

DOI:10.13350/j.cjpb.250501

• 论著 •

新型发热伴血小板减少综合征病毒 mRNA 疫苗的免疫原性研究^{*}

吴鑫宇¹, 钱华², 王亚南³, 张军杰¹, 田莉¹, 刘乐乐¹, 李梦华¹, 郑文文¹, 郑学星^{1**}, 赵忠欣^{4**}

(1. 山东大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系, 山东济南 250012;

2. 山东大学第二医院口腔医学中心; 3. 山东大学第二医院药学部; 4. 临沂市人民医院检验医学中心)

【摘要】 目的 了解发热伴血小板减少综合征病毒(Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)其囊膜糖蛋白 Gn 与 Gc 构建 LNP-mRNA 疫苗并鉴定其安全性与免疫原性。 **方法** 将 SFTSV Gn/Gc 基因进行密码子优化并合成, 体外转录及核苷酸修饰获得 mRNA-Gn/Gc; 转染 HEK-293T 细胞, 免疫荧光和 Western blot 验证目的蛋白表达; 使用脂质纳米颗粒(LNP)包封 mRNA 合成 LNP-mRNA-Gn/Gc, 免疫 BALB/c 小鼠。检测小鼠血清中 SFTSV 中和抗体滴度, 鼠腹股沟淋巴结 B 细胞与脾脏 T 细胞的募集与活化; 利用 SFTSV 攻击免疫小鼠, 评价疫苗的保护率。 **结果** 免疫荧光与 Western blot 实验均证明 mRNA-Gn/Gc 在细胞内可成功表达 Gn 与 Gc 蛋白; 小鼠免疫 LNP-mRNA-Gn/Gc 后, 可分别诱导产生高水平的特异性中和抗体, LNP-mRNA-Gc 峰值可达 1:490, LNP-mRNA-Gn 峰值可达 1:938, 且两个糖蛋白之间存在显著差异; B 细胞和 T 细胞被显著活化, B 细胞活化比例显著增加至 20% 以上, 且 IL-4 与 IFN- γ 分泌水平分别达到 303 SFU 和 1435 SFU, 显著高于对照组; SFTSV 小鼠攻击保护实验显示, LNP-mRNA-Gn/Gc 疫苗均能 100% 保护小鼠免于 SFTSV 的致死性攻击。 **结论** 本研究成功构建了表达 SFTSV Gn 与 Gc 蛋白的 mRNA 疫苗, 且 Gn 蛋白更具有潜力, 为 SFTSV 临床疫苗开发提供理论依据。

【关键词】 新型发热伴血小板减少综合征病毒; Gn/Gc 蛋白; 中和抗体; mRNA 疫苗

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)05-0551-06

[Journal of Pathogen Biology. 2025 May; 20(05): 551–556, 562.]

Immunogenicity study of an mRNA vaccine for the novel fever with thrombocytopenia syndrome virus

WU Xinyu¹, QIAN Hua², WANG Yanan³, ZHANG Junjie¹, TIAN Li¹, LIU Lele¹, LI Menghua¹, ZHENG Wenwen¹, ZHENG Xuexing¹, ZHAO Zhongxin⁴ (1. Department of Hygiene Inspection and Quarantine, School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Oral Medicine Center, Shandong University Second Hospital;

3. Department of Pharmacy, Shandong University Second Hospital; 4. Clinical Laboratory Center, Linyi People's Hospital) ***

【Abstract】 Objective To construct a lipid nanoparticle (LNP)-encapsulated mRNA vaccine encoding the Gn and Gc glycoproteins of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV) and evaluate its safety and immunogenicity. **Methods** The SFTSV Gn and Gc genes were codon-optimized, synthesized, and subjected to in vitro transcription with nucleoside modification to generate mRNA-Gn/Gc. HEK-293T cells transfected with mRNA-Gn/Gc successfully expressed the protein, as confirmed by immunofluorescence and Western blot. Lipid nanoparticles (LNPs) were used to encapsulate the mRNA to produce LNP-mRNA-Gn/Gc, which was then used to immunize BALB/c mice. Serum neutralizing antibody titers, activation of B cells in inguinal lymph nodes, and splenic T cell responses were analyzed. Immunized mice were challenged with SFTSV to evaluate the vaccine's protective efficacy. **Results** Both immunofluorescence and Western blot experiments confirmed that mRNA-Gn/Gc successfully expressed Gn and Gc proteins within the cells. After immunizing mice with LNP-mRNA-Gn/Gc, high levels of specific neutralizing antibodies were induced. The peak titers of LNP-mRNA-Gc and LNP-mRNA-Gn reached 1:490 and 1:938, with a significant difference between the two glycoproteins. Both B cells and T cells were significantly activated, with the activation rate of

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目(No. 2022YFC2305005); 国家自然科学基金项目(No. 82272335, 82102391); 山东省自然科学基金项目(No. ZR2021MC010, ZR2021QH140); 济南市临床医学科技创新计划项目(No. 202328045); 山东省口腔组织再生重点实验室开放课题(No. SDDX202103)。

** **【通信作者】** 赵忠欣, E-mail: zhaozx0905@163.com; 郑学星, E-mail: zhengxuexing@sdu.edu.cn

【作者简介】 吴鑫宇(1998—), 男, 河北人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: wuxinyu3761@163.com

B cells increasing to over 20%. Additionally, the secretion levels of IL-4 and IFN- γ reached 303 SFU and 1435 SFU, which were significantly higher than those in the control group. The SFTSV challenge experiment demonstrated that the LNP-mRNA-Gn/Gc vaccine provided 100% protection to the mice, whereas all mice in the control group died.

Conclusion This study successfully developed an mRNA vaccine expressing the SFTSV Gn/Gc protein, with the Gn protein showing greater potential. These findings provide a theoretical basis for the clinical development of SFTSV vaccines.

【Keywords】 severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; Gn/Gc protein; neutralizing antibody; mRNA vaccine.

发热伴血小板减少综合征 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) 是由发热伴血小板减少综合征病毒 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV) 引起的一种人畜共患传染病, 2024 年被 WHO 列入可能引发下一次大流行的病原体清单。2011 年 SFTSV 在我国首次被报道, 主要分布在我国中东部的农村地区, 日本、越南、韩国也相继出现病例报道^[1]。流行病学调查, 2020 年, 日本共报告 SFTS 患者 180 例, 病死率 13.9%; 2020 年, 韩国病例数 400 例, 病死率 12.5%; 2021 年, 我国报告 SFTS 患者约 2 500 例, 病死率 14.4%; 2022 年, 我国报告 SFTS 患者约 3000 例, 病死率 15%; 截至 2022 年, 全球病例超过 7 000 例, 年均增长约 15%, 我国病例占总病例数约 70%, 这种持续扩散的趋势值得关注^[2]。

SFTS 临床表现主要包括发烧、乏力, 白细胞减少、血小板减少、出血现象以及胃肠道症状等。该病发病主要集中在每年的 4~10 月, 具有明显的季节特征, 发病年龄主要集中在 30~80 岁之间, 并随着年龄增长呈现增高的趋势。SFTSV 主要经蜱传播, 也可通过动物及感染者的血液、分泌物、气溶胶等媒介导致动物-人、动物-动物、人-人之间的传播, 这存在大流行传播的风险可能性。目前尚无批准上市的疫苗来有效预防 SFTSV, 因此, SFTSV 的新型特异性疫苗的研发对于降低 SFTS 患者的发病率和病死率具有非常重要的意义。

SFTSV 为包膜 RNA 病毒, 属于布尼亚病毒目 (Bunya viridae) 白纤病毒科 (Phenui viridae), 大别班达病毒 (Dabie bandavirus)。其基因组包含三个片段 L、M、S, 分别编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶、糖蛋白 Gn/Gc 和核蛋白 NP 以及非结构蛋白 NSs^[1]。Gn 属于 I 型跨膜蛋白, 编码中和抗体表位, 能与体内的中和抗体结合, Gc 属于 II 型跨膜蛋白, 在介导受体结合及膜融合过程中发挥重要作用, 其保护性研究鲜有报道^[3-5]。Gn 作为病毒主要的抗原成分, 是目前 SFTSV 疫苗研制的主要靶点。

目前已报道的 SFTSV 疫苗类型为减毒活病毒疫

苗、灭活疫苗、病毒载体疫苗、亚单位疫苗、DNA 疫苗、mRNA 疫苗等^[6]。与传统疫苗相比, mRNA 疫苗具有生产成本低、开发快速、免疫原性强、安全性高的优点, 在疫苗研发中展现出巨大的潜力和广阔的时长前景, 成为未来最有潜力的疫苗类型^[7-8], 本研究基于 SFTSV Gn/Gc 全序列构建了 mRNA 疫苗, 设计的信号肽能够保证下游目的蛋白的正确表达, 进行了细胞水平和动物水平的免疫评价, 并对 Gn 和 Gc 这两个蛋白诱导特异性中和抗体的抗原性及保护率进行了比较。

材料与方法

1 材料

1.1 所用毒株与细胞 SFTSV JS2011 株为武汉大学公共卫生学院赠送; 非洲绿猴肾细胞 (Vero cells)、人胚胎肾细胞细胞 (HEK-293T cells) 为山东大学微生物检验实验室留存。

1.2 主要试剂 DMEM 细胞培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青-链霉素混合液、ECL 化学发光剂、Lipofectamine 3000 Reagent 购于赛默飞世尔科技有限公司; 兔源 Gc 多克隆抗体、小鼠 SFTSV Gc 多克隆抗体为本实验室留存; Hiscribe™ T7 RNA 合成试剂盒、牛痘病毒加帽酶、mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶、*E. coli* Poly(A) 聚合酶及 Monarch RNA 纯化试剂盒均购于基因生物技术国际贸易 (上海) 有限公司; 0.5% 埃文斯蓝染液、RIPA 裂解液、30% 制胶液、Tris、Tris-HCL 8.8/6.8、Loading Buffer 均购于上海碧云天生物技术有限公司; 甲醇购于天津富宇精细化工公司; HRP 标记的驴抗鼠 IgG、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购于美国 Southern Biotech 公司; BALB/c 小鼠购于济南朋悦实验动物公司; Alexa Fluor 488-山羊抗鼠抗体购于英国 abcam 公司; TruStain FcX™ 抗鼠 CD16/32 抗体购于美国 BioLegend 公司; 鼠源 APC-CD19、FITC-CD40 购于美国 BD 公司购; Mouse IFN- γ /IL-4 ELISpot 试剂盒购于深圳市达科为生物工程有限公司。

2 方法

2.1 质粒构建 将优化后的目的基因 SFTSV Gn/

Gc 插入克隆载体 pGEM-3Zf(+), 构建 pGEM-Gn/Gc。通过对比、优化、模拟不同基因区段, 以人 β -globin 序列为基础设计体外转录表达系统, 合成结构为 5'-UTR-MCS-3'UTR 的体外转录表达系统 IVT-mRNA。将 IVT-mRNA 与 pGEM-Gn/Gc 进行双酶切连接, 构建质粒 pGEM-IVT-Gn/Gc(图 1)。

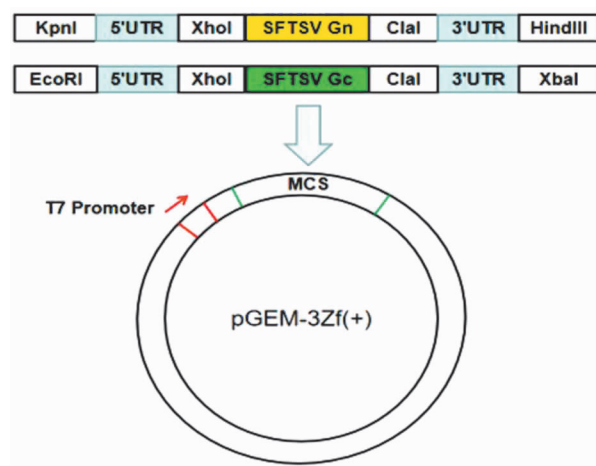


图 1 质粒构建模式图

Fig. 1 Plasmid construction pattern diagram

2.2 体外转录 以线性化质粒 pGEM-IVT-Gn/Gc 为模板, 使用 Hiscribe TM T7 RNA 合成试剂盒完成转录, 通过牛痘病毒加帽酶和 mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶给 mRNA 5'端添加 Cap1 结构, 使用 *E. coli* Poly(A)聚合酶在 mRNA 的 3'端添加 polyA 尾结构。Monarch RNA 纯化试剂盒纯化后获得纯净的转录产物 mRNA-Gn/Gc。转录产物使用脂质纳米颗粒 (LNP) 包被获得 LNP-mRNA-Gn/Gc。

2.3 免疫荧光鉴定 将 HEK-293T 细胞接种于 24 孔板中 (1.5×10^5 细胞/孔), 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养 12 h。分别将 1 μ g、2 μ g 的 Gn/Gc mRNA-LNP 加入 Lipo3000 中, 室温静置 15 min。用 Opti-MEM 清洗细胞 2 次后将 mRNA 与 Lipo3000 的混合物加入 24 孔板中, 分别设置 Gn 和 Gc 的复孔各两个, 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养 6 h, 弃去混合物后, 用含 1% 双抗的 DMEM 清洗细胞 2 次, 再加入含 1% 双抗 10% FBS 的 DMEM 继续培养 48 h, 弃培养基, PBS 清洗后 80% 丙酮固定 16 h。弃去丙酮, 将鼠源 SFTSV Gn 单克隆抗体与 Gc 多克隆抗体分别用 PBS 稀释至 1:400 后, 加入到 24 孔板的相应孔中, 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中孵育 1 h, PBS 清洗孔板 3 次, 将 Alexa Fluor 488 山羊抗鼠 IgG 抗体 (1:800) 和 0.5% 埃文斯蓝染液混合加入 24 孔板中, 孵育 1 h, PBS 清洗孔板 3 次, 于倒置荧光显微镜下进行观察。

2.4 Western blot 鉴定 培养 HEK-293T 细胞, 以

8×10^5 细胞/孔的密度接种于 6 孔板中, 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养 12 h。将 LNP-mRNA-Gn/Gc 各 5 μ g 通过 Lipo3000 转入细胞(同 2.3)培养 48 h。PBS 清洗细胞, 加入 330 μ l 裂解液/孔, 于冰上裂解 10 min 收集蛋白。蛋白煮沸变性后, 12% SDS-PAGE 进行电泳再电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2.5 h。分别用 1:2000 稀释的鼠源 SFTSV Gn 单克隆抗体与兔源 Gc 多克隆抗体孵育 PVDF 膜, 4 °C 过夜。TBST 清洗 3 次, 分别加入驴抗鼠 IgG H&L (HRP) 二抗 (1:5000)、山羊抗兔 IgG H&L (HRP) 二抗 (1:5000) 孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 加入混合均匀的 ECL 化学发光试剂, 用超灵敏多功能化学发光成像仪观察。

2.5 mRNA 疫苗毒力评价 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 每组 8 只, 采取右后肢肌肉注射的方式, 分别接种 PBS、LNP-mRNA-Gn、LNP-mRNA-Gc。首次免疫 10 μ g, 14 d 后加强免疫 10 μ g, 对照组首次免疫与加强免疫均注射 100 μ L PBS。免疫后持续观察各组小鼠进食情况、精神状态并记录体重 21 d (体重变化率 = 免疫后每日体重/初始体重 $\times 100\%$)。

2.6 mRNA 疫苗免疫原性评价 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机平均分至 3 组, 每组 18 只, 分别接种 PBS、LNP-mRNA-Gn、LNP-mRNA-Gc (免疫方案同 2.5)。对免疫后 2、4、8 周小鼠进行眼眶取血 (每次每组采集 6 只), 分离血清并灭活, 检测 SFTSV 特异性中和抗体效价。

2.7 mRNA 疫苗保护效力评价 使用 IFNAR 抗体阻断小鼠 (IFNAR Ab) 评价疫苗保护性^[9]。小鼠随机平均分为 3 组, 每组 8 只, 分别接种 PBS、LNP-mRNA-Gn、LNP-mRNA-Gc (免疫方案同 2.5)。免疫 4 周后注射 100 μ L SFTSV 病毒液, 剂量为 $1 \times 10^{5.25}$ TCID₅₀。持续监测小鼠体重、饮食、精神状态以及临床症状 21 d。绘制临床症状评分表, 记录死亡情况并绘制生存曲线。

2.8 腹股沟淋巴结 B 细胞募集与活化情况 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠随机平均分至 3 组, 每组 5 只, 分别接种 PBS、LNP-mRNA-Gn、LNP-mRNA-Gc (免疫方案同 2.5)。免疫后第 3、6、9 d 取小鼠腹股沟淋巴结制备成单细胞悬液, TruStain FcX™ 抗鼠 CD16/32 抗体孵育后, 加入 APC-CD19、FITC-CD40 抗体, BD FACSCelesta 上机检测 B 细胞募集活化情况。

2.9 特异性 T 淋巴细胞检测 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠随机平均分至 3 组, 每组 4 只, 分别接种 PBS、LNP-mRNA-Gn、LNP-mRNA-Gc (免疫方案同 2.5)。ELISpot 试剂盒检测小鼠淋巴细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-4 特异性 T 淋巴细胞数量, 免疫后第 4、8 周取小鼠

脾脏制备成单细胞悬液,加入刺激物,培养、计数。

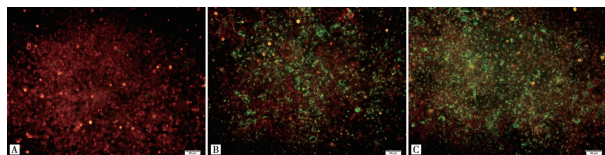
3 统计分析

采用 SPSS26.0 软件对数据进行分析,组间比较采用单因素方差分析、非参数检验、独立样本 t 检验等检验统计方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 免疫荧光鉴定

LNP-mRNA-Gn/Gc 转染 HEK-293T 细胞,孵育荧光抗体后,置于荧光显微镜下观察。LNP-mRNA-Gn 和 LNP-mRNA-Gc 组转染的细胞孔中,可以观察到明显的特异性绿色荧光;而在细胞对照孔中则未观察到特异性荧光(图 2)。



A HEK-293T B LNP-mRNA-Gc C LNP-mRNA-Gn
图 2 免疫荧光鉴定 LNP-mRNA-Gn/Gc 疫苗表达 (bar=50 μm)
Fig. 2 Identification of LNP-mRNA-Gn/Gc vaccine expression by immunofluorescence (bar=50 μm)

2 Western blot 鉴定

LNP-mRNA-Gn/Gc 转染 HEK-293T 细胞,将接种 SFTSV 的细胞作为阳性对照,未感染细胞为空白对照,培养 48 h 后裂解细胞,收集上清液。通过 Western blot 分析目的蛋白 Gn/Gc 的表达状况。结果显示(图 3),LNP-mRNA-Gc 转染的 HEK-293T 细胞,在约 70 ku 左右检测出 Gc 蛋白的特异性条带;LNP-mRNA-Gn 转染的 HEK-293T 细胞,在约 61 ku 左右检测出 Gn 蛋白的特异性条带;在 HEK-293T 细胞中未检测到 Gn/Gc 的特异性蛋白条带。

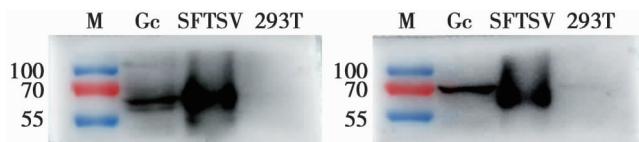
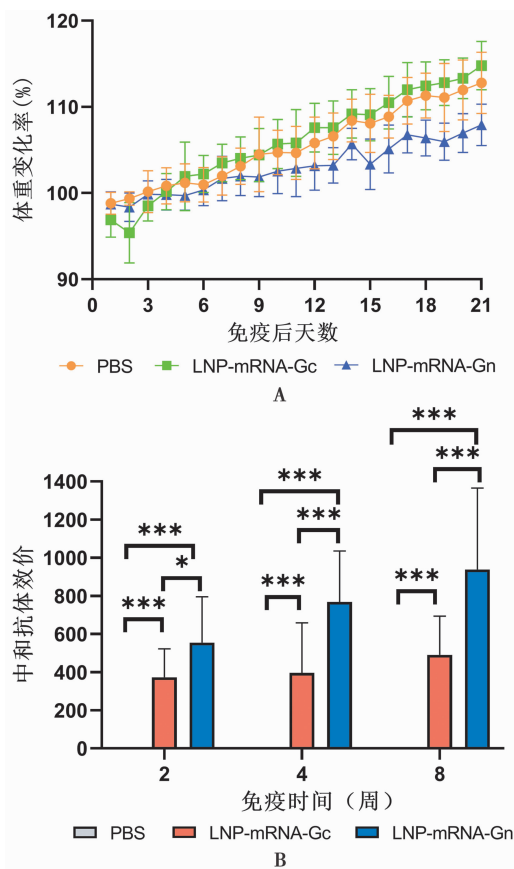


图 3 Western blot 鉴定 LNP-mRNA-Gn/Gc 疫苗表达
Fig. 3 Western blot Identification of LNP-mRNA-Gn/Gc vaccine expression

3 疫苗致病性评价

为了评估 mRNA 疫苗对小鼠的致病性,小鼠随机平均分至 3 组,每组 8 只,分别接种 PBS、LNP-mRNA-Gn 和 LNP-mRNA-Gc。按照两剂次,每次接种 10 μg mRNA 疫苗,记录小鼠 21 d 的饮食、体重、精神变化。结果表明(图 4A),mRNA 疫苗组的体重变化率与对照组无显著差异,且进食状况与精神状态良好。



A 体重变化 B 中和抗体效价
图 4 小鼠免疫后 21 d 体重变化(n=8)与中和抗体效价 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n=6)

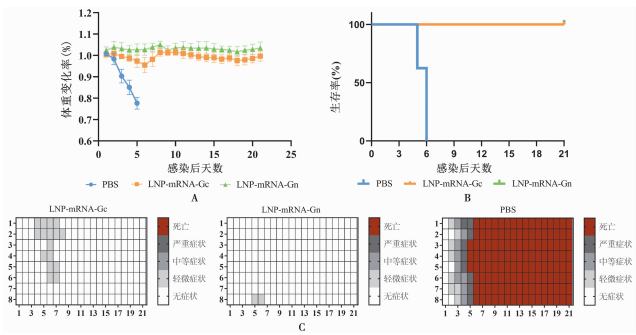
Fig. 4 Body weight changes of mice at 21 days after immunization(A) and neutralizing antibody titer assay(B)

4 mRNA 疫苗免疫原性评价

为测量 mRNA 疫苗的中和抗体效价,采集免疫后 2、4、8 周的小鼠血清,并通过病毒灶减少中和实验(FRNT)测量特异性中和抗体效价。结果显示(图 4B),接种 LNP-mRNA-Gc 后 2、4、8 周的中和抗体效价均值分别为 1 : 373、1 : 395、1 : 490;接种 LNP-mRNA-Gn 后 2、4、8 周的中和抗体效价均值分别为 1 : 554、1 : 768、1 : 938。两个 mRNA 疫苗组中和抗体效价均值显著高于 PBS 组,LNP-mRNA-Gn 组小鼠在 2、4、8 周的中和抗体效价均显著高于 LNP-mRNA-Gc 组小鼠($H = 27.6 \sim 29.4$,均 $P < 0.05$)。

5 mRNA 疫苗保护效力评价

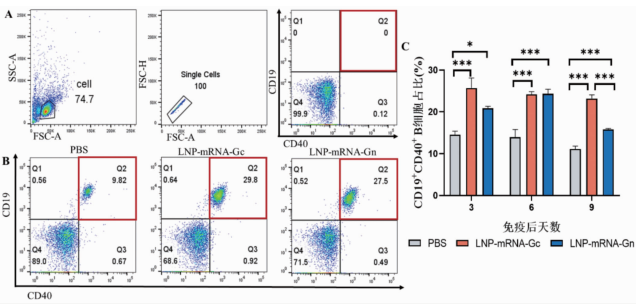
为评价疫苗的保护效力。在感染后持续监测 21 d。结果发现 LNP-mRNA-Gn 和 LNP-mRNA-Gc 组小鼠在感染后个别出现了轻微体重下降与毛发粗糙的症状,但较快恢复,且全部小鼠存活。PBS 组小鼠在感染后出现明显的体重下降(图 5A)、精神状态不佳、毛发粗糙以及身体蜷缩等现象(图 5C),最终全部死亡(图 5B)。



A 体重变化 B 生存曲线 C 临床症状评分表

图 5 感染 SFTSV 后小鼠体重变化图、生存曲线、临床症状评分表 (n=8)

Fig. 5 Body weight changes of mice infected with SFTSV, survival curves, and clinical symptoms scoring sheet



A 圈门策略 B 代表性流式图 C 细胞活化水平图

图 6 腹股沟淋巴结 B 细胞活化水平比较

(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n=5)

Fig. 6 Activations of B cells in inguinal lymph nodes (LNs) from the immunized mice

6 B 细胞募集与活化情况

B 细胞变化反应接种疫苗后的体液免疫情况见图 6。其中图 6A 为圈门策略,图 6B 为腹股沟淋巴结中 B 细胞代表性流式图,图 6C 为 B 细胞活化水平图。LNP-mRNA-Gn 和 LNP-mRNA-Gc 组小鼠 3、6、9 d 时可以快速募集活化高比例的 CD19CD40 B 细胞,显著高于对照组($F=13.9\sim86.6$,均 $P<0.05$)。

7 特异性 T 淋巴细胞检测

T 细胞含有 Th1 与 Th2 细胞亚群,Th1 细胞参与细胞免疫应答,在外来抗原刺激下主要分泌细胞因子 IFN- γ 。Th2 细胞参与体液免疫应答,主要分泌细胞因子 IL-4。在小鼠免疫后 4、8 周时,测量其分泌 IFN- γ 与 IL-4 的能力。结果显示(图 7),4、8 周时接种两种 mRNA 疫苗小鼠分泌的 IFN- γ 与 IL-4 均显著高于对照组,同时 LNP-mRNA-Gn 组小鼠分泌的 IFN- γ 与 IL-4 高于接种 LNP-mRNA-Gc 组小鼠($H=9.3\sim9.8$,均 $P<0.05$)。

讨 论

SFTSV 患者集中为中老年人群,预后较差,以对症治疗和抗病毒药物等非特异性方式为主,常用的抗

病毒药物包括利巴韦林和法匹拉韦等,但对老年患者效果欠佳^[10-13]。SFTSV 具有抑制宿主免疫反应的特征,尤其在严重的 SFTSV 感染时,免疫功能抑制会增加患者继发感染^[14],以及诱发多器官衰竭的风险^[15-16]。尽管 SFTSV 死亡率有所下降,但病例数仍在增加^[17],目前临床上尚无针对 SFTSV 的特异性药物或疫苗,亟需开发一种高效、安全且保护性好的疫苗,以保护高危人群。

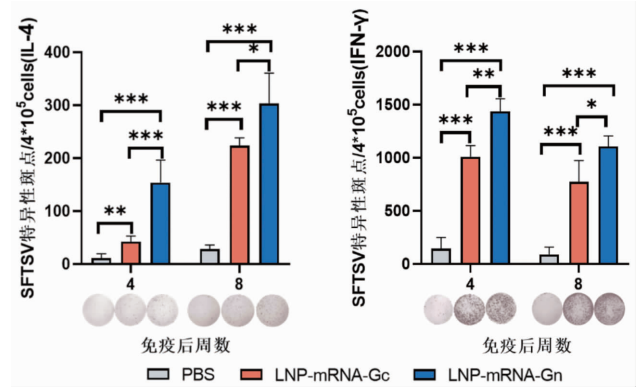


图 7 小鼠脾脏淋巴细胞 IFN- γ 与 IL-4 分泌情况

(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n=4)

Fig. 7 The secretion levels of IFN- γ and IL-4 by mouse spleen lymphocytes

本实验室先前的研究中,利用 AAV9 载体以 SFTSV Gn 蛋白为靶点构建了 AAV 疫苗,能够诱导免疫小鼠产生较强的免疫反应,并可以抵抗 SFTSV 的致死攻击^[18],说明 Gn 是一个理想的疫苗制备靶点。Kim 等^[19]利用 SFTSV Gn 头部区与铁蛋白纳米颗粒构建了 mRNA 疫苗,该疫苗使免疫小鼠完全抵抗致死剂量的 SFTSV 攻击。Lu 等^[20]利用完整的包膜糖蛋白(GP)构建了 mRNA 疫苗,可使小鼠产生较强的免疫反应。目前鲜有有分别表达 SFTSV Gn 与 Gc 全序列的 mRNA 疫苗研究,这也是开展本研究的主要原因。

本研究基于 SFTSV 的两个免疫原性蛋白 Gn 与 Gc 构建 LNP-mRNA-Gn 和 LNP-mRNA-Gc 疫苗,其可在体外表达 Gn 与 Gc 蛋白。通过两剂次免疫小鼠,显示该疫苗对小鼠无明显致病性,并能诱导小鼠产生高效且持久的中和抗体,活化高水平的 T 细胞,并分泌高水平的细胞因子,表明本研究所构建的两种 mRNA 疫苗都具有较高的免疫原性,且 LNP-mRNA-Gn 的免疫原性要高于 LNP-mRNA-Gc。SFTSV 感染宿主细胞依赖其结构糖蛋白 Gn 与 Gc,研究表明,Gn 蛋白和融合前的 Gc 蛋白形成异源二聚体结构,12 个二聚体会形成三个不同的五邻体与六邻体最终组合成为二十面体的病毒外壳^[21-22]。推测 Gn 蛋白与细胞表面趋化因子受体 2(CCR2)结合,介导病毒进入宿主

细胞,随后 Gc 蛋白促使病毒被膜与宿主细胞膜进行膜融合,释放病毒 RNA 进入宿主细胞^[3,23]。此外,Gn 蛋白可以与广泛的中和抗体以及特异性抗体结合,是中和抗体的重要位点,研究发现当 Gn 蛋白与 Gc 蛋白同时作用时,Gn 蛋白会发挥伴侣蛋白功能而促进 Gc 蛋白的转运,这也解释了单独表达时 Gc 蛋白免疫效果较弱的现象^[24]。在体液免疫反应中,B 细胞在抗原刺激后,其受到 CD40 分子参与的激活并成熟,同时广泛表达 CD19 分子^[25-26]。IFN- γ 由 Th1 细胞、NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞分泌,其可促进巨噬细胞的活化,增强抗原呈递细胞的 MHC I 和 II 类分子的表达以及促进 Th1 型反应^[27]。IL-4 由 Th2 细胞、肥大细胞等分泌,其可促进 B 细胞分化和抗体生产,诱导 M2 型巨噬细胞的分化,参与抗寄生虫反应和过敏反应并促进 Th2 型反应^[28]。小鼠在接种该 mRNA 疫苗后可以观察到高比例的 CD19CD40 B 细胞募集与活化,且有效引发小鼠 Th1 型与 Th2 型免疫反应,促进 IFN- γ 与 IL-4 的分泌。这表明 mRNA 疫苗能够在引发显著的体液免疫反应,这也是其能够诱导产生高水平中和抗体的原因之一。

SFTSV 在感染 C57BL/6 与 BALB/c 等小鼠模型时,仅会出现血小板减少等部分临床特征,无法发展为严重疾病或者死于感染,在模拟人类感染进程中有很大的局限性。免疫缺陷小鼠模型对 SFTSV 具有高度敏感性,IFNAR 抗体阻断小鼠(IFNAR Ab)和 IFN- α/β 受体敲除小鼠(IFNAR-/-)都会在感染 SFTSV 后死亡,IFNAR-/-小鼠在最低剂量 SFTSV 感染后可在 4 d 内快速死亡,而 IFNAR Ab 小鼠存活时间相对较长,可以更好的展现 SFTSV 的发病过程,因此本研究使用了 IFNAR Ab 小鼠作为攻毒模型^[9,29]。在感染保护实验中 LNP-mRNA-Gc 和 LNP-mRNA-Gn 均可完全保护小鼠免于 SFTSV 的致死性攻击,说明两种 mRNA 疫苗都可以提供有效的保护来抵御病毒攻击。

以上全部结果表明,基于 SFTSV Gn/Gc 的 mRNA 疫苗是一种具有临床治疗潜力的疫苗,但目前对 SFTSV 疫苗研究的动物模型多集中于小鼠、雪貂、猫狗等,尚缺乏在非人灵长类动物模型中的评估^[30],未来还需要进行更全面的实验以评价疫苗效果,为临床使用提供基础。鉴于 Gn 与 Gc 蛋白的免疫原性不同,后续还应该考虑两种蛋白联合表达的共同作用。此外,mRNA 还面临着一些问题,例如易降解、高温下不稳定,以及如何优化 mRNA 疫苗的翻译表达效率^[31],这些问题需要进一步研究,目前已有一些新型载体系统被开发,例如 DNA 四面体纳米颗粒(DNP)等^[32],在运输保存及表达显现优势,这可能是未来的一个研究方向以提高其临床应用的可行性。

综上所述,本研究成功构建了表达 SFTSV Gn/Gc 的 mRNA 疫苗,并通过体外转录鉴定了目的蛋白 Gn 与 Gc 的表达,该疫苗具有作为 SFTSV 临床治疗预防候选疫苗的潜力,为后续 SFTSV 临床疫苗的开发提供了一定的理论依据。

【参考文献】

- [1] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16):1523-1532.
- [2] Cui H, Shen S, Chen L, et al. Global epidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in human and animals: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2024, 48:101133.
- [3] Wu Y, Zhu Y, Gao F, et al. Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(36):E7564-E7573.
- [4] Kim KH, Kim J, Ko M, et al. An anti-Gn glycoprotein antibody from a convalescent patient potently inhibits the infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(2):e1007375.
- [5] Shimojima M, Sugimoto S, Umekita K, et al. Neutralizing mAbs against SFTS Virus Gn Protein Show Strong Therapeutic Effects in an SFTS Animal Model[J]. *Viruses*, 2022, 14(8):1665.
- [6] Kim D, Lai CJ, Cha I, et al. Current progress of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) vaccine development [J]. *Viruses*, 2024, 16(1):128.
- [7] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4):261-279.
- [8] Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, et al. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective [J]. *NPJ Vaccines*, 2020, 5:11.
- [9] Park SC, Park JY, Choi JY, et al. Pathogenicity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in mice regulated in type I interferon signaling: Severe fever with thrombocytopenia and type I interferon[J]. *Lab Anim Res*, 2020, 36:38.
- [10] Suemori K, Saijo M, Yamanaka A, et al. A multicenter non-randomized, uncontrolled single arm trial for evaluation of the efficacy and the safety of the treatment with favipiravir for patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15(2):e0009103.
- [11] Takayama-Ito M, Saijo M. Antiviral drugs against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:150.
- [12] Yuan Y, Lu QB, Yao WS, et al. Clinical efficacy and safety evaluation of favipiravir in treating patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *EBio Medicine*, 2021, 72:103591.
- [13] Tani H, Fukuma A, Fukushi S, et al. Efficacy of T-705 (favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *mSphere*, 2016, 1(1):e00061-15.

(下转 562 页)