

张硕, 姬贺龙, 丁晨晨, 等. 乳杆菌胞外多糖纳米佐剂对鸡血清 4 型禽腺病毒亚单位疫苗的免疫增强作用 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 72-79.

ZHANG S, JI H L, DING C C, et al. Immune enhancement of *Lactobacillus* extracellular polysaccharide nanoadjuvant on fowl adenovirus serotype 4 subunit vaccine in chicken [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 72-79.

乳杆菌胞外多糖纳米佐剂对鸡血清 4 型禽腺病毒亚单位疫苗的免疫增强作用

张硕, 姬贺龙, 丁晨晨, 宋素泉*, 闫丽萍*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了开发安全有效的新型兽用疫苗佐剂, 将乳杆菌胞外多糖与季铵化壳聚糖自组装制备出两种纳米颗粒佐剂 (NPs 7-4 和 NPs 8-2), 研究其对蛋白抗原的免疫增强效果。纳米颗粒佐剂与血清 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) 五邻体蛋白 (Penton base) 亚单位疫苗颈部皮下免疫接种 7 日龄 SPF 鸡 21 d 后肌肉注射 JS 株 FAdV-4, 测定组织器官病毒载量和泄殖腔排毒量, 白油佐剂作为对照。结果显示: 两种纳米颗粒佐剂对 Penton base 亚单位疫苗均具有缓释作用; 与白油佐剂组相比, NPs 8-2 佐剂组极显著提高了免疫鸡的血清特异性抗体水平 ($P < 0.001$), 而 NPs 7-4 佐剂组抗体水平无显著差异 ($P > 0.05$); 攻毒保护试验结果表明, 与白油佐剂相比, NPs 8-2 佐剂组提高了疫苗的攻毒保护率, 组织脏器损伤明显减轻, 组织病毒载量和泄殖腔排毒量显著减少 ($P < 0.05$), 而 NPs 7-4 佐剂组免疫增强作用不显著。综上, NPs 8-2 佐剂能有效增强血清 4 型禽腺病毒 Penton base 亚单位疫苗的免疫效果, 减少抗原蛋白用量, 产生较好的免疫保护效果, 其免疫增强效果明显优于传统白油佐剂。

关键词: 乳杆菌胞外多糖; 纳米佐剂; 血清 4 型禽腺病毒; 免疫效果

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)11-0072-08

Immune enhancement of *Lactobacillus* extracellular polysaccharide nanoadjuvant on fowl adenovirus serotype 4 subunit vaccine in chicken

ZHANG Shuo, JI Helong, DING Chenchen, SONG Suquan*, YAN Liping*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to develop safe and effective novel veterinary vaccine adjuvants, two nanoparticle adjuvants (NPs 7-4 and NPs 8-2) were prepared in this study by self-assembly of *Lactobacillus* extracellular polysaccharide and quaternized chitosan, and the immune-enhancing effects of the NPs against protein antigens were investigated. Seven-day-old SPF chickens were used and inoculated subcutaneously with NPs adjuvants and Penton base subunit vaccine of serotype 4 avian adenovirus (FAdV-4) in the neck for 21 days, followed by intramuscular injection of FAdV-4 JS strain; and tissue organ viral loads and cloacal effluxes in the chickens were determined. At the same time, oil adjuvant was used as a control. The results showed that both NPs 7-4 and NPs 8-2 had a sustained release effect on FAdV-4 Penton base subunit vaccine. Compared with the white oil adjuvant group, the immune group with NPs 8-2 adjuvant significantly improved the serum specific antibody level of the immunized chickens ($P < 0.001$), but the NPs 7-4 adjuvant immune group showed no significant difference ($P > 0.05$). The results of the virus challenge experiment showed that, compared with the white oil adjuvant, the NPs 8-2 adjuvant improved the protection rate, mitigated the degree of tissue damage, and significantly reduced the virus load in the tissues and the cloacal swab excretion ($P < 0.05$) in the birds, whereas the immune enhancing effect of the NPs 7-4 adjuvant was not significant. In summary, NPs 8-2 adjuvant could effectively enhance the immune effect of the FAdV-4 Penton base subunit vaccine, reduce the dosage of antigen protein, and produce a better immune-protection effect. The immune enhancing effect of NPs 8-2 adjuvant was significantly better than that of traditional oil adjuvants.

Keywords: *Lactobacillus* extracellular polysaccharide; nanoadjuvant; fowl adenovirus serotype 4; immune efficacy

收稿日期: 2023-10-19; 修回日期: 2024-09-02

基金项目: 泰州市“接榜挂帅”重点科技项目 (JBGS202103)

第一作者: 张硕, 男, 博士研究生

* 通信作者: 闫丽萍, 教授, 主要从事重要疫病病原分子流行病学、致病机理、诊断及基因工程疫苗方面的研究, E-mail: yanliping@njau.edu.cn; 宋素泉, 教授, 主要从事重要疫病病原分子流行病学、致病机理、诊断及基因工程疫苗方面的研究, E-mail: suquan.song@njau.edu.cn。

胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 是由细菌在代谢过程中合成的一类大分子碳水化合物, 其能够依附于细菌细胞壁或被分泌到细菌周围环境中^[1]。近年来的研究表明, EPS 具有多种独特的生物活性与生理功能, 例如抗菌、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节功能^[2-4]。此外 EPS 能够与细胞表面特异性受体结合, 是构建药物递送系统或靶向载体的材料之一^[5]。乳酸菌作为食品级益生菌, 其分泌产生的 EPS 与其他菌株相比安全性更高, 因此被更广泛地应用于食品、医药等行业中^[6-7]。

纳米佐剂作为纳米递送系统中的一种, 能够通过吸附或包埋抗原, 实现缓释、靶向等多种功能, 从而起到疫苗佐剂的作用^[8-9]。研究表明, 纳米佐剂不但可提高机体的体液免疫水平, 还可通过激活抗原呈递细胞和淋巴细胞来提高细胞免疫水平, 从而增强免疫应答效果^[10-11]。

血清 4 型禽腺病毒 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 是引起家禽肝炎与心包积液综合征 (hepatitis-hydropericardium syndrome, HHS) 的主要病原, 该病自 2015 年在我国广泛流行, 致死率为 30%~80%, 严重阻碍了我国家禽养殖行业的发展^[12]。本实验室前期试验研究证明, FAdV-4 的结构蛋白五邻体蛋白 (Penton base) 在 200 μg/只可以为免疫鸡提供完全的攻毒保护作用, 但较大的免疫剂量阻碍了该亚单位疫苗的制备和使用^[13]。因此, 本研究以乳酸菌 EPS 作为免疫激动剂, 通过硫酸化 EPS 和季铵化壳聚糖自组装得到纳米颗粒佐剂, 研究其对 FAdV-4 Penton base 蛋白亚单位疫苗的免疫增强效果, 为筛选开发安全高效的畜禽用疫苗佐剂提供研究思路和应用基础。

1 材料与方法

1.1 佐剂与抗原

硫酸化乳杆菌胞外多糖 (SEPS 7-4 和 SEPS 8-2), 由本实验室提取制备; 壳聚糖购自上海麦克林生化科技股份有限公司, 按文献 [14] 方法修饰得到季铵化壳聚糖 (OHTCC); 美孚 Macrol-52 食品级白油由南京兆丰华生物科技有限公司提供; FAdV-4 Penton base 抗原蛋白由南京农业大学免疫研究所禽

病组提供。

1.2 毒株与实验动物

FAdV-4 JS 株由南京农业大学免疫研究所禽病组保存; 10 日龄 SPF 鸡胚由南京兆丰华生物科技有限公司提供, 本实验室自行孵化, SPF 鸡自由采食与饮水。

1.3 主要试剂

BCA 蛋白定量试剂盒、病毒核酸提取试剂盒、SYBR Green 法荧光定量试剂盒, 均购自南京 Vazyme 公司; HRP 标记抗鸡二抗购自美国 KPL 生物有限公司; 4%多聚甲醛固定液购自北京兰杰柯科技有限公司; ELISA PLATES 购自广州洁特生物公司。

1.4 亚单位疫苗的制备

分别将 SEPS 7-4 和 SEPS 8-2 溶液 (0.2 mg/mL) 作为物理交联剂, 逐滴加入 OHTCC 溶液 (0.5 mg/mL), 两者体积比为 1:1, 20 °C 条件下 400 r/min 搅拌反应 30 min, 获得纳米颗粒 (NPs) 7-4 和 NPs 8-2; 分别向两种 NPs 溶液中逐滴加入 Penton base 蛋白 (0.5 mg/mL), 体积比为 2:1, 20 °C 条件下 400 r/min 搅拌反应 30 min, 即得 NPs 7-4 和 NPs 8-2 佐剂亚单位疫苗。

向 Penton base 蛋白溶液中加入终体积 4% 的吐温-80, 充分搅拌均匀后静置消泡作为水相, 向白油佐剂中加入终体积 4% 的司盘-80, 搅拌均匀后高压灭菌作为油相, 水相与油相 1:2 比例乳化获得白油佐剂亚单位疫苗。

1.5 体外释放率测定

NPs 佐剂亚单位疫苗制备完成后置于混匀仪上 37 °C 孵育, 分别孵育 0、0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 h。孵育结束后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度, 计算抗原累计释放率。

1.6 免疫攻毒保护试验

将 120 只 SPF 鸡随机分为 6 组, 每组 20 只, 每组 1~10 号鸡为观察组, 11~20 号鸡为解剖组。SPF 鸡 7 日龄时皮下注射免疫, 免疫后 21 d 肌肉注射 FAdV-4 JS 株病毒液进行攻毒试验, 攻毒后观察 14 d。免疫攻毒试验详细分组及设计见表 1。

表 1 免疫攻毒试验方案

组别	免疫蛋白	疫苗佐剂	蛋白含量/μg	攻毒毒株	攻毒剂量/(TCID ₅₀ ·只 ⁻¹)
阴性对照	-	-	-	-	-
攻毒对照	-	-	-	FAdV-4 JS 株	2×10 ^{6.5}
阳性对照	Penton base	白油	200	FAdV-4 JS 株	2×10 ^{6.5}

续表1

组别	免疫蛋白	疫苗佐剂	蛋白含量/ μg	攻毒毒株	攻毒剂量/ $(\text{TCID}_{50} \cdot \text{只}^{-1})$
佐剂 1	Penton base	白油	20	FAdV-4 JS 株	$2 \times 10^{6.5}$
佐剂 2	Penton base	NPs 7-4	20	FAdV-4 JS 株	$2 \times 10^{6.5}$
佐剂 3	Penton base	NPs 8-2	20	FAdV-4 JS 株	$2 \times 10^{6.5}$

注：“-”代表未做任何处理。

1.7 血清特异性抗体水平检测

各组试验鸡分别于免疫后 0、7、14、21 d 进行腿部静脉采集血液用于血清分离，并通过 ELISA 法检测血清中 Penton base 特异性抗体水平。使用 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ Penton base 蛋白包被酶标板，每孔 $100 \mu\text{L}$ ， $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜包被。使用 PBST 清洗酶标板，每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 2% BSA 溶液 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 进行封闭。弃掉封闭液，清洗酶标板后加入 PBS 溶液稀释后的鸡血清（稀释度 1:100），每孔 $100 \mu\text{L}$ ， $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 清洗酶标板后加入稀释后的 HRP 标记羊抗鸡 IgG 抗体（稀释度 1:10 000），每孔 $100 \mu\text{L}$ ， $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 45 min。使用 PBST 清洗酶标板，加入 TMB 显色液，每孔 $100 \mu\text{L}$ ，室温避光显色 10 min，随后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的 $2 \text{ mol}/\text{L}$ H_2SO_4 终止反应。在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光值^[13]。

1.8 剖检病理观察与组织病理学观察

攻毒后 1、3、5 d，解剖 3 只鸡，观察各脏器及皮下注射部位病变。采集鸡心脏、肝脏和脾脏部分组织样本放入 4% 多聚甲醛溶液中室温固定 48 h，随后进行石蜡包埋和切片，切片样本经 HE 染色后显微镜下观察组织学病理变化情况。

1.9 组织病毒载量及泄殖腔排毒量检测

攻毒后 1、3、5 d，分别采集鸡心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏组织，加入 1 mL 无菌 PBS 和氧化锆珠进行研磨，随后组织匀浆 $12\ 000 \text{ r}/\text{min}$ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min，取上清液 $200 \mu\text{L}$ 用于病毒 DNA 提取。攻毒后 1~7 d 每天采集各组鸡的泄殖腔拭子，加入 1 mL 无菌 PBS， $12\ 000 \text{ r}/\text{min}$ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min，取上清液 $200 \mu\text{L}$ 用于提取病毒 DNA。上清液样本均使用病毒核酸提取试剂盒提取病毒 DNA。

使用组织 DNA 样本作为模板进行荧光定量 PCR，引物序列为：ORF14-F：5'-AGTGTGTATGTGCGTTGGGTAG-3'；ORF14-R：5'-CATTGTCATAACGATGTGTAG-3'。根据实验室构建的 pMD-18T-ORF14 质粒绘制拷贝数-C_q 值标准曲线，将待测样品对应的 C_q 值带入标准曲线方程以计算单位质量组织内的病毒载量^[12]。

1.10 数据统计与分析

数据使用 SPSS 24 统计学软件，进行单因素方差分析。除存活率数据外，其他数据均以“平均值±标准差”表示， $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 NPs 对 Penton base 蛋白体外释放的影响

表面带正电荷的 NPs 能够通过静电吸附作用装载带负电的抗原蛋白 Penton base，在 PBS 溶液中两种纳米颗粒表面吸附的抗原被逐渐释放。48 h 时 NPs 7-4 的蛋白释放率为 85.48%，NPs 8-2 的蛋白释放率为 77.25%，此释放过程缓慢，不存在突释现象（图 1）。

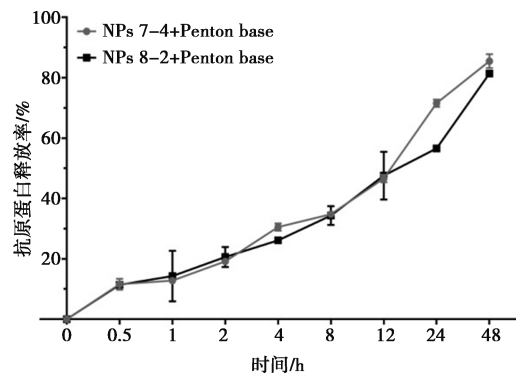
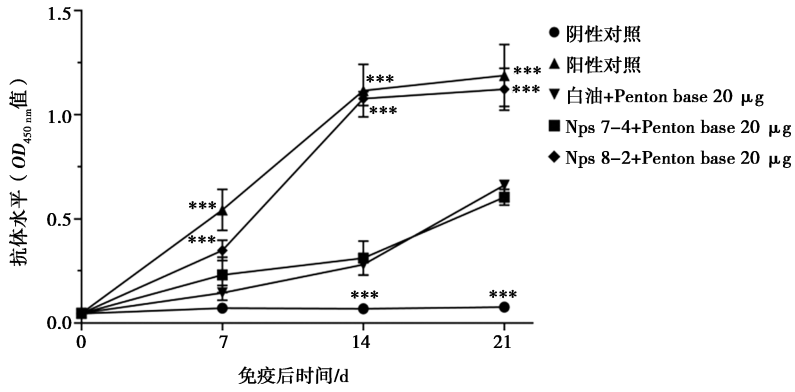


图 1 NPs 蛋白体外释放曲线

2.2 Penton base 特异性抗体水平检测

接种亚单位疫苗 7 d 后，除阴性对照组外，各免疫组鸡血清中的 Penton base 特异性抗体水平均出现升高。与白油+Penton base $20 \mu\text{g}$ 组相比，免疫后 7、14 和 21 d，NPs 8-2 + Penton base $20 \mu\text{g}$ 组和阳性对照组血清中特异性抗体水平极显著升高 ($P < 0.001$)，而 NPs 7-4 + Penton base $20 \mu\text{g}$ 组的特异性抗体水平与白油+Penton base $20 \mu\text{g}$ 组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。在免疫后 14 和 21 d，NPs 8-2 + Penton base $20 \mu\text{g}$ 组与白油+Penton base $200 \mu\text{g}$ 组抗体水平无显著差异 ($P > 0.05$)。结果详见图 2。



与白油+Penton base 20 µg 组相比, * * * 表示差异极显著 ($P < 0.001$)。

图2 Penton base 特异性抗体水平

2.3 攻毒保护率

免疫后 21 d 对各组鸡进行攻毒。结果显示白油佐剂与 Penton base 200 µg 组能完全保护攻毒鸡。免疫 20 µg 抗原蛋白, NPs 7-4 佐剂组存活率低于白油

佐剂组, 而 NPs 8-2 佐剂组存活率比白油佐剂组提高了 20% (图 3)。结果说明 NPs 8-2 佐剂可以显著提高鸡 FAdV-4 感染后的存活率, 其免疫保护效果优于传统白油佐剂。

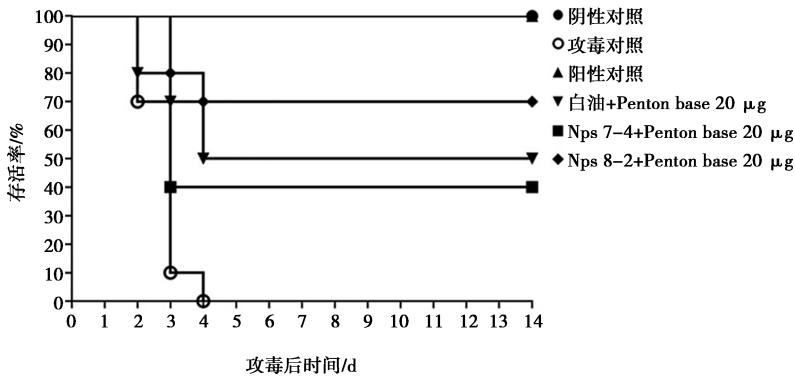


图3 攻毒后各组鸡生存曲线

2.4 剖检病理观察

攻毒后 3 d 为死亡高峰, 对各组鸡进行解剖, 观察组织脏器和注射部位的病理变化。结果显示, 鸡皮下注射部位白油佐剂组存在大小不一的结节和白油佐剂残留, NPs 7-4 与 NPs 8-2 佐剂组无肉眼可见病变。攻毒对照组鸡呈现典型的 HHS 临床病变, 包括心包积液, 肝脏肿大黄染, 肝脏表面有大量出血点和白色坏死灶。白油+Penton base 20 µg 组和 NPs 7-4+Penton base 20 µg 组鸡脏器病变程度较重, 出现心包积液及肝脏病变, 阳性对照组和 NPs 8-2+Penton base 20 µg 组脏器病变较轻, 仅存在少量心包积液,

肝脏未出现肉眼可见病变 (图 4)。

2.5 脏器组织病理学观察

攻毒后 3 d 采集各组鸡的心脏、肝脏和脾脏组织进行切片和 HE 染色, 观察组织病理学变化。结果如图 5 所示, 组织病理学观察与脏器病变结果基本一致, 攻毒对照组鸡心肌纤维出现断裂; 肝小叶结构消失, 肝细胞内出现大量包涵体; 脾脏皮质髓质交界模糊。白油+Penton base 20 µg 组和 NPs 7-4+Penton base 20 µg 组的组织病理学变化与攻毒对照组相似, NPs 8-2+Penton base 20 µg 组和阳性对照组未观察到明显的组织病理学变化。

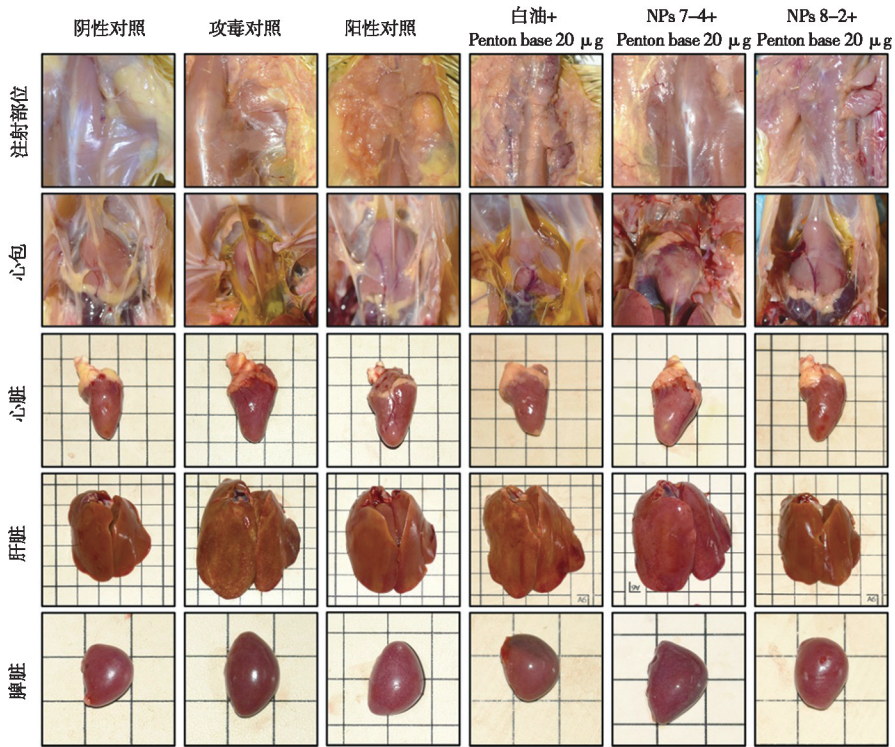


图 4 攻毒后 3 d 各组鸡不同部位剖检病变

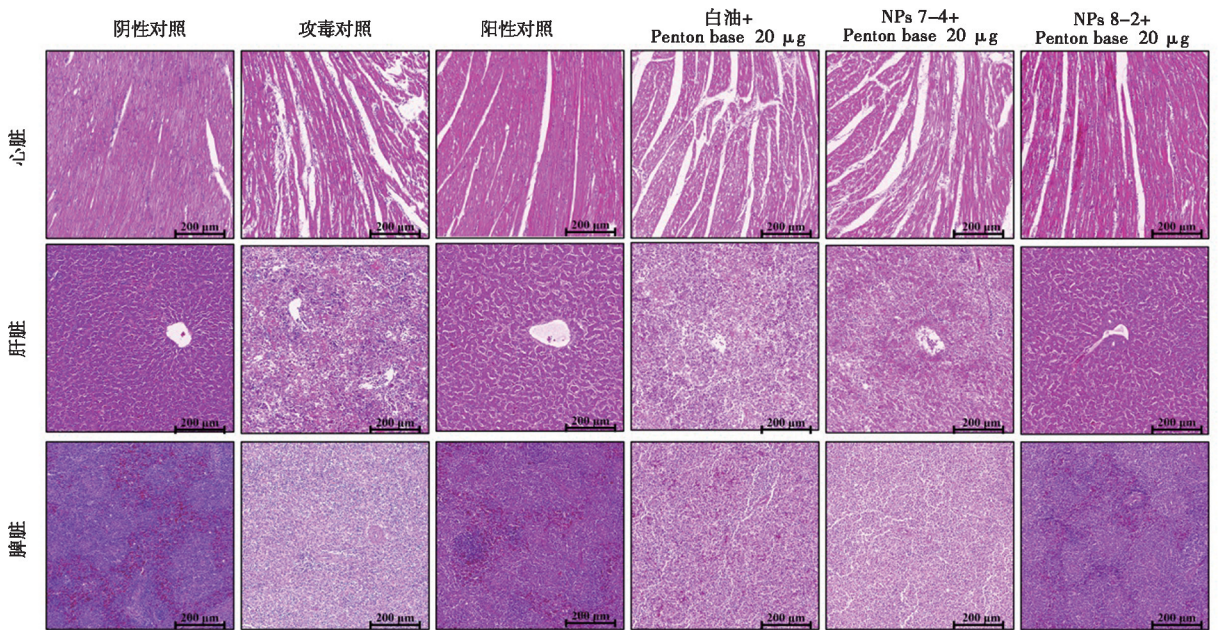


图 5 攻毒后 3 d 各组鸡的组织病理学变化

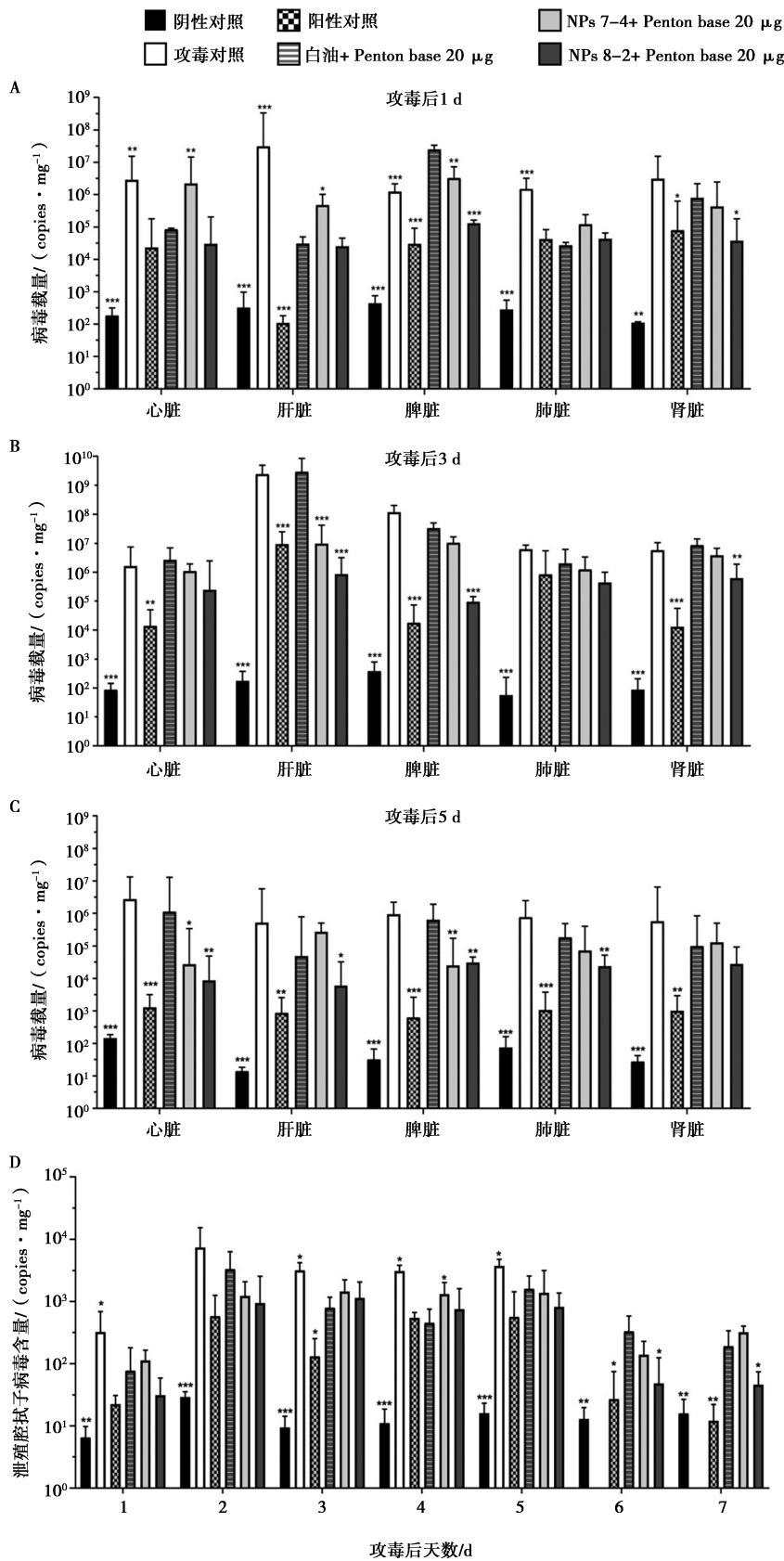
2.6 组织病毒载量及泄殖腔排毒量检测

组织病毒载量检测结果见图 6。攻毒对照组脏器组织中病毒载量最高，攻毒后 3 d 组织病毒载量达到顶峰，其中肝脏病毒载量为 $10^{9.39}$ copies/mg，心脏病毒载量为 $10^{6.21}$ copies/mg，脾脏病毒载量为 $10^{8.07}$ copies/mg。与白油+ Penton base 20 μ g 组相比，NPs 8-2 + Penton base 20 μ g 组在攻毒后 3、5 d 的组织病毒载量均显著减少 ($P < 0.05$)，肝脏中病毒含量降低

约 1 000 倍。NPs 7-4 + Penton base 20 μ g 组攻毒后 1 d 心脏、肝脏中的病毒载量显著高于白油+ Penton base 20 μ g 组，攻毒后 3、5 d 的组织病毒载量与白油+ Penton base 20 μ g 组相比无显著差异 ($P > 0.05$) (图 6 A~6C)。泄殖腔排毒量检测结果显示，攻毒后 1~7 d 为排毒高峰期，接种疫苗能够显著降低泄殖腔的排毒量 ($P < 0.05$)，其中 NPs 7-4 + Penton base 20 μ g 组和白油+ Penton base 20 μ g 组相比，泄殖腔

拭子中的病毒含量无显著差异 ($P>0.05$), NPs 8-2 + Penton base 20 μg 组排毒量显著低于白油+Penton

base 20 μg 组 ($P<0.05$) (图 6 D)。这表明 NPs 8-2 佐剂能够有效减少泄殖腔排毒量并缩短排毒持续期。



与白油+ Penton base 20 μg 组相比, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$ 。

图 6 攻毒后 1 d (A)、3 d (B)、5 d (C) 各脏器和攻毒后不同时间泄殖腔拭子 (D) 的病毒载量

3 讨论

FAdV-4 是引发 HHS 的主要病原, 该病发病急、病程快、死亡率高, 严重影响我国养禽业的发展, 接种亚单位疫苗是预防该病的有效手段。先前的研究结果表明, Penton base 蛋白作为抗原在高剂量下对鸡感染 FAdV-4 能提供有效的保护作用。然而临床应用中, 传统佐剂对亚单位疫苗的免疫增强作用有限, 抗原使用剂量较大, 抗体产生速度较慢、持续期较短, 因此亟需开发一种安全有效的兽用新型佐剂^[15-16]。随着对纳米材料的研究, 纳米颗粒作为药物递送系统展现出了作为新型佐剂的巨大潜力。

研究表明, 乳酸菌胞外多糖能够促进淋巴细胞成熟分化、招募免疫细胞并通过影响趋化因子和细胞因子发挥免疫调节功能, 这表明 EPS 具有作为免疫激活剂的潜力^[17]。因此基于 EPS 开发纳米颗粒佐剂用于递送抗原蛋白, 从而增强亚单位疫苗的免疫效果, 为兽用疫苗佐剂提供了一种新的思路。本研究将硫酸化 EPS 作为免疫刺激剂及物理交联剂, 与季铵化壳聚糖自组装制备出两种 NPs (NPs 7-4 和 NPs 8-2)。经释放率检测, 两种 NPs 释放 Penton base 蛋白的过程缓慢且稳定, 具有缓释作用, 48 h 时抗原平均释放率达到 80%, 这有利于抗原蛋白稳定地被免疫细胞识别摄取, 在提高免疫效果的同时减少免疫应激与不良反应。

疫苗免疫后的血清抗体水平是评价疫苗免疫效果的重要指标之一, ELISA 检测 Penton base 特异性抗体水平的结果表明, 白油+ Penton base 20 μg 组在免疫后 7 d 有 3 只鸡抗体检测为阴性, NPs 7-4 + Penton base 20 μg 组有 2 只鸡抗体检测为阴性, 其余免疫组鸡抗体检测均为阳性; 免疫后 14、21d, 各免疫组抗体水平逐步上升, 抗体检测全部为阳性。其中 NPs 8-2 + Penton base 20 μg 组抗体水平与白油+ Penton base 200 μg 组相似, 均显著高于白油+ Penton base 20 μg 组和 NPs 7-4 + Penton base 20 μg 组。以上结果说明, NPs 8-2 能够有效提高 Penton base 蛋白的免疫原性, 刺激机体产生更高效的体液免疫应答, 诱导抗体更快产生, 同时显著提高抗体水平, 具有较好的佐剂和免疫增强效果, 而 NPs 7-4 的免疫增强效果有限, 与白油佐剂无显著差异。

存活率是疫苗保护力最直观的体现。以往的研究证明, 高剂量 Penton base 蛋白能够为鸡只提供完全保护^[13], 我们的结果也证明使用白油佐剂与 200 μg Penton base 蛋白免疫鸡攻毒存活率为 100%, 免疫 20 μg 蛋白鸡存活率下降至 50%。NPs 8-2 作为佐剂, 免疫 20 μg 重组蛋白组存活率达到 70%, 保护效

果明显优于同剂量白油佐剂组, 但 NPs 7-4 作为佐剂, 攻毒存活率甚至低于同剂量白油佐剂组。剖检与组织病理学观察也表明, NPs 8-2 佐剂明显优于白油佐剂和 NPs 7-4 佐剂。此外, 白油佐剂免疫注射困难, 免疫后对雏鸡刺激性较大, 接种部位由于吸收不良易形成结节和钙化灶, 而 NPs 作为水佐剂更易于机体吸收, 没有出现免疫应激与不良反应。心脏和肝脏是 FAdV-4 的主要靶器官, 脏器病毒载量的检测结果也证明, 疫苗免疫显著降低了病毒在各组织脏器中的复制。NPs 8-2 佐剂与白油佐剂和 NPs 7-4 佐剂比较, 心脏、肝脏、脾脏中的病毒载量均出现了下降。肛拭子中病毒含量测定结果显示, NPs 8-2 佐剂降低了感染鸡的排毒量, 显著缩短了排毒持续期, 说明 NPs 8-2 作为 Penton base 蛋白的佐剂虽然无法阻止鸡感染 FAdV-4, 但能有效降低病毒复制。而 NPs 7-4 并没有显示出良好的免疫增强效果, 无论是脏器病毒载量还是泄殖腔排毒量都显著高于 NPs 8-2。

本实验室先前的研究结果表明, NPs 8-2 比 NPs 7-4 的粒径更小, 均一性和稳定性更好。NPs 7-4 和 NPs 8-2 在小鼠体内均能诱导高水平的细胞免疫和体液免疫反应, 其免疫调节作用与诱导 Th1 型免疫反应与激活模式识别受体有关。NPs 7-4 在鸡体内诱导的体液免疫水平显著低于 NPs 8-2, 这导致了 NPs 7-4 的保护效果低于 NPs 8-2。NPs 7-4 与 NPs 8-2 的主要区别在于来源于不同种属的乳杆菌, 研究表明多糖的组成结构和化学性质能够影响其与免疫系统的相互作用方式, 不同类型的多糖在作为佐剂时会产生不同的效果^[18]。因此我们推测 NPs 7-4 在鸡体内未能起到令人满意的免疫增强作用可能与 EPS 本身的特性及其对不同动物的免疫活性差异有关。

综上所述, 使用 NPs 8-2 作为 Penton base 蛋白亚单位疫苗的佐剂优于传统白油佐剂, 能够有效提高抗原蛋白的免疫原性, 减少免疫不良反应。本试验为进一步开发新型兽用疫苗佐剂提供了理论基础和技术支持。

参考文献:

- [1] DABA G M, ELNAHAS M O, ELKHATEEB W A. Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 173: 79-89.
- [2] KHALIL E S, ABD MANAP M Y, MUSTAFA S, et al. Probiotic properties of exopolysaccharide - producing *Lactobacillus* strains isolated from tempoyak [J]. *Molecules*, 2019, 23 (2): 398-417.
- [3] RANI R P, ANANDHARAJ M, DAVID RAVINDRAN A. Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gas-*

- seri* FR4 and demonstration of its *in vitro* biological properties [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 109: 772-783.
- [4] SPANÒ A, LAGANÀ P, VISALLI G, et al. *In vitro* antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14 [J]. *Curr Microbiol*, 2016, 72 (5): 518-528.
- [5] MISU M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1012-1016.
- [6] CAGGIANIELLO G, KLEEREBEZEM M, SPANO G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2016, 100 (9): 3877-3886.
- [7] DING C, WU H, CAO X, et al. *Lactobacillus crispatus*-derived exopolysaccharides with antibacterial activity limit *Salmonella typhimurium* invasion by inhibiting inflammasome mediated pyroptosis [J]. *Food Funct*, 2022, 13 (20): 10501-10515.
- [8] 张嘉坤, 黄啟良, 吴雁. MCM-41 介孔二氧化硅/季铵化壳聚糖载烯啶虫胺纳米颗粒的制备及缓释性能 [J]. *农药学报*, 2020, 22 (2): 225-232.
- [9] 赵莹. 纳米佐剂增强 PEDV 免疫效果的分子机制研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2023.
- [10] HOU F, TENG Z, RU J, et al. Flower-like mesoporous silica nanoparticles as an antigen delivery platform to promote systemic immune response [J]. *Nanomed-Nanotechnol*, 2022, 42: 102541-102551.
- [11] QIAO D, LI L, LIU L, et al. Universal and translational nanoparticulate CpG adjuvant [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2022, 14 (45): 50592-50600.
- [12] TANG Z, LIU M, GAO Z, et al. Pathogenicity and virus shedding ability of fowl adenovirus serotype 4 to ducks [J]. *Vet Microbiol*, 2022, 264: 109302-109309.
- [13] 刘萌. 基于血清 4 型禽腺病毒结构蛋白的亚单位疫苗初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- [14] SUN Y, WAN A. Preparation of nanoparticles composed of chitosan and its derivatives as delivery systems for macromolecules [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 92 (4): 1265-1272.
- [15] 李芳, 张荣武, 单虎, 等. 油佐剂研究进展与质量监控 [J]. *中国动物检疫*, 2010, 12 (2): 70-71.
- [16] 武桂梅, 刘纯德, 王振辉, 等. 影响注射用白油佐剂免疫效果的因素分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2014, 48 (8): 18-22.
- [17] SAADAT Y R, AHMAD Y, BAHRAM P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 217: 79-89.
- [18] 夏芯, 朱雅文, 周利, 等. 疫苗新型佐剂的作用机制和研发进展综述 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2023, 29 (4): 474-482.