

• 临床研究 •

大别班达病毒 mRNA 疫苗的构建及初步评价

周婷婷¹, 郁心怡², 纪雪雯³, 王桂芹⁴, 吴梓茵¹, 闻瑜婷⁵, 朱 进^{1*}, 刘新建^{5*}

¹东部战区疾病预防控制中心, 江苏 南京 210002; ²南京医科大学第一附属医院感染病科, 江苏 南京 210029; ³南京中医药大学整合医学院 江苏 南京 210023; ⁴中科南京生命健康高等研究院, 江苏 南京 211135; ⁵南京医科大学基础医学院病原生物学系, 国家疫苗研发创新平台&卫健委抗体技术重点实验室 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 基于 mRNA 疫苗策略构建大别班达病毒(*Bandavirus davieense* virus, DBV)疫苗, 并免疫 BALB/c 小鼠, 评价其免疫学特征。方法: 优化并合成 DBV 糖蛋白 Gn 序列, 克隆至 pGEM-3Zf(+)载体, 质粒通过 *Bam*H I 酶切线性化, 进行体外转录, 酶法加帽和添加 A 尾制备 mRNA, 瞬时转染真核 293FT 细胞, 免疫印迹验证蛋白的体外表达。通过脂质纳米颗粒递送 mRNA, 以低(2 μ g/只)、中(5 μ g/只)、高剂量(20 μ g/只)每2周肌肉注射1次免疫 BALB/c 小鼠, ELISA 测定小鼠血清抗体效价, 病毒中和实验评价小鼠血清阻断病毒感染细胞的能力。结果: 制备的 DBV mRNA 疫苗能够进行体外转录和表达, 低、中、高3个免疫剂量均能诱导小鼠产生高水平的特异性抗体, 其中高剂量免疫组可诱导稳定抗体表达至10周以上; 病毒中和实验显示, 免疫血清能够与病毒结合, 阻止病毒感染细胞。结论: 获得了能够诱导小鼠产生特异性中和抗体的 DBV mRNA 疫苗, 为 DBV 感染的预防奠定了研究基础。

[关键词] 大别班达病毒; mRNA 疫苗; 中和抗体; 病毒感染

[中图分类号] R392

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)08-1120-06

doi: 10.7655/NYDXBNSN231187

Construction and evaluation of *Bandavirus davieense* virus mRNA vaccineZHOU Tingting¹, YU Xinyi², JI Xuewen³, WANG Guiqin⁴, WU Zihan¹, WEN Yuting⁵, ZHU Jin^{1*}, LIU Xinjian^{5*}

¹Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002; ²Department of Infectious Disease, the first Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ³School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ⁴Nanjing Advanced Academy of Life and Health, Nanjing 211135; ⁵Department of Pathogen Biology, National Vaccine Innovation Platform & Key Laboratory of Antibody Techniques of National Health Commission, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To construct a *Bandavirus davieense* virus (DBV) vaccine based on the strategy of mRNA vaccine, immunize BALB/c mice, and evaluate its immunologic characteristics. **Methods:** The coding sequence of DBV glycoprotein Gn was optimized and synthesized, then inserted into the pGEM-3Zf(+) plasmid. The linearization plasmids were enzyme digested by *Bam*H I, cap and polyA tailing were added with polymerase to complete *in vitro* transcription. Western blotting verified the protein expression by transient transfection of the mRNA into eukaryotic 293FT cells. The mRNA was delivered by lipid nanoparticles, and immunized BALB/c mice by intramuscular injection of low (2 μ g/mouse), medium (5 μ g/mouse) and high (20 μ g/mouse) dose once every two weeks. The antibody titer in mice serum was detected by ELISA, and the ability of antibody to neutralize DBV *in vitro* was detected at the cellular level by virus neutralization assay. **Results:** The prepared DBV mRNA vaccine could be transcribed and expressed *in vitro*. All three immunization doses induced high levels of specific antibodies in mice, with the high-dose immunization group inducing stable antibody expression for over 10 weeks. The virus neutralization assay showed that immune sera could bind to the virus and block virus infection of cells. **Conclusion:** A DBV mRNA vaccine capable of inducing specific neutralizing antibodies in mice is obtained, laying the foundation for research on the prevention of DBV infection.

[Key words] *Bandavirus davieense* virus (DBV); mRNA vaccine; neutralizing antibodies; virus infection

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(08): 1120-1125]

[基金项目] 南京医科大学国家疫苗研发创新平台项目; 东部战区疾病预防控制中心“逸启”自主科研基金(2024YQFH04)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuxinjian@njmu.edu.cn; zhujin1968@njmu.edu.cn

发热伴血小板减少综合征(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)是发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)感染引起的一种新发传染病^[1]。SFTS为我国首先发现,并于2010年确认其病原体为一种新型布尼亚病毒,此后韩国、日本、越南和缅甸等陆续有SFTS病例报道^[2-4]。SFTS主要表现为发热、白细胞和/或血小板计数降低、淋巴肿大、乏力及胃肠道症状等,多数预后良好^[5]。重症患者出现弥散性血管内凝血、多器官功能衰竭、持续性血小板减少及高炎症因子水平等症状,甚至死亡,病死率12%~30%^[6-7]。世界卫生组织已于2017年将SFTS列为需要优先研究和干预的新发传染病之一^[8]。2019年SFTSV被国际病毒分类委员会更名为大别班达病毒(Dabie bandavirus/Bandavirus davieense virus, DBV)。

到目前为止,DBV尚无特异性治疗方案和有效的疫苗。疫苗在多种传染病防控过程中起着至关重要的作用。与传统疫苗相比,mRNA疫苗具有高效、安全、低成本等优点,其主要通过体外转录合成,并使用递送系统将mRNA运送进机体,依靠细胞自身的翻译系统实现蛋白质翻译、翻译后修饰和全部功能^[9]。随着新型冠状病毒疫情的暴发,多种新冠病毒mRNA疫苗获得紧急授权并投入使用^[10-11],在全球掀起了新一轮mRNA疫苗研究热潮。mRNA疫苗已成为预防和治疗多种疾病最有希望的方案之一。

mRNA疫苗在传染病的防治中得到了较为广泛的应用^[11]。迄今为止,许多mRNA疫苗诱导抗病毒免疫的临床前和临床试验已经在多种病毒感染疾病中进行,包括严重急性呼吸综合征冠状病毒2、寨卡病毒、人类免疫缺陷病毒、流感病毒等。本研究设计并构建了DBV mRNA疫苗,评估了该疫苗体外转录和诱导小鼠产生特异性中和抗体的能力,为DBV的防控及疫苗研发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和病毒株

无特定病原体级,健康雌性6~8周龄BALB/c小鼠共15只,体重20~25 g,购自斯贝福(苏州)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(苏)2022-0006,合格证编号:202377931。饲养于12 h光照/12 h无光照环境,实验室环境温度控制在(25±1)℃,相对湿度

50%~70%,5只/笼饲养,自由进食及饮水,小鼠免疫前,适应饲养1周。本研究通过东部战区疾病预防控制中心伦理委员会审核批准(2023001)。

DBV株(JS2012-70)由本实验室保存,在Vero细胞中扩增并用于本研究,病毒扩增和细胞中和实验均在生物安全2级实验室内完成。

1.1.2 实验试剂

大肠杆菌DH5 α 、293FT细胞、pGEM-3Zf(+)为中科南京生命健康高等研究院保存。胎牛血清、DMEM细胞培养基(Gibco公司,美国),庆大霉素、卡那霉素(Biofrox公司,德国),蛋白酶抑制剂(Roche公司,瑞士)。质粒中提试剂盒(Sigma公司,美国),胶回收提取试剂盒(Promega公司,美国),Lipofectamine 2000转染试剂(Invitrogen公司,美国)。抗Gn单克隆抗体为本室制备,HRP标记羊抗鼠单克隆抗体(Abcam公司,美国),RNA提取试剂盒(上海飞捷公司),化学发光显色液ECL(Thermo公司,美国),DNA Marker、质粒小提试剂盒、限制性内切酶(TaKaRa公司,日本)。引物合成和基因测序均由南京金斯瑞生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 DBV Gn-pGEM-3Zf(+)质粒设计和构建

根据本室保存的DBV株(JS2012-70),GenBank登录号:KY362350.1。分析M片段编码的糖蛋白Gn的序列信息,并经过序列优化后全基因合成克隆至pGEM-3Zf(+)载体,基因测序验证质粒构建正确。

1.2.2 Gn-pGEM-3Zf(+)体外转录和体外表达验证

将构建正确的质粒转化至大肠杆菌DH5 α 进行质粒扩增,使用中提质粒试剂盒从200 mL菌液中提取纯化质粒。经BamH I限制性内切酶进行质粒线性化,胶回收试剂盒进行纯化回收。以回收的线性化质粒为模板,在体外由T7 RNA聚合酶催化合成mRNA,同时使用牛痘病毒加帽酶(vaccinia capping enzyme)和mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶(2'-O-Methyltransferase)分别添加Cap0和Cap1完成mRNA修饰,使用E.coli Poly(A) Polymerase在mRNA的3'端添加polyA尾,使用LiCl沉淀法收集产物,琼脂糖凝胶电泳验证纯度。利用Lipofectamine 2000转染试剂将制备的Gn-mRNA转染至293FT细胞中,转染24 h后收取蛋白,一抗使用课题组制备纯化的抗Gn特异性单克隆抗体,浓度为1:1 000,使用HRP标记的羊抗鼠作为二抗,浓度为1:5 000,Western blot检测Gn的表达情况。

1.2.3 Gn-mRNA疫苗免疫BALB/c小鼠

将鉴定正确的Gn-pGEM-3Zf(+)质粒委托上海近岸科技有限公司进行体外转录成mRNA并进行脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)包封。按下述免疫方案免疫小鼠,6~8周雌性BALB/c小鼠,分低、中和和高3个免疫剂量组(每组 $n=5$),注射剂量分别为2 μg /只、5 μg /只和20 μg /只,每2周肌内注射免疫1次,4周后采集小鼠血清进行ELISA分析评估mRNA疫苗诱导小鼠产生的中和抗体效价。

1.2.4 ELISA检测小鼠血清抗体表达

真核表达的Gn糖蛋白以100 ng/孔包被ELISA板,小鼠尾静脉采血,收集血清,以1:100作为起始浓度,梯度稀释,每个稀释滴度设置3个复孔,以450 nm处的吸光度值为空白对照的2倍,判读小鼠血清抗体效价水平。

1.2.5 病毒中和实验

Vero细胞接种于6孔板内,当细胞汇合度达到90%时,接种病毒。用DMEM细胞培养基分别稀释病毒和小鼠血清(稀释比为1:10、1:100),选择高剂量免疫组中抗体效价高、持续时间长的3只小鼠血清进行细胞病毒中和实验。病毒接种量为MOI=

0.01,将500 μL 病毒液与500 μL 血清稀释液混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。同时设置无血清空白对照。移除6孔板中的培养基,加入1 mL病毒与血清混合液,每个稀释度设置3个平行孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h后,移除混合液,补加2 mL细胞维持液。24 h后,按照SFTS布尼亚病毒核酸检测试剂盒(广州达安基因,DA0340)说明书测定病毒滴度。

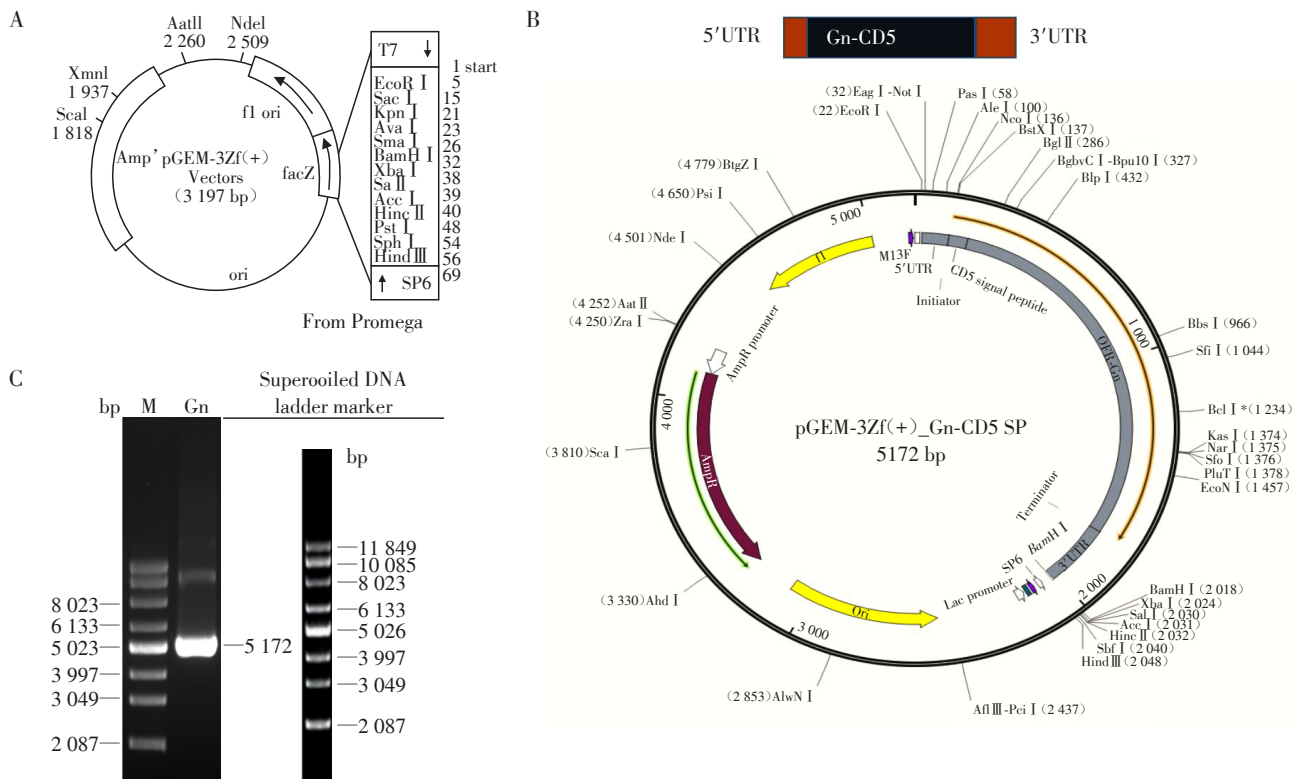
1.3 统计学方法

使用GraphPad prism 6.0统计软件进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。多组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD法,血清中和病毒的实验使用重复测定的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建DBV Gn-pGEM-3Zf(+)质粒

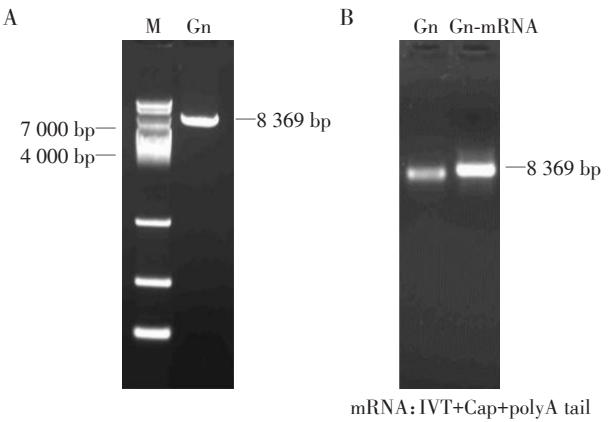
通过对DBV Gn序列分析,添加CD5信号肽序列,优化基因序列并克隆至pGEM-3Zf(+)载体中,载体序列信息见图1A, Gn序列克隆至表达载体中的示意图如图1B所示,通过琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒构建正确,大小约为5 172 bp(图1C)。



A: pGEM-3Zf(+) vector circle map and sequence reference points. B: Construction of Gn protein of DBV into pGEM-3Zf(+) vector. C: Identification of Gn-pGEM-3Zf(+) plasmids by agarose gel electrophoresis, the size of Gn-pGEM-3Zf(+) was about 5 172 bp, M: DL 10 000 DNA marker.

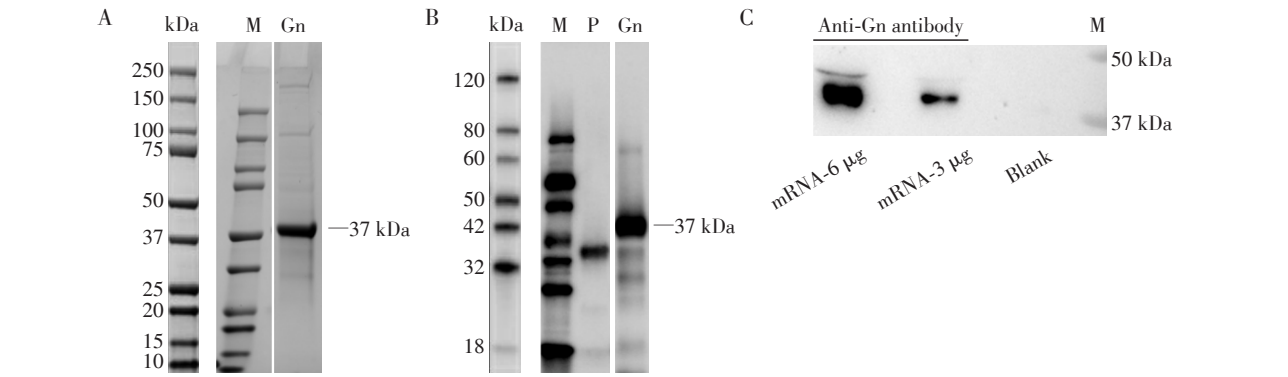
图1 Gn-pGEM-3Zf(+)质粒构建和鉴定

Figure 1 Construction and identification of Gn-pGEM-3Zf(+) plasmid



A: Linearization of Gn-pGEM-3Zf(+) plasmids by *Bam*H I. B: Identification of Gn-mRNA by agarose gel electrophoresis. The linearization of Gn-pGEM-3Zf(+) plasmids were used as template to add Cap and polyA tailing with T7 polymerase to complete *in vitro* transcription. M: DL 10 000 DNA marker.

图2 Gn-pGEM-3Zf(+)质粒体外转录鉴定
Figure 2 Identification of transcription of Gn-pGEM-3Zf(+) plasmids *in vitro*



A, B: Identification of the expression of Gn protein in CHO cells by SDS-PAGE and Western blot. C: Identification of the expression of Gn-mRNA in 293FT cells by using anti-Gn monoclonal antibody. M: marker; P: positive control.

图3 Western blot 鉴定体外转录的 mRNA 在 293FT 细胞中的表达
Figure 3 Identification of the expression of IVT mRNA in 293FT cells by Western blot

2.4 DBV mRNA 疫苗能够诱导小鼠表达高水平的特异性中和抗体

将完成 LNP 包封的 DBV mRNA 免疫小鼠, 4 周起采集小鼠血清, 持续测定 6 周、8 周和 10 周小鼠血清效价, 结果显示, 免疫 4 周, 低、中、高 3 个免疫剂量组的抗体效价均能达到 1:640 000(图 4A), 且抗体效价与免疫剂量呈正相关。随着免疫时间延长, 3 组血清抗体效价水平逐渐降低(图 4B~D), 到免疫 10 周时, 但高剂量免疫组抗体效价仍然可达到 1:160 000(图 4D)。

2.5 病毒中和实验显示小鼠血清能够阻止病毒感染细胞

DBV 以 MOI=0.01 与不同稀释比的小鼠血清

2.2 Gn-pGEM-3Zf(+)质粒的体外转录验证

将成功构建的 Gn-pGEM-3Zf(+)质粒经 *Bam*H I 酶切线性化后纯化回收, 浓度为 166.81 ng/μL(图 2A), 以纯化回收的线性质粒为模板体外转录为 mRNA, 琼脂糖凝胶电泳分别检测模板和体外转录后 mRNA 的纯度(图 2B), 经测定, 使用 700 ng 模板经过体外转录获得 12.9 μg mRNA。

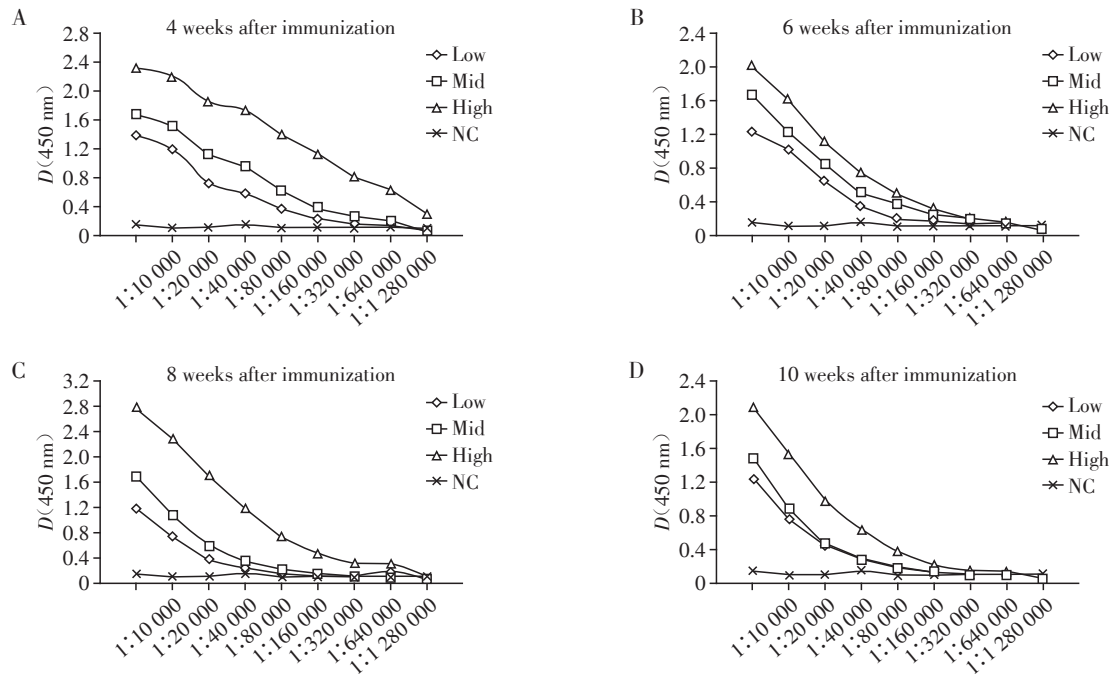
2.3 Western blot 验证 mRNA 可在真核细胞 293FT 细胞内中表达

为了验证完成体外转录的 mRNA 能够在体外表达, 首先制备了 Gn 蛋白和抗 Gn 特异性单克隆抗体, SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示 Gn 蛋白分子量约为 37 kDa(图 3A、B)。将体外转录获得的 3 μg、6 μg mRNA 使用 Lipofectamine2000 转染到 293FT 细胞中, Western blot 验证真核细胞 293FT 中 Gn 的表达, 结果显示, 体外转录获得的 mRNA 能够在真核细胞 293FT 中表达(图 3C)。

(1:10 和 1:100)孵育后接种于 Vero 细胞, 感染 24 h qPCR 测定病毒的滴度。结果显示, 免疫小鼠的血清能够阻止 DBV 感染细胞, 说明 mRNA 疫苗免疫能够诱导小鼠表达特异性中和抗体(图 5)。

3 讨论

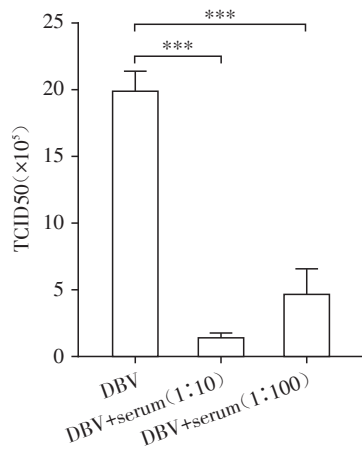
DBV 自 2010 年首次被分离发现以来, 已在我国中东部地区导致几千人感染和几百人死亡^[1]。有研究表明, DBV 具有多种传播途径, 其中蜱虫叮咬为主要的传播方式, 也可以通过直接接触患者血液或体液导致人传人, 同时存在性传播的潜在风险^[12–13]。传播 DBV 的蜱虫中长角血蜱为优势种^[14], 无论野生动物还是家养动物都可能成为其传播媒介。长角血蜱



A: ELISA analysis of the level of anti-Gn antibodies in serum at 4 weeks after immunization. Gn protein expressed in insect cells was used as substrate. B-D: The expression of anti-Gn antibodies titer in serum at 6(B), 8(C), 10 weeks(D) after immunization. Low: mice immunized with 2 μg Gn-mRNA; Mid: mice immunized with 5 μg Gn-mRNA; High: mice immunized with 10 μg Gn-mRNA; NC: negative control.

图4 ELISA检测不同时间点小鼠血清中的抗体水平

Figure 4 Analysis of the expression levels of antibodies in mice serum at different time points by ELISA



The DBV virus infected Vero cells for 24 h after incubation with different dilution (1:10 and 1:100) of serum, MOI=0.01. The virus titers were measured by qPCR, *** $P < 0.001$. TCID50: 50% tissue culture infective dose.

图5 qPCR测定不同处理组的病毒滴度

Figure 5 Virus titers in different treatment groups were measured by qPCR

在我国分布广泛,且流行地区多为乡村地区,给SFTS的防治带来了困难。

目前SFTS尚无特异性治疗方案和有效的疫苗。在DBV病毒感染疫苗研究方面,Dong等^[15]构

建了一种具有复制能力的以重组水疱性口炎病毒(rVSV)载体表达DBV Gn/Gc的减毒活疫苗,作为一种DBV候选疫苗,它可以在免疫功能正常者和免疫功能不全的IFNAR^{-/-}小鼠中诱导广谱中和抗体。Kwak等^[16]通过对编码DBV蛋白的候选DNA疫苗的研究,发现雪貂接种编码DBV蛋白的DNA疫苗后,再感染DBV全部存活,并且没有出现任何临床症状。

mRNA疫苗是一种作为蛋白质翻译模板的单核苷酸序列,在传染病的防治中得到了较为广泛的应用。与减毒活疫苗和DNA疫苗等传统疫苗相比,mRNA疫苗以IVT mRNA为主要成分,排除了在传统疫苗中的常见内毒素和其他感染风险,特别是新冠病毒mRNA疫苗的快速开发和应用,为传染病的防控提供了很好的思路。因此本研究基于mRNA疫苗设计策略,通过抗原序列分析,选择特异性抗原表位Gn为研究对象,优化合成Gn全基因序列并克隆至表达载体pGEM-3Zf(+)中,通过酶切鉴定和基因测序,确定mRNA模板构建成功。为了验证质粒模板的体外转录能力,使用BamH I酶切使质粒线性化后,通过加帽和添加poly-A尾处理,700 ng RNA体外转录获得12.9 μg mRNA,同时瞬时转染真核细胞,Western blot鉴定Gn蛋白能够在细胞中表

达, 结果表明构建的 mRNA 模板能够在体外细胞中完成转录。接着使用 LNP 进行包封, LNP 具有磷脂单分子层结构, 带正电荷的 LNP 与带负电荷的 mRNA 通过静电作用, 将 mRNA 包裹在 LNP 内^[17–18]。LNP 因其表现出的高转染效率已成为当下最常用的递送系统之一^[19–21]。包封完成以后使用不同剂量 mRNA 疫苗免疫小鼠, ELISA 检测发现高、中和低 3 个剂量组均能有效诱导小鼠表达高水平特异性抗体, 且持续时间长、抗体效价高; 病毒中和实验显示, 该血清抗体能够显著减少病毒对细胞的感染, 具有中和活性。

实验数据表明本研究制备的 DBV mRNA 疫苗具有较好的体外转录能力, 且能够诱导机体产生高水平的特异性中和抗体, 为 DBV 疫苗的研发提供了实验基础, 可为未来 SFTS 的防治提供候选疫苗。

[参考文献]

- [1] YU X J, LIANG M F, ZHANG S Y, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1523–1532
- [2] 黄晓霞, 杜珊珊, 李阿茜, 等. 2018—2021 年中国发热伴血小板减少综合征流行特征分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2024, 45(1): 112–116
- [3] KIM Y R, YUN Y, BAE S G, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection, south Korea, 2010[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(11): 2103–2105
- [4] TRAN X C, YUN Y, VAN AN L, et al. Endemic severe fever with thrombocytopenia syndrome, Vietnam[J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(5): 1029–1031
- [5] 中华医学会感染病学分会. 发热伴血小板减少综合征诊疗共识[J]. *中华传染病杂志*, 2022, 40(12): 711–721
- [6] WIN A M, NGUYEN Y T H, KIM Y, et al. Genotypic heterogeneity of *Orientia tsutsugamushi* in scrub typhus patients and thrombocytopenia syndrome Co - infection, Myanmar[J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(8): 1878–1881
- [7] NAKANO A, OGAWA H, NAKANISHI Y, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in a fatal case of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Intern Med*, 2017, 56(12): 1597–1602
- [8] WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017-First Annual review of diseases prioritized under the research and development blueprint[EB/OL].[2023-12-20].<https://cdn.who.int/media/docs/default-source/blue-print/first-annual-review-of-diseases-prioritized-under-r-and-d-blueprint.pdf>
- [9] KARIKÓ K, BUCKSTEIN M, NI H P, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA[J]. *Immunity*, 2005, 23(2): 165–175
- [10] 赵浩, 柴德智, 蔡金旋, 等. mRNA 疫苗在药物开发的一些进展[J]. *集成技术*, 2023, 12(5): 62–65
- [11] CHAUDHARY N, WEISSMAN D, WHITEHEAD K A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(11): 817–838
- [12] LIU Q, HE B, HUANG S Y, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8): 763–772
- [13] JUNG I Y, CHOI W, KIM J, et al. Nosocomial person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(5): 633.e1–633.e4
- [14] LUO L M, ZHAO L, WEN H L, et al. *Haemaphysalis longicornis* ticks as reservoir and vector of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(10): 1770–1776
- [15] DONG F F, LI D D, WEN D, et al. Single dose of a rVSV-based vaccine elicits complete protection against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. *NPJ Vaccines*, 2019, 4: 5
- [16] KWAK J E, KIM Y I, PARK S J, et al. Development of a SFTSV DNA vaccine that confers complete protection against lethal infection in ferrets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3836
- [17] LI M Y, LI Y, LI S Q, et al. The nano delivery systems and applications of mRNA[J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 227: 113910
- [18] HOU X C, ZAKS T, LANGER R, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(12): 1078–1094
- [19] EYGERIS Y, PATEL S, JOZIC A, et al. Deconvoluting lipid nanoparticle structure for messenger RNA delivery[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(6): 4543–4549
- [20] ALAMEH M G, TOMBÁČZ I, BETTINI E, et al. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses[J]. *Immunity*, 2021, 54(12): 2877–2892
- [21] KOWALSKI P S, RUDRA A, MIAO L, et al. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 710–728

[收稿日期] 2023-12-02

(本文编辑: 戴王娟)