

# 壳聚糖及其衍生物作为疫苗佐剂研究进展

周佳升, 潘 熙, 李云香, 杨文霞, 齐雪峰\*

(西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:**近年来,随着新型基因工程疫苗的快速发展,其在疫病防控中发挥越来越重要的作用。与传统疫苗相比,新型疫苗特异性好、安全性高,但同时也存在免疫原性弱,难以诱导机体产生有效的免疫应答等不足。如何利用安全有效的免疫佐剂来增强新型疫苗免疫效果已成为当前亟待解决的突出问题。壳聚糖是来源于甲壳质的天然高分子化合物,具有良好的黏膜吸附性、生物相容性、安全性和可改造性,与传统免疫佐剂相比,它不仅能够协助疫苗激活机体的体液免疫,更能有效激活机体的细胞免疫,尤其是其可增强疫苗诱导的黏膜免疫效应。论文就近年来有关壳聚糖及其衍生物的理化特性、作为疫苗佐剂的优势及机制等进行综述,以期壳聚糖及其衍生物佐剂作用机理研究与临床应用提供参考。

**关键词:**壳聚糖;黏膜免疫;免疫佐剂

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.04.022

中图分类号:R392.33

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2020)04-0104-06

现阶段批准使用的佐剂铝胶盐和 MF59,主要刺激机体产生体液免疫,对机体的细胞免疫刺激作用不明显<sup>[1]</sup>。同时缓释控释效果不佳,完整的免疫往往需要进行两次或多次疫苗免疫。壳聚糖及其衍生物由于其具有黏膜吸附性、生物相容性和生物可降解性,能有效辅助疫苗通过黏膜免疫途径刺激机体产生体液免疫和细胞免疫<sup>[2-3]</sup>。在运用纳米技术或微球技术包裹 DNA 或蛋白质疫苗抗原时,壳聚糖能有效防止 DNA 或蛋白质被酶降解,促进抗原递呈细胞对疫苗抗原的摄取、处理和加工,从而增加疫苗的免疫原性。同时,包裹在壳聚糖内的抗原可缓慢释放,持续刺激机体的免疫系统,诱导机体产生长时间的细胞免疫和体液免疫<sup>[4]</sup>。与其他高聚合物佐剂相比,低廉的成本也是壳聚糖及其衍生物用于佐剂的优势之一,尤其是在兽用疫苗研发领域。基于以上高效、安全和低廉的特点,壳聚糖及其衍生物已成为疫苗新型佐剂研究领域的热点之一。

## 1 壳聚糖及其衍生物概述

### 1.1 壳聚糖的理化性质及来源

壳聚糖是天然存在的聚阳离子碱性多糖,化学名称为  $\beta$ -(1,4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖, pKa 值为 5.5~6.5,化学性质稳定,可溶于部分有机酸和稀盐酸、稀硝酸等无机酸中,但不溶于水和碱性溶液。甲壳素是壳聚糖的前体,甲壳素主要存在于昆虫、虾、

螃蟹等甲壳动物的外壳中。甲壳素在碱性条件下脱乙酰基成为壳聚糖,通常把脱去 55% 以上的 N-乙酰基且能溶于 10 mL/L 乙酸或 10 mL/L 盐酸的甲壳素称为壳聚糖<sup>[5-8]</sup>。壳聚糖的溶解度、生物相容性、黏膜吸附性等特性受其分子量和脱乙酰化程度等参数影响,较高分子质量和较高脱乙酰度的壳聚糖具有较低的酶亲和力和较慢的降解速率<sup>[9]</sup>,3 种具有不同分子量和脱乙酰度的商品化壳聚糖具有不同的免疫佐剂活性<sup>[10]</sup>。

### 1.2 壳聚糖的衍生物

壳聚糖能在较温和条件下进行羟基化、羧甲基化、醚化、酰化、烷基化和季铵化等多种化学修饰,形成具有不同理化性质和生物特性的衍生物<sup>[12]</sup>。壳聚糖衍生物可以克服壳聚糖在生理 pH 时溶解性低等缺点,同时可以改善材料的阳离子性质,增强抗原免疫性。N-三甲基壳聚糖(trimethyl chitosan, TMC)是近年常被作为疫苗佐剂的水溶性壳聚糖衍生物,有研究者将包裹有 H1N1 抗原的 TMC 免疫小鼠,发现小鼠出现全身免疫和局部黏膜免疫反应<sup>[13]</sup>。

## 2 壳聚糖作为免疫佐剂的优势

### 2.1 黏膜吸附性

壳聚糖分子结构中含有游离的氨基和羟基,一方面可与黏液中的糖蛋白形成氢键,另一方面壳聚

收稿日期:2019-05-07

作者简介:周佳升(1997-),男,江西宜春人,西北农林科技大学动物医学院本科生。\* 通讯作者

糖由于氨基的水解而带正电,易与黏液中带负电的粘蛋白发生强烈的静电吸引作用,导致壳聚糖易于黏附于机体黏膜上,因而在黏膜药物递送系统中受到广泛关注<sup>[14-15]</sup>。近年来,研究人员为进一步提高壳聚糖的黏膜吸附能力,制备出多种壳聚糖衍生物,例如壳聚糖-三聚磷酸盐<sup>[16]</sup>、丙烯酸化壳聚糖<sup>[17]</sup>、硫酸化乙二醇壳聚糖<sup>[18]</sup>等。壳聚糖及其衍生物的黏膜吸附性不但为研发黏膜免疫途径的新型疫苗提供了条件,而且有助于延长疫苗抗原在黏膜部位的停留时间,延长抗原的释放时间并降低降解率,从而提高疫苗的有效性。

## 2.2 渗透增强性

壳聚糖可以高效促进抗原渗透进入机体。有研究表明,壳聚糖能与细胞膜相互作用,引起膜上皮细胞紧密结合蛋白的结构重组,跨膜通道开放,影响细胞旁和细胞内转运途径而促进抗原的渗透和吸收<sup>[19]</sup>。壳聚糖对疫苗抗原穿过体外培养的大鼠肠黏膜<sup>[20]</sup>和颊部黏膜<sup>[21]</sup>等具有增强作用。对豚鼠局部施用壳聚糖,研究结膜上皮细胞对其体内摄取效果,结果表明壳聚糖能有效打开细胞间紧密连接增强渗透性<sup>[22]</sup>。

## 2.3 安全性

壳聚糖在体内不积累、无免疫原性、无毒性、具有良好的生物可降解性。其在体内可被生物酶催化并缓慢降解为低分子量甲壳素、寡聚糖和氨基葡萄糖等产物,并以多种方式代谢并排泄<sup>[23]</sup>。此外,壳聚糖已被美国食品药品监督管理局认定为安全的膳食补充剂,同时日本、意大利和芬兰等国家将其批准为食品成分<sup>[24]</sup>。将 PLGA-PEG-PLGA 水凝胶与载有胰岛素的壳聚糖纳米颗粒组合注射于结膜下,发现视网膜功能、视网膜超微结构及细胞活性等均正常,同时聚合物及其降解产物也没有引发神经胶质细胞活化,表明壳聚糖具有良好的生物相容性及安全性<sup>[25]</sup>。

## 2.4 缓释和控释作用

壳聚糖本身具有一定的黏度,可以黏附在黏膜表面存留一定时间,当把疫苗抗原封装于壳聚糖及其衍生物制成纳米或微球内后,疫苗的释放速率会明显减慢。这样不但可以有效延长疫苗作用时间、避免突释效应、维持有效的疫苗浓度,而且有效减少疫苗接种次数、减轻或避免毒副作用、形成高的局部浓度,从而提高疫苗的免疫效果。

## 2.5 递送载体

壳聚糖具有阳离子性质,能与带负电荷的核酸形成稳定的复合物,因此可作为基因、小干扰 RNA

和其他带负电荷的大分子的递送载体。此外,壳聚糖纳米粒子还可以封装多种蛋白,例如牛血清白蛋白,胰岛素和卵清蛋白等,为将壳聚糖作为蛋白质纳米疫苗的研发提供了基础。研究者将肿瘤抑制因子 p53 蛋白包裹在壳聚糖-三聚磷酸盐纳米颗粒中,最后成功将此蛋白质传递到人皮肤黑色素瘤细胞<sup>[26]</sup>。

## 3 壳聚糖作为免疫佐剂的机制

### 3.1 激活固有免疫系统

固有免疫系统是生物在长期进化中逐渐形成的,是机体抵御病原体的第一道防线。固有免疫细胞包括巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞和自然杀伤 T(natural killer T, NKT)细胞等,它们通过自身表达的模式识别受体去识别病原微生物表达的病原体相关模式分子,以区别“自身”与“非己”。研究表明,壳聚糖能够通过作用于 Toll 样受体 4 诱导巨噬细胞和树突细胞的活化,提高共刺激膜蛋白 CD80 和 CD86 的表达<sup>[27]</sup>。壳聚糖与抗原结合后,能够促进主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子的表达,更大程度地提高共刺激蛋白 CD80 和 CD86 的表达。同时,壳聚糖和抗原的结合物能够活化 T 细胞,刺激其产生 IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子,加强细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)的反应<sup>[28]</sup>。

壳聚糖能够通过破坏溶酶体激活 NLRP3 炎症小体<sup>[29]</sup>,NLRP3 炎症小体是一种大分子多蛋白复合体,能够活化多种病原体相关模式分子,对固有免疫系统发挥功能具有十分重要的作用<sup>[30]</sup>。壳聚糖以内吞的方式进入细胞形成内吞小泡,内吞小泡与溶酶体发生融合,壳聚糖可以通过“质子海绵效应”破坏溶酶体,使溶酶体内的蛋白酶释放到胞浆中,激活 NLRP3 炎症小体,进而活化胱冬肽酶-1(caspase-1),促进白细胞介素等细胞因子的产生,使机体产生炎症反应。

### 3.2 激活获得性免疫系统

以壳聚糖为佐剂的疫苗进入机体后可以由抗原提呈细胞(Ag presenting cell, APC)摄取、处理和加工,T 细胞和 B 细胞因对抗原进行特异性识别而发生活化、增殖和分化,形成效应 T 细胞和效应 B 细胞,其中 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌大量细胞因子,CD8<sup>+</sup> T 细胞可杀伤靶细胞,效应 B 细胞可分泌抗体与抗原结合。通常情况下,外源性抗原主要刺激机体产生体液免疫,而内源性抗原主要刺激机体产生细胞免疫。研究发现,壳聚糖具有诱导外源性抗原发生交

又提呈从而有效激活细胞免疫的作用<sup>[31]</sup>。壳聚糖与抗原的复合物作用于树突细胞的 Toll 样受体引起树突细胞活化后,细胞将复合物摄取并将其在溶酶体内进行加工,但壳聚糖可通过“质子海绵效应”破坏溶酶体,使复合物从溶酶体中“逃逸”进入胞浆,进入 MHC I 类区室,MHC I 类分子负责对其进行提呈,MHC I 类分子与加工后的抗原形成复合物表达于 APC 表面供 CD4<sup>+</sup> T 细胞识别,最终激活细胞免疫<sup>[14,32]</sup>。值得注意的是,在这种交叉提呈的过程中,甘露糖受体是必不可少的。

### 3.3 激活黏膜免疫系统

在机体各种腔道黏膜下有大量的淋巴组织聚集,这些淋巴组织被称黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT), MALT 是发生局部特异性免疫应答的主要组织。壳聚糖与抗原的复合物与黏膜接触后, MALT 中的 M 细胞受复合物刺激,将其摄取,并以囊泡形式转运给 APC,经 APC 加工处理复合物后,一方面激活机体细胞和体液免疫应答,另一方面刺激 MALT 中的 B 细胞产生分泌型 IgA (sIgA),刺激机体产生局部黏膜免疫应答。

将甲型 H1N1 抗原与甲基丙烯酸 N-三甲氨基乙酯壳聚糖(TMC)纳米粒子结合,可提高鼻腔给药后抗原的免疫原性<sup>[33]</sup>。壳聚糖佐剂的疫苗制剂能够长时间地黏附在鼻黏膜、胃肠道黏膜表面而不被清除<sup>[34]</sup>。有研究者用荧光染料 Cy5 标记 H5N1 抗原,以壳聚糖为其佐剂进行滴鼻免疫,发现在免疫后 2 h 时仍有超过 54% 疫苗抗原存在于鼻腔黏膜上<sup>[31]</sup>。壳聚糖及其衍生物作为疫苗佐剂能够协助抗原“打开”上皮细胞间的紧密连接,促进疫苗对机体的刺激<sup>[35]</sup>。这种“打开”的能力可能与壳聚糖所带正电荷及黏膜所带负电荷之间的相互作用有关。

## 4 壳聚糖及其衍生物作为免疫佐剂在黏膜免疫方面的研究与应用

现阶段应用于人和动物机体的疫苗,其大多数是通过肌肉注射的方式进行免疫,只有少数疫苗通过黏膜途径进行免疫接种,但注射免疫接种存在局限性:如注射过程需要由专业的人员进行操作、操作不当容易引起动物的感染、对禽类进行免疫时,注射免疫很容易引起其出现应激反应,导致产能下降等。黏膜免疫途径(如口腔、滴鼻、点眼、皮肤划痕、直肠、生殖道等)在一定程度上能有效地解决肌肉注射免疫存在的问题。相比于注射途径,黏膜途径接种疫苗可以在刺激机体产生全身免疫的同时,刺激机体

产生局部黏膜免疫,形成有效阻断病原入侵机体的第一道防线。越来越多的研究表明,壳聚糖及其衍生物作为黏膜途径免疫疫苗佐剂具有广泛的应用前景(表 1)。

以壳聚糖为佐剂进行黏膜免疫接种时,除了机体血清会产生特异性 IgG 外,还会产生特异性 IgA。同时,在黏膜表面也会出现分泌型 IgA 抗体<sup>[36-38,43]</sup>。这表明壳聚糖可以促进机体产生局部黏膜免疫和体液免疫。与传统佐剂只能刺激机体产生体液免疫不同,壳聚糖除了可以刺激机体产生特异性抗体,还能够辅助灭活疫苗和新型疫苗刺激机体产生细胞免疫。以壳聚糖作为佐剂的疫苗免疫机体后可以刺激淋巴细胞产生 IFN- $\gamma$  和 IL-12,进而诱导初始 Th 细胞分化成为 Th1 细胞,介导细胞免疫功能<sup>[37-39]</sup>。

但在考虑到黏膜免疫优势的同时,也必须承认黏膜免疫过程中存在的各种阻碍。例如,在进行口服途径免疫接种时,疫苗进入机体胃肠道后,很容易被胃液、胃蛋白酶、胰蛋白酶、胆汁以及消化道各段存在的细菌、溶菌酶、抗菌肽等降解,而使派尔氏结中的 M 细胞捕获完整抗原量严重减少,降低疫苗免疫效果。在进行滴鼻免疫时,疫苗在鼻腔内停留的时间很短,同时在鼻腔黏膜上也存在生物、化学和物理屏障,这都给黏膜免疫带来了困难。

将壳聚糖制作成纳米粒或微球,并用其包裹疫苗被认为是解决这一困难的有效途径。使用壳聚糖纳米或微球一方面可以避免抗原被酶和其他物质降解而导致的抗原性的降低;另一方面,可以降低疫苗在局部的释放速率,从而延长疫苗的作用时间,减少疫苗的接种次数。将新城疫病毒 F 基因 DNA 疫苗封装到壳聚糖纳米粒中进行体内和体外试验,表明纳米粒作为黏膜免疫传递系统具有可持续释放,生物活性好,转染效率高,安全性好的特点,同时纳米粒滴鼻免疫诱导了更强的体液和黏膜免疫应答<sup>[40]</sup>。将含乙型肝炎表面抗原基因的 DNA 质粒封装于壳聚糖纳米粒中,血清中抗乙型肝炎表面抗原的抗体在 2 周内持续存在<sup>[39]</sup>。将纳米粒进行滴鼻免疫后发现,鼻腔黏膜中的 sIgA 含量明显升高,同时机体产生体液和细胞免疫反应。用壳聚糖-藻酸盐-CaCl<sub>2</sub> 包裹噬菌体制备微囊,将游离噬菌体置于 pH 3.7 以下的环境中,5 min 即被分解完全,但将微囊化噬菌体置于 pH 2.4 以下的环境中且同时用胃蛋白酶处理 1 h,微囊化噬菌体的数量仅减少 2.58 个对数单位<sup>[44]</sup>,可见微球在保护抗原过程中发挥的巨大作用。

表 1 壳聚糖及其衍生物作为免疫佐剂在黏膜免疫方面的研究  
Table 1 Studies of chitosan and its derivatives as immune adjuvants in mucosal immunity

佐剂 Adjuvants	疫苗/抗原 Vaccine/antigen	其他佐剂 Other adjuvants	动物模型 Animal model	研究结论 Research conclusion
壳聚糖 Chitosan	流感病毒基质蛋白 M1 Influenza virus matrix protein M1	无 No	Balb/c 小鼠 Balb/c mice	产生针对 H9N2 的 IgG 和 IgA 抗体;对 H1N1 和 H5N1 具有一定的保护作用 <sup>[37]</sup> 。Animals produce IgG and IgA antibodies against H9N2, which have a certain resistance to H1N1 and H5N1 <sup>[37]</sup>
壳聚糖 Chitosan	乙肝表面抗原 HBsAg	海藻酸钠 Sodium alginate	Balb/c 小鼠 Balb/c mice	IFN- $\gamma$ 的分泌量显著增加 <sup>[38]</sup> 。The secretion of IFN- $\gamma$ increased significantly <sup>[38]</sup>
壳聚糖 Chitosan	白喉无毒突变体 Diphtheria toxin cross-reacting materials 197	无 No	健康人群 Healthy people	IFN- $\gamma$ 的分泌量显著增加;相比于注射免疫,滴鼻免疫显著增强了机体细胞免疫应答 <sup>[39]</sup> 。The secretion of IFN- $\gamma$ gamma increased significantly. Compared with immunization by injection, nasal drip significantly enhanced the cellular immune response of the body <sup>[39]</sup>
壳聚糖 Chitosan	含乙肝表面抗原基因的 DNA 质粒 DNA plasmid containing hepatitis b surface antigen gene	无 No	Balb/c 小鼠 Balb/c mice	血液中抗乙肝表面抗原的抗体持续存在两周;滴鼻后,鼻腔黏膜中的 sIgA 含量明显升高 <sup>[40]</sup> 。Antibodies against hepatitis b surface antigens in the blood persist for two weeks; After nasal drip, sIgA content in nasal mucosa increased significantly <sup>[40]</sup>
壳聚糖 Chitosan	含新城疫病毒 F 基因的 DNA 质粒 DNA plasmid containing Newcastle disease virus F gene	无 No	SPF 鸡 SPF chick	具有可持续释放,转染效率高,安全性好等优点 <sup>[41]</sup> 。It has the advantages of sustainable release, high transfection efficiency and good safety <sup>[41]</sup>
壳聚糖 Chitosan	柱状芽孢杆菌灭活疫苗 Inactivated <i>Bacillus columnar</i> vaccine	无 No	罗非鱼 <i>Tilapia mossambica</i>	疫苗黏附性有显著的提高;鱼存活率上升明显 <sup>[42]</sup> 。The adhesion of vaccine was significantly improved. The survival rate of fish increased significantly <sup>[42]</sup>
三甲基壳聚糖 Trimethylated chitosan	甲型 H1N1 流感病毒抗原 Influenza a (H1N1) virus antigen	无 No	Balb/c 小鼠和雄性 SD 大鼠 Balb/c mice & male SD rats	血清 IgG 和黏膜 sIgA 含量升高;可刺激巨噬细胞产生 IL-1 $\beta$ 和 IL-6,脾脏淋巴细胞产生 IL-2 和 IFN- $\gamma$ <sup>[13]</sup> 。Serum IgG and mucosal sIgA levels were increased. It can stimulate macrophages to produce IL-1 and IL-6, and spleen lymphocytes to produce IL-2 and IFN- $\gamma$ <sup>[13]</sup>
藻酸盐壳聚糖 Alginate chitosan	重组乙肝表面抗原 Recombinant hepatitis b surface antigen	无 No	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	口服诱导 60% 的动物产生血清抗体,同时肠道黏膜 sIgA 升高 <sup>[43]</sup> 。Oral administration induced the production of serum antibodies in 60% of the animals, and increased intestinal mucosa sIgA <sup>[43]</sup>
N-2-HACC 和 CMC N-2-HACC & CMC	含新城疫病毒 F 基因的 DNA 质粒 DNA plasmid containing Newcastle disease virus F gene	无 No	SPF 鸡 SPF chick	几乎没有细胞毒性,同时安全性高,可以延长质粒 DNA 在体内的表达时间 <sup>[44]</sup> 。With almost no cytotoxicity and high safety, the expression time of plasmid DNA in vivo can be prolonged <sup>[44]</sup>

注: N-2-HACC 为 N-O-羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖, CMC 为 N,O-羧甲基壳聚糖。

Note: N-2-HACC is N-O-hydroxypropyltrimethylammonium chloride chitosan, CMC is N,O-carboxymethyl chitosan.

## 5 现状与展望

壳聚糖由于其本身来源广泛、价格低廉,且具有黏膜吸附性、生物相容性、安全性、可改造性等性质,同时可以促进抗原渗透进入细胞,因此近些年一直是疫苗佐剂研究的热点,特别对于新型疫苗,壳聚糖作为佐剂发挥的功能更为重大,不但可以防止 DNA 疫苗、亚单位疫苗在转运过程中的降解,而且能保证疫苗的免疫原性,提高 DNA 疫苗的转染效率,促进疫苗在体内长期缓慢释放,达到缓释控释、减少疫苗注射次数的目的。此外,壳聚糖由于其本身具有的高效黏膜吸附性的特点,被认为是黏膜免疫途径的理想佐剂。

现阶段要将壳聚糖及其衍生物投入临床应用仍存在很多的问题。首先,壳聚糖及其衍生物在机体

局部和全身免疫应答过程中发挥的作用及其机制尚不明确;其次,单纯的壳聚糖虽然无毒,但其溶解性低,很难在机体发挥其作用,而在壳聚糖分子上添加各类水溶性基团虽然可以提高其水溶性,但是在化学改造过程中使用的有机溶剂和重金属容易发生残留,使衍生物具有毒性。如何做好毒性和其发挥佐剂特性之间的平衡是未来壳聚糖佐剂研究的重点之一。此外,由于壳聚糖分子结构的复杂性和特殊性,壳聚糖及其衍生物的理化性质和生物学性质受到制造加工工艺、原料的分子量、脱乙酰度和纯度等方面的影响,要保证原料及成品批次间的一致性和稳定性也是壳聚糖作为佐剂研发的难点之一。基于此,将壳聚糖及其衍生物开发成为一种质量与品质稳定、结构与功能清晰且作用机制明确、不良反应可控

的疫苗佐剂任重道远,但可以确定壳聚糖是一种有巨大发展潜力的新型免疫佐剂。

#### 参考文献:

- [1] HARANDI A M. Systems analysis of human vaccine adjuvants [J]. *Semin Immunol*, 2018, 39: 30-34.
- [2] ZOU P, YANG X, WANG J, et al. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides [J]. *Food Chem*, 2016, 190: 1174-1181.
- [3] RITEAU N, SHER A. Chitosan: An adjuvant with an unanticipated STING [J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 522-524.
- [4] 任慧梅, 曾令冰, 曾明. 壳聚糖纳米粒作为疫苗佐剂的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(6): 786-788.
- [5] BENEDIKTSDÓTTIR B E, BALDURSSON Ó, MÁSSON M. Challenges in evaluation of chitosan and trimethylated chitosan (TMC) as mucosal permeation enhancers: From synthesis to in vitro application [J]. *J Controlled Release*, 2014, 173: 18-31.
- [6] DASH M, CHIELLINI F, OTTENBRITE R M, et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications [J]. *Progress Polymer Sci*, 2011, 36(8): 981-1014.
- [7] 杨玲, 何荣香, 马玉静, 等. 壳聚糖的生物学功能及其在畜禽生产中的应用 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31(3): 1037-1043.
- [8] MITTAL H, RAY S S, KAITH B S, et al. Recent progress in the structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields [J]. *Euro Polymer J*, 2018, 109: 402-434.
- [9] ZHANG H, NEAU S H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(12): 1653-1658.
- [10] SCHERLIEß R, BUSKE S, YOUNG K, et al. *In vivo* evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations [J]. *Vaccine*, 2013, 31(42): 4812-4819.
- [11] 张传杰. 低聚壳聚糖的制备、溶解及其包覆海藻纤维的结构与性能 [D]. 江苏: 江南大学, 2018.
- [12] ELKNIDRI H, BELAABED R, ADDAOU A, et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 1181-1189.
- [13] LIU Q, ZHENG X, ZHANG C, et al. Conjugating influenza A (H1N1) antigen to n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles improves the immunogenicity of the antigen after nasal administration [J]. *J Med Virol*, 2015, 87(11): 1807-1815.
- [14] XIA Y, FAN Q, HAO D, et al. Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean [J]. *Vaccine*, 2015, 33(44): 5997-6010.
- [15] SOGIAS I A, WILLIAMS A C, KHUTORYANSKIY V V. Why is chitosan mucoadhesive? [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(7): 1837-1842.
- [16] HEJAJI E M A, SMITH A M, MORRIS G A. Evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles prepared using different chitosan to tripolyphosphate (CS: TPP) ratios [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 1610-1617.
- [17] SAHATSAPAN N, ROJANARATA T, NGAWHIRUNPAT T, et al. 6-Maleimidohexanoic acid-grafted chitosan: A new generation mucoadhesive polymer [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 202: 258-264.
- [18] PERRONE M, LOPALCO A, LOPEDOTA A, et al. S-preactivated thiolated glycol chitosan useful to combine mucoadhesion and drug delivery [J]. *Euro J Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 2018, 132: 103-111.
- [19] ELGADIR M A, UDDIN M S, FERDOSH S, et al. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review [J]. *J Food Drug Analysis*, 2015, 23(4): 619-629.
- [20] LANGOTH N, KAHLBACHER H, SCHÖFFMANN G, et al. Thiolated chitosans: Design and *in vivo* evaluation of a mucoadhesive buccal peptide drug delivery system [J]. *Pharmac Res*, 2006, 23(3): 573-579.
- [21] DÜNNHAUPT S, BARTHELMES J, RAHMAT D, et al. S-Protected thiolated chitosan for oral delivery of hydrophilic macromolecules: Evaluation of permeation enhancing and efflux pump inhibitory properties [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2012, 9(5): 1331-1341.
- [22] SCHUERER N, STEIN E, INIC-KANADA A, et al. Effects of chitosan and chitosan N-acetylcysteine solutions on conjunctival epithelial cells [J]. *J EuCornea*, 2018, 1(1): 12-18.
- [23] BALDRICK P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient [J]. *Regulatory Toxicol Pharmacol*, 2010, 56(3): 290-299.
- [24] 蔡建周. 季磷化壳聚糖作为疫苗递送载体用于免疫接种的研究 [D]. 广东: 暨南大学, 2017.
- [25] RONG X, YANG J, JI Y, et al. Biocompatibility and safety of insulin-loaded chitosan nanoparticles/ PLGA-PEG-PLGA hydrogel (ICNPH) delivered by subconjunctival injection in rats [J]. *J Drug Delivery Sci Technol*, 2019, 49: 556-562.
- [26] STIE M B, THOKE H S, ISSINGER O, et al. Delivery of proteins encapsulated in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles to human skin melanoma cells [J]. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 174: 216-223.
- [27] 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.
- [28] VILLIERS C, CHEVALLET M, DIEMER H, et al. From secretome analysis to immunology: chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(6): 1252-1264.
- [29] LI H, WILLINGHAM S B, TING J P, et al. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3 [J]. *J Immunol*, 2008, 181(1): 17-21.
- [30] 张懿, 刘磊, 刘韵姿, 等. NLRP3 炎性小体研究新进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(9): 1763-1765.
- [31] AMIGORENA S, SAVINA A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(1): 109-117.
- [32] BURGDORF S, KAUTZ A, BOHNERT V, et al. Distinct

- pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 612-616.
- [33] LIU Q, ZHENG X, ZHANG C, et al. Conjugating influenza A (H1N1) antigen to n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles improves the immunogenicity of the antigen after nasal administration[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(11): 1807-1815.
- [34] WU Y, WEI W, ZHOU M, et al. Thermal-sensitive hydrogel as adjuvant-free vaccine delivery system for H5N1 intranasal immunization[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2351-2360.
- [35] HIROSUE S, VOKALI E, RAGHAVAN V R, et al. Steady-state antigen scavenging, cross-presentation, and CD8+ T cell priming: a new role for lymphatic endothelial cells[J]. *J Immunol*, 2014, 192(11): 5002-5011.
- [36] SUI Z, CHEN Q, FANG F, et al. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of M1-based vaccine with chitosan as an adjuvant[J]. *Vaccine*, 2010, 28(48): 7690-7698.
- [37] BORGES O, CORDEIRODASILVA A, TAVARES J, et al. Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles[J]. *Euro J Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 2008, 69(2): 405-416.
- [38] MCNEELA E A, JABBAL-GILL I, ILLUM L, et al. Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans; enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan[J]. *Vaccine*, 2004, 22(8): 909-914.
- [39] KHATRI K, GOYAL A K, GUPTA P N, et al. Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B[J]. *Int J Pharmaceutics*, 2008, 354(1): 235-241.
- [40] ZHAO K, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Preparation and efficacy of Newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles[J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9: 389-402.
- [41] KITTIYODOM S, KAEWMALUN S, NITTAYASUT N, et al. The potential of mucoadhesive polymer in enhancing efficacy of direct immersion vaccination against *Flavobacterium columnare* infection in tilapia[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 86: 635-640.
- [42] SOARES E, JESUS S, BORGES O. Oral hepatitis B vaccine: chitosan or glucan based delivery systems for efficient HBsAg immunization following subcutaneous priming[J]. *Int J Pharmaceutics*, 2018, 535(1): 261-271.
- [43] 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]. *Mol Pharmaceutics*, 2018, 15(1): 226-237.
- [44] MA Y, PACAN J C, WANG Q, et al. Microencapsulation of bacteriophage *felix O1* into chitosan-alginate microspheres for oral delivery[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(15): 4799.

## Progress on Chitosan and Its Derivatives as Vaccine Adjuvants

ZHOU Jia-sheng, PAN Xi, LI Yun-xiang, YANG Wen-xia, QI Xue-feng

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

**Abstract:** In recent years, new generation vaccines have been gradually developed and played an important role in disease prevention and control. Compared with traditional vaccines, although the new generation vaccines are specific and safe, have weak reactivity, low immunogenicity, and difficulty in inducing organism to produce an effective immune response. Therefore, how to use safe and effective immune adjuvant to enhance the immune effect of new vaccines has become an urgent problem to be solved. Chitosan is a natural polymer compound derived from chitin. It has efficient mucosal adsorption, biocompatibility, safety and modification. Compared with traditional vaccine adjuvants, Chitosan can not only assist the vaccine to activate the host humoral immunity, but also effectively activate the cellular immunity, especially in enhancing vaccine-induced mucosal immunity. This paper reviewed the physicochemical properties of chitosan and its derivatives, its advantages and mechanisms as vaccine adjuvants, and the current research progress, in order to provide reference for the mechanism and clinical application of chitosan and its derivatives adjuvants.

**Key words:** chitosan; mucosal immunity; immune adjuvant