

秦 竹, 陈 瑾, 侯立婷, 等. 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的制备及佐剂活性[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(1): 141-148.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.01.015

# 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的制备及佐剂活性

秦 竹<sup>1,2</sup>, 陈 瑾<sup>1,2</sup>, 侯立婷<sup>1,2</sup>, 乔绪稳<sup>1,2</sup>, 李 兰<sup>1,2</sup>, 杨 利<sup>1,2</sup>, 杜露平<sup>1,2</sup>,  
于晓明<sup>1,2</sup>, 张元鹏<sup>1,2</sup>, 郑其升<sup>1,2</sup>

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省食品质量与安全重点实验室, 江苏南京 210014; 2.兽用生物制品国泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 重组 CTA1-DD 蛋白具有与完整 CT 分子相当的全身性和黏膜佐剂功能,但在复杂的生理环境中易被酶或酸降解。本研究以同样具有佐剂活性的 *O*-羧甲基壳聚糖(OCS)和硫酸葡聚糖(DS)为载体,通过离子交联形成纳米颗粒,将 CTA1-DD 蛋白嵌入其中,使其得到稳定保护。包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的粒径为 50~150 nm, Zeta 电位约 -50 mV, 质量浓度 1.0 mg/ml 的 CTA1-DD 蛋白投入制备的包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒载药率 25.33%, 包封率 86.56%。体外模拟释放试验结果显示 CTA1-DD 蛋白可在 7 d 内缓慢释放。将 CTA1-DD 蛋白与 PRV 灭活抗原混合后,接种至小鼠鼻腔,结果表明,包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒能够同时诱导更高的血清 IgG 抗体和黏膜 IgA 抗体表达,证明了其作为黏膜佐剂的高效性。

**关键词:** CTA1-DD 蛋白; *O*-羧甲基壳聚糖; 硫酸葡聚糖; 纳米颗粒; 佐剂活性

中图分类号: S852.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)01-0141-08

## Preparation and adjuvant activity of OCS-DS nanoparticles encapsulating CTA1-DD protein

QIN Zhu<sup>1,2</sup>, CHEN Jin<sup>1,2</sup>, HOU Li-ting<sup>1,2</sup>, QIAO Xu-wen<sup>1,2</sup>, LI Lan<sup>1,2</sup>, YANG Li<sup>1,2</sup>, DU Lu-ping<sup>1,2</sup>,  
YU Xiao-ming<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuan-peng<sup>1,2</sup>, ZHENG Qi-sheng<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety, Nanjing 210014, China; 2. Guotai Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** The recombinant CTA1-DD protein has systemic and mucosal adjuvant functions comparable to intact CT molecules. But it is easily degraded by enzymes or acids in complex physiological environments. In this study, *O*-carboxymethyl chitosan (OCS) and dextran sulfate (DS), which also had adjuvant activity, were used as carriers to form nanoparticles through ion crosslinking, and CTA1-DD protein was embedded in them for stable protection. The particle size of OCS-

收稿日期: 2022-12-20

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(21)3135]; 十四五重点研发专项(2022YFD1800800)

作者简介: 秦 竹(1983-), 女, 江苏南京人, 博士, 副研究员, 主要从事免疫增强性分子结构设计及其纳米结构研究。(E-mail) qinz@jaas.ac.cn

通讯作者: 张元鹏, (E-mail) zhangyuanpengnj@163.com; 郑其升, (E-mail) njcvc1302@163.com

DS nanoparticles encapsulating CTA1-DD protein ranged from 50 nm to 150 nm, with a Zeta potential of approximately -50 mV. The drug loading rate of OCS-DS nanoparticles encapsulating CTA1-DD protein was 25.33% when 1.0 mg/ml CTA1-DD protein was put into preparation, and the protein encapsulation rate was 86.56%. The simulated release tests *in vitro* showed that CTA1-DD protein could be slowly released within seven days. The mice

were inoculated intranasally with the mixture of CTA1-DD protein and PRV inactivated antigen. The results showed that OCS-DS nanoparticles encapsulated with CTA1-DD protein could simultaneously induce higher expression of serum IgG antibodies and mucosal IgA antibodies, which proved its high efficiency as mucosal adjuvant.

**Key words:** CTA1-DD protein; *O*-carboxymethyl chitosan; dextran sulfate; nanoparticles; adjuvant activity

重组 CTA1-DD 蛋白是由霍乱毒素 (Cholera toxin, CT) 的 A1 亚基 (CTA1) 与金黄色葡萄球菌蛋白 A 的二聚体 (D-dimer, DD) 相连组成, 其佐剂效应于 1997 年被首次报道。随后, CTA1-DD 被广泛应用于人类免疫缺陷病毒 (HIV)、人乳头瘤病毒 (HPV)、埃博拉病毒 (EBOV)、甲型 H1N1 流感病毒和轮状病毒小颗粒等疫苗产品中, 显著增强了疫苗的免疫保护效力, 验证了其佐剂功效<sup>[1-5]</sup>。研究表明, CTA1-DD 融合蛋白具有与完整 CT 分子相当的全身性和黏膜佐剂功能, 大大提升了机体对其联合免疫的特异性抗原的免疫应答水平<sup>[6-7]</sup>, 是一种具有前途的蛋白类佐剂。但是, CTA1-DD 蛋白在复杂的生理环境中通常容易被酶或者酸降解, 生物利用率不高, 因此在生产应用中受到很大的限制。

为了解决上述问题, 本研究利用载体材料将 CTA1-DD 蛋白包裹成纳米颗粒进行体内递送, 以保护 CTA1-DD 蛋白在生理环境中不易被快速降解, 能够高效到达靶标组织和细胞, 发挥佐剂作用。本研究以同样具有佐剂活性的多糖 (壳聚糖和葡聚糖) 衍生物<sup>[8-9]</sup>为载体材料。壳聚糖是自然界中广泛存在的甲壳素的脱乙酰产物, 分子表面的伯胺基质子化后带正电, 具有良好的生物相容性和生物可降解性<sup>[10-11]</sup>, 亦可作为佐剂增强疫苗的体液免疫和细胞免疫应答<sup>[12-13]</sup>。由于壳聚糖在生理 pH 下的溶解性较差, 研究者常常将壳聚糖通过离子交联、乳液交联、自组装等方法制备成纳米颗粒使用<sup>[14]</sup>。研究表明, 壳聚糖纳米颗粒可诱导炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1 $\alpha$  的释放, 并促进 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖<sup>[15-17]</sup>。Günbeyaz 等<sup>[18]</sup>将壳聚糖纳米颗粒用于牛疱疹病毒疫苗的黏膜递送, 提高了细胞免疫水平。Zhao 等<sup>[19]</sup>将新城疫病毒疫苗用壳聚糖纳米粒包裹, 通过黏膜途径免疫鸡, 提升了疫苗的缓释性、安全性及有效性。葡聚糖的免疫活性调节作用主要与巨噬细胞相关<sup>[20]</sup>。葡聚糖分子上含有大量羟基, 链间氢键可形成稳定的三级结构, 与巨噬细胞表面 Dectin-1 和 Toll 样受体结合, 增强其吞噬活性, 并

诱导机体炎性细胞因子的释放, 从而间接激活 B 细胞和 T 细胞, 增强免疫应答<sup>[21-22]</sup>。

本研究采用葡聚糖的硫酸盐衍生物和实验室前期合成的壳聚糖衍生物——*O*-羧甲基壳聚糖, 通过离子交联法制备包裹有 CTA1-DD 蛋白的纳米颗粒。研究纳米颗粒的制备工艺对颗粒基本性能的影响, 包裹有 CTA1-DD 蛋白纳米颗粒的包封率和载药率, 并进一步探讨包裹有 CTA1-DD 蛋白纳米颗粒的体液免疫和黏膜免疫水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

霍乱毒素基因融合蛋白 CTA1-DD 和 *O*-羧甲基壳聚糖 (相对分子质量  $3 \times 10^4$ ) 均为本实验室自制, 硫酸葡聚糖 (相对分子质量  $5 \times 10^5$ ) 购自索莱宝公司, 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 购于博士德公司, 其余试剂均购于国药集团。健康 BALB/c 雌性小鼠 (5 周龄) 购于扬州大学实验动物中心。

### 1.2 *O*-羧甲基壳聚糖-硫酸葡聚糖 (OCS-DS) 纳米颗粒的制备

分别配制 2 mg/ml 的 *O*-羧甲基壳聚糖 (OCS) 和硫酸葡聚糖 (DS) 溶液, 加入 NaCl 调节其离子强度为 0.1 mol/L, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤。分别以 2 ml 的 OCS 或 DS 为底液, 在高速搅拌条件下, 采用注射泵以 20 ml/h 的流速加入不同体积的反向电荷溶液, 再继续搅拌 10 min, 静置 6 h 后, 将样品倒入离心管中, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 再用去离子水分散、离心 2 次, 冷冻干燥, 4  $^{\circ}$ C 保存待用。

### 1.3 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒制备

将 CTA1-DD 蛋白以不同终质量浓度加入 2 mg/ml 的 DS 溶液中, 搅拌溶解, 取 2 ml 为底液。在高速搅拌的条件下, 采用注射泵以 20 ml/h 的流速加入不同体积的 OCS 溶液 (2 mg/ml), 再继续搅拌 10 min, 静置 6 h 后, 将样品倒入离心管中, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 再用去离子水分散、离心 2 次, 冷冻干燥, 4  $^{\circ}$ C 保存待用。

#### 1.4 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的基本性能表征

利用 Zetasizer Nano ZS 测定单一 OCS-DS 纳米颗粒及包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的水合粒径和 Zeta 电位,利用扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)观测样品的本体粒径和外观形态。

#### 1.5 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的载药量和包封率评价

将包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒和单一 OCS-DS 纳米颗粒在 37 ℃ 条件下分别搅拌至完全溶解,得到确定纳米颗粒质量浓度的澄清溶液。溶液中 CTA1-DD 蛋白的质量浓度通过 BCA 试剂盒在 570 nm 波长下测定吸光度,进一步计算求得。单一纳米颗粒溶解液的吸光度值作为空白对照值。OCS-DS 纳米颗粒对蛋白 CTA1-DD 的载药量(DL)和包封率(EE)计算公式分别如下:

$$DL = (W/W_n) \times 100\%;$$

$$EE = (W/W_0) \times 100\%。$$

式中,W:包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒中 CTA1-DD 蛋白的质量; $W_n$ :包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒中 OCS-DS 的质量; $W_0$ :在包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒制备时 CTA1-DD 蛋白的投入质量。

#### 1.6 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的 CTA1-DD 蛋白释放特性评价

将一定质量的包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒和单一 OCS-DS 纳米颗粒分别分散于 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,在 37 ℃ 的摇床中以 54 r/min 的速率恒温振荡。在不同时间点,各取 1 ml 振荡中的 PBS 溶液,同时补充 1 ml 新鲜 PBS 溶液。取出的 PBS 溶液在 4 ℃ 条件下 10 000 r/min 离心 20 min。取上清液,通过 BCA 试剂盒测定 CTA1-DD 蛋白质量浓度,绘制释放曲线。每个时间点取 3 个平行样进行测定,以单一 OCS-DS 纳米颗粒的释放情况作为对照。

#### 1.7 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的佐剂活性评价

以猪伪狂犬病毒(PRV)灭活抗原为模式抗原,与包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的 PBS 溶液直接混合制备 PRV 疫苗,并设置不同对照组。将健康 BALB/c 雌性小鼠按表 1 随机分组,每

组 8 只。PRV 疫苗以液滴形式直接涂抹在小鼠的双鼻孔上,疫苗用量为 1 只 20  $\mu$ l。首次免疫后 21 d,所有小鼠均以相同方式增强免疫 1 次。首次免疫后 42 d,眼眶采血分离血清,并将小鼠处死后收集支气管肺泡灌洗液,用 ELISA 法检测特异性 IgG 和 IgA 抗体水平。ELISA 检测法的具体步骤如下:将 96 孔白板用 PRV 抗原包被,每孔 5  $\mu$ g,4 ℃ 孵育过夜,再用含 5% BSA 的 DPBS(每孔 100  $\mu$ l)37 ℃ 条件下封闭 1 h,洗涤,晾干。每孔加入 100  $\mu$ l 稀释后的待测血清(稀释度:1:100~1:12 800)或肺泡灌洗液(稀释度:1:20~1:2 560),37 ℃ 孵育 1.5 h。洗涤 5 次后,分别加入 100  $\mu$ l 的 HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgG 抗体(血清样品检测孔)或 IgA 抗体(肺泡灌洗液检测孔)孵育 1 h。洗涤 5 次,加入 100  $\mu$ l TMB 室温下孵育显色,15 min 后,以 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  (50  $\mu$ l)终止酶底物反应,检测 450 nm 波长下的吸光度值( $OD_{450}$ ),判定 IgG 和 IgA 抗体滴度。

表 1 免疫分组

Table 1 Groups of vaccination

组别	疫苗组成
1	PBS
2	PRV 抗原
3	PRV 抗原+CTA1-DD 蛋白(5 $\mu$ g)
4	PRV 抗原+包裹有 CTA1-DD 蛋白(5 $\mu$ g)的 OCS-DS 纳米颗粒
5	PRV 抗原+包裹有 CTA1-DD 蛋白(1 $\mu$ g)的 OCS-DS 纳米颗粒

## 2 结果与分析

### 2.1 制备参数对羧甲基壳聚糖-硫酸葡聚糖(OCS-DS)纳米颗粒的影响

以 O-羧甲基壳聚糖(OCS)为聚阳离子,硫酸葡聚糖(DS)为聚阴离子,二者碰撞过程中可通过离子交联形成凝胶纳米颗粒。由于 OCS 与 DS 各自所带电性的强弱程度不同,因此阴阳离子的碰撞过程中,哪方为过量底物,哪方为渐进增加的成分,二者最终比例都决定了颗粒的结合紧密程度(体现为颗粒粒径)和颗粒表面的电荷强度(体现为 Zeta 电位)。此外,颗粒的粒径还与反向电荷的加入速率、二者结合时的搅拌速率密切相关。

本研究通过前期预备试验,确定了 OCS 和 DS 溶液的质量浓度均为 2 mg/ml,反向电荷溶液的加



入流速为 20 ml/h。重点研究 OCS、DS 分别为底物时,反向电荷溶液加入比例和二者混合速率这两个关键因素对纳米颗粒形成的影响。

由表 2 可以看出,以聚阴离子 DS 为底物时,形成的 OCS-DS 纳米颗粒粒径大部分在 250 nm 以下,始终保持负电性。随着反向电荷 OCS 溶液加入量的增加,颗粒粒径呈先减少再逐渐增加的趋势。当反向电荷 OCS 溶液加入量达到一定值(约 1.2 ml 左右)时,由于 Zeta 电位的负电性显著降低,颗粒间排斥力减少,颗粒粒径显著增大,且很快絮凝沉降。随着颗粒形成时搅拌速率的增加,OCS-DS 纳米颗粒的粒径先降低,再趋于一致。颗粒粒径变化进入平台期,表明该因素对颗粒粒径的影响力饱和。

表 2 2 ml 硫酸葡聚糖(DS)为底物时 O-羧甲基壳聚糖-硫酸葡聚糖(OCS-DS)纳米颗粒的粒径与 Zeta 电位

Table 2 The particle size and Zeta potential of O-carboxymethyl chitosan and dextran sulfate (OCS-DS) nanoparticles with 2 ml dextran sulfate (DS) as substrate

编号	搅拌速率 (r/min)	OCS 体积 (ml)	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)
1	800	0.4	184.6±5.3	-58.6±3.2
2	800	0.6	157.4±7.2	-56.7±4.1
3	800	0.8	152.2±3.4	-50.7±2.4
4	800	1.0	234.7±6.8	-32.4±3.6
5	800	1.2	325.2±12.8	-17.2±2.6
6	600	0.8	217.2±3.8	-48.2±1.7
7	700	0.8	191.6±3.1	-50.3±3.2
8	900	0.8	152.7±6.3	-52.3±2.8
9	1 000	0.8	151.8±3.2	-50.4±3.1

分析表 3 结果可知,以聚阳离子 OCS 为底物时,OCS-DS 纳米颗粒粒径大部分在 250 nm 以上,呈弱正电性。随着反向电荷 DS 溶液加入量的增加,颗粒表面正电性越来越弱,粒径也随之增加。当二者混合时搅拌速率提高,粒径略有下降。

综合表 2 和表 3 的颗粒参数来看,以 DS 为底物制备的 OCS-DS 纳米颗粒,其 Zeta 电位的绝对值大部分在 30 以上,表明溶液中颗粒间的排斥力较强,不易团聚。而以 OCS 为底物制备的颗粒粒径偏大,Zeta 电位绝对值在 20 左右,稳定性也较差。因此,本研究选择 DS 为底物,反向电荷溶液 OCS 加入量为 0.8 ml,搅拌速度 800 r/min 的制备条件开展后续

CTA1-DD 蛋白的包裹研究。

表 3 2 ml O-羧甲基壳聚糖(OCS)为底物时 O-羧甲基壳聚糖-硫酸葡聚糖(OCS-DS)纳米颗粒的粒径与 Zeta 电位

Table 3 The particle size and Zeta potential of O-carboxymethyl chitosan and dextran sulfate (OCS-DS) nanoparticles with 2 ml O-carboxymethyl chitosan (OCS) as substrate

编号	搅拌速率 (r/min)	DS 体积 (ml)	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)
1	800	0.4	198.2±4.8	27.2±3.4
2	800	0.6	223.7±2.5	23.4±2.8
3	800	0.8	258.4±1.6	20.3±3.7
4	800	1.0	324.9±7.9	16.0±1.3
5	800	1.2	476.2±14.3	13.7±2.0
6	600	0.8	273.2±4.3	21.6±3.1
7	700	0.8	276.3±3.8	19.5±2.7
8	900	0.8	231.0±3.1	20.8±1.2
9	1 000	0.8	228.2±4.2	22.4±3.8

## 2.2 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的粒径与电位表征

由于制备的 CTA1-DD 蛋白整体呈偏弱的负电性,因此将 CTA1-DD 蛋白加入到聚阴离子 DS 的溶液中,在 CTA1-DD 蛋白投入质量浓度分别为 0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、1.5 mg/ml、2.0 mg/ml、2.5 mg/ml 时制备纳米颗粒。制备过程中其他固定参数为:底物为 2 ml 含不同质量浓度 CTA1-DD 蛋白的 DS 溶液(2 mg/ml),注入液为 0.8 ml 的 OCS 溶液(2 mg/ml),注入液流速 20 ml/h,搅拌速率 800 r/min。

由图 1 可知,当投入的 CTA1-DD 蛋白质量浓度≤1.0 mg/ml 时,包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的粒径和 Zeta 电位变化不大。随着投入的 CTA1-DD 蛋白质量浓度的上升,包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的粒径显示出增加的趋势,估计是过量的蛋白质未能被充分包裹;而表面电位仅略微下降,表明颗粒表面仍是强烈负电性的葡聚糖硫酸根占主导,弱负电性的 CTA1-DD 蛋白仅起到辅助作用。

包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的微观外观如图 2 所示,颗粒呈球体,稳定性良好,粒径为 50~150 nm,较之水溶液中测试的粒径值要小,这是由于 OCS-DS 纳米颗粒在水溶液中的水合半径

较大,而电镜观察到的是干燥的本体颗粒。

### 2.3 包裹有 CTA1-DD 蛋白的纳米颗粒的载药率和包封率

图 3 显示了投入的 CTA1-DD 蛋白质量浓度分别为 0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、1.5 mg/ml、2.0 mg/ml、2.5 mg/ml 时,制备得到的包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒有效包封蛋白的能力。由于 OCS 和 DS 在发生离子交联的凝胶化反应时,具有一定负电性的 CTA1-DD 蛋白也会通过离子作用或随机碰撞效应嵌入其中。由图 3 可知,当 CTA1-DD 的质

量浓度从 0.5 mg/ml 提高到 2.0 mg/ml 时,其在 OCS-DS 纳米颗粒上的载药率也逐渐增加。但是随着 CTA1-DD 蛋白质量浓度的增加,则会在纳米颗粒形成过程中影响其结合的紧密程度,致使粒径增大,载药率反而下降。从包封率来看,CTA1-DD 蛋白投入质量浓度为 0.5~1.0 mg/ml 时,CTA1-DD 蛋白的包封率均在 80% 以上。CTA1-DD 蛋白质量浓度进一步增加,载药率仅小幅提升,但包封率显著下降。表明大部分 CTA1-DD 蛋白在溶液中过剩,因此包封率显著下降。

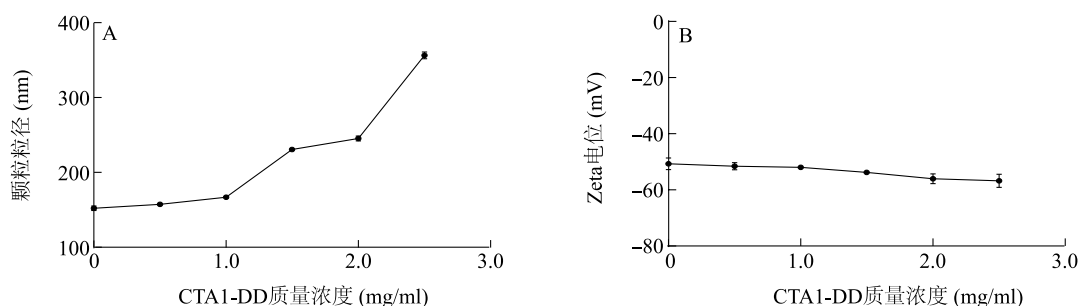
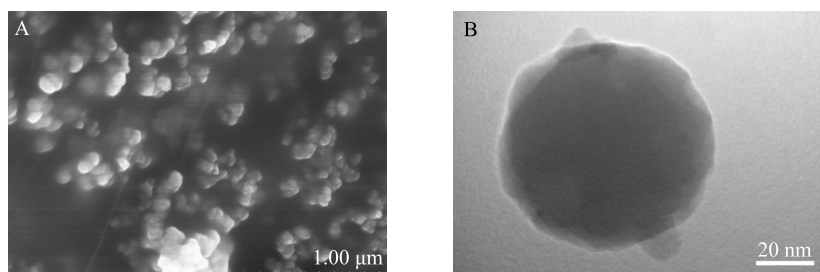


图 1 投入不同质量浓度 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒表征

Fig.1 Characterization of OCS-DS nanoparticles with different concentrations of CTA1-DD protein



A:扫描电子显微镜结果;B:透射电子显微镜结果。

图 2 包裹有 CTA1-DD 蛋白 (1 mg/ml) 的 OCS-DS 纳米颗粒的电镜图

Fig.2 Electron microscopy images of OCS-DS nanoparticles encapsulated with CTA1-DD protein (1 mg/ml)

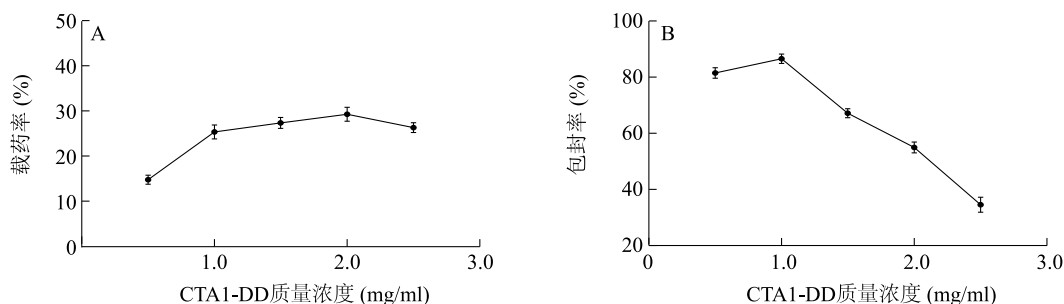


图 3 投入不同质量浓度 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒蛋白包封能力

Fig.3 Protein encapsulation capacity of OCS-DS nanoparticles with different concentrations of CTA1-DD protein

## 2.4 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的 CTA1-DD 蛋白体外释放特性

依据试验结果,本研究优选质量浓度 1.0 mg/ml 的 CTA1-DD 蛋白投入制备包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒,进行 CTA1-DD 蛋白体外释放特性的评价。制备过程中其他固定参数条件不变。包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒在生理 pH 下的体外释放过程如图 4 所示。纳米颗粒在 1 d 以内有突然释放效应,释放约一半的 CTA1-DD 蛋白。然后在 1 d 以后释放速率逐渐变缓即为缓释过程。第 7 d 时,预计纳米颗粒已基本被水溶液渗透崩解,CTA1-DD 蛋白完全释放。

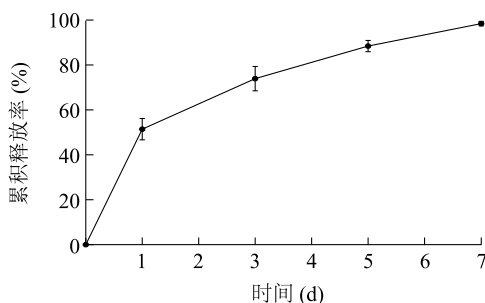


图 4 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的 CTA1-DD 蛋白体外释放曲线

Fig.4 The OCS-DS protein release profile *in vitro* of OCS-DS nanoparticles encapsulated with CTA1-DD protein

## 2.5 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒的佐剂活性

为了验证 CTA1-DD 蛋白被 OCS-DS 纳米颗粒包裹后的佐剂活性,将包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒与 PRV 灭活抗原混合后,滴入小鼠鼻腔,并分别设 PBS 阴性对照、PRV 抗原对照及 CTA1-DD 蛋白对照。首次免疫后 42 d,收集血清和肺泡灌洗液,分别检测代表体液免疫的 IgG 抗体水平和黏膜免疫的 IgA 抗体水平。ELISA 检测结果如图 5 所示,包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒能够同时诱导更高的血清 IgG 抗体和黏膜 IgA 抗体表达。

## 3 讨论

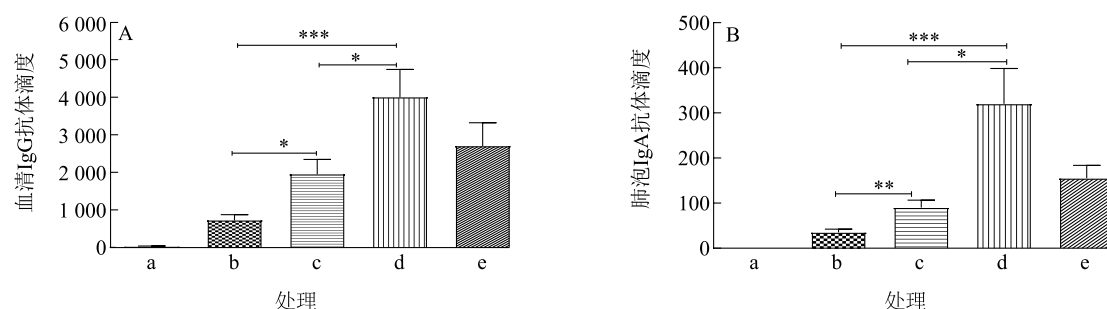
霍乱毒素和与其密切相关的大肠杆菌不耐热毒素是目前发现的最强大、研究最充分的黏膜佐剂,但由于其具有神经毒性,开发和利用受到限制<sup>[23]</sup>。经由霍乱毒素 A1 亚基重组开发的 CTA1-DD 蛋白规

避了神经毒性,并且具有与完整霍乱毒素分子相当的全身和黏膜佐剂功能。但是,在前期的应用中发现,CTA1-DD 蛋白在复杂的生理环境中容易被酶或者酸降解,生物利用率不高。为了能够更好利用 CTA1-DD 蛋白,让其在体内能够尽量多的进入免疫细胞,最大程度发挥其佐剂效应,本研究采取了将其制备成纳米颗粒这一策略。

基于 CTA1-DD 蛋白独特的黏膜佐剂潜在优势,本研究选择了同样具有黏膜佐剂效应的壳聚糖衍生物为载体材料之一。研究结果表明,无论是壳聚糖分子亦或壳聚糖纳米颗粒都在黏膜途径的疫苗给药后发挥了显著的免疫增强作用<sup>[12-13,18-19]</sup>。然而,壳聚糖仅在强酸性条件下可溶,制备成纳米颗粒后一般 pH 值也偏酸性,预计将限制其在部分抗原上的应用。本研究将壳聚糖 6 位亚甲基上的羟基选择性羧甲基化,制得了在广泛 pH 下水溶性良好的 O-羧甲基壳聚糖,并保留了正电性的伯氨基未被羧甲基化,维持了其阳离子多糖的性能<sup>[24]</sup>。硫酸葡聚糖是本研究选择的另一载体材料。葡聚糖通过激活巨噬细胞表面 Dectin-1 和 Toll 样受体,也具备一定的免疫调节功能。而葡聚糖的硫酸化,不但解决了其高分子结构水溶性差的问题,也赋予了葡聚糖表面强烈的负电性。本研究通过正电性的 O-羧甲基壳聚糖与负电性的硫酸葡聚糖相互吸引,瞬间交联形成纳米颗粒,制备方法简单,反应时间短,避免了活性物质因反应时间长或反应条件苛刻而导致的失活。而且制备过程中是在水溶液中进行,除了盐离子外,没有添加其他试剂,无毒无害。

本研究筛选了 OCS-DS 纳米颗粒的制备条件,发现以 DS 为过量底物时,OCS 滴加到 DS 溶液中可以形成比较稳定(Zeta 电位绝对值>30)的纳米颗粒。随后又通过细化条件的试验,确定了包裹 CTA1-DD 蛋白的制备条件。由于 CTA1-DD 为弱负电性,所以在制备时与 DS 溶解在同一水相中,在高剪切力作用下,随着 OCS 的滴入,CTA1-DD 蛋白随机嵌入在 OCS 与 DS 交联形成的紧密凝胶三维结构中,理论上应当部分被完全包裹在凝胶内部,部分位于凝胶表面共同维持其结构稳定。

由于 CTA1-DD 蛋白的二聚体(DD)部分具有一定的 B 细胞靶向性,而 B 细胞的激活程度与体液免疫水平直接相关,如果蛋白质完全被包裹在纳米颗粒中,则将丧失其靶向作用。本研究将 CTA1-DD 蛋



a: PBS; b: PRV; c: PRV+CTA1-DD 蛋白 (5  $\mu$ g); d: PRV+包裹有 CTA1-DD 蛋白 (5  $\mu$ g) 的 OCS-DS 纳米颗粒; e: PRV+包裹有 CTA1-DD 蛋白 (1  $\mu$ g) 的 OCS-DS 纳米颗粒。\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \*\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.001$ )。

图5 包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒为佐剂的疫苗滴鼻免疫后抗体水平

Fig.5 Antibody level after intranasal vaccination with OCS-DS nanoparticles encapsulating CTA1-DD protein as adjuvant

白纳米颗粒与 PRV 抗原混合制备疫苗,通过鼻腔黏膜途径免疫小鼠。结果表明,无论是表征全身体液免疫的 IgG 抗体还是体现黏膜免疫的 IgA 抗体,包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒在相同剂量下都能诱导显著高于 CTA1-DD 蛋白诱导的抗体水平,直接说明纳米颗粒化的 CTA1-DD 蛋白生物利用率更高,佐剂效应更强,同时也间接表明蛋白质的 DD 部分应该部分展示在纳米颗粒表面,仍具有一定的 B 细胞靶向性。

与传统免疫途径相比,黏膜免疫具有免针、降低交叉污染风险等诸多优势,适当配方的黏膜疫苗可以激活包括分泌性 IgA、血清 IgG 中和抗体及细胞介导的免疫应答在内的任何类型的免疫反应,对易引起黏膜感染或通过黏膜侵入的病原体尤有吸引力<sup>[25]</sup>。因此,黏膜佐剂的研究对于非活性黏膜疫苗的开发具有重要意义<sup>[26]</sup>。本研究制备的包裹有 CTA1-DD 蛋白的 OCS-DS 纳米颗粒在初步的小鼠免疫试验中展现出了高效黏膜佐剂的潜力,后续将进一步明确 CTA1-DD 蛋白在纳米颗粒内部的分布规律,探究 CTA1-DD 蛋白与纳米颗粒互作下的免疫增强内在机制。

## 参考文献:

- [1] FANG Y, ZHANG T, LIDELL L, et al. The immune complex CTA1-DD/IgG adjuvant specifically targets connective tissue mast cells through Fc $\gamma$ RIIIA and augments anti-HPV immunity after nasal immunization[J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(6): 1168-1178.
- [2] MCNEAL M M, BASU M, BEAN J A, et al. Intrarectal immunization of mice with VP6 and either LT(R192G) or CTA1-DD as adjuvant protects against fecal rotavirus shedding after EDIM challenge[J]. *Vaccine*, 2007, 25(33): 6224-6231.

- [3] SUNDLING C, SCHÖN K, MÖRNER A, et al. CTA1-DD adjuvant promotes strong immunity against human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins following mucosal immunization [J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(12): 2954-2964.
- [4] FAN X, SU Q, QIU F, et al. Intranasal inoculation of influenza virus vaccine against lethal virus challenge [J]. *Vaccine*, 2018, 36(29): 4354-4361.
- [5] SU Q D, HE S H, YI Y, et al. Intranasal vaccination with ebola virus GP amino acids 258-601 protects mice against lethal challenge [J]. *Vaccine*, 2018, 36(41): 6053-6060.
- [6] GIULIANI M M, DEL-GIUDICE G, GIANNELLI V, et al. Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1998, 187(7): 1123-1132.
- [7] TAKAI T, ONO M, HIKIDA M, et al. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice [J]. *Nature*, 1996, 379(6563): 346-349.
- [8] 周佳升, 潘 熙, 李云香, 等. 壳聚糖及其衍生物作为疫苗佐剂研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2020, 41(4): 104-109.
- [9] FERREIRA S S, PASSOS C P, MADUREIRA P, et al. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132: 378-396.
- [10] 邹兴龙, 陈柱先, 孙娟娟, 等. 壳聚糖药用制剂及其应用的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(11): 1791-1794.
- [11] WANG F, ZHANG R, WU Q, et al. Probing the nanostructure, interfacial interaction, and dynamics of chitosan-based nanoparticles by multiscale solid-state NMR [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(23): 21397-21407.
- [12] ILLUM L, JABBAL-GILL I, HINCHCLIFFE M, et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 51(1/2/3): 81-96.
- [13] ZAHAROFF D A, ROGERS C J, HANCE K W, et al. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination [J]. *Vaccine*, 2007, 25(11): 2139-2147.

- 2085-2094.
- [14] SAHARIAH P, MÁSSON M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure-activity relationship[J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(11): 3846-3868.
- [15] KOPPULU B, ZAHAROFF D A. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(9): 2359-2369.
- [16] DASH M, CHIELLINI F, OTTENBRITE R M, et al. Chitosan-A versatile semisynthetic polymer in biomedical applications[J]. *Progress in Polymer Science*, 2011, 36: 981-1014.
- [17] SAKLOETSAKUN D, PERERA G, HOMBACH J, et al. The impact of vehicles on the mucoadhesive properties of orally administered nanoparticles: a case study with chitosan-4-thiobutylamine conjugate[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11(3): 1185-1192.
- [18] GÜNBEYAZ M, FARAJI A, OZKUL A, et al. Chitosan based delivery systems for mucosal immunization against bovine herpesvirus 1 (BHV-1) [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 41(3/4): 531-545.
- [19] ZHAO K, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9: 389-402.
- [20] SOTO E, KIM Y S, LEE J, et al. Glucan particle encapsulated rifampicin for targeted delivery to macrophages [J]. *Polymers*, 2010, 2(4): 681-689.
- [21] TSONI S V, BROWN G D. Beta-glucans and dectin-1 [J]. *Annals of the New York Academy of Science*, 2008, 1143: 45-60.
- [22] KIM H S, HONG J T, KIM Y, et al. Stimulatory effect of  $\beta$ -glucans on immune cells [J]. *Immune Network*, 2011, 11(4): 191-195.
- [23] SPANGLER B D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1992, 56(4): 622-647.
- [24] MURAT K, YAVUZ S C, TALAT B, et al. New chitin, chitosan, and *O*-carboxymethyl chitosan sources from resting eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea); with physicochemical characterization, and antimicrobial and antioxidant activities[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(1): 58-69.
- [25] LEVINE M M. Can needle-free administration of vaccines become thenorm in global immunization? [J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(1): 99-103.
- [26] YUKI Y, KIYONO H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2003, 13(5): 293-310.

(责任编辑:成纾寒)