



不同黏膜佐剂对猪丁型冠状病毒诱导小鼠免疫应答的影响

李厚伟^{1,2}, 张先锋², 王彦辉², 姬星宇², 王蕾², 张真真², 李倩倩², 张云飞³, 胡永浩^{1*}

- 1 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070
- 2 河南普华基因科技有限公司, 河南 郑州 450045
- 3 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046

李厚伟, 张先锋, 王彦辉, 姬星宇, 王蕾, 张真真, 李倩倩, 张云飞, 胡永浩. 不同黏膜佐剂对猪丁型冠状病毒诱导小鼠免疫应答的影响. 微生物学报, 2022, 62(7): 2686–2701.

Li Houwei, Zhang Xianfeng, Wang Yanhui, Ji Xingyu, Wang Lei, Zhang Zhenzhen, Li Qianqian, Zhang Yunfei, Hu Yonghao. Effects of different mucosal adjuvants on the immune responses induced by porcine deltacoronavirus in mice. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2686–2701.

摘要:【目的】旨在为猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)灭活疫苗黏膜免疫筛选理想佐剂,降低疫苗副作用。利用小鼠模型评价不同佐剂制备的PDCoV灭活疫苗对体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫应答的影响。【方法】将甘露聚糖肽(PA)、CpG ODN2395、单磷酸脂质A(MPLA)佐剂分别与IMS 1313、GEL02佐剂联合制备PDCoV灭活疫苗,经鼻腔免疫BALB/c小鼠;将ISA201佐剂制备的PDCoV灭活疫苗经皮下免疫BALB/c小鼠,将PDCoV灭活抗原经鼻腔免疫BALB/c小鼠作为对照,间隔14 d加强免疫一次。用ELISA方法检测小鼠血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)中的IgG、IgG1、IgG2a、IL-4、IFN- γ 及粪便和BALF中sIgA表达水平;用MTT方法检测疫苗免疫后对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响;观察并记录小鼠免疫后的临床表现,HE染色方法观察免疫小鼠主要器官组织的病理学变化,评价疫苗的安全性。【结果】ISA201组小鼠BALF和血清中的抗体(IgG、IgG1)及IL-4表达水平相对较高,但IgG2a、IFN- γ 和粪便中sIgA表达水平较低;相较于IMS 1313组、IMS1313+2395组、IMS1313+PA组、IMS1313+MPLA组,GEL02组、GEL02+2395组、GEL02+PA组、GEL02+MPLA组小鼠BALF和血清中的抗体(IgG、IgG1、IgG2a)、IL-4、IFN- γ 及粪便中sIgA表达水平均较高;其中GEL02+2395组小鼠BALF和血清中

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972678); 河南省重大科技专项(181100110500)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31972678) and by the Major Science and Technology Projects in Henan Province (181100110500)

*Corresponding author. E-mail: yhh0817@126.com

Received: 8 November 2021; Revised: 11 March 2022; Published online: 21 March 2022

IgG2a 抗体、IFN- γ 及 BALF 和粪便中 sIgA 表达水平显著高于其他组; GEL02+2395 疫苗、IMS1313+2395 疫苗可促进 T 淋巴细胞增殖; 小鼠主要器官组织未见明显病理变化, GEL02 疫苗、GEL02+2395 疫苗免疫小鼠的副反应最轻微。【结论】GEL02 与 CpG ODN2395 佐剂联合制备 PDCoV 灭活疫苗经鼻腔免疫小鼠, 不仅可增强小鼠体液免疫水平, 也可有效提高细胞免疫和黏膜免疫水平, 为黏膜疫苗的研发提供数据支持。

关键词: 猪丁型冠状病毒; 佐剂; 黏膜免疫

Effects of different mucosal adjuvants on the immune responses induced by porcine deltacoronavirus in mice

LI Houwei^{1,2}, ZHANG Xianfeng², WANG Yanhui², JI Xingyu², WANG Lei²,
ZHANG Zhenzhen², LI Qianqian², ZHANG Yunfei³, HU Yonghao^{1*}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Henan Puhua Gene Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450045, Henan, China

3 College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

Abstract: [Objective] The aim of this study is to screen an ideal adjuvant for an inactivated porcine deltacoronavirus (PDCoV) vaccine to induce mucosal immunity and reduce the side effect of the vaccine. We used different mucosal adjuvants to prepare the inactivated PDCoV vaccines. We then used mouse model to evaluate the humoral, cellular and mucosal immune responses induced by the inactivated vaccines via different immunization routes. **[Methods]** The adjuvants IMS1313 and GEL02 were respectively combined with polyactin A (PA), CpG ODN2395, and monophosphoryl lipid A (MPLA) to prepare the inactivated PDCoV vaccines, which were then used to immunize BALB/c mice intranasally. The inactivated PDCoV vaccine prepared with ISA201 adjuvant was used to immunize BALB/c mice subcutaneously. The inactivated PDCoV vaccine without adjuvant was used as a control to immunize BALB/c mice intranasally. The mice were immunized once again at the same doses in the same ways 14 days post the primary immunization. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to determine the expression levels of IgG, IgG1, IgG2a, IL-4, and IFN- γ in serum and bronchial lavage fluid (BALF) samples, as well as the levels of sIgA in feces and BALF samples. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the proliferation of spleen lymphocytes. We observed and recorded the clinical manifestations of immunized mice. Meanwhile, we observed the pathological changes of major organs and tissues of immunized mice via hematoxylin-eosin (HE) staining to evaluate the safety of the vaccines. **[Results]** The ISA201 group had high expression levels of antibodies (IgG and IgG1) and IL-4 in BALF and serum and low expression levels of IgG2a, IFN- γ , and sIgA in feces. GEL02, GEL02+2395, GEL02+PA, and GEL02+MPLA groups showed higher expression levels of antibodies (IgG, IgG1, and IgG2a), IL-4, and IFN- γ in BALF and serum and higher expression level of sIgA in feces than IMS1313, IMS1313+2395, IMS1313+PA, and IMS1313+MPLA groups. In particularly, the expression levels of IgG2a in BALF and serum samples and IFN- γ and sIgA in BALF and feces samples of GEL02+2395 group were significantly higher than those of other groups.

The vaccines prepared with the adjuvant combinations GEL02+2395 and IMS1313+2395 promoted T lymphocyte proliferation. No obvious pathological changes were observed in the main organs and tissues of mice. The mice immunized with the vaccines prepared with the adjuvants GEL02 and GEL02+2395 had the mildest adverse reactions. **[Conclusion]** The inactivated PDCoV vaccine prepared with GEL02 and CpG ODN2395 can not only enhance the humoral immunity but also improve the cellular immunity and mucosal immunity in mice, which provides basic information for the research and development of novel mucosal adjuvants for PDCoV vaccines.

Keywords: porcine deltacoronavirus; adjuvant; mucosal immunity

猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)属于冠状病毒科丁型冠状病毒属, PDCoV可以感染不同年龄的猪,其中以哺乳仔猪最易感。其主要临床症状为水样腹泻、脱水和死亡。有研究表明,近年来PDCoV常与猪流行性腹泻病毒(PEDV)、传染性胃肠炎病毒(TGEV)混合感染,导致仔猪死亡率骤升^[1-5]。PDCoV主要经粪口途径传播,主要感染猪的空肠和回肠等肠道组织,通过抑制天然免疫应答过程中产生干扰素刺激因子的信号通路,在肠道宿主细胞中复制,导致上皮细胞急性坏死,肠绒毛皱缩、脱落,肠壁变薄,肠道功能紊乱,机体对水分的吸收减少而引起腹泻等症状^[6]。疫苗接种是控制PDCoV感染的最有效手段之一,但目前国内尚无商品化的PDCoV疫苗。由于活疫苗具有毒力返强及散毒的风险,灭活疫苗更适用于母猪及初生仔猪的免疫预防,但是常引起部分动物出现注射部位脓肿、体温升高、精神不振、食欲减退、过敏反应甚至诱发免疫病理损伤等副作用^[7]。PDCoV是一种可导致猪腹泻的肠道病毒,黏膜免疫是防控该类疫病的有效手段^[8]。灭活疫苗可以诱导机体产生高水平的抗体,有效的黏膜佐剂可以增强免疫效果,而合适的免疫途径有利于提高疫苗的效力,减少副作用。鼻腔黏膜免疫可以更早更广泛地诱导产生体液免疫应答和黏膜共同免疫应答,增强免疫效果,因此经鼻腔免疫疫苗可以作为预

防PDCoV病发生的重要策略,但是黏膜疫苗普遍存在短时应答、弱势应答的缺点,迫切需要免疫佐剂增强其免疫作用。

本研究以疫苗佐剂IMS1313、GEL02、ISA201和新型黏膜佐剂甘露聚糖肽(polyactin A, PA)、CpG ODN2395、单磷酸脂质A(MPLA)与PDCoV灭活抗原共同免疫BALB/c小鼠,观察其诱导的免疫水平,探讨佐剂免疫的增强效果,为研制PDCoV黏膜疫苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株及实验动物

PDCoV HNZK-04株悬浮细胞毒P29代($10^{9.0}$ TCID₅₀/0.1 mL)由河南普华基因科技有限公司制备;体重为18-22 g的5-6周龄SPF级雌性健康BALB/c小鼠购自河南省实验动物中心。

1.1.2 主要试剂

Montanide™ IMS 1313 VG N水溶性纳米佐剂(简称IMS1313)、Montanide™ GEL02 PR水溶性聚合物佐剂(简称GEL02)、Montanide™ ISA201 VG水包油包水双向佐剂(简称ISA201)购自赛彼科(上海)特殊化学品有限公司;注射用甘露聚糖肽(简称PA)购自国药一心制药有限公司;全硫代修饰CpG ODN2395核酸序列(简称2395),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;单磷酸脂质A(简称MPLA)购自Sigma公司;小鼠IL-4、

IFN- γ 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、小鼠淋巴细胞分离液、MTT 细胞增殖检测试剂盒均购自 Solarbio Life Sciences; 小鼠免疫球蛋白 G1(IgG1)ELISA 检测试剂盒、小鼠免疫球蛋白 G2a(IgG2a)ELISA 检测试剂盒、小鼠分泌型免疫球蛋白 A(IgA)ELISA 检测试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司; 抗 PDCoV 的猪多克隆抗体受赠于河南农业大学动物分子病原学实验室。

1.1.3 主要仪器

FA25D 高剪切分散乳化机购自 Fluko; 叠加式 CO₂ 恒温振荡器购自精骐公司; CMAX PLUS 酶标仪购自 Molecular Devices; 倒置相差显微镜购自 Olympus; VELOCITY 14R 型低温高速离心机购自 Dynamica。

1.2 PDCoV 灭活抗原的制备方法

将 PDCoV HNZK-04 悬浮细胞毒 P29 代 ($10^{9.0}$ TCID₅₀/0.1 mL), 按 MOI 为 0.001 接种于密度为 2×10^6 cells/mL 的 LLC-PK1Sa 细胞, 添加 TPCK 胰酶至终浓度为 7.5 μ g/mL 时, 接毒后 48 h 收获病毒液, 测定 TCID₅₀。向收获的病毒液中加入终浓度为 0.1 mol/L BEI 溶液, 37 °C 150–180 r/min 条件下灭活 24 h, 加入终浓度为 1 mol/L Na₂S₂O₃ 溶液反应 1 h, 经细胞检验灭活完全后, 4 °C 保存。

1.3 不同佐剂与 PDCoV 灭活抗原的乳化方法

参照佐剂使用说明书, 将 ISA201、IMS1313 佐剂分别与灭活 PDCoV 抗原水相等体积比混合(50 mL 佐剂+50 mL 抗原); 将 GEL02 佐剂与 1.8 倍稀释的灭活 PDCoV 抗原水相按体积比 1:9 混合(10 mL 佐剂+90 mL 抗原); 将灭菌生理盐水与灭活 PDCoV 抗原水相等体积比混合(50 mL 生理盐水+50 mL 抗原); 各取 3 份 GEL02 佐剂、IMS1313 佐剂与灭活 PDCoV 抗原混合液, 20 mL/份, 分别添加 PA、CpG ODN2395、MPLA 黏膜

佐剂至终浓度为 500、100、100 μ g/mL, 确保乳化均匀, 经检验合格后, 4 °C 保存。将制备的疫苗分别命名为 ISA201 疫苗、IMS1313 疫苗、GEL02 疫苗、PDCoV 对照疫苗、IMS1313+PA 疫苗、IMS1313+2395 疫苗、IMS1313+MPLA 疫苗、GEL02+PA 疫苗、GEL02+2395 疫苗、GEL02+MPLA 疫苗。

1.4 动物分组及免疫接种

BALB/c 雌性小鼠随机分为 10 组, 每组 20 只。ISA201 疫苗经颈背部皮下多点注射, 0.2 mL/只; 其余 8 组疫苗用移液器经双侧鼻腔交替缓慢滴入, 0.2 mL/只; 同时设不加佐剂的 PDCoV 灭活抗原对照组, 滴鼻免疫, 0.2 mL/只; 首次免疫后 14 d 以相同剂量和相同途径加强免疫一次。

1.5 血清样品采集

分别于首次免疫后 0、1、2、3、4、5、6、7、8 w 采集小鼠血液, 分离血清。每组每次随机抽取 5 只小鼠进行断尾采血, 每只 0.3 mL 左右。血清于 -20 °C 保存。

1.6 支气管肺泡灌洗液(BALF)样品采集

分别于首次免疫后 2 w 和 5 w, 每组随机抽取 3 只小鼠, 颈椎脱臼处死, 分离气管, 在喉结处剪开小口, 插入毛细导管约 1 cm, 缝合线扎紧。用 1 mL 注射器注入 200 μ L PBS 液, 来回抽吸两次, 吸出洗液, 再重复 2 次, 合并洗液, 4 °C 条件下 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, -20 °C 保存。

1.7 粪便样品采集

分别于免疫后 2 w 及 5 w, 收集当天的粪便, 每组收集 1 g, 置于 4 mL 含蛋白酶抑制剂的稀释液中, 充分振荡混匀, 4 °C 条件下 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, -20 °C 保存。

1.8 抗体 ELISA

依据闫瑞杰等^[9]建立的 PDCoV 间接 ELISA 法检测小鼠血清及 BALF 中的 IgG 水平, 本方

法以 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PDCoV N 蛋白多克隆抗体为包被抗原, 将待检血清 1:80 稀释后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 加入 1:6 000 稀释的兔抗猪 HRP 标记的酶标二抗(IgG), 待检血清 OD_{450} 值 ≥ 0.272 判为阳性; 采用上海江莱生物科技有限公司生产的小鼠免疫球蛋白 G1(IgG1)ELISA 检测试剂盒、小鼠免疫球蛋白 G2a(IgG2a)ELISA 检测试剂盒、小鼠分泌型免疫球蛋白 A(IgA)ELISA 检测试剂盒检测小鼠血清及 BALF 中 IgG1、IgG2a 抗体水平, BALF 及粪便中分泌型 IgA (secretory IgA, sIgA) 抗体水平, ELISA 检测试剂盒均采用双抗体夹心法 ELISA, 往预先包被小鼠相应捕获抗体的包被孔中, 依次加入样本、HRP 标记的检测抗体, 经过温育并彻底洗涤, 用底物 TMB 显色, 用酶标仪测定 OD_{450} 值。

1.9 细胞因子 ELISA

采用北京索莱宝科技有限公司生产的小鼠 IL-4 ELISA KIT 和小鼠 IFN- γ ELISA KIT, 检测小鼠血清及 BALF 中的 IL-4、IFN- γ 表达水平, ELISA 检测试剂盒均采用双抗体夹心 ELISA, 往预先包被抗小鼠 IL-4、IFN- γ 单克隆抗体的包被孔中, 分别加入小鼠血清和 BALF, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗板后加入生物素标记的抗小鼠 IL-4、IFN- γ 抗体, 洗板后加入 HRP 标记的链霉亲和素, 经过温育并彻底洗涤, TMB 显色后, 用酶标仪测定 OD_{450} 值。

1.10 淋巴细胞增殖试验

分别于免疫后 2 w 及 5 w, 每组取 3 只小鼠, 颈椎脱臼处死, 无菌取其脾脏, 加 DMEM 培养基 3 mL, 充分研磨制成组织悬液, 按照小鼠淋巴细胞分离液使用说明书将淋巴细胞分离出来, 稀释成 10^6 cells/mL 细胞悬液, 然后于 96 孔板中每孔加入 100 μL , 每只小鼠为 9 孔, 其中 3 孔为 ConA 刺激组, ConA 终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3 孔为疫苗刺激组(每孔加 20 μL 灭活疫苗, 灭

活前病毒含量为 $10^{8.0}$ TCID₅₀/0.1 mL), 3 孔为 DMEM 阴性对照。置 5% CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 每孔加入 10 μL (5 mg/mL) MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养 4 h, 各孔加入 100 μL 的 formazan 溶液, 置摇床上低速振荡 10–30 min, 使结晶物充分溶解。用酶标仪在波长为 492 nm 处测定吸光度, 结果用刺激指数(SI)表示(公式 1)。SI=(PDCoV 灭活疫苗刺激组 OD 值 - 空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值 - 空白对照 OD 值) 公式(1)

1.11 疫苗安全性检验

首次免疫后, 每日观察并记录每组小鼠的精神及食欲状态, 背毛凌乱程度, 呕吐及腹泻情况, 注射部位的炎症表现与疫苗残留, 死亡情况, 连续观察 5 w, 将每只小鼠出现症状的指标按发生的程度进行计分(轻度 1 分, 中度 2 分, 重度或死亡 3 分), 最后按照各项指标发生的程度计算综合得分, 表示小鼠出现疫苗副反应的严重程度。选取免疫后 5 w 小鼠, 3 只/组, 颈椎脱臼处死, 取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、空肠、回肠组织, 10%福尔马林固定组织 48 h, 经石蜡包埋、切片、HE 染色, 显微镜下观察组织病理学变化。

1.12 数据分析

试验中所有数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 试验数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 误差线代表标准偏差, 组间比较采用 t 检验分析, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异非常显著, $P<0.001$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

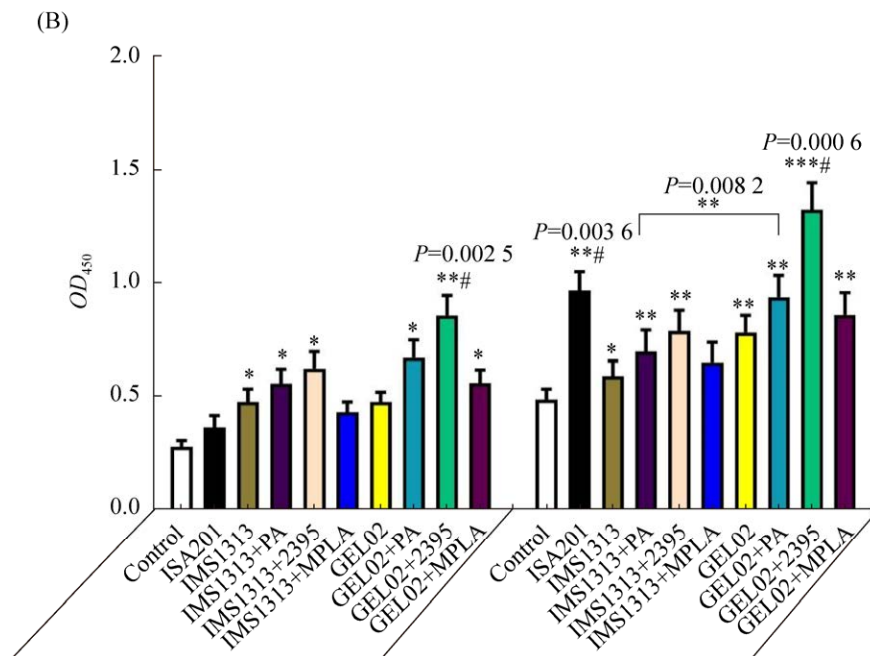
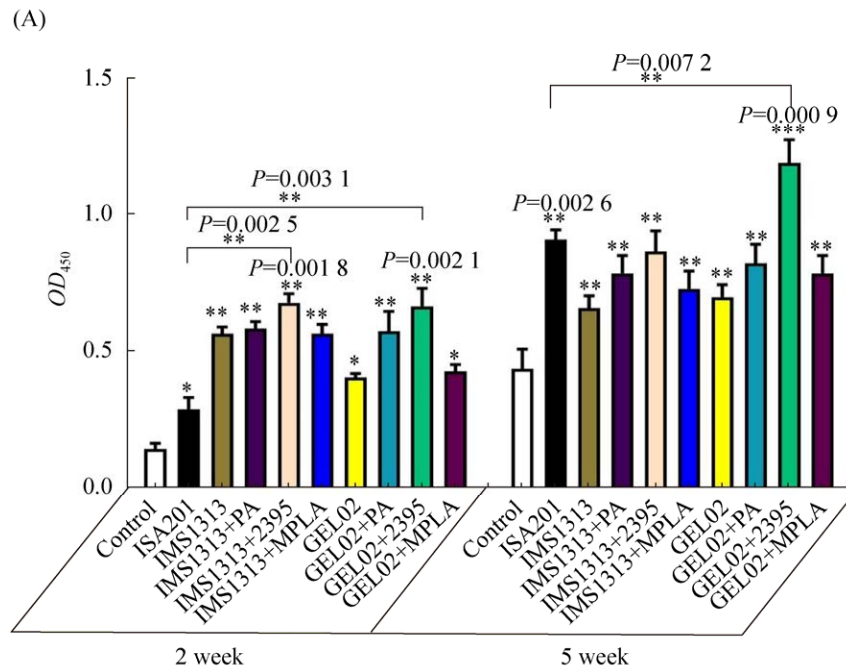
2.1 不同黏膜佐剂对 PDCoV 灭活疫苗诱导小鼠体液免疫的影响

2.1.1 BALF 中抗体水平的检测结果

小鼠 BALF 中的 IgG、IgG1、IgG2a 和 sIgA 的表达水平检测结果见图 1。与对照组相比, 各疫苗组均能提高免疫小鼠 BALF 中的 IgG、

IgG1、IgG2a、sIgA 的表达水平。与首次免疫后 2 w 相比,各疫苗组免疫后 5 w BALF 中的各类抗体表达水平均有明显升高。其中,免疫后 5 w,ISA201 组 IgG 及 IgG1 表达水平相较于对照组差异非常显著($P<0.01$),但 IgG2a 和 sIgA 表达水平较低;与对照组相比, GEL02+2395

组的 IgG 及 IgG1 表达水平差异极显著($P<0.001$), IgG2a 和 sIgA 的表达水平差异非常显著($P<0.01$); GEL02+2395 组与 ISA201 组相比 IgG 表达水平也呈显著性差异($P=0.0072$)。免疫后 5 w, GEL02+2395 组 IgG1、IgG2a 和 sIgA 的表达水平相较于其他组差异非常显著($P<0.01$)。



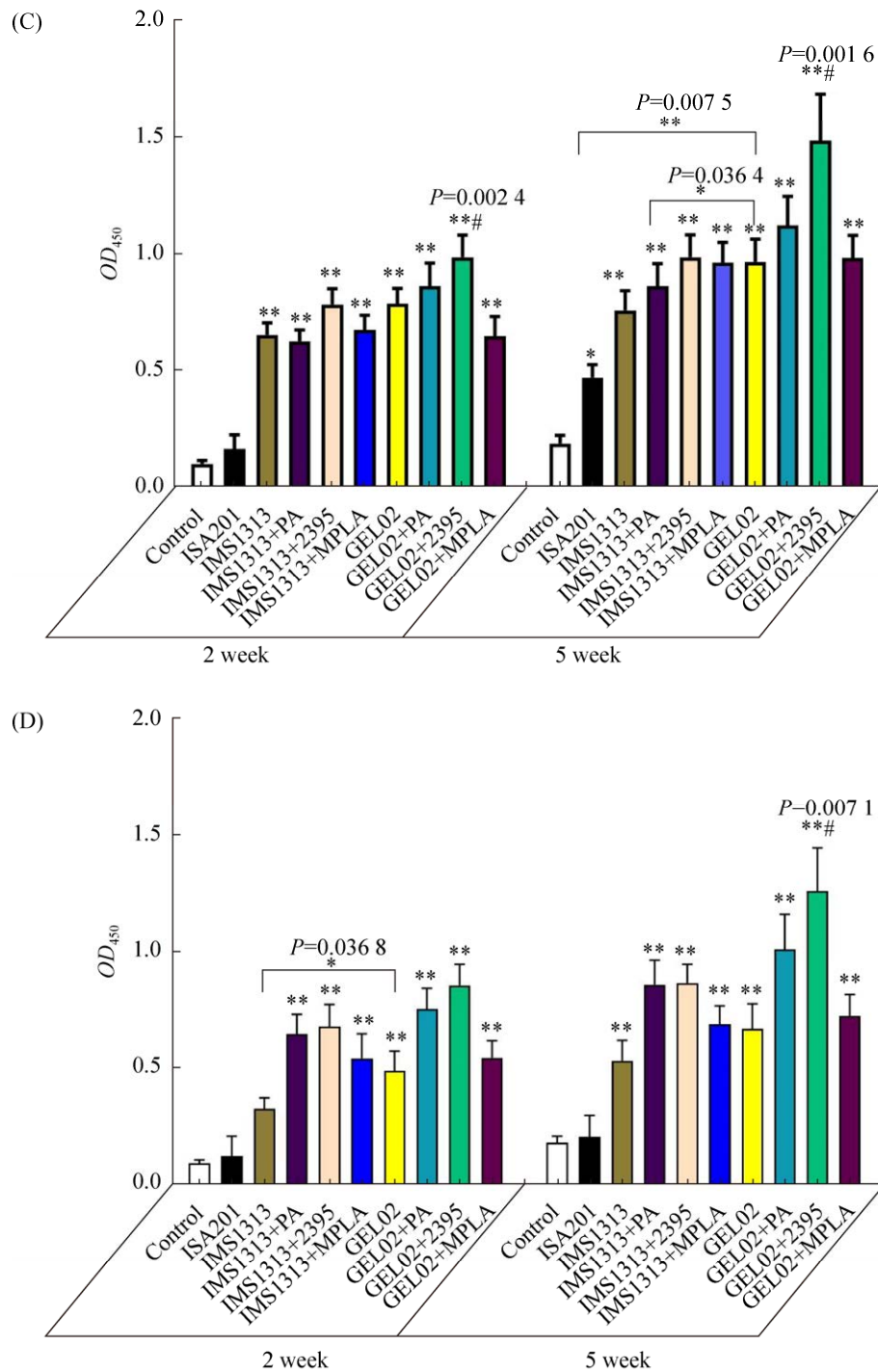


图 1 ELISA 法检测小鼠 BALF 中抗体水平

Figure 1 Detection of antibodies in the BALF of the immunized mice by ELISA. Levels of IgG (A), IgG1 (B), IgG2a (C) and sIgA (D) in BALF; *: significant compared with control group ($P < 0.05$); **: very significant compared with control group ($P < 0.01$); ***: extremely significant compared with control group ($P < 0.001$); #: significant compared with other groups ($P < 0.05$).

2.1.2 血清及粪便中抗体水平的检测结果

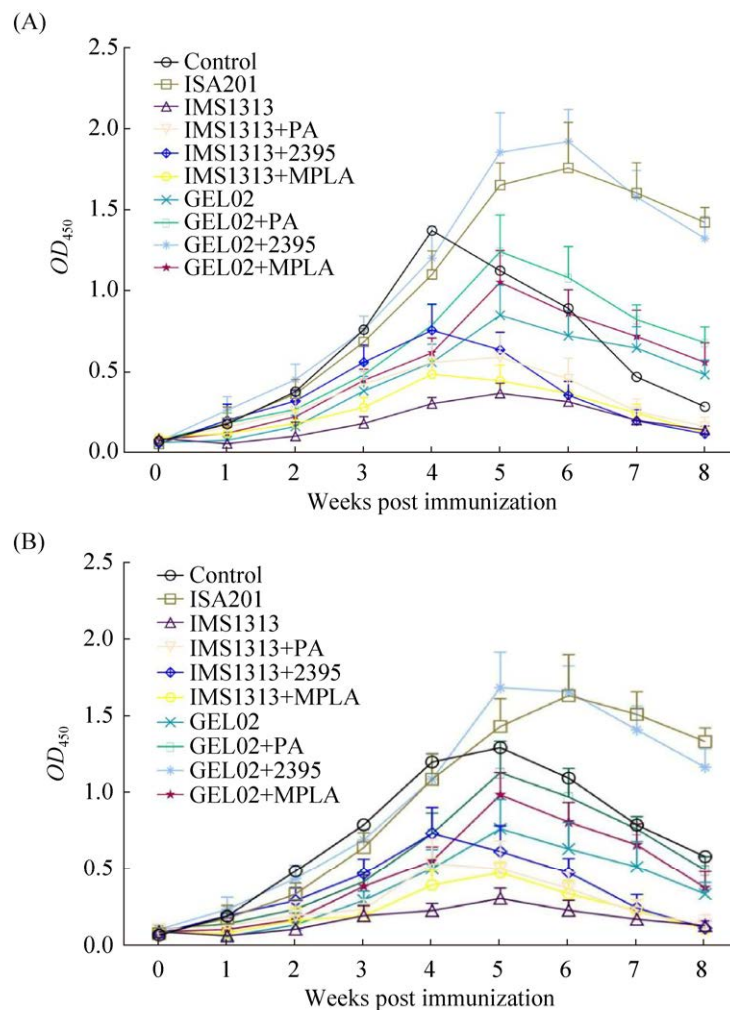
小鼠血清中 IgG、IgG1、IgG2a 及粪便中 sIgA 的表达水平检测结果见图 2。血清中的 IgG、IgG1 和 IgG2a 的表达水平均有明显的消长过程, 疫苗组小鼠血清中 IgG、IgG1、IgG2a 表达水平在免疫后的 5–6 w 达到峰值, 随后缓慢下降。其中 ISA201 组和 GEL02+2395 组 IgG 及 IgG1 抗体水平较高, 而 GEL02+2395 组和 GEL02+PA 组 IgG2a 的表达水平较高。与对照组相比, GEL02+2395 组、GEL02+PA 组免疫后 2 w 及 5 w 粪便中 sIgA 的表达水平差异非常显著 ($P<0.01$), 免疫后 2 w, GEL02 组相较于

IMS1313 组、GEL02+2395 组相较于 IMS1313+2395 组粪便中 sIgA 的表达水平差异非常显著 ($P=0.0072$ 、 $P=0.0063$); 免疫后 5 w, GEL02+2395 组与其他组相比粪便中 sIgA 的表达水平差异均非常显著 ($P<0.01$); GEL02+PA 组相较于 IMS1313+PA 组粪便中 sIgA 的表达水平差异非常显著 ($P=0.0076$)。

2.2 不同黏膜佐剂对 PDCoV 灭活疫苗诱导小鼠细胞免疫的影响

2.2.1 BALF 中细胞因子表达水平的检测结果

小鼠 BALF 中的 IL-4 和 IFN- γ 表达水平检测结果见图 3。免疫后 2 w 和 5 w, GEL02+2395



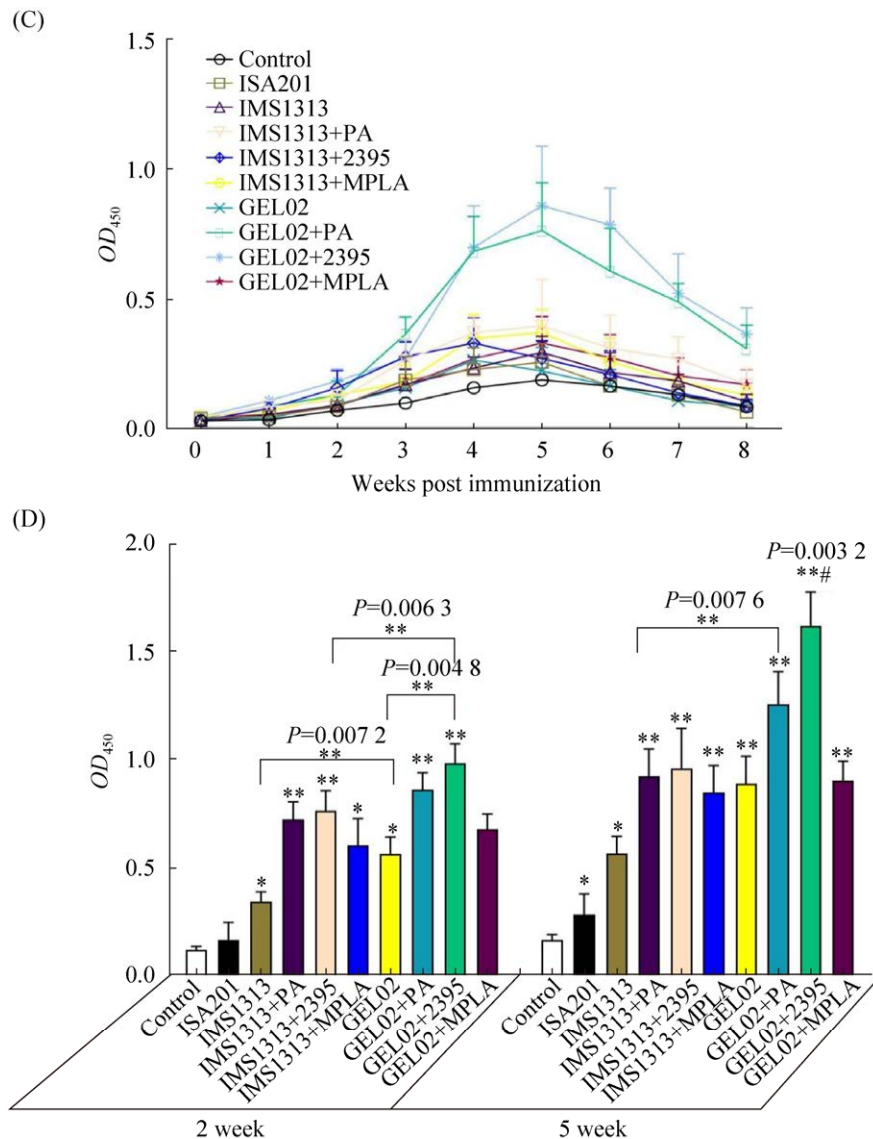


图 2 ELISA 法检测免疫小鼠血清中 IgG、IgG1、IgG2a 及粪便中 sIgA 抗体水平

Figure 2 Detection of IgG, IgG1, IgG2a in the sera and sIgA in the feces of the immunized mice by ELISA. Levels of IgG (A), IgG1 (B) and IgG2a (C) in sera; D: levels of sIgA in feces; *: significant compared with control group ($P < 0.05$); **: very significant compared with control group ($P < 0.01$); #: significant compared with other groups ($P < 0.05$).

组 IL-4 水平与其他组相比差异非常显著($P < 0.01$), 其次为 GEL02+PA 组($P < 0.05$); 免疫后 5 w, GEL02+MPLA 组 IL-4 表达水平也显著高于其他组($P < 0.05$); GEL02 组 IL-4 表达水平显著高于 IMS1313 组($P = 0.0083$); 免疫后 2 w 和 5 w,

GEL02+2395 组 IFN- γ 的含量非常显著高于其他组($P < 0.01$), 免疫后 5 w, GEL02+MPLA 组相较于其他组 IFN- γ 表达水平显著升高($P < 0.05$); GEL02+PA 组相较于 IMS1313+PA 组 IFN- γ 表达水平差异非常显著($P = 0.0078$).

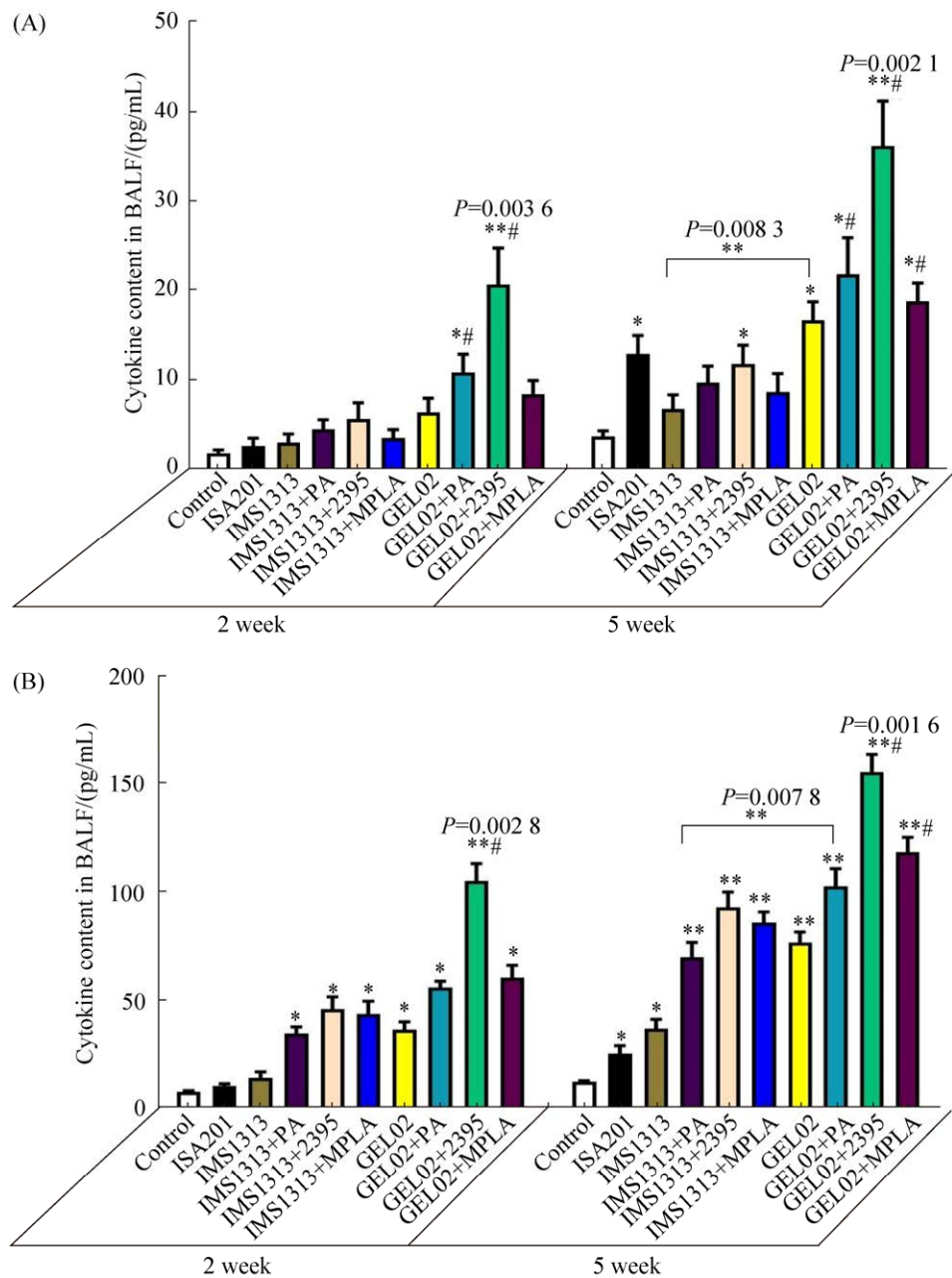


图3 ELISA法检测免疫小鼠BALF中细胞因子表达水平

Figure 3 Detection of cytokine expression in the BALF of the immunized mice by ELISA. Levels of IL-4 (A) and IFN- γ (B) in BALF; *: significant compared with control group ($P < 0.05$); **: very significant compared with control group ($P < 0.01$); #: significant compared with other groups ($P < 0.05$).

2.2.2 血清中细胞因子表达水平的检测结果

小鼠血清中的IL-4和IFN- γ 表达水平检测结果见图4。免疫后2w, GEL02+PA组、GEL02+2395组、GEL02+MPLA组血清中的

IL-4表达水平与对照组相比均明显升高, 差异显著($P < 0.05$); 免疫后5w, GEL02+PA组、GEL02+2395组与其他组相比IL-4的表达水平差异非常显著($P < 0.01$), 值得注意的是, 在免疫后5w,

ISA201 组小鼠血清中的 IL-4 含量增长迅速, 相较于 IMS1313 组差异非常显著($P=0.0073$)。免疫后 2 w 和 5 w, GEL02+2395 组小鼠血清的 IFN- γ 的水平相较于其他组均明显升高, 差异非常显著

($P<0.01$), 免疫后 5 w, IMS1313 组小鼠血清中 IFN- γ 的表达水平相较于 ISA201 组差异非常显著 ($P=0.0061$), IMS1313+2395 组相较于 IMS1313+PA 组 IFN- γ 的表达水平差异显著($P=0.0386$)。

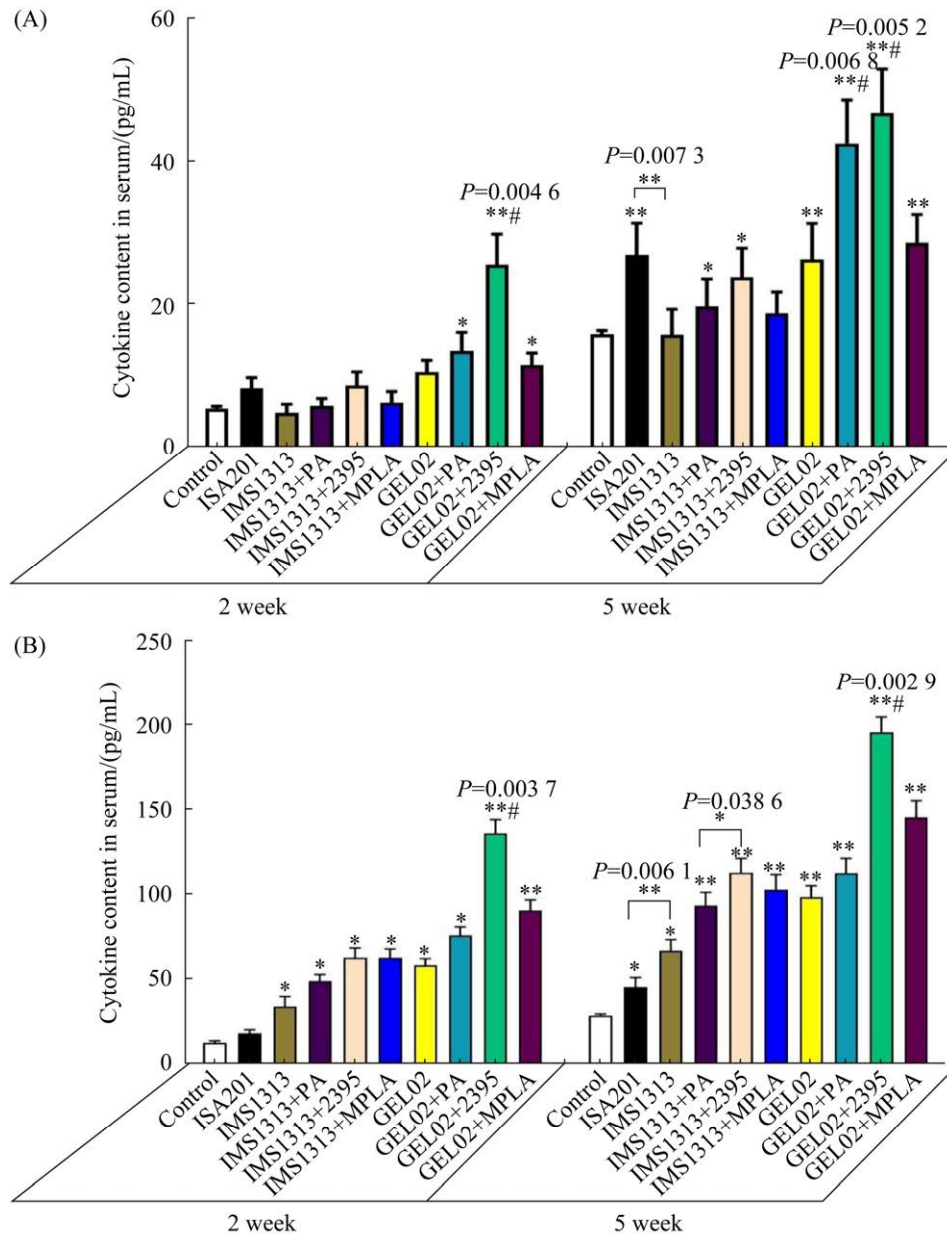


图 4 ELISA 法检测免疫小鼠血清中细胞因子表达水平

Figure 4 Detection of cytokine expression in the sera of the immunized mice by ELISA. Levels of IL-4 (A) and IFN- γ (B) in sera; *: significant compared with control group ($P<0.05$); **: very significant compared with control group ($P<0.01$); #: significant compared with other groups ($P<0.05$).

2.2.3 小鼠淋巴细胞增殖率的检测结果

分别于免疫后 2 w 及 5 w 采集小鼠的脾脏, MTT 法分析不同黏膜佐剂对 PDCoV 灭活疫苗诱导小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响, 结果见图 5。与对照组相比, ISA201 组、IMS1313 组、IMS1313+PA 组、IMS1313+MPLA 组、GEL02 组、GEL02+PA 组及 GEL02+MPLA 组均未见表示淋巴细胞增殖水平的 SI 值呈显著差异, 但是在免疫后 2 w 和 5 w, IMS1313+2395 组的 SI 值相较于对照组差异显著($P<0.05$), 而 GEL02+2395 组的 SI 值与对照组相比差异非常显著($P<0.01$)。

2.3 疫苗安全检验结果

免疫后小鼠的精神及食欲状态, 呕吐及腹泻情况, 注射部位的炎症表现及疫苗残留情况, 死亡情况等见表 1。结果表明, ISA201 疫苗经过皮下注射途径能使接种小鼠产生严重的不良反应; IMS1313 疫苗、IMS1313+PA 疫苗、IMS1313+2395 疫苗、IMS1313+MPLA 疫苗、

GEL02+PA 疫苗、GEL02+MPLA 疫苗均有一定的副反应, 但在可接受的范围内; GEL02 疫苗、GEL02+2395 疫苗导致接种小鼠的副反应最轻微。解剖小鼠无菌采集心脏、肝脏、脾、肺、肾、空肠、回肠等组织脏器, 肉眼观察均未见明显病变, HE 染色后镜检, 实验组和对照组小鼠组织脏器均无明显的病理变化差异, 结果如图 6 所示。

3 讨论与结论

黏膜是许多病原体入侵机体的主要途径, 通过黏膜部位接种疫苗诱导的免疫反应, 可以形成局部甚至全身的黏膜免疫, 从而发挥全面的保护作用^[10-11]。有研究表明, 保护动物免于肠道病毒感染的有效策略之一是筛选合适的黏膜佐剂, 增加疫苗诱导机体肠道黏膜分泌 sIgA 抗体的水平^[8,12]。本研究将不同佐剂与灭活的 PDCoV 抗原混合, 制备 PDCoV 灭活疫

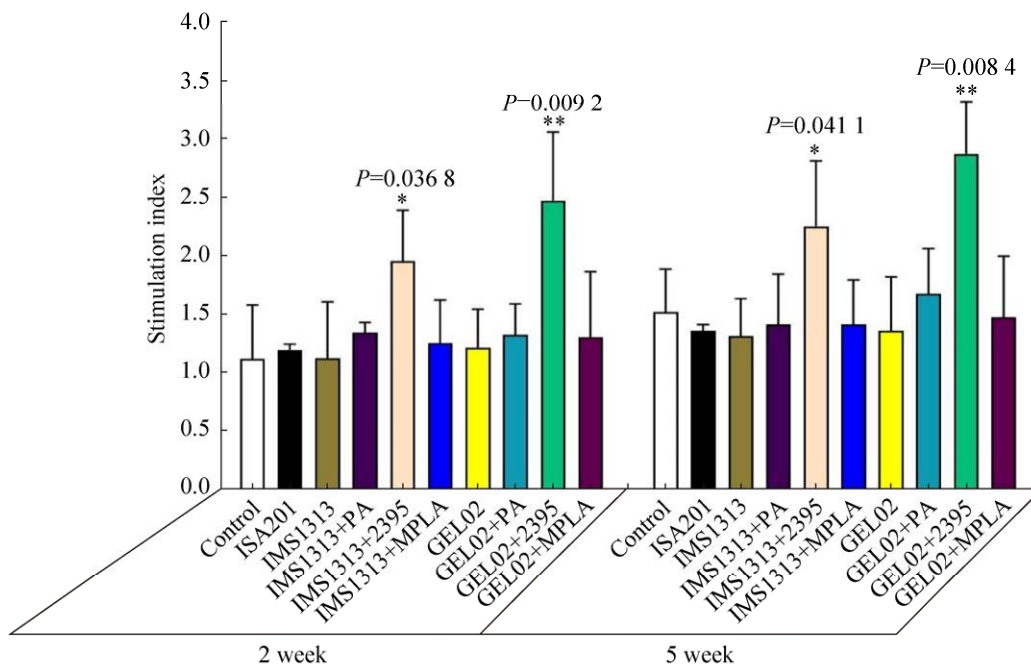


图 5 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖水平

Figure 5 Proliferation level of the splenocytes in the immune mice. *: significant compared with control group ($P<0.05$); **: very significant compared with control group ($P<0.01$).

苗免疫小鼠，探讨不同佐剂对 PDCoV 免疫应答的影响。

IgG 抗体水平是评价疫苗效果的重要指标，但 IgG 亚型的表达水平则与免疫应答类型密切

相关，其中 IgG2a 亚型是依赖 Th1 型细胞免疫应答的特征性标志，而 IgG1 亚型是依赖 Th2 型体液免疫应答的特征性标志^[13]。因此，通过检测 IgG、IgG1、IgG2a 水平的变化，可以间接

表 1 9 种佐剂疫苗的小鼠安全性试验结果

Table 1 Safety assessment of vaccines with 9 different adjuvants on mice

Vaccines types	Numbers	Depression	Anorexia	Diarrhea	Emesis	Unkempt skin hair	Inflammation	Vaccine residue	Deaths	Pathology	Score
ISA201	20	15	15	0	0	12	7	3	0	0	52
IMS1313	20	6	6	0	0	8	0	0	0	0	20
IMS1313+PA	20	10	10	0	0	12	0	0	0	0	32
IMS1313+2395	20	6	6	0	0	10	0	0	0	0	22
IMS1313+MPLA	20	8	8	0	0	10	0	0	0	0	26
GEL02	20	2	2	0	0	6	0	0	0	0	10
GEL02+PA	20	8	8	0	0	10	0	0	0	0	26
GEL02+2395	20	2	2	0	0	6	0	0	0	0	10
GEL02+MPLA	20	6	6	0	0	8	0	0	0	0	20
Control	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

One point for mild, 2 for moderate, 3 for severe or death which was given to each mouse with the symptoms of side effects.

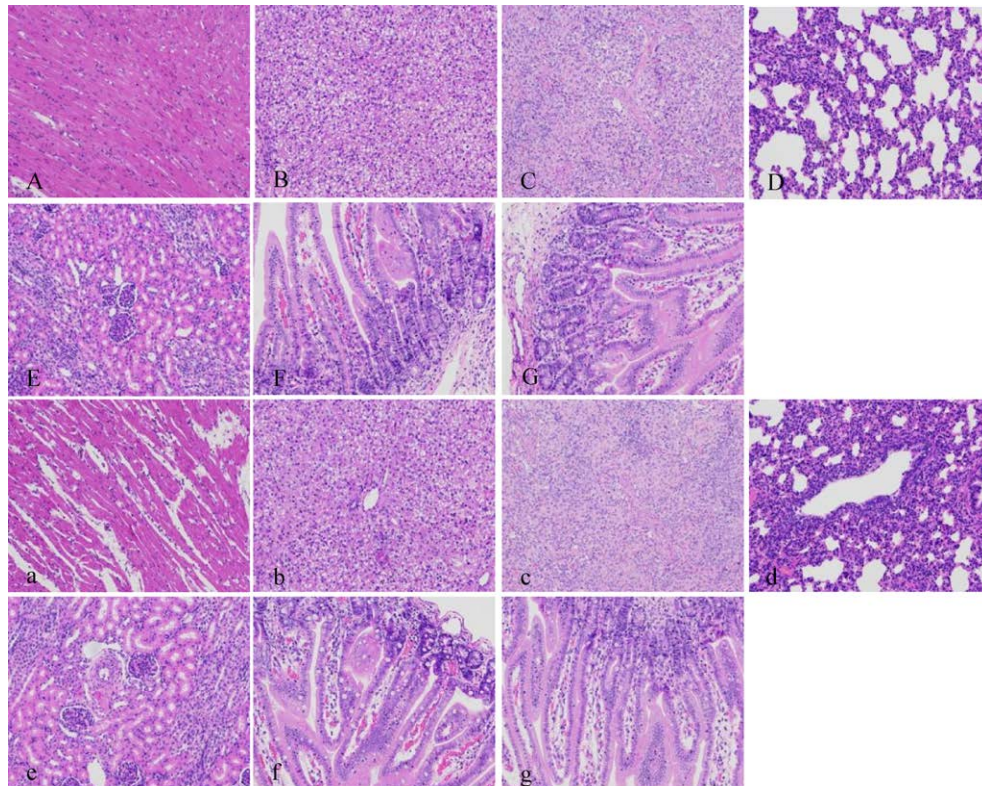


图 6 GEL02+2395 组及对照组小鼠主要组织病理学变化(200×)

Figure 6 The main histopathological changes of GEL02+2395 group and control group. A–G: the heart, liver, spleen, lung, kidney, jejunum and ileum of the mice in the adjuvant-free vaccination group; a–g: the heart, liver, spleen, lung, kidney, jejunum and ileum of the mice in the GEL02+2395 adjuvant vaccine group.

反映体液免疫和细胞免疫应答的变化。张珍珍等^[14]将猪肺炎支原体活疫苗和水性佐剂 GEL01 滴鼻免疫小鼠, BALF 中抗原特异性抗体(IgG、IgG1、IgG2a 和 sIgA)的水平显著高于单独疫苗组。本研究表明,相较于单独灭活的 PDCoV 疫苗,添加 GEL02 与 CpG ODN2395 佐剂的疫苗经滴鼻免疫能显著地提高 IgG、IgG1、IgG2a 抗体水平,表明 GEL02 与 CpG ODN2395 联合应用能诱导小鼠机体产生 Th1 型和 Th2 型免疫反应,促进机体细胞免疫和体液免疫应答。蒋康富等^[15]采用 ISA201、ISA15A、CP940 等佐剂制备脑心肌炎灭活疫苗对 BALB/c 小鼠进行免疫保护试验,结果表明 ISA201 佐剂能够更好地诱导体液免疫应答。本研究表明,添加 ISA201 佐剂的疫苗可以显著升高 IgG、IgG1 抗体水平,但对 IgG2a 抗体的表达无显著影响,这一结果与蒋康富等研究结果相一致。此外, sIgA 在病原体诱导的特异性免疫中起着不可或缺的作用。例如,流感病毒和大肠杆菌的黏膜疫苗可诱发 sIgA^[16-17], CpG ODN 纳米佐剂经鼻黏膜免疫可增强感染 A 型流感疫苗的免疫活性,产生较高的黏膜抗体和细胞免疫应答^[18]。本研究结果显示, BALF 和粪便中的 sIgA 抗体水平最高的为 GEL02+2395 组,其次为 GEL02+PA 组,证实 GEL02 与 CpG ODN2395、PA 联合应用制备的疫苗经鼻腔黏膜免疫可以在局部黏膜甚至远端黏膜表面产生 sIgA,这可能与鼻腔丰富的淋巴组织参与的免疫机制有直接关系,疫苗中的部分抗原被鼻相关淋巴组织上的 M 细胞摄取递送给上皮细胞,经 T、B 淋巴细胞及抗原递呈细胞吞噬,最终引流至颈深淋巴结,经共同黏膜免疫系统诱导远端黏膜部位的免疫应答^[19]。

为进一步探讨不同黏膜佐剂对 PDCoV 灭活疫苗免疫应答的影响,本研究还检测了具有代表特征的 Th1/Th2 细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 表

达水平。结果表明,相较于单独灭活的 PDCoV 疫苗, GEL02 和 MPLA、PA 尤其是 GEL02 和 CpG ODN2395 佐剂联合使用,可明显促进小鼠 BALF 和血清中 IFN- γ 和 IL-4 的表达,具有刺激小鼠机体产生细胞免疫和体液免疫的双重作用。时小光等^[20]利用 CpG 与灭活 PDCoV 混合后免疫 C57BL/6J 小鼠,能明显促进 IFN- γ 的分泌,但对 IL-4 的生成没有明显影响,与本研究结果有差异,可能是由于本研究中将 GEL02 与 CpG ODN2395 佐剂联合应用,二者协同促进了 IL-4 的表达。

T 淋巴细胞增殖水平的检测在评价细胞免疫功能中具有重要意义。叶艳菊等^[21]将细粒棘球绦虫转 Eg95-EgA31 融合基因首蓆疫苗分别经口服和鼻腔黏膜免疫 BALB/c 小鼠,滴鼻免疫组小鼠脾 T 淋巴细胞增殖水平在末次免疫后 4-10 周高于口服免疫组。本研究结果表明,在免疫后 2 w 和 5 w,经鼻腔免疫的 IMS1313+2395 组、GEL02+2395 组能够显著促进 T 淋巴细胞增殖分化,提示小鼠的细胞免疫反应增强。

中和抗体水平是疫苗免疫效果评价的金标准,其中蚀斑减少中和试验、细胞病变中和试验和假病毒中和试验是病毒疫苗评价中最常用的中和抗体检测方法虽然方法学可靠,但均需严格的标准化过程,由于目前 PDCoV 体外中和抗体的检测方法尚缺乏相关的标准品和标准化毒株,无论是在方法学的标准化方面还是阳性判断值建立方面都缺乏充分的研究和论证^[22-23]。因此本研究运用 ELISA 方法检测免疫小鼠 IgG、IgG1、IgG2a、sIgA 以及 IL-4、IFN- γ 等抗体和细胞因子的表达水平,初步评估不同的佐剂对 PDCoV 灭活疫苗免疫小鼠的免疫应答的影响。鉴于中和抗体水平及免疫攻毒保护试验是疫苗评估和质量控制的重要依据,为更加全面地评估 GEL02 与 CpG ODN2395 佐剂联合应用制备

的 PDCoV 灭活疫苗的免疫效果, 仍需进一步研究免疫后中和抗体产生的规律及免疫后机体对病毒侵袭的抵抗力。

参考文献

- [1] He B, Zhang YZ, Xu L, Yang WH, Yang FL, Feng Y, Xia LL, Zhou JH, Zhen WB, Feng Y, Guo HC, Zhang HL, Tu CC. Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China. *Journal of Virology*, 2014, 88(12): 7070–7082.
- [2] Chen Q, Li GW, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KJ, Stevenson GW, Burrough ER, Harmon KM, Main RG, Zhang JQ. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(1): 234–243.
- [3] Wang LY, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227–1230.
- [4] Hu H, Jung K, Vlasova AN, Chepngeno J, Lu ZY, Wang QH, Saif LJ. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1537–1548.
- [5] Zhang HL, Liang QQ, Li BX, Cui XG, Wei XL, Ding QW, Wang YB, Hu H. Prevalence, phylogenetic and evolutionary analysis of porcine deltacoronavirus in Henan Province, China. *Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 166: 8–15.
- [6] Liu SD, Fang PX, Ke WT, Wang J, Wang XL, Xiao SB, Fang LR. Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection antagonizes interferon- λ 1 production. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247: 108785.
- [7] Miquel-Clopés A, Bentley EG, Stewart JP, Carding SR. Mucosal vaccines and technology. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019, 196(2): 205–214.
- [8] Wen ZF, Xu ZC, Zhou QF, Li W, Wu YY, Du YP, Chen L, Zhang Y, Xue CY, Cao YC. Oral administration of coated PEDV-loaded microspheres elicited PEDV-specific immunity in weaned piglets. *Vaccine*, 2018, 36(45): 6803–6809.
- [9] 闫瑞杰, 张云飞, 刘玲玲, 张红垒, 王亚宾, 胡慧. 猪 δ 冠状病毒 N 蛋白的原核表达和间接 ELISA 检测方法的建立. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2019, 47(10): 1–8, 17.
- [10] Yan RJ, Zhang YF, Liu LL, Zhang HL, Wang YB, Hu H. Prokaryotic expression of N protein and establishment of an indirect ELISA for antibody detection of porcine deltacoronavirus. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2019, 47(10): 1–8, 17. (in Chinese)
- [11] Solans L, Loch C. The role of mucosal immunity in pertussis. *Frontiers in Immunology*, 2019, 9: 3068.
- [12] Li M, Wang Y, Sun Y, Cui HY, Zhu SJ, Qiu HJ. Mucosal vaccines: strategies and challenges. *Immunology Letters*, 2020, 217: 116–125.
- [13] Chattha KS, Roth JA, Saif LJ. Strategies for design and application of enteric viral vaccines. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2015, 3: 375–395.
- [14] Yu JF, Song YP, Tian WZ. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 45.
- [15] 张珍珍, 韦艳娜, 王佳, 王海燕, 熊祺琰, 邵国青, 冯志新. GEL 01 佐剂联合猪支原体肺炎活疫苗黏膜接种的效果评估. *中国动物传染病学报*, 2018, 26(6): 73–79.
- [16] Zhang ZZ, Wei YN, Wang J, Wang HY, Xiong QY, Shao GQ, Feng ZX. Gel 01 adjuvant enhances mucosal immunity of live *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2018, 26(6): 73–79. (in Chinese)
- [17] 蒋康富, 白娟, 李玉峰, 王先炜, 姜平. 脑心肌炎病毒灭活疫苗佐剂的筛选及其效力评价. *中国兽医学报*, 2015, 35(2): 242–246.
- [18] Jiang KF, Bai J, Li YF, Wang XW, Jiang P. Screening and effective evaluation of encephalomyocarditis virus inactivated vaccine adjuvant. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(2): 242–246. (in Chinese)
- [19] Suzuki T, Aina A, Hasegawa H. Functional and structural characteristics of secretory IgA antibodies elicited by mucosal vaccines against influenza virus. *Vaccine*, 2017, 35(39): 5297–5302.
- [20] Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, Barry NA, Stefanowski J, Hao LM, Degnan PH, Hu JZ, Peter I, Zhang W, Ruggiero E, Cho JH, Goodman AL, Flavell RA. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*, 2014, 158(5): 1000–1010.
- [21] Tao WQ, Hurst BL, Shakya AK, Uddin MJ, Ingrole RSJ, Hernandez-Sanabria M, Arya RP, Bimler L, Paust

- S, Tarbet EB, Gill HS. Consensus M2e peptide conjugated to gold nanoparticles confers protection against H1N1, H3N2 and H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Research*, 2017, 141: 62–72.
- [19] An XY, Martinez-Paniagua M, Rezvan A, Sefat SR, Fathi M, Singh S, Biswas S, Pourpak M, Yee C, Liu XL, Varadarajan N. Single-dose intranasal vaccination elicits systemic and mucosal immunity against SARS-CoV-2. *iScience*, 2021, 24(9): 103037.
- [20] 时小光, 李秀丽, 张闯年, 黄平升, 张建华, 王伟伟, 鄢明华. 不同佐剂对病毒灭活疫苗免疫效果的影响. *生物医学工程与临床*, 2020, 24(5): 604–610.
Shi XG, Li XL, Zhang CN, Huang PS, Zhang JH, Wang WW, Yan MH. Impacts of different adjuvants on immune responses of inactivated virus vaccine. *Biomedical Engineering and Clinical Medicine*, 2020, 24(5): 604–610. (in Chinese)
- [21] 叶艳菊, 李文桂. 细粒棘球绦虫转 Eg95-EgA31 融合基因苜蓿疫苗免疫 BALB/c 小鼠后脾 T 淋巴细胞增殖的动态观察. *热带医学杂志*, 2009, 9(12): 1360–1362, 1373.
- Ye YJ, Li WG. Kinetic study on the proliferation of splenocytes in mice immunized with transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) containing Eg95-EgA31 fusion gene of *Echinococcus granulosus*. *Journal of Tropical Medicine*, 2009, 9(12): 1360–1362, 1373. (in Chinese)
- [22] 马建, 贺鹏飞, 赵晨燕, 陈瑞峰, 刘强, 王佑春, 黄维金, 杨晓明. SARS 和 MERS 中和抗体假病毒检测方法的建立. *病毒学报*, 2019, 35(2): 189–195.
Ma J, He PF, Zhao CY, Chen RF, Liu Q, Wang YC, Huang WJ, Yang XM. Development of SARS and MERS neutralization methods based on pseudoviruses. *Chinese Journal of Virology*, 2019, 35(2): 189–195. (in Chinese)
- [23] Chen R, Fu JY, Hu JF, Li C, Zhao YJ, Qu H, Wen XT, Cao SJ, Wen YP, Wu R, Zhao Q, Yan QG, Huang Y, Ma XP, Han XF, Huang XB. Identification of the immunodominant neutralizing regions in the spike glycoprotein of porcine deltacoronavirus. *Virus Research*, 2020, 276: 197834.

(本文责编 张晓丽)