

DOI:10.13350/j.cjpb.230223

• 综述 •

基于细胞毒性 T 淋巴细胞通用流感疫苗的展望

高晓洋¹, 刘静^{2*}, 梁高峰^{1**}

(1. 河南科技大学医学院, 河南洛阳 471023; 2. 河南大学基础医学院)

【摘要】 目前, 流感疫苗的接种策略是诱导产生针对流感病毒表面抗原的抗体。然而, 流感病毒表面抗原的频繁变化使它们能够逃避抗体介导的免疫。以甲型流感病毒的 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)为靶点的免疫抗原群对流感病毒亚型具有广泛的交叉反应性, 可作为开发通用流感疫苗的新方向。本文探讨 CTL 反应在流感病毒防控中的作用及交叉保护性 CTL 流感疫苗的研究现状, 分析交叉保护性 CTL 反应来改善流感疫苗保护效果以及在尝试诱导此类免疫时机制, 基于这些原则设计的流感疫苗将对流感病毒的大流行可起到较好的防控作用。

【关键词】 流感疫苗; 交叉保护; CTL; CD8⁺ T 细胞; 综述

【中图分类号】 R373.14

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)02-0238-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Feb;18(2):238-242,247.]

Prospect for influenza vaccine based on cytotoxic T lymphocytes

GAO Xiao-yang¹, LIU Jing², LIANG Gao-feng¹ (1. Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China; 2. Basic Medical College, Henan University)

【Abstract】 The current strategy for influenza vaccination is to induce the production of antibodies against the surface antigens of the influenza virus. However, frequent changes in the surface antigens of influenza viruses allow them to evade antibody-mediated immunity. The immune antigen clusters targeting CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) of influenza A virus have broad cross-reactivity to influenza virus subtypes and can be used as a new direction for the development of universal influenza vaccines. This paper discusses the role of CTL response in influenza virus prevention and control and the current status of research on cross-protective CTL influenza vaccines, analyzes the cross-protective CTL response to improve influenza vaccine protection and the mechanism when trying to induce such immunity. An influenza vaccine designed based on these principles would provide better prevention and control of influenza virus pandemics.

【Key words】 influenza vaccine; cross-protective; CTL; CD8⁺ T cell; review

***流感是由流感病毒引起的急性呼吸道疾病, 流感平均每年导致约 25 万~50 万人死亡, 而随着一种新亚型病毒的出现, 这一数字可能会上升到数百万(<https://www.who.int>)^[1]。预防流感感染的最佳形式是可产生高滴度病毒中和抗体的疫苗接种, 此类抗体可在呼吸道中起作用并限制病毒在宿主中的传播。尽管常用的季节性流感灭活疫苗可诱导针对对应病毒株的保护性反应, 但随着循环病毒的积累突变, 其有效性逐渐下降。疫苗株需定期更新, 但由于无法预测未来流感流行毒株, 且疫苗研制时间较长, 因此较难实现疫苗株与流行毒株的匹配。此外, 无论疫苗株与人类流行毒株的匹配程度如何, 也不可能提供针对新亚型毒株的显著保护。

高致病性甲型禽流感病毒可在家禽和野生鸟类中持续流行, 且人类不断出现感染了甲型禽流感病毒的病例, 可见开发对所有甲型流感病毒产生异源交叉免疫力的疫苗的重要性。开发基于甲型流感病毒保守内部抗原设计的可介导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)产生广泛交叉保护反应的通用流感疫苗备受关注。在自然感染流感病毒的情况下, 主要由识别病毒内部保守成分的 CD8⁺ T CTL 介导的交叉保护免疫在一定程度上发挥作用^[2]。目前, 现有的疫苗不会诱导 CTL 反应, 只能微弱地增强原有的记忆性 CD8⁺ T 细胞反应^[3]。

对当前的流感疫苗进行优化、设计、改造, 使其包含可有效

激活交叉保护性 CTL 反应的成分。该策略将有效改善人类对季节性流感病毒漂移变种后的保护水平, 同时还可大大降低未来流感大流行毒株带来的影响。本研究介绍了基于 CTL 流感疫苗的研究现状, 并讨论了在开发可诱导交叉保护性流感病毒特异性 CTL 反应疫苗时需要注意的一些免疫学问题。

1 CTL 在流感病毒清除中的关键作用

研究表明, 小鼠呼吸道病毒载量减少与 CD8⁺ CTL 反应相关^[4]。在攻毒之前 CD4⁺ T 细胞的耗竭对实验动物感染病程程度无影响^[5]。CD4⁺ T 细胞可通过产生抗病毒细胞因子来降低病毒滴度, 为记忆 CD8⁺ T 细胞的启动提供基本信号。在幼龄动物身上, 流感病毒的清除主要由 CTL 反应介导^[6]。在缺乏特异性中和抗体时, 通过感染不同亚型的病毒或接种 CD8⁺ T 细胞诱导免疫原引起的高水平 CD8⁺ 记忆 T 细胞, 可实现对后

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32102751); 河南省青年人才托举工程项目(No. 2021HYTP056); 河南省科技攻关项目(No. 222102310093)。

** **【通讯作者】** 刘静, Email: 15294861003@163.com
梁高峰, Email: lgfeng990448@163.com

【作者简介】 高晓洋(1987-), 男, 河南柘城人, 硕士, 研究方向为微生物学。E-mail: 771065523@qq.com

续感染的控制^[7-8]。CD8⁺T 细胞不会介导对感染的保护,它们不能发挥其效应器功能,除非发生靶细胞感染,且产生其在上皮细胞上的识别结构,即携带病毒肽的主要组织相容性复合体 MHC I 类分子。CTL 反应可限制疾病的发展程度,此作用是通过在释放子代病毒之前裂解受感染细胞来实现病毒的清除,由此产生的病毒载量降低更容易被发展中的抗体反应中和^[5]。CTL 通过不同的机制非常有效地杀死受感染的靶细胞,从而消除感染生物体的病毒。在流感病毒感染的情况下,已经证明这种类型的免疫可以保护小鼠免受甲型流感病毒的致命攻击^[9]。

CD8⁺T 细胞消除流感病毒感染的效应机制主要由颗粒介导的细胞毒性,涉及穿孔素、颗粒酶,可能还包括一些细胞因子的产生^[10]。干扰素 IFN- γ 在控制流感感染中的作用证据不一,它对于将效应 T 细胞募集到受感染的肺组织中至关重要^[11]。来自肺实质、支气管肺泡灌洗液、纵隔淋巴结和脾脏的 CD8⁺T 细胞表达一种或多种编码穿孔素、颗粒酶 A、B 和 K 以及 IFN- γ 的 mRNA,且可在一些原发性流感病毒感染的人的胞内染色组织中检测到 IFN- γ 和颗粒酶 B 蛋白^[2]。颗粒酶 B 的产生也被证实与人类感染流感有关^[12]。

2 疫苗接种诱导交叉保护性 CTL 应答的潜在益处

如果 CTL 是由接触流感病毒引起的,记忆性 CD8⁺T 细胞的存在可能是大多数未接种疫苗的健康成年人不会患上非常严重的流感疾病的原因。感染流感后,CD8⁺T 细胞记忆群将被提升到足以改善后续感染的水平。然而,已证明 CD8⁺T 细胞介导的免疫在小鼠体内随着时间推移迅速减弱,在感染后几个月内消失^[13]。在人类中可在体外召回的 CTL 活性的半衰期估计为 2~3 年^[14]。因此,一个群体中的个体在进入“流感季节”时可能具有非常不同水平的交叉反应性记忆 CD8⁺T 细胞。中等水平的记忆性 CD8⁺T 细胞是否对疾病有影响,以及它们是否可以增强人体次优抗体反应的保护功效,是值得挖掘的问题。小鼠模型实验结果显示,为了充分有效地对抗强毒株,记忆性 CD8⁺T 细胞的数量必须足够多,以至于记忆性 CD8⁺T 细胞在召回时几乎不需要额外的增殖,从而使病毒的复制得到迅速控制,不同程度减少了病毒引起的损伤。将记忆性 CD8⁺T 细胞维持在此保护水平将是 CTL 诱导疫苗的目标。

记忆 CD8⁺T 细胞反应的最佳水平可能对抗体诱导疫苗效力相对较低的老年人至关重要。研究表明,流感病毒特异性 CD8⁺T 细胞的前体频率高低在年轻组和老年组中无差异^[15]。老年组的研究结果表明,与抗体反应相比,高 IFN- γ /IL-10 比值和高颗粒酶 B 活性是疫苗接种后流感疾病持续风险的更敏感标志物,提示 CTL 免疫对保护老年组发挥一定的作用^[16]。

在传统疫苗不匹配的情况下,或在经历“抗原原罪”的老年人中,强 CD8⁺T 细胞反应的共同激发可抵抗病毒的感染^[17]。如果普遍使用的疫苗除了能诱导针对循环毒株的抗体外,还能显著增强异亚型 CD8⁺T 细胞反应,那么人类在大流行开始时就会得到一定的保护。当感染 H5N1 大流行性病毒的情况下,全球生产诱导特异性抗体疫苗的能力远远低于为世界人口接种疫苗所需的能力^[18]。

3 CTL 流感疫苗的候选蛋白

与表面糖蛋白不同,位于流感病毒粒子内的蛋白质(例如 NP 和 M1)由于它们在病毒复制周期中的功能作用而高度保

守。它们不能在受感染或免疫的动物中诱导中和抗体,但它们能够诱导强大的细胞免疫。研究表明从感染某种甲型流感病毒亚型中恢复的小鼠对异源毒株的致命攻击具有一定的保护作用,并且这种现象的免疫学基础主要由抗流感特异性 CTL 介导的^[19-20]。CTL 对流感病毒蛋白高度保守的氨基酸序列的识别,主要是通过病毒进入机体后病毒颗粒内的蛋白激活细胞表面的 MHC I 类途径进行的^[21-23],CTL 反应与人类保护之间存在相关性^[24,25]。从欧洲受试者获得的多克隆病毒特异性 CD8⁺T 细胞群与 H5N1 病毒衍生肽或 H5N1 病毒 NP 基因转染的细胞存在交叉反应性,这表明人类 CTL 反应对多样化的流感病毒亚型表现出高度的交叉反应性^[26]。早期对使用纯化重组 NP (rNP)蛋白作为疫苗抗原的 CTL 疫苗的研究,进一步证实了含有携带 NP 基因的疫苗能够保护小鼠免受异源流感病毒的致命挑战^[27]。尽管抗体特异性不合适,但其诱导的 CD8⁺ CTL 反应将会降低新出现的病毒亚型引起的发病率和死亡率^[28]。

4 诱导 CTL 反应的流感疫苗的研究现状

4.1 减毒活疫苗 病毒蛋白的细胞溶质递送是有效的 MHC I 类限制性呈递和随后诱导 CD8⁺ CTL 反应的必要条件,并且是在抗原呈递细胞感染期间实现的。

流感减毒活疫苗的使用会提高细胞介导的免疫力^[29-30]。流感减毒活疫苗是自 1960 年代以来开发的,减毒是通过病毒适应低温(25-33 °C)进行复制而获得的,仅导致轻微的上呼吸道感染。冷适应疫苗的鼻内给药通常会诱导良好的免疫反应,包括局部 IgA 反应和 CTL 反应^[31]。这些疫苗的有效性表明诱导的保护性免疫并不总是与血清抗体反应的大小相关^[32]。目前,已有减毒活流感疫苗在美国注册,以 2~59 岁人群作为受试者。同样在俄罗斯,减毒活流感疫苗已经被评估和使用了约 50 年。

4.2 病毒载体疫苗 表达外源基因的重组病毒载体可被用作疫苗研发,多种 DNA 和 RNA 病毒已被用于传递靶基因和诱导免疫反应,包括重组腺病毒、痘病毒、甲病毒、麻疹病毒和疱疹病毒,它们目前处于不同的发展阶段^[33-34]。为了获得良好的安全性,大多数病毒载体都是基于减毒或复制缺陷病毒。可以预期,除了体液和 CD4⁺T 细胞反应之外,这些病毒载体还可诱导 CTL 反应,因为这些载体驱动受感染细胞中靶蛋白的合成。确实已有研究表明其中一些候选疫苗会引发对感兴趣的蛋白质特异的 CD8⁺ CTL 反应^[34]。使用腺病毒载体递送 HIV-1 病毒蛋白 Gag、Pol 和 Nef 也被认为是一种有前途的候选疫苗,旨在诱导 HIV-1 特异性 CTL 反应。载体疫苗具有免疫原性,并且在猕猴和人类中证实了 HIV-1 特异性 CTL 反应^[35-36]。使用表达流感病毒蛋白 NP 和 M2(全长或 M2e)的重组腺病毒载体进行小鼠免疫实验研究,结果表明流感疫苗诱导的 CTL 反应对小鼠的保护极为有效^[37-38]。此外,一种采用类似方法构建的重组改良型安卡拉痘苗病毒(MVA)流感疫苗,是以 MVA 为载体来编码流感病毒 NP 和 M1 蛋白。在 I 期临床试验中,该重组疫苗在免疫人群中产生有效的 CD8⁺T 细胞特异性免疫;在健康志愿者中进行的一项 II 期临床试验表明,这种疫苗在感染活病毒后能够减缓流感症状^[39]。

4.3 佐剂形式疫苗 另一种诱导病毒特异性 CTL 反应的方法是使用基于免疫刺激复合物 (ISCOM) 的佐剂疫苗。

ISCOM由胆固醇、磷脂、病毒蛋白和 Quil A 佐剂的糖苷组成^[40]。ISCOM的各个组成部分可以形成典型的结构,可以很容易地通过电子显微镜识别,其直径约为 40 nm^[40]。此外,与传统灭活疫苗相比,使用 ISCOM 制备物进行疫苗接种会产生强烈的 T 细胞反应,同时也优化了抗原递送的过程,且在用外源蛋白免疫后可获得强烈的 CTL 反应^[41-42]。在小鼠实验研究中,表明 ISCOM 可大大提高商业疫苗的效率,增加了对异亚型毒株的保护和 CTL 反应^[43]。基于 ISCOM 的流感疫苗已在临床试验中进行了评估。在人类中,与接受无佐剂疫苗的个体相比,用 ISCOM 配制的三价灭活流感疫苗可引起急剧增加的 CTL 反应^[44-45]。ISCOM 显著增加抗 HA CTL 反应,但不是抗 NP CTL 反应,这与体内感染流感病毒后抗 NP CTL 反应占主导地位的情况不同^[45]。为预防禽流感,基于 ISCOM 技术的疫苗已被开发并注册。

除 ISCOM 外,联合其它同类佐剂配制的 rNP 流感疫苗也可有效保护接种动物免受同源或异源病毒致命攻击。霍乱毒素联合 rNP 鼻内给药可抵御多种流感病毒亚型^[46]。配制重组 NP 和 M2 蛋白组合的脂质体疫苗可刺激特定 CTL 的显著增加,且保护接种疫苗的小鼠免受 H5N1 禽流感毒株的致命攻击^[47]。用 rNP 和 TLR3 配体配制的疫苗可诱导特异性 CTL 并保护动物免受流感病毒的致命挑战^[48]。Savard 等^[49]研究表明分裂病毒粒子类季节性流感疫苗在免疫小鼠后没有产生针对 NP 和 M 蛋白的免疫原性。然而,他们发现用木瓜花叶病毒(PapMV)纳米颗粒为佐剂的相同疫苗对小鼠和雪貂进行免疫后,触发了针对 NP 和 M1 蛋白的 CTL 介导的免疫反应,并在受到异亚型流感毒株攻击时产生了持久性保护作用。另外,对源自流感 NP 蛋白的 CTL 表位的 PapMV 纳米颗粒进行动物实验,研究结果表明 PapMV 对触发疫苗产生有效的 CTL 反应至关重要^[50]。

基于上述现象得出如下结论,流感疫苗中所含的内源性 NP 或 M 蛋白保守性成分可被佐剂刺激产生较强的 CTL 反应。

5 CTL 流感疫苗开发的注意事项

5.1 特异性 CD8⁺T 细胞诱导

疫苗需要包含足以覆盖不同 MHC I 类单倍型个体的保守表位。研究表明,被识别的表位中大部分来自病毒内部蛋白,主要靶标是基质蛋白 M1^[51]。研究者采取不同的方法检测了捐赠者的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞对 H5N1 病毒整个内部蛋白补体表位肽有相当广泛的特异性交叉反应^[52]。除 M1 外,流感病毒核蛋白 NP 是诱导 H5N1 病毒交叉反应性 CD8⁺T 细胞应答的重要表位来源。这些研究为 CD8⁺T 细胞诱导疫苗在人类中有效性的评估和表位疫苗的构建提供了必要的信息。在某些情况下,表位诱导疫苗是非常有效的 CTL 诱导剂,可用于通用流感候选疫苗的开发^[53]。

构建疫苗时,避免免疫优势也是一个要考虑的因素^[54]。免疫优势是其中一种特异性的 CTL 反应主动抑制对其它表位的免疫反应的现象。利用“多肽”疫苗在小鼠体内传递多个 CD8⁺T 细胞表位来验证免疫优势存在的结果表明,在使用含有多个 CTL 表位的疫苗进行加强免疫将引起更广泛的交叉反应性^[55]。

5.2 APC 的抗原载量通过疫苗接种诱导 CD8⁺T 细胞反应

显然比诱导抗体甚至 CD4⁺T 细胞反应更困难,主要是因为疫苗抗原必须进入树突状细胞 DC 的 MHC I 类加工途径。流感病毒感染诱导的有效 CD8⁺T 细胞免疫不仅需要 DC 作为抗原提呈细胞的启动子,还需要 DC 的二次刺激以及淋巴结腔的最佳扩张^[56]。

经历凋亡的受感染呼吸道上皮细胞的 DC 摄取也是交叉呈递抗原的潜在来源。因此,预计减毒活病毒疫苗会产生强烈的 CD8⁺T 细胞反应。冷适应减毒活流感疫苗使病毒复制受限于上呼吸道,可在小鼠中诱导 CD8⁺T 细胞介导的异病毒亚型保护,并且对人类显著漂移的毒株显示出良好的疗效^[57]。然而,由于减毒疫苗的抗原刺激减少,这些交叉反应性 CD8⁺T 细胞反应的强度可能不是最佳的。通过各种方法灭活的全病毒疫苗已被证明能激发小鼠的 CTL 反应,当用于活化 DC 时,可以在体外有效地召回人类记忆性 CD8⁺T 细胞的反应^[58-59]。另外,微粒递送形式疫苗也可有效激活 CTL 反应,如基于 ISCOM 的疫苗可通过流感病毒受体或含脂质颗粒与细胞膜直接融合将抗原递送至 DC,但疫苗设计必须包含病毒内部 NP 蛋白为靶标抗原^[60-61]。许多其他 DC 表面摄取受体也有可能用于有效递送疫苗,如 DNA 疫苗是动物模型中抗流感 CTL 反应特别好的诱导剂,被认为通过受体介导的摄取可直接进入 DC^[62]。

CD8⁺T 细胞决定簇及流感病毒内部蛋白的肽没有靶向性,必须依靠低效的液相胞饮作用才能获得 DC。尽管最小表位肽可以直接加载到 DC 的 MHC I 类分子上,但这可能不会刺激 DC 激活所需的其它信号。CTL 反应可被脂肽成功诱导特别是那些通过 Toll 样受体 2(TLR2)配体将肽靶向 DC 以有效诱导保护性记忆 CD8⁺T 细胞反应。TLR2 是一种摄取受体,疫苗上的 TLR2 配体可实现靶标的靶向、加载和 DC 激活。

5.3 记忆和位置的重要性

记忆 T 细胞提供了一个扩大的、分布更广的特定细胞库,在病毒感染时可快速诱导记忆反应。研究表明记忆 CD8⁺T 细胞是从效应 T 细胞库中产生的,CD8⁺T 细胞记忆不依赖于抗原持久性^[63]。产生和维持 CD8⁺记忆细胞的最关键要求是在初级激活过程中存在辅助性 CD4⁺T 细胞。对疫苗的反应不如由病毒感染引起的反应持久。与病毒感染相比,疫苗可能需要诱导更大的记忆性 CD8⁺T 细胞库。由于该库的大小与初级效应子群体的大小并不成正比,因此需要更好地了解记忆前体形成的驱动因素,以最大限度地提高记忆反应。

记忆 T 细胞基于它们的归巢受体表达被分为两组:CD62L 高 CCR7⁺中央记忆细胞(TCM)通过血液和次级淋巴器官运输,而 CD62L 低 CCR7⁻效应记忆细胞(TEM)存在于外周组织部位以及脾脏和血液。从广义上讲,这些亚群对再刺激的反应是存在差异的,TCM 具有更大的增殖能力,而 TEM 保留了裂解靶细胞和在受到病毒感染时立即分泌细胞因子的能力。正如针对 HIV 的 CTL 疫苗所争论的那样,对于疫苗来讲引发 TEM 可能特别重要,TEM 将持续存在于相关的粘膜部位(在流感感染的情况下为呼吸道),为感染性挑战做好早期反应准备。总之,开发有效、持久交叉反应的流感疫苗依赖于个体产生记忆 CD8⁺T 细胞的能力。

如上所述,在流感大流行期间,尤其是幼儿可能最容易患严重疾病和高死亡率,这可能是由于缺乏先前感染季节性流感

病毒诱导 CTL 免疫的结果。老年人也可能形成一个处于危险中的年龄组,因为免疫力下降和免疫衰老。因此,幼儿和老年人组可能从疫苗诱导的 CTL 免疫中获益最多,其他人群将受益于增强现有的 CTL 免疫力。

6 结语

传统的流感疫苗自推出以来未发生较大改变,未来流感疫苗的挑战是开发可诱导广泛保护性免疫的通用疫苗。通过克服这一挑战,流感大流行出现造成的影响也将显著减少。虽然对预防季节性流行性流感和大流行性流感的相关性的理解仍然存在差距,病毒特异性 CTL 反应有助于提高对流感病毒感染后的保护性免疫,特别是在没有针对爆发性流行毒株 HA 和 NA 蛋白特异性抗体存在的情况下,可有效改善感染流感病毒后的病情严重程度和死亡率。在大流行期间,诱导强、长寿命的记忆 CD8⁺ T 细胞免疫是诱导交叉保护性免疫的重要手段。目前人类流感感染情况下重要的蛋白 CTL 表位已被确定,但对将这些抗原递送到 DC 以在正确的位置引发正确类别的大量记忆反应尚不清楚。

综上,对实验疫苗和现有疫苗的优化改进和严格评估,且当有希望的候选疫苗进入临床试验时,应评估它们诱导交叉保护性 CTL 反应的能力。随着可用于评估 CTL 表位特异性反应、相关效应子功能和记忆表型的新工具的出现,可为新一代交叉保护性通用流感疫苗生产提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Estrada LD, Schultz-Cherry S. Development of a universal influenza vaccine[J]. J Immunol, 2019, 202(2):392-398.
- [2] Jansen JM, Gerlach T, Elbahesh H, et al. Influenza virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell-mediated immunity induced by infection and vaccination[J]. J Clin Virol, 2019(119):44-52.
- [3] Auladell M, Jia X, Hensen L, et al. Recalling the future: immunological memory toward unpredictable influenza viruses [J]. Front Immunol, 2019(10):1400.
- [4] Vogel OA, Manicassamy B. Broadly protective strategies against influenza viruses: universal vaccines and therapeutics[J]. Front Microbiol, 2020(11):135.
- [5] Cullen JG, McQuilten HA, Quinn KM, et al. CD4⁺ T help promotes influenza virus-specific CD8⁺ T cell memory by limiting metabolic dysfunction[J]. Pnas, 2019, 116(10):4481-4488.
- [6] Chen X, Liu S, Goraya MU, et al. Host immune response to influenza A virus infection[J]. Front Immunol, 2018(9):320.
- [7] Muruganandah V, Sathkumara HD, Navarro S, et al. A systematic review: the role of resident memory T cells in infectious diseases and their relevance for vaccine development [J]. Front Immunol, 2018(9):1574.
- [8] Campo JD, Bouley J, Chevandier M, et al. OVX836 Heptameric Nucleoprotein Vaccine Generates Lung Tissue-Resident Memory CD8⁺ T-Cells for Cross-Protection Against Influenza [J]. Front Immunol, 2021(12):678483.
- [9] Noisumdaeng P, Roytrakul T, Prasertsopon J, et al. T cell mediated immunity against influenza H5N1 nucleoprotein, matrix and hemagglutinin derived epitopes in H5N1 survivors and non-H5N1 subjects[J]. PeerJ, 2021(9):e11021.
- [10] Korenkov D, Isakova-Sivak I, Rudenko L. Basics of CD8 T-cell immune responses after influenza infection and vaccination with inactivated or live attenuated influenza vaccine[J]. Expert Rev Vaccines, 2018, 17(11):977-987.
- [11] Prabhu N, Ho AW, Wong KHS, et al. Gamma interferon regulates contraction of the influenza virus-specific CD8 T cell response and limits the size of the memory population[J]. J Virol, 2013, 87(23):12510-12522.
- [12] Salk HM, Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, et al. Granzyme B ELISPOT assay to measure influenza-specific cellular immunity[J]. J Immunol Methods, 2013(398):44-50.
- [13] Schmidt A, Lapuente D. T cell immunity against influenza: the long way from animal models towards a real-life universal flu vaccine[J]. Viruses, 2021, 13(2):199.
- [14] Kumar A, Mcelhaney JE, Walrond L, et al. Cellular immune responses of older adults to four influenza vaccines: Results of a randomized, controlled comparison [J]. Hum Vacc Immunother, 2017(9):2048-2057.
- [15] Dugan HL, Henry C, Wilson PC. Aging and Influenza Vaccine-Induced Immunity[J]. Cell Immunol, 2020(348):103998.
- [16] Lambert ND, Ovsyannikova IG, Pankratz VS, et al. Understanding the immune response to seasonal influenza vaccination in older adults: a systems biology approach [J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 11(8):985-994.
- [17] Adalja AA, Henderson DA. Original antigenic sin and pandemic (H1N1) 2009[J]. Em Infect Dis, 2010, 16(6):1028.
- [18] Sparrow E, Wood JG, Chadwick C, et al. Global production capacity of seasonal and pandemic influenza vaccines in 2019[J]. Vaccine, 2021, 39(3):512-520.
- [19] Hemann EA, Green R, Turnbull JB, et al. Interferon-λ modulates dendritic cells to facilitate T cell immunity during infection with influenza A virus[J]. Nat Immunol, 2019, 20(8):1035-1045.
- [20] Fiege JK, Block KE, Pierson MJ, et al. Mice with diverse microbial exposure histories as a model for preclinical vaccine testing[J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(12):1815-1827.
- [21] Jansen JM, Gerlach T, Elbahesh H, et al. Influenza virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell-mediated immunity induced by infection and vaccination[J]. J Clin Virol, 2019(119):44-52.
- [22] Zhang H, Zheng H, Guo P, et al. Broadly protective CD8⁺ T cell immunity to highly conserved epitopes elicited by heat shock protein gp96-adjuvanted influenza monovalent split vaccine[J]. J Virol, 2021, 95(12):e00507-21.
- [23] McGee MC, Huang W. Evolutionary conservation and positive selection of influenza A nucleoprotein CTL epitopes for universal vaccination[J]. J Med Virol, 2022, 94(6):2578-2587.
- [24] Schotsaert M, Cox RJ, Mallett CP. Pandemic influenza vaccine approaches: Current status and future directions [J]. Front Immunol, 2022(13):980956.
- [25] Tsang TK, Lam KT, Liu Y, et al. Investigation of CD4 and CD8 T cell-mediated protection against influenza A virus in a cohort study[J]. BMC Med, 2022, 20(1):1-13.
- [26] Auladell M, Jia X, Hensen L, et al. Recalling the future: immunological memory toward unpredictable influenza viruses [J]. Front Immunol, 2019(10):1400.

- [27] Machkovech HM, Bedford T, Suchard MA, et al. Positive selection in CD8⁺ T-cell epitopes of influenza virus nucleoprotein revealed by a comparative analysis of human and swine viral lineages[J]. *J virol*, 2015, 89(22):11275-11283.
- [28] Van de Sandt CE, Clemens EB, Grant EJ, et al. Challenging immunodominance of influenza-specific CD8⁺ T cell responses restricted by the risk-associated HLA-A* 68:01 allomorph[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1-16.
- [29] Jang YH, Seong BL. Immune responses elicited by live attenuated influenza vaccines as correlates of universal protection against influenza viruses[J]. *Vaccines*, 2021, 9(4):353.
- [30] Mohn KGI, Smith I, Sijns H, et al. Immune responses after live attenuated influenza vaccination [J]. *Hum Vacc Immunother*, 2018, 14(3):571-578.
- [31] Gasparini C, Acunzo M, Biuso A, et al. Nasal spray live attenuated influenza vaccine: the first experience in Italy in children and adolescents during the 2020-21 season[J]. *Ital J Pediatr*, 2021, 47(1):1-11.
- [32] Subbarao K. Live attenuated cold-adapted influenza vaccines[J]. *CSHr Perspect Med*, 2021, 11(9):a038653.
- [33] SHumphreys IR, Sebastian S. Novel viral vectors in infectious diseases[J]. *Immunology*, 2018, 153(1):1-9.
- [34] Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, et al. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact [J]. *Curr Opin Immunol*, 2016(41):47-54.
- [35] Liu G, Qin L, Li Y, et al. Subsequent malaria enhances virus-specific T cell immunity in SIV-infected Chinese rhesus macaques[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1):1-13.
- [36] Nyombayire J, Anzala O, Gazzard B, et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of an intranasally administered replication-competent Sendai virus vectored hiv type 1 gag vaccine; Induction of potent T-cell or antibody responses in prime-boost regimens[J]. *J Infect Dis*, 2017, 215(1):95-104.
- [37] Dhakal S, Loube J, Misplon JA, et al. Effect of an adenovirus-vectored universal influenza virus vaccine on pulmonary pathophysiology in a mouse model[J]. *J virol*, 2021, 95(9):e02359-20.
- [38] Xiang K, Ying G, Yan Z, et al. Progress on adenovirus-vectored universal influenza vaccines[J]. *Hum Vacc Immunother*, 2015, 11(5):1209-1222.
- [39] Janssens Y, Joye J, Waerlop G, et al. The role of cell-mediated immunity against influenza and its implications for vaccine evaluation[J]. *F Immunol*, 2022(13):959379.
- [40] Pearse MJ, Drane D. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2005, 57(3):465-474.
- [41] Wilson NS, Yang B, Morelli AB, et al. ISCOMATRIX vaccines mediate CD8⁺ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway[J]. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90(5):540-552.
- [42] Morelli AB, Becher D, Koernig S, et al. ISCOMATRIX; a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases[J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61(7):935-943.
- [43] Rivera-Patron M, Moreno M, Baz M, et al. ISCOM-like nanoparticles formulated with quillaja brasiliensis saponins are promising adjuvants for seasonal influenza vaccines [J]. *Vaccines*, 2021, 9(11):1350.
- [44] Cibulski SP, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF, et al. Novel ISCOMs from Quillaja brasiliensis saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake[J]. *Vaccine*, 2016, 34(9):1162-1171.
- [45] Cargnelutti DE, Sanchez MV, Mattion NM, et al. Development of a universal CTL-based vaccine for influenza[J]. *Bioengineered*, 2013, 4(6):374-378.
- [46] Lei H, Peng X, Jiao H, et al. Broadly protective immunity against divergent influenza viruses by oral co-administration of Lactococcus lactis expressing nucleoprotein adjuvanted with cholera toxin B subunit in mice[J]. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1):1-10.
- [47] Thueng-in K, Maneewatch S, Srimanote P, et al. Heterosubtypic immunity to influenza mediated by liposome adjuvanted H5N1 recombinant protein vaccines[J]. *Vaccine*, 2010, 28(41):6765-6777.
- [48] Jelinek I, Leonard JN, Price GE, et al. TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection[J]. *J Immunol*, 2011, 186(4):2422-2429.
- [49] Savard C, Gu rin A, Drouin K, et al. Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles[J]. *PLoS one*, 2011, 6(6):e21522.
- [50] Babin C, Majeau N, Leclerc D. Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP[J]. *J Nanobiotechnol*, 2013, 11(1):1-8.
- [51] Van de Sandt CE, Pronk MR, van Baalen CA, et al. Variation at extra-epitopic amino acid residues influences suppression of influenza virus replication by M1(58-66) epitope-specific CD8(+) T lymphocytes[J]. *J Virol*, 2018, 92(11):e00232-18.
- [52] Li Z, Zarnitsyna VI, Lowen AC, et al. Why Are CD8 T cell epitopes of human influenza A virus conserved? [J]. *J Virol*, 2019, 93(6):e01534-18.
- [53] Cargnelutti DE, MV S, Mattion NM, et al. Development of a universal CTL-based vaccine for influenza [J]. *Bioengineered Bugs*, 2013, 4(6):374-378.
- [54] Knight M, Changrob S, Li L, et al. Imprinting, immunodominance, and other impediments to generating broad influenza immunity[J]. *Immunol Rev*, 2020, 296(1):191-204.
- [55] Matsui M, Kohyama S, Suda T, et al. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A* 0201 transgenic mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(3):1494-1499.
- [56] Hemann EA, Green R, Turnbull JB, et al. Interferon- λ modulates dendritic cells to facilitate T cell immunity during infection with influenza A virus[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(8):1035-1045.
- [57] Tatiana K, Daniil K, Victoria M, et al. Live attenuated influenza vaccine viral vector induces functional cytotoxic T-cell immune response against foreign CD8+ T-cell epitopes inserted into NA and NS1 genes using the 2A self-cleavage site[J]. *Hum Vacc Immunother*, 2018, 14(12):2964-2970. (下转 247 页)

- Annu Rev Cell Dev Biol, 2012(28):337-362.
- [34] Admyre C, Johansson SM, Paulie S, et al. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT [J]. Eur J Immunol, 2006, 36(7):1772-1781.
- [35] Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014(30):255-289.
- [36] Skokos D, Le Panse S, Villa I, et al. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes[J]. J Immunol, 2001, 166(2):868-876.
- [37] Giri PK, Kruh NA, Dobos KM, et al. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages[J]. Proteomics, 2010, 10(17):3190-3202.
- [38] Ma D, Zhang QY, Rong HM, et al. Proteomic profiling and functional analysis of B cell-derived exosomes upon pneumocystis infection[J]. J Immun Res, 2022(2022):1-15.
- [39] Madison MN, Jones PH, Okeoma CM. Exosomes in human semen restrict HIV-1 transmission by vaginal cells and block intravaginal replication of LP-BM5 murine AIDS virus complex [J]. Virology, 2015(482):189-201.
- [40] Qian X, Xu C, Fang S, et al. Exosomal micrornas derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection[J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(9):1190-1203.
- [41] Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes[J]. Nature, 2013, 496(7445):367-371.
- [42] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(14):6328-6333.
- [43] Buck AH, Coakley G, Simbari F, et al. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity[J]. Nat Commun, 2014(5):5488.
- [44] Xia X, Yuan P, Liu Y, et al. Emerging roles of extracellular vesicles in COVID-19, a double-edged sword? [J]. Immunology, 2021, 163(4):416-430.
- [45] Aqil M, Mallik S, Bandyopadhyay S, et al. Transcriptomic analysis of mRNAs in human monocytic cells expressing the HIV-1 nef protein and their exosomes[J]. Biomed Res Int, 2015(2015):492395.
- [46] Ahmed W, Philip PS, Attoub S, et al. Epstein-barr virus-infected cells release Fas ligand in exosomal fractions and induce apoptosis in recipient cells via the extrinsic pathway[J]. J Gen Virol, 2015, 96(12):3646-3659.
- [47] Chaput N, Thery C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations [J]. Semin Immunopathol, 2011, 33(5):419-440.
- [48] Julich H, Willms A, Lukacs-Kornek V, et al. Extracellular vesicle profiling and their use as potential disease specific biomarker[J]. Front Immunol, 2014, 5:413.
- [49] Kornek M, Lynch M, Mehta SH, et al. Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis [J]. Gastroenterology, 2012, 143(2):448-458.
- [50] Wen C, Seeger RC, Fabbri M, et al. Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles[J]. J Extracell Vesicles, 2017, 6(1):1400370.
- [51] Xu A, Freywald A, Xiang J. Novel T-cell-based vaccines via arming polyclonal CD4⁺ T cells with antigen-specific exosomes [J]. Immunotherapy, 2016, 8(11):1265-1269.
- [52] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6):654-659.
- 【收稿日期】 2022-09-29 【修回日期】 2022-12-14

(上接 242 页)

- [58] Bouguyon E, Goncalves E, Shevtsov A, et al. A new adjuvant combined with inactivated influenza enhances specific CD8 T cell response in mice and decreases symptoms in swine upon challenge[J]. Viral Immunol, 2015, 28(9):524-531.
- [59] Zhang H, Zheng H, Guo P, et al. Broadly protective CD8⁺ T cell immunity to highly conserved epitopes elicited by heat shock protein gp96-adjuvanted influenza monovalent split vaccine[J]. J Virol, 2021, 95(24):e0175021.
- [60] Paillot R, Prowse L. ISCOM-matrix-based equine influenza (EIV) vaccine stimulates cell-mediated immunity in the horse [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012, 145(1-2):516-521.
- [61] Jamali A, Holtrop M, Haan AD, et al. Cationic influenza virosomes as an adjuvanted delivery system for CTL induction by DNA vaccination[J]. Immunol Lett, 2012, 148(1):77-82.
- [62] Wei H, Lenz SD, Thompson DH, et al. DNA-epitope vaccine provided efficient protection to mice against lethal dose of influenza A virus H1N1. [J]. Viral Immunol, 2014, 27(1):14.
- [63] Lugli E, Galletti G, Boi SK, et al. Stem, effector, and hybrid states of memory CD8⁺ T cells[J]. 2020, 41(1):17-28.
- 【收稿日期】 2022-09-20 【修回日期】 2022-12-05