

• 基础研究 •

流感病毒裂解疫苗佐剂对比: Alum-CpG 肌肉注射与糖纳米颗粒鼻喷递送的免疫保护效果评价

李永琪^{1,2}, 蒋正东³, 张玮欣^{1,2}, 季旻珺^{1*}, 王桂芹^{2*}

¹南京医科大学国家疫苗研发创新平台, 国家卫生健康委抗体技术重点实验室, 病原感染与防治研究省高校重点实验室, 南京医科大学基础医学院病原生物学系, 江苏 南京 211166; ²中科南京生命健康高等研究院, 江苏 南京 211135; ³深圳康泰生物制品股份有限公司, 广东 深圳 518107

[摘要] 目的: 基于同一裂解疫苗抗原体系, 比较铝佐剂-寡核苷酸(aluminum adjuvant-CpG oligodeoxynucleotide, Alum-CpG)复合佐剂肌肉注射与糖纳米颗粒(sugar-based lipid nanoparticle, SNP)鼻喷递送两种免疫策略的保护效果。方法: 将8周龄BALB/c 雌性小鼠随机分为Alum-CpG组、SNP组、仅肌注裂解疫苗的Split vaccine组及未免疫的对照组, 共免疫2次, 间隔14 d。加强免疫后第14天采集血清及鼻腔灌洗液(nasal lavage fluid, NLF), 采用血凝抑制(hemagglutination inhibition, HI)试验和间接酶联免疫吸附试验检测抗体水平。随后以异源流感病毒A/Scotland/P2/2015(H1N1)进行攻毒, 评价各组小鼠体重变化、存活率、肺组织病毒载量及肺部病理学改变。结果: 在相同抗原剂量条件下, Alum-CpG组显著提高血清HI抗体效价, 攻毒后小鼠存活率达100%, 并显著降低肺组织流感病毒载量、减轻肺部炎性损伤。SNP组虽能诱导一定水平的HI抗体和分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A, sIgA)抗体并提供部分保护, 但其HI抗体效价、存活率及病毒清除效果均低于Alum-CpG组及Split vaccine组, 部分小鼠肺组织中仍可检测到较高水平的病毒复制。结论: Alum-CpG复合佐剂肌肉注射策略可显著提升裂解疫苗的免疫原性与保护效力, 免疫增强作用优于SNP鼻喷递送; SNP作为鼻喷载体具有应用潜力, 但需进一步优化其自身设计以提高保护效果。

[关键词] 流感病毒; 裂解疫苗; 铝佐剂; 寡脱氧核苷酸; 糖纳米颗粒**[中图分类号]** R392.11**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2026)07-1020-09**doi:** 10.7655/NYDXBNSN260133

Adjuvant comparison for influenza virus split vaccine: evaluation of immune protective efficacy between Alum-CpG and sugar-based lipid nanoparticles

LI Yongqi^{1,2}, JIANG Zhengdong³, ZHANG Weixin^{1,2}, JI Minjun^{1*}, WANG Guiqin^{2*}

¹National Innovation Platform for the Integration of Industry and Education in Vaccine; NHC Key Laboratory of Antibody Technique; Provincial Key Laboratory for Pathogen Infection and Prevention Research, Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Nanjing Institute of Life and Health Sciences, China University of Science and Technology, Nanjing 211135; ³Shenzhen Kangtai Biological Products Co., Ltd., Shenzhen 518107, China

[Abstract] **Objective:** This study focused on the same split vaccine antigen system to compare the protective efficacy of two immunization strategies: intramuscular injection with aluminum adjuvant - CpG oligodeoxynucleotide (Alum - CpG) and intranasal delivery with sugar-based lipid nanoparticles (SNP). **Methods:** Eight-week-old female BALB/c mice were randomly assigned into different experimental groups: Alum-CpG group, SNP group, intramuscular unadjuvanted split vaccine group, and unimmunized control group. All mice received two immunizations 14 days apart. On day 14 after the booster immunization, serum and nasal lavage fluid(NLF) were collected. Antibody levels were measured by hemagglutination inhibition (HI) assay and indirect enzyme-linked immunosorbent

[基金项目] 江苏省科技厅社会发展项目(BE2021756); 江苏省“双创人才”项目(JSSCRC2023555)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: Jiminjun@njmu.edu.cn(ORCID: 0000-0003-0293-0255); Gqwang@ipsnanjing.cn(ORCID: 0000-0002-5733-1797)

assay. Mice were then challenged with heterologous virus A/Scotland/P2/2015(H1N1) to evaluate body weight changes, survival rate, lung viral load, and pulmonary pathological changes. **Results:** Under equivalent antigen doses, intramuscular administration of the split vaccine adjuvanted with Alum-CpG significantly elevated serum HI antibody titers. Following viral challenge, mice in this group achieved a 100% survival rate, accompanied by marked reductions in lung viral loads and substantial alleviation of influenza-associated inflammatory lung pathology. Although the SNP group induced detectable serum HI antibodies and secretory IgA (sIgA) responses, and conferred partial protection against influenza virus challenge, its serum HI titers, survival rates, and viral clearance capacity were all inferior to those observed in the Alum-CpG group and the split vaccine group. Moreover, higher levels of viral replication were still detectable in the lung tissues of some mice in the SNP group. **Conclusion:** The intramuscular vaccination strategy employing Alum-CpG adjuvant markedly enhanced both the immunogenicity and protective efficacy of the split vaccine, demonstrating superior immune-enhancing effects compared to the intranasal SNP delivery. SNP have potential as an intranasal delivery platform, but their formulation design requires further optimization to improve protective efficacy.

[Key words] influenza virus; split vaccine; aluminum adjuvant; CpG oligodeoxynucleotide; sugar-based lipid nanoparticle
[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(07): 1020-1028]

流感是对人类健康构成重大威胁的传染病之一。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计,流感每年导致近10亿人感染,产生300万~500万重症病例,29万~65万死亡病例。疫苗接种是防控流感疫情的最有效途径,但疫苗对季节性流感的保护效果受到病毒抗原漂移及宿主免疫差异等多种因素影响,其平均保护率仅为38%^[1]。

佐剂的合理应用被认为是提升疫苗免疫原性的重要策略。目前,已获批的季节性流感佐剂疫苗主要有两种:FLUAD(含角鲨烯的水包油乳液佐剂的流感疫苗)和Inflexal V(病毒囊泡佐剂流感疫苗),二者均已在欧洲上市^[2]。这些应用表明,通过合理选择和设计佐剂可以显著增强疫苗诱导的免疫反应,从而提升疫苗保护效果。

铝佐剂(aluminum adjuvant, Alum)与CpG寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG)的复合佐剂(Alum-CpG)在新型疫苗开发中应用广泛。Alum可有效增强体液免疫反应,主要诱导Th2型免疫应答;而CpG作为Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)9激动剂,可促进Th1型免疫反应。二者联合应用能够在一定程度上实现Th1/Th2免疫应答的平衡,从而提升疫苗整体免疫效果^[3]。因此,Alum联合CpG策略已在多种疫苗中得到广泛研究与应用。例如,2022年6月获欧盟批准的Valneva公司疫苗VLA2001就联合了Alum与CpG^[4]。

糖纳米颗粒(sugar-based lipid nanoparticle, SNP)作为一类以多糖或寡糖为基础构建的纳米递送载体,具有良好的生物相容性及免疫调节潜力^[5]。通过糖基修饰或自组装方式,SNP不仅能够实现抗原的高效递送,还可联合多种免疫刺激分子调控免疫

反应。例如,GLA-3M-052-LS佐剂体系同时包含TLR4激动剂吡喃葡萄糖基脂质A(glucopyranosyl lipid A, GLA)和TLR7/8激动剂3M-052,可通过多通路协同激活先天免疫系统,从而诱导更广泛的体液与细胞免疫应答^[5-7]。已有研究表明,该佐剂在亚单位疫苗、蛋白疫苗及mRNA疫苗中均具有增强免疫原性的潜力,并在新型冠状病毒感染、流感、结核病、艾滋病等传染病疫苗以及肿瘤免疫治疗疫苗中展现出应用前景^[8-9]。

本研究在相同裂解抗原背景下,通过小鼠模型比较Alum-CpG复合佐剂肌肉注射、SNP鼻喷递送及裂解疫苗肌肉注射的免疫保护效果,分析不同“佐剂-给药途径”组合策略对流感疫苗保护效果的影响,为流感裂解疫苗的佐剂优化和免疫方案设计提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)鸡胚(江苏勃林格殷格翰公司);8周龄雌性SPF级BALB/c小鼠(浙江维通利华公司);流感病毒疫苗株A/Victoria/4897/2022(H1N1)、A/Wisconsin/1009/2024(H3N2)、B/California/0855/2024(B/Victoria)(深圳康泰生物制品股份有限公司);GLA(Avanti Polar Lipids公司,美国);3M-052(Selleck Chemicals公司,美国);二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇2000、胆固醇、 α -生育酚(上海艾伟拓医药科技有限公司);氯仿(上海国药集团化学试剂有限公司);Alum、CpG(InvivoGen公司,美国);受体破坏酶(receptor-destroying enzyme, RDE)(生研株式会社,

日本);病毒生长培养基(Gibco公司,美国);1%鸡红细胞(江苏鸿泉生物科技有限公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)(Becton Dickinson公司,美国);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠IgA二抗(Abcam公司,美国);即用型三溴乙醇溶液(南京爱贝生物科技有限公司);MDCK细胞、A/Scotland/P2/2015(H1N1)毒株由中科南京生命健康高等研究院提供。

所有动物实验经中科南京生命健康高等研究院动物伦理委员会审批通过(NAALH-N-2507004)。

1.2 方法

1.2.1 疫苗制备

三价裂解疫苗原液制备:将WHO推荐的流感病毒疫苗株接种于SPF鸡胚。经培养收获尿囊液,通过灭活工艺处理后,进行超滤纯化,制备各单价原液。随后,将各单价原液等比例混合,以总血凝素(hemagglutinin, HA)定量结果为准,将所得三价裂解疫苗原液的总HA浓度调整至合适水平备用。

SNP构建:将GLA、3M-052、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇2000、胆固醇及 α -生育酚溶于氯仿中,经旋转蒸发去除有机溶剂形成脂质膜。加入25 mmol/L磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)水合,混合物置于60℃水浴超声处理1 h。随后使用微流控设备在18 000 psi压力下进行5个循环挤压,经0.22 μ m滤膜过滤制得SNP,储存于2~8℃备用。

各免疫组疫苗制备:将三价裂解疫苗原液与各佐剂进行混合,通过室温缓慢搅拌12 h,最终制备成

不同组别的疫苗制剂(均为混合后终浓度)。SNP组:调整三价裂解疫苗原液总HA终浓度为100 μ g/mL, SNP终浓度为300 μ g/mL。接种时,每只小鼠取20 μ L(含2 μ g总HA、6 μ g SNP)经鼻喷接种。Alum-CpG组:调整三价裂解疫苗原液总HA终浓度为100 μ g/mL, Alum终浓度为5 mg/mL, CpG终浓度为1.25 mg/mL。接种时每只小鼠取20 μ L(含2 μ g总HA、100 μ g Alum和25 μ g CpG)经肌肉注射接种。Split vaccine组:调整三价裂解疫苗原液总HA终浓度为100 μ g/mL, 接种时每只小鼠取20 μ L(含2 μ g总HA)经肌肉注射接种。

1.2.2 流感病毒鸡胚扩增

实验前,将各流感病毒疫苗株用PBS稀释 1×10^5 倍;取稀释后病毒液100 μ L接种于9日龄SPF级鸡胚尿囊腔。接种后的鸡胚置于(37.0 $\pm$ 0.5)℃、相对湿度60% $\pm$ 5%的孵化箱中孵育72 h。孵育结束后,将鸡胚转移至4℃冷胚过夜,随后无菌操作收获尿囊液。

收集的尿囊液4℃、3 500 r/min离心20 min,取上清液,采用1%鸡红细胞悬液进行血凝试验。选取血凝效价 ≥ 256 的阳性尿囊液,再次4℃、3 500 r/min离心20 min,将上清液分装后置于-80℃超低温冰箱保存,以备后续血凝抑制(hemagglutination inhibition, HI)试验使用。

1.2.3 小鼠免疫接种

选取80只8周龄雌性SPF级BALB/c雌性小鼠,随机分为4组,每组20只,前3组分别按前述方法进行疫苗接种,第4组为未免疫对照(Control)组,免疫方案见表1。

表1 实验动物免疫方案

Table 1 Experimental animal immunization protocol

Group	Immunization route	HA immunization dose	Number of mouse	Immunization schedule
SNP	Intranasal	2 μ g	20	2 immunizations, 21-day interval
Alum-CpG	Intramuscular	2 μ g	20	2 immunizations, 21-day interval
Split vaccine	Intramuscular	2 μ g	20	2 immunizations, 21-day interval
Control	Intramuscular	0	20	2 immunizations, 21-day interval

1.2.4 小鼠血清采集及处理

小鼠加强免疫14 d后,进行颌下静脉采血。采集的全血室温静置2 h后4℃过夜,3 500 r/min离心10 min,吸取上层血清。采用RDE预处理血清,以PBS溶解RDE为工作液,按1:3的比例将血清与RDE混合,37℃水浴过夜后56℃金属浴30 min灭活RDE,获得待检血清。

1.2.5 小鼠鼻腔灌洗液(nasal lavage fluid, NLF)采集

在加强免疫后第14天采集小鼠NLF。小鼠安乐死后暴露小鼠气管,将吸有PBS的注射器插入气管,向鼻腔方向缓慢推注液体,将从鼻孔流出的NLF收集于离心管中,于4℃、3 000 r/min离心10 min,收集上清备用。

1.2.6 小鼠血清HI试验

参照《全国流感监测技术指南》进行HI试验。以完全抑制红细胞凝集的血清最高稀释倍数作为HI抗体滴度;未见抑制者记为HI滴度<10。每组检测10只小鼠的血清样本。

1.2.7 小鼠NLF中分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A, sIgA)检测

采用间接酶联免疫吸附试验检测小鼠NLF中流感病毒抗原特异性sIgA。将A/Victoria/4897/2022(H1N1)单价裂解疫苗作为包被抗原,用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释HA至终浓度1 μg/mL, 100 μL/孔加入96孔酶标板,4℃包被过夜。次日用2% BSA封闭1 h,用含0.1% Tween-20的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline with Tween-20, PBST)洗板3次。将NLF样本进行10倍稀释,再以2倍梯度连续稀释,每孔加入100 μL,37℃孵育1 h。洗板后每孔加入1:5 000稀释的HRP标记山羊抗小鼠IgA二抗,37℃孵育1 h。经洗板后加入TMB显色,37℃避光反应30 min,终止后于酶标仪上测定450 nm吸光度值。以Control组吸光度均值的2.1倍作为阳性判定阈值,吸光度值高于该阈值的最高样本稀释倍数定义为该样本的sIgA滴度。每组检测5只小鼠的NLF样本。

1.2.8 小鼠攻毒实验

小鼠加强免疫后21 d,采用A/Scotland/P2/2015(H1N1)流感病毒株进行攻毒。对小鼠腹腔注射三溴乙醇麻醉后,经鼻腔滴注50 μL的10×半数致死量(lethal dose 50, LD₅₀)病毒液。攻毒后连续14 d监测小鼠体重变化百分率和存活情况,每组检测10只小鼠。

1.2.9 小鼠肺组织病毒载量测定

攻毒后第4天取小鼠肺组织,制备10%肺组织匀浆。取传代20代以内的MDCK细胞,消化后调整细胞密度至 1.5×10^5 个/mL,接种于96孔细胞培养板中,每孔200 μL,37℃、5% CO₂培养20 h,待细胞融合度达90%进行实验。将肺组织匀浆上清用病毒生长培养基进行10倍梯度稀释。弃去MDCK细胞培养板中培养基,以病毒生长培养基清洗1次后,每孔加入100 μL不同稀释度的样本,每个稀释度设置4个复孔。于37℃、5% CO₂条件下吸附2 h后,弃去接种液,再次清洗,每孔加入200 μL病毒生长培养基,继续培养72 h。

培养结束后观察细胞病变,并结合血凝试验判定病毒感染阳性孔。采用Reed-Muench法计算肺组

织匀浆上清的半数组织培养感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀),根据肺组织重量换算为每克肺组织的TCID₅₀(TCID₅₀/g),经对数转换后得到lg(TCID₅₀/g),结果以此形式表示。每组检测5只小鼠的肺组织病毒载量。

1.2.10 小鼠肺病理切片

攻毒后第4天,取小鼠肺组织置于4%多聚甲醛中固定。随后由中科南京生命健康高等研究院动物实验平台完成石蜡包埋、切片及苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。采用数字切片扫描系统获取图像。使用Image J软件对每张切片进行定量分析:在10倍视野下,随机选取5个非重叠视野,测定炎症面积占视野总面积的百分比,取平均值作为该小鼠的炎症面积结果。每组检测5只小鼠。

1.3 统计学方法

所有统计学分析均采用GraphPad Prism 9软件完成。各组样本量主要依据前期预实验结果、既往相关文献以及动物伦理原则综合确定。抗体滴度和病毒载量以对数转换后数据的均值±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示;肺组织炎症面积占比以均值±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。组间比较方法如下:对多组数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并结合Dunnett多重比较检验或Tukey多重比较检验进行两两比较;因SNP组针对H3N2的HI抗体滴度、Alum-CpG组病毒载量均低于检测下限,经统一赋值后组间方差不齐,均采用Brown-Forsythe和Welch ANOVA进行整体比较,并进一步以Split vaccine组为参照进行Dunnett's T3多重比较检验。生存曲线采用Kaplan-Meier法绘制,统计学分析采用Log-rank(Mantel-Cox)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流感病毒疫苗株血凝效价测定

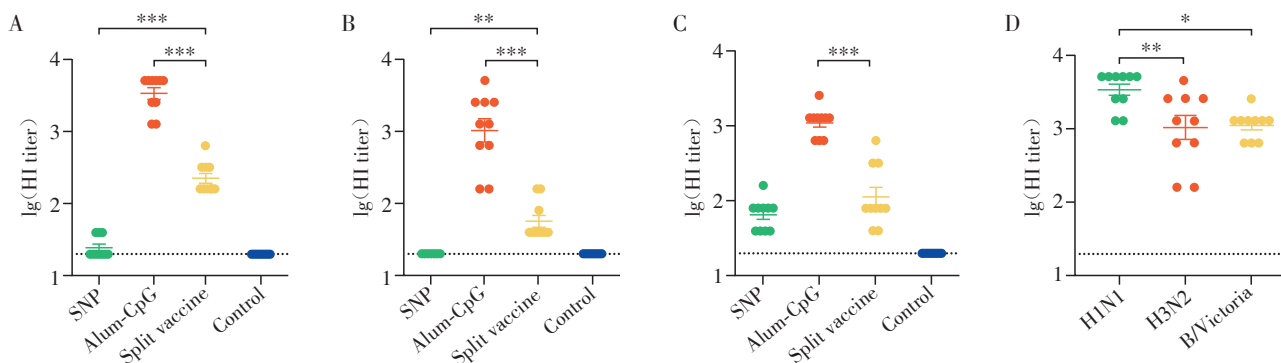
流感病毒疫苗株接种鸡胚72 h后取上清液测定血凝效价,所扩流感病毒疫苗株A/Victoria/4897/2022(H1N1)、A/Wisconsin/1009/2024(H3N2)以及B/California/0855/2024(B/Victoria)的血凝效价均为256。

2.2 小鼠血清对流感病毒的HI抗体滴度测定

在加强免疫后第14天采集小鼠血清,分别以各流感病毒疫苗株为抗原进行HI试验,以评价不同免疫组诱导的HI抗体水平。如图1A所示,各组针对A/Victoria/4897/2022(H1N1)的HI抗体滴度存在显著差异($P < 0.001$)。其中,Alum-CpG组显著高于Split vaccine组($P < 0.001$),而SNP组显著低于Split

vaccine 组 ($P < 0.001$)。如图 1B 所示, 各组针对 A/Wisconsin/1009/2024 (H3N2) 的 HI 抗体应答总体趋势与前述结果一致, Alum-CpG 组显著高于 Split vaccine 组 ($P < 0.001$), 而 SNP 组低于 Split vaccine 组 ($P = 0.001$)。如图 1C 所示, Alum-CpG 组针对 B/California/0855/2024 (B/Victoria) 的 HI 抗体滴度显著高于 Split vaccine 组 ($P < 0.001$), 而 SNP 剂量组与 Split vaccine 组比较差异无统计学意义 ($P = 0.100$)。进一

步比较 Alum-CpG 组对不同流感病毒亚型的 HI 抗体应答发现, 其对 A/Victoria/4897/2022 (H1N1) 诱导的 HI 抗体滴度最高, 显著高于 A/Wisconsin/1009/2024 (H3N2) ($P = 0.008$) 和 B/California/0855/2024 (B/Victoria) ($P = 0.012$, 图 1D)。上述结果表明, Alum-CpG 复合佐剂肌肉注射策略在增强裂解疫苗诱导的 HI 抗体方面优于 SNP 鼻喷递送策略, 且其免疫增强作用具有一定的亚型差异。



A: Serum HI titers against A/Victoria/4897/2022 (H1N1). B: Serum HI titers against A/Wisconsin/1009/2024 (H3N2). C: Serum HI titers against B/California/0855/2024 (B/Victoria). D: Comparison of serum HI titers against different influenza virus subtypes within the Alum-CpG group. The dashed line represents the limit of detection. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n = 10$).

图 1 加强免疫 14 d 后小鼠血清对 H1N1、H3N2 及 B/Victoria 型流感病毒的 HI 滴度

Figure 1 Hemagglutination inhibition titers of mouse serum against H1N1, H3N2, and B/Victoria influenza viruses on 14 days after booster immunization

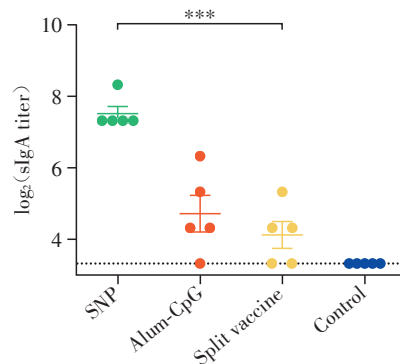
2.3 小鼠 NLF 中流感病毒抗原特异性 sIgA 滴度

在加强免疫后第 14 天收集小鼠 NLF, 并检测其针对 A/Victoria/4897/2022 (H1N1) 的特异性 sIgA 抗体滴度, 以评价不同免疫组诱导呼吸道黏膜免疫的能力。如图 2 所示, SNP 组可显著诱导局部黏膜抗体应答, 其 NLF sIgA 滴度显著高于 Split vaccine 组 ($P < 0.001$)。相比之下, Alum-CpG 组与 Split vaccine 组均采用肌肉注射免疫, 两组间差异无统计学意义 ($P = 0.380$)。上述结果表明, 鼻喷递送的 SNP 组能够更有效地诱导呼吸道局部黏膜 sIgA 免疫应答, 而肌肉注射免疫对鼻腔黏膜 sIgA 的诱导作用有限。

2.4 免疫小鼠攻毒后体重变化率和存活率

在加强免疫后第 14 天采集小鼠血清, 采用流感病毒 A/Scotland/P2/2015 (H1N1) 进行 HI 试验, 结果如图 3A 所示, Alum-CpG 组的 HI 抗体滴度显著高于 Split vaccine 组 ($P < 0.001$), 而 SNP 组的 HI 抗体滴度低于 Split vaccine 组 ($P = 0.003$)。

随后, 在加强免疫后第 21 天采用 A/Scotland/P2/2015 (H1N1) 对小鼠进行滴鼻攻毒, 并通过监测小鼠体重变化和存活率评估免疫保护效果。如图 3B、C



Influenza antigen-specific sIgA titers in NLF after immunization with different vaccine strategies. The dashed line represents the limit of detection. *** $P < 0.001$ ($n = 5$).

图 2 不同免疫策略对小鼠 NLF 中流感病毒抗原特异性 sIgA 抗体水平的影响

Figure 2 Effects of different immunization strategies on influenza virus antigen-specific sIgA antibody levels in mouse NLF

所示, Control 组小鼠攻毒后体重迅速下降, 并于感染后第 8 天全部死亡。Alum-CpG 组和 Split vaccine 组小鼠均全部存活, 其中 Alum-CpG 组体重变化最

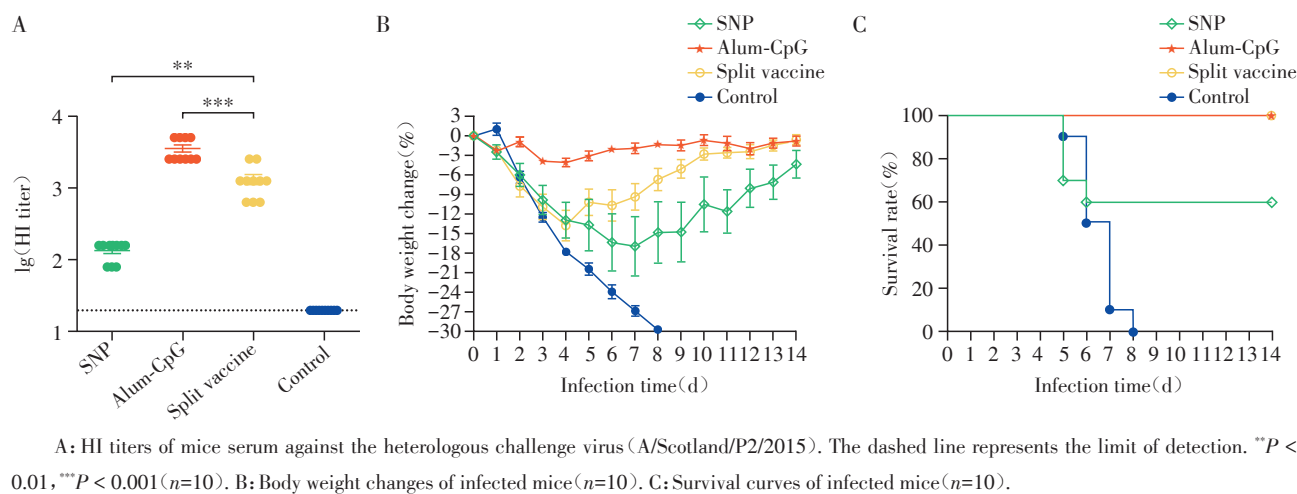


图3 不同免疫策略在小鼠异源流感病毒攻毒模型中的免疫原性与保护效力评价

Figure 3 Immunogenicity and protective efficacy of different immunization strategies in a mouse model of heterologous influenza virus challenges

小,仅在感染后第4天出现近4%的最大降幅,随后迅速恢复,提示其可为小鼠提供完全保护。Split vaccine组同样实现100%存活,但体重波动较Alum-CpG组更明显。

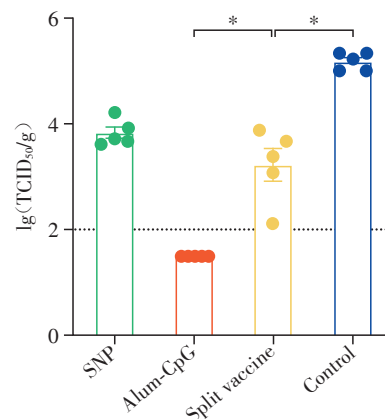
SNP组未能提供完全保护,小鼠在攻毒后出现明显体重下降,最终存活率为60%,总体保护水平低于Alum-CpG组和Split vaccine组。

2.5 免疫小鼠攻毒后4 d肺病毒载量测定

加强免疫后第21天,采用致死剂量的A/Scotland/P2/2015(H1N1)病毒对小鼠进行攻毒,并在攻毒后第4天取肺组织,采用Reed-Muench法测定肺组织病毒载量(图4)。结果显示,Alum-CpG组肺组织病毒载量低于检测下限,按1.5赋值后纳入统计分析,其病毒载量低于Split vaccine组($P=0.016$)。而SNP组与Split vaccine组相比差异无统计学意义($P=0.359$)。上述结果表明,Alum-CpG复合佐剂肌肉注射策略可显著增强病毒清除能力,有效降低肺部病毒载量;相比之下,SNP鼻喷递送体系降低肺部病毒载量的作用有限,未展现出明显的病毒清除优势。

2.6 免疫小鼠攻毒后4 d小鼠肺部病理切片HE染色结果

小鼠加强免疫后第21天,以致死剂量的A/Scotland/P2/2015(H1N1)病毒滴鼻攻毒,并于攻毒后第4天取肺组织进行病理学分析。如图5A所示,正常小鼠的肺组织结构完整,未见明显炎症细胞浸润;Control组则出现严重肺损伤,包括肺泡结构紊乱、间质出血、大量炎症细胞浸润及肺泡融合。SNP组和Split vaccine组肺组织均表现为中重度病理改变,



Lung viral loads in mice after lethal heterologous influenza virus (A/Scotland/P2/2015) challenge. The dashed line indicates the limit of detection. Samples below the limit of detection are assigned a value of 1.5 for statistical analysis. * $P < 0.05$ ($n=5$).

图4 不同免疫策略对异源流感病毒攻毒后小鼠肺部病毒载量的影响

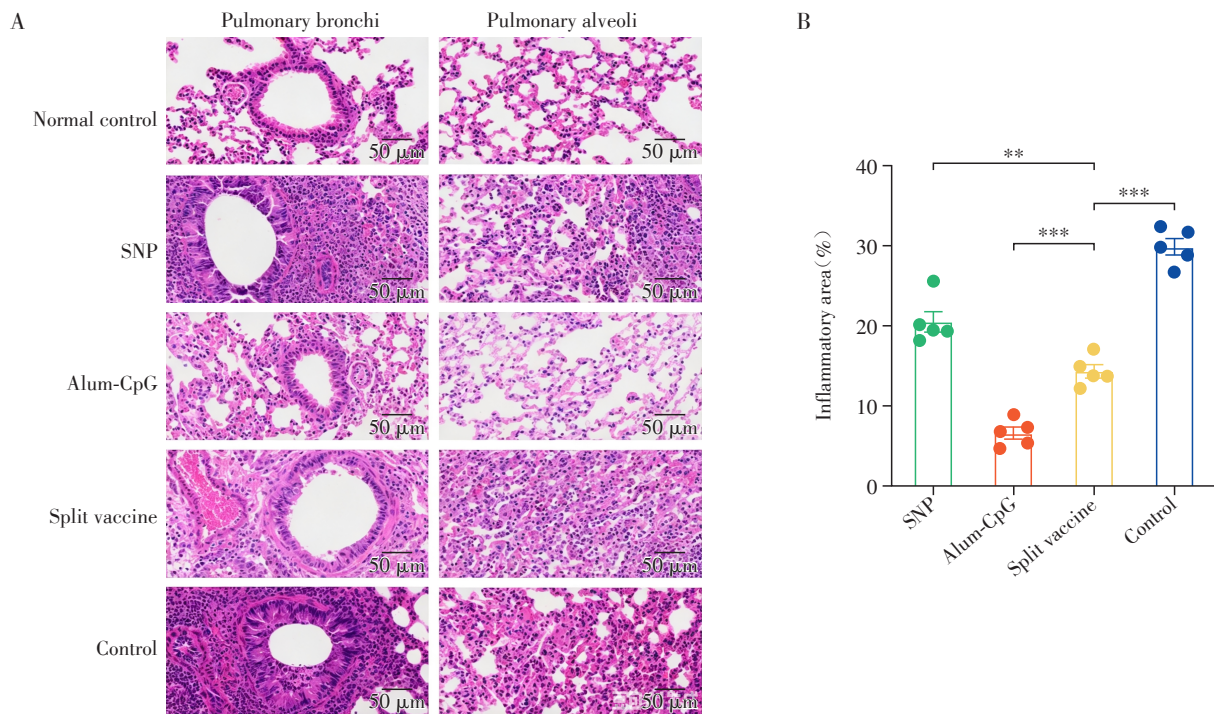
Figure 4 Effects of different immunization strategies on lung viral loads in mice after heterologous influenza virus challenge

损伤程度虽较Control组减轻,但仍较明显。相比之下,Alum-CpG组仅见轻度病理异常和少量散在炎症细胞浸润。

炎症面积定量分析结果显示,Control组炎症面积占比均值最高(29.9%);各疫苗组均低于Control组,其中Alum-CpG组低于Split vaccine组($P < 0.001$,图5B)。结合肺组织病毒载量检测结果,Alum-CpG组病毒载量低于检测下限,表明其可有效抑制肺内病毒复制并减轻病理损伤,而SNP组和Split vaccine组的保护作用相对有限。

3 讨论

本研究在相同裂解抗原体系下,以血清HI抗体



A: Lung pathological sections of mice at 4 days post influenza virus challenge (scale bar: 50 μm). B: Quantification of the percentage of inflammatory area in lung sections. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=5$).

图5 不同免疫策略免疫小鼠攻毒后肺组织病理学分析

Figure 5 Histopathological analysis of lung tissues in mice immunized with different immunization strategies after influenza virus challenge

水平、黏膜抗体应答、致死剂量病毒攻毒后的存活率、肺组织病毒载量及病理损伤作为主要评价指标,比较 Alum-CpG 复合佐剂肌肉注射策略与 SNP 鼻喷递送策略的免疫保护效果。结果表明,在本研究设定的抗原剂量、免疫程序及评价方式下,Alum-CpG 组在 HI 抗体水平、攻毒后存活率、肺组织病毒清除及病理损伤缓解等方面均呈现更优的综合保护效果。这提示对于本研究所采用的裂解疫苗抗原,Alum-CpG 复合佐剂更有助于诱导强效且持久的系统性免疫应答,进而形成稳定的体内保护效应。结合既往研究,Alum 可通过抗原沉积和缓释作用延长抗原暴露时间^[10],从而增强体液免疫应答,CpG 作为 TLR9 激动剂,可促进先天免疫细胞活化并增强抗原提呈,从而提高疫苗免疫原性^[11-12]。本研究中 Alum-CpG 组表现出的高 HI 抗体滴度、低于检测下限的肺组织病毒载量及轻微病理损伤,与上述文献报道基本一致。

相比之下,SNP 鼻喷递送策略虽可诱导鼻腔局部 sIgA 应答,但在血清 HI 抗体水平及致死剂量攻毒保护效果上未优于 Alum-CpG 组,与部分报道 SNP

可提升保护效力的研究结果不完全一致^[13]。该差异可能受多重因素共同影响。一方面,既往相关研究多采用结构明确、纯度较高的重组蛋白或病毒样颗粒作为抗原^[14],而本研究使用成分更为复杂的裂解疫苗,抗原组成与结构特征的差异,可能影响其与 SNP 的相互作用及局部递送后的抗原提呈效率^[8]。另一方面,鼻腔黏液屏障与纤毛清除作用会缩短疫苗局部滞留时间,限制抗原有效抵达鼻相关淋巴组织,难以触发充分的系统性免疫应答^[15]。因此,SNP 鼻喷递送策略虽可有效诱导黏膜免疫,但在本实验条件下未能充分激活系统性免疫,其保护效果并未优于 Alum-CpG 复合佐剂肌肉注射策略。

需要特别说明的是,本研究比较的并非单一变量,而是比较 Alum-CpG 肌肉注射与 SNP 鼻喷递送两种完整免疫策略。SNP 组采用鼻喷接种免疫,Alum-CpG 组及 Split vaccine 组采用肌肉注射,不同给药途径本身即可影响抗原分布、免疫启动部位及最终免疫保护效果。肌肉注射更有利于诱导系统性体液免疫(如 HI 抗体),而鼻喷则更侧重激活呼吸道局部黏膜免疫(如 sIgA 应答)^[16-17]。因此,SNP 组

在系统性保护指标上的相对劣势,不完全代表SNP本身的免疫潜力,更反映了不同免疫途径的天然应答差异。SNP鼻喷递送策略的核心价值在于补充肌注疫苗无法实现的黏膜免疫,而黏膜sIgA对呼吸道病毒早期拦截和传播阻断具有关键作用。

已有研究证实,SNP在肌肉或皮下注射下可诱导较强的系统性免疫应答^[18],Alum-CpG用于鼻腔递送时存在递送效率低或局部刺激等问题^[19],因此,本研究未设置肌注SNP组和鼻喷Alum-CpG组。结果显示,SNP可有效介导抗原鼻喷递送并触发局部黏膜免疫反应,初步验证了其作为鼻喷载体的可行性;但整体保护效果未达最优,提示该免疫策略仍有较大优化空间。综上,本研究结果可理解为:在本实验设定的裂解抗原体系、免疫程序及评价条件下,Alum-CpG肌肉注射策略的综合保护效果优于SNP鼻喷递送策略。该结论仅适用于本研究体系,尚不能外推至其他抗原类型或动物模型,SNP在不同给药途径下的免疫表现仍有待进一步系统研究。

尽管本研究中SNP鼻喷递送策略未显示出优于Alum-CpG肌肉注射策略的整体保护效果,鼻喷裂解疫苗在公共卫生应用中仍具有独特潜在优势。其无创接种方式可显著提升人群依从性、降低医疗资源负担,更适合大规模人群免疫推广^[20],同时,黏膜免疫能够在病原体入侵早期在呼吸道局部建立第一道免疫屏障,对呼吸道病毒的防控至关重要^[21]。然而,本研究结果提示,在裂解抗原体系下,黏膜递送的理论优势未必能够直接转化为更强的整体保护效果。这可能与裂解疫苗主要诱导体液免疫应答,以及鼻腔环境中抗原稳定性、黏膜滞留时间和个体局部差异等因素有关^[22-23]。

本研究的创新之处在于,在同一流感裂解抗原背景下直接对比Alum-CpG肌肉注射与SNP鼻喷递送两种免疫策略,并采用统一攻毒模型与评价体系,从生存率、体重变化、肺组织病毒载量及病理损伤程度等功能性终点全面评估保护效果。结果表明,在裂解抗原体系中,Alum-CpG肌肉注射策略的保护效果优于SNP鼻喷递送策略;复合佐剂联用在本研究条件下较单纯优化递送途径展现出更显著的保护优势。同时,本研究提示抗原与递送载体间的匹配性是影响黏膜疫苗效果的关键因素。流感裂解疫苗抗原成分复杂、结构异质性高,可能影响其与SNP的结合、释放及有效表位的提呈,进而削弱黏膜免疫应答强度。因此,针对裂解疫苗设计递

送系统时,除关注载体材料自身递送性能外,更应重视其与抗原理化性质的适配性。本研究未对SNP进行靶向或功能化修饰,仅评估其在裂解抗原体系下的免疫适配性与实际保护效果。

本研究仍存在一定局限性。本研究未系统检测细胞免疫指标,难以对不同免疫策略介导的细胞免疫机制进行深入阐释。本文主要基于体液免疫应答、病毒清除效率及病理保护结果展开讨论,相关机制推论仍需后续实验进一步验证。此外,攻毒毒株仅选用H1N1亚型异源株,未评估各策略对其他流感亚型的交叉保护效果。未来可通过优化SNP颗粒结构、选用结构更均一的重组抗原或病毒样颗粒等方式,提升抗原与载体间的匹配性,进一步优化鼻喷黏膜疫苗的免疫效果。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突,作者李永琪、张玮欣、季旻珺与期刊出版部同隶属南京医科大学,但审稿决策由独立审稿人和编辑团队负责,未受机构隶属关系影响。

Conflict of Interests:

All authors declare no conflicts of interest. Authors Li Yongqi, Zhang Weixin, and Ji Minjun are affiliated with the same institution as the journal's editorial department, Nanjing Medical University. However, the review process and editorial decisions were made independently by the reviewers and the editorial team, and were not influenced by institutional affiliations.

作者贡献声明:

李永琪参与研究设计、实验操作、数据处理、稿件写作;蒋正东、张玮欣参与实验操作;季旻珺参与文章指导;王桂芹负责选题、文章修改。

Author's Contributions:

LI Yongqi participated in the research design, experimental operation, data processing, and completed the initial draft; JIANG Zhengdong and ZHANG Weixin participated in the experimental operation; JI Minjun provided guidance on the article; WANG Guiqin was responsible for the topic selection, article revision.

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Influenza (seasonal) [EB/OL]. [2026-03-13]. [https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- [2] European Medicines Agency. Vaccines for pandemic influenza [EB/OL]. [2026-03-13]. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/public-health-threats/pandemic-influenza/vaccines-pandemic-influenza>
- [3] MABUCHI H, KAWANO T, GOBARU R, et al. Evaluation of the effect of two adjuvants co-administered with

- nasal recombinant hemagglutinin influenza vaccine on immune cells in mice[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2025, 66(6): 107617
- [4] LIANG Z H, ZHU H R, WANG X, et al. Adjuvants for coronavirus vaccines[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 589833
- [5] SWIERCZEWSKA M, HAN H S, KIM K, et al. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99: 70–84
- [6] GOMEZ M, MCCOLLUM J, WANG H, et al. Development of a formulation platform for a spray-dried, inhalable tuberculosis vaccine candidate [J]. *Int J Pharm*, 2021, 593: 120121
- [7] KASTURI S P, RASHEED M A U, HAVENAR-DAUGHTON C, et al. 3M-052, a synthetic TLR-7/8 agonist, induces durable HIV-1 envelope-specific plasma cells and humoral immunity in nonhuman primates[J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(48): eabb1025
- [8] ABHYANKAR M M, MANN B J, STUREK J M, et al. Development of COVID-19 vaccine using a dual Toll-like receptor ligand liposome adjuvant [J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6: 137
- [9] VOIGT E, ALSHARAYDEH A, KASAL D N, et al. ID93+ GLA-3M-052-LS vaccine candidate administered by heterologous routes improves BCG efficacy against TB[J]. *Front Immunol*, 2026, 17: 1797767
- [10] MOKALLA V R, GUNDARAPU S, KAUSHIK R S, et al. Influenza vaccines: current status, adjuvant strategies, and efficacy[J]. *Vaccines*, 2025, 13(9): 962
- [11] VERMA A, BENIWAL N, PUTTA C L, et al. CpG ODNs: precision immunotherapy and recent trends in nano-enabled nucleotide delivery[J]. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 2026, 43(1): 57–95
- [12] LIANG Z H, BAO H, YAO Z Y, et al. The orientation of CpG conjugation on aluminum oxyhydroxide nanoparticles determines the immunostimulatory effects of combination adjuvants[J]. *Biomaterials*, 2024, 308: 122569
- [13] BEHZAD H, HUCKRIEDE A L W, HAYNES L, et al. GLA-SE, a synthetic toll-like receptor 4 agonist, enhances T-cell responses to influenza vaccine in older adults[J]. *J Infect Dis*, 2012, 205(3): 466–473
- [14] ONTIVEROS-PADILLA L, BACHELDER E M, AINSLIE K M. Microparticle and nanoparticle - based influenza vaccines[J]. *J Control Release*, 2024, 376: 880–898
- [15] XU Y C, YAN X Y, WEI T, et al. Transmucosal delivery of nasal nanovaccines enhancing mucosal and systemic immunity[J]. *Nano Lett*, 2023, 23(22): 10522–10531
- [16] MALTSEVA M, GALIPEAU Y, MCCLUSKIE P, et al. Systemic and mucosal antibody responses to SARS-CoV-2 variant-specific prime-and-boost and prime-and-spike vaccination: a comparison of intramuscular and intranasal bivalent vaccine administration in a murine model [J]. *Vaccines*, 2025, 13(4): 351
- [17] MA B J, TAO M X, LI Z L, et al. Mucosal vaccines for viral diseases: status and prospects [J]. *Virology*, 2024, 593: 110026
- [18] HERNANDEZ-FRANCO J F, YADAGIRI G, PATIL V, et al. Intradermal vaccination against influenza with a STING-targeted nanoparticle combination adjuvant induces superior cross-protective humoral immunity in swine compared with intranasal and intramuscular immunization[J]. *Vaccines*, 2023, 11(11): 1699
- [19] CHEN R T, NIE M F, JIANG Y T, et al. A respiratory mucosal vaccine based on chitosan/aluminum adjuvant induces both mucosal and systemic immune responses[J]. *Int J Pharm*, 2025, 670: 125168
- [20] SONG Y F, MEHL F, ZEICHNER S L. Vaccine strategies to elicit mucosal immunity [J]. *Vaccines*, 2024, 12(2): 191
- [21] NELSON S A, SANT A J. Potentiating lung mucosal immunity through intranasal vaccination [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 808527
- [22] YIN J H, ZHAO Y Z, HUANG F, et al. Immune response and homeostasis mechanism following administration of BBIBP-CorV SARS-CoV-2 inactivated vaccine [J]. *Innovation*, 2023, 4(1): 100359
- [23] ZHANG Z H, HONG W Q, ZHANG Y, et al. Mucosal immunity and vaccination strategies: current insights and future perspectives [J]. *Mol Biomed*, 2025, 6(1): 57
- (收稿: 2026-01-26; 修回: 2026-05-22; 录用: 2026-05-27)
(本文编辑: 蒋 莉)