

流感病毒交叉反应性记忆 T 细胞的研究进展

苏敏, 黄俊琼*

遵义医科大学附属医院输血科, 贵州 遵义 563000

苏敏, 黄俊琼. 流感病毒交叉反应性记忆 T 细胞的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 724-736

Su Min, Huang Junqiong. Advances in influenza virus cross-reactive memory T cells[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 724-736

摘要: 流感病毒是长期威胁人类健康最主要的病毒之一。灭活流感疫苗主要产生针对病毒血凝素的菌株特异性抗体, 当新出现的流感病毒株与疫苗株不匹配时, 疫苗的有效性将会大大降低。由于季节性流感病毒的抗原漂移和突变的持续出现, 人们迫切地需要找到更广泛的保护方式。在以往的研究中, 人们逐渐意识到细胞免疫的重要性, 尤其是预先存在的记忆 T 细胞能靶向识别流感病毒内部保守蛋白, 可与多种亚型的流感病毒发生交叉反应, 并对随后同种亚型或不同亚型的流感病毒感染提供一定的保护作用。本文通过对流感病毒交叉反应性记忆 T 细胞的研究进展及交叉反应性记忆 T 细胞在流感预防中的一些指导应用进行综述, 以期流感的预防和疫苗的研发提供新的参考。

关键词: 流感病毒; T 细胞; 保守抗原; 交叉反应

Advances in influenza virus cross-reactive memory T cells

SU Min, HUANG Junqiong*

Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China

Abstract: Influenza virus is one of the most important viruses that threaten human health for a long time. The inactivated influenza vaccine mainly produces strain-specific antibodies against the viral hemagglutinin. When the newly emerging influenza virus strain does not match the vaccine strain, the effectiveness of the vaccine will be greatly reduced. Due to the continuous emergence of antigenic drift and mutation of seasonal influenza viruses, people urgently need to find a wider range of protection methods. Previous studies show the importance of cellular immunity, especially the pre-existing memory

基金项目: 国家自然科学基金(81860376); 遵义市科学技术基金(遵义社科合社字 201887); 遵义市科技计划项目(遵市科合 HZ 字 202125)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81860376); Zunyi Science and Technology Fund (Zunyi Society Science 201887); Zunyi Science and Technology Planning Project (Zunyi Science Technology HZ 202125)

*Corresponding author: E-mail: junqiongh@aliyun.com

Received: 2021-06-11; Accepted: 2021-08-10; Published online: 2021-09-23

T cells. Pre-existing memory T cells which target and recognize the conserved proteins inside influenza viruses can cross-react with influenza viruses of multiple subtypes, providing a certain degree of protection to influenza virus infections of the same subtypes or different subtypes. This article reviews the research progress of influenza virus cross-reactive memory T cells and some guiding applications of cross-reactive memory T cells in influenza prevention, aiming to provide a new reference for influenza prevention and vaccine development.

Keywords: influenza virus; T cells; conserved antigen; cross reaction

流感病毒(influenza virus)是一种属于正黏病毒科的单股、负链的 RNA 病毒,根据核蛋白(nucleoprotein, NP)和基质蛋白 1 (matrix protein 1, M1)抗原性的不同分为甲、乙、丙和丁 4 型。流感病毒感染后常引起呼吸道感染、急性肺炎及严重并发症甚至造成死亡。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计,在世界范围内,每年都有 300–500 万人严重感染,29–60 万人死亡^[1]。甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)对人类和多种动物具有致病力,曾引起 4 次世界大流行。其中 1918 年的西班牙流感(H1N1 亚型)造成大约 5 000 万人死亡,1957 年的亚洲流感(H2N2 亚型)造成约 200 万人死亡,1968 年的中国香港流感(H3N2 亚型)造成约 100 万人死亡,2009 年的墨西哥新甲型猪源流感(pH1N1 亚型)造成 20 多万人死亡,并在几周内迅速蔓延至全球 200 多个国家^[2–3]。流感病毒可以刺激机体产生流感病毒特异性抗体和 T 细胞免疫应答。由于流感病毒表面的抗原突变较快,疫苗诱导的抗体很难对疫苗株以外其他病毒毒株的感染提供有效保护^[4]。然而 T 细胞识别的免疫原相对保守,主要为流感病毒内部蛋白(如 M1、NP)、聚合酶复合体(polymerase complex) (如 PB1、PB2、PA)等,体内预先存在的记忆 T 细胞可以提供对多种亚型流感病毒的交叉保护,不仅仅局限于甲型流感病毒,也涉及乙型和丙型流感病毒^[5–6]。

本文将对流感病毒交叉反应性记忆 T 细胞的研究进展进行综述,概括了流感病毒保守抗原、交叉反应性记忆 T 细胞的相关研究及交叉反应性记忆 CD8⁺ T 细胞和记忆 CD4⁺ T 细胞在清除异亚型流感感染中发挥的作用,以及交叉反应性记忆 T 细胞在流感预防中发挥的指导作用,以此对流感病毒的预防和通用流感疫苗的研发提供帮助。

1 流感病毒保守抗原

流感病毒特异性记忆 T 细胞可以识别不同亚型流感病毒之间的共享表位,这些抗原表位在大多数甲型流感病毒中是高度保守的,因此具有交叉反应性的记忆 T 细胞可以对不同亚型流感病毒提供保护作用。记忆 T 细胞交叉识别的对象包括流感病毒表面保守抗原、外膜保守抗原和内部保守抗原。

1.1 表面保守抗原

血凝素(hemagglutinin, HA)是流感病毒包膜上的跨膜糖蛋白三聚体,由高度可变的头部和相对保守的杆部构成,包括 HA1 和 HA2 这 2 个结构^[7]。事实上,HA 点突变主要积累在中和抗体选择性压力下的区域,而蛋白质的其余部分则保持相对良好的保守性,允许 T 细胞识别。研究表明 T 细胞表位位于 HA 的 HA1 和 HA2 结构域中,并能表现出记忆表型^[8]。

研究表明神经氨酸酶(neuraminidase, NA)

在流感病毒复制周期中起着关键作用,因此其一直是抗病毒抗体结合或病毒药物治疗的重要靶标。尽管在 NA 蛋白上也发生点突变,但在甲型流感病毒中,NA 抗原漂移速率要比 HA 慢;CD4⁺ T 细胞交叉反应表位主要位于表面 HA 和 NA 蛋白中^[9]。然而有研究指出,预先存在的 NA 反应性抗体降低了 CD4⁺ T 细胞的免疫应答^[10]。

1.2 其他保守抗原

研究发现在流感病毒进化的过程中,核蛋白 NP、基质蛋白 M1 和 M2 这 3 种蛋白非常稳定, T 细胞能靶向识别这些部位与其他亚型流感病毒产生交叉反应。Lee 等报道, M1 和 NP 在流感病毒内部蛋白中具有最主要的免疫原性,其次是 PB1 和 PA^[11]。流感病毒 NP 和 M1 是 CD4⁺ 辅助 T 细胞(T helper cell, T_H)和 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T cell, CTL)激活后交叉识别的优势靶点,其中 CD8⁺ T 细胞是清除流感病毒感染的主要效应细胞。

1.2.1 外膜保守抗原

M1 介导流感病毒组装,是甲型流感病毒中细胞免疫识别的主要抗原之一。其中 HLA*0201 限制性表位 M1₅₈₋₆₆ 在人群中被公认为高度保守^[12-13]。研究发现在与源自不同 IAV 的 M1 蛋白的反应中, T 细胞的交叉反应性存在偏差, M1 蛋白中的突变可能对流感病毒的免疫原性有较大影响^[14]。M2 蛋白保守程度较高,其 N 末端 24 个氨基酸组成的胞外域(ectodomain of matrix protein 2, M2e)更是高度保守,尤其是 N 端 2-9 位的表位 SLLETEVT 在所有 IAV 中都未曾发生过变异^[15]。经修饰和优化后的 M2e 疫苗在动物模型中被证实能有效地诱导体液免疫和细胞免疫应答,对流感病毒的感染具有较好的保护效果^[16]。

1.2.2 内部保守抗原

流感病毒 NP 蛋白是与病毒遗传物质 RNA 结合的主要成分,其氨基酸序列高度保守,在所有 RNA 序列中保守性高达 90%^[17]。NP 蛋白的免疫优势性和高度的保守性可能使其成为刺激 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞对不同流感毒株发生交叉反应的一个很好的候选者^[9,18]。在甲型和乙型流感病毒内部蛋白中,与其他蛋白相比, PB1 序列具有更高的整体同源性,而且拥有更多的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞表位^[19-20]。Uddbäck 等研究调查了 PB1 和 NP 蛋白在基于腺病毒载体疫苗中用作预防 IAV 靶标的可能性,结果证实 PB1 的免疫原性不如 NP^[21]。

2 流感病毒特异的 T 细胞交叉反应

当机体不存在病毒特异性抗体时,主要由交叉反应性 T 细胞介导的异源免疫提供保护。研究初期证明了甲型流感病毒在小鼠和人体内诱导的大部分 T 细胞涉及相对保守的抗原(如 NP 蛋白和 M1 蛋白);提出了这些 T 细胞有助于对不同亚型流感病毒提供交叉保护的假设,并进一步证实了流感病毒特异性 T 细胞的交叉反应性及其在异源免疫中发挥的重要作用。

2.1 流感病毒记忆 T 细胞具有交叉反应性

1965 年首次在小鼠身上发现,4 周前感染过甲型流感病毒(PR8)的小鼠在受到 A2 型流感病毒攻击后表现出肺病毒滴度降低,肺部病变范围较小,死亡率降低的现象^[22]。这种暴露于一种亚型流感病毒而能免受其他亚型流感病毒挑战的现象称为异源免疫或交叉保护。流感病毒记忆 T 细胞具有交叉反应性的证据主要来自动物模型,其中将来自流感病毒感染后小鼠体内的记忆性 T 细胞转移至未经感染的小鼠体内(而非记忆性 B 细胞的过继转移)可以保护小鼠免受致命性异亚型流感病毒的攻击,这一实验

充分说明了记忆 T 细胞在交叉保护作用中的重要性^[23]。经动物研究证实在初次感染流感病毒后诱导生成的记忆 T 细胞具有针对一种或几种流感病毒攻击的保护作用(表 1), 病毒特异性 T 细胞能识别源自病毒内部保守蛋白的抗原决定簇(如 M1、NP、PB1、PA 等), 这些交叉反应涉及同一和不同亚型流感病毒。在这些研究中, 通过量化以前接触过常见流感病毒的人和小鼠体内的 H7N9 交叉反应记忆 T 细胞储存库, 发现了显著的交叉反应 T 细胞群体, 它们可以降低致死性 H7N9 攻击的发病率和死亡率, 提供异亚型交叉保护; 既往感染过 H9N2 或 H1N1 产生的异源免疫显著降低了 H7N9 病毒攻击后小鼠的发病率和死亡率、肺部病毒载量及清除时间; 研究发现免疫 H9N2 减毒活流感疫苗(live attenuated influenza vaccine, LAIV)是控制鸡群中高致病性 H5N2 病毒的一种有前途的策略, 这种交叉保护归因于 LAIV 激活的 H5N2 交叉反应性记忆 T 细胞^[24-28]。

然而人们对于人类异型免疫的了解还知之甚少。早期, 通过流行病学调查发现在 1957 年大流感期间, 55% 的儿童在大流行期间有流感症状, 而成人只有 5% 有流感症状; 在缺乏 pH2N2 特异性中和抗体的情况下, 感染过 H1N1 的个体在 1957 年 H2N2 流行时患病率更低^[29]。记忆 T 细胞的交叉反应性可以部分解释这种新型大流行病毒的低致病性现象。后期,

通过分析人类记忆 T 细胞储存库, 进一步评估了 33 名 pH1N1 血清抗体阴性个体中 19 名个体的交叉反应 T 细胞记忆, 尽管他们之前没有接触过 pH1N1 病毒或 pH1N1 疫苗, 但是大多数人体内的记忆 T 细胞都能够识别感染 pH1N1 活病毒(16/19, 84%)或大流行疫苗株(15/19, 79%)后抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)所呈递的抗原肽(M1、NP 和 PB1)^[30]。这些研究表明, 刺激交叉反应性记忆 T 细胞群, 不同于基于特异性抗体保护的策略, 可以赋予大流行菌株更广泛、更有效的潜在保护。另一方面, 交叉反应性记忆 T 细胞对体液免疫也有一定影响, Nienen 等发现以前接触过抗原相似的流感病毒株的交叉反应性记忆 T 细胞对活化病毒毒株特异的初始化 B 细胞提供了足够的帮助, 并且接触的程度有助于提高疫苗诱导产生的抗体效价^[31]。

2.2 流感病毒交叉反应性记忆 CD8⁺ T 细胞

在流感病毒感染过程中, 初次免疫的 T 细胞从淋巴结迁移到肺部, 在那里它们通过消除感染流感病毒的上皮细胞发挥抗病毒作用, 清除病毒并建立免疫记忆。常规记忆 CD8⁺ T 细胞通过表型标记和运输模式可以区分为 3 类, 第一类为效应记忆细胞(effect memory T cells, T_{EM}), 表达低水平的 CD62L 和 CCR7, 缺乏归巢于淋巴结的能力, 并优先定位于周围组织; 第二类是中央记忆细胞(central memory T cell,

表 1 流感病毒记忆 T 细胞具有交叉反应性的证据

Table 1 Evidence about cross-reactivity of influenza virus memory T cells

Priming virus	Cross-reaction virus	Modles	Involving antigens	References
pH1N1 ^a	PR8 ^b , H7N9	C57BL/6 mice	NP, M1, PB1, PA	[24]
H9N2, pH1N1 ^a	H7N9	C57BL/6 mice	NP	[25]
H9N2	H5N2	SPF chickens	PB1, NP, M1	[26]
PR8 ^b	H7N3	C57BL/6 mice	NP, M1, PB1, PA	[27]
H3N2, PR8 ^b	pH1N1 ^a	C57BL/6 mice	NP, PA, PB1	[28]

Note: a: A/California/04/2009(H1N1); b: A/Puerto Rico/8/1934(H1N1).

T_{CM}), 表达高水平 CD62L 和 CCR7, 可以通过血液和次级淋巴器官在体内循环; 第三类是组织驻留记忆细胞(tissue-resident memory T cell, T_{RM}), 表达 CD69 和 CD103, 驻留在外周组织中, 并且不循环^[32]。如图 1 所示, 记忆 T 细胞亚群并不是都具有同等的交叉保护作用, 作为记忆 T 细胞子集的组织驻留记忆细胞— T_{RM} 被保留在特定部位, 并被认为是赋予组织异亚型感染有效保护的第一道防线。更重要的是, 这些 T_{RM} 介导的交叉保护不依赖于循环 T 细胞和中和抗体, 抑制循环 T 细胞从淋巴结中流出不会对保护程度产生影响; 在 B 细胞缺陷小鼠的实验中, 没有抗体的情况下, 反复感染流感病毒使肺中具有保护性的 $CD8^+$ T_{RM} 细胞的数量增加, 小鼠发病率降低, 保护性增强^[33]。

T_{RM} 细胞源自 T_{EM} 细胞而不是 T_{CM} 细胞, 但 T_{RM} 细胞如何从 IAV 诱导的 T_{EM} 细胞发展而来尚

不清楚。一些研究表明, T_{EM} 细胞向 T_{RM} 细胞转化需要肺组织中存在的抗原, 机体内在环境将影响 T_{EM} 细胞转化为 T_{RM} 细胞; 已经发现白细胞介素(interleukin, IL)-15、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 、转录因子 Blimp-1 及其同源物 Hobit 的活性在诱导和维持 T_{RM} 中发挥了重要作用^[34-35]。也有研究认为 Blimp-1 而非 Hobit 介导了肺 $CD8^+$ T_{RM} 细胞的形成^[36]。衰老环境可能会导致组织中 TGF- β 水平升高进而影响 T_{RM} 细胞的功能。近期有研究表明从老化肺中分离出的 T_{RM} 细胞是一类缺乏参与 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)信号传导和效应功能表达特征的亚群, 这种功能障碍使来自老化肺的 T_{RM} 细胞不足以提供异源保护性免疫^[37]。当继发感染作出反应的病毒特异性 T 细胞再次识别保守的抗原时, 记忆 T 细胞对抗原性不同的病毒就可以建立异源免疫。这些流感病毒交叉反应性记忆 T 细胞能在机体

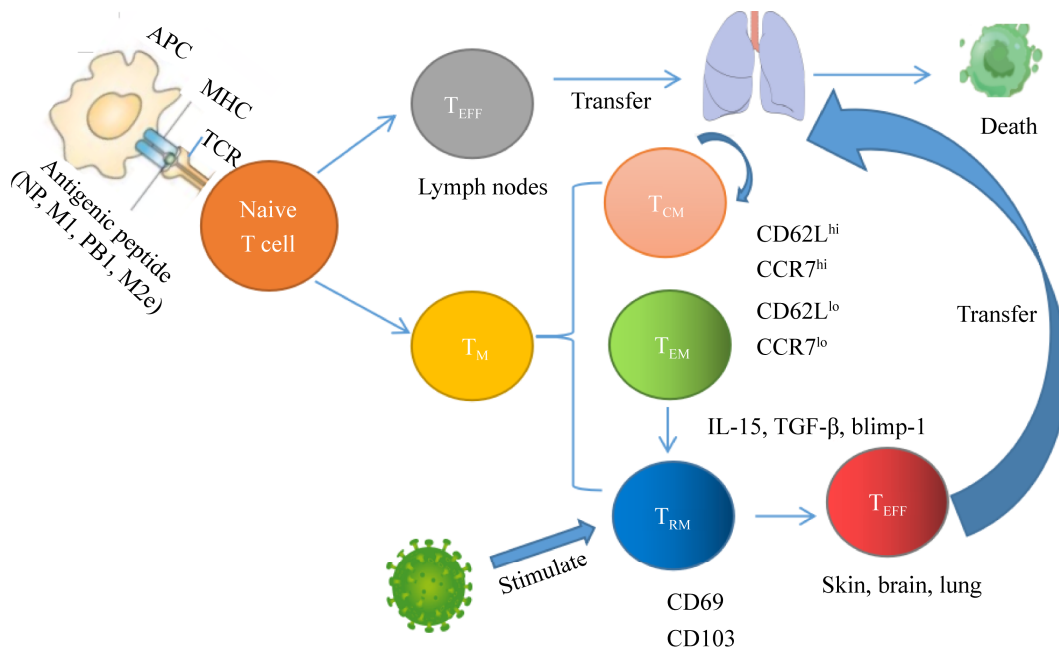


图 1 $CD8^+$ T_{RM} 细胞清除异亚型流感病毒感染示意图

Figure 1 Schematic diagram of $CD8^+$ T_{RM} cells clearing out heterogeneous influenza virus infection.

再次感染后被有效地召回感染部位, 其中驻留在肺中的记忆 $CD8^+$ T 细胞对第二次异源肺部 IAV 感染提供了最有效的保护^[38]。通过小鼠模型进行观察发现, 小鼠对异型流感攻击后的防御能力是通过肺与流感淋巴结中 $CD8^+$ T_{RM} 细胞的早期增殖和效应 $CD8^+$ T 细胞(effector T cell, T_{EFF})迅速迁移至病毒复制部位来增强的, 随着感染时间的增加, T_{RM} 细胞被 T_{CM} 细胞取代, T_{CM} 细胞以延迟的动力学方式增殖, 随着异型免疫力的下降而消失, 并导致强烈的肺部炎症反应^[39-40]。由于针对流感病毒产生异亚型交叉保护作用的 T_{EFF} 细胞是由预先存在于记忆 T 细胞池中的交叉反应 T 细胞选择性扩增而导致的, 这种保护的程度与可用的应答 $CD8^+$ T 细胞数量直接相关^[41]。然而记忆 CTL 细胞池的大小和组成取决于 2 个连续感染的 IAV 之间的表位序列同源性, 这可能会进一步显著改变病毒特异性 CTL 细胞反应和未来人类继发性甲型流感感染的疾病严重程度。 T_{RM} 细胞的建立介导了对特定部位感染的保护, 在其他组织中也有描述, 包括皮肤、女性生殖道和大脑。流感病毒经阴道免疫小鼠引起长期记忆免疫反应后, 通过鼻腔途径进行二次感染, 能将抗原特异性 T 细胞重新定位到肺气道, 并对呼吸道感染提供保护^[42]。这种 T_{RM} 细胞介导的流感病毒异亚型交叉保护持续时间较长, 荧光显微镜观察到一些 $CD103^+$ T_{RM} 细胞在流感病毒感染后很长一段时间内仍保留在大气道壁中, 异型免疫在 7 个月后显著降低^[38]。然而 T_{RM} 细胞不会随着交叉保护作用的逐渐丧失而长期存在; 随着肺 T_{RM} 细胞数量的下降, 保护作用随着时间的推移而减弱, 这与其他黏膜部位(如皮肤)的 T_{RM} 细胞长期维持的现象形成鲜明对比^[43]。Van De Wall 等总结了限制肺 T_{RM} 群体规模的机制, 包括 IL-10 的产生、调节性 T 细胞介导的免疫抑制、氧化

代谢、氧张力, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号传导以及通过程序性死亡受体-1/程序性死亡受体配体-1 轴信号传导^[44]。

2.3 流感病毒交叉反应性记忆 $CD4^+$ T 细胞

与记忆 $CD8^+$ T 细胞相比, 记忆 $CD4^+$ T 细胞的作用似乎更容易被忽视。实际上交叉反应性记忆 $CD4^+$ T 细胞是感染 IAV 动物异源免疫所必需的, 并且有助于对人类流感病毒感染提供保护。在没有 B 细胞和 $CD8^+$ T 细胞存在的情况下, 记忆 $CD4^+$ T 细胞能指导清除流感病毒, 提供交叉保护作用^[45]。Eliasson 等首次证明了 M2e- $CD4^+$ T 细胞具有广泛的交叉保护作用, 活化的 HA 交叉反应性 $CD4^+$ T 细胞转移到未感染的小鼠中可以独立于 B 细胞和 $CD8^+$ T 细胞而保护小鼠免受感染^[46]。 $CD4^+$ T 细胞介导的保护机制, 一种是直接产生 INF- γ , 在感染早期使病毒滴度下降, 另一种就是对体液免疫应答起调节作用^[47]。记忆 $CD4^+$ T 细胞本身不能清除流感病毒, 主要通过产生细胞因子辅助活化 $CD8^+$ T 细胞和 B 细胞, 将记忆 $CD4^+$ T 细胞保护作用发挥到最大^[45,48]。Alam 等发现广泛交叉反应性 HA- $CD4^+$ T 细胞记忆库选择性扩展增强了异亚型感染后 HA 特异性抗体的产生^[49]。近期, Son 等确定了一群在流感病毒清除后发展并同时表现出 T_H 细胞和 T_{RM} 细胞功能的肺 $CD4^+$ T_H 细胞, 并将这些细胞定义为组织驻留 T 辅助(tissue-resident T helper cell, T_{RH})细胞; T_{RH} 细胞对协助 $CD8^+$ T_{RM} 细胞群体提供异亚型交叉保护至关重要; 与记忆 $CD8^+$ T 细胞相似, 记忆 $CD4^+$ T 细胞存在的组织部位与机体对病毒感染的保护程度有关^[50]。Teijaro 等发现仅肺 $CD4^+$ T_{RM} 细胞能保护小鼠免受异亚型流感病毒感染, 而脾脏来源的记忆 $CD4^+$ T 细胞提供的保护很少^[51]。研究发现, 即在血清学上不同的 IAV

亚型之间可能存在交叉反应性记忆 CD4⁺ T 细胞应答, 甚至可以针对未遇到的病毒毒株(包括 H7N9)^[24]。然而季节性流感疫苗不能对 H7N9 提供较好的保护, 研究通过量化评估季节性流感病毒诱导可交叉识别 H7 HA 衍生肽的记忆 CD4⁺ T 细胞的潜力, 发现许多人具有大量的交叉反应性 H7-CD4⁺ T 细胞, 而其中多达 40% 的人体内缺乏这种细胞^[52]。然而人类对禽类疫苗的反应失败很可能是由于缺乏交叉反应性 CD4⁺ T 细胞记忆, 由病毒内部保守蛋白特异性结合的记忆 CD4⁺ T 细胞与幼稚的 HA 特异性 CD4⁺ T 细胞竞争或抑制造成的^[53]。重复接种季节性流感疫苗, 可以维持交叉反应性记忆 CD4⁺ T 细胞的数量, 为成年人每年继续接种季节性流感疫苗提供了理论依据。在未来几年中, 与 T 细胞的记忆状态和功能相关的表面标志物的鉴定以及多色流式细胞术的改进将会对疫苗和流感病毒引发的记忆 CD4⁺ T 细胞的性质进行越来越严格地研究, 确定交叉反应性记忆 CD4⁺ T 细胞在人类异源免疫中的影响将会变得越来越容易。

3 交叉反应性记忆 T 细胞对流感预防具有指导意义

病毒特异性抗体和 T_{RM} 细胞都是最佳异源免疫所必需的, 而循环记忆 CD8⁺ T 细胞则基本上不会改变病程。交叉反应性记忆 T 细胞(尤其是 T_{RM} 细胞)在异源免疫中能起到重要作用, 但这种保护作用的逐渐丧失与流感特异性肺 T_{RM} 细胞种群规模的减小密切相关。因此在疫苗接种和疫苗研发过程中, 诱导和维持有效且持久的流感交叉反应性记忆 T 细胞群体对流感病毒的预防具有指导意义。

3.1 疫苗接种

Flumist[®] 是目前市场上能够有效诱导记忆

CD8⁺ T 细胞的流感疫苗, 并且能在短时间内做出增强反应, 活化的 CD8⁺ T 细胞最早可以在激活后 7 d 提高到保护性水平^[54]。截至目前, 鼻内感染被证实是诱导交叉反应性记忆 T 细胞最有效的方式^[55-56]。经鼻腔免疫的 IAV 疫苗能刺激体液和细胞免疫系统, 但这种疫苗引起的 T 细胞反应是高度可变的, 而且适用于一种仅在上呼吸道较低温度(33 °C)下复制的流感病毒^[57]。有研究通过小鼠肌肉注射(intramuscular, IM)和腹腔注射(intraperitoneal, IP)活病毒, 发现通过 IM 途径诱导产生了交叉反应性记忆 CD8⁺ T 细胞, 与 IP 途径相比, 在异亚型 H3N2 攻击后, 小鼠肺部病毒滴度更低^[58]。这表明同一种疫苗不同的接种途径会影响疫苗的整体保护效果, 影响随后的免疫类型和作用范围。另外, 由于肺 T_{RM} 细胞逐渐丧失, 由初级记忆 CD8⁺ T 细胞介导的异源免疫会随着时间的推移而减弱^[59]。因为疫苗诱导 T 细胞的主要目的可能是将记忆中的 CD8⁺ T 细胞维持在能够实现临床保护的水平, 这可能需要每隔几年增加一次剂量; 初免-加强的免疫策略能有效地增加 T_{RM} 细胞的数量, 提供更持久的抗流感病毒保护作用^[60-61]。多个研究证明在接种流感疫苗的情况下, 每年接受多次疫苗接种的健康成年人将被保护免受严重流感疾病的侵袭。Trieu 等首次证实了重复接种疫苗维持了交叉反应性记忆 INF-γ⁺ CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞的数量, 为成年人每年连续接种流感疫苗提供了免疫学依据^[62]。在一项临床研究中显示, 两剂活流感 A/H5N2 疫苗注射证实可促进或增强健康年轻受试者外周血中的记忆 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞反应^[63]。

研究已经证实 LAIV 比灭活流感疫苗能诱导更多的 T_{RM}-CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞亚群, 并为类似于先前感染的流感病毒非疫苗株提供了异

亚型交叉保护^[38]。目前的灭活疫苗不能引起强烈的 T 细胞反应, 这一弊端在一定程度上可以通过使用正确的佐剂来克服。近年来, 人们一直在迫切寻找能用于灭活疫苗中安全有效增强细胞免疫的佐剂以诱导肺 T_{RM} 细胞产生, 同时提供交叉保护作用。Cheng 等在小鼠模型上探索了经表皮和皮下免疫 CpG 寡核苷酸佐剂的潜力, 发现表皮免疫 CpG 寡核苷酸能对异亚型 IAV 提供更强的长期保护作用, 这种保护作用被证实与肺 T_{RM} 细胞有关^[64]。Wang 等找到了一种天然有效的刺激剂 2',3'-环鸟苷酸-腺苷一磷酸 (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, CGAMP), 这种佐剂可在免疫后 2 d 诱导形成强有力的交叉保护, 这种交叉保护维持了至少 6 个月, 同时肺中持续存在 $CD8^+$ T_{RM} 细胞与目前的流感疫苗效果形成鲜明的对比^[65]。这一发现对机体内早期交叉保护的形成功具有非常重要的指导意义, 早期交叉保护对于保护一线工作者和高危易感人群极为重要, 尤其是当发生耐药或高致病性病毒(如 H5N1 和 H7N9 病毒)出现成为大流行时。

3.2 疫苗研发

病毒载体疫苗能激发强大的 T 细胞反应, 各种基于病毒载体的流感候选疫苗正在研发中, 包括杆状病毒、副流感病毒、阿尔法病毒和新城疫病毒疫苗载体^[66]。然而, 这些载体系统的有效性、安全性还未得到广泛地测试。目前, 实验性流感疫苗的开发主要集中在使用改良的痘苗病毒安卡拉(modified vaccinia virus ankara, MVA)和腺病毒载体, 其中以 MVA 载体疫苗应用较多。MVA 可以编码一种或多种外源性抗原, 因此可以用作多价疫苗。该载体可作为生物安全级别 I 级使用, 具有佐剂固有的能力, 并能诱导体液和细胞免疫应答^[67]。研究将表达 NP、M1、HA 和 NA 不同组合的 MVA

载体疫苗在不同动物模型中进行了评估, 这些载体疫苗已被证实可以激活产生交叉反应性 T 细胞反应^[68-70]。此外还研发了能够同时诱导特异性抗体和 T 细胞反应的载体疫苗。Mullin 等证实了 MVA-NP-M1 疫苗诱导分泌 IFN- γ 的 $CD4^+$ T 细胞和 T_{RM} 细胞比对照组多; MVA-NP-M1 还能诱导 NP 特异性 IgG 抗体的产生^[71]。一项动物研究评估 MVA-H5N1-NP 载体疫苗的保护效果, 发现表达高度保守的流感病毒 NP 蛋白的 MVA 载体疫苗能保护小鼠免受不同流感病毒亚型的致命攻击, 而其他保守的流感蛋白没有提供显著的保护水平。NP 表达载体疫苗介导的对免受致死性 IAV 攻击的保护与强烈的 $CD4^+$ T 细胞应答相关^[72]。目前, MVA 载体疫苗已经进入临床试验阶段。一项关于候选流感疫苗 MVA-NP+M1 的 I 期临床试验已经在老年人和年轻人中开展, 结果证明这种疫苗是安全的和具有免疫原性的, 能显著增强 T 细胞对 NP 和 M1 的反应, 并对流感攻击具有保护作用^[73-74]。综上所述, 我们能看出 MVA 载体疫苗在新型通用流感疫苗的研发中具有非常广阔的临床应用前景。

同时, 近两年来高度保守的流感基质蛋白 2 胞外域(M2e)已成为有吸引力的交叉保护疫苗靶标^[75]。使用 pdmH1N1 攻击免疫了基于可溶性四聚体 NA (tetrameric NA, tetNA)和 M2e 联合疫苗后的小鼠, 发现疫苗所提供免疫力可防止小鼠体重减轻并显著降低肺部病毒载量, 单独使用基于 M2e 的疫苗或与 tetNA 结合使用, 也可以抵抗 H3N2 病毒的攻击^[76]。其他研究证明鼻腔接种串联重复 M2e 表位的病毒样颗粒 (M2e5 \times VLP)能够诱导机体产生针对保守 M2e 表位的交叉免疫^[77]。M2e5 \times VLP 在提供异亚型交叉保护和为宿主装备交叉保护性核蛋白肺 T_{RM} - $CD8^+$ T 细胞方面优于毒株特异性颗粒疫

苗^[78]。总之，与其他疫苗形式相比，这些候选疫苗能更有效地诱导病毒交叉反应性记忆 T 细胞的产生。

4 问题与展望

目前，诱导机体产生针对流感病毒血凝素的抗体仍然是预防流感最主要的方式，但通过疫苗接种或感染诱导的特异性血清抗体要有足够高滴度才能保护个体免受随后的感染。大量证据表明流感病毒交叉反应性记忆 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞在对抗异亚型流感病毒感染中发挥了重要作用。因此，未来的新型通用流感疫苗应该能够有效地诱导和维持交叉保护性记忆 T 细胞，尤其是肺 T_{RM} 细胞。一个合格的通用疫苗既能抵御季节性流感抗原漂移，在流感大暴发的情况下用于紧急接种，又可早期快速诱导交叉保护性 T 细胞，直到有了诱导适当特异性抗体的疫苗可用。交叉反应性记忆 T 细胞虽然不能预防流感病毒感染，但能帮助机体更快地清除病毒，特别是免疫系统发育尚不成熟的受试者，如以前未经历过流感病毒感染的幼儿，可能会从这一策略中受益。

预先存在的记忆 T 细胞可以对其他亚型流感病毒产生一定水平的交叉反应，但其他亚型的流感病毒的 T 细胞表位仍能发生突变引起免疫逃逸。然而，这种保护效果会随着时间的推移随肺 T_{RM} 细胞数量下降而减弱，更深入地了解肺部环境如何影响 T_{RM} 细胞的功能和维持足够数量的肺 T_{RM} 细胞以提供对流感病毒的最佳保护，这些都是疫苗研发中不容忽视的问题。目前，基于诱导交叉反应性记忆 T 细胞的新型通用疫苗研究已经取得了一定进展，在动物试验和临床研究中表现出一定的交叉保护作用。截至目前，尚无流感疫苗可用于诱导人类流感特异性 T 细胞介导的异型免疫。尽管经过几十

年的广泛研究，这种通用流感疫苗能否实现仍然不清楚。未来的临床前和临床试验需要提供有关这些疫苗有效性和安全性等信息。我们要解决的问题仍有很多，例如，最佳保守抗原的筛选、T 细胞表位的作用、是否存在优势表位？老年人群如何维持肺 T_{RM} 细胞的功能、最佳的疫苗免疫方式和程序、安全问题等，这些问题的解决对流感的预防和疫苗的研发都有重大的意义。相信随着流感病毒学研究的深入、生物信息学技术的发展、疫苗生产方式的变革，开发出一款安全有效的广谱流感通用疫苗势在必行。

REFERENCES

- [1] World Health Organization. 2020, Influenza (Seasonal). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- [2] Johnson NPAS, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 “Spanish” influenza pandemic[J]. *Bulletin of the History of Medicine*, 2002, 76(1): 105-115
- [3] Jester BJ, Uyeki TM, Jernigan DB. Fifty years of influenza A(H3N2) following the pandemic of 1968[J]. *American Journal of Public Health*, 2020, 110(5): 669-676
- [4] Gou XQ, Wu XX, Shi Y, Zhang K, Huang JQ. A systematic review and meta-analysis of cross-reactivity of antibodies induced by H7 influenza vaccine[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2020, 16(2): 286-294
- [5] Van De Sandt CE, Dou YY, Vogelzang-Van Trierum SE, Westgeest KB, Pronk MR, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Rimmelzwaan GF, Hillaire MLB. Influenza B virus-specific CD8⁺ T-lymphocytes strongly cross-react with viruses of the opposing influenza B lineage[J]. *The Journal of General Virology*, 2015, 96(8): 2061-2073
- [6] Koutsakos M, Illing PT, Nguyen THO, Mifsud NA, Crawford JC, Rizzetto S, Eltahla AA, Clemens EB, Sant S, Chua BY, et al. Human CD8⁺ T cell cross-reactivity across influenza A, B and C viruses[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(5): 613-625
- [7] Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen LM, Santelli E, Stec B, Cadwell G, Ali M, et al. Structural

- and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(3): 265-273
- [8] Roti M, Yang JB, Berger D, Huston L, James EA, Kwok WW. Healthy human subjects have CD4⁺ T cells directed against H5N1 influenza virus[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(3): 1758-1768
- [9] Reber AJ, Music N, Kim JH, Ganseboom S, Chen JF, York I. Extensive T cell cross-reactivity between diverse seasonal influenza strains in the ferret model[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 6112
- [10] Dolfi DV, Mansfield KD, Kurupati RK, Kannan S, Doyle SA, Ertl HCJ, Schmader KE, Wherry EJ. Vaccine-induced boosting of influenza virus-specific CD4⁺ T cells in younger and aged humans[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77164
- [11] Lee LYH, Ha DLA, Simmons C, Jong MDD, Chau NVV, Schumacher R, Peng YC, McMichael AJ, Farrar JJ, Smith GL, et al. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(10): 3478-3490
- [12] Richards KA, Treanor JJ, Nayak JL, Sant AJ. Overarching immunodominance patterns and substantial diversity in specificity and functionality in the circulating human influenza A and B virus-specific CD4⁺ T-cell repertoire[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018, 218(7): 1169-1174
- [13] Choo JAL, Liu JX, Toh X, Grotenbreg GM, Ren EC. The immunodominant influenza A virus M158-66 cytotoxic T lymphocyte epitope exhibits degenerate class I major histocompatibility complex restriction in humans[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(18): 10613-10623
- [14] Zhao M, Liu KF, Luo JJ, Tan SG, Quan CS, Zhang SJ, Chai Y, Qi JX, Li Y, Bi YH, et al. Heterosubtypic protections against human-infecting avian influenza viruses correlate to biased cross-T-cell responses[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e01408-1418
- [15] Saelens X. The role of matrix protein 2 ectodomain in the development of universal influenza vaccines[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 219(Suppl_1): S68-S74
- [16] Wang Y, Deng L, Gonzalez GX, Luthra L, Dong CH, Ma Y, Zou J, Kang SM, Wang BZ. Double-layered M2e-NA protein nanoparticle immunization induces broad cross-protection against different influenza viruses in mice[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2020, 9(2): 1901176
- [17] Hung SJ, Hsu YM, Huang SW, Tsai HP, Lee LYY, Hurt AC, Barr IG, Shih SR, Wang JR. Genetic variations on 31 and 450 residues of influenza A nucleoprotein affect viral replication and translation[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2020, 27(1): 1-13
- [18] Machkovech HM, Bedford T, Suchard MA, Bloom JD. Positive selection in CD8⁺ T-cell epitopes of influenza virus nucleoprotein revealed by a comparative analysis of human and swine viral lineages[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(22): 11275-11283
- [19] Terajima M, Babon JAB, Co MDT, Ennis FA. Cross-reactive human B cell and T cell epitopes between influenza A and B viruses[J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 244
- [20] Assarsson E, Bui HH, Sidney J, Zhang Q, Glenn J, Oseroff C, Mbawuike IN, Alexander J, Newman MJ, Grey H, et al. Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12241-12251
- [21] Uddbäck IEM, Steffensen MA, Pedersen SR, Nazeraï L, Thomsen AR, Christensen JP. PB₁ as a potential target for increasing the breadth of T-cell mediated immunity to influenza A[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35033
- [22] Schulman JL, Kilbourne ED. Induction of partial specific heterotypic immunity in mice by a single infection with influenza a virus[J]. *Journal of Bacteriology*, 1965, 89: 170-174
- [23] Furuya Y, Chan J, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Kok T, Manavis J, Li P, Müllbacher A, Alsharifi M. Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by γ -irradiated influenza A viruses[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(9): 4212-4221
- [24] McMaster SR, Gabbard JD, Koutsonanos DG, Compans RW, Tripp RA, Tompkins SM, Kohlmeier JE. Memory T cells generated by prior exposure to influenza cross react with the novel H7N9 influenza virus and confer protective heterosubtypic immunity[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0115725
- [25] Duan SS, Meliopoulos VA, McClaren JL, Guo XZJ, Sanders CJ, Smallwood HS, Webby RJ, Schultz-Cherry SL, Doherty PC, Thomas PG. Diverse heterologous primary infections radically alter immunodominance hierarchies and clinical outcomes following H7N9 influenza challenge in mice[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(2): e1004642
- [26] Wang MY, Wei YD, Pu J, Bing GX, Sun YP, Sun HL,

- Wei FH, Liu JH. Cross-immunity of a H9N2 live attenuated influenza vaccine against H5N2 highly pathogenic avian influenza virus in chickens[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 220: 57-66
- [27] Di Mario G, Garulli B, Sciaraffia E, Facchini M, Donatelli I, Castrucci MR. A heat-inactivated H7N3 vaccine induces cross-reactive cellular immunity in HLA-A2.1 transgenic mice[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 56
- [28] Sage LK, Fox JM, Tompkins SM, Tripp RA. Subsisting H1N1 influenza memory responses are insufficient to protect from pandemic H1N1 influenza challenge in C57BL/6 mice[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(8): 1701-1711
- [29] Epstein SL. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland family study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193(1): 49-53
- [30] Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Ziegler T, Roberts KL, Barclay WS, Openshaw P, Lalvani A. Predominance of heterosubtypic IFN- γ -only-secreting effector memory T cells in pandemic H1N1 naive adults[J]. *European Journal of Immunology*, 2012, 42(11): 2913-2924
- [31] Nienen M, Stervbo U, Mölder F, Kaliszczyk S, Kuchenbecker L, Gayova L, Schweiger B, Jürchott K, Hecht J, Neumann AU, et al. The role of pre-existing cross-reactive central memory CD4⁺ T-cells in vaccination with previously unseen influenza strains[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 593
- [32] Lanzer KG, Cookenham T, Reiley WW, Blackman MA. Virtual memory cells make a major contribution to the response of aged influenza-naïve mice to influenza virus infection[J]. *Immunity & Ageing*, 2018, 15: 17
- [33] Quiñones-Parra SM, Clemens EB, Wang ZF, Croom HA, Kedzierski L, McVernon J, Vijaykrishna D, Kedzierska K. A role of influenza virus exposure history in determining pandemic susceptibility and CD8⁺ T cell responses[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(15): 6936-6947
- [34] MacKay LK, Wynne-Jones E, Freestone D, Pellicci DG, Mielke LA, Newman DM, Braun A, Masson F, Kallies A, Belz GT, et al. T-box transcription factors combine with the cytokines TGF- β and IL-15 to control tissue-resident memory T cell fate[J]. *Immunity*, 2015, 43(6): 1101-1111
- [35] Behr FM, Parga-Vidal L, Kragten NAM, Dam TJPV, Wesselink TH, Sheridan BS, Arens R, Van Lier RAW, Stark R, Van Gisbergen KPJM. Tissue-resident memory CD8⁺ T cells shape local and systemic secondary T cell responses[J]. *Nature Immunology*, 2020, 21(9): 1070-1081
- [36] Behr FM, Kragten NAM, Wesselink TH, Nota B, Van Lier RAW, Amsen D, Stark R, Hombrink P, Van Gisbergen KPJM. Blimp-1 rather than hobit drives the formation of tissue-resident memory CD8⁺ T cells in the lungs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 400
- [37] Goplen NP, Wu Y, Son Y, Li CF, Wang Z, Cheon IS, Jiang L, Zhu BB, Ayasoufi K, Chini EN, et al. Tissue-resident CD8⁺ T cells drive age-associated chronic lung sequelae following viral pneumonia[J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.04.13.040196
- [38] Wu T, Hu YH, Lee YT, Bouchard KR, Benechet A, Khanna K, Cauley LS. Lung-resident memory CD8⁺ T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2014, 95(2): 215-224
- [39] Zens KD, Chen JK, Farber DL. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection[J]. *JCI Insight*, 2016, 1(10): e85832
- [40] Suarez-Ramirez JE, Chandiran K, Brocke S, Cauley LS. Immunity to respiratory infection is reinforced through early proliferation of lymphoid T_{RM} cells and prompt arrival of effector CD8⁺ T cells in the lungs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1370
- [41] Yan AWC, Cao PX, Heffernan JM, McVernon J, Quinn KM, La Gruta NL, Laurie KL, McCaw JM. Modelling cross-reactivity and memory in the cellular adaptive immune response to influenza infection in the host[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2017, 413: 34-49
- [42] Garulli B, Meola M, Stillitano MG, Kawaoka Y, Castrucci MR. Efficient vagina-to-lower respiratory tract immune trafficking in a murine model of influenza A virus infection[J]. *Virology*, 2007, 361(2): 274-282
- [43] Slütter B, Van Braeckel-Budimir N, Abboud G, Varga SM, Salek-Ardakani S, Harty JT. Dynamics of influenza-induced lung-resident memory T cells underlie waning heterosubtypic immunity[J]. *Science Immunology*, 2017, 2(7): eaag2031
- [44] Van De Wall S, Badovinac VP, Harty JT. Influenza-specific lung-resident memory CD8⁺ T cells[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2021, 13(2): a037978
- [45] McKinstry KK, Strutt TM, Kuang Y, Brown DM, Sell S, Dutton RW, Swain SL. Memory CD4⁺ T cells protect

- against influenza through multiple synergizing mechanisms[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(8): 2847-2856
- [46] Eliasson DG, Omokanye A, Schön K, Wenzel UA, Bernasconi V, Bemark M, Kolpe A, El Bakkouri K, Ysenbaert T, Deng L, et al. M2e-tetramer-specific memory CD4⁺ T cells are broadly protective against influenza infection[J]. *Mucosal Immunology*, 2018, 11(1): 273-289
- [47] Teijaro JR, Verhoeven D, Page CA, Turner D, Farber DL. Memory CD4⁺ T cells direct protective responses to influenza virus in the lungs through helper-independent mechanisms[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(18): 9217-9226
- [48] MacLeod MKL, David A, McKee AS, Crawford F, Kappler JW, Marrack P. Memory CD4⁺ T cells that express CXCR5 provide accelerated help to B cells[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(5): 2889-2896
- [49] Alam S, Chan C, Qiu X, Shannon I, White CL, Sant AJ, Nayak JL. Selective pre-priming of HA-specific CD4⁺ T cells restores immunological reactivity to HA on heterosubtypic influenza infection[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176407
- [50] Son YM, Cheon IS, Wu Y, Li CF, Sun J. Tissue-resident CD4⁺ T helper cells assist the development of protective respiratory B and CD8⁺ T cell memory responses[J]. *Science Immunology*, 2021, 6(55): eabb6852
- [51] Teijaro JR, Turner D, Pham Q, Wherry EJ, Lefrançois L, Farber DL. Cutting edge: tissue-retentive lung memory CD4⁺ T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(11): 5510-5514
- [52] Richards KA, Nayak J, Chaves FA, DiPiazza A, Knowlden ZAG, Alam S, Treanor JJ, Sant AJ. Seasonal influenza can poise hosts for CD4⁺ T-cell immunity to H7N9 avian influenza[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2015, 212(1): 86-94
- [53] DiPiazza A, Richards K, Poulton N, Sant AJ. Avian and human seasonal influenza hemagglutinin proteins elicit CD4⁺ T cell responses that are comparable in epitope abundance and diversity[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2017, 24(3): e00548-16
- [54] Slütter B, Pewe LL, Lauer P, Harty JT. Cutting edge: rapid boosting of cross-reactive memory CD8⁺ T cells broadens the protective capacity of the Flumist vaccine[J]. *Journal of Immunology*, 2013, 190(8): 3854-3858
- [55] Bodewes R, Kreijtz JHCM, Geelhoed-Mieras MM, Van Amerongen G, Verburgh RJ, van Trierum SE, Kuiken T, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF. Vaccination against seasonal influenza A/H3N2 virus reduces the induction of heterosubtypic immunity against influenza A/H5N1 virus infection in ferrets[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(6): 2695-2702
- [56] Xie XC, Zhao C, He Q, Qiu TY, Yuan SH, Ding LF, Liu L, Jiang L, Wang J, Zhang LX, et al. Influenza vaccine with consensus internal antigens as immunogens provides cross-group protection against influenza A viruses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1630
- [57] Basha S, Hazenfeld S, Brady RC, Subbramanian RA. Comparison of antibody and T-cell responses elicited by licensed inactivated- and live-attenuated influenza vaccines against H3N2 hemagglutinin[J]. *Human Immunology*, 2011, 72(6): 463-469
- [58] Wang ZF, Chua BY, Ramos JV, Parra SMQ, Fairmaid E, Brown LE, Jackson DC, Kedzierska K. Establishment of functional influenza virus-specific CD8⁺ T cell memory pools after intramuscular immunization[J]. *Vaccine*, 2015, 33(39): 5148-5154
- [59] Van Braeckel-Budimir N, Varga SM, Badovinac VP, Harty JT. Repeated antigen exposure extends the durability of influenza-specific lung-resident memory CD8⁺ T cells and heterosubtypic immunity[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(13): 3374-3382.e3
- [60] Liu WC, Nachbagauer R, Stadlbauer D, Solórzano A, Berlanda-Scorza F, García-Sastre A, Palese P, Krammer F, Albrecht RA. Sequential immunization with live-attenuated chimeric hemagglutinin-based vaccines confers heterosubtypic immunity against influenza A viruses in a preclinical ferret model[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 756
- [61] Gooch KE, Marriott AC, Ryan KA, Yeates P, Slack GS, Brown PJ, Fothergill R, Whittaker CJ, Carroll MW. Heterosubtypic cross-protection correlates with cross-reactive interferon-gamma-secreting lymphocytes in the ferret model of influenza[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2617
- [62] Trieu MC, Zhou F, Lartey S, Jul-Larsen Å, Mjaaland S, Sridhar S, Cox RJ. Long-term maintenance of the influenza-specific cross-reactive memory CD4⁺ T-cell responses following repeated annual influenza vaccination[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017, 215(5): 740-749
- [63] Chirkova TV, Naykhin AN, Petukhova GD, Korenkov DA, Donina SA, Mironov AN, Rudenko LG. Memory T-cell immune response in healthy young adults

- vaccinated with live attenuated influenza A (H5N2) vaccine[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(10): 1710-1718
- [64] Cheng WK, Plumb AW, Lai JCY, Abraham N, Dutz JP. Topical CpG oligodeoxynucleotide adjuvant enhances the adaptive immune response against influenza A infections[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 284
- [65] Wang J, Li PY, Yu Y, Fu YH, Jiang HY, Lu M, Sun ZP, Jiang SB, Lu L, Wu MX. Pulmonary surfactant-biomimetic nanoparticles potentiate heterosubtypic influenza immunity[J]. *Science*, 2020, 367(6480): eaau0810
- [66] Tripp RA, Tompkins SM. Virus-vectored influenza virus vaccines[J]. *Viruses*, 2014, 6(8): 3055-3079
- [67] Altenburg AF, Kreijtz JHCM, De Vries RD, Song F, Fux R, Rimmelzwaan GF, Sutter G, Volz A. Modified vaccinia virus Ankara (MVA) as production platform for vaccines against influenza and other viral respiratory diseases[J]. *Viruses*, 2014, 6(7): 2735-2761
- [68] Florek NW, Weinfurter JT, Jegaskanda S, Brewoo JN, Powell TD, Young GR, Das SC, Hatta M, Broman KW, Hungnes O, et al. Modified vaccinia virus Ankara encoding influenza virus hemagglutinin induces heterosubtypic immunity in macaques[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(22): 13418-13428
- [69] Brewoo JN, Powell TD, Jones JC, Gundlach NA, Young GR, Chu HY, Das SC, Partidos CD, Stinchcomb DT, Osorio JE. Cross-protective immunity against multiple influenza virus subtypes by a novel modified vaccinia Ankara (MVA) vectored vaccine in mice[J]. *Vaccine*, 2013, 31(14): 1848-1855
- [70] Altenburg AF, Magnusson SE, Bosman F, Stertman L, De Vries RD, Rimmelzwaan GF. Protein and modified vaccinia virus Ankara-based influenza virus nucleoprotein vaccines are differentially immunogenic in BALB/c mice[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2017, 190(1): 19-28
- [71] Mullin J, Ahmed MS, Sharma R, Upile N, Beer H, Achar P, Puksuriwong S, Ferrara F, Temperton N, McNamara P, et al. Activation of cross-reactive mucosal T and B cell responses in human nasopharynx-associated lymphoid tissue *in vitro* by Modified Vaccinia Ankara-vectored influenza vaccines[J]. *Vaccine*, 2016, 34(14): 1688-1695
- [72] Hessel A, Savidis-Dacho H, Coulibaly S, Portsmouth D, Kreil TR, Crowe BA, Schwendinger MG, Pilz A, Barrett PN, Falkner FG, et al. MVA vectors expressing conserved influenza proteins protect mice against lethal challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 viruses[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88340
- [73] Swayze H, Allen J, Folegatti P, Yu LM, Gilbert S, Hill A, Ellis C, Butler CC. A phase IIb study to determine the safety and efficacy of candidate influenza vaccine MVA-NP+M1 in combination with licensed inactivated influenza vaccine in adults aged 65 years and above (INVICTUS): a study protocol[J]. *F1000Research*, 2019, 8: 719
- [74] Folegatti PM, Bellamy D, Flaxman A, Mair C, Ellis C, Ramon RL, Ramos Lopez F, Mitton C, Baker M, Poulton I, et al. Safety and immunogenicity of the heterosubtypic influenza A vaccine MVA-NP+M1 manufactured on the AGE1.CR.pIX avian cell line[J]. *Vaccines*, 2019, 7(1): 33
- [75] Lahiri A, Sharif S, Mallick AI. Intragastric delivery of recombinant *Lactococcus lactis* displaying ectodomain of influenza matrix protein 2 (M2e) and neuraminidase (NA) induced focused mucosal and systemic immune responses in chickens[J]. *Molecular Immunology*, 2019, 114: 497-512
- [76] Schotsaert M, Ysenbaert T, Smet A, Schepens B, Vanderschaeghe D, Stegalkina S, Vogel TU, Callewaert N, Fiers W, Saelens X. Long-lasting cross-protection against influenza A by neuraminidase and M2e-based immunization strategies[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24402
- [77] Lee YT, Ko EJ, Lee Y, Kim KH, Kim MC, Lee YN, Kang SM. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190868
- [78] Lee YN, Lee YT, Kim MC, Gewirtz AT, Kang SM. A novel vaccination strategy mediating the induction of lung-resident memory CD8⁺ T cells confers heterosubtypic immunity against future pandemic influenza virus[J]. *Journal of Immunology*, 2016, 196(6): 2637-2645