

不同粒径口蹄疫病毒样颗粒-ZIF-8 复合物诱导小鼠的体液免疫效果分析

李家俊^{1#}, 王俊^{1,2#}, 张韵¹, 滕志东¹, 董虎¹, 郭慧琛¹, 孙世琪^{1*}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室 口蹄疫国家参考实验室,
甘肃 兰州 730046

2 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319

李家俊, 王俊, 张韵, 滕志东, 董虎, 郭慧琛, 孙世琪. 不同粒径口蹄疫病毒样颗粒-ZIF-8 复合物诱导小鼠的体液免疫效果分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4837-4848.

LI Jiajun, WANG Jun, ZHANG Yun, TENG Zhidong, DONG Hu, GUO Huichen, SUN Shiqi. Evaluation of the humoral immunity in mice induced by foot-and-mouth disease virus-like particles-ZIF-8 complexes with different sizes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4837-4848.

摘要: 为进一步提高口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)疫苗的免疫效果, 本研究采用仿生矿化方法, 将 Zn^{2+} 和 2-甲基咪唑按照不同浓度配比制备了不同粒径的 FMDV VLPs-沸石咪唑骨架-8 (zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8)复合物, 以探究尺寸效应对免疫效果的影响。结果显示, 成功制备出 3 种不同粒径的 FMDV VLPs-ZIF-8, 粒径分别约为 70、100、1 000 nm。细胞毒性和组织病理学试验表明, 3 种复合物均具有良好的生物安全性。小鼠免疫试验表明, 3 种复合物均能明显提高中和抗体和特异性抗体水平, 并且随着复合物体积的减小, 其免疫效果也随之增强。本研究表明, ZIF-8 包封 FMDV VLPs 可显著增强其免疫效果, 且具有尺寸依赖性。

关键词: 沸石咪唑骨架-8; 口蹄疫病毒样颗粒; 佐剂; 尺寸效应

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800300); 国家自然科学基金(32072859, 32072847, 32002272); 甘肃省科技重大专项计划(21ZD3NA001); 科技人才与平台计划(202205AF150007)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300), the National Natural Science Foundation of China (32072859, 32072847, 32002272), the Science and Technology Major Project of Gansu Province (21ZD3NA001), and the Science and Technology Talents and Platform Program (202205AF150007).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: sunshiqi@caas.cn

Received: 2023-02-02; Accepted: 2023-04-23; Published online: 2023-05-12

Evaluation of the humoral immunity in mice induced by foot-and-mouth disease virus-like particles-ZIF-8 complexes with different sizes

LI Jiajun^{1#}, WANG Jun^{1,2#}, ZHANG Yun¹, TENG Zhidong¹, DONG Hu¹, GUO Huichen¹, SUN Shiqi^{1*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, National Foot-and-mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

Abstract: To further enhance the immune effect of the foot-and-mouth disease (FMD) virus-like particles (VLPs) vaccine, this study prepared FMDV VLPs-zeolitic imidazolate (framework-8, ZIF-8) complexes with different particle sizes. We used a biomimetic mineralization method with Zn^{2+} and 2-methylimidazole in different concentration ratios to investigate the effect of size on the immunization effect. The results showed that FMDV VLPs-ZIF-8 with three different sizes were successfully prepared, with an approximate size of 70 nm, 100 nm, and 1 000 nm, respectively. Cytotoxicity and animal toxicity tests showed that all three complexes exhibited excellent biological safety. Immunization tests in mice showed that all three complexes enhanced the titers of neutralizing and specific antibodies, and their immune effects improved as the size of the complexes decreased. This study showed that ZIF-8 encapsulation of FMDV VLPs significantly enhanced their immunogenic effect in a size-dependent manner.

Keywords: zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8); foot-and-mouth disease virus-like particles (FMDV VLPs); adjuvants; size effect

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、高传染性疾病,主要感染偶蹄类动物^[1],可通过接触易感动物、接触动物分泌物、气溶胶等方式传播。感染后 2-3 d 出现发热、跛行以及口腔、舌、牙龈、乳头和蹄间出现水泡等症状^[2-3]。尽管我国在 FMD 防控上取得了很大成绩,但由于该病在我国蔓延情况严重,仍是我国养猪业面临的一大难题。

疫苗是防控 FMD 的有效手段之一^[4],灭活疫苗接种仍然是目前使用最广泛的预防 FMD 的免疫方法,但是需要较高生物级别的生产车间且存

在病毒逃逸的风险^[5]。为了增加安全性,病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)作为一种基因工程亚单位疫苗,由一种或多种结构蛋白组成,其具有与天然病毒相似的结构形貌、不含有遗传物质、不具有传染性,因此具有较高的安全性等优点。VLPs 已被广泛应用于疫苗、基因治疗、药物载体和材料研究^[6],是传统灭活或减毒疫苗的理想替代品。然而,VLPs 疫苗也存在一些不足之处,例如:VLPs 的蛋白质性质决定了 VLPs 在室温保存时不稳定、易分解;与灭活疫苗比较,在相同免疫剂量下,VLPs 产生的免疫效果较弱^[7]。所以,为了增强其稳定性和免疫效果,常常需要使用佐剂。

佐剂是疫苗的重要组成部分,可辅助抗原激活机体产生良好的免疫反应。近年来,金属有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)作为一种新型的纳米佐剂,因其高比表面积、高孔隙率、优异的稳定性和良好的生物相容性以及易于各种化学修饰等优势,已在材料固定、药物递送、疫苗佐剂研发等领域得到广泛应用^[8]。沸石咪唑骨架-8 (zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8)是由 Zn^{2+} 和 2-甲基咪唑配位而成的典型 MOFs 材料,表现出良好的亲和力和免疫调节作用,被广泛应用于生物材料固定、药物递送等生物领域^[9]。进一步研究发现,ZIF-8 作为疫苗佐剂也具有良好效果,能够诱导小鼠产生更强的免疫反应,且具有良好的生物相容性,是一种安全的疫苗递送载体^[10]。

纳米颗粒的尺寸、表面电荷和与细胞膜的相互作用会影响细胞对其摄取效率、分布,从而影响其生物功能^[11]。徐晓微等^[12]研究发现,二氧化硅纳米颗粒的吸收速率随尺寸增加而降低。贾吉磊等^[13]研究发现,小尺寸的纳米颗粒更容易被树突状细胞(dendritic cells, DCs)摄取,促进 DCs 的成熟与活化,诱导机体产生更高水平的特异性免疫应答。此外,研究表明纳米颗粒表面的电荷也会影响纳米颗粒与细胞膜的相互作用,表面带正电的纳米颗粒比带负电的纳米颗粒更容易进入细胞^[14]。

本研究利用仿生矿化,合成了不同尺寸的 VLPs-ZIF-8 复合物,结果表明,这些复合物具有良好的生物相容性,可以诱导产生良好的免疫应答。此外,不同尺寸的 FMDV VLPs-ZIF-8 疫苗诱导机体产生的免疫应答也存在差异,其中尺寸较小的(70 nm)复合物具有最好的免疫效果。

1 材料与方法

1.1 材料

表达 O 型 FMDV 结构蛋白的大肠杆菌

(*Escherichia coli*) BL21、抗 FMDV 的阳性血清和仓鼠肾细胞(baby hamster syrian kidney, BHK-21)均由本实验室保存;HRP 标记的兔抗猪 IgG、DMEM 培养基、硝酸锌、2-甲基咪唑购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素、胎牛血清购自英杰生命技术有限公司;酵母粉和胰蛋白胨购自安琪酵母股份有限公司;cOmplete His-Tag Purification Resin 购自上海罗氏制药有限公司;IL-4、IL-1 β 、IFN- γ 细胞因子试剂盒购自安迪生物科技有限公司;6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 FMDV VLPs 获取和鉴定

根据本实验室建立的 FMDV VLPs 大肠杆菌表达系统,获得了组装的 FMDV VLPs^[15]。具体操作如下,将菌株融化后,按比例 1:100 将表达 O 型 FMDV 结构蛋白的菌株接种于含有氨苄青霉素(50 μ g/mL)、卡那霉素(10 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)的 LB 培养基中,以 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件培养至 OD_{600} 达 0.6-0.8,再加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度为 1 mmol/L,以 16 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件诱导表达 14 h;收集培养液离心收集菌体,并用含有 10 mmol/L 咪唑的缓冲液重悬;将重悬液进行低温超声破碎,并在 12 000 r/min 离心 30 min;将离心后的上清液转移至平衡好的镍柱中,4 $^{\circ}$ C 旋转结合 1 h,滤掉液体,柱中依次加入含有 10、20、45 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱杂蛋白,最后用含有 500 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白 FMDV VLPs。SDS-PAGE 鉴定,将上述收集的蛋白按一定比例加入类泛素蛋白修饰分子(small ubiquitin-like modifier, SUMO)酶,4 $^{\circ}$ C 酶切,将样品与

2×SDS 上样缓冲液按照 1:1 的比例混合, 每孔 10 μL 加入酶切前后的蛋白样品, 进行凝胶电泳, 随后进行考马斯亮蓝染液染色, 然后在摇床上染色过夜, 随后使用脱色液脱色, 至条带清晰进行观察。Western-blotting 鉴定, SDS-PAGE 后取出凝胶, 利用电转法转至硝酸纤维素膜上, 用 1×TBST 配制 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 倒去脱脂奶粉, 将抗 FMDV 的阳性血清与 2%脱脂奶粉按 1:1 000 制成一抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 6 次, 每次 5 min。然后将辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的兔抗猪 IgG 与 2%脱脂奶粉按 1:1 000 制成二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 6 次, 每次 5 min。ECL 发光液进行曝光。将酶切后的结构蛋白在组装缓冲溶液中进行组装, 通过动态光散射纳米粒度仪(dynamic light scattering, DLS)测定颗粒尺寸, 具体操作如下, 测量皿用超纯水洗 3 次, 将测量皿甩干, 加入样品, 样品中不能有气泡, 然后进行粒径测量。

1.2.2 不同纳米尺寸的金属有机框架材料的合成及表征

70 nm ZIF-8 (Z70)制备: 将 160 mmol/L 2-甲基咪唑与 50 mmol/L 硝酸锌按照 9:1 比例混合, 同时加入 FMDV VLPs, 冰上静置 3 h, 离心收集白色沉淀并用去离子水洗涤, 重悬。

100 nm ZIF-8 (Z100)制备: 将 160 mmol/L 2-甲基咪唑与 50 mmol/L 硝酸锌按照 1:1 比例混合, 同时加入 FMDV VLPs, 冰上静置 3 h, 离

心收集沉淀并用去离子水洗涤, 重悬。

1 000 nm ZIF-8 (Z1 000)制备: 将 320 mmol/L 2-甲基咪唑与 80 mmol/L 硝酸锌按照 6:4 比例混合, 同时加入 FMDV VLPs, 冰上静置 3 h, 离心收集沉淀并用去离子水洗涤, 重悬。

通过 SDS-PAGE、Western blotting、DLS 分析验证 Z70、Z100 和 Z1 000 的合成、大小、电势, 操作步骤同 1.2.1。用透射电镜观察合成材料形貌特征, 步骤如下: 取出铜网, 滴加样品 10 μL , 样品吸附 2 min, 用吸水纸吸去多余样品, 进行电镜观察。

1.2.3 细胞毒性测定

用 MTS 细胞增殖比色法测定 Z70、Z100 和 Z1 000 的细胞毒性。将培养好的 BHK-21 细胞消化并计数, 按 10^4 /孔接种到 96 孔细胞培养板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中培养至细胞长至 60%, 弃掉原培养基, 在新培养基中配制 10、20、40、60、80、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的样品, 并按照 100 μL /孔的量加入细胞中, 继续培养 24 h。然后按照 10 μL /孔的剂量加入 MTS, 孵育 4 h, 通过酶标仪检测 OD_{490} , 计算细胞存活率: 细胞存活率(%)=实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times 100\%$, 每组设 4 个复孔, 实验重复 3 次。

1.3 动物实验

1.3.1 实验分组及免疫剂量

将 6–8 周龄雌性的 BALB/c 小鼠随机分为 6 组, 每组 6 只, 1 月后 14 d 进行加强免疫; 实验分组及免疫剂量如表 1 所示。动物使用严格遵守中国

表 1 动物实验及免疫剂量

Table 1 Groups and immunization dose of the animal experiment

Animal groups	Count	Immune dose of VLPs (μg)	Immune way
PBS	6	0	
FMDV VLPs	6	50	
VLPs-ISA206	6	50	
Z70	6	50	Immunization of muscle in hind limbs
Z100	6	50	
Z1 000	6	50	

农业科学院兰州兽医研究所动物伦理委员会规定(批准文号: LVRIAEC-2022-003), 对小鼠的操作都符合动物福利要求。

1.3.2 组织病理学试验

通过观察免疫小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏的组织切片, 鉴定 Z70、Z100 和 Z1 000 的生物安全性。具体如下: 小鼠处死后采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏组织用 10%中性甲醛固定, 固定组织经脱水、包埋, 切片后进行如下操作: 先将切片脱蜡, 随后在苏木精染料中染色 10–20 min。使用自来水冲洗 1–3 min, 然后进行盐酸酒精分化 5–10 s。再次使用自来水进行冲洗 1–3 min, 然后把切片放入 50 °C 的温水或弱碱性水溶液中返蓝, 直到出现蓝色为止。再次使用自来水进行冲洗 1–3 min, 之后将切片放入 85% 的酒精中浸泡 3–5 min, 进行伊红染色 3–5 min, 用水洗涤 3–5 s, 之后使用梯度酒精进行脱水, 再使用二甲苯透明剂, 最后使用中性树脂进行封固处理进行观察。

1.3.3 FMDV VLPs-ZIF-8 细胞摄取试验

在 12 孔细胞板铺 BHK-21 细胞, 长至 60% 的 BHK-21 细胞孔中分别加入 VLPs 和不同粒径的 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物, 然后置于含 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱中孵育 0、1、2、4、6 h。用预冷 PBS 洗 5 遍后, 每孔加入 100 μL 1× 上样缓冲液收集细胞。100 °C 金属浴中加热 10 min, 然后进行 Western blotting。转膜后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。将猪抗 FMDV 的阳性血清与 2% 脱脂奶粉按 1:1 000 配制成一抗, 加 5–7 mL, 室温孵育 1 h。TBST 洗 3 次, 每次 5 min。然后用 HRP 标记兔抗猪的抗体与 2% 脱脂奶粉按 1:1 000 配制二抗, 加 5–7 mL, 室温孵育 1 h。TBST 洗 3 次, 每次 5 min。然后用 ECL 发光液进行蛋白检测。

1.3.4 特异性抗体检测

采集小鼠 2 免后 14 d 的血液, 分离得到的

血清按照液相阻断酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法进行检测。具体如下: (1) 按 1:8 比例倍比稀释被检血清和阴阳性对照血清, 加入 U 型反应板中, 每孔 50 μL; (2) 将 FMDV 抗原加入到每个稀释孔内, 每孔 50 μL, 并设置阳性对照和阴性对照孔, 4 °C 静置过夜; (3) 将抗原抗体混合液按 50 μL/孔移至已包被 O 型 FMDV 兔抗的 ELISA 板上, 封板, 37 °C 温育 60 min; (4) 用 PBST 连续洗板 3–5 次, 拍干, 加 O 型 FMDV 豚鼠抗体工作液, 每孔 50 μL, 封板, 37 °C 温育 30 min; (5) 同上洗板 3–5 次, 拍干, 加兔抗豚鼠 IgG-HRP 工作液, 封板, 37 °C 温育 30 min; (6) 同上洗板 3–5 次, 拍干, 加 TMB 底物溶液, 每孔 50 μL, 37 °C 显色 15 min; (7) 加终止液 50 μL/孔, 终止反应, 在酶标仪上读取 OD₄₅₀ 数值。

1.3.5 中和抗体检测

在含有 10% FBS 的 DMEM 培养中培养 BHK-21 细胞, 待长满后, 按 10⁴/孔的细胞数接种到 96 孔细胞板中进行培养。血清 56 °C 灭能 30 min 后, 按 1:8 比例倍比稀释, 加入 96 孔板中, 每孔 50 μL, 共 6 个稀释度, 每个样品做 4 个重复; 将终浓度为 200 TCID₅₀/0.1 mL 的 FMDV 加入 96 孔板中与血清混合, 每孔 50 μL, 并设置病毒回归孔, 37 °C、5% CO₂ 孵育 1 h; 将混合液加入至 BHK-21 细胞中孵育 1 h, 弃掉培养液后用灭菌 PBS 清洗 2 次, 加入含 3% FBS 的 DMEM 培养 72 h 后观察细胞病变情况。

1.3.6 数据分析

使用 GraphPad Prism 5.0 软件对各组数据进行统计学分析。通过双因素方差分析(two-way analysis of variance, two-way ANOVA)和单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)分析数据并进行显著性分析。

*: $0.01 \leq P < 0.05$ 说明差异显著, **: $P < 0.01$ 说明差异极显著。

2 结果与分析

2.1 FMDV VLPs 的获取

按照本实验室建立的 FMDV 结构蛋白大肠杆菌表达系统, 对 FMDV 结构蛋白进行诱导表达, 对表达产物进行纯化, 并利用 SUMO 酶切除 FMDV 结构蛋白中的 His-SUMO 标签。经 SDS-PAGE (图 1A) 和 Western blotting (图 1B) 鉴定, 成功得到 FMDV 结构蛋白。将 FMDV 结构蛋白在组装缓冲溶液中进行组装获得 FMDV VLPs, 经纳米粒度仪测定水合直径约为 34 nm (图 1C)。

2.2 矿化 FMDV VLPs 及表征

按照不同配方矿化 FMDV VLPs 得到 3 种不同粒径的 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物。通过 SDS-PAGE、Western blotting 检测 Z70、Z100、Z1000 包封 FMDV VLPs 的情况, 结果如图 2A、2B 所示, 3 种复合物均成功包裹 FMDV VLPs。纳米粒度仪检测到 FMDV VLPs、Z70、Z100 和 Z1000 的电势分别为 -8、30.2、35.5、36.2 mV, 显示 ZIF-8 形成的矿化层带正电荷(图 2C)。利用纳米粒度仪检测到 Z70、Z100、Z1000 的水合粒径分别约为 67、109、977 nm (图 2D-2F)。进一步通过透射电镜对 Z70、Z100、Z1000 的形貌和尺寸进行观察, 结果如图 2G、2H、2I 所示。

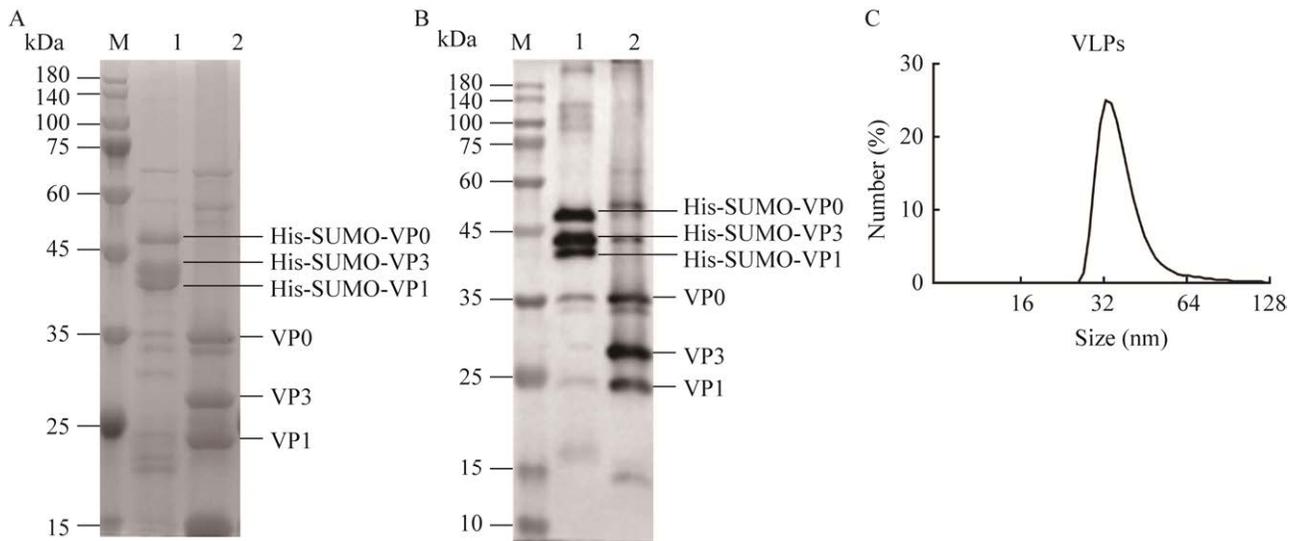


图 1 FMDV VLPs 的获得 A: FMDV 结构蛋白的酶切前、后 SDS-PAGE 检测. M: 蛋白分子质量标准; 1: 酶切前目的蛋白; 2: 酶切后目的蛋白. B: FMDV 结构蛋白的酶切前、后 Western blotting 分析. M: 蛋白分子质量标准; 1: 酶切前目的蛋白; 2: 酶切后目的蛋白. C: 组装的 FMDV VLPs 的水合粒径的纳米粒度仪分析

Figure 1 Acquisition of FMDV VLPs. A: Pre- and post-enzymatic SDS-PAGE assay of FMDV structural proteins. M: Protein molecular quality standard; 1: Pre-enzymatic target protein; 2: Post-enzymatic target protein. B: Pre- and post-enzymatic Western blotting analysis of FMDV structural proteins. M: Protein molecular quality standard; 1: Pre-enzymatic target protein; 2: Post-enzymatic target protein. C: Nanoparticle size analysis of hydrated particle size of assembled FMDV VLPs.

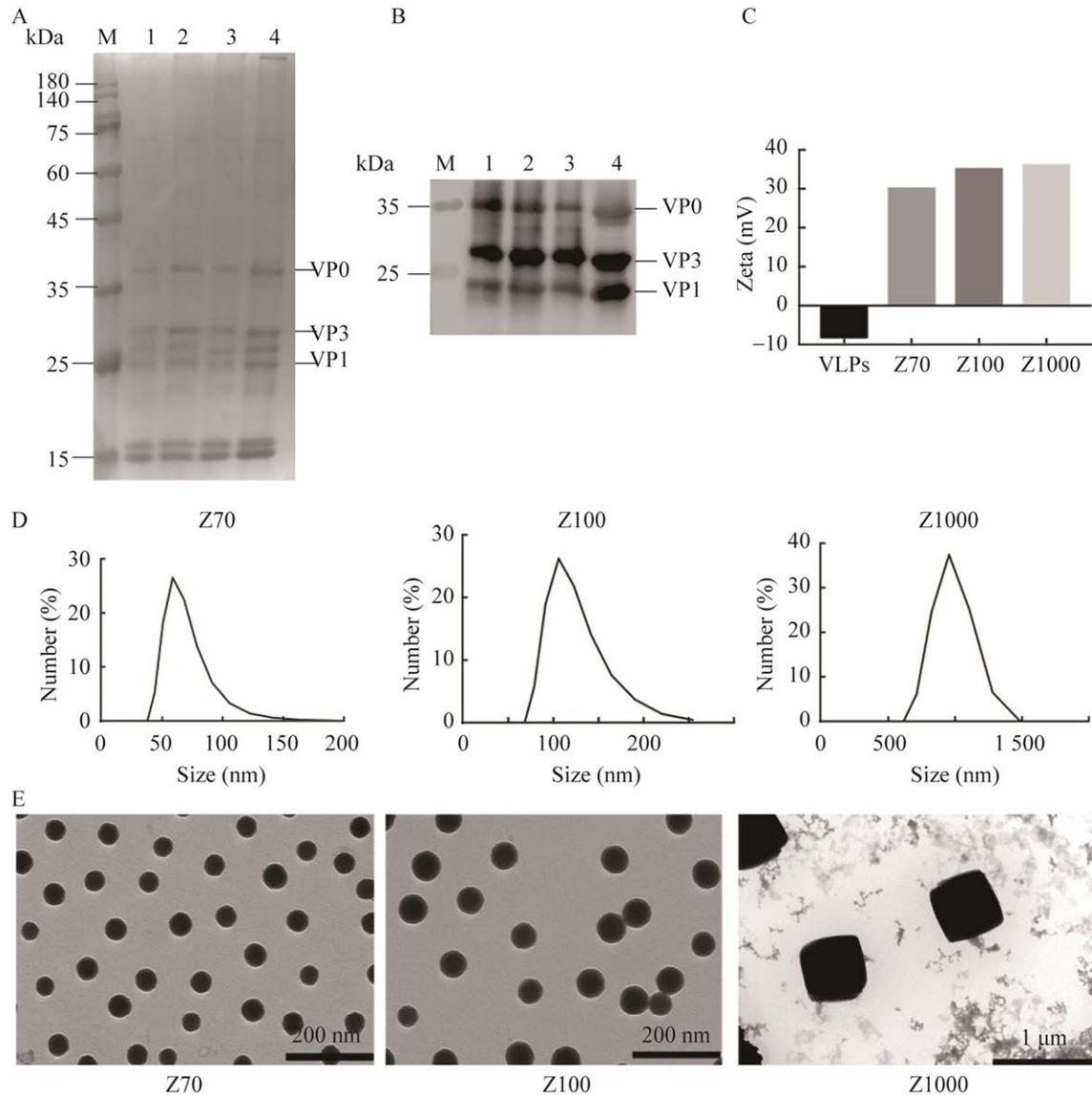


图 2 三种不同粒径的 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物的合成与表征 A: FMDV VLPs 生物矿化后 SDS-PAGE 分析. M: 蛋白分子质量标准; 1: Z70; 2: Z100; 3: Z1000; 4: FMDV VLPs. B: FMDV VLPs 生物矿化后 Western blotting 分析. M: 蛋白分子质量标准; 1: Z70; 2: Z100; 3: Z1000; 4: FMDV VLPs. C: FMDV VLPs 以及 3 种不同粒径的 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物表面电势的测定. D: Z70、Z100 和 Z1000 水合粒径的纳米粒度仪检测. E: Z70、Z100 和 Z1000 尺寸与形貌的透射电镜分析

Figure 2 Synthesis and characterization of three FMDV VLPs-ZIF-8 complexes with different sizes. A: FMDV VLPs biom mineralization followed by SDS-PAGE analysis. M: Protein molecular quality standard; 1: Z70; 2: Z100; 3: Z1000; 4: FMDV VLPs. B: Western blotting analysis after FMDV VLPs biom mineralization. M: Protein molecular quality standard; 1: Z70; 2: Z100; 3: Z1000; 4: FMDV VLPs. C: FMDV VLPs and determination of the surface potential of FMDV VLPs-ZIF-8 complexes of three different particle sizes. D: The size of Z70, Z100 and Z1000 were analyzed by DLS. E: TEM analysis of Z70, Z100 and Z1000 sizes and morphology.

2.3 FMDV VLPs-ZIF-8 的细胞毒性

为了证实 Z70、Z100 和 Z1000 是可以免疫注射的具有良好生物安全性的复合物，通过 MTS 检测了它们的细胞毒性。结果如图 3 所示，3 种复合物在浓度达到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均无明显的细胞毒性，显示 Z70、Z100 与 Z1000 具有良好的生物相容性。

2.4 FMDV VLPs-ZIF-8 的组织病理学试验

为了进一步分析矿化复合物对动物机体的

损伤情况，采集免疫小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏，用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色分析 Z70、Z100 与 Z1000 复合物免疫小鼠后主要组织脏器的病理变化，进一步检测矿化复合物作为疫苗的生物安全性。结果如图 4 所示，3 种尺寸的矿化复合物均未引起免疫动物心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏明显病理变化，进一步证实 Z70、Z100 与 Z1000 复合物具有较好的生物相容性。

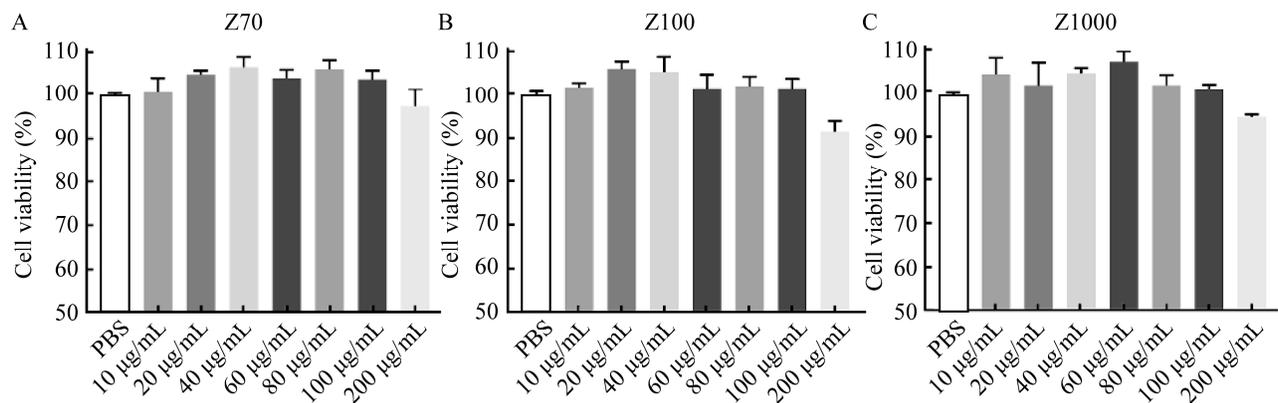


图 3 FMDV VLPs-ZIF-8 的细胞毒性分析

Figure 3 Cytotoxicity analysis of FMDV VLPs-ZIF-8.

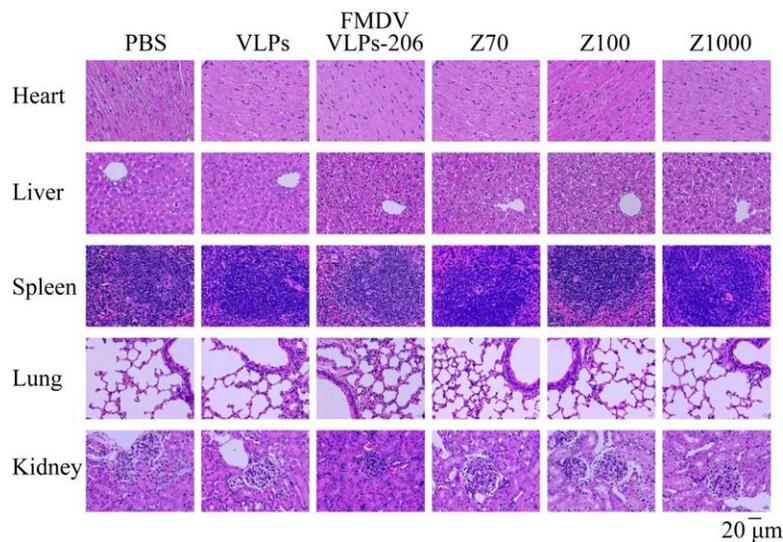


图 4 PBS、FMDV VLPs、FMDV VLPs-206 和 FMDV VLPs-ZIF-8 免疫后小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏组织病理学试验分析(HE 400 \times)

Figure 4 Histopathological analysis of the heart, liver, spleen, lung, and kidney in mice after immunization with PBS, FMDV VLPs, FMDV VLPs-206, and FMDV VLPs-ZIF-8 (HE 400 \times).

2.5 FMDV VLPs-ZIF-8 细胞摄取试验

为检测 FMDV VLPs-ZIF-8 的细胞摄取, 将 VLPs 和 FMDV VLPs-ZIF-8 加入 BHK-21 细胞, 分别孵育 0、1、2、4、6 h, 通过 Western blotting 检测摄取情况。结果如图 5 所示, 不同尺寸的 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物摄取效果明显优于 FMDV VLPs, 且随着尺寸的减小细胞摄取的效果

率升高。

2.6 特异性抗体和中和抗体检测

为了测定不同尺寸矿化复合物免疫小鼠后诱导机体产生的免疫应答水平, 用液相阻断 ELISA 法测定二免后 14 d 的特异性抗体水平; 用微量病毒中和试验检测小鼠二免疫后 2 周血清的中和抗体水平。结果如图 6 所示, Z70、Z100

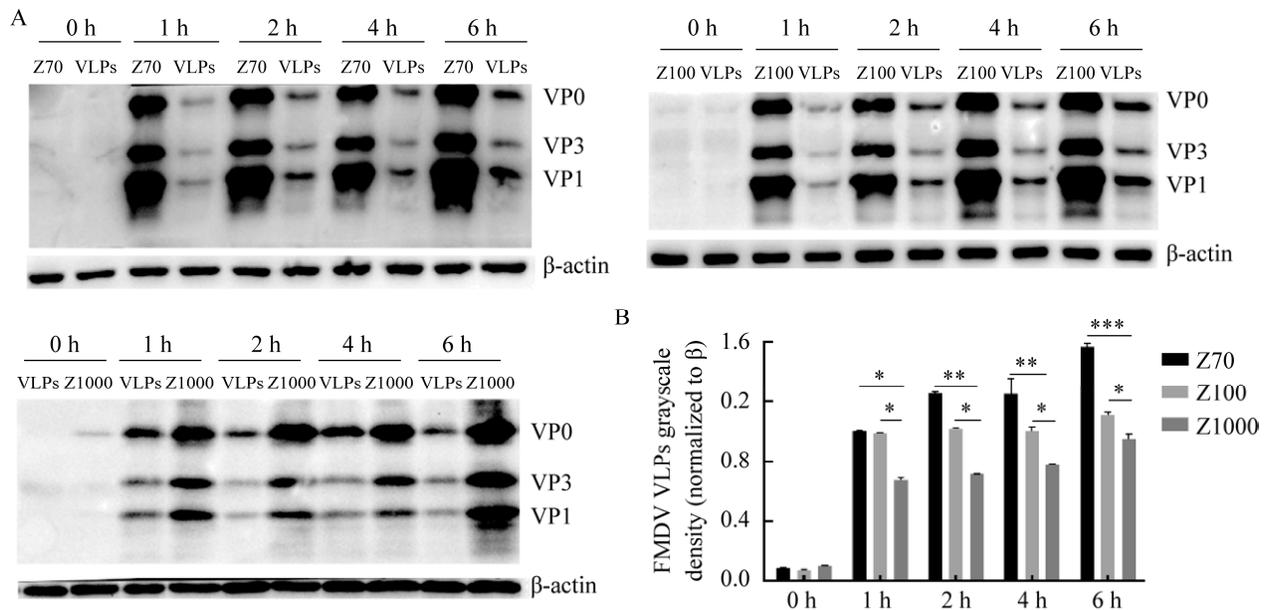


图 5 细胞摄取试验 A: FMDV VLPs 和不同粒径 FMDV VLPs-ZIF-8 细胞摄取水平的 Western blotting 分析. B: FMDV VLPs-ZIF-8 细胞摄取水平的 Western blotting 灰度分析

Figure 5 Cell uptake assay. A: Western blotting analysis of the uptake levels of FMDV VLPs and FMDV VLPs-ZIF-8 cells with different sizes. B: Western blotting grayscale analysis of FMDV VLPs-ZIF-8 cell uptake levels. Significance analysis revealed P values of ≤ 0.1 (*), P values of ≤ 0.05 (**), and P values of ≤ 0.01 (***) for Z70, Z100, and Z1000 respectively.

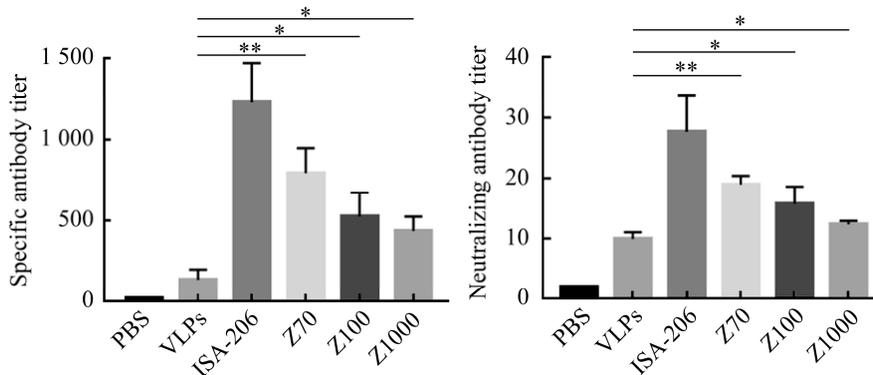


图 6 免疫后各实验组小鼠血清的特异性抗体水平与中和抗体水平检测

Figure 6 Specific antibody titer and neutralization antibody titer in serum from immunized mice. Significance analysis revealed P values of ≤ 0.1 (*), P values of ≤ 0.05 (**), and P values of ≤ 0.01 (***) for Z70, Z100, and Z1000 respectively.

与 Z1 000 免疫组小鼠产生的特异性抗体和中和抗体水平显著高于 FMDV VLPs 免疫组,并且随着矿化复合物尺寸的减小,其诱导机体产生的特异性抗体水平升高。

3 讨论与结论

FMD 是一种高度传染性疾病,严重影响家畜和野生偶蹄动物。FMD 在我国是强制免疫的疫病之一,疫苗是防控 FMD 的有效手段。虽然传统灭活苗能诱导良好的免疫反应,提供较好的保护,但也存在生产过程中 FMDV 逃逸风险、不易区分免疫与感染动物等不足之处^[16]。VLPs 疫苗由于具有较高的安全性及良好的免疫效果成为公认最有潜力的候选疫苗之一。目前 FMD 疫苗通常使用油乳佐剂,但是油乳佐剂也存在明显的副作用,容易出现局部毒性、局部组织损伤和炎症反应,甚至会引起全身症状^[17]。为进一步提高 VLPs 的免疫效果,同时减少佐剂副作用,开发良好的佐剂是非常重要的。

ZIF-8 的结构非常适合生物分子的固定和递送,已经作为一种良好的递送平台广泛用于生物医学研究,例如疫苗的递送^[18]。本研究将 Zn^{2+} 和 2-甲基咪唑与 FMDV VLPs 混合后成功形成了包封 FMDV VLPs 的矿化复合物。Zeta 电位结果表明,ZIF-8 包封 FMDV VLPs 的复合物表面带正电荷,随后试验表明 FMDV VLPs-ZIF-8 相较于单独的 FMDV VLPs 更易被细胞摄取。这是由于细胞表面呈负电荷,更有利于与带正电的 FMDV VLPs-ZIF-8 相互作用,利于促进细胞的摄取^[19]。此外,细胞毒性试验和组织病理学试验表明,ZIF-8 材料表现出良好的生物相容性,这可能由于 Zn^{2+} 是负责催化和功能调节的必需微量元素之一^[20],良好的生物相容性对疫苗非常重要,不仅可以辅助疫苗,同时还有助于降低产生不良反应的风险^[21]。

ZIF-8 不仅具有良好的生物相容性,还可以通过多种方式增强抗原免疫效果,例如,ZIF-8 可以提高细胞摄取抗原的水平,从而提高动物免疫反应^[22]。通过细胞摄取试验表明 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物的抗原内化明显高于 VLPs 本身,说明 ZIF-8 增加了 FMDV VLPs 的细胞摄取含量。通过动物试验表明,Z70、Z100 与 Z1000 3 种不同尺寸的 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物均可刺激机体产生比单独 FMDV VLPs 更高水平的免疫应答。并且本研究表明不同的粒径诱导机体产生不同的免疫效果,随着尺寸减小,产生的抗体水平随之增加,这是由于随着纳米颗粒的体积降低,其比表面积上升,具有更高的比表面积的纳米颗粒可以更有效地穿透生物屏障被细胞吸收^[23-24],从而产生良好的免疫效果。当纳米颗粒小于 200 nm 时,可以进入淋巴引流循环并增加抗原呈递^[25]。大小为 50 nm 左右可增加某些细胞标志物的表达,如 CD40、CD80 和 TNF- α 等免疫系统反应相关因子^[26]。总之,小尺寸的 FMDV VLPs-ZIF-8 复合物更有希望成为 FMDV 灭活疫苗的替代者。

综上所述,ZIF-8 可以作为疫苗的递送系统用于 FMDV VLPs 疫苗的开发,ZIF-8 具有良好的生物相容性,能够改善抗原的免疫原性,使抗原被免疫细胞有效识别并激活显著特异免疫反应。因此,本研究为 ZIF-8 作为疫苗佐剂,特别是 VLPs 疫苗的佐剂提供了新思路 and 参考数据,未来将会是一个非常具有潜力的开发方向。

REFERENCES

- [1] 苗海生,李乐,信爱国,廖德芳,胡骑,李华春,王继华,朱明旺. 口蹄疫疫苗综述[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2010(6): 14-15.
MIAO HS, LI L, XIN AG, LIAO DF, HU Q, LI HC, WANG JH, ZHU MW. Review of foot-and-mouth disease vaccine[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and

- Veterinary Medicine, 2010(6): 14-15 (in Chinese).
- [2] KOPLIKU L, RELMY A, ROMNEY A, GORNA K, ZIENTARA S, BAKKALI-KASSIMI L, BLAISE-BOISSEAU S. Establishment of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection in MDBK cells[J]. Archives of Virology, 2015, 160(10): 2503-2516.
- [3] DIAZ-SAN SEGUNDO F, MEDINA GN, STENFELDT C, ARZT J, de LOS SANTOS T. Foot-and-mouth disease vaccines[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 206: 102-112.
- [4] 卢曾军. 口蹄疫疫苗研究与防控实践[J]. 饲料与畜牧, 2018(6): 1.
LU ZJ. Research and control of foot-and-mouth disease vaccine[J]. Feed and Husbandry, 2018(6): 1 (in Chinese).
- [5] HARDHAM JM, KRUG P, PACHECO JM, THOMPSON J, DOMINOWSKI P, MOULIN V, GAY CG, RODRIGUEZ LL, RIEDER E. Novel foot-and-mouth disease vaccine platform: formulations for safe and DIVA-compatible FMD vaccines with improved potency[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 554305.
- [6] ZDANOWICZ M, CHROBOCZEK J. Virus-like particles as drug delivery vectors[J]. Acta Biochimica Polonica, 2016, 63(3): 469-473.
- [7] WANG ND, ZHANG Y, LEI XN, YU WT, ZHAN Y, WANG DL, ZHANG JX, WANG AB, XIAO LH, JIANG P, YANG Y. Optimized conditions for preserving stability and integrity of porcine circovirus type2 virus-like particles during long-term storage[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 243: 146-150.
- [8] DU P, LIU RH, SUN SQ, DONG H, ZHAO RB, TANG RK, DAI JW, YIN H, LUO JX, LIU ZX, GUO HC. Biomaterialization improves the thermostability of foot-and-mouth disease virus-like particles and the protective immune response induced[J]. Nanoscale, 2019, 11(47): 22748-22761.
- [9] YANG Y, CHEN Q, WU JP, KIRK TB, XU JK, LIU ZH, XUE W. Reduction-responsive codelivery system based on a metal-organic framework for eliciting potent cellular immune response[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(15): 12463-12473.
- [10] ZOU KY, LI ZX. Frontispiece: controllable syntheses of MOF-derived materials[J]. Chemistry-a European Journal, 2018, 24(25): 6506-6518.
- [11] CHEN TT, YI JT, ZHAO YY, CHU X. Biomaterialized metal-organic framework nanoparticles enable intracellular delivery and endo-lysosomal release of native active proteins[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(31): 9912-9920.
- [12] 徐晓微, 张恺, 赵亮, 王丹丹, 杨柏, 林崇韬, 孙宏晨. 不同尺寸二氧化硅纳米颗粒对细胞摄取和功能的研究[C]. 第十次全国牙周病学学术会议, 2014: 1.
XU XW, ZHANG K, ZHAO L, WANG DD, YANG B, LIN CT, SUN HC. Effects of SiO₂ nanoparticles of different sizes on cell uptake and function[C]. The 10th National Academic Conference on Periodontology, 2014: 1 (in Chinese).
- [13] 贾吉磊. 基于碳酸钙微球的乙肝疫苗佐剂构建及免疫增强效果研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 博士学位论文, 2017.
JIA JL. Fabrication of CaCO₃ microspheres and its application as vaccine adjuvants for hepatitis B vaccine[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2017 (in Chinese).
- [14] METWALLY S, STACHEWICZ U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications[J]. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications, 2019, 104: 109883.
- [15] GUO HC, SUN SQ, JIN Y, YANG SL, WEI YQ, SUN DH, YIN SH, MA JW, LIU ZX, GUO JH, LUO JX, YIN H, LIU XT, LIU DX. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in Guinea pigs, swine and cattle[J]. Veterinary Research, 2013, 44(1): 1-13.
- [16] CAO YM, LU ZJ, LIU ZX. Foot-and-mouth disease vaccines: progress and problems[J]. Expert Review of Vaccines, 2016, 15(6): 783-789.
- [17] PETROVSKY N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs[J]. Drug Safety, 2015, 38(11): 1059-1074.
- [18] ZHANG Y, WANG F, JU E, LIU Z, CHEN Z, REN J, QU X. Metal-organic-framework-based vaccine platforms for enhanced systemic immune and memory response[J]. Advanced Functional Materials, 2016, 26(35): 6454-6461.
- [19] LANDGRAF L, MÜLLER I, ERNST P, SCHÄFER M, ROSMAN C, SCHICK I, KÖHLER O, OEHRING H, BREUS VV, BASCHÉ T, SÖNNICHSEN C, TREMEL W, HILGER I. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization[J]. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2015, 6: 300-312.

- [20] ROOHANI N, HURRELL R, KELISHADI R, SCHULIN R. Zinc and its importance for human health: an integrative review[J]. *Journal of Research in Medical Sciences: the Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 2013, 18(2): 144-157.
- [21] SUZUKI H, ADLER A, HUANG TW, KURAMOCHI A, OHBA Y, SATO Y, NAKAMURA N, MANIVEL V, EKDAHL K, NILSSON B, ISHIHARA K, TERAMURA Y. Impact of spontaneous liposome modification with phospholipid polymer-lipid conjugates on protein interactions[J]. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2022, 23: 845-857.
- [22] PENG F, XIANG Y, WANG H, HU Y, ZHOU R, HU Y. Biomimetic assembly of spore@ ZIF-8 microspheres for vaccination[J]. *Small*, 2022, 18(38): 2204011.
- [23] SHI WD, WANG JZ, FAN XJ, GAO HJ. Size and shape effects on diffusion and absorption of colloidal particles near a partially absorbing sphere: implications for uptake of nanoparticles in animal cells[J]. *Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2008, 78(6 Pt 1): 061914.
- [24] PANYAM J, DALI MM, SAHOO SK, MA WX, CHAKRAVARTHI SS, AMIDON GL, LEVY RJ, LABHASETWAR V. Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles[J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 92(1/2): 173-187.
- [25] OH N, PARK JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9(suppl 1): 51-63.
- [26] KIM S, OH WK, JEONG YS, HONG JY, CHO BR, HAHN JS, JANG J. Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(9): 2342-2350.

(本文责编 郝丽芳)