

结核分枝杆菌 EsxV 脂质体纳米颗粒亚单位疫苗的制备及免疫学特性

白鹭^{1,2}, 路延之¹, 宁唤唤¹, 康亚莉^{1,4}, 谢燕玲^{1,2}, 康健¹, 李雪^{1,3},
崔若因^{1,3}, 韦垠^{1,4}, 刘月芹^{2*}, 柏银兰^{1*}

1 空军军医大学基础医学院 微生物与病原生物学教研室, 陕西 西安 710032

2 延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

3 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

4 宁夏医科大学基础医学院 生理学和神经生物学系, 宁夏 银川 750001

白鹭, 路延之, 宁唤唤, 康亚莉, 谢燕玲, 康健, 李雪, 崔若因, 韦垠, 刘月芹, 柏银兰. 结核分枝杆菌 EsxV 脂质体纳米颗粒亚单位疫苗的制备及免疫学特性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4085-4097.

BAI Lu, LU Yanzhi, NING Huanhuan, KANG Yali, XIE Yanling, KANG Jian, LI Xue, CUI Ruonan, WEI Yin, LIU Yueqin, BAI Yinlan. Preparation of *Mycobacterium tuberculosis* EsxV lipid nanoparticles subunit vaccine and its immunological characteristics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4085-4097.

摘要: 本研究旨在制备脂质体纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)为载体的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)抗原 EsxV 亚单位疫苗, 明确该疫苗经黏膜免疫诱导的免疫应答水平。采用薄膜分散法制备包裹蛋白 EsxV 和 c-di-AMP 的 LNP (EsxV:C:L), 并对其包封率、LNP 形态、粒径、表位电荷及多相分散指数进行了检测。EsxV:C:L 滴鼻免疫 BALB/c 小鼠, 检测免疫后血清和黏膜抗体、肺或脾细胞因子转录及分泌水平、肺 T 细胞亚群细胞比例。结果成功获得大小均一、呈球状、带负电的 EsxV:C:L LNP 亚单位疫苗。与 EsxV:C 相比, EsxV:C:L 鼻黏膜接种可诱导小鼠呼吸道黏膜 sIgA 水平增加, 脾细胞因子 IL-2 分泌水平升高, 提高中央记忆 T 细胞和组织驻留 T 细胞的比例。综上, EsxV:C:L 经黏膜免疫, 可诱导更强的黏膜免疫和记忆性 T 细胞免疫应答, 可能提供更好的抗 Mtb 感染的保护作用。

关键词: 结核分枝杆菌; EsxV; 环二腺苷酸; 脂质体纳米颗粒; 亚单位疫苗

资助项目: 陕西省重点研发计划(2022ZDLSF01-07); 国家自然科学基金(81971560, 82272343); 国家“十三五”重大专项(2018ZX10302302002004)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2022ZDLSF01-07), the National Natural Science Foundation of China (81971560, 82272343), and the National Major Special Projects of 13th Five-year Plan (2018ZX10302302002004).

*Corresponding authors. E-mail: BAI Yinlan, yinlanbai@fmmuedu.cn; LIU Yueqin, liuyue811223@126.com

Received: 2023-04-03; Accepted: 2023-06-28; Published online: 2023-07-11

Preparation of *Mycobacterium tuberculosis* EsxV lipid nanoparticles subunit vaccine and its immunological characteristics

BAI Lu^{1,2}, LU Yanzhi¹, NING Huanhuan¹, KANG Yali^{1,4}, XIE Yanling^{1,2}, KANG Jian¹, LI Xue^{1,3}, CUI Ruonan^{1,3}, WEI Yin^{1,4}, LIU Yueqin^{2*}, BAI Yinlan^{1*}

1 Department of Microbiology and Pathogen Biology, Basic Medical School, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

2 School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

3 College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

4 Department of Physiology and Neurobiology, Basic Medical School, Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, Ningxia, China

Abstract: To prepare a lipid nanoparticle (LNP)-based subunit vaccine of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigen EsxV and study its immunological characteristics, the LNP containing EsxV and c-di-AMP (EsxV:C:L) was prepared by thin film dispersion method, and its encapsulation rate, LNP morphology, particle size, surface charge and polyphase dispersion index were measured. BALB/c mice were immunized with EsxV:C:L by nasal drops. The levels of serum and mucosal antibodies, transcription and secretion of cytokines in lung and spleen, and the proportion of T cell subsets were detected after immunization. EsxV:C:L LNPs were obtained with uniform size and they were spherical and negatively charged. Compared with EsxV:C immunization, EsxV:C:L mucosal inoculation induced increased sIgA level in respiratory tract mucosa. Levels of IL-2 secreted from spleen and ratios of memory T cells and tissue-resident T cells in mice were also elevated. In conclusion, EsxV:C:L could induce stronger mucosal immunity and memory T cell immune responses, which may provide better protection against Mtb infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; EsxV; cyclic dimeric adenosine monophosphate; liposome nanoparticles; subunit vaccine

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)经呼吸道感染引起的慢性传染病,是仅次于新型冠状病毒肺炎的第二大单一致死性传染病。2021年世界卫生组织报告,全球新发TB病例1 060万,病死约160万例^[1]。卡介苗(Bacille Calmette-Guérin, BCG)是牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)减毒活疫苗,是唯一获得批准的TB预防性疫苗。然而,BCG接种对成人TB的保护率为0%–80%^[2],

且会导致免疫低下人群感染的风险^[3]。与减毒活疫苗相比,亚单位疫苗安全性好、免疫原性强,能够提供抗细菌感染的特异性免疫保护。因此,研发安全、有效的Mtb亚单位疫苗是TB研究的重要内容之一。此外,Mtb主要通过呼吸道途径感染,目前已进入临床试验的Mtb亚单位疫苗接种均经肌肉或皮下途径,不能有效刺激机体的黏膜免疫反应^[4-5]。因此,抗Mtb感染黏膜免疫亚单位疫苗是TB疫苗研发中极

具潜力的方向之一。

研究表明,亚单位疫苗诱导的机体免疫反应水平主要受免疫抗原、免疫途径和免疫佐剂三方面因素影响^[6]。BCG 在制备过程中丢失一些具有免疫原性的抗原,被认为是其保护力不完善的原因之一。BCG 与 Mtb 的基因差异区域(region of difference, RD)编码一些具有免疫原性抗原。EsxV 是由 RD9 区 *Rv3619c* 基因编码的一种分泌蛋白,仅存在于 Mtb 中。此外,EsxV 与 TB 疫苗候选抗原 6 kDa 早期分泌靶抗原(6 kDa early secretory antigen target, ESAT-6)均属于 Mtb 中 WXG100 蛋白家族,该蛋白家族中大多数蛋白已被研究是可诱导 T 细胞免疫应答的抗原,因此是备受关注的一类疫苗候选抗原。研究发现,EsxV 经肌肉免疫途径可诱导兔、小鼠的体液免疫和 Th1 型细胞免疫反应,但其诱导的免疫应答水平有待进一步提高^[7-8]。环二腺苷酸(cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是包括 Mtb 等细菌中新发现的第二信使分子^[9],其可作为亚单位疫苗免疫佐剂促进机体强烈的适应性免疫应答^[10]。本课题组前期研究发现,c-di-AMP 作为黏膜免疫佐剂与 ESAT-6、EsxV 蛋白滴鼻方式免疫小鼠,可显著提高抗原诱导的体液免疫应答,但其诱导的细胞免疫应答水平提高不明显^[11-12]。分析原因,可能是 EsxV 和 c-di-AMP 进入呼吸道黏膜后,被酶类降解,从而影响免疫效应^[13]。

脂质体纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)是一类具有一层或多层同心脂质双分子层结构的疫苗佐剂或递送系统,因生物相容性好、生物利用度高等优点已用于如新冠肺炎、癌症等重要疾病的防治^[14-15]。本研究拟构建包裹抗原蛋白 EsxV 和黏膜佐剂分子 c-di-AMP 的 LNP 亚单位疫苗(EsxV:c-di-AMP:LNP, EsxV:C:L),并研究其通过黏膜免疫途径诱导的小鼠特异性免疫反应。

1 材料与方 法

1.1 试剂

大豆卵磷脂(soy lecithin)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG2000)购自西安瑞禧生物科技有限公司;胆固醇购自日本精化株式会社;氯化钠(NaCl)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)和氢氧化钠(NaOH)购自天津市富宇精细化工有限公司;c-di-AMP 购自 InvivoGen 公司,EsxV 纯化蛋白为本实验室前期制备;Lowry 蛋白浓度测定试剂盒购自北京酷来搏科技有限公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG、IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 购自 InCellGene LLC 公司;小鼠 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 细胞因子检测试剂盒均购自 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司;逆转录试剂盒购自 Vazyme 公司;流式细胞术所用抗体均购自 eBioscience 公司。

1.2 实验动物

6-8 周雌性无特定病原体(specific pathogen-free, SPF) BALB/c 小鼠购自空军军医大学实验动物中心,并经空军军医大学实验动物中心福利与伦理审查委员会批准(批准号:20190213)。遵循 3R 原则给予实验动物人道关怀。

1.3 亚单位疫苗 EsxV:C:L 的制备

采用薄膜分散法制备 EsxV 脂质体纳米颗粒亚单位疫苗:称取 20 mg 胆固醇加入 20 mL 无水乙醇,在 50 °C 水浴下充分溶解,再加入 120 mg 大豆卵磷脂充分溶解;上述混合溶液于圆底烧瓶中在 50-60 r/min、50 °C 条件下减压旋转蒸发除去乙醇,直至形成无色透明的脂膜。随后加入 60 mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液

(phosphate buffer solution, PBS), 同时加入 0.004 8 g 的 DSPE-PEG2000, 在 52 °C 水浴常压条件下旋转圆底烧瓶使脂膜水化溶解, 继续 50 °C 水浴 2 h, 形成多室脂质体。冰水浴中超声 10 min, 条件设置为: 超声 5 s、间歇 5 s、功率 200 W。超声结束后, 50 °C 水浴 1 h, 即获得单室脂质体。Lowry 法检测 EsxV 抗原蛋白总量。向单室脂质体中加入 500 μg EsxV 抗原和 167 μg c-di-AMP, 再次以同样条件超声, 即获得 EsxV:C:L。同时, 按照上述条件制备不含 EsxV 和 c-di-AMP 的空白 LNP, 4 °C 保存备用。

1.4 亚单位疫苗 EsxV:C:L 包封率测定

利用超速离心和 Lowry 法检测 LNP 中 EsxV 的包封率。取 1 mL EsxV:C:L 置于 5 mL 超速离心管中, 30 000 r/min、4 °C 超速离心 3 h, 取上清。Lowry 法检测上清游离蛋白质量。根据公式(1)计算 EsxV:C:L 中 EsxV 的包封率。

$$\text{包封率} = (\text{EsxV 总蛋白质量} - \text{EsxV 游离蛋白质量}) / \text{EsxV 总蛋白质量} \times 100\% \quad (1)$$

1.5 表征检测

1 mL LNP 混悬液加入透明样品室中, 置于马尔文激光粒度仪检测室内, 检测 LNP 的粒径、多相分散指数(polyphasic dispersion index, PDI) 和表面 zeta 电位, 每个样品连续测定 3 次。

1.6 电镜观察

采用磷钨酸负染色法, 取 LNP 混悬液 10 μL 滴于铜网上, 室温吸附 5 min 后滤纸吸去多余液体, 室温放置 2 min 晾干。再滴加 2% 磷钨酸溶液于铜网上负染 3 min, 使用滤纸吸掉多余的染液, 室温晾干。将铜网置于透射电子显微镜下, 观察 LNP 形态特征。

1.7 小鼠免疫

取 BALB/c 雌性 6-8 周小鼠 20 只, 随机分为 5 组, 即正常对照组(Naïve)、空白 LNP 组(LNP)、EsxV 蛋白组(EsxV)、EsxV 蛋白联合

c-di-AMP 组(EsxV:C) 和 EsxV:C LNP 组(EsxV:C:L)。5 组小鼠分别经滴鼻途径免疫 PBS、空白 LNP、15 μg EsxV、15 μg EsxV 和 5 μg c-di-AMP、EsxV:C:L LNP (含 15 μg EsxV 和 5 μg c-di-AMP) 50 μL/只, 间隔 2 周, 免疫 4 次。免疫完成 4 周后检测小鼠免疫应答水平。

1.8 ELISA 法检测抗体水平

小鼠摘眼球取血, 37 °C 静置 30 min, 5 000 r/min 离心 4 min, 取血清-20 °C 保存。随后, 用注射器将 1 mL PBS 经颈部气管推入肺中, 反复推注 5 次后抽出肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF), 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清-20 °C 保存。用间接酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血清和肺泡灌洗液中抗体效价。酶标板每孔包被 1 μg EsxV 蛋白抗原, 分别加入 100 μL 血清(1:200 稀释)和 100 μL BALF 原液作为一抗, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次; 再加入 100 μL HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 (均为 1:5 000 稀释)作为二抗, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤 5 次, TMB 显色, 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色, 酶标仪检测 OD₄₅₀。

1.9 qRT-PCR 检测肺组织细胞因子转录水平

取小鼠右肺中叶, 利用 RNA 提取试剂盒提取肺组织总 RNA, 利用分光光度法检测 RNA 浓度。将 RNA 逆转录为 cDNA, 实时定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 *ifn-γ*、*il-2* 和 *il-10* 转录水平, 小鼠 *gapdh* 作为内参基因。检测基因引物序列见表 1。

1.10 ELISA 法检测脾细胞细胞因子分泌水平

取小鼠脾脏并制备脾细胞悬液。将脾细胞以 1×10⁶ cells/孔接种 96 孔板, 加入终浓度为

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for qRT-PCR assay

Target gene	Primer sequence (5'→3')
<i>Gapdh</i> -F	ACAACCTTGGCATTGTGGAA
<i>Gapdh</i> -R	GATGCAGGGATGATGTTCTG
<i>ifn-γ</i> -F	GCTCTGAGACAATGAACGCTAC
<i>ifn-γ</i> -R	TGCAGGATTTTCATGTCACC
<i>il-2</i> -F	CTTGTGCTCCTTGTC AACAG
<i>il-2</i> -R	TCCAAGTTCATCTTCTAGGC
<i>il-10</i> -F	TGCTCTACTGACTGGCAT
<i>il-10</i> -R	CTGGATCATTCCGATAAGGC

5 μg/mL 去内毒素 EsxV 蛋白进行刺激,以不含 EsxV 蛋白的 1640 完全培养基同样处理作为阴性对照。培养 72 h,按 ELISA 试剂盒说明书检测脾细胞上清 IFN-γ、IL-2 和 IL-10 分泌水平。

1.11 酶联免疫斑点法检测脾细胞 IFN-γ 阳性频数

按照说明书,酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospotting, ELISpot)孔板用 PBS 洗涤 3 次,加入 200 μL 含 10% FBS 的 1640 完全培养基(含 1%青/链霉素双抗),室温孵育 30 min。弃培养基,每孔加入 5×10^5 个脾细胞,同时加入 EsxV 蛋白使终浓度为 5 μg/mL,37 °C、5% CO₂ 培养 48 h。弃上清,PBS 洗孔板 5 次。每孔加入 100 μL 检测抗体,室温孵育 2 h。弃上清,PBS 洗孔板 5 次。每孔加入链霉亲和素偶联物,室温孵育 1 h,再加入底物溶液 100 μL。孔内出现明显斑点后,ddH₂O 冲洗终止反应。孔板干燥后,用 ELISpot 读板仪拍照计数。

1.12 流式细胞术检测小鼠肺组织 T 细胞亚群

取小鼠其余肺组织,剪碎后用胶原蛋白酶 V 裂解,预冷 PBS 洗涤,获得肺细胞。取 1 mL 1×10^6 个肺细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃 900 μL 上清,加入 1 μL live/dead 染料,冰上避光孵育

15 min。再加入 1 mL 预冷 PBS 溶液,1 000 r/min 离心 5 min,弃 900 μL 上清。加入 Trustain FCXTM plus (anti-mouse CD16/32) 0.5 μL,冰上避光孵育 10 min,封闭细胞表面 Fc 受体。加入抗体 BV510-CD3、FITC-CD4、PE-CD8、PerCP-CD44、APC-CD62L、Pe-Cy7-CD69 和 AF700-CD103,冰上避光孵育 30 min;加入 1 mL 染色缓冲液(含 2.5% FBS 的 PBS 溶液)洗涤细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;最后加入 300 μL 的染色缓冲液重悬细胞,流式细胞仪检测,FlowJo 软件分析结果。

1.13 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组比较采用 *t* 检验分析,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。统计学差异标注为: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 EsxV:C:L LNP 表征

Lowry 法检测超速离心上清中游离 EsxV 蛋白质量为 149.3 μg。经计算,EsxV:C:L 中 EsxV 包封率为 70.14%。马尔文激光粒度仪检测显示,EsxV:C:L LNP 平均粒径为(264.5±0.929) nm(图 1A),其与空白 LNP 粒径分布范围均较窄且呈正态分布(图 1B),提示所制备的 LNP 大小具有较高的均一性。多相分散指数(PDI)与 LNP 的稳定性紧密相关。马尔文激光粒度仪检测显示,EsxV:C:L LNP 的 PDI 为 0.24,表明其较稳定性较高(图 1C),与粒径检测结果相符(图 1B)。zeta 电位检测显示,EsxV:C:L 表面电位为 -3.35 mV(图 1D)。以上表明获得了大小均一、较为稳定且带微量负电的 LNP。

2.2 EsxV:C:L LNP 电镜观察

进一步利用透射电镜观察 EsxV:C:L LNP 和空白 LNP 的形态。结果发现, 空白 LNP 基本呈球状, 大小均一(图 2A); 包裹 EsxV 和佐

剂 c-di-AMP 的 LNP 形态未发生明显变化(图 2B), 且和粒径大小、PDI 检测结果均相符。以上提示 EsxV:C:L LNP 和空白 LNP 形态稳定、分布均一, 可用于下一步免疫学特性研究。

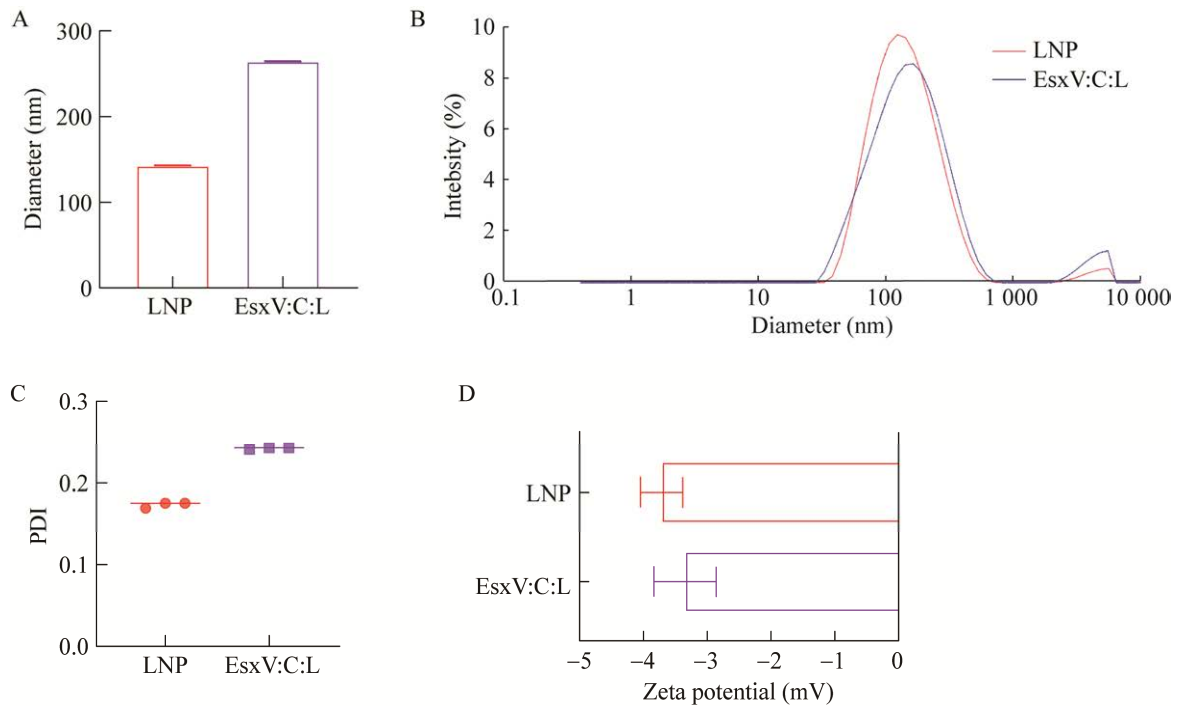


图 1 LNP 表征检测

Figure 1 Characteristics and detections of LNP. A: Liposomal nanoparticle (LNP) particle size detection. B: LNP particle size normal distribution. C: Multiphase dispersion index detection (PDI). D: Zeta potential detection.

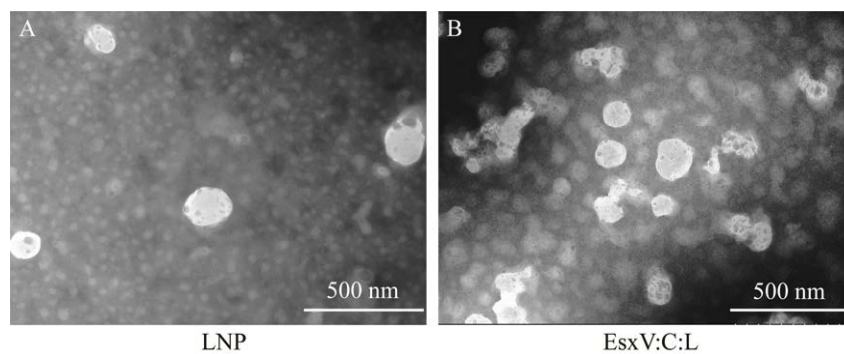


图 2 LNP 透射电镜观察

Figure 2 Transmission electron microscope observation of LNP. A: Electron microscopic morphological observation of LNP. B: Electron microscopic morphological observation of EsxV:C:L LNP.

2.3 免疫小鼠血清抗体效价水平

ELISA 检测小鼠血清特异性抗体水平。结果发现, EsxV:C 可诱导血清 IgG 效价显著升高 ($P=0.0064$), EsxV:C:L 诱导的血清抗体效价略高于 EsxV, 但无显著差异; 各免疫组血清 IgA 和 IgM 抗体水平与对照组相当(图 3A)。EsxV 诱导小鼠血清 IgG 的效价为 1:12 500, EsxV:C 诱导血清 IgG 效价 1:5 000, EsxV:C:L 诱导血清 IgG 效价为 1:25 000 (图 3B)。在 IgG 抗体亚类检测中, EsxV、EsxV:C 和 EsxV:C:L 均可诱导 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的抗体效价升高, 其中这 3 组特异性 IgG1 抗体效价相当; EsxV:C 诱导的 IgG2a、IgG2b 和 IgG3 水平显著高于 EsxV ($P=0.0002$, $P=0.0245$, $P=0.0191$); EsxV:C:L 诱

导的 IgG2a 和 IgG2b 水平显著高于 EsxV ($P=0.0023$, $P=0.0245$), 与 EsxV:C 相比无显著差异(图 3C), 提示 EsxV:C:L 黏膜免疫可诱导小鼠产生 EsxV 特异性的 IgG, 且主要亚类为 IgG2a、IgG2b, 其诱导的体液免疫反应水平高于 EsxV 单独免疫, 与 EsxV:C 相当。

2.4 免疫小鼠肺泡灌洗液 sIgA 水平

黏膜局部的体液免疫应答主要由分泌型 IgA (secretory IgA, sIgA) 介导, 其被认为是黏膜免疫的标志性抗体。收集免疫小鼠 BALF, ELISA 检测 sIgA 水平(图 4)。结果显示, 和对照组相比, EsxV、EsxV:C 和 EsxV:C:L 滴鼻免疫均可显著诱导 sIgA 水平升高 ($P=0.0005$, $P<0.0001$, $P<0.0001$)。EsxV:C 较 EsxV 诱导小

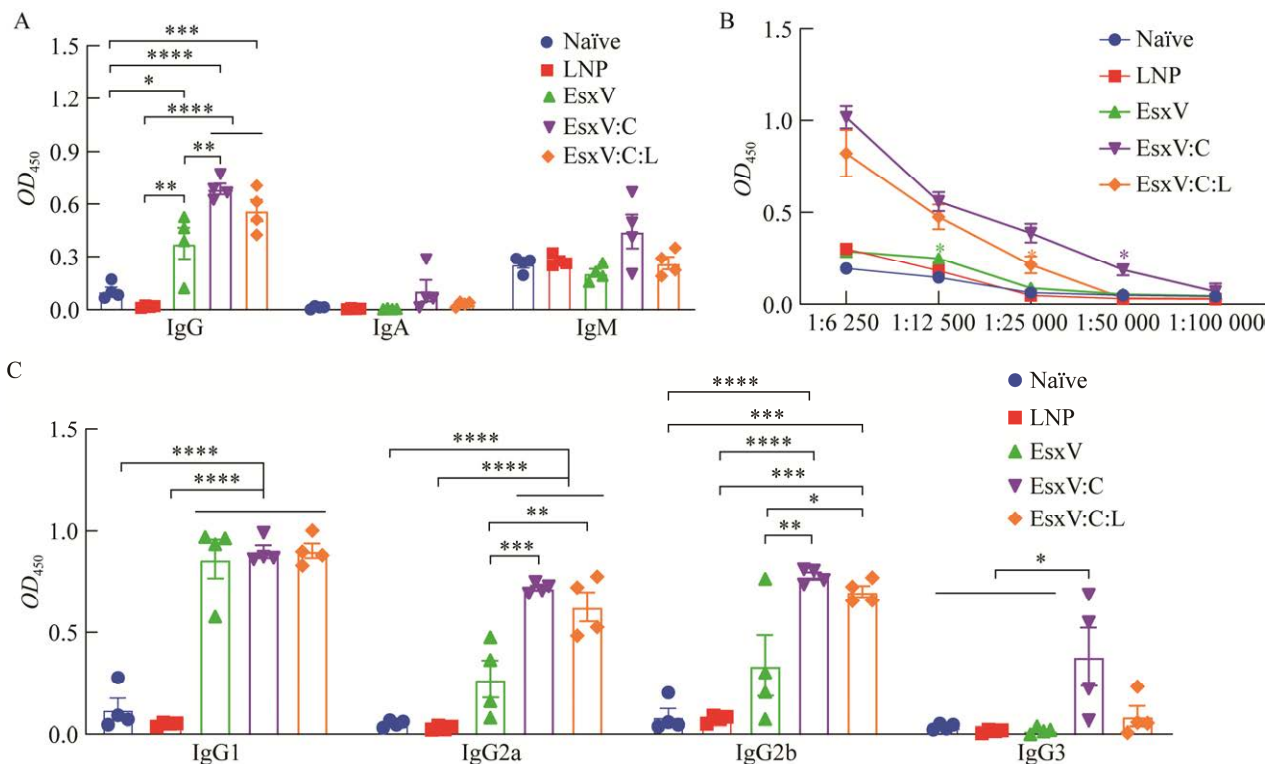


图 3 小鼠体液免疫应答水平检测

Figure 3 Humoral immune response level and antibody subclass detection. A: Antibody subclass IgG, IgA and IgM detection (mouse serum 1:200 dilution). B: Serum antibody IgG antibody titer detection. C: IgG subclass IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (mouse serum diluted 1:200). Data are shown as the $\bar{x} \pm s$, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

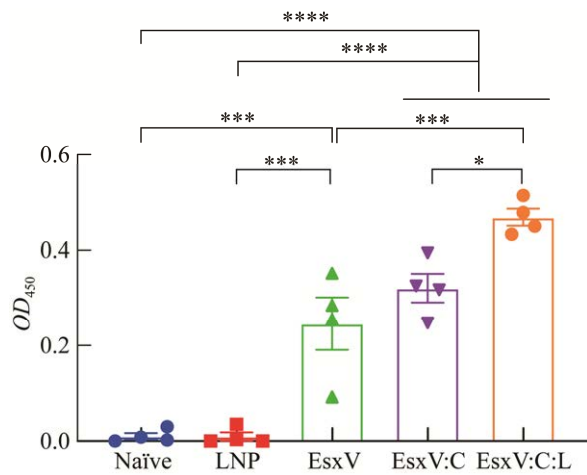


图4 小鼠BALF中sIgA水平的检测

Figure 4 Detection of sIgA level in BALF. Data are shown as the $\bar{x} \pm s$, *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

鼠sIgA分泌水平有上升趋势,但无显著差异。EsxV:C:L免疫诱导的sIgA水平显著高于EsxV与EsxV:C ($P=0.0009$, $P=0.0312$)。这表明EsxV可诱导黏膜免疫反应,c-di-AMP作为佐剂并未显著增加EsxV诱导的黏膜免疫反应,而EsxV:C:L诱导黏膜免疫应答水平显著高于EsxV和EsxV:C。

2.5 免疫小鼠脾细胞分泌细胞因子水平

脾细胞经EsxV体外抗原刺激后,ELISA法检测细胞因子IFN- γ 、IL-2和IL-10分泌水平。结果显示,与对照组相比,EsxV免疫后,IFN- γ 和IL-10分泌水平显著升高($P=0.0232$, $P=0.0234$)。EsxV:C组各细胞因子分泌水平与EsxV组相当。相比较而言,EsxV:C:L免疫诱导脾细胞IFN- γ 、IL-2和IL-10分泌水平均高于对照组($P=0.0003$, $P=0.0024$, $P=0.0003$),但仅IL-2的分泌水平显著高于EsxV组($P=0.0388$),其他细胞因子分泌水平与EsxV:C组持平(图5A-5C)。以上结果表明EsxV:C:L黏膜免疫诱导的细胞免疫应答水平与EsxV:C相当。

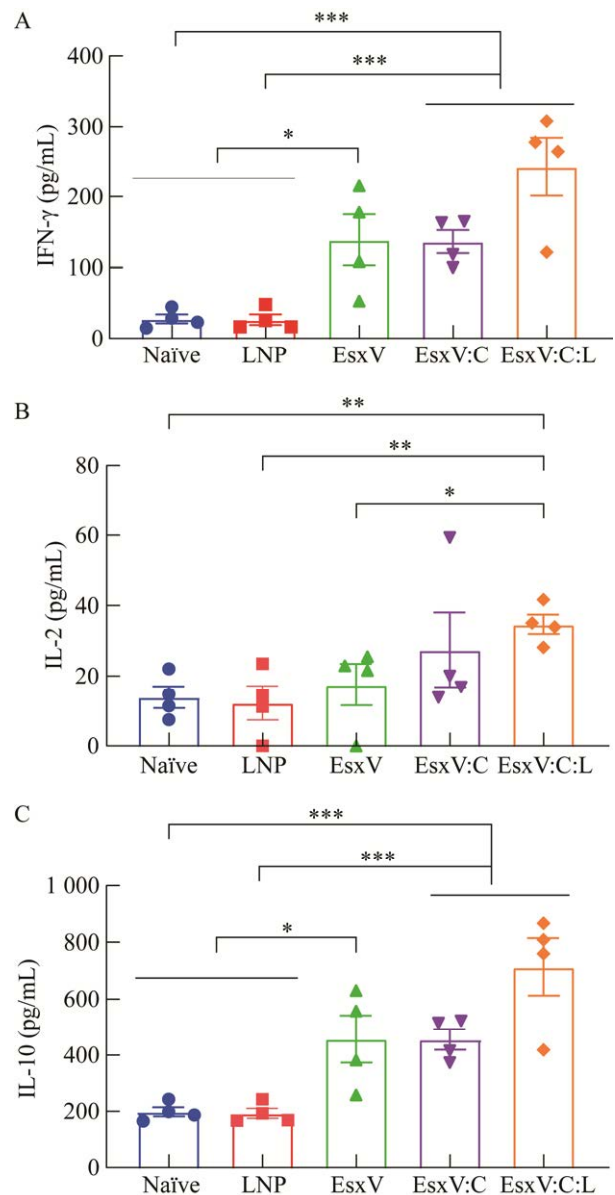


图5 脾细胞细胞因子分泌水平检测

Figure 5 Cytokine secretion of splenic lymphocytes in immunized mice. A: Detection of IFN- γ secretion level. B: Detection of IL-2 secretion level. C: Detection of IL-10 secretion level. Data are shown as the $\bar{x} \pm s$, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.6 小鼠脾细胞分泌IFN- γ 细胞频数

为了进一步检测小鼠的细胞免疫反应,脾细胞经EsxV抗原体外刺激48h后检测分泌IFN- γ 的脾细胞频数。结果显示,EsxV、EsxV:C

和 EsxV:C:L 诱导的 IFN- γ 阳性脾细胞数均显著升高($P=0.0003$, $P<0.0001$, $P=0.0011$); 其中 EsxV:C 显著高于 EsxV 组($P=0.0001$) (图 6)。EsxV 免疫可诱导 IFN- γ 阳性脾细胞数升高, c-di-AMP 可进一步促进 IFN- γ 阳性脾细胞数目的增加; EsxV:C:L 诱导的分泌 IFN- γ 阳性脾细胞数与 EsxV 组持平, 表明 LNP 作为载体抑制 c-di-AMP 促进 IFN- γ 阳性脾细胞增加的效应。

2.7 小鼠肺细胞因子转录水平

EsxV:C:L 黏膜免疫能够提高小鼠的黏膜 sIgA 水平, 进一步验证其是否能够提高肺部的细胞免疫反应。通过 qRT-PCR 检测肺组织细胞因子转录水平, 结果显示 EsxV、EsxV:C 和 EsxV:C:L 均不能显著提高肺组织 *ifn- γ* 、*il-2* 和 *il-10* 的转录水平(图 7)。上述结果表明, EsxV:C:L 经黏膜免疫并不能提高肺细胞因子的转录增加。

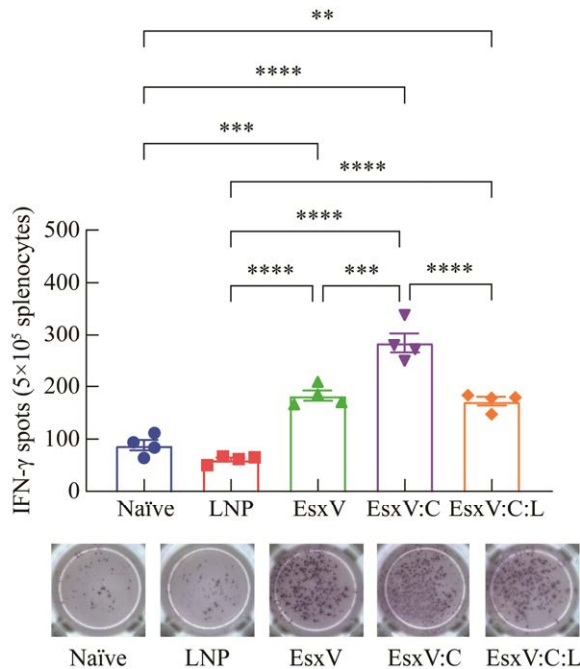


图 6 免疫小鼠 IFN- γ 阳性脾细胞频数

Figure 6 Frequency of IFN- γ cells secreted by immune mouse spleen cells. Data are shown as the $\bar{x}\pm s$, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

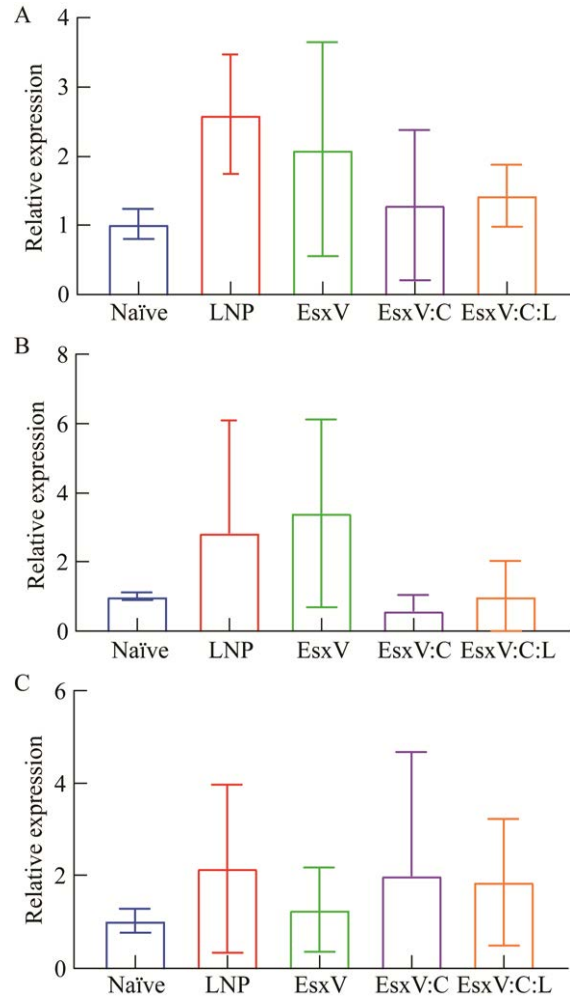


图 7 免疫小鼠肺细胞因子转录水平

Figure 7 Cytokine transcription levels in lung of mice. A: *ifn- γ* secretion level detection. B: Detection of *il-2* secretion level. C: Detection of *il-10* secretion level.

2.8 小鼠肺 T 细胞亚群比例

进一步探究 EsxV:C:L 黏膜免疫对肺 T 细胞亚群的影响。通过流式细胞术检测发现(图 8A), 与对照组相比, EsxV:C:L 免疫组小鼠 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞比例呈升高趋势, 但无显著性差异(图 8B–8D)。进一步检测各组效应记忆 T 细胞(effective memory T cell, TEM) (CD44⁺, CD62L⁻)、中央记忆 T 细胞(central memory T cells, TCM) (CD44⁺, CD62L⁺)和组织驻留记忆 T 细胞(tissue-

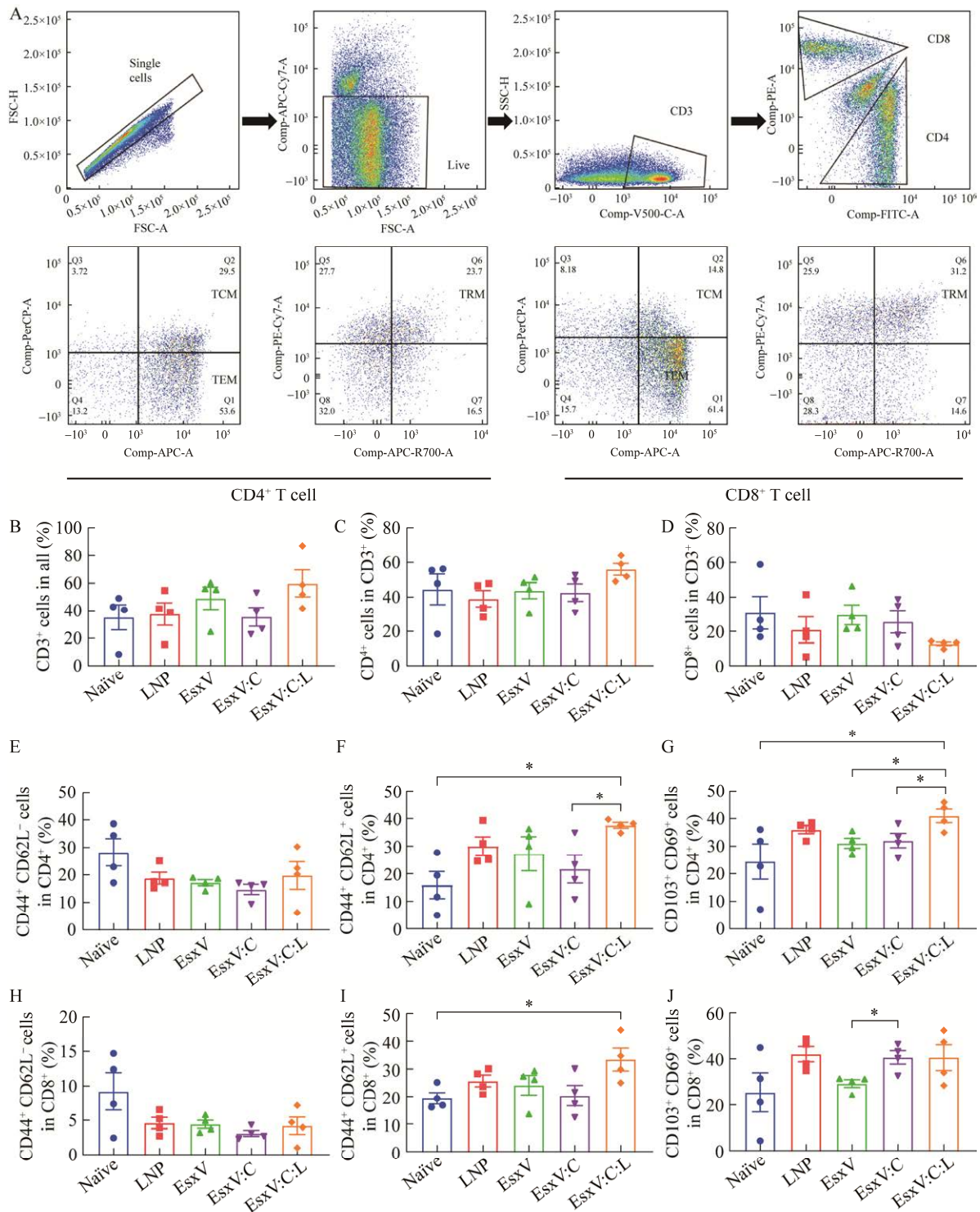


图 8 免疫小鼠肺组织 T 细胞亚群检测

Figure 8 Detection of T cell subsets in lung tissue of immunized mouse. A: Gating strategy of flow cytometry. B: CD3⁺ T cell ratio. C: CD4⁺ T cell ratio. D: CD8⁺ T cell ratio. E: Proportion of CD4⁺ TEM cells. F: CD4⁺ TCM cell ratio. G: CD4⁺ TRM cell ratio. H: CD8⁺ TEM cell ratio. I: CD8⁺ TCM cell ratio. J: CD8⁺ TRM cell ratio. Data are shown as the $\bar{x} \pm s$, *: $P < 0.05$.

resident memory T cells, TRM) ($CD103^+$, $CD69^+$) 比例。结果显示, EsxV:C:L 黏膜免疫后 $CD4^+$ TEM 比例未改变(图 8E), 但诱导小鼠肺组织 $CD4^+$ TCM 和 TRM 比例显著升高($P=0.039\ 1$, $P=0.041\ 0$), 且均显著高于 EsxV:C 免疫组($P=0.022\ 3$, $P=0.047\ 4$) (图 8F 和 8G)。类似地, EsxV:C:L 黏膜免疫能够诱导小鼠肺组织 $CD8^+$ TCM 比例显著升高($P=0.022\ 1$) (图 8I)。较 EsxV 免疫组, EsxV:C 和 EsxV:C:L 免疫可诱导 $CD8^+$ TRM 比例上升, 其中 EsxV:C 显著升高($P=0.015\ 9$); 而 EsxV:C:L 组与 EsxV:C 组相比无显著变化(图 8J)。此外, 各免疫组 $CD8^+$ TEM 比例无明显变化(图 8H)。以上表明 EsxV:C:L 能够诱导肺部 $CD4^+$ TCM、 $CD4^+$ TRM 和 $CD8^+$ TCM 比例显著升高, 可能提供对 Mtb 肺部感染的更强的保护力。

3 讨论与结论

在 LNP 制备过程中, 原材料磷脂和胆固醇会导致 LNP 热不稳定性。本研究加入亲水性物质聚乙二醇, 其与磷脂、胆固醇共同制成热稳定性的长循环 LNP (或隐形 LNP)^[16], 以能够防止 LNP 被体内网状内皮系统吞噬, 从而增强自身稳定性^[17], 同时也能够有效保护内容物并促进宿主细胞摄取。由于制备所使用的 DSPE-PEG2000 可增加 LNP 的空间位阻, 所以 LNP 较为稳定^[17]。研究表明, 粒径为 200–300 nm 颗粒是树突状细胞最佳的摄取颗粒^[15]。本研究所制备的 EsxV:C:L 粒径大部分处于 200–300 nm 之间, PDI 值 ≤ 0.30 , 表明 60% 以上的 LNP 大小相当, 形态较为稳定, 且呈正态分布; EsxV:C:L 表面带负电, 电位值为 0–5 mV。以上表明, 本研究制备的 EsxV:C:L 有利于被巨噬细胞等抗原提呈细胞摄取, 并有可能通过提高体内半衰期从而诱导更高的免疫应答。

呼吸道黏膜通过黏膜免疫形成了抵抗 Mtb 感染的第一道防线。BCG 经气管内黏膜接种恒河猴诱导的抗 Mtb 感染保护力高于 BCG 皮内接种^[13]。本课题组前期研究表明, c-di-AMP 作为黏膜佐剂可提高 Mtb 抗原 ESAT-6 和 EsxV 的免疫原性^[11–12], EsxV:C 免疫诱导的体液和细胞免疫应答水平优于 EsxV 蛋白免疫, 与前期研究一致。本研究中, EsxV:C:L 免疫小鼠不仅能够诱导小鼠特异性 IgG 抗体以及 IgG2a、IgG2b 抗体亚类水平升高, 还能诱导呼吸道黏膜 sIgA 分泌水平增加。Th1 型细胞免疫反应可针对 Mtb 感染发挥保护作用, 其中产 IFN- γ 的 Th1 型 T 细胞是保护性免疫中的主要细胞亚群^[18–20]。与 EsxV 单独免疫组相比, EsxV:C:L 能够诱导脾细胞分泌更多细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10。这些结果均证实, LNP 作为 EsxV 黏膜免疫的递送载体, 可显著增强抗原诱导的免疫应答水平^[21]。

T 细胞免疫应答在控制 Mtb 感染中发挥关键作用。研究表明, BCG 滴鼻免疫小鼠后, 免疫后 2 周小鼠肺部的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞比例上升, 为 40.7% 和 29.5%; 但第 4 周后, 细胞比例出现下降趋势, 即 18.3% 和 38%^[22]。本研究中, 小鼠免疫后 4 周肺部 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞比例与之相似, 一些研究认为, 多功能 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞可诱导免疫记忆反应发生^[23]。

免疫记忆是机体长期抵抗病原感染的重要因素之一。记忆 T 细胞被分为 2 个亚群, 即效应 TEM 和 TCM, 二者在抵抗病原感染的保护性免疫应答中发挥不同作用。在感染早期, 外周的 TEM 发挥抗感染保护作用; 感染晚期, 由于 TCM 具有较强的增殖特性, 其替代 TEM 发挥更为持久的抗感染保护作用^[24]。本研究中, EsxV:C:L 黏膜免疫能够显著提高 TCM 比例, 表明 EsxV:C:L 可能诱导针对 Mtb 呼吸道感

染的长效保护作用。TRM 是近年来发现的新一类记忆 T 细胞, 其与 TEM 和 TCM 细胞转录谱相似, 但是组织定位不同, 因此发挥不同的功能^[25]。TRM 存在肺组织中, 被认为是抵御 Mtb 二次感染的第一道防线^[25]。有报道表明, 鼻内或气管内注射包裹 Mtb 抗原的纳米颗粒可诱导肺 TRM 比例升高^[26], 提示 TRM 与纳米颗粒进入体内有一定相关性。本研究中 EsxV:C:L 免疫后可诱导 CD4⁺ TRM 细胞比例显著上升趋势, 表明 LNP 不仅可以通过 TCM 对 Mtb 呼吸道感染发挥较长保护作用, 也可以通过 TRM 作用抵抗 Mtb 二次感染, 这对于成年人 TB 疫苗保护效力不足可能有重要意义。

综上, 本研究制备的 EsxV:C:L LNP 经黏膜免疫小鼠, 可诱导更强的黏膜免疫和细胞免疫应答, 并且可诱导肺 TCM 和 TRM 数量增加, 提示其可诱导细胞免疫记忆并可能提供长效抗 Mtb 感染的保护作用。课题组进一步将对 EsxV:C:L 诱导的长效免疫应答及其抗 Mtb 感染的保护作用进行评价研究。本研究获得了可用于 TB 黏膜免疫的 LNP 候选疫苗, 为以 Mtb 抗原为基础的 LNP 亚单位疫苗的研制提供了理论和实验依据。

REFERENCES

- [1] BAGCCHI S. WHO's global tuberculosis report 2022[J]. *The Lancet Microbe*, 2023, 4(1): e20.
- [2] BRAZIER B, MCSHANE H. Towards new TB vaccines[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2020, 42(3): 315-331.
- [3] LANGE C, AABY P, BEHR MA, DONALD PR, KAUFMANN SHE, NETEA MG, MANDALAKAS AM. 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille calmette-guérin[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022, 22(1): e2-e12.
- [4] JEYANATHAN M, FRITZ DK, AFKHAMI S, AGUIRRE E, HOWIE KJ, ZGANIACZ A, DVORKIN-GHEVA A, THOMPSON MR, SILVER RF, CUSACK RP, LICHTY BD, O'BYRNE PM, KOLB M, MEDINA MFC, DOLOVICH MB, SATIA I, GAUVREAU GM, XING Z, SMAILL F. Aerosol delivery, but not intramuscular injection, of adenovirus-vectored tuberculosis vaccine induces respiratory-mucosal immunity in humans[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(3): e155655.
- [5] JEYANATHAN M, YAO YS, AFKHAMI S, SMAILL F, XING Z. New tuberculosis vaccine strategies: taking aim at un-natural immunity[J]. *Trends in Immunology*, 2018, 39(5): 419-433.
- [6] LEE W, SURESH M. Vaccine adjuvants to engage the cross-presentation pathway[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 940047.
- [7] HANIF SNM, AL-ATTIYAH R, MUSTAFA AS. Molecular cloning, expression, purification and immunological characterization of three low-molecular weight proteins encoded by genes in genomic regions of difference of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2010, 71(5): 353-361.
- [8] SAFAR HA, EL-HASHIM AZ, AMOUDY H, MUSTAFA AS. *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen Rv3619c effectively alleviates allergic asthma in mice[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 532199.
- [9] XIONG ZQ, FAN YZ, SONG X, LIU XX, XIA YJ, AI LZ. The second messenger c-di-AMP mediates bacterial exopolysaccharide biosynthesis: a review[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(11): 9149-9157.
- [10] CHENG XQ, NING J, XU X, ZHOU XD. The role of bacterial cyclic di-adenosine monophosphate in the host immune response[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 958133.
- [11] NING HH, ZHANG W, KANG J, DING TB, LIANG X, LU YZ, GUO CX, SUN WJ, WANG HP, BAI YL, SHEN LX. Subunit vaccine ESAT-6: c-di-AMP delivered by intranasal route elicits immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 647220.
- [12] 白鹭, 宁唤唤, 康健, 梁璇, 谢燕玲, 彭钰君, 张婧瑶, 路延之, 柏银兰. 结核分枝杆菌 EsxV 亚单位疫苗黏膜免疫诱导的免疫应答[J]. *中国人兽共患病学报*, 2022, 38(5): 379-386.
- BAI L, NING HH, KANG J, LIANG X, XIE YL, PENG YJ, ZHANG JY, LU YZ, BAI YL. Immune responses induced by mucosal immunization with *Mycobacterium tuberculosis* EsxV subunit vaccine[J].

- Chinese Journal of Zoonoses, 2022, 38(5): 379-386 (in Chinese).
- [13] STYLIANOU E, PAUL MJ, RELJIC R, MCSHANE H. Mucosal delivery of tuberculosis vaccines: a review of current approaches and challenges[J]. Expert Review of Vaccines, 2019, 18(12): 1271-1284.
- [14] MIAO L, ZHANG Y, HUANG L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy[J]. Molecular Cancer, 2021, 20(1): 41.
- [15] HELLFRITZSCH M, SCHERLIEß R. Mucosal vaccination *via* the respiratory tract[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(8): 375.
- [16] DOI Y, SHIMIZU T, ISHIMA Y, ISHIDA T. Long-term storage of PEGylated liposomal oxaliplatin with improved stability and long circulation times *in vivo*[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2019, 564: 237-243.
- [17] VIARD M, REICHARD H, SHAPIRO BA, DURRANI FA, MARKO AJ, WATSON RM, PANDEY RK, PURI AN. Design and biological activity of novel stealth polymeric lipid nanoparticles for enhanced delivery of hydrophobic photodynamic therapy drugs[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2018, 14(7): 2295-2305.
- [18] ZENG GC, ZHANG GL, CHEN XC. Th1 cytokines, true functional signatures for protective immunity against TB?[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2018, 15(3): 206-215.
- [19] FRANCO AR, PERI F. Developing new anti-tuberculosis vaccines: focus on adjuvants[J]. Cells, 2021, 10(1): 78.
- [20] AHMAD S, BHATTACHARYA D, KAR S, RANGANATHAN A, van KAER L, DAS G. Curcumin nanoparticles enhance *Mycobacterium bovis* BCG vaccine efficacy by modulating host immune responses[J]. Infection and Immunity, 2019, 87(11): e00291-19.
- [21] VERBEKE R, HOGAN MJ, LORÉ K, PARDI N. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines[J]. Immunity, 2022, 55(11): 1993-2005.
- [22] BLAZEVIC A, EICKHOFF CS, STANLEY J, BULLER MR, SCHRIEWER J, KETTELSON EM, HOFT DF. Investigations of TB vaccine-induced mucosal protection in mice[J]. Microbes and Infection, 2014, 16(1): 73-79.
- [23] JASENOSKY LD, SCRIBA TJ, HANEKOM WA, GOLDFELD AE. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans[J]. Immunological Reviews, 2015, 264(1): 74-87.
- [24] BUSCH DH, FRÄßLE SP, SOMMERMEYER D, BUCHHOLZ VR, RIDDELL SR. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy[J]. Seminars in Immunology, 2016, 28(1): 28-34.
- [25] OGONGO P, PORTERFIELD JZ, LESLIE A. Lung tissue resident memory T-cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 992.
- [26] HART P, COPLAND A, DIOGO GR, HARRIS S, SPALLEK R, OEHLMANN W, SINGH M, BASILE J, ROTTENBERG M, PAUL MJ, RELJIC R. Nanoparticle-fusion protein complexes protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2018, 26(3): 822-833.

(本文责编 陈宏宇)