

酵母微囊封装的纳米乳佐剂增强亚单位疫苗的体液和细胞免疫应答

章婉娴, 黄婷婷, 吴昌静, 张远冬*

(遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000)

摘要: 利用酵母衍生的微囊多级装载纳米乳佐剂 MF59 和抗原, 以解决 MF59 佐剂不能直接包载抗原以及诱导细胞免疫能力不足的问题。利用强酸碱法制备酵母微囊 (yeast microcapsules, YC), 其具有多孔、中空的结构和较好的佐剂效应。将聚合物聚己内酯-聚乙烯亚胺 (polycaprolactone-polyethyleneimine, PCL-PEI) 修饰 MF59 纳米乳获得正电性的乳粒, 通过静电力驱动使乳粒自发沉积到 YC 中, 并进一步吸附抗原鸡卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA), 得到共载抗原和佐剂的疫苗 YC-MF59-OVA。YC-MF59-OVA 基于囊壳上 β -葡聚糖可被抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APCs) 识别而内吞, 同时在接种部位募集抗原提呈细胞, 进而有效激活机体免疫响应, 使血清中 IgG、IgG1、IgG2a 抗体水平相比游离 OVA 升高了 2~3 倍; 诱导了显著高于 OVA 的 IFN- γ ⁺CD8⁺、IL-4⁺CD4⁺ T 细胞免疫应答, 刺激脾组织中记忆性 CD44⁺CD62L⁺ T 细胞比例显著升高。本动物实验方案经遵义医科大学实验动物伦理委员会审核批准 (批准号: ZMU21-2407-169)。研究结果表明, YC-MF59-OVA 能够激活强效的体液免疫应答和细胞免疫应答, 证实 YC 能够显著弥补纳米乳佐剂的不足, 为后续疫苗递送系统的开发提供新的参考。

关键词: 酵母微囊; 纳米乳; 免疫佐剂; 亚单位疫苗; 细胞免疫应答

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)04-1019-10

MF59 and subunit vaccine encapsulated in yeast microcapsules with enhanced humoral and cellular immune responses

ZHANG Wan-xian, HUANG Ting-ting, WU Chang-jing, ZHANG Yuan-dong*

(School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract: Yeast-derived microcapsules were employed to co-encapsulate a nano-emulsion adjuvant (MF59) and antigens, effectively addressing the limitations of MF59 adjuvant in direct antigen encapsulation and its capacity to induce cellular immunity. Yeast microcapsules (YCs) were prepared using strong acid and alkali treatments, resulting in a porous and hollow structure with enhanced adjuvant properties. Positively charged polycaprolactone-polyethyleneimine (PCL-PEI) modified MF59 nanoemulsions were produced, which allowed for electrostatic interaction-driven spontaneous deposition into YCs. This modification facilitated the adsorption of the antigen, chicken ovalbumin (OVA), forming the complex YC-MF59-OVA. YC-MF59-OVA was efficiently recognized and endocytosed by antigen-presenting cells (APCs), a process facilitated by the β -glucan present on the capsular shell. Simultaneously, YC-MF59-OVA enabled a sustained release of the antigen and promoted the recruitment of APCs at the site of inoculation, leading to enhanced activation of immune responses in mice. Specifically, YC-MF59-OVA significantly elevated serum levels of IgG, IgG1, and IgG2a antibodies, achieving concentrations that were two to three times higher than those observed in the group treated with free OVA. In addition, the cellular immune response was notably improved, as evidenced by increased frequencies of IFN- γ ⁺CD8⁺ and IL-4⁺CD4⁺ T cells compared to the OVA-immunized group. Furthermore, there was a marked

收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2024-12-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160678, 82003686); 中国博士后科学基金 (2019M650249, 2020T130088ZX).

*通讯作者 Tel: 86-851-28200264, E-mail: yuandong@zmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1090

increase in the proportion of memory T cells (CD44⁺CD62L⁺) in the splenic tissues of treated animals. The animal experiment protocol was reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of Zunyi Medical University (approval No. ZMU21-2407-169). These findings demonstrate that YC-MF59-OVA can elicit robust humoral and cellular immune responses, confirming that YC can significantly overcome the limitations of traditional nanoemulsion adjuvants. This study provides a promising reference for the development of advanced vaccine delivery systems.

Key words: yeast microcapsule; nanoemulsion; immune adjuvant; subunit vaccine; cellular immune response

临床上已被批准使用的纳米乳佐剂有 MF59、AS03 等, 主要应用于人体的新型流感疫苗。临床研究和追踪证明, 纳米乳佐剂具有较高的安全性和可靠性^[1]。纳米乳佐剂能募集抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APCs), 直接促进 APCs 对抗原的吞噬作用和胞饮作用并引流至淋巴结, 并使淋巴结生发中心产生生长久性免疫保护^[1]。然而, 水包油型纳米乳不易直接装载蛋白、多肽等亚单位抗原; 其次, 纳米乳佐剂通常诱导经典抗体介导的 (Th2) 反应, 而对细胞介导的 (Th1) 免疫增强效果并不明显, 因此不适合接种各种慢性传染病或癌症疫苗^[2]。到目前为止, 因缺乏能够引发强烈 Th1 偏向细胞免疫反应的递送平台, 疫苗的开发受到严重限制^[3]。近年来, 研究者通过仿生学原理, 制备了不同类型的细菌样或病毒样颗粒佐剂, 这类佐剂能够模拟病原体的尺寸、表面电荷、形状、成分等物理特性, 通过病原体感染机体的途径实现抗原递送, 增加抗原与免疫细胞的相互作用, 进而激发强效的细胞免疫应答^[4,5]。同时, 颗粒佐剂常常具有核壳复合结构, 能够实现对抗原及佐剂的多级装载。这些信息提示, 颗粒佐剂的优势能够弥补纳米乳佐剂的缺陷。

研究发现, 酵母菌来源的微囊颗粒 (yeast microcapsules, YC) 是天然的细胞免疫佐剂。酵母菌经简单的酸碱及有机溶剂处理后即可获得 YC, YC 具有中空、多孔的结构, 且表面所含 β -葡聚糖能与巨噬细胞及树突状细胞 (dendritic cell, DC) 上的 Dectin-1 受体特异性识别而被吞噬, 进而激活 APCs 的活化和成熟, 促进细胞因子 TNF- α 、IL-6 等分泌, 上述细胞因子既能调节 CD4⁺ T 细胞分化为 Th1 和 Th17 辅助细胞, 又能诱导 CD8⁺ T 细胞产生毒性 T 淋巴细胞^[6]。同时, YC 中空、多孔的结构可以高效负载大多数药物和微粒^[6]; 此外, YC 具有较好的生物相容性、生物降解性、高稳定性、低毒性等特点, 已被 FDA 批准为安全食品添加剂。因此, YC 既是天然的颗粒佐剂, 又是理想的疫苗载体。然而, YC 直接包封蛋白抗原效率较差, 同时, 蛋白抗原也容易从 YC 内泄漏, 因而需要其他组分将抗原锚定在 YC 内。

本研究将纳米乳佐剂与 YC 的优势结合, 用于提

升亚单位疫苗免疫效力。选用水包油型纳米乳 MF59。MF59 是临床经典的水包油 (O/W) 型乳佐剂, 其由鲨鱼肝油来源的角鲨烯 (squalene, 4.3%)、乳化剂 Tween-80 (0.5%) 和 Span 85 (0.5%) 以及水相组成。MF59 具有稳定的纳米乳结构, 粒径范围在 160~200 nm^[7]。将两亲性聚合物聚己内酯-聚乙烯亚胺 (polycaprolactone-polyethyleneimine, PCL-PEI) 的疏水端 PCL 插入到 MF59 油相中, 亲水的 PEI 链端则分布在乳粒外层, PEI 带强正电荷, 形成阳离子纳米乳 (cationic MF59, CMF59); 利用 YC 中空、多孔的结构先包载 CMF59, 再通过乳粒表面的正电荷吸附负电的蛋白抗原, 从而得到一个内部载有纳米乳佐剂和抗原, 外部有 β -葡聚糖外壳的乳液/颗粒复合型疫苗递送系统。这种具有壳核结构的颗粒, 可以完成抗原和纳米乳佐剂的多级装载; 同时, 其外壳具有 β -葡聚糖, 能靶向 APCs 而被识别; 该体系兼具纳米乳佐剂和颗粒佐剂的优势, 具有引发强效的细胞免疫、体液免疫应答的潜力。

材料与amp;方法

材料 食用酵母 (yeast, 加拿大 Fleischmann's[®] 公司); 聚乙烯亚胺 2000 (PEI 2K)、 ϵ -己内酯、鸡卵清白蛋白 (OVA, 纯度 > 98%)、异硫氰酸荧光素、制霉菌素 (Nys)、聚赖氨酸 (PLL)、硫酸葡聚糖 (DS)、阿米洛利 (Ami)、氯丙嗪 (Chlo)、昆布多糖 (Lam)、角鲨烯、FITC (德国 Sigma 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); 羊抗小鼠二抗 IgG-HRP、IgG1-HRP、IgG2a-HRP (美国 Abcam 公司); anti-CD4-APC-Cy7、anti-CD8a-FITC、anti-IL-4-PE、anti-IFN- γ -APC、anti-CD11c-V450、anti-Alexa-Fluor-F4/80、anti-Ly-6G、anti-CD4-FITC、anti-CD44-PE、anti-CD62L-APC、细胞内因子染色试剂盒 (含有蛋白转运抑制剂 Brefeldin A、IC 固定液、细胞打孔液等) (美国 eBioscience 公司); Span 85 (中国 Aladdin 公司); Tween-80 (中国 Macklin 公司); 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, 中国 Biosharp 公司); 牛血清白蛋白 (德国 Biofrox 公司);

PBS with Tween-20 (中国 Adamas 公司); Cy5 (北京 Bioss 公司)。

仪器 十万分之一电子分析天平 (BP211D, 德国 Sartorius 公司); 磁力加热搅拌器 (中国杭州仪表电机厂); 优普超纯水仪 (UPH-II-10T, 中国成都超纯科技有限公司); Zeta 电位分析仪 (Zetasizer Nano ZS90, 英国 Malvern 公司); 透射电子显微镜 (H-600, 日本 Hitachi 公司); 激光共聚焦显微镜 (LSM 800, 德国 Carl Zeiss 公司); 流式细胞仪 (BD FACSCelesta, 美国 BD Bioscience 公司)。全波长多功能微孔板检测仪 (SPARK 10M, 瑞士 Tecan 公司); 小动物活体成像仪 (IVIS Lumina, 德国 PerkinElmer 公司); 涡旋振荡器 (UVS-2, 北京优晟公司)。

YC 的制备 称取 25.0 g 酵母颗粒, 倒入圆底烧瓶, 分多次加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 250 mL, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温油浴搅拌 1 h, 搅拌至酵母溶液逐渐变黄。随后以 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 将沉淀物转移至圆底烧瓶中, 加超纯水分散, 用浓盐酸调 pH 至 4.5, 于 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 油浴中搅拌 1 h, 以 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集沉淀, 随后依次用超纯水、异丙醇、丙酮清洗, 室温晾干, 得到 YC, 置于密封玻璃瓶中保存。

PCL-PEI 聚合物的合成 参考文献^[8], 以苯甲醇为引物, 二乙基己酸亚锡为催化剂使 ϵ -己内酯开环, 发生聚合反应生成 PCL-OH。以 PCL-OH 为起始物, 选用低毒的 PEI 2K 与 PCL-OH 室温搅拌反应 24 h, 然后置于透析袋透析, 除去未反应底物, 冷冻干燥得到 PCL-PEI。

纳米乳 MF59 和 YC-MF59-OVA 的制备 将 0.20 g Span 85 溶解在 0.50 g 角鲨烯中, 将 0.20 g Tween-80 溶于注射用水中, 混合形成初乳, 初乳经高压均质 (876 bar ; 15 min) 得到纳米乳, 加超纯水定容至 40 mL, 得 MF59 纳米乳。取 PCL-PEI 溶解, 配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 按体积比 1:4 取 PCL-PEI 溶液和 MF59 纳米乳混合, 涡旋 1 min (转速 $2800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 加注射用水稀释 2 倍, 得 PCL-PEI 修饰的 CMF59。向纳米乳溶液中加入 YC 粉末, 搅拌状态下孵育 4 h 后, 超滤管 ($M_w: 30 \text{ kDa}$) 离心收集沉淀, 并用注射用水洗涤 3 次; 沉淀重新用注射用水分散, 再加入抗原 OVA ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 孵育 1 h 后, 收集沉淀, 洗涤 3 次, 即得到共载佐剂和抗原的 YC-MF59-OVA (图 1)。

YC-MF59-OVA 的表征 透射电子显微镜观察酵母、YC、YC-MF59-OVA 的外观形态并测定其粒径; Zeta 电位分析仪检测其表面电荷; 用 FITC 标记 OVA 后, 制备荧光显色的 YC-MF59-OVA, 分别通过激光共聚焦显微镜观察其抗原包载情况, 同时, 采用超滤管

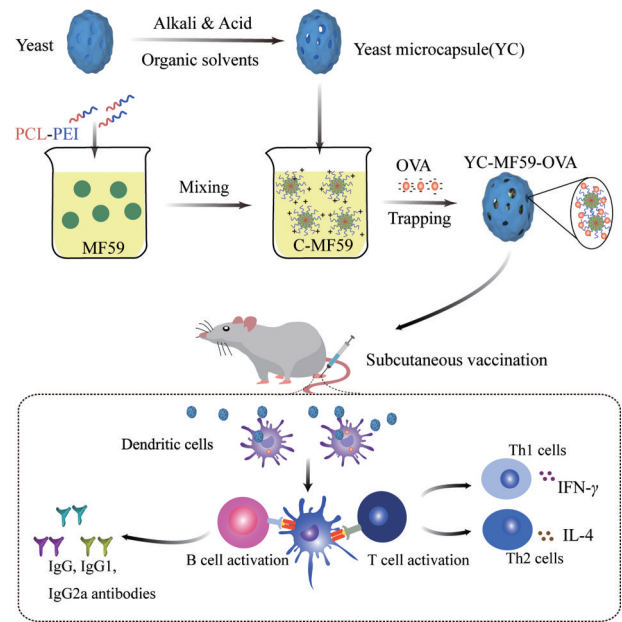


Figure 1 The schematic diagram illustrates the preparation process of YC-MF59-OVA and the induction of humoral and cellular immunity following subcutaneous inoculation with YC-MF59-OVA. YC: Yeast microcapsules; PCL-PEI: Polycaprolactone-polyethyleneimine; C-MF59: Cationic MF59; OVA: Ovalbumin

($M_w: 100 \text{ kDa}$) 分离 YC-MF59-OVA 中未包载的抗原, 经荧光分光光度计测定其包封率。

抗原的体外释放 同时制备 YC-MF59-OVA 和对照组 YC-PEI 25K-OVA, BCA 蛋白试剂盒测定抗原包封率。将制备好的 YC-MF59-OVA、YC-PEI 25K-OVA 按 1:50 的比例加入磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4), 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床中, 以 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振摇, 在 1、2、3、4、6 h 取 1 mL 释放液, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 收集上清液, 测定蛋白含量, 考察抗原从 YC 内释放的情况。

细胞及细胞培养 小鼠树突状细胞系 DC 2.4 来源于第三军医大学, 使用 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素) 培养, 细胞均在温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 5% CO_2 的孵箱中培养。细胞处于对数生长期时可用于细胞实验。

细胞毒性 以 1×10^4 个/孔接种 DC 2.4 于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 以正电性的 PCL-PEI 浓度为指标, 加入不同体积的 YC-MF59-OVA 溶液, 其中 PCL-PEI 浓度分别为 0、4、8、12、16、20、40、80、120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 各组浓度设 5 个复孔, 以不加细胞的培养基组为空白对照, 不含药物的细胞组为阴性对照。继续孵育 24 h 后, 向每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂, 再孵育 4 h, 置于全波长多功能微孔板检测仪中, 检测 450 nm 处的吸光度值。按照公式计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = $[(A_s - A_b)/(A_c - A_b)] \times 100\%$, 其中 A_s 为实验组的吸光度

值, A_c 为阳性对照组的吸光度值, A_b 为空白孔的吸光度值。

细胞摄取 FITC 标记 OVA 并制备 YC-MF59-OVA, 取荧光标记的游离 OVA 和 YC-MF59-OVA, 蛋白含量均为 10 μg 。在无血清无抗生素培养基中与 DC 2.4 共孵育 2 h, 随后收集细胞, 离心洗涤后流式测定细胞摄取阳性率。同时在共聚焦小皿中培养 DC 2.4, 并与荧光标记 OVA 和 YC-MF59-OVA 共培养 3 h, 将细胞用 4% 多聚甲醛固定后, 使用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 对细胞核进行染色, 并置于共聚焦显微镜下观察 YC-MF59-OVA 被摄取的情况。

细胞摄取机制 DC 2.4 以 1×10^5 个/孔接种于细胞培养板, 待细胞贴壁后, 加入 1640 培养基稀释的 Nys ($250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、PLL ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、DS ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Ami ($26 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Chlo ($70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Lam ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 孵育 1 h; 同时考察能量抑制组, 将细胞放入 4°C 冰箱孵育 1 h。随后吸出含抑制剂培养基和低温培养基, 加入含等量荧光标记的 YC-MF59-OVA 培养基, 各组细胞置于 37°C 孵育 2 h 后收集细胞, 进行流式细胞仪检测。

抗原滞留时间 Cy5 标记 OVA 后制备荧光标记的 YC-MF59-OVA, 注射到小鼠大腿内侧皮下, 同时对对照组注射游离 Cy5-OVA 和 MF59 与 Cy5-OVA 的混合液 MF59+Cy5-OVA, 于注射后 1、12、24、36 h 置于小动物活体成像仪中, 观察注射部位荧光强度的变化, 考察抗原滞留时间。

注射部位免疫细胞的募集 制备游离 OVA、MF59+OVA 混合液、YC-MF59-OVA, 皮下注射后分别于第 1、3 天取注射部位组织, PBS 洗净, 剪碎, 加入含胶原酶 VIII ($250 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 DNA 酶 I ($2 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的无血清 RPMI 1640 培养基, 37°C 下孵育 60 min 后, 将组织置于 $40 \mu\text{m}$ 细胞筛网研磨, 收集细胞, $2000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, PBS 洗涤 3 次后加入抗小鼠 anti-CD11c-V450、anti-Alexa-Fluor-F4/80、anti-Ly-6G 染色 40 min, 进行流式细胞仪检测, 考察注射部位 APCs 的募集。

动物和免疫实验 实验小鼠为 6~8 周龄 Balb/C 小鼠, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 所有动物实验均按《遵义医科大学动物实验中心管理办法》和《遵义医科大学动物实验伦理审评》(ZMU21-2407-169) 执行。将小鼠随机分配为 4 组, 每组小鼠 5 只。于小鼠脚掌肌内注射免疫, 实验组分别给予游离 OVA 溶液、MF59+OVA 混合液、YC-MF59-OVA 溶液。抗原 OVA 剂量均为 10 μg , 空白对照组不给予任何处理。初次免疫记作第 0 天, 此后于第 7 天加强免疫 1 次。于第 14、21、28、35 天眼眶静脉取血, 于 $6000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离

心 5 min, 吸取上清液收集血清样品检测。

抗体检测 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血清中的抗原特异性 IgG 及亚型 IgG1、IgG2a 抗体水平。血清用含 1% 牛血清白蛋白和 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液稀释 10^4 倍, 羊抗小鼠二抗 IgG、IgG1 或 IgG2a 均稀释 10^3 倍后进行测定。

细胞内因子检测 小鼠免疫第 37 天断颈处死, 取出脾脏, 在无菌条件下制备脾单细胞悬液, 用 RPMI 1640 完全培养基稀释, 以 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个/孔加入细胞培养板中, 与 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OVA 共孵育 1 h, 然后加入转运抑制剂 brefeldin A。Brefeldin A 抑制胞内高尔基体转运作用, 阻断胞内细胞因子转运到胞外。继续孵育 5 h, 收集细胞。将细胞重悬于抗体染色缓冲液中, 加入 anti-CD4-APC-Cy7、anti-CD8a-FITC 混匀, 4°C 避光染色 40 min 后洗涤 2 次, 对细胞进行固定、打孔后, 离心洗涤, 进行细胞内因子染色, 分别加入含 anti-IL-4-PE 或 anti-IFN- γ -APC 抗体的打孔液, 避光染色 20 min, 再加入打孔液洗涤离心后重悬于 PBS 中, 流式细胞仪检测。

记忆性 T 细胞检测 小鼠免疫后第 37 天处死, 取脾制备单细胞悬液, 细胞计数后, RPMI 1640 完全培养基稀释, 按 1×10^7 个/孔细胞接种到细胞培养板中。每孔加入 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OVA, 置于 37°C 二氧化碳培养箱中孵育 72 h。收集细胞, 重悬于抗体染色缓冲液中, 加入 anti-CD4-FITC、anti-CD44-PE 和 anti-CD62L-APC, 4°C 避光染色 40 min, 离心洗涤 2 遍, 重悬于 PBS 中, 流式细胞仪检测。

数据分析 本研究使用 GraphPad Prism 9.0 对数据进行统计分析, 结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 one-way ANOVA 分析各组数据间的差异, $P < 0.05$ 表示各组数据间的差异具有统计学意义。

结果与讨论

1 YC-MF59-OVA 的表征

酵母菌具有细胞壁、细胞膜结构, 胞内有多种细胞器, 含有蛋白质、脂质、核酸等。细胞壁主要由葡聚糖、蛋白质、脂类、几丁质等组成。透射电镜显示, 未处理的酵母菌含有大量内容物, 呈现为具有灰色外壁和黑色实心的颗粒 (图 2A)。细胞壁主要成分为 β -葡聚糖, 其通过 β -1,3 和 β -1,6 糖苷键连接, 维持细胞壁网络骨架刚性结构并能够耐受酸碱。因此, 采用酸碱法处理酵母菌后, 能够大量去除胞内及细胞壁上的蛋白质、脂类, 形成多孔、中空的 YC (图 2B)。

两嵌段聚合物 PCL-PEI 中, PCL 为疏水端, PEI 为亲水端; MF59 为 O/W 型乳剂。PCL-PEI 与 MF59 乳剂

混合涡旋时, 在外力作用下, PCL-PEI上疏水端PCL插入乳剂内部油相, 亲水端PEI则朝向外外部, 分布在乳滴表面, 得到强正电性的CMF59。考察MF59和CMF59的粒径和电位, 结果显示, MF59粒径为 164.2 ± 1.8 nm, 表面电荷 -24.3 ± 0.71 mV; PCL-PEI修饰后的CMF59粒径减小, 约 151.6 ± 7.4 nm, 表面电荷翻转为 $+37.7 \pm 1.20$ mV, MF59和CMF59粒径分布均一, 均无明显聚集。如图2所示, 正电性的CMF59与YC共孵育时, YC细胞内壁含有糖链, 呈电负性, 在电荷吸附及渗透压作用下, CMF59进入YC内, 此时, YC内部电荷翻转为正电(图2E、F), 能够有效吸附OVA进入微囊内。透射电镜显示, YC包载了MF59和OVA后, 中空透明的微囊内部重新填充了黑色内容物(图2C)。制备荧光标记的YC-MF59-(FITC-OVA), 共聚焦显微镜显示, YC-MF59-(FITC-OVA)呈现明显的壳核结构, 内部显示较强的绿色荧光, 同时微粒之间无聚集(图2D), 表明YC-MF59-OVA制备成功。电镜测定YC-MF59-OVA横径约为4 μm , 竖径约为5~6 μm ; 表面电荷为 $+7.85 \pm 0.32$ mV。

2 YC-MF59-OVA的包封率及体外释放

考察不同浓度的YC对抗原的包封率, 结果显示, YC浓度小于 $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对OVA的包封率随YC浓度增加而升高, 其浓度达到 $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上, 对抗原的包载达到饱和, 包封率均在90%以上(图3A), 表明YC对OVA的包载效率较好。YC-MF59-OVA的体外释放行为结果表明, YC-MF59-OVA中抗原的释放行为与对照组YC-PEI 25K-OVA一致, 均在前2 h有释放, 累计释放百分率约为15%, 随后匀速缓慢释放抗

原(图3B)。表明静电吸附的OVA能够较稳定地包载于YC内, 因而, YC-MF59-OVA能完整地被APCs摄取, 避免了在抗原提呈及免疫激活中抗原与佐剂的分离, 从而保证了更好的疫苗免疫诱导潜力。PEI 25K具有极强的正电性, 研究证实其基于电荷吸附能够有效进入中空的YC内, 并高效吸附蛋白或小分子药物, 实现YC对药物的包载^[9]。但PEI 25K较强的正电性会导致细胞损伤及机体毒副作用, 在药物递送中受到限制。本研究将低毒的PCL-PEI 2K修饰MF59, 获得的阳离子纳米乳具有与PEI 25K同等的锚定作用, 其既介导YC对抗原的高效包载, 实现抗原的缓慢释放, 同时也降低疫苗载体的毒副作用。

3 YC-MF59-OVA的细胞毒性及细胞摄取

如图3C所示, YC-MF59-OVA中PCL-PEI浓度在 $0\sim 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内细胞存活率均在95%以上, 当浓度高于 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率降低至80%以下, 提示PCL-PEI在高浓度时仍然具有明显细胞毒性。后续实验使用的YC-MF59-OVA所含PCL-PEI浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 能够避免PCL-PEI的毒副作用。图3D显示, 相对游离OVA, YC-MF59-OVA在APCs上的摄取效率均显著升高, RAW 264.7细胞上YC-MF59-OVA组荧光强度是OVA组的4.2倍, 而DC 2.4细胞上, YC-MF59-OVA组荧光强度则是游离OVA组的43倍。共聚焦显微镜观察表明, YC-MF59-OVA大量以完整的微囊颗粒被DC 2.4细胞吞噬, 而仅有少量的游离OVA被摄取(图3F)。细胞摄取抑制实验显示, YC-MF59-OVA的细胞吞噬效率受到硫酸葡聚糖、氯丙嗪和昆布多糖的抑制(图3E)。硫酸葡聚糖为清道夫受体A抑制剂, 氯丙嗪抑制网格

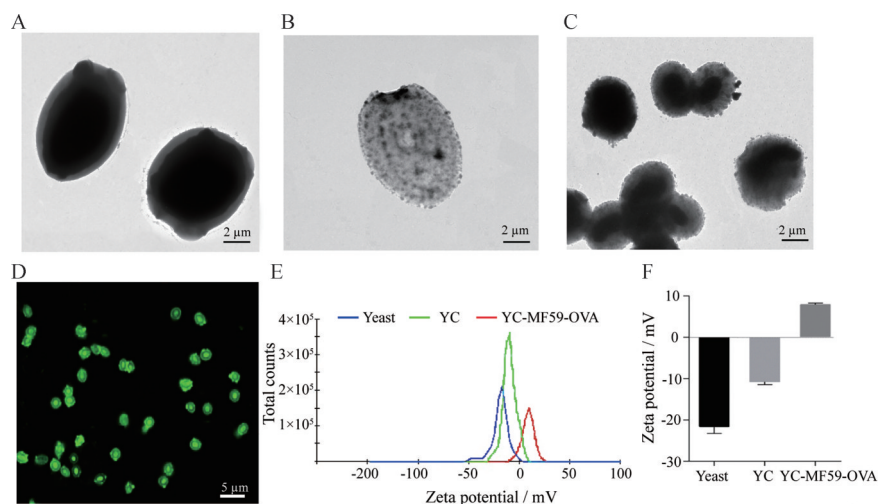


Figure 2 Characterization of YC-MF59-OVA. A: Transmission electron microscopy (TEM) images of yeast particles; B: TEM images of YCs; C: TEM images of YCs after loading with nanoemulsion and antigens; D: Confocal electron microscopy imaging of YCs after the incorporation of fluorescence-labeled antigens. Green: FITC-OVA; E, F: Zeta potential measurements for yeast, YCs, and the YC-MF59-OVA

蛋白摄取通路^[10], 昆布多糖是 Dectin-1 的典型配体^[11]。因此, YC-MF59-OVA 在 APCs 上的摄取由清道夫受体、网格蛋白、Dectin-1 受体介导, 同时具有能量依赖的特征。YC 细胞壁的主要成分是 β -葡聚糖, 是吞噬细胞 C 型凝集素受体 Dectin-1 特异性识别的配体^[12]。当昆布多糖优先占据 APCs 表面的 Dectin-1 受体时, YC-MF59-OVA 摄取效率受到明显限制。低分子量的 β -葡聚糖易与 Dectin-1 结合, 随后通过 SYK/CARD9 激活核因子 κ B (NF- κ B) 和促炎基因表达, 激活免疫响应^[13]。但完整真菌颗粒上较大的 β -葡聚糖链被识别

后, 驱动表面 Dectin-1 受体的定位并形成“吞噬突触”, 随后才被吞入胞内发挥作用, 该过程受到多种因素影响^[14]。DC 细胞上的树突可能更有利于 YC-MF59-OVA 的吞噬, 这可能是 YC-MF59-OVA 在 DC 2.4 和 RAW264.7 上摄取效率不同的原因。

4 抗原滞留时间及免疫细胞募集能力

接种位置抗原的释放行为在诱导免疫力中起着至关重要的作用^[15], 注射部位抗原的持续刺激已被证明可以增强和延长疫苗免疫力^[16]。通过活体成像 (图 4A), 结果表明, 游离的 OVA 和 MF59+OVA 混合物注

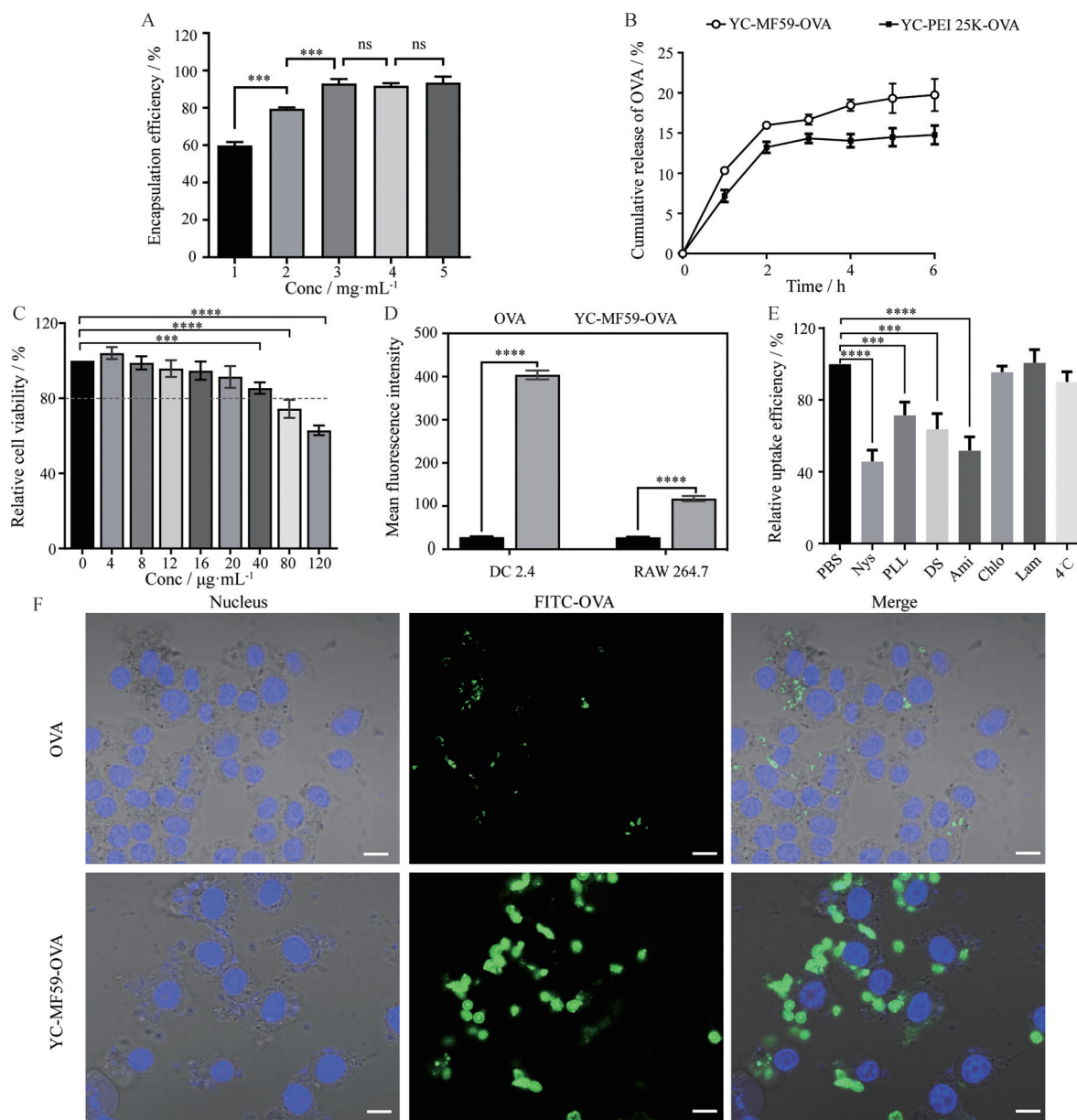


Figure 3 The cytological study of YC-MF59-OVA vaccine on antigen presenting cells (APCs). A: The loading efficiency of YC for OVA; B: The delayed release of antigens from YC-MF59-OVA; C: The cytotoxicity of YC-MF59-OVA on DC 2.4; The antigen uptake efficiency (D) and uptake mechanism (E) of YC-MF59-OVA on APCs was determined by flow cytometry; F: The uptake of YC-MF59-OVA on DC 2.4 was observed using confocal microscopy (scale bar = 5 μm). $n = 3$ (Figure A, B, D, E), $n = 5$ (Figure C), $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ns: No significant difference

射到皮下后, 24 h 荧光降低约 80%, 36 h 时荧光完全消失; 而 YC-MF59-OVA 滞留时间显著较长, 给药 36 h 时仍有约 40% 的荧光存在 (图 4B)。表明酵母微囊一定程度上具有抗原贮库的作用, 支持注射部位抗原的持久刺激。此外, YC-MF59-OVA 免疫 3 天后能够显著促进注射部位 APCs, 包括巨噬细胞、DC、中性粒细胞增多 (图 4C~E), 且效果明显优于单独的抗原。而 MF59+OVA 组仅仅使注射部位中性粒细胞升高 (图 4E)。以往研究已证实, MF59 皮下注射后, 会激活并促进 APCs 产生趋化因子, 如趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand, CCL2) 以及 CCL4、CCL5 等, 进而将单核细胞募集到注射部位, 这些细胞进一步迁移到引流淋巴结以激活 B 细胞和 T 细胞^[17]。而将酵母微囊与 MF59 结合后, 形成的联合佐剂不仅对单核细胞实现了大量募集, 而且增加对巨噬细胞和 DCs 的招募。因此, 构建的 YC-MF59-OVA 疫苗相对 MF59 来说具有更好的佐剂作用。

5 体液免疫应答能力

通过对小鼠进行 2 次加强免疫后, 测定第 14 天至 35 天血清中的抗体水平 (图 5A), 结果显示, 小鼠皮下接种 YC-MF59-OVA 后, 血清 IgG、IgG1、IgG2a 抗体水平均显著高于 MF59+OVA 和 OVA 组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$, 图 5B)。YC-MF59-OVA 组血清抗体水平从 14 天升高, 在 28 天血清 IgG、IgG1、IgG2a 抗体水平相比 MF59+OVA 和 OVA 组升高了 2~3 倍 (图 5C~E)。而 MF59+OVA 皮下免疫后, 抗体水平只在 28 天后与 OVA 组具有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$,

$P < 0.001$)。计算 IgG2a/IgG1 的比值, MF59+OVA 与 OVA 组比值接近, 在 0.6 左右; 而 YC-MF59-OVA 组 IgG2a/IgG1 的比值更接近于 1 (图 5F)。由此可见, MF59 诱导的主要是体液免疫反应, Th2 通路占主导地位, 这与先前使用 MF59 的疫苗制剂研究结果一致^[18,19]。而 YC-MF59-OVA 接种后, 酵母微囊通过与 APCs 表面 Dectin-1 之间的相互作用, 激活“吞噬突触”机制, 发生吞噬、氧化暴发等过程, 最终激活 NF- κ B 和促炎细胞因子分泌, 从而产生偏向于 Th1 先天性和适应性的细胞免疫应答^[20]。总之, 将 MF59 与抗原封装到酵母微囊后, 能够补充 MF59 佐剂在 Th1 免疫应答方面的不足, 能够有效增强其细胞免疫应答的能力。

6 细胞免疫应答能力

疫苗诱导 CD4 和 CD8 阳性 T 细胞分泌的细胞因子 IFN- γ 及 IL-4 对病原体的消除至关重要。通过细胞内因子染色实验检测 YC-MF59-OVA 诱导机体细胞免疫应答的能力。在免疫第 28 天收获接种疫苗小鼠的脾脏, 获得单细胞悬液。加入抗原 OVA 刺激。经细胞因子荧光染色后流式检测, 结果显示, YC-MF59-OVA 显著增强了 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞免疫反应, 诱导的 IL-4⁺CD4⁺ T 细胞百分比几乎高出 OVA 组两倍, 比 MF59+OVA 组高出 1 倍 (图 6A、B)。同样, 诱导的 IFN- γ ⁺CD8⁺ T 细胞百分比仍然显著高于 MF59+OVA 和 OVA (图 6C、D)。这些结果表明, YC-MF59-OVA 在体内引发了有效的抗原特异性 T 细胞反应。虽然 MF59+OVA 在诱导 IFN- γ ⁺CD8⁺ T 细胞百分比上相对于 OVA 组没有差异, 但诱导的 IL-4⁺CD4⁺ T 细胞百分比明显高于

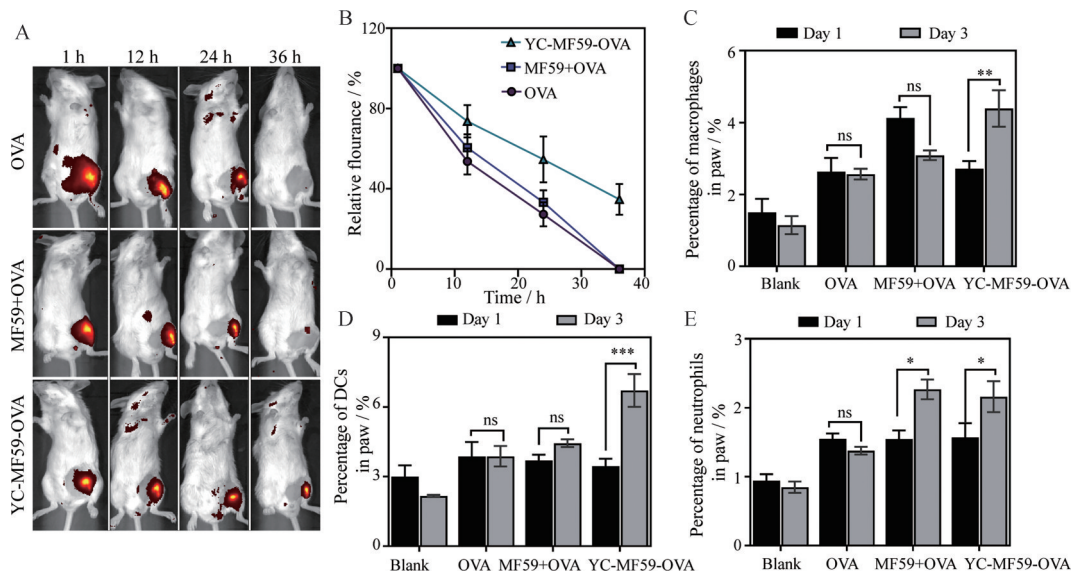


Figure 4 The mechanisms of immune activation by the YC-MF59-OVA vaccine at the injection site. A, B: The retention time and fluorescence degradation of YC-MF59-Cy5-OVA at the injection site; C–E: The yeast microencapsulated vaccine has promoted the recruitment of macrophages (C), dendritic cells (DC, D), and neutrophils (E) at the injection site. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

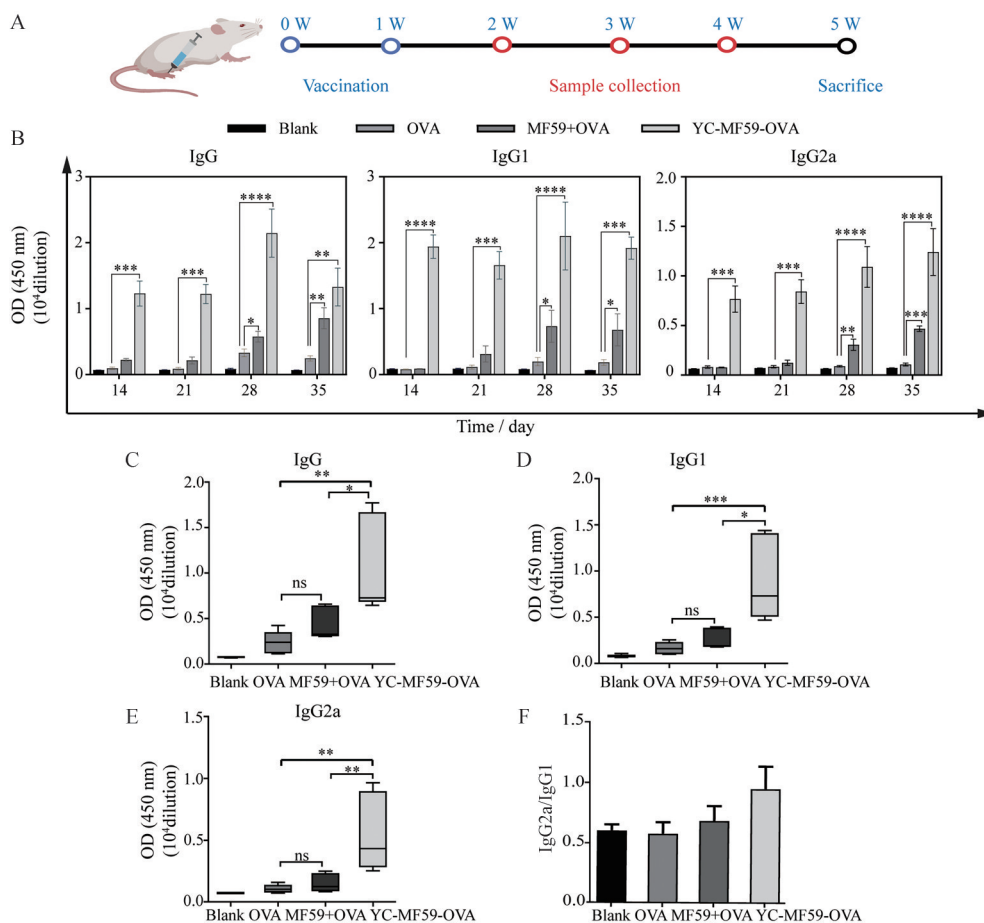


Figure 5 YC-MF59-OVA vaccine has induced a high level of serum antibody responses. A: Schematic diagram of the vaccination procedure in mice; B: Changes of IgG, IgG1, and IgG2a antibodies levels in serum in mice vaccinated with YC-MF59-OVA over 35 days; C-E: The optical density (OD) values of IgG, IgG1, and IgG2a antibodies in serum in mice vaccinated with YC-MF59-OVA on day 28; F: The ratio of IgG2a and IgG1 antibodies. $n = 5, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

OVA 组。Th2 细胞将 IL-4 递送到 B 细胞可以增强其 IgG1 抗体的产生。IFN- γ 与抗原特异性 IgG2a 水平的增加有关,高水平的 IL-4 通常与 Th2 反应相关,而高水平的 IFN- γ 被认为反映了 Th1 反应^[21]。上述结果再次表明, MF59 佐剂能够促进抗原激活 Th2 型免疫反应,而在诱导 Th1 型免疫应答上效力不足,而与酵母微囊结合能够明显提升 Th1 型免疫反应。对病原体再感染的抵抗力归因于宿主体内记忆 T 细胞的生成^[22]。因此,进一步检测脾脏中记忆 T 细胞和效应 T 细胞比例。结果显示,初始 T 细胞表达 CD62L⁺CD44⁻ 表型无明显差异 (图 6E、F), YC-MF59-OVA 免疫组脾脏中记忆性 T 细胞 (CD44⁺CD62L⁺) 比例升高 (3.91%), 明显高于 OVA 免疫组 (2.14%) (图 6G), 表明疫苗成功接种并产生了记忆。此外, YC-MF59-OVA 免疫组效应记忆 T 细胞 (CD44⁺CD62L⁻) 也表达显著上调 (8.77%), 而 MF59+OVA 免疫组 (5.29%) 和 OVA 免疫组 (4.98%) 没有明显增加, 且两组之间无显著差异 (图 6H)。

结论

现有的纳米乳佐剂引起的细胞免疫应答效应弱,使疫苗免疫作用局限于预防性免疫保护,而无法满治疗性疫苗的发展要求;而基于纳米技术和高分子聚合物的颗粒佐剂虽能引起细胞免疫反应,但通常其制备工艺复杂、效果有限且存在生物相容性较差的问题。本研究针对以上问题,将纳米乳佐剂 MF59 与酵母微囊结合,构建了一种兼具乳液佐剂和颗粒佐剂优势,并具有壳核结构的疫苗递送系统,从而实现佐剂/抗原的共载和协同递送,并在疫苗接种后能够激活强效的体液免疫应答和细胞免疫应答,证实酵母微囊能够显著弥补纳米乳佐剂 MF59 的不足。本研究结果为疫苗免疫佐剂和递送系统的开发提供新的参考。

作者贡献: 章婉娴负责疫苗制备和免疫学实验,并对研究数据进行分析解释和撰写初稿;吴昌静参与免疫学实验;黄婷婷参与细胞和活体成像实验和流式细胞仪检测;张远冬

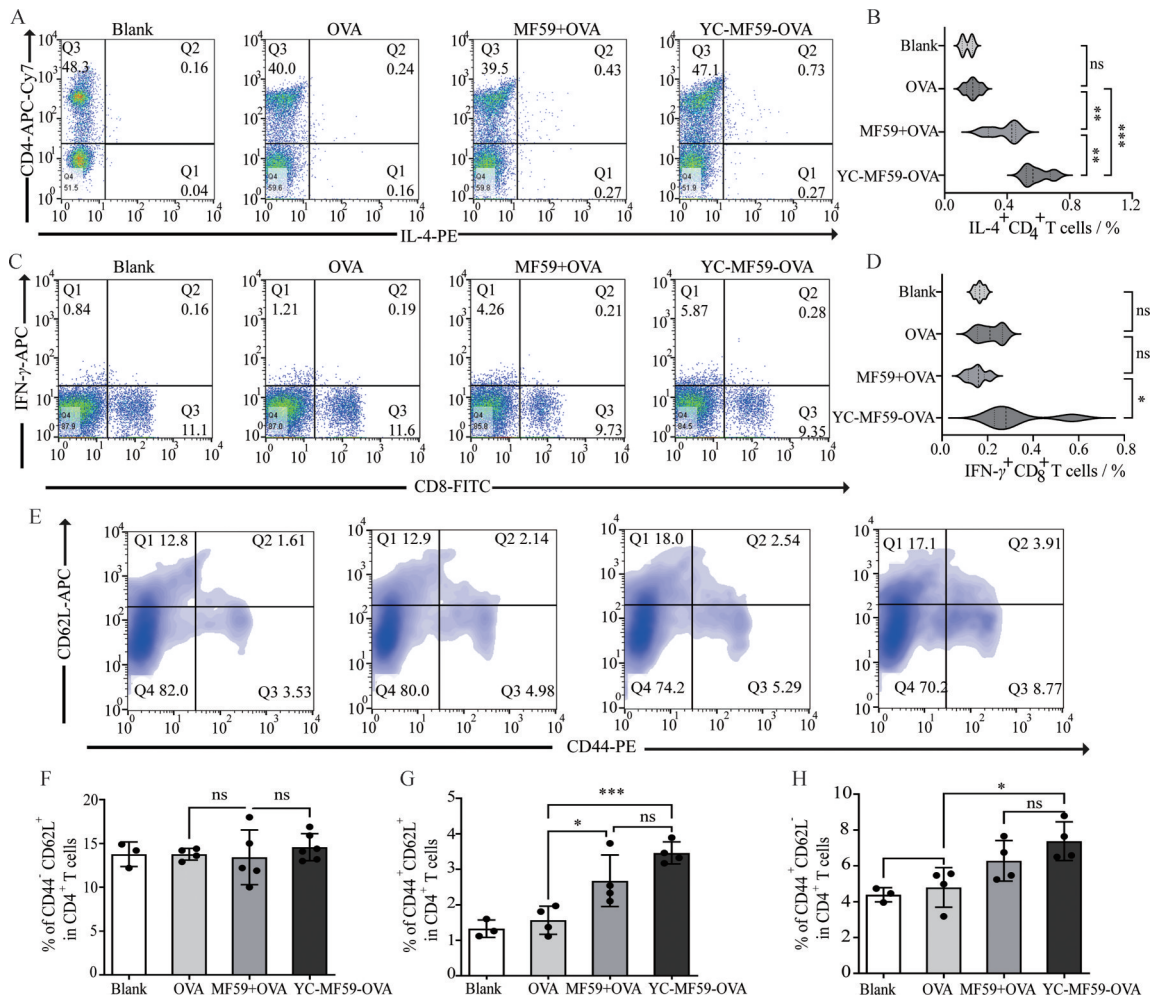


Figure 6 YC-MF59-OVA vaccine has elicited a robust cellular immune response. A: Representative fluorescence-activated cell sorting (FACS) plots of the expression of IL-4 on CD4⁺ T cells in spleen; B: Proportion of IL-4⁺ CD4⁺ T cells; C: Representative FACS plots of the expression of IFN-γ on CD8⁺ T cells in spleen; D: Proportion of IFN-γ⁺ CD8⁺ T cells; E: Representative FACS plots of the expression of CD44 and CD62L in splenic OVA-stimulated T cells; F - H: The percentage of CD44⁺ CD62L⁺ (left), CD44⁺ CD62L⁻ (middle), and CD44⁻ CD62L⁺ (right) at day 35 post-immunisation with YC-MF59-OVA. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

负责构思项目、设计实验和完成主要研究和撰写文章。

利益冲突: 作者声明本论文没有任何利益冲突。

References

- [1] O'Hagan DT, van der Most R, Lodaya RN, et al. Author correction: "World in motion"-emulsion adjuvants rising to meet the pandemic challenges [J]. NPJ Vaccines, 2021, 6: 158.
- [2] Song SY, Qiao M, Yang J, et al. Dual-functional emulsifier based nano-emulsion adjuvant effectively enhanced immunogenicity of recombinant respiratory syncytial virus vaccine in mice [J]. J Drug Deliv Sci Tec, 2024, 100: 106098.
- [3] Zhao Q, Chen FM, Lai Y, et al. Advances of metal nanoadjuvant for cancer immunotherapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 2311-2319.
- [4] Xia YF, Wu J, Wei W, et al. Exploiting the pliability and lateral mobility of Pickering emulsion for enhanced vaccination [J]. Nat Mater, 2018, 17: 187-197.
- [5] Yang Y, Wang HY, Sun Y, et al. Advances in the study of nano-biomimetic tumor vaccines [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 963-975.
- [6] Sabu C, Mufeedha P, Pramod K. Yeast-inspired drug delivery: biotechnology meets bioengineering and synthetic biology [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2019, 16: 27-41.
- [7] Ko EJ, Kang SM. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines [J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14: 3041-3045.
- [8] Davoodi P, Srinivasan MP, Wang CH, et al. Synthesis of intracellular reduction-sensitive amphiphilic polyethyleneimine and poly (ϵ -caprolactone) graft copolymer for on-demand release of doxorubicin and p53 plasmid DNA [J]. Acta Biomater, 2016, 39: 79-93.
- [9] Zhang XJ, Xu XQ, Chen YD, et al. Bioinspired yeast microcapsules loaded with self-assembled nanotherapies for

- targeted treatment of cardiovascular disease [J]. *Mater Today*, 2017, 6: 301-313.
- [10] Chen ZJ, Hao XY, Wang HR. Smart combination of aluminum hydroxide and MF59 to induce strong cellular immune responses [J]. *J Control Release*, 2022, 349: 699-711.
- [11] Xie JH, Guo L, Ruan YY. Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391: 958-962.
- [12] Wang JQ, Jin XM, Yan SH. Yeast β -glucan promotes antiviral type I interferon response *via* dectin-1 [J]. *Vet Microbiol*, 2024, 295: 110107.
- [13] Horneck Johnston CJH, Ledwith AE, Lundahl MLE, et al. Recognition of yeast β -glucan particles triggers immunometabolic signaling required for trained immunity [J]. *iScience*, 2024, 3: 109030.
- [14] Hino S, Kito A, Yokoshima R, et al. Discharge of solubilized and Dectin-1-reactive β -glucan from macrophage cells phagocytizing insoluble β -glucan particles: involvement of reactive oxygen species (ROS)-driven degradation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421: 329-334.
- [15] Roth GA, Picece VCTM, Ou BS, et al. Designing spatial and temporal control of vaccine responses [J]. *Nat Rev Mater*, 2022, 7: 174-195.
- [16] Chen J, Wang B, Caserto JS, et al. Sustained delivery of SARS-CoV-2 RBD subunit vaccine using a high affinity injectable hydrogel scaffold [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11: e2101714.
- [17] Pulendran B, S Arunachalam P, O'Hagan DT. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 454-475.
- [18] Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo* [J]. *Science*, 2007, 315: 107-111.
- [19] Nouri A, Laraba-Djebari F. Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against *Androctonus australis hector* envenomation using safe antigens: comparative role of MF59 and Alum adjuvants [J]. *Vaccine*, 2015, 43: 5756-5763.
- [20] He LY, Zhu ZC, Qi CJ. β -Glucan-a promising immunocyte-targeting drug delivery vehicle: superiority, applications and future prospects [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 339: 122252.
- [21] Nazeri S, Zakeri S, Mehrizi AA, et al. Measuring of IgG2c isotype instead of IgG2a in immunized C57BL/6 mice with *Plasmodium vivax* TRAP as a subunit vaccine candidate in order to correct interpretation of Th1 *versus* Th2 immune response [J]. *Exp Parasitol*, 2020, 216: 107944.
- [22] Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, et al. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9: e3321.