

• 医药生物技术 •

壳聚糖盐酸盐稳定乳液的制备及免疫效果分析

王丹阳¹, 吴颀², 王宁^{1*}

1 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

王丹阳, 吴颀, 王宁. 壳聚糖盐酸盐稳定乳液的制备及免疫效果分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 262-274.

WANG Danyang, WU Jie, WANG Ning. Preparation of chitosan hydrochloride stabilized emulsion and its immunostimulatory effect[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 262-274.

摘要: 为了解决油乳佐剂在诱导细胞免疫方面的不足, 引入正电荷的壳聚糖盐以稳定乳液, 从而提升细胞免疫应答。本研究选取卵清蛋白为模式抗原, 分别制备了单抗原疫苗、商品佐剂疫苗和乳液疫苗, 表征了乳液的粒径、电势及抗原吸附率等参数。通过肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠, 检测免疫后抗体和细胞因子的分泌水平、淋巴细胞的活化水平以评价乳液的免疫效果。结果显示壳聚糖盐酸盐可有效稳定乳液, 其粒径在 600 nm 左右, 荷正电并对抗原吸附率达 90%以上。免疫动物后, 该乳液可有效提升血清特异性抗体水平并增强 IL-4 的分泌, 显著提高抗原特异性 CD8⁺T 细胞的比例, 提升细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表面活化分子的表达水平, 诱导高效的细胞免疫应答。此外, 乳液能够有效提高记忆 T 细胞(CD44⁺CD62L⁺)的水平。综上所述, 以壳聚糖盐酸盐稳定的乳液为佐剂能有效提升体液及细胞免疫效果, 并有望起长期保护作用。

关键词: 疫苗佐剂; 壳聚糖盐; 油乳制剂; 细胞免疫

Preparation of chitosan hydrochloride stabilized emulsion and its immunostimulatory effect

WANG Danyang¹, WU Jie², WANG Ning^{1*}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: In order to increase the ability of oil-emulsion adjuvant to stimulate cellular immunity, chitosan hydrochloride with positive charge was selected to stabilize oil-in-water

资助项目: 国家自然科学基金(22078335, 21776287, 22077053)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22078335, 21776287, 22077053).

*Corresponding author. E-mail: wangning@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-04-09; Accepted: 2022-07-29

emulsion (CHE). In this paper, model antigen ovalbumin was selected to prepare vaccines with emulsion adjuvant, commercial adjuvant or no adjuvant. The emulsion was characterized by measuring the particle size, electric potential and antigen adsorption rate. BALB/c mice were immunized by intramuscular injection. Serum antibody levels, the numbers of IL-4-secreting cells in splenocytes, cytotoxic T lymphocyte (CTL) response, and the expression of central memory T cells were measured to evaluate the immunostimulatory effect. The results showed that chitosan hydrochloride can effectively stabilize the emulsion. The emulsion size is about 600 nm, and the antigen adsorption rate is more than 90%. After immunization, CHE could increase serum antibodies levels and increase IL-4 secretion. Expression of CTL surface activation molecules was also increased to stimulate CTL response further and to increase the CD44⁺CD62L⁺ in T cells proportion. CHE as adjuvant can stimulate humoral and cellular immunity more efficiently, and is expected to extend the duration of protection.

Keywords: vaccine adjuvant; chitosan salts; oil emulsion; cellular immune

接种疫苗是预防传染病最有效的策略之一^[1]。佐剂是添加在疫苗中的一类免疫调节剂,用于刺激和/或增强免疫应答强度和持久性^[2]。随着新型抗原的发展,对佐剂的数量与质量要求越来越高。理想的新型佐剂应该安全、稳定、易于使用并且具有经济效益,重要的是能够刺激最佳的免疫类型来增强抗原特异性免疫应答、增强免疫记忆和增强保护作用^[3]。传统的油乳佐剂因其强效的体液免疫能力而备受关注,在人用疫苗及动物疫苗中均有应用^[4-7]。最具有代表性的油乳佐剂为 MF59,由 4.3% (质量体积分数)的角鲨烯、0.5% (质量体积分数)的 Tween 80 和 0.5% (质量体积分数)的 Span 85 组成。MF59 作为流感疫苗佐剂时可显著增强体液免疫应答,效果优于铝佐剂(Al 佐剂)^[8]。但油乳佐剂也存在不足之处,目前油乳佐剂多采用非离子型表面活性剂稳定,其抗原吸附率低、抗原的递送效率低,导致其细胞免疫增强效果不佳^[9]。为解决这一问题,采用带正电荷的高分子表面活性剂替代传统表面活性剂稳定乳液,以增强乳液对抗原的吸附。

壳聚糖是甲壳素去乙酰化后的产物,其在

自然界中储量丰富、可降解、生物相容性好,且带有正电荷,有利于对带负电抗原的吸附^[10]。但壳聚糖不溶于水,对其进行改性修饰以得到水溶性壳聚糖盐^[11-12]。壳聚糖及其衍生物具有佐剂疫苗特性,并且已有多种不同形式的壳聚糖盐酸盐被成功应用于疫苗佐剂^[13-15]。虽然壳聚糖季铵盐凝胶颗粒制备的乳液具备作为疫苗佐剂的免疫能力,但其制备工艺较复杂^[16]。鉴于此,选取可溶性壳聚糖衍生物作为表面活性剂稳定乳液,考察乳液稳定性及作为疫苗佐剂的免疫特性。

本研究以壳聚糖盐酸盐代替传统表面活性剂,制备得到稳定的壳聚糖盐酸盐乳液(chitosan hydrochloride stabilized emulsion, CHE),并考察乳液的理化性质,在此基础上,采用免疫佐剂研究中广泛应用的卵清蛋白(ovalbumin, OVA)作为模式抗原^[17],通过肌肉注射方式免疫小鼠,并评价其对体液免疫、细胞免疫以及记忆 T 细胞表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试验动物

小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限

公司, 饲养于中国科学院过程工程研究所动物房。实验前, 新购买小鼠适应环境 1 周。所有动物实验均严格按照《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)进行, 并经中国科学院过程工程研究所动物房的伦理审查委员会批准(批准号: IPEAECA2021071)。

1.2 材料和试剂

壳聚糖盐酸盐, 购自潍坊海之源生物制品有限公司; Al 佐剂, 购自 InvivoGen 公司; 氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠, 购自北京化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)、洗液(PBST)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、红细胞裂解液、4%组织固定液, 购自北京索莱宝科技有限公司; 浓硫酸, 购自北京化工厂; OVA、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、角鲨烯、Span 85 和 Tween 80, 购自 Sigma-Aldrich 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI1640 培养基, 购自 Gibco 公司; 青霉素-链霉素双抗、Micro BCA 蛋白检测试剂盒、流式抗体、流式缓冲液, 购自 Thermo-Fisher 公司; 白油由 Petro-Canada Lubricants Inc.提供; 辣根过氧化物酶偶联羊抗鼠 IgG 抗体, 购自 Abcam 公司; ELISPOT 试剂盒, 购自 Mab Tech 公司。

1.3 方法

1.3.1 壳聚糖盐溶液电势及其接触角测定

使用 Mastersizer Nano ZS 激光粒度仪测定壳聚糖盐酸盐溶液的电势。吸取 1 mL 壳聚糖盐酸盐溶液加入电位池中, 平衡 2 min 后, 开始测定电势, 测量 3 次平行。将壳聚糖盐酸盐溶液均匀铺在载玻片上, 在通风橱中干燥过夜, OCA-20 接触角测量仪测定壳聚糖盐酸盐溶液与去离子水的接触角, 选取平面中 3 处不同位置, 将去离子水缓慢滴加至载玻片上, 测定接触角。

1.3.2 制备 CHE

称取壳聚糖盐酸盐 0.3 g, 加入 10 mL 去离

子水搅拌至溶解, 利用 0.45 μm 滤器过滤, 定容至 30 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用去离子水将壳聚糖盐酸盐溶液稀释至浓度为 4 mg/mL, 加入氢氧化钠调节 pH 至 5.6–6.0, 按照油水比例 1:9 加入白油, 总体积为 1 mL, 选取超声频率为 20%, 超声时间 3 min 制备乳液。

1.3.3 CHE 粒径分布、电位及稳定性表征

利用 Mastersizer Nano ZS 激光粒度仪测量乳液的粒径及电势。制备乳液后, 用去离子水将 CHE 稀释 100 倍, 用移液器将稀释后的 CHE 加入样品槽中, 平衡 2 min 后测定 CHE 粒径大小并采用多分散指数(polydispersity index, PDI)表征其均一性, 数值越小越均一, 并且测定稀释后 CHE 的电势, 每个样品测量 3 次平行。测定 CHE 制备后 0、7、14、21、28、60 d 的粒径及电势以评价 CHE 的稳定性。

1.3.4 CHE 吸附抗原能力检测

将 CHE 与 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA 按照体积比 1:1 混匀(OVA 总量为 W), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 吸附过夜。将混合液以 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 1 mL 注射器吸取下清液, Micro BCA 试剂盒检测下清液中蛋白含量(即未吸附 OVA 的量为 S)。吸附率(adsorption efficiency, AE)计算公式如下:

$$\text{AE}(\%) = (W - S) / W \times 100$$

1.3.5 实验分组和免疫

选取 6–8 周 BALB/c 雌鼠随机分成 5 组, 每组 4 只, 适应环境 3–5 d。采取肌肉注射的方式在 0、14 d 分别进行免疫, 每只小鼠免疫体积为 100 μL , 35 d 时处死小鼠结束免疫。实验方案如表 1 所示。选取商品化 Al 佐剂与自制表面活性剂稳定的乳液(surfactant stabilized emulsion, SSE)佐剂作为对照组, SSE 佐剂为表面活性剂稳定的油乳佐剂, 配方与 MF59 相似, 按文献[18]方法制备。

表 1 每只小鼠免疫剂量

Table 1 Formulation and dosage of the treated groups (per mouse)

Group	Al (μg)	Chitosan (μg)	Squalene (μL)	White oil (μL)	OVA (μg)
PBS	/	/	/	/	/
OVA	/	/	/	/	10
Al	10	/	/	/	10
SSE	/	/	8.6	/	10
CHE	/	150	/	5	10

/: Does not contain this ingredient.

1.3.6 血清抗体水平检测实验分组与免疫

在首次免疫后的第 21、28、35 天取血，室温静置 4 h， $10\ 000\times g$ 离心 10 min 收集血清，保存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中。血清中 IgG 抗体采用间接 ELISA 技术检测，实验操作如下：首先在 96 孔板中加入 $100\ \mu\text{L}$ 含 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ OVA 的包被液，置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下静置过夜；次日弃去包被液，用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 封闭液， $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1 h；弃去封闭液，用 PBST 洗板 4 次后，加入梯度稀释的待测血清， $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 45 min；弃去血清，用 PBST 洗板 4 次后，每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 的 $1:50\ 000$ 稀释的 IgG 二抗， $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 45 min；弃去板内 IgG 稀释液，用 PBST 洗板 6 次后，每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ TMB 显色液，在室温下避光显色 10 min，再加入 $50\ \mu\text{L}$ $1\ \text{mol}/\text{L}$ 的硫酸终止显色反应；在 $450\ \text{nm}$ 波长处测定吸光度值从而确定 IgG 抗体滴度。

1.3.7 脾细胞悬液的制备

在初次免疫后第 35 天，处死小鼠并用 75% 的酒精消毒，在超净台中用剪刀镊子将位于小鼠左腹的脾脏取出，置于 200 目无菌细胞筛上，加入 $5\ \text{mL}$ RPMI1640 培养基，用研磨棒研磨脾脏，并用 $10\ \text{mL}$ RPMI1640 冲洗细胞筛，得到脾细胞悬液，将所得脾细胞悬液加入到 $50\ \text{mL}$ 离心管中， $500\times g$ 离心 5 min，弃去上清。加入 $4\ \text{mL}$ 红细胞裂解液吹打细胞，室温下静置 4 min，加入 RPMI 1640 培养基混匀后离心，弃去上清。加入 $1\ \text{mL}$ RPMI1640 完全培养基(含有 10% FBS 和 1%青霉素-链霉素双抗的 RPMI

1640 培养基)重悬细胞并计数。

1.3.8 酶联免疫斑点法 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)检测

将脾细胞以 5×10^5 个/孔浓度加入到 IL-4 预包被的 PVDF 96 孔板中。向孔板中加入浓度为 $4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ OVA 作为刺激物。放入细胞培养箱孵育 24 h 之后取出，去除孔内细胞，用 PBST 洗板 4 次，按照产品说明书加入稀释的生物素标记检测抗体，室温放置 2 h 后弃去，用 PBST 洗板 4 次，加入稀释的酶标亲和素，室温放置 1 h。最后倒掉，用 PBST 洗板 4 次后拍干孔板，每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 显色液显色 15 min，倒掉显色液，置于流动的自来水下终止反应，取下孔板背部的塑料保护层，在室温下自然干燥，孔板底部形成斑点，通过读板仪读取细胞个数。

1.3.9 五聚体实验^[18]

取 3×10^6 个脾细胞悬液于 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中，离心后弃去上清，每管加入 $50\ \mu\text{L}$ 流式缓冲液重悬细胞，再加入 $10\ \mu\text{L}$ 的 APC-Pentamer，室温孵育 20 min，PBS 洗涤后加入含 PE-CD8a 抗体的流式缓冲液， $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育 30 min，加入 PBS 洗涤后，加入流式缓冲液重悬细胞，细胞筛网过滤后，使用流式细胞仪检测 $\text{Pentamer}^+\text{CD8}^+$ 双阳的细胞数。

1.3.10 T 细胞表面活化分子标记物检测

将脾细胞以 1×10^6 个/孔的浓度接种于 24 孔板中，加入含有 OVA 刺激的 RPMI1640 完全培养基，细胞培养箱中培养 48–60 h，收集细胞后离心，弃上清后加入含有 Percp/Cy5.5-CD8a、

APC/Cy7-CD69、PE-CD107 和 FITC-SIINFEKL-MHC I 流式抗体的流式缓冲液重悬细胞, 4 °C 避光孵育 30 min。加入 PBS 洗涤后, 加入流式缓冲液重悬细胞, 细胞筛网过滤后, 使用流式细胞仪检测各分子表达情况。

1.3.11 流式检测记忆性 T 细胞表达水平

细胞前期处理与 1.3.10 中相同, 收集细胞离心, 弃上清后加入含有 PE/Cy7-CD4、PE-CD8a、Percp/Cy5.5-CD44 和 FITC-CD62L 流式抗体的流式缓冲液重悬细胞, 4 °C 避光孵育 30 min。加入 PBS 洗涤后, 加入流式缓冲液重悬细胞, 细胞筛网过滤后, 使用流式细胞仪检测记忆性 T 细胞表达水平。

1.3.12 生物安全性检测

按照动物实验中分组及免疫方案进行肌肉注射免疫, 在初次免疫后第 35 天, 从小鼠眼眶采血收集血清, 生化分析仪测定血清中丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)以及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)以评价心肝肾毒性。采血后处死各组小鼠, 摘取小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏, 使用 PBS 漂洗去除残余的血液, 剪取一部分脏器放入 4%组织固定液

中, 固定过夜。之后制备石蜡切片并进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 使用 Vectra 切片成像系统进行观察, 并与阴性对照组 PBS 对比, 验证其动物水平的生物安全性。

1.3.13 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 进行统计学分析, 数据表达方式为平均值±标准差。*P* 值大于 0.05 时, 表示数据间无显著性差异, 用 ns 表示; *P* 值小于 0.05 时, 表示数据间存在差异。其中*: *P*<0.05, **: *P*<0.01, ***: *P*<0.001, ****: *P*<0.000 1。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖盐酸盐溶液及 CHE 表征

壳聚糖盐酸盐的黏度为 40 mPa·s, 脱乙酰度为 90.5%。测得壳聚糖盐酸盐溶液 pH 值为 5.63, 电势为(32.5±2.3) mV。其三相接触角为 37.0°±4.2°, 有文献报道称^[19], 接触角在 20°–90°之间时, 能够有效稳定乳液。CHE 粒径为(621.0±6.0) nm, 分散性良好(PDI<0.3), 电势为(50.7±0.7) mV, 能够有效吸附 OVA, 吸附率为(94.1±2.9)%。CHE 在制备后 0、7、14、21、28、60 d 的粒径及电势如图 1 所示, 无明显变化, 证明 CHE 可以在 4 °C 条件下可以保存至少 2 个月。

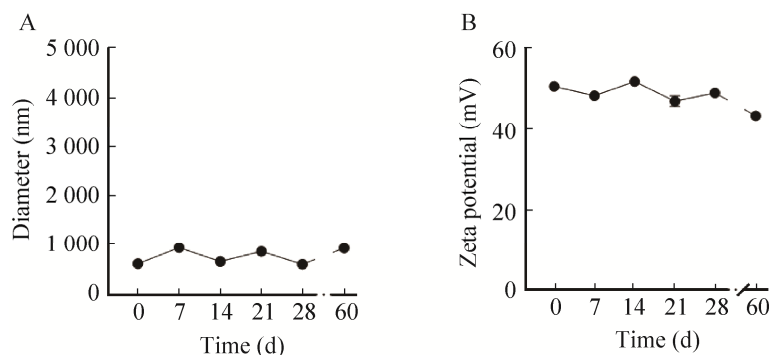


图 1 CHE 的稳定性粒径(A)和电势(B)

Figure 1 Stability of CHE size (A) and zeta (B).

2.2 体液免疫效果评价

2.2.1 CHE 对血清中 IgG 特异性抗体水平的影响

各免疫佐剂所引起的抗体滴度结果如图 2 所示, 并采用 Two-way ANOVA Tukey's test 进行数据分析。在初次免疫后第 14 天, 各组之间没有显著性差异($P>0.05$)。在初次免疫后第 21 天, CHE 组抗体水平最高, 但与 SSE 与 AI 之间无显著性差异($P>0.05$), 与单独抗原组之间存在显著性差异($P<0.001$)。在初次免疫后第 28 天, 各组抗体水平比较结果为: $SSE>CHE>AI>OVA$ 。其中 SSE 组抗体滴度最高, 与 CHE 之间存在显著差异($P<0.0001$), CHE 对比单独抗原组能够显著提升抗体滴度($P<0.0001$), 是单独抗原组抗体水平的 52 倍。在初次免疫后第 35 天, 各组抗体水平比较结果为: $CHE>SSE>AI>OVA$, CHE 组与 SSE 之间无显著性差异($P>0.05$), 但是显著优于 AI ($P<0.05$)与单独抗原组($P<0.0001$)。研究结果表明, CHE 能够在

免疫初期对比单独抗原组, 产生较高的抗体水平, 在免疫后期与 SSE 佐剂之间无显著性差异, 且优于 AI 抗体水平。

2.2.2 ELISPOT 检测分泌 IL-4 的脾细胞数目

在初次免疫后第 35 天, 用 ELISPOT 检测脾细胞中分泌 IL-4 细胞因子的细胞数目, 结果如图 3 所示, 并采用 One-way ANOVA Tukey's test 进行数据分析。CHE 组分泌 IL-4 细胞因子的脾细胞数是单独抗原组的 2.3 倍, 与 SSE 与 AI 之间没有显著性差异($P>0.05$)。这说明 CHE 在免疫后可以增强体液免疫效果, 且与商品化 AI 佐剂、油乳佐剂 SSE 产生的体液免疫效果相当。

2.3 细胞免疫效果评价

2.3.1 五聚体实验

用 SIINFEKL 特异性的五聚体试剂盒检测各免疫制剂对脾细胞中抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞的影响, 结果如图 4A 所示, 并采用 One-way ANOVA Tukey's test 进行数据分析。CHE 组产

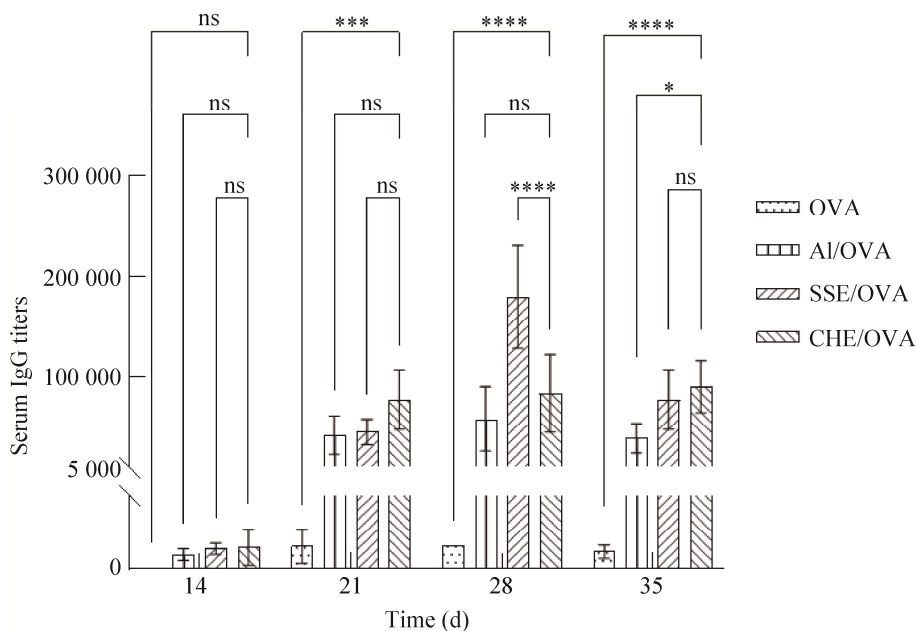


图 2 血清中特异性抗体 IgG 分泌水平($n=4$)

Figure 2 Antigen-specific antibody secretion in serum ($n=4$). ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

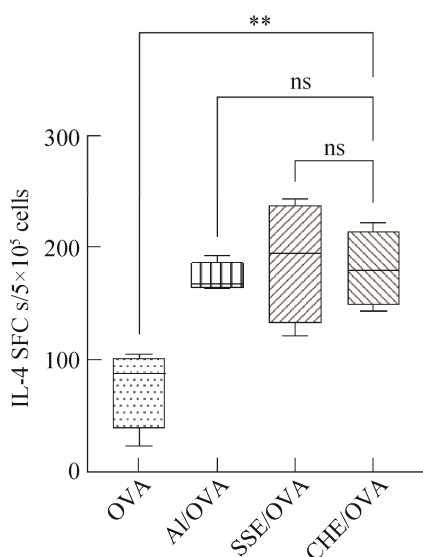


图3 脾细胞中分泌细胞因子 IL-4 细胞数目($n=4$)
Figure 3 Number of splenocyte secreting cytokines of IL-4 ($n=4$). ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

生的抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞与 SSE ($P<0.001$)、AI ($P<0.01$)和单独抗原组($P<0.01$)相比均具有显著性差异,分别是各组的 2.1、1.8 和 1.7 倍,表明 CHE 能够显著增加抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞的比例。

2.3.2 流式细胞仪检测 $CD8^+$ T 细胞表面活化分子

为了评价各免疫制剂对细胞免疫的影响,流式细胞术检测了 $CD8^+$ T 细胞表面的活化分子,结果如图 4B-D 所示,并采用 One-way ANOVA Tukey's test 进行数据分析。 $CD69$ 分子被称为淋巴细胞的早期活化标志^[20],能够反映免疫细胞增殖活化能力。在 $CD69^+CD8^+$ 表达情况中, CHE 组的百分比显著高于其余免疫制剂组,与 SSE 和单独抗原组之间存在显著性差异($P<0.0001$),与 AI 之间也存在显著性差异($P<0.001$)。另外,细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)杀伤靶细胞的重要途径之一是释放颗粒酶, $CD8^+$ T 中的

溶酶体膜糖蛋白 $CD107$ 可以随 T 细胞脱颗粒过程而出现在其表面,因此 $CD107$ 可以直接反映 CTL 细胞数目^[21]。在 $CD107^+CD8^+$ 表达情况中, CHE 组百分比最高,能够显著优于 SSE ($P<0.001$)、AI ($P<0.001$)和单独抗原组 ($P<0.01$)。SIINFEKL-MHC I 表达量可以反映细胞交叉递呈能力^[22],在 SIINFEKL-MHC I $^+CD8^+$ 的表达情况中, CHE 组显著优于 SSE ($P<0.0001$)、AI ($P<0.001$)和单独抗原组 ($P<0.0001$)。CHE 增加了 $CD69$ 、 $CD107$ 与 SIINFEKL-MHC I 在 $CD8^+$ T 细胞表面的表达。研究结果表明, CHE 组具有更好的细胞免疫效果。

2.4 记忆性 T 细胞表达水平考察

为了评价各免疫制剂对记忆性 T 细胞表达水平的影响,流式细胞术检测了 $CD8^+$ T 与 $CD4^+$ T 细胞表面 $CD44$ 与 $CD62L$ 分子的表达情况,即中心记忆 T 细胞的百分比。结果如图 5 所示,并采用 One-way ANOVA Tukey's test 进行数据分析。在 $CD8^+$ T 细胞中, CHE 组对 $CD44^+CD62L^+$ 的表达能力显著优于单独抗原组 ($P<0.01$)。在 $CD4^+$ T 细胞中, CHE 与 SSE ($P<0.05$)、单独抗原组($P<0.0001$)之间具有显著性差异,因此, CHE 有望起长效保护作用。

2.5 生物安全性评价

在初次免疫后 35 d,血清生化分析仪检测各生化指标,结果如表 2 所示。免疫后小鼠的各项生化指标没有显著差异。并对主要脏器进行 HE 染色,得到切片结果如图 6 所示, CHE 组小鼠的主要脏器未产生明显的病变,与 PBS 组相比,未见明显差异,表明 CHE 具有注射安全性。

3 讨论

接种疫苗以产生特异性免疫保护是预防和控制传染病传播的最有效策略^[23]。疫苗需要较

强的免疫原性才能刺激机体产生免疫应答,但单纯抗原组成的疫苗往往免疫原性较差,需要添加佐剂来增强免疫反应^[24]。Al佐剂虽然已经有百年的应用历史,但其仅能激活体液免疫反应,而且容易在注射部位产生不良反应^[25]。MF59作为油乳佐剂的代表,相较于Al佐剂,在激活体液免疫应答中更为有效,但是无法引发有效的细胞免疫应答,尤其是CTL的活化^[26]。理想疫苗佐剂应该具备优异的安全性和免疫激

活性能,包括体液免疫和细胞免疫。因此开发安全、经济的新材料作为表面活性剂稳定乳液,实现提高免疫应答效果仍然存在需求。

为了克服油乳佐剂难以激活细胞免疫问题,选取其他生物相容性良好的材料代替表面活性剂稳定乳液,成为油乳佐剂发展的新趋势。Burakova等^[27]利用食品级皂苷提取物作为乳化剂和免疫刺激剂稳定乳液用作兽用佐剂,结果证明乳液能够显著加强抗体反应,但是细胞免

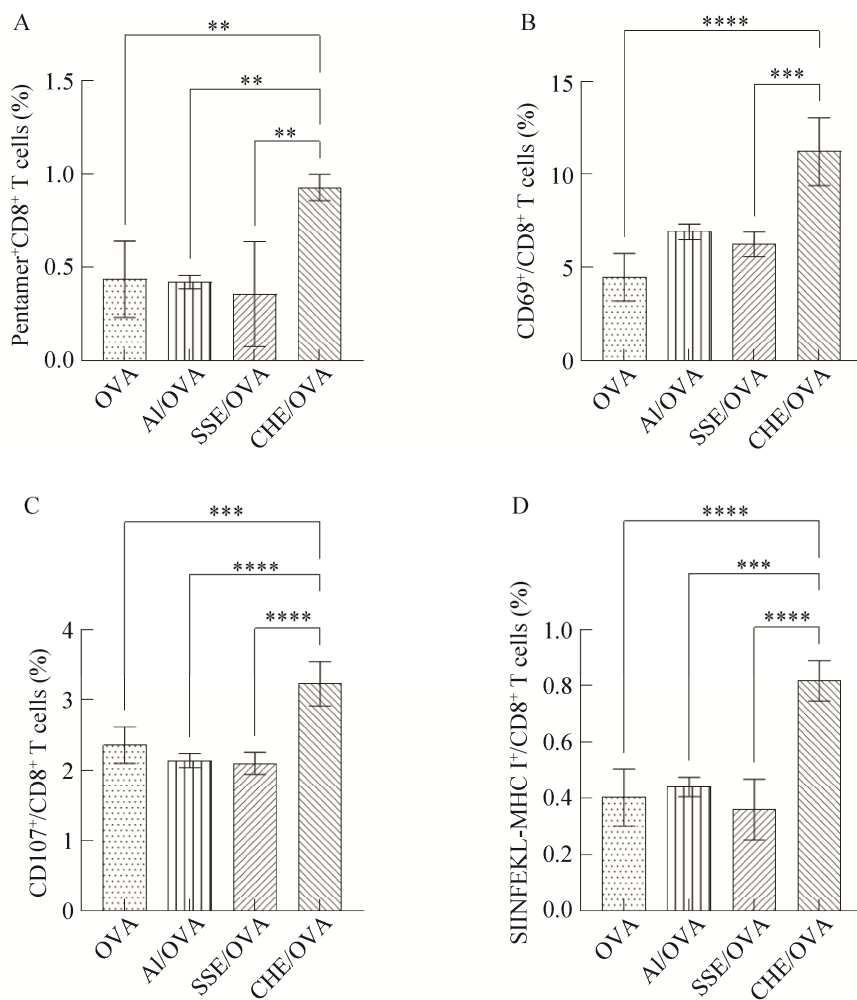


图4 CHE对细胞免疫的影响($n=4$)

Figure 4 Effect of CHE on cellular immune response ($n=4$). A: Percentage of antigen-specific CD8⁺ T cells. B: Flow cytometry analysis of CD69 expression in CD8⁺ T cells. C: Flow cytometry analysis of CD107 expression in CD8⁺ T cells. D: Flow cytometry analysis of MHC I expression in CD8⁺ T cells. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

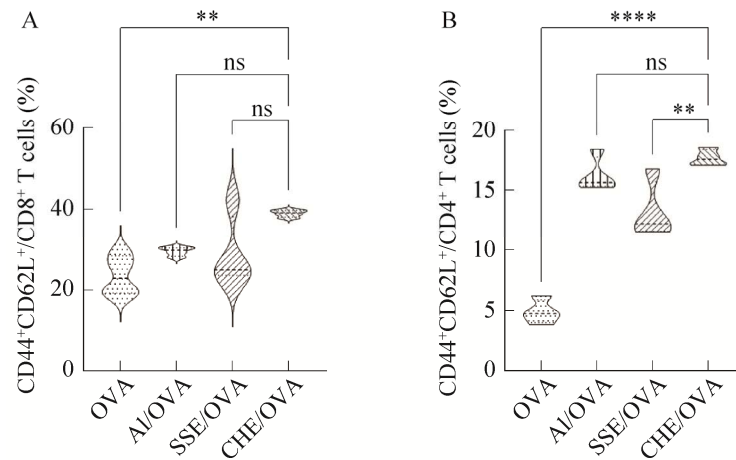


图 5 CHE 对 CD8⁺ (A) 和 CD4⁺ (B) T 细胞亚群的影响($n=4$)

Figure 5 Effect of CHE on CD8⁺ (A) and CD4⁺ (B) T cell subsets ($n=4$). ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

表 2 各免疫小鼠生化指标表

Table 2 Biochemical analysis of the formulations

Item	BUN (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
PBS	9.8±0.8	45.3±6.1	166.7±10.1	114.3±5.1	479.0±77.4
OVA	10.5±1.5	49.6±10.1	177.6±18.2	141.0±24.8	672.2±134.9
AI/OVA	9.7±1.5	46.0±15.7	156.7±37.8	135.8±21.0	594.0±54.1
SSE/OVA	11.1±2.6	48.6±9.3	182.7±13.2	151.7±21.1	558.3±83.6
CHE/OVA	13.4±1.4	54.6±7.0	204.7±28.1	148.3±17.2	493.7±109.1

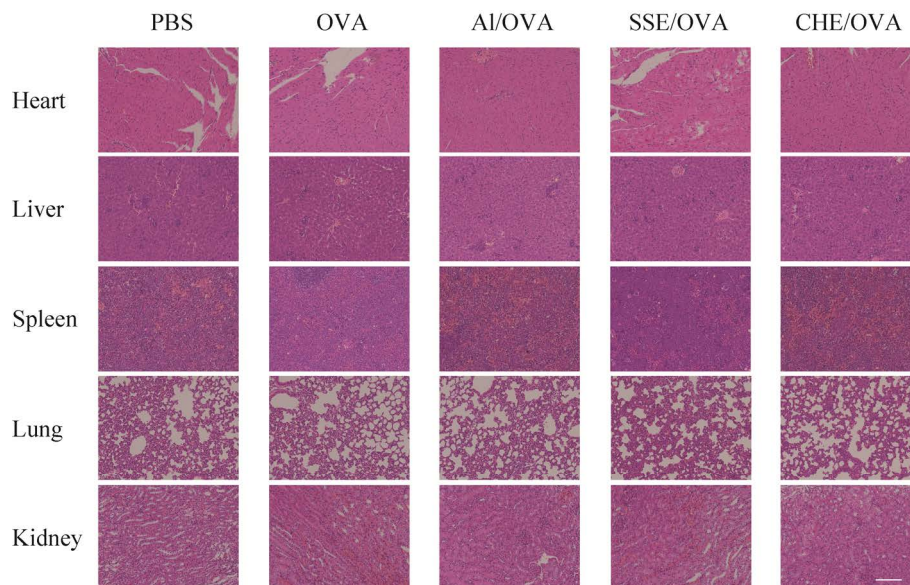


图 6 小鼠主要脏器病理性切片(比例尺为 200 μm , $n=4$)

Figure 6 Pathological sections of main organs of mice (scale bar=200 μm , $n=4$).

免疫效果未有报道。Huang 等^[28]合成了一种两亲性双嵌段三元共聚物聚—(乙二醇)-聚乳酸己内酯(PEG-b-PLACL), 用 PEG-b-PLACL 代替 Tween 80 来稳定柠檬酸钠/角鲨烯乳剂, 开发了多相乳化剂疫苗给药系统, 命名为 PELC。当 PELC 与 CpG 联合使用时, PELC-CpG 可增强细胞免疫效应。然而, 如果不添加 CpG, 该乳剂很难诱导有效的细胞免疫反应^[29]。这可能是由于 PEG-PLA 是电中性的, 它不能有效地吸附抗原, 也不能增强与抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)的相互作用。综上所述, 油乳佐剂虽然能够激活体液免疫保护, 但是其依然无法引发有效的细胞免疫应答。因此, 现有临床应用的疫苗佐剂已无法满足抗体不敏感病毒防治的发展需求, 开发新型佐剂迫在眉睫。

本研究采用自然界唯一的阳离子多糖壳聚糖作为单一表面活性剂稳定乳液, 制备了新型油乳佐剂 CHE, 对其表征并进一步考察其免疫效果。CHE 粒径较小, 为(621±6) nm, 能够稳定 60 d, 乳滴表面具有正电荷, 可通过静电吸附对带负电性的 OVA 实现高吸附。体液免疫试验结果表明, CHE 能够产生较高的抗体滴度, 增加脾细胞分泌 IL-4 的水平。这说明其在免疫后可以增强体液免疫效果。在体液免疫的增强机制方面, CHE 与 MF59 机制相似, 在肌肉注射后, 局部的刺激募集免疫细胞, 迅速产生趋化因子^[30], 进而募集其他具有吞噬和抗原提呈能力的免疫细胞。募集而来的免疫细胞在乳液的刺激下分泌细胞因子, 形成免疫活化微环境, 进一步诱导天然免疫细胞在注射部位富集, 形成免疫响应正循环^[31]。在免疫活化微环境中, 募集而来的天然免疫细胞表达 CD86 等因子^[32], 并且高表达主要组织相容性复合物 II, 增强抗原提呈能力^[33], 提升体液免疫效果。

为了进一步考察 CHE 的细胞免疫效果, 对

免疫后小鼠脾细胞中 CTL 细胞数量进行评价。流式细胞术评价了抗原特异性 CD8⁺ T 细胞占比及 CD8⁺ T 细胞表面的活化分子的表达水平。试验结果显示 CHE 较 AI 佐剂组及 SSE 组显著提升细胞免疫应答, 这是因为细胞膜为磷脂双分子层结构, 并且表面有大量糖蛋白呈负电性。CHE 具有正电荷的表面性质, 通过吸附携带大量抗原, 油乳佐剂本身增加了与细胞接触的表面积, 能够更好地与细胞膜相互作用, 促进细胞对抗原的摄取。一般认为, 500–2 000 nm 的颗粒易于被 APCs 摄取^[34]。CHE 的粒径在此范围内, 因此可以更有效地提高抗原的利用率, 实现更好的细胞免疫效果。

此外, 还探究了中心记忆 T 细胞的表达水平, CHE 组所产生的中心记忆 T 细胞较多, 当它们遇到相同抗原时, 能迅速增殖并产生效应细胞, 从而起到长期保护机体的作用。其作用机制可能与油乳佐剂 MF59 注射后相似, 在注射部位募集而来的免疫细胞被检测出高水平的 C-C 趋化因子受体 7, 说明油乳佐剂不仅可以诱导 APCs 的活化与成熟, 还可以促进其向引流淋巴结特异性的富集。归巢后的嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、单核细胞和树突状细胞可以高效递呈抗原, 增强淋巴结中滤泡状辅助 T 细胞的活化和生发中心的成熟, 进而产生长效免疫记忆^[35]。综上所述, CHE 有望成为一种新型油乳佐剂。

4 结论

本研究采用壳聚糖盐酸盐代替传统表面活性剂稳定乳液, 并表征其性质及作为疫苗佐剂的免疫增强效果。得到如下结论: (1) 壳聚糖盐酸盐与水的接触角适中, 能有效稳定水包油乳液。CHE 粒径为(621±6) nm, 电势为(50.7±0.7) mV, 呈正电性, 有利于对带负电抗原

的吸附。(2) CHE 能够较单独抗原组显著提升抗体滴度,在免疫后期保持与 A1、SSE 相当水平的抗体滴度,并且提升分泌 Th2 型细胞因子 IL-4 的脾细胞数目,说明 CHE 能够有效提升体液免疫效果。(3) CHE 能够显著促进 CD8⁺ T 细胞活化,具有良好的细胞免疫增强效果。(4) 此外, CHE 能够显著促进中心记忆 T 细胞的表达,具有较好的长效免疫应答能力。

本研究对壳聚糖盐酸盐稳定的水包油乳液的稳定性及免疫增强效果进行评价,结果表明壳聚糖盐酸盐稳定的乳液具有一定的免疫增强能力。CHE 在与传统油乳佐剂相当的体液免疫应答效果基础上,能显著提升细胞免疫应答,有望作为治疗性疫苗制剂。

REFERENCES

- [1] ZHANG RQ, HUNG IFN. Approaches in broadening the neutralizing antibody response of the influenza vaccine[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2021, 20(12): 1539-1547.
- [2] 曾振, 王海宁, 张志芳, 易咏竹. 新型疫苗佐剂的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 78-87.
ZENG Z, WANG HN, ZHANG ZF, Yi YZ. Research progress of new vaccine adjuvants[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(1): 78-87 (in Chinese).
- [3] KIM SH, JANG YS. The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants[J]. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2017, 6(1): 15-21.
- [4] TAHARA Y, MIZUNO R, NISHIMURA T, MUKAI SA, WAKABAYASHI R, KAMIYA N, AKIYOSHI K, GOTO M. A solid-in-oil-in-water emulsion: an adjuvant-based immune-carrier enhances vaccine effect[J]. *Biomaterials*, 2022, 282: 121385.
- [5] WONG PT, GOFF PH, SUN RJ, RUGE MJ, ERMILER ME, SEBRING A, O'KONEK JJ, LANDERS JJ, JANCZAK KW, SUN WN, BAKER JR JR. Combined intranasal nanoemulsion and RIG-I activating RNA adjuvants enhance mucosal, humoral, and cellular immunity to influenza virus[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 18(2): 679-698.
- [6] PANASIUK M, ZIMMER K, CZARNOTA A, NARAJCZYK M, ESZYŃSKA-SULARZ G, CHRANIUK M, HOVHANNISYAN L, ŻOLEDOWSKA S, NIDZWORSKI D, ŻACZEK AJ, GROMADZKA B. Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe cancer immunotherapy[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 160.
- [7] GORSE GJ, GRIMES S, BUCK H, MULLA H, WHITE P, HILL H, MAY J, FREY SE, BLACKBURN P. MAS-1, a novel water-in-oil adjuvant/delivery system, with reduced seasonal influenza vaccine hemagglutinin dose may enhance potency, durability and cross-reactivity of antibody responses in the elderly[J]. *Vaccine*, 2022, 40(10): 1472-1482.
- [8] DU YQ, SONG TT, WU J, GAO XD, MA GH, LIU YC, XIA YF. Engineering mannosylated pickering emulsions for the targeted delivery of multicomponent vaccines[J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121313.
- [9] 张雪梅, 徐婧雯, 吴忠香, 王葳, 徐小宁, 董少忠. MF59 佐剂对脊髓灰质炎灭活疫苗诱导恒河猴细胞免疫应答的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(10): 1263-1267.
ZHANG XM, XU JW, WU ZX, WANG W, XU XN, DONG SZ. Effect of MF59 adjuvant on cellular immune response induced by inactivated polio vaccine in rhesus[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2014, 27(10): 1263-1267 (in Chinese).
- [10] XU CJ, XING RE, LIU S, QIN YK, LI KC, YU HH, LI PC. The immunostimulatory effects of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan-carboxymethyl chitosan nanoparticles[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 181: 398-409.
- [11] SAFARZADEH M, MOHAMMADI-YEGANEH S, GHORBANI-BIDKORBEH F, HAJI MOLLA HOSEINI M. Chitosan based nanoformulation expressing miR-155 as a promising adjuvant to enhance Th1-biased immune responses[J]. *Life Sciences*, 2022, 297: 120459.
- [12] GOMES DCO, BEATRIZ LILIAN DA SILVA COSTA SOUZA, SCHWEDERSKY RP, COVRE LP, DE MATOS GUEDES HL, LOPES UG, RÉ MI, ROSSI-BERGMANN B. Intranasal immunization with chitosan microparticles enhances LACK-DNA vaccine protection and induces specific long-lasting immunity against visceral leishmaniasis[J]. *Microbes and*

- Infection, 2022, 24(2): 104884.
- [13] YU S, HAO SN, SUN BN, ZHAO DY, YAN XY, JIN Z, ZHAO K. Quaternized chitosan nanoparticles in vaccine applications[J]. Current Medicinal Chemistry, 2020, 27(30): 4932-4944.
- [14] LI XZ, YANG Y, YANG F, WANG FH, LI H, TIAN HY, WANG GY. Chitosan hydrogel loaded with recombinant protein containing epitope C from HSP90 of *Candida albicans* induces protective immune responses against systemic candidiasis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 327-340.
- [15] GHALAVAND M, SAADATI M, SALIMIAN J, ABBASI E, HOSSEINZADEH G, GOUVARCHIN GHALEH HE, AHMADI A. Biological properties the novel application of N-trimethyl chitosan nanospheres as a stabilizer and preservative in tetanus vaccine[J]. Clinical and Experimental Vaccine Research, 2021, 10(1): 24-34.
- [16] ZOU YJ, LI S, NGAI T, ZHANG SP, MA GH, WU J. Green preparation of hydrogel particles-in-emulsions for simultaneous enhancement of humoral and cell-mediated immunity[J]. Engineering in Life Sciences, 2020, 20(11): 514-524.
- [17] ISLAM MA, RICE J, REESOR E, ZOPE H, TAO W, LIM M, DING JX, CHEN YH, ADULUSO D, ZETTER BR, FAROKHZAD OC, SHI JJ. Adjuvant-pulsed mRNA vaccine nanoparticle for immunoprophylactic and therapeutic tumor suppression in mice[J]. Biomaterials, 2021, 266: 120431.
- [18] XIA YF, WU J, WEI W, DU YQ, WAN T, MA XW, AN WQ, GUO AY, MIAO CY, YUE H, LI SG, CAO XT, SU ZG, MA GH. Exploiting the pliability and lateral mobility of pickering emulsion for enhanced vaccination[J]. Nature Materials, 2018, 17(2): 187-194.
- [19] BINKS BP. Particles as surfactants—similarities and differences[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2002, 7(1/2): 21-41.
- [20] YU ZJ, LIU WS, HE Y, SUN ML, YU JK, JIAO X, HAN Q, TANG HC, ZHANG B, XIAN YK, QI J, GONG J, XIN W, SHI G, SHAN FP, ZHANG R, LI JP, WEI MJ. HLA-A2.1-restricted ECM1-derived epitope LA through DC cross-activation priming CD8⁺ T and NK cells: a novel therapeutic tumour vaccine[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2021, 14(1): 71.
- [21] PITTET LF, FRITSCHI N, TEBRUEGGE M, DUTTA B, DONATH S, MESSINA NL, CASALAZ D, HANEKOM WA, BRITTON WJ, ROBINS-BROWNE R, CURTIS N, RITZ N. *Bacillus calmette-guérin* skin reaction predicts enhanced mycobacteria-specific T-cell responses in infants: a *Post hoc* analysis of a randomized controlled trial[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2022, 205(7): 830-841.
- [22] XU HC, HUANG J, PANDYRA AA, PANDEY P, WANG RF, ZHANG ZL, ZHUANG Y, GERTZEN CGW, MÜNK C, HEREBIAN D, BORKHARDT A, RECHER M, GOHLKE H, ESPOSITO I, OBERBARNSCHEIDT M, HÄUSSINGER D, LANG KS, LANG PA. Single MHC-I expression promotes virus-induced liver immunopathology[J]. Hepatology Communications, 2022, 6(7): 1620-1633.
- [23] ZHU K, TIAN YK, DONG XM, AKINWUNMI BO, ZHANG CJP, HUANG J, MING WK. The cost-effectiveness of bivalent, quadrivalent, and nine-valent HPV vaccination in Asia: a systematic review[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2022, 306(1): 173-187.
- [24] HUNG IFN, YUEN KY. Immunogenicity, safety and tolerability of intradermal influenza vaccines[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2018, 14(3): 565-570.
- [25] 何鹏, 胡忠玉. 铝佐剂效应的影响因素及铝佐剂疫苗改进的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(6): 654-659.
- HE P, HU ZY. Advance in study on influencing factors of action mechanism and on improvement of aluminum-based adjuvant[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2016, 29(6): 654-659 (in Chinese).
- [26] O'HAGAN DT. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection[J]. Expert Review of Vaccines, 2007, 6(5): 699-710.
- [27] BURAKOVA Y, MADERA R, WANG LH, BUIST S, LLEELLISH K, SCHLUP JR, SHI JS. Food-grade saponin extract as an emulsifier and immunostimulant in emulsion-based subunit vaccine for pigs[J]. Journal of Immunology Research, 2018, 2018: 8979838.
- [28] HUANG MH, CHOU AH, LIEN SP, CHEN HW, HUANG CY, CHEN WW, CHONG P, LIU SJ, LENG CH. Formulation and immunological evaluation of novel vaccine delivery systems based on bioresorbable poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide-co-epsilon-caprolactone)[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials, 2009, 90(2): 832-841.

- [29] HUANG MH, LIN SC, HSIAO CH, CHAO HJ, YANG HR, LIAO CC, CHUANG PW, WU HP, HUANG CY, LENG CH, LIU SJ, CHEN HW, CHOU AH, HU AYC, CHONG P. Emulsified nanoparticles containing inactivated influenza virus and CpG oligodeoxynucleotides critically influences the host immune responses in mice[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12279.
- [30] O'HAGAN DT, OTT GS, DE GREGORION E, SEUBERT A. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation[J]. *Vaccine*, 2012, 30(29): 4341-4348.
- [31] SHARP FA, RUANE D, CLAASS B, CREAGH E, Harris J, MALYALA P, SINGH M, O'HAGAN DT, PÉTRILLI V, TSCHOPP J, O'NEILL LAJ, LAVELLE EC. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(3): 870-875.
- [32] SEUBERT A, MONACI E, PIZZA M, O'HAGAN DT, WACK A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells[J]. *Journal of Immunology: Baltimore, Md: 1950, 2008*, 180(8): 5402-5412.
- [33] DUPUIS M, DENIS-MIZE K, LABARBARA A, PETERS W, CHARO IF, MCDONALD DM, OTT G. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis[J]. *European Journal of Immunology*, 2001, 31(10): 2910-2918.
- [34] KOPPOLU B, ZAHAROFF DA. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(9): 2359-2369.
- [35] O'HAGAN DT, OTT GS, NEST GV, RAPPUOLI R, GIUDICE GD. The history of MF₅₉[®] adjuvant: a phoenix that arose from the ashes[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2013, 12(1): 13-30.

(本文责编 郝丽芳)