPHUD N, KUHAUDOMLARP S, OLMEDILLAS E, SAPHIRE EO, THITITHANYANONT A, HONGENG S, WONGTRAKOONGATE P. A circular mRNA vaccine prototype producing VFLIP-X spike confers a broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by mouse sera[J]. *Antiviral Research*, 2022, 204: 105370.
- [10] 樊建勇, 田晨, 王兴旺, 张功恺, 高睿, 籍丽玥, 陈韦君, 杨慧兰. 单纯疱疹病毒 2 型 gD 蛋白-结核杆菌热休克蛋白 70 DNA 疫苗的免疫效应研究[J]. *实用皮肤病学杂志*, 2021, 14(1): 8-11.
- FAN JY, TIAN C, WANG XW, ZHANG GK, GAO R, JI LY, CHEN WJ, YANG HL. Immune response induced by Hsp70-HSV2gD DNA vaccine[J]. *Journal of Practical Dermatology*, 2021, 14(1): 8-11 (in Chinese).
- [11] MICHEL T, LUFT D, ABRAHAM MK, REINHARDT S, SALINAS MEDINA ML, KURZ J, SCHALLER M, AVCI-ADALI M, SCHLENSAK C, PETER K, WENDEL HP, WANG XW, KRAJEWSKI S. Cationic nanoliposomes meet mRNA: efficient delivery of modified mRNA using hemocompatible and stable vectors for therapeutic applications[J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2017, 8: 459-468.
- [12] RICHNER JM, JAGGER BW, SHAN C, FONTES CR, DOWD KA, CAO B, HIMANSU S, CAINE EA, NUNES BT, MEDEIROS DBA, MURUATO AE, FOREMAN BM, LUO HL, WANG T, BARRETT AD, WEAVER SC, VASCONCELOS PFC, ROSSI SL, CIARAMELLA G, MYSOREKAR IU, PIERSON TC, SHI PY, DIAMOND MS. Vaccine mediated protection against zika virus-induced congenital disease[J]. *Cell*, 2017, 170(2): 273-283.e12.
- [13] KIAIE SH, MAJIDI ZOLBANIN N, AHMADI A, BAGHERIFAR R, VALIZADEH H, KASHANCHI F, JAFARI R. Recent advances in mRNA-LNP therapeutics: immunological and pharmacological aspects[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 276.
- [14] KORMANN MSD, HASENPUSCH G, ANEJA MK, NICA G, FLEMMER AW, HERBER-JONAT S, HUPPMANN M, MAYS LE, ILLENYI M, SCHAMS A, GRIESE M, BITTMANN I, HANDGRETINGER R, HARTL D, ROSENECKER J, RUDOLPH C. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(2): 154-157.
- [15] CAI LK, HU H, DUAN HX, LI YY, ZOU ZX, LUO KL, ZHANG ZY, YANG JH, JIN J, CHEN Y, KE ZH, FANG ZY, LIU Q, HONG XQ, HU S, LIU BL. The construction of a new oncolytic herpes simplex virus expressing murine interleukin-15 with gene-editing technology[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(12): 3617-3627.
- [16] ALAREEKI A, OSMAN AMM, KHANDAKJI MN, LOOKER KJ, HARFOUCHE M, ABU-RADDAD LJ. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 in Europe: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions[J]. *The Lancet Regional Health Europe*, 2022, 25: 100558.
- [17] TOGNARELLI EI, PALOMINO TF, CORRALES N, BUENO SM, KALERGIS AM, GONZÁLEZ PA. Herpes simplex virus evasion of early host antiviral responses[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 127.
- [18] LI HJ, PENG K, YANG K, MA WB, QI SL, YU XY, HE J, LIN X, YU GC. Circular RNA cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies[J]. *Theranostics*, 2022, 12(14): 6422-6436.
- [19] WARREN L, MANOS PD, AHFELDT T, LOH YH, LI H, LAU F, EBINA W, MANDAL PK, SMITH ZD, MEISSNER A, DALEY GQ, BRACK AS, COLLINS JJ, COWAN C, SCHLAEGER TM, ROSSI DJ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 618-630.
- [20] JACKSON NAC, KESTER KE, CASIMIRO D, GURUNATHAN S, DeROSA F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective[J]. *NPJ Vaccines*, 2020, 5: 11.
- [21] POLACK FP, THOMAS SJ, KITCHIN N, ABSALON J, GURTMAN A, LOCKHART S, PEREZ JL, MARC GP, MOREIRA ED, ZERBINI C, BAILEY R, SWANSON KA, ROYCHOUDHURY S, KOURY K, LI P, KALINA WV, COOPER D, FRENCK RW Jr, HAMMITT LL, TÜRECI Ö, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [22] AKINC A, QUERBES W, DE S, QIN JE, FRANK-KAMENETSKY M, JAYAPRAKASH KN, JAYARAMAN M, RAJEEV KG, CANTLEY WL, DORKIN JR, BUTLER JS, QIN LL, RACIE T, SPRAGUE A, FAVA E, ZEIGERER A, HOPE MJ, ZERIAL M, SAH DW, FITZGERALD K, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms[J]. *Molecular Therapy*, 2010, 18(7): 1357-1364.
- [23] AMAYA L, GRIGORYAN L, LI ZJ, LEE A, WENDER PA, PULENDRAN B, CHANG HY. Circular RNA vaccine induces potent T cell responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(20): e2302191120.