

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.2.12

新型动物疫苗佐剂的研究进展

刘元杰, 张媛, 王秀丽, 张一帜, 李建, 李俊平*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-07-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 02-0074-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 疫苗佐剂是使疫苗免疫原性充分发挥的工具, 目前动物疫苗佐剂主要以铝盐佐剂和油乳佐剂为主。近年来基因重组疫苗和亚单位疫苗发展迅猛, 而这些新型疫苗与传统疫苗相比免疫原性较弱, 这就对佐剂提出了更高的要求。当前针对佐剂的研究层出不穷, 部分佐剂如 MF59、AS01、AS03 等已经在人用疫苗中成功应用, 但应用于动物疫苗还有技术难题需要攻破。蜂胶佐剂目前在动物疫苗中应用较广, 且已经占有了一定的市场份额。为充分比较现有新型疫苗佐剂的优缺点, 为后续疫苗佐剂的研究提供参考, 就目前广泛研究的新型动物疫苗佐剂进行综述。

[关键词] 铝盐佐剂; 动物疫苗; 油乳佐剂; 天然佐剂; 蜂胶佐剂

Research Progress of New Animal Vaccine Adjuvants

LIU Yuan-jie, ZHANG Yuan, WANG Xiu-li, ZHANG Yi-zhi, LI Jian, LI Jun-ping*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: Vaccine adjuvant is a tool to give full play to the immunogenicity of vaccine. At present, most commonly used animal vaccine adjuvants are aluminum adjuvants and oil emulsion adjuvants. However, there is a rapid development in gene recombination vaccines and subunit vaccines in recent years. Compared with traditional vaccines, these new vaccines have weaker immunogenicity, which require more effective adjuvants. In current, there are many researches on adjuvant. Some adjuvants, such as MF59, AS01, AS03, have been successfully applied in human vaccines, but there are still some technical problems to be solved in animal vaccines. Propolis adjuvant is widely used in animal vaccines at present, and has occupied a certain market share. In order to fully compare the advantages and disadvantages of the existing new vaccine adjuvants and provide reference for the subsequent research of vaccine adjuvants, the new animal vaccine adjuvants that widely studied at present are reviewed.

Key words: aluminum adjuvant; animal vaccine; oil-in-water adjuvant; natural adjuvant; propolis adjuvant

作者简介: 刘元杰, 硕士, 从事细菌生物制品的检验与研究。

通讯作者: 李俊平。E-mail: lijunping03@163.com

目前我国动物疫苗佐剂仍然以铝盐佐剂为主,除此之外,也有油乳和蜂胶等佐剂疫苗批准生产并投入使用。佐剂是一种非特异性的免疫增强剂,可辅助特异性抗原进入机体内,增强机体对目的抗原的免疫应答。一般认为,佐剂对疫苗作用的促进主要体现在两个方面:一是增加疫苗的稳定性和延长疫苗作用时间;二是激活机体免疫系统,增加疫苗作用强度。

目前针对新型疫苗佐剂的研究很多,主要有铝盐佐剂、油乳佐剂、天然佐剂、脂质体佐剂、纳米粒子佐剂、细胞因子佐剂等,部分新型佐剂已经普遍应用,还有部分正在研究和不断完善中。

1 铝盐佐剂

铝盐佐剂早在 1926 年就已经被批准使用,在此后也一直广泛被应用,直到现在仍然是动物疫苗中最主要的佐剂。铝盐佐剂可以诱导体液免疫反应,而且不会导致严重的副反应,具有较好的安全性^[1]。铝盐佐剂价格低廉、工艺成熟,但也存在一定的缺点,如注射部位的红肿、过敏反应,不能诱导细胞免疫应答等。近年来,分子生物学和基因工程学发展迅猛,多种 DNA 疫苗、亚单位疫苗等新型疫苗相继上市,传统铝盐佐剂分子质量小、免疫原性差等问题开始突显,已不能满足新型疫苗的更高要求。

2 油乳佐剂

油乳佐剂按油料区别可分为矿物油佐剂和非矿物油佐剂,按分散状态不同分为水包油、油包水和双相型乳液三种形式。目前应用和研究较多的油乳佐剂有白油佐剂、MF59、AS03 等。

2.1 白油佐剂 目前市场上的动物油佐剂疫苗大多为白油佐剂。白油佐剂为矿物油佐剂,可以使抗原免疫时间延长,减少免疫次数。但其存在因黏度大导致的注射困难和注射部位炎症反应的问题。研究表明,影响白油佐剂免疫效果的主要因素为芳烃、重金属含量和白油运动的黏度两方面^[2]。白油粒子的均一性对疫苗免疫效果影响不大,但是均一性更高的白油佐剂引起的炎症反应更轻^[3]。

2.2 MF59 MF59 是最具代表性的水包油佐剂,

主要成分是角鲨烯,在肝脏中自然合成,易于降解。MF59 中两种非离子表面活性剂吐温 80 和 span85 (山梨酸酐三油酸酯)可以起到稳定油滴的作用,从而增加疫苗作用时间。MF59 诱导机体产生的体液免疫效果明显高于铝盐佐剂,同时诱导产生一定的细胞免疫反应。有研究显示 MF59 可以产生 Th1 型和 Th2 型细胞免疫反应,但是未发现 CD8⁺ 毒性 T 细胞免疫反应的报道^[4]。MF59 已经应用于部分亚单位疫苗中,其安全性高,扩散快,而且不形成抗原储库^[5],但需要抗原与佐剂免疫相同位置才能增强免疫反应。有学者将自主构建的 H7N9 禽流感病毒疫苗加 MF59 制备成品疫苗,验证了以 MF59 为佐剂的禽流感疫苗不仅具备长期免疫原性^[6],而且有良好的稳定性,在 2 ~ 8 ℃ 至少可保存 30 个月^[7]。

2.3 AS03 AS03 是葛兰素史克公司在 2009 年研发的一种佐剂系统,与 MF59 相比,增加了一种主要成分 α -生育酚。该物质可以增加诱导产生的细胞因子水平,促进单核细胞的抗原摄取水平,进一步提高诱导产生的抗体水平^[8]。目前 AS03 已经被用于 H5N1 流感病毒疫苗^[9]和 H7N9 流感病毒疫苗^[10]临床试验阶段的研究。

新型油乳佐剂的研究还有很多,如同样由葛兰素史克公司研发的 AS02 已经被应用于结核病的临床试验阶段^[11]。姜佳琪等^[12]对 SP01 佐剂进行了安全性评价,验证了其无毒,且对实验动物无过敏反应。

油乳佐剂通过油乳本身对抗原的包裹使抗原可以在机体内持续存在,从而使抗原刺激的时间延长,免疫效果大幅提高^[13]。但也正是因为油乳佐剂这个特点,在持续的刺激下,机体中容易出现组织损伤、应激反应、矿物油的残留等,存在一定的安全隐患。未来针对油乳佐剂的研究方向在于如何在保证其长效抗原刺激的同时进一步提高其安全性,避免因长期存在于体内造成各种不良反应。

3 天然佐剂

天然佐剂主要来源于天然植物中提取的某些具有免疫活性的成份,这些成分具有毒性低、易于

代谢的特点,主要包括蜂胶佐剂和壳聚糖佐剂等。

3.1 蜂胶佐剂 蜂胶是由从植物中提取的树脂和蜜蜂分泌物经特定工序加工而成的胶状物质,可以增强机体的体液免疫反应,增强巨噬细胞的吞噬能力,增加白细胞数量,刺激细胞因子产生,从而使免疫效果得到显著提高。因其为天然物质,与其他类型佐剂相比安全性较高。翟晓虎等^[14]在猪细小病毒疫苗的研制过程中比较了油佐剂与蜂胶佐剂,发现蜂胶佐剂可以提高豚鼠细胞免疫和早期体液免疫。赵晶^[15]比较了不同类型的蜂胶佐剂和其他佐剂猪圆环病毒疫苗活性的促进作用,结果显示蜂胶佐剂猪圆环病毒疫苗能显著增强猪群的特异性免疫和非特异性免疫,且具有良好的安全性,为蜂胶佐剂疫苗临床推广应用提供了数据支撑。

近年来蜂胶佐剂的应用已经十分广泛,在特定种类疫苗中,蜂胶佐剂疫苗的生产数量已经远远超过传统疫苗,有逐渐取代传统疫苗的趋势。统计 2017–2019 年部分细菌灭活疫苗批签发数据,其中禽大肠杆菌类灭活苗、禽多杀性巴氏杆菌类灭活苗、猪链球菌类灭活苗三种主要细菌相关产品中蜂胶佐剂疫苗生产量占比分别为 51.8%、30.4%、30.9%,从数量上看蜂胶苗在灭活苗中已经占据了相当大的比例。

3.2 壳聚糖佐剂 壳聚糖是天然中存在的碱性多糖,化学性质稳定,可溶于部分无机酸中,但不溶于水。壳聚糖中游离的氨基和羟基可通过氢键和静电吸引作用吸附于机体粘膜上^[16]。通过作用于 Toll 样受体 4 诱导巨噬细胞和树突细胞的活化^[17],提高共刺激膜蛋白 CD80 和 CD86 的表达,从而激活免疫系统。壳聚糖能在较温和条件下进行一系列化学修饰,形成具有不同生物特性的衍生物^[18]。壳聚糖–三磷酸盐是近年来研发出的多聚糖衍生物,克服了壳聚糖在生理 pH 下溶解度低的缺点,延长抗原释放时间并降低降解率,从而提高疫苗的有效性^[19]。壳聚糖是存在于昆虫甲壳中的天然物质,在生产过程中成本相对较低,而且具有良好的生物相容性,安全性较高^[20]。在壳聚糖类佐剂应用的过程中,使用黏膜免疫的方法更有利于发挥其

本身黏膜吸附性的优势。通过黏膜免疫的方法,在黏膜中可以产生分泌型 IgA 抗体,这说明壳聚糖可以促进机体的黏膜免疫^[21]。

尽管壳聚糖有着安全性和黏膜吸附性的优势,但在实际应用的过程中还存在两个主要问题。其一是溶解性低。壳聚糖本身不易溶于水,不利于在机体中发挥作用。一般可以通过化学修饰来提高其溶解性,但是在化学修饰过程中很难避免出现因重金属残留而导致的毒性增加。未来壳聚糖改造工艺仍然有待进一步研究。其二是黏膜免疫在机体中存在的各种阻碍,如口服易在胃中被消化,滴鼻在鼻腔内作用时间短等问题。可以通过将壳聚糖转化为纳米粒的形式来保证疫苗在体内的持续性。有学者将新城疫病毒 F 基因 DNA 疫苗封装到壳聚糖纳米粒中,促进了黏膜免疫传递系统的持续释放,提高了免疫效率^[22]。

4 脂质体佐剂

4.1 类病毒颗粒 类病毒颗粒是模拟病毒表面蛋白结构的非感染性空衣壳,可以诱导体液免疫反应和 CTL 等细胞免疫反应,还可以传递多肽、蛋白质等大分子物质^[23]。不同于其他病毒样颗粒,类病毒颗粒不是在宿主内合成,而是在体外装配形成,所以不具有感染性。与铝盐佐剂相比,类病毒颗粒具有更高的安全性,因其本身为膜蛋白,更容易降解。目前类病毒颗粒已经被广泛应用于亚单位疫苗的载体和佐剂,如以此为基础的流感疫苗和乙肝疫苗已经上市^[24]。

4.2 AS01 AS01 是由单磷酸脂质体(MPL)和皂素 QS-21 作为免疫激活剂辅以脂质体组成。与一般油乳佐剂不同,QS-21 的作用机制并非延长抗原在机体内的存在时间,因为 QS-21 和抗原注射机体后 24 h 就不能检测出 QS-21 的存在^[25]。AS01 的作用机制在于 MPL 和 QS-21 联合作用于抗原,将特异性免疫反应的效力达到最大,刺激细胞毒性 CD8⁺ T 细胞的产生^[26]。2015 年,应用 AS01 佐剂技术研发的疟疾疫苗已经被欧洲药监局批准使用。在结核病的临床试验中,AS01 佐剂也作为重要的技术手段被加以应用^[27]。

4.3 AS04 AS04 是由铝盐佐剂添加 MPL 制备而成,相比铝盐佐剂可以更高水平地诱导体液免疫反应和 Th1 型细胞反应。AS04 已经被批准应用于人宫颈癌的预防^[28]和乙型肝炎疫苗^[29]。

脂质体佐剂在安全性和免疫原性上具有显著优点,但是制作工艺复杂,成本较高。目前脂质体佐剂主要应用于人用疫苗,未来在大量生产中还有很大的技术难题需要攻破。不过其作为一种高效、安全的新型佐剂,未来在动物疫苗领域也有很大的应用前景。

5 纳米佐剂

纳米佐剂是指用聚合物类等纳米粒子材料制成的佐剂,具有独特物理性质,既可避免渗入血管,又可限制纳米粒子在淋巴管中的传输速度。纳米粒子佐剂的优势在于可通过多种途径与免疫系统的细胞相互作用,促进 APCs 的交叉递呈,提高抗原对异型病毒的交叉保护力。而且其化学性质稳定,可以在不改变药物作用机理的条件下发挥作用。生物相容性材料的应用促进了其在生物体内的吸收和降解,使纳米粒子佐剂有着高于传统佐剂的安全性。

PLGA (poly lactic - co - glycolic acid, 聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物) 是一种聚合物类纳米粒,在机体中可自行降解。在美国,PLGA 通过食品和药品管理局 (FDA) 认证,被正式作为药用辅料收录进美国药典。用 PLGA 包被的禽流感病毒经多种途径免疫都明显增强了抗体介导的免疫反应^[30]。简敏捷^[31]以聚乙二醇 - 400 (PEG - 400) 作为材料包裹产肠毒素性大肠埃希菌 (ETEC) 蛋白,开辟了治疗 ETEC 的新方法。 α - 甘露聚糖肽是一种聚糖类有机纳米物质,作为佐剂能够在转基因小鼠模型上提高 E75 乳腺癌疫苗的免疫效应,具有增强基于细胞免疫的多肽类肿瘤疫苗免疫原性的能力^[32]。

目前针对于纳米粒子佐剂的研究以人类肿瘤病为主。在技术上,因人与动物本身免疫系统的差异导致在选取纳米材料上存在一定的技术难题,因为不同纳米材料理化性质差异较大,由此免疫策略也不相同。

6 细胞因子佐剂

细胞因子是机体产生的具有广泛生物调节性质的调节因子,具有免疫佐剂效应的细胞因子有干扰素和白细胞介素等。例如 IL - 2、IL - 12 和 IFN - γ 可促进 Th1 细胞的刺激,从而产生对细胞内病原体细胞介导的免疫应答,IL - 4、IL - 5 和 IL - 10 可促进 Th2 细胞的发育和抗体产生,在宿主抵御细胞外病原体中发挥着重要作用。柏玲等^[33]在研制水貂阿留申病毒 (ADV) VP2 核酸疫苗时,构建了 IL - 12、IFN - γ 细胞因子真核表达质粒,并且在体外细胞水平鉴定了上述目的基因的成功表达。匡露寒等^[34]在禽腺病毒亚单位疫苗的研发过程中添加鸡源白细胞介素和 γ - 干扰素作为免疫佐剂,增强了疫苗的免疫保护效果。

细胞因子佐剂在使用的过程中不仅可以促进特异性免疫反应,也可以最大激发非特异性免疫,应用前景十分广泛。但是就临床应用而言,目前细胞因子佐剂还存在半衰期短、价格昂贵的问题^[35]。除此之外,对剂量的把握也是细胞因子佐剂在应用过程中亟待解决的难题,因为剂量使用不当可能会导致潜在的自身免疫安全隐患。

7 Toll 样受体 (Toll - like receptors, TLR)

TLRs 是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。TLR 作为非催化性跨膜蛋白,可以识别微生物中具有保守结构的分子。当微生物突破机体的物理屏障,如皮肤、黏膜等时,TLR 可以识别它们并激活机体产生免疫应答。

目前已经鉴定的 TLRs 共有 15 种,不同动物所含 TLRs 种类略有不同,如在哺乳动物中有 13 种^[36],而禽类中有 10 种。不同种类的 TLRs 功能不同,如 TLR1 - 6 和 TLR10 等主要在细胞表面表达,可以识别脂蛋白、肽聚糖、鞭毛等病原体细胞膜成分;TLR3、TLR7 - 9 等又被称为抗病毒 TLRs,可以作为胞内受体识别细胞内外源双链 RNA^[37];TLR4 和 TLR5 可以识别细菌脂多糖和鞭毛蛋白^[38]。Bashir K 等^[39]在 IBDV 疫苗中使用了 TLR2 配体和 TLR3 配体为佐剂,促进了 T 细胞和

巨噬细胞的功能,维持疫苗的免疫活性,减少了 IBDV 疫苗的副作用。Bhardwaj R 等^[40]使用 TLR4 配体 LPS 作为鸡新城疫疫苗佐剂,血液和组织样品中 IL-12、IFN- γ 、IL-4 和 TLR4 的含量和血清效价均得到一定程度的上调,验证了 LPS 引发的抗原特异性体液和细胞免疫应答的结论。

8 结 语

目前市场中兽用疫苗绝大多数仍然为铝盐佐剂疫苗,油乳佐剂疫苗和蜂胶苗也在市场中占重要地位。一些新型佐剂的研发是在已经成熟应用佐剂的基础上添加新成分,如 AS04 在铝盐基础上添加了 MPL,邹勇娟等^[41]将白油佐剂与壳聚糖微球混合作为禽流感疫苗佐剂。未来佐剂的研发方向倾向于多种佐剂组合使用,充分发挥每种佐剂的优势。蜂胶佐剂在灭活疫苗中占有一定的比重,但仍然有进一步发展的空间。以猪链球菌类灭活疫苗产品为例,虽然从数量上来看,蜂胶苗在灭活苗中占比达到 30.9%,但蜂胶苗种类在灭活苗种类中占比只有 16.7%。蜂胶苗产量大,但种类并不多,这也恰恰说明了已有蜂胶苗已经被市场所认可。不过,蜂胶佐剂虽然在部分特定种类疫苗中市场数据可观,但其免疫效果仍需要进一步跟踪观察,针对蜂胶佐剂的作用机理也需要进一步研究。未来可以应用蜂胶佐剂技术对已有传统疫苗进行升级改造,扩大蜂胶佐剂的应用范围。纳米佐剂、脂质体佐剂、细胞因子佐剂等技术手段相对复杂,还有很大的技术难题需要攻破,如纳米佐剂的材料选取难题和细胞因子佐剂的剂量控制难题。除此之外,成本问题也是疫苗在临床应用过程中必须面对的问题。当前已经被批准使用的如 MF59、AS 系列佐剂和重构流感病毒颗粒等主要应用于人用疫苗,这些技术在未来动物疫苗领域的应用具有很大空间,随着技术的不断完善,相信会有越来越多的新型动物疫苗出现。

参考文献:

[1] Marrack P, McKee A S, Munks M W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium[J]. Nat Rev Immunol,

2009, 9(4): 287-293.

[2] 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.

Wu G M, Liu C D, Wang Z H, *et al.* Analysis of factors affecting immune effect of white oil adjuvant for injection[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(8): 18-22.

[3] 刘雁南,王连艳,杨婷媛,等. 白油佐剂粒径均一性与炎症和免疫学效应的相关性[J]. 过程工程学报,2015,15(4):653-658.

Liu Y N, Wang L Y, Yang T Y, *et al.* Correlation between particle size uniformity of white oil adjuvant and inflammatory and immunological effects[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2015, 15(4): 653-658.

[4] 刘建东,张静飞,徐颖之,等. 已上市人用预防疫苗佐剂的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2020,33(4):455-460.

Liu J D, Zhang J F, Xu Y Z, *et al.* Research progress of adjuvants for preventive vaccines for human use on the market[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2020, 33(4): 455-460.

[5] O'Hagan D T, Ott G S, De Gregorio E, *et al.* The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation[J]. Vaccine, 2012, 30(29): 4341-4348.

[6] 吴晓鑫,沈吉友,李方仲,等. H7N9 禽流感病毒裂解佐剂(MF59)疫苗的长期免疫原性研究[J]. 微生物学免疫学进展,2019,47(5):10-15.

Wu X X, Shen J Y, Li F Z, *et al.* Study on long-term immunogenicity of avian influenza virus splitting adjuvant (MF59) vaccine[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2019, 47(5): 10-15.

[7] 沈吉友,吴晓鑫,陈磊,等. H7N9 禽流感病毒裂解佐剂(MF59)疫苗稳定性研究[J]. 微生物学免疫学进展,2019,47(4):22-26.

Shen J Y, Wu X X, Chen L, *et al.* Study on the stability of H7N9 avian influenza virus lysis adjuvant (MF59) vaccine[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2019, 47(4): 22-26.

[8] Garçon N, Vaughn D W, Didierlaurent A M. Development and evaluation of AS03, an adjuvant system containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion[J]. Expert Review of Vaccines, 2012, 11(3): 349-366.

[9] Izurieta P, Uy-Aragon M J, Drame M, *et al.* Assessment of prime-boost vaccination using an AS03B-adjuvanted influenza A (H5N1) vaccine: A randomized trial in children of three to less than eighteen years of age[J]. Pediatr Infect Dis J, 2016, 35(2): e35-47.

[10] Jackson L A, Campbell J D, Frey S E, *et al.* Effect of varying

- doses of a monovalent H7N9 influenza vaccine with and without AS03 and MF59 adjuvants on immune response: A randomized clinical trial[J]. JAMA, 2015, 314(3): 237–246.
- [11] Spertini F, Audran R, Lurati F, *et al.* The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02 in PPD positive adults: a randomized controlled phase I/II study[J]. Tuberculosis (Edinb), 2013, 93(2): 179–188.
- [12] 姜佳琪, 于 姝, 邢 丽, 等. 新型水包油佐剂 SP01 的安全性评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(7): 885–889.
- Jiang J J, Yu S, Xing L, *et al.* Safety evaluation of new oil-in-water adjuvant SP01[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(7): 885–889.
- [13] Baker J A, Lewis E L, Byland L M, *et al.* Mucosal vaccination promotes clearance of *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization[J]. Vaccine, 2017, 35(9): 1273–1280.
- [14] 翟晓虎, 徐传芬, 张玲玲, 等. 蜂胶黄酮作为 PPV 灭活疫苗佐剂活性的研究[J]. 上海农业学报, 2019, 35(1): 71–75.
- Zhai X H, Xu C F, Zhang L L, *et al.* Study on the activity of propolis flavonoids as adjuvant of PPV inactivated vaccine[J]. Acta Agricultural Shanghai, 2019, 35(1): 71–75.
- [15] 赵 晶. 八种 PCV2 VLPs 疫苗免疫效果评价比较[D]. 山东: 山东农业大学, 2019.
- Zhao J. Evaluation and comparison of immune effects of eight PCV2 VLPs vaccines [D]. Shandong: Shandong Agricultural University, 2019.
- [16] Xia Y, Fan Q, Hao D, *et al.* Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean[J]. Vaccine, 2015, 33(44): 5997–6010.
- [17] Koppolu 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.
- [18] Elknidri H, Belaabed R, Addaou A, *et al.* Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan[J]. Int J Biolog Macromol, 2018, 120: 1181–1189.
- [19] Hejjajie M A, Smith A M, Morris G A. Evaluation of the muco-adhesive properties of chitosan nanoparticles prepared using different chitosan to tripolyphosphate (CS:TPP) ratios[J]. Int J Biolog Macromol, 2018, 120: 1610–1617.
- [20] 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.
- Zhou J S, Pan X, Li Y X, *et al.* Research progress of chitosan and its derivatives as vaccine adjuvants [J]. Progress in Veterinary Medicine. 2020, 41(4): 104–109.
- [21] Zhao K, Han J, Zhang Y, *et al.* Enhancing mucosal immune response of newcastle disease virus DNA vaccine using N-2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride chitosan and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as delivery carrier [J]. Molecular Pharmaceutics, 2018, 15(1): 226–237.
- [22] Zhao K, Zhang Y, Zhang X Y, *et al.* Preparation and efficiency of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles[J]. International Journal of Nanomedicine, 2014, 9: 389–402.
- [23] Saga K, Kaneda Y. Virosome presents multimodel cancer therapy without viral replication[J]. Biomed Res Int, 2013. doi:10.1155/2013/764706.
- [24] Schwendener R A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances[J]. Ther Adv Vaccine, 2014, 2(6): 159–182.
- [25] Didierlaurent A M, Laupeze B, Dipasquale A, *et al.* Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines[J]. Expert review of vaccines, 2017, 16(1): 55–63.
- [26] Ragupathi G, Gardner J R, Livingston P O, *et al.* Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer [J]. Expert Review of Vaccines, 2011, 10(4): 463–470.
- [27] Penn-nicholson A, Geldenhuys H, Burny W, *et al.* Safety and immunogenicity of candidate vaccine M72/AS01E in adolescents in a TB endemic setting[J]. Vaccine, 2015, 33(32): 4025–4034.
- [28] Bryan J T, Buckland B, Hammond J, *et al.* Prevention of cervical cancer: journey to develop the first human papillomavirus viruslike particle vaccine and the next generation vaccine [J]. Curr Opin Chem Biol, 2016, 32: 34–47.
- [29] Desilva T I, Green S T, Cole J, *et al.* Successful use of Fendrix in HIV-infected non-responders to standard hepatitis B vaccines[J]. The Journal of Infection, 2014, 68(4): 397–399.
- [30] Alkie T N, Yitbarek A, Taha-Abdelaziz K, *et al.* Characterization of immunogenicity of avian influenza antigens encapsulated in PLGA nanoparticles following mucosal and subcutaneous delivery in chickens[J]. Plos One, 2018, 13(11): e206324.
- [31] 简敏捷. 载产肠毒素性大肠埃希菌 ST-LTB 融合蛋白纳米疫苗的制备及特性鉴定[J]. 生命技术世界, 2012(5): 9–10.
- Jian M J. Preparation and characterization of nano-vaccine carrying enterotoxigenic *Escherichia coli* ST-LTB fusion protein [J]. Biotech World, 2012(5): 9–10.
- [32] 王 威, 许 薇, 王亚文, 等. 新型佐剂 α -甘露聚糖肽对 E75 多肽肿瘤疫苗在转基因小鼠体内免疫效果的影响[J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(6): 535–540.
- Wang W, Xu W, Wang Y W, *et al.* Effect of new adjuvant α -

- mannatide on immune effect of E75 polypeptide tumor vaccine in transgenic mice[J]. Journal of Shanxi Medical University, 2020, 51(6): 535–540.
- [33] 柏玲,朱言柱,胡博,等. ADV VP2 主要抗原表位基因核酸疫苗与 IL-12、IFN- γ 细胞因子佐剂质粒的构建及鉴定[J]. 特产研究, 2020, 42(2): 1–8, 14.
- Bai L, Zhu Y Z, Hu B, *et al.* Construction and identification of ADV VP2 major epitope gene nucleic acid vaccine and IL-12, IFN- γ cytokine adjuvant plasmid [J]. Special Product Research, 2020, 42(2): 1–8, 14.
- [34] 匡露寒,季国荣,杨灿灿,等. 基于抗原蛋白 Fiber-2 及细胞因子佐剂的 I 群 4 型禽腺病毒亚单位疫苗的开发[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(04): 452–458.
- Kuang L H, Ji G R, Yang C C, *et al.* Development of group I avian adenovirus subunit vaccine based on antigen protein fiber-2 and cytokine adjuvant[J]. Veterinary Science in China, 2020, 50(4): 452–458.
- [35] 王亚贞,樊惠英,廖明,等. 禽用疫苗佐剂研究进展[J]. 养禽与禽病防治, 2019(9): 25–30.
- Wang Y Z, Fan H Y, Liao M, *et al.* Research progress of vaccine adjuvant for poultry [J]. Poultry Raising and Prevention of Poultry Diseases, 2019(9): 25–30.
- [36] 李鹏,王雅春. 猪 Toll 样受体研究进展[J]. 福建畜牧兽医, 2019, 41(6): 31–35.
- Li P, Wang Y C. Research progress of pig Toll-like receptor [J]. Fujian Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 41(6): 31–35.
- [37] 曹晓亚,徐福洲,郭杰,等. Toll 样受体 3 激动剂在疫苗佐剂中的应用进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(2): 144–151.
- Cao X Y, Xu F Z, Guo J, *et al.* Advances in the application of Toll-like receptor 3 agonists in vaccine adjuvants[J]. Advances in Biotechnology, 2020, 10(2): 144–151.
- [38] Huang X Y, Ansari A R, Huang H B, *et al.* Lipopolysaccharide mediates immuno-pathological alterations in young chicken liver through TLR4 signaling[J]. BMC Immunology, 2017, 18(1): 12.
- [39] Bashir K, Kappala D, Singh Y, *et al.* Combination of TLR2 and TLR3 agonists derepress infectious bursal disease virus vaccine-induced immunosuppression in the chicken[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8197.
- [40] Bhardwaj R, Verma R, Deka D, *et al.* Validation of immunomodulatory effects of lipopolysaccharide through expression profiling of Th1 and Th2 biased genes in Newcastle disease virus vaccinated indigenous chicken[J]. Vet World, 2018, 11(4): 437–445.
- [41] 邹勇娟,刘艳,王月琦,等. 壳聚糖微球及其与白油混合乳液对禽用新流二联疫苗佐剂的免疫效果[J]. 过程工程学报, 2016, 16(4): 639–646.
- Zou Y J, Liu Y, Wang Y Q, *et al.* Immune effect of chitosan microspheres and their mixed emulsion with white oil on the adjuvant of new stream vaccine for poultry[J]. Chinese Journal of Process Engineering, 2016, 16(4): 639–646.

(编辑:李文平)