专论 Perspectives

微针在流感疫苗接种中的研究进展

曾勇年，王陈媛，张 雯，黎 威*

（武汉大学药学院，组合生物合成与新药发现教育部重点实验室，湖北武汉 430071）

摘要：流感对全球公共卫生安全造成了严重的威胁，接种流感疫苗是预防和控制流感蔓延的有效方法。传统的流感疫苗接种方式主要以肌内注射为主，由于受到诸多限制，如需要医护人员操作、注射产生疼痛、患者依从性低等，导致流感疫苗接种率低和疫苗有效性不足。微针是一种新型的经皮给药方法，具有安全无痛、可自主给药、提高患者依从性、避免交叉感染、成本低廉等优点，而且皮肤含有丰富的抗原呈递细胞，尤其是朗格汉斯细胞，使皮肤成为接种流感疫苗的理想位置。因此，微针经皮递送流感疫苗作为肌内注射流感疫苗的一种良好替代接种途径，具有重要的应用潜能。本研究首先归纳了用于皮下递送流感疫苗的微针类型，然后分析了流感疫苗的微针装载策略。最后，对微针递送流感疫苗的未来研究方向进行了展望，为其进一步开发和应用提供参考。

关键词：流感疫苗；微针；经皮免疫；透皮给药

中图分类号：R944.9 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-8255 (2022) 08-1081-10

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.001



【专家介绍】黎威，现任武汉大学药学院教授、博士生导师，国家级海外高层次人才、武汉英才，主持 1 项国家自然科学基金和 1 项湖北省自然科学基金。黎威教授长期从事药物递送与缓控释领域的研究。近 5 年来，在药学领域国际主流期刊发表研究论文 24 篇，其中以第一作者或通信作者身份发表 14 篇（其中在《Nature Biomedical Engineering》《Nature Reviews Materials》《Science Advances》上各发表了 1 篇，在《Journal of Controlled Release》上发表了 2 篇），相关研究成果被全球 59 家媒体报道。现担任武汉药学会药物分析与评价专业委员会的副主任委员，担任药学领域学术期刊《Acta Materia Medica》《Exploration》的青年编委，同时也是《International Journal of Molecular Sciences》《Frontiers in Microbiology》的客座主编，并受邀担任《Science Advances》《Advanced Functional Materials》《Advanced Healthcare Materials》等多个学术期刊审稿人。

Research Progress of Microneedles in Influenza Vaccination

ZENG Yongnian, WANG Chenyuan, ZHANG Wen, LI Wei*

(*Lab. of Combinatorial Biosynthesis and New Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071*)

ABSTRACT: Influenza has posed a severe threat to global public health security, and vaccination is an effective way to prevent and control the spread of influenza. Influenza vaccines are usually intramuscularly injected. There are many constraints imposed on this traditional vaccination method, such as the need for medical personnel, pain caused by the injection, and low patient compliance, leading to a low rate of influenza vaccination and inadequate vaccine effectiveness. Microneedle is a new transdermal drug delivery method that shows excellent superiority in delivering influenza vaccines for its advantages of delivering drugs without pain, enabling self-administration, improving patient compliance, avoiding cross-infection, and causing low cost. Besides the fact that skin has many antigen-presenting cells, especially Langerhans cells, that makes skin an ideal place to get vaccinated against influenza. Therefore, transdermal delivery of vaccines by microneedles can be an excellent alternative to traditional intramuscular injection and has a great potential application. In this review, the types of microneedles utilized to deliver influenza vaccines are summarized, the strategies used to load influenza vaccines into microneedles are analyzed, and future research perspectives are included in order to provide some references for further development and application of microneedles for transdermal delivery of influenza vaccines.

Key Words: influenza vaccine; microneedle; percutaneous immunization; transdermal delivery

流行性感冒（简称流感）是一类由流感病毒引起的呼吸道传染疾病，极易在学校、养老院等人口密集性场所内广泛传播[1]。流感病毒属于RNA病毒，常见甲、乙、丙3种血清型可导致人类感染，其中甲乙2种类型的病毒有8个独立遗传片段，编码10种以上的蛋白质，易发生变异并在人群中广泛传播，并且每年会导致季节性流行[2—4]。据报道，每年由流感病毒引发的季节性流感将导致全球3万～500万例重症病例以及29万～65万例流感并发症死亡病例，造成了严重的经济负担[5—6]。接种流感疫苗可预防和控制流感及其相关并发症、提高群体免疫力、降低全球发病率和死亡率，是防控流感的最佳方法。目前，流感疫苗的接种方式分为肌内注射、皮下注射和皮内注射（图1）[7]。其中，肌内注射是接种流感疫苗的最常用方式。然而，肌内注射不仅需要接受过专业培训的医务人员操作，还易引起剧烈疼痛，大幅降低了患者的依从性。此外，使用后的注射用具回收难度大，如处理不当还会带来因刺伤导致的其他血液性疾病传播的风险。皮肤作为人体的最大器官，是人体抵御外来病原体的第一道防线，主要由表皮层、真皮层及皮下组织三部分组成[8]。由于人皮肤（主要在表皮层）中含有丰富的如朗格汉斯细胞、树突状细胞等抗原呈递细胞，可将抗原呈递给T细胞和B细胞，引起免疫应答反应[9—10]，因此皮肤是一个理想的疫苗接种位置。微针（microneedles，MNs）由于独特的性质（针体足够长，使微针可顺利刺透皮肤角质层；针体又足够短，使微针恰好到达皮肤表皮层），在递送流感疫苗方面具有重要的应用潜能。

自1976年GERSTEL等首次提出微针透皮给药这一概念后[11]，为了克服传统肌内注射疫苗的局限性，以微针技术为基础的流感疫苗接种逐渐引起了科学家的广泛关注。微针阵列由数十甚至数百根微米级长度的针状凸起组成，针体长度为50～900 μm[12]，针体部分含有流感疫苗，经按压后微

收稿日期：2022-03-23

作者简介：曾勇年(1995—)，女，博士研究生，专业方向：基于微针的药物递送。

通信作者：黎　威(1986—)，男，教授，博士生导师，从事基于微针的药物递送与缓释系统研究。

E-mail：weili.mn@whu.edu.cn

针阵列可穿过皮肤角质层在皮下形成有序的微小孔道，促进疫苗的精准递送[13]。利用微针接种流感疫苗不仅可实现自主给药，简化接种流程，还能将疫苗精准递送到有丰富抗原呈递细胞的皮肤组织，在提高疫苗利用率的同时减小疫苗的使用剂量，达到更高的免疫效果；其次，微针经皮免疫过程不会刺激到真皮组织中的神经末梢和毛细血管丛，减轻甚至消除了患者在接种过程中的疼痛感[14—16]，提高了依从性，尤其是针头恐惧者和儿童患者；同时，使用微针技术递送流感疫苗，能大幅降低接种成本，如交通成本、医护人员成本等；最后，微针接种流感疫苗后的医疗废物回收更方便，可减少由意外刺伤引起的相关血液性疾病的传播。此外，多项研究表明，微针接种疫苗比传统的肌内接种疫苗能产生更强的免疫反应[17—19]。因此，利用微针技术接种流感疫苗是一种更佳的接种手段。

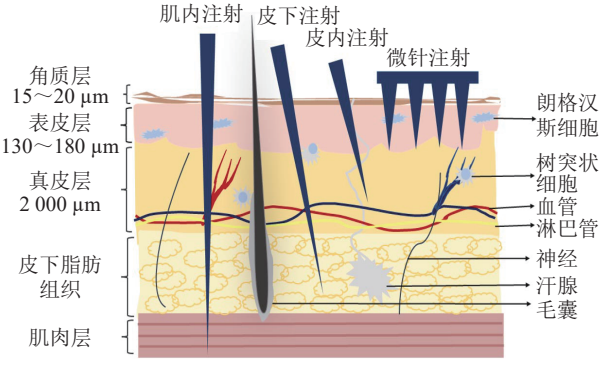


图 1 微针和常规方式递送疫苗到人体内的示意图

Fig.1 Schematic Diagram of Delivery of Vaccines to Human Bodies via Microneedles and Conventional Methods

1 用于递送流感疫苗的微针类型

微针作为一种新型的流感疫苗递送体系，具有运输便捷、微创无痛、可自主给药等优势。目前已开发了众多用于递送流感疫苗的微针，包括固体涂层微针、可溶性微针和空心微针。

1.1 固体涂层微针接种流感疫苗

固体涂层微针的针体通常由金属、硅、聚合物等加工而成，可作为皮肤预处理的穿刺工具和药物载体[20—21]，通过“浸渍法”或“喷涂法”可将药物溶液有效包覆在固体微针表面[22—26]。当针尖插入皮肤，微针表面的药物会快速进入组织发挥作用[12]。在过去的研究中，固体涂层微针常作为载体递送流感疫苗，如金属固体微针是较常见的疫苗载体。通过电解抛光法制备的金属微针可涂布甲型 H1N1 流感疫苗，小鼠接种后对致命的流感病毒表现出完全的防御作用[27]。QUAN 等将海藻糖掺杂到微针涂层的配方中，进一步提高了疫苗稳定性[28]。此外，对金属微针表面进行纳米修饰可有效改善亲水性，增强疫苗和微针表面的结合力，从而显著提高微针中疫苗的负载量[29]。除了金属固体微针，丝素蛋白固体微针也被用于流感疫苗的递送。STINSON 等证明丝素蛋白固体微针可在高温下有效保护生物大分子，并在小鼠模型上验证了具有流感疫苗涂层的丝素蛋白固体微针的免疫能力[30]。图 2 显示了疫苗溶液涂布于丝素蛋白固体微针表面的过程。

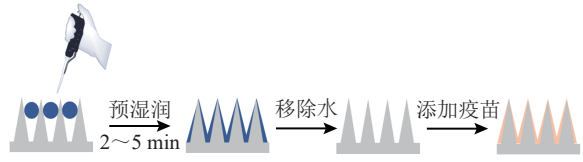


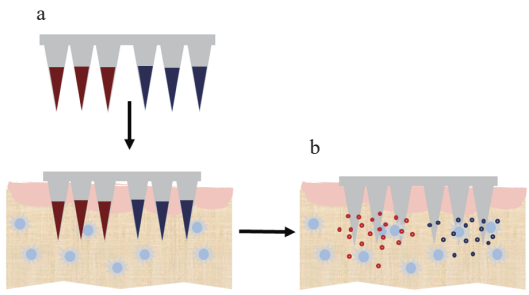
图 2 流感疫苗涂层的丝素蛋白固体微针的制备流程

Fig.2 Fabrication Process of Silk Fibroin Solid Microneedles Coated with Influenza Vaccines

固体微针不仅能递送单一的疫苗，还可将多种疫苗同时递送到皮肤组织中，JEONG 等利用聚乳酸制备了隔室微针阵列（compartmental microneedle array，CMA）用于 2 种乙型流感疫苗的单次递送[31]。CMA 由 2 个独立隔室组成，如图 3 所示，分别涂有乙型 B/Y 流感疫苗和乙型 B/V 流感疫苗。小鼠体内研究表明，与传统的肌内注射相比，采用 CMA 接种的小鼠表现出更好的免疫应答能力和更高的存活率。

1.2 空心微针接种流感疫苗

空心微针是一种微米级的注射针，结合了传统皮下注射和透皮给药的特点，同时有无痛、便于自我操作等优势[32]。空心微针插入皮肤后为药



a：乙型 B/Y 和乙型 B/V 流感疫苗通过 CMA 递送到皮层，b：2 种单价疫苗分别诱导皮层的免疫反应

图 3　CMA 单次递送 2 种 B 型抗原的示意图

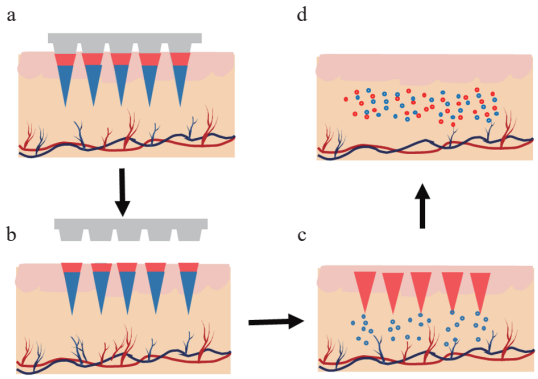
Fig.3　Schematic Diagram of CMA Delivering Two Types B Antigens in a Single Delivery

物递送到皮下提供了输送管道，再通过连接注射器、微泵等液体输送驱动装置，可将药物递送到皮下[8,33]。空心微针作为传统皮下注射针的替代品已被广泛应用到流感疫苗递送领域。2011 年，美国 FDA 批准法国赛诺菲巴斯德（Sanofi Pasteur）公司的 Fluzone® 皮下流感疫苗上市，这是美国批准的首个皮下递送流感疫苗的新型微注射系统。通过大量免疫原性和安全性的数据证明，能实现主动免疫的 Fluzone® 皮下流感疫苗中抗原含量（9 μg）比传统肌内注射含量（15 μg）低。临床试验评估表明，相比于肌内注射接种疫苗，受试者对皮下微注射系统的接受度更高[34—35]。LEVIN 等开发了一种空心微针 MicronJet™（以色列 NanoPass Technologies 公司）用于皮下注射流感疫苗[36]。该微针进一步降低了皮下注射流感疫苗所需的抗原含量（3 μg），与传统注射器皮下注射等量甲型 H1N1 流感疫苗（Mantoux technique）或肌内注射甲型 H3N2 流感疫苗（15 μg）相比，受试者表现出更高的免疫水平[37—38]。

1.3　可溶性微针接种流感疫苗

可溶性微针由可生物降解的聚合物制备而成，如聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、透明质酸（HA）等聚合物[15,39]。在可溶性微针的制备过程中，将药物与聚合物混合填入微针模具中即可实现微针中药物的快速装载。可溶性微针插入皮肤后，微针的聚合物基质通过吸收组织间质液溶解，从而快速释放出被封装的药物。与固体微针和空心微针相比，可溶性微针的针尖可完全溶解在皮肤中，没有利器残留，减少了环境污染[12,40]；且制备过程相对简单，载药量大，能有效改善微针药物负载量小的问题，被广泛用于疫苗的递送。2010 年，SULLIVAN 等将流感疫苗封装在以 PVP 为基质的可溶性微针中，并通过试验证实同等剂量的可溶性微针疫苗诱导的保护性免疫反应优于肌内注射获得的免疫反应[41]。2017 年该团队报道的用于皮下递送流感疫苗的可溶性微针已顺利完成了Ⅰ期临床试验[42]。试验结果显示，可溶性微针皮下接种流感疫苗表现出良好的耐受性和更强的免疫原性。随后又对不同的可溶性微针基质配方进行了筛选，结果显示流感疫苗在以精氨酸（arginine）/ 七葡萄糖酸盐（heptagluconate）基质为配方的微针中稳定性良好，可在室温下长期贮存。通过小鼠的体内免疫反应试验证明，该微针装载的流感疫苗在 25 ℃贮存 1 年后仍能保持活性，暴露在 60 ℃条件下 4 个月、经多次冻融循环或电子束照射后活性仍未丧失[43]。此外，CHOI 等也构建了一种新型可溶性微针用于流感疫苗递送[44]。该微针由聚己内酯（PCL）基座和 HA 针尖组成，针尖部分用于封装流感疫苗。针尖在插入皮肤后能与 PCL 基座快速分离，使疫苗停留在体内（图 4）。封装在针体中的疫苗在 50 ℃环境中保存 3 周后仍有活性，而相同条件下保存的液体疫苗的活性已完全丧失。豚鼠在通过该微针接种流感疫苗 8 d 后，体内病毒完全消失。

相关研究表明壳聚糖或丝素蛋白等生物材料制备的微针能在皮肤中持续释放抗原 10 d 以上[45—46]。2021 年，STINSON 等利用丝素蛋白优良的生物性能制备了一种负载流感疫苗的可溶性微针，经皮给药后抗原能在体内释放 1 ～ 2 周[47]。与肌内注射流感疫苗相比，通过微针单次接种流感疫苗具有更持久的血凝抑制（hemagglutination inhibition，HAI）滴度、更快的血清转化率及对致命流感攻击更高的保护功效。KIM 等将含有冻干灭活甲型 H1N1 流感疫苗和 PVP 的无水有机溶剂（氯仿）加入模具中制备了一种可溶性微针（图 5）[48]。试验表明该流感疫苗微针可在 40 ℃保存 12 周，并在没有其他稳定剂和佐剂的情况下使小鼠产生了强烈的免疫反应。



a：微针插入皮肤，b：微针基座与针尖快速分离，针尖植入皮肤内，c：封装疫苗的针尖溶解，d：针尖完全溶解，释放出疫苗

图 4 可溶性微针的工作原理示意图

Fig.4 Schematic Diagram of the Working Principle of Soluble Microneedles

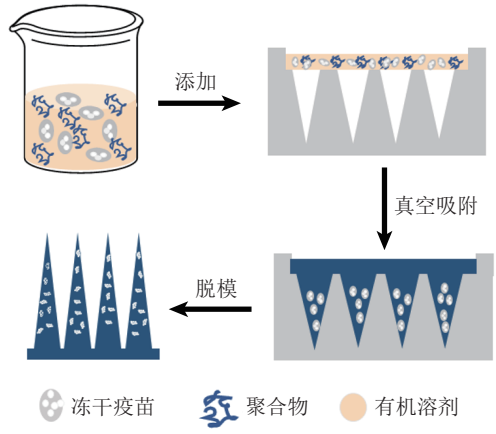


图 5 制备可溶性微针的示意图

Fig.5 Schematic Diagram of Fabrication of Soluble Microneedles

针对目前疫苗接种无法充分诱导 65 岁以上人群对流感病毒产生免疫反应的问题，VASSILIEVA 等报道了一种环磷酸腺苷酸（cGAMP）/ 皂素 / 流感疫苗可溶性微针，接种后可使老年小鼠完全免受流感攻击[49]。2022 年，TIAN 等也报道了一种能在 37 ℃贮存 4 周且保持良好机械性能和强大免疫反应的可溶性微针贴片，用该微针接种流感疫苗的小鼠能产生与经肌内注射接种的小鼠相似的免疫反应[50]。

2 微针接种流感疫苗的策略

2.1 微针与聚合物纳米粒结合

近年来，天然或合成高分子制备的聚合物纳米粒常被用作疫苗佐剂，如壳聚糖、HA、支链淀粉、聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物（PLGA）等[51—59]。聚合物纳米粒具有生物相容性好、无毒、可生物降解、形状和尺寸可控的优势，作为疫苗佐剂还能保护抗原免受酶降解、提高机体免疫能力。2013 年，ZARIC 等将流感抗原封装到 PLGA 纳米粒中制备了一种可溶性载药微针阵列，该阵列可将抗原靶向递送到皮肤内的特异性抗原呈递细胞，从而提高疫苗的免疫原性并延长疫苗在皮肤中的保留时间[60]。2017 年，SHIN 等用酵母 β- 葡聚糖作为流感疫苗佐剂，与流感抗原同时涂布到不锈钢微针上[61]。结果表明，用酵母 β- 葡聚糖作为佐剂的流感疫苗微针比单独使用流感疫苗产生的抗原免疫原性更强。同年，SEOK 等制备了一种表面有 PLGA/ 聚乙烯亚胺（PEI）纳米粒涂层的微针，纳米粒中装载有流感疫苗 pH1N1 复合物[62]。试验结果表明，与表面涂有裸流感抗原的微针接种以及传统的肌内注射接种相比，用该纳米粒涂层微针进行皮下疫苗接种可在小鼠体内诱导更强的体液免疫反应。BRAZ 等报道采用一种快速溶解型微针递送抗原的缓释聚合物纳米粒，可达到经皮免疫的效果[63]。主要原理是将可溶性微针插入表皮层，使之接触组织间隙液后迅速溶解，释放出负载流感抗原（M2）的聚合物纳米粒，再随着聚合物纳米粒的降解逐渐释放 M2 抗原，使机体产生免疫应答反应。而且，小鼠经该微针接种后，皮肤上只短暂形成了微孔，移除微针贴片后不久这些微孔就开始闭合，因此没有对小鼠皮肤造成不良影响，再次证明微针接种流感疫苗具有良好的生物安全性。

2.2 微针与纳米乳结合

纳米乳是 2 种互不相溶的液体形成的澄清透明或半透明体系，通常包括 w/o 型和 o/w 型 2 种类型[64]。纳米乳制备工艺简单、生物相容性好、稳定性强、能提高药物的溶解性，常被用作新型的药物载体[65—66]。微针给药时在皮肤上形成的微孔可促进纳米乳的皮肤渗透性，提高药物生物利用度，确保药物精准递送。YU 等报道了一种微针辅助 MF59 流感疫苗纳米乳透皮免疫的策略，体内试验

表明经微针预处理后皮肤接受 MF59 流感疫苗所引起的血凝抑制效果明显强于未经微针预处理组，表现出更强的免疫原性[67]。

2.3 微针与病毒样颗粒（virus-like particles，VLPs）结合

VLPs 是一种不含病毒核酸的纳米空壳结构，没有病毒的基因组和复制机制，仅保留了病毒的高免疫原性，其形态结构与天然病毒颗粒相似。VLPs 是一种安全性较高的疫苗替代物，能刺激机体产生体液免疫和细胞免疫。2010 年，QUAN 等开发了一种流感 VLPs（A/PR/8/34 H1N1 VLPs）微针[68]。研究表明，使用该微针进行的低剂量（0.3 μg）A/PR/8/34 H1N1 VLPs 疫苗接种不仅比低剂量肌内注射疫苗接种具有高的免疫原性，还能完全预防 A/PR/8/34 病毒的感染。此外，低剂量（0.3 μg）微针接种还能达到与高剂量（1 μg）肌内注射接种相似的免疫原性。PEARTON 等利用微针递送 H1N1 流感 VLPs 疫苗到离体人体皮肤中[69]，结果显示，微针给药后皮肤中的树突状细胞迁移更明显。2019 年，KIM 等报道了一种用人流感裂解疫苗和异源 M2e5x VLPs 制备的涂层微针[70]。利用该微针将流感裂解疫苗和 M2e5x VLP 共递送至皮肤后，机体可抵抗不同类型的异亚型流感病毒的攻击。与肌内注射相比，利用该微针递送疫苗可使机体产生更多的 IgG2a 抗体以及在黏膜和全身产生更多的 γ 干扰素（IFN-γ）。

2.4 微针与流感血凝素结合

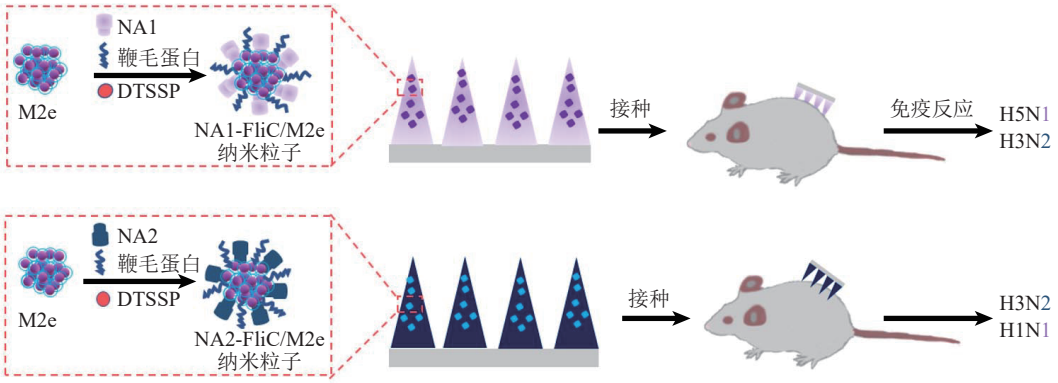
血凝素（hemagglutinin）是流感病毒株的主要表面蛋白之一，具有免疫原性，可诱导机体产生体液免疫及细胞免疫，因此，血凝素基因工程疫苗具有广阔的应用前景。KIM 等研发了一种 A/PR8 流感血凝素和 A/PR8 灭活病毒疫苗的涂层微针[71]。试验表明，利用该微针接种后机体不仅可针对 A/PR8 流感产生强大的抗体反应，还可针对小鼠甲型 H1N1 大流行性流感产生强大的异源抗体反应。HIROBE 等报道了一种含有 15 μg 三价流感血凝素疫苗的可溶性微针，通过 BALB/c 小鼠试验证明，相同剂量的微针经皮免疫组与皮下注射组可对 2 种流感病毒（A/H1N1 和 A/H3N2）产生相同的免疫应答反应[72]。SCHEPENS 等开发了一种含有重组流感血凝素（pH1N1 HA）的空心微针，该微针平均孔径为 80 nm[73]。与肌内注射免疫相比，使用该微针对小鼠进行皮下 pH1N1 HA 疫苗接种后可使小鼠产生更高水平的特异性抗体。

2.5 微针与蛋白质纳米粒结合

蛋白质是一类两亲性的天然分子，其疏水域能与许多疏水性药物相互作用，因此被认为是制备纳米粒的理想材料[74—75]。天然蛋白质纳米粒具有可生物降解、高生物相容性、低免疫原性等优点。此外，它们的制备条件温和，无需使用有毒溶剂。近几十年来，蛋白质纳米粒已成为了一种备受欢迎的药物载体。DENG 等将核蛋白 - 甲型流感 M2 蛋白层状纳米粒（NPep nano-4M2e）加入到聚乙烯醇（PVA）和蔗糖的混合溶液中，制备成负载双层肽纳米粒的可溶性微针贴片，利用该微针免疫接种后能在小鼠体内引发强大的保护性免疫反应[76]。WANG 等合成了交联流感抗原和鞭毛蛋白的蛋白质纳米粒，能保留鞭毛蛋白的固有信号活性并显著增加体外抗原摄取和促进树突状细胞成熟，将其掺入可溶性微针中用于小鼠经皮疫苗接种（图 6）[77]。结果表明，该微针能将载有流感疫苗的蛋白纳米粒有效递送至抗原呈递细胞，诱导产生 B 细胞及流感特异性抗体或诱发细胞反应，有效保护小鼠免受同源和异亚型流感病毒的感染。

3 结论与展望

微针经皮免疫是一种优异的疫苗接种方式，通过微针接种可将疫苗递送至含有丰富抗原呈递细胞的表皮层，产生比肌内注射更有效的免疫反应。另外，微针的应用降低了疫苗的运输成本、减少了对专业医护人员的依赖、提高了患者的依从性。因此，通过微针进行皮下接种流感疫苗，有望为流感大流行期间的大规模免疫提供高效、便捷的解决手段。研究者已利用固体涂层微针、空心微针及可溶性微针，并采用不同的策略装载流感疫苗，开发出一系列基于微针技术的流感疫苗递送体系，取得了良好的免疫效果。



M2e：蛋白编码基因 M2e；NA1：神经氨酸酶 1；FliC：鞭毛蛋白；NA2：神经氨酸酶 2；DTSSP：3,3'- 二硫代双（磺酸琥珀酰亚氨基丙酸酯）；H5N1：甲型流感病毒 H5N1；H3N2：甲型流感病毒 H3N2；H1N1：甲型流感病毒 H1N1

图 6 可溶性微针装载含有流感抗原的蛋白质纳米粒的经皮免疫策略

Fig.6 Percutaneous Immunization Strategy of Soluble Microneedles Loaded with Protein Nanoparticles Containing Influenza Antigens

虽然微针在流感疫苗递送方面取得了巨大成功，但仍存在一些困难和挑战。第一，尽管微针可通过结构设计和工艺优化较好地控制疫苗装载剂量、提高疫苗的递送效率，但由于生物大分子的稳定性较差，且绝大多数疫苗均由水溶性微针来装载，通过微针在皮下的迅速溶解来快速释放流感疫苗，因此，较难实现通过缓释材料来装载和控制疫苗释放以达到更强的免疫效果；第二，使用的疫苗需要无菌且不耐高温，而微针的生产工艺又较为复杂，这将会给大规模生产疫苗微针带来一定的困难；第三，由于个体皮肤的差异性（水分、年龄、性别、病理状况等），需要对微针进行合理设计，使之具有足够强的机械性能来克服这些差异，使微针顺利穿透皮肤并引起良好的免疫应答反应，这也是微针工业化生产及临床转化的关键。尽管利用微针经皮递送流感疫苗存在上述问题，但由于微针本身独特的优势，相信在不久的将来，研究者们将能开发出安全有效的微针递送体系，使人们可通过自主操作的方式来使用微针进行皮下接种流感疫苗。

参考文献：

[1] 国家免疫规划技术工作组流感疫苗工作组. 中国流感疫苗预防接种技术指南(2019—2020)[J]. 中华预防医学杂志, 2020, **54**(1): 21-36.

[2] KOUTSONANOS D G, COMPANS R W, SKOUNTZOU I. Targeting the skin for microneedle delivery of influenza vaccine [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, **785**: 121-132.

[3] SKOUNTZOU I, KOUTSONANOS D G, KIM J H, *et al*. Immunity to pre-1950 H1N1 influenza viruses confers cross-protection against the pandemic swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus [J]. *J Immunol*, 2010, **185**(3): 1642-1649.

[4] 于 琨, 安丽平, 王 伟, 等. 流感疫苗的研究进展 [J]. 现代预防医学, 2017, **44**(14): 2644-2646.

[5] IULIANO A D, ROGUSKI K M, CHANG H H, *et al*. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study [J]. *Lancet*, 2018, **391**(10127): 1285-1300.

[6] NUWARDA R F, ALHARBI A A, KAYSER V. An overview of influenza viruses and vaccines [J]. *Vaccines* (Basel), 2021, **9**(9): 1032.

[7] LEONE M, MÖNKÄRE J, BOUWSTRA J A, *et al*. Dissolving microneedle patches for dermal vaccination [J]. *Pharm Res*, 2017, **34**(11): 2223-2240.

[8] KIM Y C, PARK J H, PRAUSNITZ M R. Microneedles for drug and vaccine delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, **64**(14): 1547-1568.

[9] 李明辉, 邱玉琴, 杨国忠, 等. 流感病毒灭活疫苗可溶性微针制备及评价[J]. 免疫学杂志, 2017, **33**(6): 477-481.

[10] 严琴英, 翁嘉绮, 张正晗, 等. 疫苗皮内接种技术的研究进

展[J]. 中国现代应用药学, 2019, **36**(17): 2228-2235.

[11] GERSTEL M S, PLACE V A. Drug delivery device: US, 3964482A [P]. 1976-06-22.

[12] MENON I, BAGWE P, GOMES K B, *et al*. Microneedles: a new generation vaccine delivery system [J]. *Micromachines* (Basel), 2021, **12**(4): 435.

[13] 周逸轩, 金银秀, 蒋旻昀, 等. 微针与新型经皮给药载体结合的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, **37**(17): 2170-2176.

[14] 陈明龙, 杨　丹, 孙　颖, 等. 可溶微针在经皮药物递送领域的研究进展[J]. 药学进展, 2020, **44**(5): 324-331.

[15] 李锐婷, 李丽云, 孙文强, 等. 可溶性微针的研究进展[J]. 药学进展, 2021, **45**(6): 460-466.

[16] 魏　微, 赵　锋, 马银玲, 等. 微针在皮肤癌治疗方面的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(9): 1154-1160.

[17] ROUPHAEL N G, LAI L L, TANDON S, *et al*. Immunologic mechanisms of seasonal influenza vaccination administered by microneedle patch from a randomized phase Ⅰ trial [J]. *NPJ Vaccines*, 2021, **6**(1): 89.

[18] LIU Y, YE L, LIN F, *et al*. Intradermal immunization by Ebola virus GP subunit vaccines using microneedle patches protects mice against lethal EBOV challenge [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 11193.

[19] NG H I, TUONG Z K, FERNANDO G J P, *et al*. Microprojection arrays applied to skin generate mechanical stress, induce an inflammatory transcriptome and cell death, and improve vaccine-induced immune responses [J]. *NPJ Vaccines*, 2019, **4**: 41.

[20] BHATNAGAR S, GADEELA P R, THATHIREDDY P, *et al*. Microneedle-based drug delivery: materials of construction [J]. *J Chem Sci*, 2019, **131**(9): 1-28.

[21] 张振波, 房德敏. 微针技术在经皮给药系统的研究进展[J]. 天津药学, 2018, **30**(6): 40-43.

[22] CHEN Y, CHEN B Z, WANG Q L, *et al*. Fabrication of coated polymer microneedles for transdermal drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, **265**: 14-21.

[23] LIANG L, ZHAO Z Q, CHEN Y, *et al*. Some attempts to increase the amount of drug coated onto the microneedles [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, **67**: 102986.

[24] MCGRATH M G, VRDOLJAK A, O'MAHONY C, *et al*. Determination of parameters for successful spray coating of silicon microneedle arrays [J]. *Int J Pharm*, 2011, **415**(1/2): 140-149.

[25] VRDOLJAK A, MCGRATH M G, CAREY J B, *et al*. Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines [J]. *J Control Release*, 2012, **159**(1): 34-42.

[26] TORT S, MUTLU AGARDAN N B, HAN D, *et al*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of microneedles coated with electrosprayed micro/nanoparticles for medical skin treatments [J]. *J Microencapsul*, 2020, **37**(7): 517-527.

[27] ZHU Q Y, ZARNITSYN V G, YE L, *et al*. Immunization by vaccine-coated microneedle arrays protects against lethal influenza virus challenge [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(19): 7968-7973.

[28] QUAN F S, KIM Y C, YOO D G, *et al*. Stabilization of influenza vaccine enhances protection by microneedle delivery in the mouse skin [J]. *PLoS One*, 2009, **4**(9): e7152.

[29] DUONG H T T, KIM N W, THAMBI T, *et al*. Microneedle arrays coated with charge reversal pH-sensitive copolymers improve antigen presenting cells-homing DNA vaccine delivery and immune responses [J]. *J Control Release*, 2018, **269**: 225-234.

[30] STINSON J A, RAJA W K, LEE S, *et al*. Silk fibroin microneedles for transdermal vaccine delivery [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, **3**(3): 360-369.

[31] JEONG H R, BAE J Y, PARK J H, *et al*. Preclinical study of influenza bivalent vaccine delivered with a two compartmental microneedle array [J]. *J Control Release*, 2020, **324**: 280-288.

[32] LEE J W, PRAUSNITZ M R. Drug delivery using microneedle patches: not just for skin [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, **15**(6): 541-543.

[33] 田　霞, 王　宁, 丁江生. 空心微针透皮给药技术的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2021, **30**(2): 119-124.

[34] ANSALDI F, DE FLORENTIIS D, DURANDO P, *et al*. Fluzone® Intradermal vaccine: a promising new chance to increase the acceptability of influenza vaccination in adults [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2014, **11**(1): 17-25.

[35] ROBERTSON C A, DIAZGRANADOS C A, DECKER M D, *et al*. Fluzone® high-dose influenza vaccine [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, **15**(12): 1495-1505.

[36] LEVIN Y, KOCHBA E, KENNEY R. Clinical evaluation of a novel microneedle device for intradermal delivery of an influenza vaccine: are all delivery methods the same? [J]. *Vaccine*, 2014, **32**(34): 4249-4252.

[37] KÜNZI V, KLAP J M, SEIBERLING M K, *et al*.

Immunogenicity and safety of low dose virosomal adjuvanted influenza vaccine administered intradermally compared to intramuscular full dose administration [J]. *Vaccine*, 2009, **27**(27): 3561-3567.

[38] VAN DAMME P, OOSTERHUIS-KAFEJA F, VAN DER WIELEN M, *et al*. Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults [J]. *Vaccine*, 2009, **27**(3): 454-459.

[39] ZHUANG J, RAO F, WU D M, *et al*. Study on the fabrication and characterization of tip-loaded dissolving microneedles for transdermal drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, **157**: 66-73.

[40] ITA K. Transdermal delivery of drugs with microneedles: strategies and outcomes [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2015, **29**: 16-23.

[41] SULLIVAN S P, KOUTSONANOS D G, DEL PILAR MARTIN M, *et al*. Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination [J]. *Nat Med*, 2010, **16**(8): 915-920.

[42] ROUPHAEL N G, PAINE M, MOSLEY R, *et al*. The safety, immunogenicity, and acceptability of inactivated influenza vaccine delivered by microneedle patch (TIV-MNP 2015): a randomised, partly blinded, placebo-controlled, phase Ⅰ trial [J]. *Lancet*, 2017, **390**(10095): 649-658.

[43] MISTILIS M J, JOYCE J C, ESSER E S, *et al*. Long-term stability of influenza vaccine in a dissolving microneedle patch [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2017, **7**(2): 195-205.

[44] CHOI I J, KANG A, AHN M H, *et al*. Insertion-responsive microneedles for rapid intradermal delivery of canine influenza vaccine [J]. *J Control Release*, 2018, **286**: 460-466.

[45] STINSON J A, PALMER C R, MILLER D P, *et al*. Thin silk fibroin films as a dried format for temperature stabilization of inactivated polio vaccine [J]. *Vaccine*, 2020, **38**(7): 1652-1660.

[46] BOOPATHY A V, MANDAL A, KULP D W, *et al*. Enhancing humoral immunity via sustained-release implantable microneedle patch vaccination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, **116**(33): 16473-16478.

[47] STINSON J A, BOOPATHY A V, CIESLEWICZ B M, *et al*. Enhancing influenza vaccine immunogenicity and efficacy through infection mimicry using silk microneedles [J]. *Vaccine*, 2021, **39**(38): 5410-5421.

[48] KIM Y C, LEE J W, ESSER E S, *et al*. Fabrication of microneedle patches with lyophilized influenza vaccine suspended in organic solvent [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2021, **11**(2): 692-701.

[49] VASSILIEVA E V, LI S, KORNIYCHUK H, *et al*. cGAMP/saponin adjuvant combination improves protective response to influenza vaccination by microneedle patch in an aged mouse model [J]. *Front Immunol*, 2021, **11**: 583251.

[50] TIAN Y, LEE J, VAN DER MAADEN K, *et al*. Intradermal administration of influenza vaccine with trehalose and pullulan-based dissolving microneedle arrays [J]. *J Pharm Sci*, 2022, **111**(4): 1070-1080.

[51] MORAN H B T, TURLEY J L, ANDERSSON M, *et al*. Immunomodulatory properties of chitosan polymers [J]. *Biomaterials*, 2018, **184**: 1-9.

[52] NEVAGI R J, SKWARCZYNSKI M, TOTH I. Polymers for subunit vaccine delivery [J]. *Eur Polym J*, 2019, **114**: 397-410.

[53] BUSSIO J I, MOLINA-PEREA C, GONZÁLEZ-ARAMUNDIZ J V. Hyaluronic acid nanocapsules as a platform for needle-free vaccination [J]. *Pharmaceutics*, 2019, **11**(5): 246.

[54] NASHCHEKINA Y A, RAYDAN M. Noninvasive penetration of 5 nm hyaluronic acid molecules across the epidermal barrier (*in vitro*) and its interaction with human skin cells [J]. *Skin Res Technol*, 2017, **24**(1): 129-134.

[55] LYU C C, YANG X K, YANG J C, *et al*. Role of amylopectin synthesis in *Toxoplasma gondii* and its implication in vaccine development against toxoplasmosis [J]. *Open Biol*, 2021, **11**(6): 200384.

[56] DOLEN Y, GILEADI U, CHEN J L, *et al*. PLGA nanoparticles co-encapsulating NY-ESO-1 peptides and IMM60 induce robust CD8 and CD4 T cell and B cell responses [J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 641703.

[57] DU X R, XUE J P, JIANG M Z, *et al*. A multiepitope peptide, rOmp22, encapsulated in chitosan-PLGA nanoparticles as a candidate vaccine against *Acinetobacter baumannii* infection [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, **16**: 1819-1836.

[58] KOERNER J, HORVATH D, HERRMANN V L, *et al*. PLGA-particle vaccine carrying TLR3/RIG-I ligand riboxxim synergizes with immune checkpoint blockade for effective anti-cancer immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 2935.

[59] ZHANG J, SUN H W, GAO C, *et al*. Development of a chitosan-modified PLGA nanoparticle vaccine for protection against *Escherichia coli* K1 caused meningitis in mice [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, **19**(1): 69.

[60] ZARIC M, LYUBOMSKA O, TOUZELET O, *et al*. Skin dendritic cell targeting via microneedle arrays laden with antigen-encapsulated poly-D,L-lactide-*co*-glycolide nanoparticles induces efficient antitumor and antiviral immune responses [J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(3): 2042-2055.

[61] SHIN J H, NOH J Y, KIM K H, *et al*. Effect of zymosan and poly(I:C) adjuvants on responses to microneedle immunization coated with whole inactivated influenza vaccine [J]. *J Control Release*, 2017, **265**: 83-92.

[62] SEOK H Y, NOH J Y, LEE D Y, *et al*. Effective humoral immune response from a H1N1 DNA vaccine delivered to the skin by microneedles coated with PLGA-based cationic nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2017, **265**: 66-74.

[63] BRAZ GOMES K, D'SOUZA B, VIJAYANAND S, *et al*. A dual-delivery platform for vaccination using antigen-loaded nanoparticles in dissolving microneedles [J]. *Int J Pharm*, 2022, **613**: 121393.

[64] VLAIA L, MU A M, CONEAC G, *et al*. Biocompatible topical microemulsions—use and perspectives as cutaneous delivery systems for medicines [J]. *Farmacist Ro*, 2020, **1**(1): 30-36.

[65] CHOUDHURY H, GORAIN B, PANDEY M, *et al*. Recent update on nanoemulgel as topical drug delivery system [J]. *J Pharm Sci*, 2017, **106**(7): 1736-1751.

[66] NASIRI M I, VORA L K, ERSHAID J A, *et al*. Nanoemulsion-based dissolving microneedle arrays for enhanced intradermal and transdermal delivery [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2021, **12**(4): 1-16.

[67] YU Q, HUANG Y P, ZHU C C, *et al*. Combination of microneedles and MF59 adjuvant as a simple approach to enhance transcutaneous immunization [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2020, **16**(12): 1776-1786.

[68] QUAN F S, KIM Y C, COMPANS R W, *et al*. Dose sparing enabled by skin immunization with influenza virus-like particle vaccine using microneedles [J]. *J Control Release*, 2010, **147**(3): 326-332.

[69] PEARTON M, PIRRI D, KANG S M, *et al*. Host responses in human skin after conventional intradermal injection or microneedle administration of virus-like-particle influenza vaccine [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, **2**(10): 1401-1410.

[70] KIM M C, KIM K H, LEE J W, *et al*. Co-delivery of M2e virus-like particles with influenza split vaccine to the skin using microneedles enhances the efficacy of cross protection [J]. *Pharmaceutics*, 2019, **11**(4): 188.

[71] KIM Y C, YOO D G, COMPANS R W, *et al*. Cross-protection by co-immunization with influenza hemagglutinin DNA and inactivated virus vaccine using coated microneedles [J]. *J Control Release*, 2013, **172**(2): 579-588.

[72] HIROBE S, AZUKIZAWA H, HANAFUSA T, *et al*. Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch [J]. *Biomaterials*, 2015, **57**: 50-58.

[73] SCHEPENS B, VOS P J, SAELENS X, *et al*. Vaccination with influenza hemagglutinin-loaded ceramic nanoporous microneedle arrays induces protective immune responses [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, **136**: 259-266.

[74] LOHCHAROENKAL W, WANG L Y, CHEN Y C, *et al*. Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2014, **2014**: 180549.

[75] MIAO Y, YANG T, YANG S, *et al*. Protein nanoparticles directed cancer imaging and therapy [J]. *Nano Converg*, 2022, **9**(1): 2.

[76] DENG L, CHANG T Z, WANG Y, *et al*. Heterosubtypic influenza protection elicited by double-layered polypeptide nanoparticles in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, **115**(33): E7758-E7767.

[77] WANG Y, LI S, DONG C H, *et al*. Skin vaccination with dissolvable microneedle patches incorporating influenza neuraminidase and flagellin protein nanoparticles induces broad immune protection against multiple influenza viruses [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, **4**(6): 4953-4961.