



壳寡糖的免疫佐剂效果及作为减毒活菌载体疫苗佐剂的可行性探索*

欧倩^{1,2}, 陈昭斌², 唐静¹, 陈梦蝶², 张云雯¹, 陈梓楠², 刘曲², 罗俊容², 汪川^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院 卫生检验与检疫系(成都 610041);

2. 深圳市生医联盟生物科技集团有限公司(深圳 518057)

【摘要】目的 探究壳寡糖(chitosan oligosaccharide, COS)的免疫佐剂效果,包括免疫激活作用和引发溶酶体逃逸作用,并探索其是否可以作为减毒活菌载体疫苗佐剂。**方法** ①以0(对照组)、0.1~4 mg/mL COS培养小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞24 h,利用CCK8实验检测细胞活力的影响;以0(对照组)、1、2、4 mg/mL COS干预小鼠RAW264.7细胞24 h,通过RT-qPCR实验检测细胞因子 $IFN-\gamma$ 、 $IL-10$ 、 $TGF-\beta$ 、 $TLR-4$ 的mRNA表达水平。②RAW264.7细胞加入1 mL含有不同组分[钙黄绿素(Calcein)50 μ g/mL, COS 2 mg/mL, 阻断剂bafilomycin A1 1 μ mol/mL]的PBS培养,分组为Calcein组、Calcein+COS组、Calcein+COS+Bafilomycin A1组。通过激光共聚焦显微镜观察RAW264.7细胞在有或无COS干预下对荧光染料Calcein的吞噬和胞内荧光分布情况,判断COS是否能够引发溶酶体逃逸。③用0.5、1、2、4、8 mg/mL COS包被减毒李斯特菌载体宫颈癌治疗性疫苗候选株LM Δ E6E7和LI Δ E6E7,测定Zeta电位变化,选择COS成功包被细菌的质量浓度。检测2 mg/mL COS包被LM Δ E6E7和LI Δ E6E7前后,RAW264.7细胞对疫苗菌株的吞噬率。**结果** ①CCK8结果显示,与对照组相比,不同质量浓度COS干预RAW264.7细胞24 h后,对细胞无毒性,并能够促进细胞增殖,差异有统计学意义($P<0.05$);RT-qPCR结果表明,与对照组相比,COS干预能够上调RAW264.7细胞 $TLR-4$ 和 $IFN-\gamma$ 的mRNA水平,同时抑制 $TGF-\beta$ 和 $IL-10$ 的mRNA表达水平,以4 mg/mL COS组最为明显($P<0.05$)。②激光共聚焦显微镜发现在COS干预下,Calcein+COS组比Calcein组有更多的荧光染料从溶酶体内释放进入胞内,而这个过程可以被bafilomycin A1阻断。③Zeta电位结果表明COS质量浓度达到2 mg/mL时,能成功包被到细菌表面。疫苗株被COS包被前、后,RAW264.7细胞对LM Δ E6E7的吞噬率分别为5.70%和22.00%,差异有统计学意义($P<0.05$);RAW264.7细胞对LI Δ E6E7的吞噬率分别为1.55%和6.12%,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** COS具有激活巨噬细胞免疫应答和引发溶酶体内物质逃逸溶酶体的作用,包被减毒活菌载体疫苗候选菌株可促进巨噬细胞对细菌的吞噬,可望进一步开发作为细菌载体类疫苗佐剂。

【关键词】 壳寡糖 巨噬细胞 李斯特菌 逃逸溶酶体

Immunoadjuvant Effect of Chitosan Oligosaccharide and Its Feasibility of Being Used as an Adjuvant for Attenuated Live Bacteria Vector Vaccines OU Qian^{1,2}, CHEN Zhaobin², TANG Jing¹, CHEN Mengdie², ZHANG Yunwen¹, CHEN Zinan², LIU Qu², LUO Junrong², WANG Chuan^{1△}. 1. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Shen Zhen Biomed Alliance Biotech Group Co., Ltd, Shenzhen 518057, China

△ Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the immunoadjuvant effects of chitosan oligosaccharide (COS), including the immune activation and the triggering of lysosomal escape, and to explore whether COS can be used as an adjuvant for attenuated live bacteria vector vaccines. **Methods** 1) Mouse macrophages RAW264.7 cells were cultured with COS at 0 mg/mL (the control group) and 0.1-4 mg/mL for 24 h and the effect on cell viability was measured by CCK8 assay. Mouse macrophages RAW264.7 were treated with COS at 0 (the control group), 1, 2, and 4 mg/mL for 24 h. Then, the mRNA expression levels of the cytokines, including $IFN-\gamma$, $IL-10$, $TGF-\beta$, and $TLR4$, were determined by RT-qPCR assay. 2) RAW264.7 cells were treated with 1 mL of PBS containing different components, including calcein at 50 μ g/mL, COS at 2 mg/mL, and bafilomycin A1, an inhibitor, at 1 μ mol/mL, for culturing. The cells were divided into the Calcein group, Calcein+COS group, and Calcein+COS+Bafilomycin A1 group accordingly. Laser scanning confocal microscopy was used to observe the phagocytosis and the intracellular fluorescence distribution of calcein, a fluorescent dye, in RAW264.7 cells in the presence or absence of COS intervention to determine whether COS was able to trigger lysosomal escape. 3) LM Δ E6E7 and LI Δ E6E7, the attenuated *Listeria* vector candidate therapeutic vaccines for cervical cancer, were encapsulated with COS at the mass concentrations of 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, and 8 mg/mL. Then, the changes in zeta potential were measured to select the concentration of COS that successfully encapsulated the bacteria. Phagocytosis of the vaccine strains by RAW264.7 cells was measured before and after LM Δ E6E7 and LI Δ E6E7 were coated with COS at 2 mg/mL. **Results** 1) CCK8 assays showed that, compared with the findings for the control group, the

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31570924)和成都市科技局重点研发支撑计划技术创新研发项目(No. 2018-YF05-00292-SN)资助

△ 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

出版日期: 2024-03-20

intervention of RAW264.7 cells with COS at different concentrations for 24 h was not toxic to the cells and promoted cell proliferation, with the difference being statistically significant ($P < 0.05$). According to the RT-qPCR results, compared with those of the control group, the COS intervention up-regulated the mRNA levels of *TLR4* and *IFN- γ* in RAW264.7 cells, while it inhibited the mRNA expression levels of *TGF- β* and *IL-10*, with the most prominent effect being observed in the 4 mg/mL COS group ($P < 0.05$). 2) Laser scanning confocal microscopy revealed that the amount of fluorescent dye released from lysosomes into the cells was greater in the Calcein+COS group than that in the Calcein group. In other words, a greater amount of fluorescent dye was released from lysosomes into the cells under COS intervention. Furthermore, this process could be blocked by bafilomycin A1. 3) The zeta potential results showed that COS could successfully encapsulate the surface of bacteria when its mass concentration reached 2 mg/mL. Before and after the vaccine strain was encapsulated by COS, the phagocytosis of LM Δ E6E7 by RAW264.7 cells was 5.70% and 22.00%, respectively, showing statistically significant differences ($P < 0.05$); the phagocytosis of LI Δ E6E7 by RAW264.7 cells was 1.55% and 6.12%, respectively, showing statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** COS has the effect of activating the immune response of macrophages and triggering lysosomal escape. The candidates strains of coated live attenuated bacterial vector vaccines can promote the phagocytosis of bacteria by macrophages. Further research is warranted to develop COS into an adjuvant for bacterial vector vaccine.

【Key words】 Chitosan oligosaccharide Macrophages *Listeria* Lysosomal escape

壳寡糖(chitosan oligosaccharide, COS)是一种带正电荷的碱性多糖,一般由壳聚糖降解产生,其分子量低、水溶性好、无毒,较壳聚糖更容易吸收,发挥生物活性,且同样也具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等作用^[1-2]。活菌载体疫苗是以减毒活菌为载体的疫苗,可以携带较长的多价抗原基因以制备多价疫苗,具有更高更持久的免疫保护效果,同时因其作用位点明确、安全性较高,已逐渐成为基因工程疫苗的热点^[3-4]。COS在病毒载体疫苗中的佐剂作用已得到了良好的验证,但其作为佐剂在减毒活菌载体疫苗中的应用研究较少^[5-6]。本实验室在前期研究中构建了携带人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV) 16型E6E7蛋白编码基因(*HPV-16 E6E7*基因)的减毒李斯特菌活菌载体宫颈癌治疗性疫苗候选株LM Δ E6E7和LI Δ E6E7,体外实验及体内实验证明LM Δ E6E7和LI Δ E6E7能够有效抑制肿瘤产生,具有较好的治愈率^[7]。

本研究拟从细胞层面,通过CCK8实验和RT-qPCR测定壳寡糖对巨噬细胞的免疫刺激作用;通过激光共聚焦显微镜观察COS是否能引发溶酶体逃逸;以LM Δ E6E7和LI Δ E6E7作为减毒活菌载体疫苗的代表,测定不同质量浓度COS包被后的Zeta电位变化,判断COS是否成功包被细菌;以小鼠巨噬细胞系RAW264.7为抗原递呈细胞代表,通过活菌培养测定进入胞内的细菌量,探究COS包被能否促进RAW264.7细胞对疫苗菌株的吞噬,由此初步探究COS作为佐剂应用于活菌载体疫苗的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞

携带*HPV-16 E6E7*基因,敲除了毒力基因*actA*和

*plcB*的重组绵羊李斯特菌LI Δ -E6E7;携带*HPV-16 E6E7*基因,敲除了毒力基因*actA*和*plcB*的重组单增李斯特菌,由本实验室构建^[7];小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞,由四川大学华西药学院孙逊教授惠赠。

1.1.2 主要试剂及设备

COS粉末购于浙江金壳药业有限公司,相对分子量 $< 3\ 000$,纯度 $\geq 80\%$;Calcein、bafilomycin A1购于索莱宝公司;免疫染色固定液、抗荧光淬灭剂和CCK8试剂盒购于碧云天生物技术公司;DMEM培养基购于美国Gibco公司;RNA提取试剂盒购于上海奕杉生物科技有限公司;逆转录mix和Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;脑心浸液培养基和脑心浸液琼脂培养基(Brain-Heart Infusion Medium, BHI)购于北京路桥公司;日本尼康激光共聚焦显微镜(型号A1R+);英国马尔文帕纳科 Zeta 电位分析仪(型号ZETASIZER NANO ZS90);美国Thermo Fisher酶标仪(型号Multiskan GO 1510);美国Thermo Fisher核酸定量仪(型号Nanodrop 2000)。

1.2 方法

1.2.1 CCK8法测定壳寡糖干预对RAW264.7细胞的活力影响

取生长状态良好的RAW264.7细胞按每孔 1×10^4 细胞铺板96孔板,培养18 h后,用PBS清洗,加入含有不同质量浓度COS的DMEM完全培养基。试验组COS质量浓度设置为4、2、1、0.8、0.4、0.2、0.1 mg/mL,同时设置对照组(RAW 264.7细胞+DMEM完全培养基)及调零孔(DMEM完全培养基),培养24 h后,用PBS清洗,加入含有10% CCK-8溶液的DMEM培养基,继续培养2 h,在酶标仪上于450 nm处测定吸光度(A_{450}),按下面公式计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = \frac{(\text{试验组}A_{450} - \text{调零孔}A_{450})}{(\text{对照组}A_{450} - \text{调零孔}A_{450})} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 RT-qPCR测定壳寡糖干预对RAW264.7细胞的免疫激活作用

取生长状态良好的RAW264.7细胞按每孔 1×10^5 细胞铺板6孔板,培养18 h后,分别加入COS质量浓度为4 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL的DMEM完全培养基,同时设置对照组(RAW264.7细胞+DMEM完全培养基)继续培养24 h。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size/bp
β -actin	CCACCATGTACCCAGGCATT	CGGACTCATCGTACTCCTGC	189
TLR-4	GCATGGCTTACACCACCTCT	TTGTCTCCACAGCCACCAG	117
IFN- γ	GTCAACAACCCACAGGTCCA	CGACTCCTTTCCGCTTCTCT	101
TGF- β	GGAAGGACCTGGGTTGGAAG	GGTTGTAGAGGGCAAGGACC	126
IL-10	CAGAGAAGCATGGCCCAAGAA	GCTCCACTGCCTTGCTCTTA	129

TLR-4: Toll-like receptor 4; IFN- γ : interferon-gamma; TGF- β : transforming growth factor-beta; IL-10: interleukin-10.

1.2.3 激光共聚焦观察

取生长状态良好的RAW264.7细胞按每孔 7×10^4 细胞铺板24孔板,每孔加入细胞爬片,培养18 h后用PBS清洗3次,加入1 mL含有下述不同组分的PBS,分组为Calcein组(正常释放组)、Calcein+COS组(干预释放组)、Calcein+COS+Bafilomycin A1组(阻断组)。其中,Calcein为50 μ g/mL, COS为2 mg/mL, bafilomycin A1为1 μ mol/mL。继续培养45 min后每孔加入1 mL PBS,于摇床上避光清洗,加入免疫染色固定液,室温避光固定15 min,再次避光清洗,取一滴抗荧光淬灭剂于载玻片,取出爬片倒扣至抗荧光淬灭剂处,静置5 min后进行封片,于激光扫描共聚焦显微镜下观察。

1.2.4 COS包被及Zeta电位测定

将LM Δ E6E7和LI Δ E6E7接种于BHI培养基,于37 $^{\circ}$ C 200 r/min培养至OD₆₀₀=0.4~0.7,用PBS调整菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,取适量菌液分别与8 mg/mL、4 mg/mL、2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL COS溶液等体积混匀,室温静置30 min,13 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心3 min弃上清,1 mL PBS重悬菌沉淀获得包被不同质量浓度COS的COS-LM Δ E6E7和COS-LI Δ E6E7复合物。在25 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ 散射角条件下用Zeta电位分析仪对复合物进行Zeta电位测定,以等量PBS包被作为阴性对照。李斯特菌表面携带负电荷,而COS带正电荷,若LM Δ E6E7和LI Δ E6E7的Zeta电位升高到0,则提示COS已成功包被。选择能成功包被的COS质量浓度,进行后继实验。

1.2.5 RAW264.7细胞对包被壳寡糖的宫颈癌治疗性疫苗候选株的吞噬率测定

按1.2.4中方法用COS包被LM Δ E6E7和LI Δ E6E7

按说明书提取各组细胞总RNA,逆转录得到质量合格的cDNA。

采用SYBR Green法进行qPCR检测,根据南京诺唯赞Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix说明书配制qPCR反应体系,95 $^{\circ}$ C预变性30 s,95 $^{\circ}$ C变性5 s,55 $^{\circ}$ C延伸5 s,循环变性、延伸操作40次,检测Ct值,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量。引物由北京擎科生物技术公司合成,序列见表1。

(COS包被质量浓度为2 mg/mL),用PBS配制浓度为 4×10^7 CFU/mL的LM Δ E6E7、LI Δ E6E7、COS-LM Δ E6E7和COS-LI Δ E6E7的细菌悬液。

取生长状态良好的RAW264.7细胞按每孔 1×10^5 细胞铺板24孔板,培养18 h后用PBS清洗,每孔加入100 μ L浓度为 4×10^7 CFU/mL的LM Δ E6E7、LI Δ E6E7、COS-LM Δ E6E7和COS-LI Δ E6E7菌悬液(感染复数MOI=40:1)继续培养1 h, PBS清洗,每孔加入500 μ L含100 μ g/mL庆大霉素的DMEM完全培养基,继续培养1 h,弃去液体, PBS清洗2次,每孔加入1 mL 0.1% Triton-100溶液,室温作用5 min,10倍梯度稀释,取20 μ L稀释液滴于BHI平板上,37 $^{\circ}$ C培养48 h,计数CFU,平行重复3次,按下列公式计算RAW264.7细胞对疫苗菌株的吞噬率。

$$\text{吞噬率} = \frac{(\text{裂解液细菌浓度} \times V1)}{(\text{初始菌悬液浓度} \times V2)} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, V1=1 mL, V2=0.1 mL。裂解液细菌浓度 \times V1为进入胞内的细菌量。浓度单位为CFU/mL。

1.2.6 统计学方法

定量资料经过正态性检验及方差齐性检验后,根据设计类型使用方差分析或t检验,对于不满足正态分布和方差齐性的资料选择使用秩和检验;定性资料采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COS对小鼠巨噬细胞RAW264.7具有免疫激活作用

CCK-8法结果显示,与培养基对照组相比,不同质量浓度COS干预RAW264.7细胞24 h后,均能够增加细胞活力、促进细胞增殖,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图1所

示。说明COS无细胞毒性。

RT-qPCR结果如图2所示。1 mg/mL COS干预即可改变IFN- γ 和TGF- β 基因的表达量,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 2 mg/mL COS干预时,TLR-4、IL-10、TGF- β 基因的表达量与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 4 mg/mL COS干预时,IFN- γ 、TLR-4、IL-10、TGF- β 基因的表达量与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 COS有利于吞噬体内的物质逃逸吞噬体

见图3。通过激光共聚焦显微镜观察RAW264.7细胞在有或无COS干预下对荧光染料Calcein的吞噬和胞内荧光分布情况,结果表明,与正常释放组相比,干预释放组在COS干预条件下溶酶体破裂,有更多的荧光染料从溶酶体内释放进入胞内;与干预释放组比,阻断组抑制了溶酶体内被吞噬的荧光染料Calcein逃逸溶酶体。激光共聚

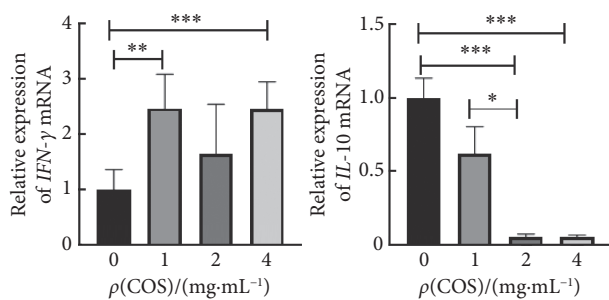


图 2 不同质量浓度壳寡糖干预细胞后IFN- γ 、TLR-4、TGF- β 和IL-10基因表达水平变化

Fig 2 Changes in IFN- γ , TLR-4, TGF- β and IL-10 gene expression levels after intervention with COS at different mass concentrations

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 3$.

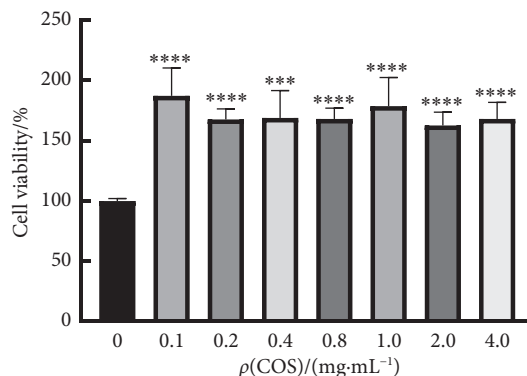


图 1 不同质量浓度壳寡糖干预RAW264.7细胞后的细胞活性变化

Fig 1 Changes in RAW264.7 cell viability after intervention with COS at different mass concentrations

*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, vs. 0 mg/mL. $n = 3$.

焦结果证实了存在COS的情况下,能够引起胞内溶酶体破裂,进一步导致被吞噬物质发生溶酶体逃逸。

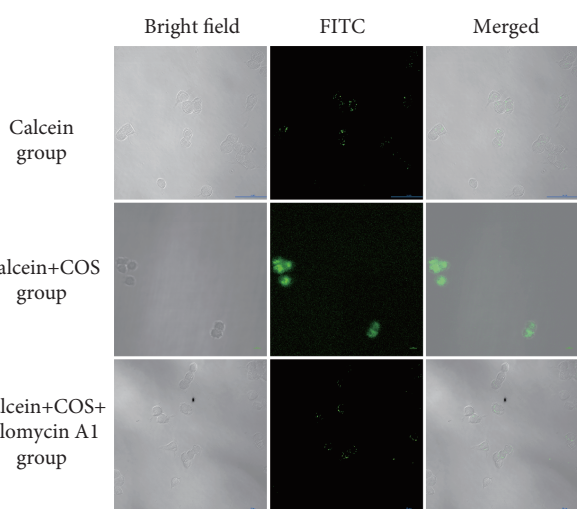


图 3 激光共聚焦显微镜测定结果 ($\times 200$)

Fig 3 Results of laser scanning confocal microscopic measurement ($\times 200$)

2.3 COS能通过静电吸附包被宫颈癌治疗性疫苗候选株LM Δ E6E7和LI Δ E6E7

不同质量浓度COS包被LM Δ E6E7和LI Δ E6E7后,利用

Zeta电位分析仪测定其Zeta电位的变化,测定结果显示,随着COS包被质量浓度增加,LM Δ E6E7和LI Δ E6E7的Zeta电位逐渐升高,当COS包被质量浓度达到2 mg/mL时,细菌电位几乎被完全中和,如图4所示。

2.4 COS包被可促进吞噬细胞对细菌的吞噬

疫苗株被COS包被前、后,RAW264.7细胞对LM Δ E6E7的吞噬率分别为5.70%和22.00%,差异有统计学意义($P < 0.05$); RAW264.7细胞对LI Δ E6E7的吞噬率分别为1.55%和6.12%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两者包被后均较包被前提高4倍左右。

3 讨论

阳离子聚合物带正电荷,可通过静电吸附作用与带负电的核酸、蛋白等生物分子形成复合物,具有响应刺激、抗菌、抗氧化、抗肿瘤和抗炎症等作用,目前被广泛应用于医药生物研究。阳离子聚合物与核酸形成纳米复合物后,能防止核酸被酶降解,并促进细胞吸收和溶酶体

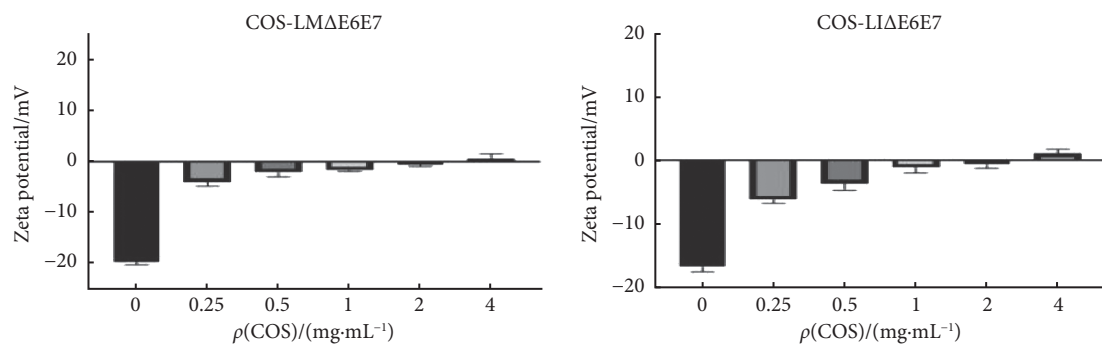


图4 壳寡糖包被后疫苗菌株Zeta电位的变化

Fig 4 Changes in the zeta potential of the vaccine strains after COS coating

n=3.

逃逸,有效提高基因转染^[8]。除此之外阳离子聚合物还能作为药物运输载体或与药物结合用于肿瘤治疗^[9-10]。目前常见的阳离子材料主要包括聚乙烯亚胺(PEI)、聚氨基酯(PBAE)、壳聚糖(Chitosan)、聚丙烯胺(PAH)、二乙氨基葡聚糖(DEAE-dextran)、聚氨树枝状聚合物(PAMAM)等^[11]。

壳寡糖是壳聚糖的降解产物,较壳聚糖水溶性更好,具有更高的生物活性,已被证实可以作为佐剂抑制肿瘤生长,增强疫苗的免疫反应^[12]。CCK8实验和RT-qPCR实验结果显示壳寡糖干预巨噬细胞RAW462.7后会增加细胞活力但并没有剂量效应关系,同时上调TLR-4、IFN- γ 的mRNA表达,抑制TGF- β 和IL-10的表达,表明COS可能促进巨噬细胞向M1型分化,提高免疫应答能力。本研究通过激光共聚焦显微镜观察发现COS的存在促进了溶酶体内的物质逃离溶酶体,胞内荧光染料分布较未存在COS的情况下明显增加,而阻断剂bafilomycin A1的加入阻止了溶酶体内质子泵发挥作用,抑制溶酶体酸性内环境的形成,阻止了胞内溶酶体的破裂,从而抑制了溶酶体内被吞噬的荧光染料Calcein逃离溶酶体,因此阻断组较干预组的胞内荧光染料分布明显减少。COS本身携带正电荷,当其被吞噬进入溶酶体后,会引起溶酶体周围酸性环境改变,导致溶酶体破裂,使得溶酶体内的物质释放进入胞内,这也被称为质子海绵效应。具有质子海绵效应的物质进入溶酶体后能吸收膜上质子泵送入的质子,阻止pH降低,使质子泵持续保持开放状态,让大量的水和无机盐离子进入溶酶体内,从而导致内体膜破裂引发溶酶体逃逸^[13]。激光共聚焦显微镜的观察结果提示了包被COS的菌株被RAW264.7细胞吞噬后,COS会在溶酶体内产生质子海绵效应引发菌株逃逸溶酶体,进入胞质的抗原将通过MHC-I分子实现交叉抗原递呈,激活CTL细胞应答,有利于肿瘤免疫。因此壳寡糖与肿瘤治疗性疫苗联合作用有望增加疫苗的治疗效果。

LM Δ E6E7和LI Δ E6E7由本实验室构建,携带HPV-16 E6E7基因,动物实验结果表明具有较好的免疫效果,能有效抑制肿瘤生长^[6]。李斯特菌表面带负电荷,而细胞表面同样带有负电荷,不利于抗原提呈细胞接触李斯特菌,影响免疫效果。壳寡糖表面带正电荷,通过电荷中和作用升高细菌表面Zeta电位,可能会提高重组李斯特菌与抗原提呈细胞的接触效率,Zeta电位测定结果显示壳寡糖包被质量浓度达到2 mg/mL时,电荷几乎被完全中和,证明本实验通过简单混合的方式即可将COS成功包被在减毒活菌载体疫苗LM Δ E6E7和LI Δ E6E7上;同时细胞吞噬实验结果表明,两株重组李斯特菌包被了壳寡糖后吞噬率均提高4倍左右,证明包被壳寡糖能提高巨噬细胞对细菌的吞噬效率,提示COS作为佐剂与治疗性疫苗共同发挥免疫作用可能性。

本研究通过细胞实验证实COS能够激活巨噬细胞,COS包被疫苗菌株后,还可以通过促进巨噬细胞对菌株的吞噬和引发菌株逃逸溶酶体来提高抗原递呈效率,初步证明了COS的佐剂效应,为后续减毒活菌载体疫苗在临床中的实际使用提供了新思路。

* * *

作者贡献声明 欧倩负责论文构思、正式分析、调查研究、研究方法和初稿写作,陈昭斌负责正式分析、调查研究和提供资源,唐静负责正式分析和调查研究,陈梦蝶和张云雯负责调查研究,陈梓楠、刘曲和罗俊容负责提供资源,汪川负责论文构思、研究方法和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution OU Qian is responsible for conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, and writing--original draft. CHEN Zhaobin is responsible for formal analysis, investigation, and resources. TANG Jing is responsible for formal analysis and investigation. CHEN Mengdie and ZHANG Yunwen are responsible for investigation. CHEN Zinan, LIU Qu, and LUO Junrong are responsible for resources. WANG Chuan is responsible for conceptualization, methodology, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the

article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] 杨靖亚, 郑雯静, 李诗怡. 壳寡糖的制备及生物活性研究进展. 国际药学研究杂志, 2020, 47(7): 502-507. doi: 10.13220/j.cnki.jipr.2020.07.003.
YANG J Y, ZHEN W J, LI S Y. Research progress on the preparation and biological activity of chito-oligosaccharides. Int J Pharm Res, 2020, 47(7): 502-507. doi: 10.13220/j.cnki.jipr.2020.07.003.
- [2] NAVEED M, PHIL L, SOHAIL M, *et al.* Chitosan oligosaccharide (COS): an overview. Int J Biol Macromol, 2019, 129: 827-843. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192.
- [3] 张翰, 王亮, 陈强, 等. 活菌载体疫苗的研究概述. 广东畜牧兽医科技, 2006(5): 3-5.
ZHANG H, WANG L, CHEN Q, *et al.* An overview of research on live vector vaccines. Guangdong J Animal Vet Sci, 2006(5): 3-5.
- [4] 任晨艳, 刘思静, 蒲启康, 等. 李斯特菌载体结核疫苗候选株基因重组构建及蛋白表达验证. 四川大学学报(医学版), 2016, 47(6): 819-824. doi: 10.13464/j.scuxbyxb.2016.06.001.
REN C Y, LIU S J, PU Q K, *et al.* Genetic recombination and protein expression detection of *Listeria*-based tuberculosis vaccine candidates. J Sichuan Univ (Med Sci), 2016, 47(6): 819-824. doi: 10.13464/j.scuxbyxb.2016.06.001.
- [5] ZHANG G, JIA P, LIU H, *et al.* Conjugation of chitosan oligosaccharides enhances immune response to porcine circovirus vaccine by activating macrophages. Immunobiology, 2018, 3(11): 663-670. doi: 10.1016/j.imbio.2018.07.012.
- [6] ZHANG G, CHENG G, JIA P, *et al.* The positive correlation of the enhanced immune response to PCV2 subunit vaccine by conjugation of chitosan oligosaccharide with the deacetylation degree. Mar Drugs, 2017, 15(8): 236. doi: 10.3390/md15080236.
- [7] SU L, ZHANG Y, ZHANG X, *et al.* Combination immunotherapy with two attenuated *Listeria* strains carrying shuffled HPV-16 E6E7 protein causes tumor regression in a mouse tumor model. Sci Rep, 2021, 11(1): 13404. doi: 10.1038/s41598-021-92875-9.
- [8] 任先越, 杨立群, 梁玄, 等. 阳离子聚合物在非病毒基因转染中的研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(5): 568-577. doi: 10.13345/j.cjb.2013.05.005.
REN X Y, YANG L Q, LIANG X, *et al.* Research progress of cationic polymers in non-viral gene transfection. Chin J Biotechnol, 2013, 29(5): 568-577. doi: 10.13345/j.cjb.2013.05.005.
- [9] 蒯诗佳, 喻琴梅, 孟文彤, 等. 脂质体包裹水泡口炎病毒基质蛋白对小鼠淋巴瘤的治疗作用及机制研究. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(5): 712-715. doi: 10.13464/j.scuxbyxb.2011.02.010.
LIN S J, YU Q M, MENG W T, *et al.* The preliminary study on anti-photodamaged effect of astaxanthin liposomes in mice skin. J Sichuan Univ (Med Sci), 2018, 49(5): 712-715. doi: 10.13464/j.scuxbyxb.2011.02.010.
- [10] BILENSOY E. Cationic nanoparticles for cancer therapy. Expert Opin Drug Deliv, 2010, 7(7): 795-809. doi: 10.1517/17425247.2010.485983.
- [11] PIOTROWSKI-DASPIT A S, KAUFFMAN A C, BRACAGLIA L G, *et al.* Polymeric vehicles for nucleic acid delivery. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 156: 119-132. doi: 10.1016/j.addr.2020.06.014.
- [12] LIU X, ZHANG H, GAO Y, *et al.* Efficacy of chitosan oligosaccharide as aquatic adjuvant administrated with a formalin-inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine. Fish Shellfish Immunol, 2015, 47(2): 855-860. doi: 10.1016/j.fsi.2015.10.012.
- [13] 王文喜, 代凯, 洪璐, 等. 基因胞内传递中的内体逃逸技术. 药科学报, 2014, 49(8): 1111-1116.
WANG W X, DAI K, HONG L, *et al.* Endosomal escape technology in gene intracellular transmission. Chin J Pharm Sci, 2014, 49(8): 1111-1116.

(2023-08-03收稿, 2024-02-05修回)

编辑 吕熙



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0 国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有

Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Science)