

新型冠状病毒疫苗 Ad5-nCoV 不同给药途径异源加强接种的系统免疫原性比对分析

马文煊¹, 韩雨红², 林 昂^{1*}, 赵维俊^{2,3**}

(¹ 中国药科大学基础医学与临床药学院疫苗中心, 南京 211198; ² 中国药科大学新药安全评价研究中心, 南京 211198; ³ 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘 要 新冠疫苗异源加强接种可以解决疫苗单一使用时保护效力降低的问题。灭活新冠疫苗联合重组腺病毒载体新冠疫苗 (Ad5-nCoV) 的序贯接种模式和 Ad5-nCoV 肌肉注射给药或雾化吸入式给药两种途径已被批准用于临床。本研究在小鼠模型中, 系统对比分析了不同接种策略下小鼠体内抗原特异性 T 细胞、记忆 B 细胞 (MBC)、抗体水平、抗体功能、黏膜免疫应答等关键指标以揭示作用机制。将接种组分为“磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照组” (3×PBS 组)、“2 针灭活新冠疫苗+1 针灭活新冠疫苗”同源加强接种组 (3×INA 组)、“2 针灭活新冠疫苗+1 针 Ad5-nCoV 肌肉注射组” [2×INA+Ad5 (im) 组] 和“2 针灭活新冠疫苗+1 针 Ad5-nCoV 滴鼻给药组” [2×INA+Ad5 (in) 组]。结果显示: 2×INA+Ad5 (im) 组与 2×INA+Ad5 (in) 组异源接种诱导的抗体、Spike 特异性 T 细胞、Spike⁺MBCs 水平均显著高于 3×INA 组同源接种, Ad5-nCoV 在肌肉注射途径下诱导的 Spike 特异性 T 细胞、Spike⁺MBCs 水平显著高于滴鼻给药途径。Ad5-nCoV 滴鼻加强接种不仅明显诱导血清和支气管灌洗液免疫球蛋白 A 产生, 同时诱导更多中性粒细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞向肺组织中募集。本研究系统对比分析了 Ad5-nCoV 经不同给药途径异源加强接种后诱导的疫苗特异性免疫应答差异, 为包括新冠疫苗在内的多种抗感染疫苗提供了预防接种策略指导。

关键词 新型冠状病毒疫苗; 异源加强接种; 同源加强接种; 给药途径; 免疫原性; 黏膜免疫

中图分类号 R967 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2024)01-0137-10

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024011701

引用本文 马文煊, 韩雨红, 林昂, 等. 新型冠状病毒疫苗 Ad5-nCoV 不同给药途径异源加强接种的系统免疫原性比对分析 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(1): 137–146.

Cite this article as: MA Wenxuan, HAN Yuhong, LIN Ang, *et al.* A comparative analysis of vaccine immunity induced by heterologous booster with Ad5-nCoV via different routes of administration[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(1): 137–146.

A comparative analysis of vaccine immunity induced by heterologous booster with Ad5-nCoV via different routes of administration

MA Wenxuan¹, HAN Yuhong², LIN Ang^{1*}, ZHAO Weijun^{2,3**}

¹Vaccine Center, School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ²Center for New Drug Safety Evaluation and Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ³College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Heterologous boost COVID-19 vaccination can solved the problem of decreased efficacy caused by single dose of vaccine. Heterologous booster with adenoviral-vectored COVID-19 vaccine (Ad5-nCoV) following primary immunization with inactivated COVID-19 vaccines is a widely-used vaccination strategy in clinic, while different routes of Ad5-nCoV administration exist and pose a question which route could be more optimal. In this study, we comprehensively evaluated and compared the vaccine immunity induced in mice immunized according to three different vaccination regimens: “3×phosphate buffered solution(3× PBS)”,

收稿日期 2024-01-17 **通信作者** *Tel: 025-86185619 E-mail: anglin@cpu.edu.cn

**Tel: 025-86185619 E-mail: 1620144293@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No.32200764); 江苏省自然科学基金项目 (No.BK20221031)

“2×inactivated vaccine + 1×inactivated vaccine (3×INA)”, “2×inactivated vaccine + 1×Ad5-nCoV (intramuscular) [2×INA+Ad5(im)]” and “2×inactivated vaccine + 1×Ad5-nCoV (intranasal) [2×INA+Ad5(in)]”. We found that heterologous booster with Ad5-nCoV, irrespective of the route of administration, induced significantly higher levels of anti-Spike IgG and subclasses (IgG1 and IgG2c), Spike-specific T cells, class-switched Spike⁺ memory B cells (MBCs) than homologous booster with 3rd dose of inactivated COVID-19 vaccine. Of note, compared with the intramuscular given, intranasal given of Ad5-nCoV as a booster dose clearly induced higher levels of serum and bronchoalveolar lavage fluid anti-spike immunoglobulin A, and moreover, induced stronger infiltration of major innate effector cells like neutrophils, natural killer cells and dendritic cells into the lung tissue, which suggested that mucosal vaccine responses are generated upon intranasal booster with Ad5-nCoV. Altogether, our study analyzed the vaccine immunity induced by different COVID-19 vaccines administered using different regimens, which may guide the clinical use of other types of prophylactic vaccines aiming to mount improved vaccine responses.

Key words COVID-19 vaccines; heterologous booster; homologous booster; route of administration; immunogenicity; mucosal response

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32200764) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20221031)

自新型冠状病毒 (coronavirus disease 2019, COVID-19, 以下简称新冠) 感染疫情暴发以来, 100 余种依托不同技术平台的候选新冠疫苗相继问世^[1], 已上市的新冠疫苗种类涵盖灭活病毒疫苗^[2]、病毒载体疫苗^[2]、蛋白亚单位疫苗^[3]及 mRNA 疫苗等^[4]。不同类型疫苗因设计及作用原理差异, 所诱导产生的免疫应答水平、特征及质量亦有差别, 因此产生不同的保护效力。例如, 新冠 mRNA 疫苗 (美国 Pfizer 公司/德国 BioNTech 公司)、灭活疫苗 (北京国药集团中国生物技术有限公司)、病毒载体疫苗 (美国 Janssen 公司) 在病毒突变前的真实世界保护效力分别为 95%^[5]、79.3%^[6] 和 66.9%^[7]。然而, 包括新冠疫苗在内的大多数抗感染疫苗产品均面临时间伴随的免疫力减弱 (waning immunity) 现象。临床研究显示, 即使具有高保护效力的新冠 mRNA 疫苗, 2 针接种 6 个月后, 中和抗体水平相比于峰值期下降 80%^[8]。针对保护效力较弱或维持时间短的疫苗品种, 如何进一步合理改造或应用以提高其效力是需要解决的关键问题。此外, 当前使用的新冠疫苗多数基于原始病毒株开发, 随着具有更高传播力和/或致病力且获得免疫逃逸能力的病毒突变株不断出现, 导致现有疫苗的免疫保护效力下降^[9]。例如, 接种 2 剂新冠 mRNA 疫苗 (美国 Pfizer 公司/德国 BioNTech 公司) 的受试者血清针对 Omicron (B.1.1.529) 突变株的中和能力仅为针对原始病毒株的 1/30^[10]。而在南非的疫苗接种保护力数据显示, 该疫苗在 Omicron 突变株流行期间产生的保护效力仅为 70%, 远低于 Omicron 株流行前 93%^[11]。

针对以上问题, 全球在围绕迭代疫苗开发^[12]、扩大产能、提高接种率、实现分配平衡等方面不断努力的同时, 也针对不同的免疫接种策略进行探索和实践。其中, 新冠疫苗的异源加强接种 (heterologous boost vaccination), 在临床上被证实相比于同种疫苗加强接种能够诱导产生更高水平的抗体和细胞免疫应答^[13-14]。例如, 灭活新冠疫苗 (CoronaVac, 北京科兴生物制品有限公司) 接种后使用重组腺病毒载体新冠疫苗 (Ad5-nCoV, 天津康希诺生物股份公司) 进行加强接种, 受试者血清病毒结合抗体和中和抗体滴度显著提高^[14]。然而, Ad5-nCoV 的临床接种途径存在传统肌肉注射给药和雾化吸入式给药两种方式^[15], 该款疫苗在异源加强接种应用中, 选择何种注射途径且不同注射途径所产生的疫苗特异性免疫应答反应存在何种差异, 目前罕有报道。本研究系统对比分析了 “2 针灭活新冠疫苗+1 针灭活新冠疫苗” 同源加强接种 (3×INA)、“2 针灭活新冠疫苗+1 针 Ad5-nCoV 肌肉注射” [2×INA+Ad5 (im)] 和 “2 针灭活新冠疫苗+1 针 Ad5-nCoV 滴鼻给药” [2×INA+Ad5 (in)] 3 组不同接种策略下, 小鼠体内 Spike 特异性 T 细胞、记忆 B 细胞 (memory B cells, MBCs)、抗体水平、抗体功能、黏膜免疫应答等关键免疫指标, 为后续包括新冠疫苗在内的多种抗感染疫苗临床应用提供了预防接种策略指导。

1 材料

1.1 试剂

胎牛血清 (FBS)、PBS (上海龙田生物科技有限

公司);青霉素-链霉素(苏州新赛美生物科技有限公司);双死活染料(上海睿钰生物科技有限公司);10×PBS 溶液、ELISA 包被液(10×)、红细胞裂解液、牛血清白蛋白 V(BSA)(北京索莱宝科技有限公司);3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液、TMB 显色终止液(上海碧云天生物技术有限公司)辣根过氧化物酶(HRP)偶联山羊抗鼠 IgG(英国 Abcam 公司);重组 SARS-CoV-2 S1+S2 结构域蛋白(北京义翘神州科技股份有限公司);HRP 偶联山羊抗鼠 IgG2c、HRP 偶联山羊抗鼠免疫球蛋白 A(IgA)、HRP 偶联山羊抗鼠 IgG1(美国 SouthernBiotech 公司);RPMI 1640 培养液(以色列 BI 公司);小鼠 IFN- γ 酶联免疫斑点法(ELISPOT)试剂盒、小鼠 IL-2 ELISPOT 试剂盒(瑞典 Mabtech 公司);500×细胞刺激物、FITC 偶联 C3 抗体(美国 Invivogen 公司);SARS-CoV-2 Spike 肽库(南京金斯瑞生物科技有限公司);红色荧光微球(美国 ThermoFisher 公司)、生物素化 Spike 蛋白(美国 Acro Biosystems 公司);BV421-或 APC-链霉亲和素(美国 Biolegend 公司);LunaStain 细胞染色缓冲液、顺铂试剂、Ir-DNA 插层试剂、质谱流式抗体、LunaAcq 细胞采集液、SureBits 元素校准珠(上海宸安生物科技有限公司);可固定活性染料 eFluor™ 506(美国 eBioscience 公司);Fc 受体阻断试剂(德国 Miltenyi 公司);灭活新冠疫苗 KCONVAC(深圳康泰生物有限公司);腺病毒载体新冠疫苗 Ad5-nCoV(天津康希诺生物股份公司)。

1.2 仪器

CXS31SF 生物倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Countstar Rigel S2 全自动荧光细胞分析仪(上海睿钰生物科技有限公司);Multiskan MK3 酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Attune NXT 流式细胞仪(美国 ThermoFisher 公司);Celesta-1 流式细胞仪(美国 BD Bioscience 公司);PB-QY012104 质谱流式仪(上海宸安生物科技有限公司)。

1.3 动物

C57BL/6J 小鼠,雌性,6 周龄,18~20 g,购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2018-0008。小鼠饲养于中国药科大学新药安全评价研究中心 SPF 级动物房[实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2023-0019]。动物饲养环境温度为(22±1)℃,相对湿度为 40%~60%,12 h/12 h 明暗交替。所有动物实验均按照《实

验动物护理和使用指南》和中国药科大学伦理委员会要求进行,由中国药科大学新药安全评价研究中心实验动物管理和使用委员会的协议批准。

2 方法

2.1 疫苗免疫

C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组($n=8$):PBS 组、3×INA 组、2×INA+Ad5(im)组、2×INA+Ad5(in)组。第 0、14 天,使用灭活新冠疫苗(0.1×人用剂量)肌肉注射免疫小鼠,第 12 周进行第 3 针加强接种。第 7、21、35、91、127 天,采集血清。第 3 次免疫后 7 天,对小鼠进行安乐死,收集脾、肺等组织,制备单细胞悬液。

2.2 支气管灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)采集

小鼠安乐死之后,以背卧姿势固定在啮齿动物工作台上,并将其前爪伸直固定。减掉多余组织,充分暴露气管后于喉结处刺穿,将注射器插入气管内,用棉线固定,注射 PBS 1000 μ L 后抽吸,收集 BALF 约 500 μ L。

2.3 脾淋巴细胞分离

小鼠安乐死后,剖取脾,在 70 μ m 滤膜上研磨,并用 PBS 30 mL 冲洗至离心管。在 4℃ 条件下 1000 r/min 离心 5 min;弃上清液,加入 1×红细胞裂解液 2 mL,将细胞重新分散并室温静置 5 min,用 PBS 30 mL 终止裂解。在 4℃ 条件下 1000 r/min 离心 5 min,使用 RPMI 1640 培养基重新分散制备单细胞悬液。

2.4 肺组织细胞分离

小鼠安乐死后,于超净台中分离出肺组织,剪碎放置于 6 孔板中。样本于 37℃ 原代培养箱中以 100 U/mL I 型胶原酶消化 4 h。在 70 μ m 滤膜上研磨小鼠脾,并用 PBS 30 mL 冲洗至离心管。在 4℃ 条件下 1000 r/min 离心 5 min;弃去上清液,加入 1×红细胞裂解液 2 mL,将细胞重新分散并室温静置 5 min,用 PBS 30 mL 终止裂解。在 4℃ 条件下 1000 r/min 离心 5 min。使用 PBS 重新分散细胞,制备肺组织单细胞悬液。

2.5 抗原特异性结合抗体检测

将 Spike 蛋白以每孔 50 ng 包被入 96 孔强吸附板,4℃ 孵育过夜。后用浓度为 0.075% 吐温-20 的 PBS 洗板。用 2%BSA 在 30℃ 封闭 2 h。使

用 0.2%BSA 梯度稀释血清,将血清稀释样本与空白孔于高吸附板中 30 ℃ 条件下孵育 2 h。使用 HRP 偶联山羊抗小鼠 IgG 抗体(1:50 000)测定 IgG,在 30℃ 条件下孵育 1 h。使用 TMB 作为底物产生荧光,TMB 磷酸终止液终止反应。在 450 nm 波长读取光密度(optical density, OD)。将 OD 高于 2.1 倍空白背景 OD 的稀释度作为终止滴度。针对 anti-Spike IgA 测量时,血清样本经 1:100 稀释后加入 96 孔板中,用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgA 抗体进行分析。

2.6 抗体介导的补体沉积 (antibody dependent complement deposition, ADCD) 检测

在 4 ℃ 条件下,将生物素化抗原与微球共孵育 16 h,使用 5%BSA-PBS 溶液洗涤,重新分散。取稀释后 Spike 抗原 10 μ L 偶联微球(1:100 稀释后)加入 96-U 底板孔中,再取稀释后血清样本 90 μ L 混匀(血清样本提前 56 ℃ 灭活 30 min)37 ℃ 共孵育形成免疫复合物。加入补体与 37 ℃ 孵育 15 min,加入 C3 抗体(1:500 稀释)使用流式细胞仪检测补体水平。数据使用 FlowJo V.10.1 进行分析。

2.7 抗体介导的中性粒细胞吞噬 (antibody dependent neutrophil phagocytosis, ADNP) 检测

在 4 ℃ 条件下,将生物素化 Spike 抗原与微球共孵育 16 h,使用 0.1%BSA-PBS 溶液洗涤,重新分散,取稀释后抗原 10 μ L 偶联微球(1:100 稀释后)加入 96-U 底板孔中,再取稀释后血清样本 90 μ L 混匀(血清样本提前 56 ℃ 灭活 30 min),37 ℃ 孵育 2 h,形成免疫复合物。每孔加入效应细胞悬液(含有 2×10^4 个中性粒细胞)100 μ L,总体积为 200 μ L,用含 2%FBS 培养基稀释细胞至每毫升 2×10^5 个细胞。在 37 ℃ 条件下孵育 16 h。加入 PBS 洗涤,使用 0.1% BSA -PBS 重新分散。使用流式细胞仪检测中性粒细胞吞噬水平。数据使用 FlowJo V.10.1 进行分析。

2.8 抗原特异性 T 细胞应答检测

依照“2.3”项方法制备脾单细胞悬液,使用双死活染料浸染脾细胞后测量细胞浓度及活率,并用 RPMI 1640 培养基将细胞浓度调至每毫升 2×10^6 个细胞。ELISpot 多孔板中每孔加入含 10 % 灭活血清 RPMI 1640 培养基 200 μ L,在 37 ℃ 条件下封闭 30 min。用 RPMI 1640 培养基稀释 Spike 肽库母液,至质量浓度为 20 μ g/mL。封闭结束后,弃去培养基,每孔中各加入上述脾细胞悬液 100 μ L。每个

样本分别设置刺激孔和未刺激孔。分别向各样本的刺激孔中加入 Spike 肽库溶液 100 μ L,使肽库溶液工作量为 10 μ g/mL。在 37 ℃,5% CO₂ 条件下培养 18~20 h。培养结束后,使用 PBS 溶液清洗并稀释 IFN- γ 和 IL-2 抗体至 1 μ g/mL。每孔中各加入 100 μ L 抗体溶液,37 ℃ 孵育 2 h。孵育结束后使用 PBS 溶液清洗。以 1:1 000 比例稀释 Streptavidin-ALP 抗体,每孔加入 ALP 抗体溶液 100 μ L,37 ℃ 孵育 1 h。最后向每孔中加入 BCIP/NBT-plus 底物溶液 100 μ L。室温避光反应 8~10 min。待到斑点形成后,冲洗并避光晾干。读取每孔斑点数目。将刺激孔斑点数目与未刺激孔的差作为样本孔最终值。

2.9 IgG⁺ Spike⁺ MBC 分析

使用流式细胞术评估脾中 MBC。生物素化 Spike 蛋白与 BV421-或 APC-链霉亲和素以物质的量比 4:1 结合,制备 Spike 探针。用 Spike 探针孵育细胞 20 min,用可固定活性染料 eFluor™ 506 染色 5 min。细胞从脾、骨髓或淋巴结分离。洗涤后,用 Fc 受体阻断试剂和抗体混合物在 4℃ 黑暗中孵育 20 min。流式细胞术分析在 BD FACSymphony A3 流式仪上进行。数据使用 FlowJo V.10.1 进行分析。

2.10 质谱流式

用 LunaStain 细胞染色缓冲液洗涤细胞,先用顺铂试剂 10 μ L 在室温下染色 5 min。然后用 LunaStain 细胞染色缓冲液洗涤细胞,用重金属标记抗体混合物在室温下染色 30 min。然后用 LunaStain 细胞染色缓冲液洗涤细胞两次,用 Ir-DNA 插层试剂染色 10 min。染色后,在 LunaAcq 细胞采集液和 SureBits 元素校准珠 20 μ L 中洗涤细胞并调整至每毫升 1×10^6 个细胞。细胞采集后使用 PB-QY012104 质谱流式仪进行分析。数据使用 FlowJo V.10.1 进行分析。

2.11 统计方法

实验数据使用 Graphpad Prism 8 软件进行 *t*-test 检验分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结 果

3.1 在不同新冠疫苗加强接种条件下对小鼠体内抗体应答分析

如图 1-A 所示,在第 0、14 天,首先对 C57BL/6J 小鼠肌肉注射灭活新冠疫苗或者 PBS 对照溶液。有研究表明在接种两针灭活疫苗约 4 个月之后,抗体水平有明显下降趋势^[16],因此选择在全实验流程第 155 天,对小鼠进行第 3 针加强疫苗接种或

注射 PBS 作为对照。第 3 针加强接种分别采用灭活新冠疫苗(同源加强)、Ad5-nCoV 肌注(异源加强)、Ad5-nCoV 滴鼻(异源加强)3 种形式,对应组别分别为: PBS 组、3×INA 组、2×INA+Ad5(im)组、2×INA+Ad5(in)组。伴随试验周期,对小鼠血清抗

体水平进行了监测。2 针灭活新冠疫苗接种后,所有疫苗组小鼠均产生较高水平 anti-Spike IgG(图 1-B),使用灭活新冠疫苗或 Ad5-nCoV 进行第 3 针加强接种均能够进一步提高抗体水平,但 Ad5-nCoV 异源接种组小鼠体内 anti-Spike IgG 水平显著高于

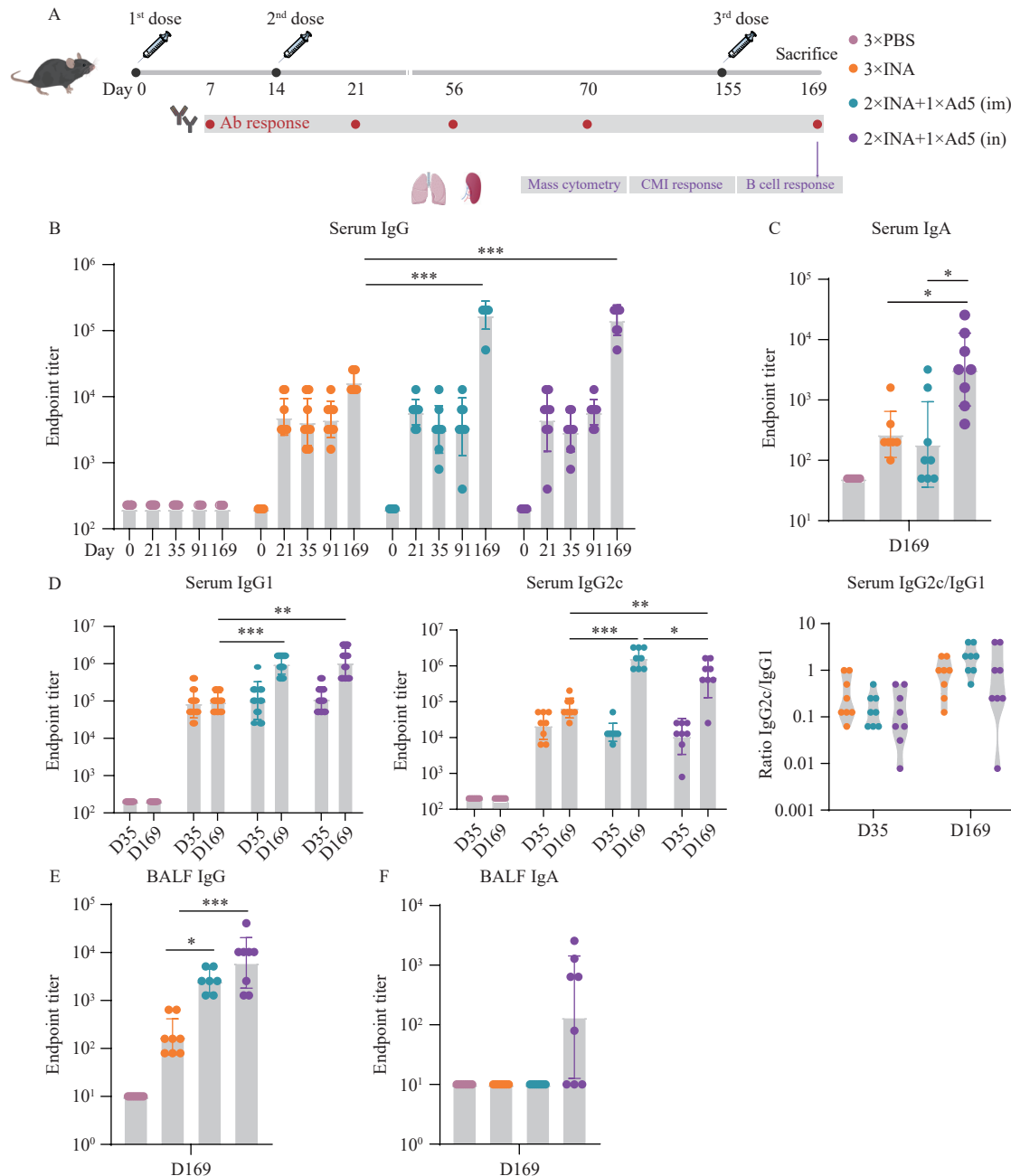


Figure 1 Evaluation of Ab responses in mice immunized with COVID-19 vaccines ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A: Study design; B: Longitudinal analysis of serum anti-Spike IgG titer; C: Anti-Spike IgA titer at day 169 in serum; D: Anti-Spike IgG1 and IgG2c titers and ratio of IgG2c/IgG1 at day 35 and 169; E: Anti-Spike IgG titer in bronchoalveolar bavage fluid (BALF); F: Anti-Spike IgA titer inBALF

3×PBS: 3×phosphate buffered solution; 3×INA: 2×inactivated vaccine + 1×inactivated vaccine; 2×INA+Ad5(im): 2×inactivated vaccine + 1×Ad5-nCoV (intramuscular); 2×INA+Ad5(in): 2×inactivated vaccine + 1×Ad5-nCoV (intranasal)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

同源加强接种组(图 1-B),且肌肉给药和滴鼻给药两组小鼠血清 anti-Spike IgG 水平相当。然而,2×INA+Ad5(in)组小鼠血清中 anti-Spike IgA 滴度明显高于其余疫苗组,提示 Ad5-nCoV 经鼻给药激发黏膜免疫应答(图 1-C)。接下来,针对 Spike 特异性 IgG 抗体亚型滴度和比例进行了分析。结果显示,Ad5-nCoV 异源接种组小鼠体内 anti-Spike IgG1, IgG2c 水平显著高于 3×INA 组,但第 3 针加强免疫后,各组 IgG2c/IgG1 比例无明显差异(图 1-D)。为了进一步分析黏膜部位抗体应答,采集小鼠 BALF 进行分析,结果显示,2×INA+Ad5(im)组和 2×INA+Ad5(in)组小鼠 BALF 样本中 anti-Spike IgG 滴度显著高于 3×INA 组,且 2×INA+Ad5(in)组更优(图 1-E);3×INA 组和 2×INA+Ad5(im)组小鼠 BALF 均未检测到黏膜 anti-Spike IgA 产生,而 2×INA+Ad5(in)组 5/8 小鼠产生 anti-Spike IgA(图 1-F)。该结果进一步表明了 Ad5-nCoV 经鼻异源加强接种诱导黏膜免疫应答优势。

3.2 Ad5-nCoV 异源加强接种显著提高抗体功能

除了抗体滴度,抗体功能与其介导的免疫保护密切相关,而抗体功能很大程度上由 Fc 段特征所决定^[17]。本研究分析了第 3 针加强免疫后 2 周(第

169 天),小鼠血清 ADCD 和 ADNP 功能。与 3×INA 组相比,Ad5-nCoV 异源加强接种组小鼠抗体 ADCD 和 ADNP 功能显著提升(图 2-A, 2-B)。其中,Ad5-nCoV 经肌肉注射加强接种后对抗体 ADCD 和 ADNP 功能促进作用更为显著。

3.3 Ad5-nCoV 异源加强接种诱导更强地 T 细胞应答

T 细胞应答在抗 SARS-CoV-2 感染中发挥重要作用^[18]。第 3 针加强免疫后 2 周(第 169 天),使用 Spike 肽库刺激脾淋巴细胞 24 h,检测脾中 IL-2 与 IFN- γ 分泌型 Spike 特异性总 T 细胞数量。结果显示:灭活新冠疫苗 3 次接种诱导微弱地 T 细胞应答,而在 2 针灭活疫苗接种后使用 Ad5-nCoV 异源加强接种能够显著上调 IL-2 或 IFN- γ 分泌型 T 细胞水平(图 3-A, 3-B)。其中,2×INA+Ad5(im)组小鼠脾病毒特异 T 细胞比例明显高于 2×INA+Ad5(in)组,提示 Ad5-nCoV 经鼻腔给药对于诱导全身系统性 T 细胞应答能力弱于经传统肌肉注射途径,但经鼻给药是否针对肺组织特异 T 细胞产生较强激活尚未研究。

3.4 Ad5-nCoV 异源加强接种诱导 Spike⁺记忆 B 细胞频率升高

产生高质量抗体和维持 B 细胞免疫记忆取决

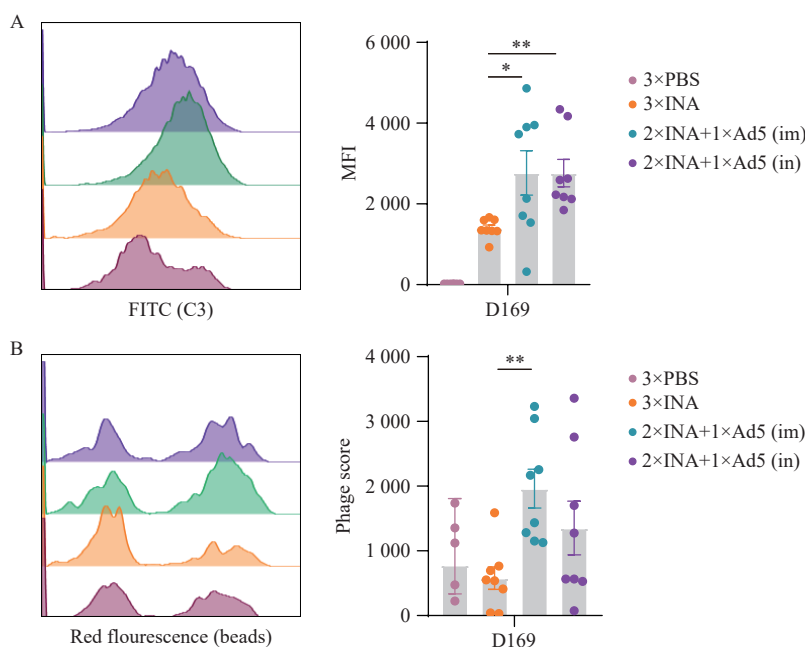


Figure 2 Effector functions of Abs induced by COVID-19 vaccines ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A: Antibody dependent complement deposition (ADCD) function of Abs detected by fluorescently labeled anti-C3 Abs and median fluorescence intensities(MFIs) ; B: Antibody dependent neutrophil phagocytosis (ADNP) function of Abs determined by beads-positive primary neutrophils and phagocytic scores

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

于生发中心(germinal center, GC)反应。使用荧光标记 Spike 蛋白作为探针对第 3 针免疫后小鼠脾中已发生型别转化 Spike⁺MBC(CD19⁺CD38⁺IgM⁺IgD⁺)进行了分析。结果显示: 2×INA+Ad5(im)组和 2×INA+Ad5(in)组小鼠脾中 Spike⁺MBCs 频率显著高于 3×INA 组,这一现象在 Ad5-nCoV 肌肉注射组更为明显(图 4)。

3.5 Ad5-nCoV 经鼻异源加强接种促进天然免疫细胞群体对肺组织浸润

相比于传统肌肉接种途径,疫苗经鼻递送可以显著激发黏膜免疫应答。采用质谱流式技术,对第

3 针加强接种后小鼠肺组织中免疫细胞群体构成进行了分析。由于 PBS 对照组小鼠体内分离提取所得肺组织单细胞数量较少,无法进行后续质谱流式分析,故研究重点聚焦 3 组疫苗接种组,分析对象包括中性粒细胞(CD11b⁺CD170⁺Ly6G⁺)、树突状细胞(CD11b⁺MHC II⁺)、巨噬细胞(CD11b⁺F4/80⁺)、单核细胞(monocytes, CD11b⁺F4/80⁺)、自然杀伤细胞(CD161⁺CD3e⁺)、B 淋巴细胞(CD19⁺CD45R⁺)、 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞(CD3e⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺)、CD4⁺T(CD3e⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺CD4⁺)淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞(CD3e⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺CD8⁺)等。结果显示: 相比于 3×INA 组, 2×

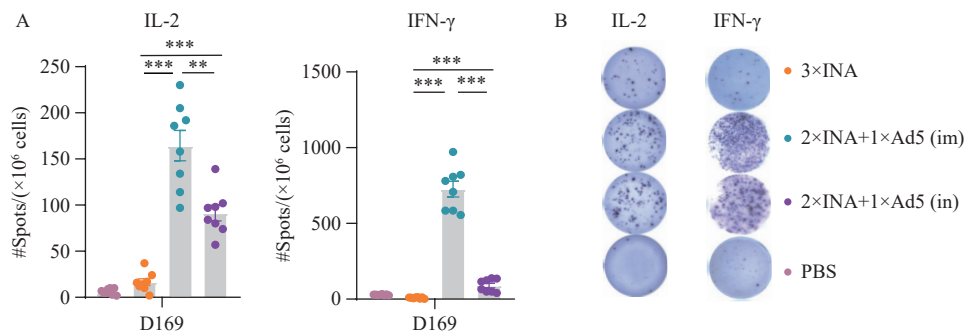


Figure 3 Spike-specific cytokine-secreting T cells induced by COVID-19 vaccines ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A-B: Splenocytes were stimulated with Spike peptides pool and the number of IL-2 or IFN- γ -secreting T cells were quantified by ELISpot assay

** $P<0.01$, *** $P<0.001$

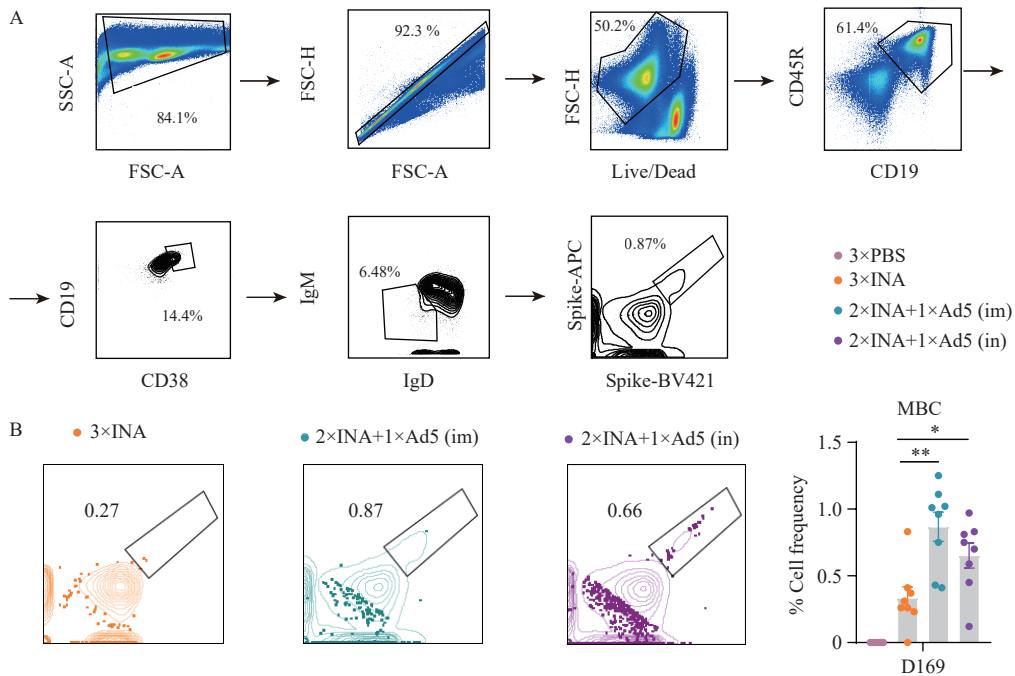


Figure 4 Evaluation of Spike-specific memory B cells in spleens after COVID-19 vaccination

A: Gating strategy of CD19⁺CD38⁺IgM⁺IgD⁺ memory B cells (MBC) in spleens; B: Frequencies of Spike⁺ MBCs were quantified and shown ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

INA+Ad5(in)组小鼠肺中性粒细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞频率明显增加,而 $\gamma\delta$ T淋巴细胞频率显著减少;2×INA+Ad5(im)组小鼠肺组织B细胞群体比例显著增加(图5)。该现象进一步表明,Ad5-nCoV经鼻给药显著激活肺组织黏膜免疫应答。

4 讨论

大量临床试验数据表明,新冠疫苗异源加强比同源加强具有明显优势。新冠疫苗异源加强接种可以解决病毒变异导致的疫苗单一使用条件下保护效力降低的问题,尤其适用于保护效力相对较弱的疫苗品种。2022年2月19日,国家卫生健康委

员会宣布部署新冠疫苗异源序贯接种,完成2剂灭活疫苗满6个月的18岁以上人群,可选择重组蛋白疫苗(ZF2001,重庆智飞生物制品有限公司)或腺病毒载体疫苗(Ad5-nCoV,天津康希诺生物科技有限公司)进行序贯加强免疫。其中,Ad5-nCoV可以选择两种不同给药途径进行接种。

本研究系统对比分析了在早期两针灭活新冠疫苗接种的基础上,使用Ad5-nCoV进行不同给药途径序贯加强接种后,机体特异性免疫应答的产生和差异。本研究发现,“灭活疫苗+重组腺病毒载体疫苗”的序贯接种组在小鼠体内诱导产生的特异性抗体和T、B淋巴细胞反应均显著优于“灭活疫

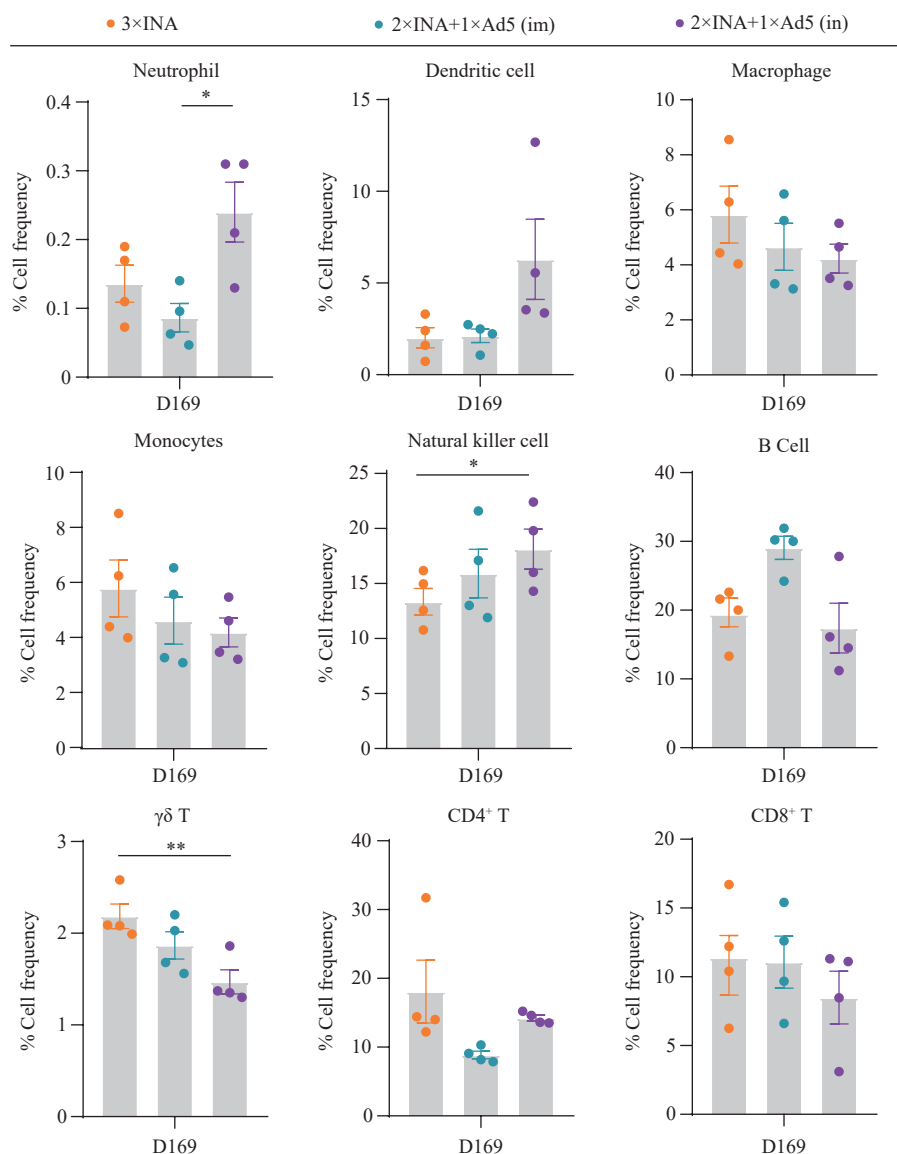


Figure 5 Frequencies of distinct immune cell subsets in the lung compartment after COVID-19 vaccination ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

苗+灭活疫苗”的同源接种组, 而 Ad5-nCoV 在肌肉给药、滴鼻给药两种不同注射途径下对于免疫系统的调控各有优势。Ad5-nCoV 经肌注给药能够产生更强的全身系统性病毒抗原特异 T 细胞、Spike⁺ MBCs 细胞应答, 而经滴鼻给药能够诱导明显的肺组织特异 黏膜应答, 具体表现在血清 anti-Spike IgA、BALF anti-Spike IgA 的产生及关键天然免疫细胞群体的肺组织浸润。值得注意的是, 肺组织中保护性抗体的产生和效应细胞的浸润可以在抗病原感染过程中发挥关键早期保护作用, 有效切断感染路径。此外, 本研究结果显示, Ad5-nCoV 滴鼻加强接种组小鼠肺组织中 $\gamma\delta$ T 细胞频率显著降低, 该群细胞作为肺组织长期驻留的一群细胞, 在抵御外来病原微生物感染过程中发挥关键作用, 其频率降低的具体原因尚不可知, 推测是由于其他免疫细胞向肺组织大量募集, 导致了 $\gamma\delta$ T 频率降低而绝对数量可能并未发生变化。

抗体在抗新冠感染过程中发挥关键作用, 本研究不仅关注了疫苗诱导抗体水平高低, 对于抗体的关键效应功能 ADNP 和 ADCD 也做了分析。“灭活疫苗+重组腺病毒载体疫苗”的序贯接种能够明显提高抗体与天然免疫系统关键成分(补体系统、中性粒细胞等)的协同作用, 进而可通过除直接中和以外的机制发挥抗病毒保护效应。此外, 本研究对脾中 Spike 蛋白特异的已发生型别转化的 MBC 进行了分析, Ad5-nCoV 的序贯接种明显激活该群细胞, 提示生发中心的显著活化。

综上所述, 本研究系统对比分析了 3×INA、2×INA+Ad5(im)、2×INA+Ad5(in) 3 种不同接种策略下, 小鼠体内病毒特异性 T 细胞、记忆 B 细胞、抗体水平和功能、黏膜免疫应答等关键免疫特征, 为后续包括新冠疫苗在内的多种抗感染疫苗临床应用提供了预防接种策略指导。

References

- [1] Li MC, Wang H, Tian LL, *et al.* COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 146.
- [2] Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(2): 83-100.
- [3] Mekonnen D, Mengist HM, Jin TC. SARS-CoV-2 subunit vaccine adjuvants and their signaling pathways[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2022, 21(1): 69-81.
- [4] Fang EY, Liu XH, Li M, *et al.* Advances in COVID-19 mRNA vaccine development[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 94.
- [5] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [6] Al Kaabi N, Zhang YT, Xia SL, *et al.* Effect of 2 inactivated SARS-CoV-2 vaccines on symptomatic COVID-19 infection in adults: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2021, 326(1): 35-45.
- [7] Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, *et al.* Safety and efficacy of single-dose Ad26. COV2. S vaccine against covid-19[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(23): 2187-2201.
- [8] Levin EG, Lustig Y, Cohen C, *et al.* Waning immune humoral response to BNT162b2 covid-19 vaccine over 6 months[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(24): e84.
- [9] Yadav PD, Kumar S. Global emergence of SARS-CoV-2 variants: new foresight needed for improved vaccine efficacy[J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(3): 298-299.
- [10] Dejnirattisai W, Shaw RH, Supasa P, *et al.* Reduced neutralisation of SARS-CoV-2 omicron B. 1.1. 529 variant by post-immunisation serum[J]. *Lancet*, 2022, 399(10321): 234-236.
- [11] Collie S, Champion J, Moultrie H, *et al.* Effectiveness of BNT162b2 vaccine against Omicron variant in South Africa[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(5): 494-496.
- [12] Afkhami S, D'Agostino MR, Zhang AL, *et al.* Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2[J]. *Cell*, 2022, 185(5): 896-915. e19.
- [13] Munro APS, Janani L, Cornelius V, *et al.* Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCov-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet*, 2021, 398(10318): 2258-2276.
- [14] Li JX, Hou LH, Guo XL, *et al.* Heterologous AD5-nCoV plus CoronaVac versus homologous CoronaVac vaccination: a randomized phase 4 trial[J]. *Nat Med*, 2022, 28(2): 401-409.
- [15] Li JX, Wu SP, Guo XL, *et al.* Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: a randomised, open-label, single-centre trial[J]. *Lancet Respir Med*, 2022, 10(8): 739-748.
- [16] Zhang HY, Jia YY, Ji Y, *et al.* Inactivated vaccines against SARS-CoV-2: neutralizing antibody titers in vaccine recipients[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 816778.
- [17] Phelps M, Balazs AB. Contribution to HIV prevention and treatment by antibody-mediated effector function and advances in broadly neutralizing antibody delivery by vectored immunopro-

phylaxis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 734304.

BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses[J].

[18] Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, *et al*. COVID-19 vaccine

Nature, 2021, 590(7844): E17.



[专家介绍] 赵维俊, 预防兽医学博士, 高级实验师, 硕士生导师, 中国毒理学会认证毒理学家。主要研究方向为利用动物模型进行疫苗免疫作用机制和安全性评价研究, 为新型疫苗开发提供指导。在国际重要学术期刊如 *Signal Transduct Target Ther*、*Archives of Toxicology*、*Emerging Microbes and Infections* 等以第一作者和通讯作者发表多篇 SCI 论文。主持并完成 11 个 1 类新药的非临床 GLP 研究, 包括化药、中药和生物制品等。

· 校园信息 ·

中国药科大学附属南京天印山医院揭牌启用

2023 年 12 月 22 日, 中国药科大学附属南京天印山医院正式启用。恒瑞医药集团董事长孙飘扬, 江苏省卫健委副主任张金宏, 国家卫健委国际交流中心副主任侯晓梅, 中国临床肿瘤学会理事长徐瑞华, 南京市副市长吴炜, 江苏省医保局副局长朱丽菁, 南京医科大学党委书记兰青, 江苏省药监局副局长姜伟, 南京市卫健委主任夏海鸣及省市区各级部门领导和二十多位全国著名医学专家, 南京市各大医院和高校的领导, 国内外大型制药企业代表出席活动。我校党委书记金能明, 校长郝海平, 党委副书记、纪委书记戴建君, 副校长孔令义、袁浩、杨勇等领导出席活动, 我校党委办公室、校长办公室相关负责人参加活动。

南京天印山医院由中国药科大学杰出校友, 恒瑞医药集团董事长孙飘扬筹建, 是恒瑞医药集团深入贯彻健康中国战略, 积极落实党中央、国务院关于促进和支持社会办医政策的有力举措。作为中国药科大学第一附属医院, 南京天印山医院将充分对接中国药科大学学科资源, 双方将在临床医疗水平提高、医学人才培养、最佳用药组合的筛选等方面有所作为, 走出具有中国特色的创新药研发道路, 研发生产更多适合中国人生命基因传承和身体素质特点的“中国药”, 并努力成为江苏医教研一体化发展的名片, 为广大的病患提供优质的医疗服务, 推动医疗卫生事业发展, 助力医药产业的创新转型。

(党委宣传部、校长办公室, 本刊有删改)