

壳聚糖修饰的纳米乳用于鼻腔疫苗递送的研究*

郝欣岩, 张远冬, 侯盈盈, 孙 逊[△]

四川大学华西药学院 靶向药物与释药系统教育部重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 制备壳聚糖修饰的阳离子纳米乳,用于延长疫苗在鼻腔的滞留时间并提高细胞摄取效率,增强鼻腔疫苗免疫效力。方法 制备表面包裹壳聚糖的纳米乳疫苗;表征其粒径、电位和抗原包封率,考察其稳定性和细胞毒性;测定其在不同细胞上的摄取效率和小鼠鼻腔的滞留情况;最后对小鼠进行鼻腔免疫,检测小鼠血清和鼻腔灌洗液中抗体水平。结果 制备的壳聚糖修饰的纳米乳疫苗平均粒径为(167.2±0.75) nm,多分散系数为0.21±0.01,平均电位为(13.7±0.85) mV,对抗原的包封率为92.7%;该纳米乳疫苗稳定性良好,在犬肾上皮细胞上未表现出明显细胞毒性;在树突状细胞和犬肾上皮细胞上均显示了较高的摄取效率,分别为(49.7±3.45)%和(59.7±2.19)%。此外,阳离子纳米乳也显著增加了抗原在小鼠鼻腔的滞留时间,给药后60 min仍有较多纳米乳疫苗滞留于鼻腔;经小鼠鼻腔免疫后,与游离抗原和未经壳聚糖修饰的纳米乳疫苗比较,壳聚糖修饰的纳米乳疫苗诱导了较高的系统及黏膜抗体水平($P<0.01$)。结论 本研究制备的壳聚糖修饰纳米乳能够增强鼻腔疫苗免疫效力,是一个具有较大潜力的鼻腔疫苗递送载体。

【关键词】 纳米乳 鼻腔给药 免疫应答

Applying Chitosan-Modified Nanoemulsion in Nasal Vaccine Delivery HAO Xin-yan, ZHANG Yuan-dong, HOU Ying-ying, SUN Xun[△]. Key Laboratory of Drug-Targeting and Drug Delivery System of the Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: sunxun@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To prepare a chitosan-modified cationic nanoemulsion that could be used to prolong the residence time of nasal vaccines in the nasal cavity and improve the cellular uptake efficiency so as to enhance the immune efficacy of nasal vaccines. **Methods** A nanoemulsion-based vaccine coated with chitosan was prepared, and the particle size, potential, antigen encapsulation efficiency, stability as well as cytotoxicity were examined. The uptake efficiency of vaccine on different cells and the residence time of vaccine in the nasal cavity were measured. Finally, nasal vaccine was administered on mice and the antibody levels in the serum and in the nasal lavage fluids of the immunized mice were examined. **Results** The nanoemulsion-based vaccine had an average particle size of (167.2±0.75) nm, a polydispersity index (PDI) of 0.21±0.01, and an average potential of (13.7±0.85) mV. The encapsulation efficiency of antigen was 92.7%. The nanoemulsion-based vaccine had good stability and did not show obvious cytotoxicity in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells. The vaccine demonstrated relatively high cellular uptake of antigens on DC2.4 and MDCK cells at (49.7±3.45)% and (59.7±2.19)%, respectively. Besides, the cationic nanoemulsion also significantly increased the residence time of the antigen, and a considerable amount of nanoemulsion-based vaccine was found remaining in the nasal cavity 60 minutes after administration. Compared with free antigen and the nanoemulsion without chitosan modification, the chitosan-modified nanoemulsion vaccine induced higher systemic and mucosal antibody levels in mice after nasal immunization ($P<0.01$). **Conclusion** The chitosan-modified nanoemulsion vaccine prepared in the study can enhance the immune efficacy of nasal vaccines, showing great potential to be used as a delivery carrier for nasal vaccines.

【Key words】 Nanoemulsion Nasal administration Immune responses

传染性疾病对人类生命健康造成重大威胁,疫苗是预防传染病最为有效的手段之一^[1]。值得注意的是,大多数病原体会经黏膜部位入侵机体,如新冠病毒、流感病毒等。因此,构建黏膜防御对传染性疾病的预防极为重要。传统疫苗多通过肌肉或皮下注射给药,能诱导强效的系统性免疫应答,但注射用疫苗通常难以在黏膜部位

形成良好的免疫保护,因此经黏膜接种的疫苗开发对于预防感染性疾病意义重大。经黏膜部位接种疫苗可以诱导系统免疫应答,同时还可以在黏膜部位建立有效的免疫保护^[1-2]。其中,在鼻腔接种疫苗是很有前景的给药方式,与注射用疫苗相比,鼻腔疫苗给药方式简单,无针刺疼痛感,患者顺应性更好;更重要的是,鼻黏膜存在特有的鼻相关淋巴组织,包含丰富的抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)和T、B淋巴细胞,疫苗鼻腔免疫后,不仅诱导强效的全身免疫反应,同时还诱导黏膜部位

* 杰出青年基金项目(No. 81925036)和国家自然科学基金重大项目(No. 81690261)资助

[△] 通信作者, E-mail: sunxun@scu.edu.cn

分泌IgA抗体,从而有效地预防和清除病原体,为机体提供全方位的免疫保护。此外,鼻腔部位本身存在大量的共生菌,鼻制剂的生产和质控要求较注射疫苗低,可降低疫苗的生产成本;与口服疫苗相比,鼻腔疫苗可以避免肝脏首过效应和胃肠道pH环境对抗原的降解,从而提高了疫苗的免疫效率^[3-4]。然而,鼻腔疫苗的研发比较缓慢,目前上市或处于临床试验中的产品还比较少,原因在于鼻腔免疫途径存在多个生理屏障。首先,鼻腔上皮细胞形成紧密连接,导致游离的抗原摄取效率极低;其次,鼻腔黏液与纤毛的运动加速抗原的清除而使免疫无效。因此,构建有效的递送载体,保证抗原在鼻腔部位的滞留并提高抗原的摄取对于鼻腔疫苗发挥作用至关重要^[5-6]。

合适的疫苗载体可以有效地递送抗原并增强免疫应答^[7-8]。纳米乳(nanoemulsion, NE)是一种应用广泛的疫苗递送载体^[9],常用于皮下/肌肉注射,可在注射部位有效地募集淋巴细胞,显著提高机体的抗体水平^[10]。但传统的纳米乳通常为电负性,且本身不具备黏膜黏附性,在鼻腔免疫中不能有效地发挥免疫诱导作用。因此本研究在纳米乳表面包裹正电性的壳聚糖(chitosan, CS),制备了新型的阳离子纳米乳疫苗递送载体,CS具有较好的生物黏附性,可以延长制剂在鼻腔的滞留时间,进而提高上皮细胞和APCs对抗原的摄取^[11-12]。本研究以鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)为模型抗原,最终通过鼻腔免疫,验证该阳离子纳米乳疫苗递送系统诱导抗原特异性的系统和黏膜免疫应答的能力。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

Balb/c小鼠(四川大学实验动物中心);小鼠树突状细胞株DC 2.4(第三军医大学惠赠);犬肾上皮细胞MDCK(中科院上海细胞库);角鲨烯(梯希爱化成工业有限公司);吐温80(成都科隆化学品有限公司);司盘85(成都科隆化学品有限公司);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG 2000,艾伟拓医药科技有公司);十八水合硫酸铝(成都科隆化学品有限公司);羟乙基哌嗪乙磺磺酸(HEPES,百灵威科技有限公司);OVA(Sigma公司);CS(阿拉丁生化科技股份有限公司);Cy5-N-羟基琥珀酰亚胺酯(Cy5-NHS, Sigma公司);Cy5-OVA(自制);异硫氰酸荧光素(FITC, Sigma公司);FITC-OVA(自制);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, Sigma公司);山羊抗小鼠IgG-HRP、IgG1-HRP、IgG2a-HRP(Abcam公司);TMB显色底物(湖州英创生物科技有限公司);其余化学试剂均为国产分析纯及以上级别。动

物实验符合我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892-2018)》要求,规范落实实验动物福利伦理。

1.2 包载抗原的纳米乳(NE-OVA)的制备

称取500 mg角鲨烯和200 mg司盘85混合均匀为油相,再称取200 mg吐温80溶解于10 mL注射用水,涡旋下加入油相中,得到初乳。将初乳进行高压均质(100 000 kPa; 5 min),定容至40 mL。称取5 mg DSPE-PEG 2000溶解于1 mL制得乳剂中,加入62.5 μ L十二水合硫酸铝溶液(125 mg/mL),再加入HEPES缓冲液(pH8.0)调至中性,即得NE。取NE与OVA混匀(OVA质量浓度为0.25 mg/mL),于37 $^{\circ}$ C摇床中孵育30 min即得NE-OVA。

制备荧光标记的纳米乳:分别制备FITC标记的OVA和Cy5标记的OVA,将上述制备方法中的OVA替换为FITC-OVA或Cy5-OVA,即制备得到载有FITC-OVA的纳米乳(F-NE-OVA)和载有Cy5-OVA的纳米乳(C-NE-OVA)。

1.3 CS修饰的NE-OVA的制备

称取适量CS溶解于0.3%冰醋酸中,制成质量浓度为3 mg/mL的CS储备液。向1 mL制备好的NE中加入0.60 mL HEPES缓冲液(pH8.0),涡旋下滴加0.87 mL质量浓度为1 mg/mL的OVA溶液,于37 $^{\circ}$ C摇床中孵育30 min。涡旋条件下加入1 mL CS溶液,即得制剂(CS-NE-OVA)。制剂中CS的质量浓度为0.86 mg/mL, OVA质量浓度为0.25 mg/mL。

制备荧光标记的CS修饰的纳米乳:将上述制备方法中的OVA替换为FITC-OVA或Cy5-OVA,即可制备得到载有FITC-OVA的CS修饰纳米乳(F-CS-NE-OVA)和载有Cy5-OVA的CS修饰纳米乳(C-CS-NE-OVA)。

1.4 粒径、电位测定及形态学考察

取20 μ L制好的NE-OVA和CS-NE-OVA稀释至1 mL,用激光粒度仪对其粒径和电位进行检测,平行测定3次。将稀释后的NE-OVA和CS-NE-OVA滴于铜网上,用滤纸吸走多余液体,再用1%磷钨酸溶液进行负染,待液体干后置于电镜下观察其形态。

1.5 纳米乳稳定性的考察

将CS-NE-OVA置于4 $^{\circ}$ C下保存15 d,于不同时间点取样,检测粒径和分散系数(PDI),考察其稳定性。

1.6 包封率的测定

取游离Cy5-OVA溶液加入100 kDa超滤内管中,3 500 r/min离心15 min,取滤过液检测荧光强度,计算OVA的透过率。分别制备C-NE-OVA和C-CS-NE-OVA,置于超滤管中3 500 r/min离心15 min,取滤过液检测荧光强度。建立Cy5-OVA含量测定方法,计算其包封率。包封率=[1-滤液中OVA量/(OVA总量 \times 透过率)] \times 100%。

1.7 NE-OVA和CS-NE-OVA的摄取效率

本研究考察了NE-OVA和CS-NE-OVA在树突状细胞系DC2.4(dendritic cell line, DC2.4)和犬肾上皮细胞(Madin-Darby canine kidney, MDCK)上的摄取效率。其中, DC2.4是一种典型的APCs, MDCK细胞则通常被用作模拟鼻腔上皮细胞^[13]。分别制备F-NE-OVA和F-CS-NE-OVA, 将DC2.4和MDCK分别以 1×10^5 /孔接种于24孔板中, 待细胞贴壁生长至80%左右进行实验。分为OVA组、NE-OVA组和CS-NE-OVA组, 每孔FITC-OVA的量为10 μg 。在DC2.4和MDCK细胞上分别摄取1.5 h和2 h, 之后收集细胞进行流式检测, 评价NE-OVA和CS-NE-OVA在不同细胞上的摄取效率。

1.8 MTT法检测细胞毒性

采用MTT法^[14]考察CS-NE-OVA在MDCK细胞上的毒性。将MDCK细胞以 1×10^4 /孔接种于96孔板中, 部分孔不加细胞作为空白组。向各组加入含不同质量浓度CS的CS-NE-OVA溶液作为实验组, 每组设置5个复孔, 对照组则加入相同量的培养基, 继续培养24 h后, 弃去培养基, 向每孔加入200 μL MTT(0.5 mg/mL)溶液, 继续孵育4 h, 吸出孔中溶液后再加入150 μL 二甲基亚砜, 轻微振荡10 min, 充分显色后检测在570 nm处的吸光值, 计算细胞存活率。

细胞存活率=(实验组吸光值-空白组吸光值)/(对照组吸光值-空白组吸光值) $\times 100\%$ 。

1.9 鼻腔滞留时间考察

分别制备C-NE-OVA和C-CS-NE-OVA。取6~8周龄Balb/c雌性小鼠, 随机分为3组: OVA组、NE-OVA组和CS-NE-OVA组, 每组小鼠3只。将小鼠麻醉后, 避光条件下对小鼠进行鼻腔给药, 每只小鼠给予5 μg Cy5-OVA, 给药体积为20 μL 。利用活体成像仪在给药后15 min、30 min、45 min和60 min对小鼠进行活体成像, 观察小鼠鼻腔部位荧光滞留情况。

1.10 小鼠免疫后抗体水平的检测

取6~8周龄Balb/c雌性小鼠, 随机分为4组: 空白组、OVA组、NE-OVA组、CS-NE-OVA组, 每组小鼠4只。按对应分组对小鼠进行鼻腔免疫, 每只小鼠5 μg OVA, 给药体积为20 μL , 空白组则给予相同体积的PBS溶液。第一次给药时记为第0天, 于第14天、第28天对小鼠进行加强免疫, 于第38天收集血清和鼻腔灌洗液, 通过ELISA法^[15]检测其血清中IgG、IgG1、IgG2a抗体水平及鼻腔灌洗液中IgA抗体水平。

1.11 统计学方法

实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用one-way ANOVA

进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 粒径、电位的测定及形态学考察

NE-OVA的平均粒径为(130.4 \pm 1.93) nm, 电位为(-20.1 \pm 2.50) mV, PDI为0.16 \pm 0.03; CS-NE-OVA的平均粒径为(167.2 \pm 0.75) nm, 平均电位为(13.7 \pm 0.85) mV, PDI为0.21 \pm 0.01。PDI均小于0.3, 显示出较好的分散性。通过透射电镜观察NE的形态(图1), NE-OVA和CS-NE-OVA均显示为较均一的类球形形态。由于激光粒度仪测定的是粒子水合粒径, NE在水分散介质中表面存在水化层, 故测得粒径大于透射电镜下观察的粒径。

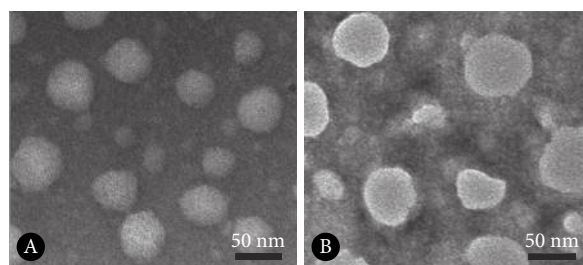


图1 NE-OVA (A) 和CS-NE-OVA (B) 的透射电镜图
Fig 1 Transmission electron microscope (TEM) images of nanoemulsion (NE)-ovalbumin (OVA) (A) and chitosan (CS)-NE-OVA (B)

2.2 稳定性考察结果

结果见图2。在考察时间范围内, CS-NE-OVA的粒径和PDI均未发生明显变化, 显示了较好的稳定性。

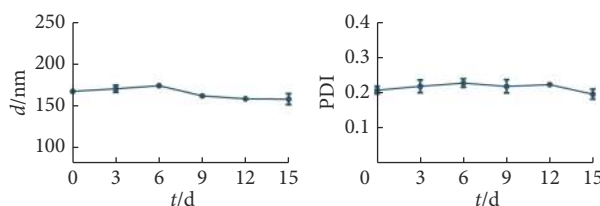


图2 CS-NE-OVA在4 °C放置15 d的稳定性 (n=3)
Fig 2 Stability of CS-NE-OVA at 4 °C for 15 d (n=3)

2.3 包封率测定结果

测定OVA含量后, 根据包封率计算公式计算得出NE-OVA和CS-NE-OVA中抗原包封率分别为(92.5 \pm 0.001)%和(92.7 \pm 0.025)%, 可见制剂对OVA有较高的包封率。

2.4 NE-OVA和CS-NE-OVA的细胞摄取效率

结果见图3。NE-OVA和CS-NE-OVA在DC2.4上的摄取效率分别为(52.4 \pm 4.59)%和(49.7 \pm 3.45)%, 均高于OVA组的摄取效率($P < 0.0001$), 表明该制剂能够促进APCs对抗原的摄取, 具有进一步诱导免疫应答的潜力。NE-OVA在MDCK上摄取效率较低, 仅为(8.9 \pm 0.40)%, 而CS的包裹则极大提高了MDCK对NE的摄取, 阳性率为

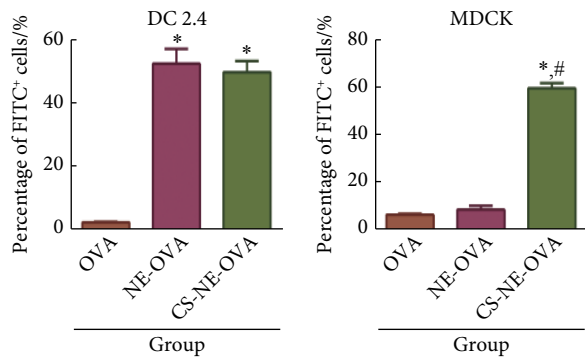


图 3 NE在DC2.4和MDCK上的摄取效率 (n=3)

Fig 3 The uptake efficiency of nanoemulsions on DC2.4 and MDCK (n=3)

*P<0.0001, vs. OVA group; # P<0.0001, vs. NE-OVA group.

(59.7±2.19)%, 高于其他两组 (P<0.0001), 这显示出CS-NE-OVA可以同时提高在APCs和上皮细胞上的摄取, 提高疫苗的递送效率, 有利于后续免疫应答的发生。

2.5 细胞毒性检测结果

结果见图4。不同质量浓度的CS-NE-OVA在MDCK上均未显示明显毒性, 表明该制剂在细胞上的安全性较好。

2.6 CS-NE-OVA在鼻腔的滞留时间

结果见图5。在15~60 min内, CS-NE-OVA组鼻腔部位的荧光明显强于OVA组和NE-OVA组, OVA组和NE-OVA组在给药后15 min时, 荧光强度显著降低, 表明其在鼻腔中被快速清除, 而CS-NE-OVA组在60 min时, 仍然保留较强的荧光强度, 表明仍有较多CS-NE-OVA滞留于鼻腔部位, 显示了较好的滞留效果。

2.7 小鼠免疫后的抗体水平

小鼠血清和鼻腔灌洗液中抗体水平见图6。NE-OVA未能诱导抗体水平的提高, 而CS-NE-OVA组小鼠血清中IgG、IgG1和IgG2a抗体水平高于OVA组和NE-OVA免

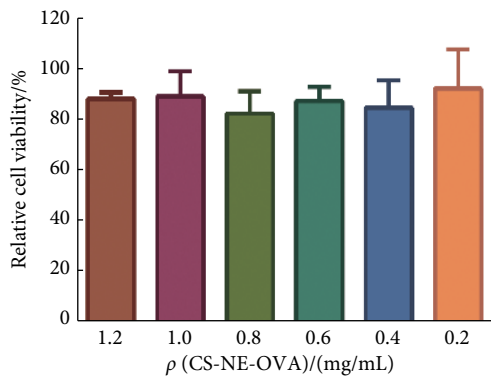


图 4 MTT法检测CS-NE-OVA在MDCK细胞上的毒性 (n=5)

Fig 4 Cytotoxicity of CS-NE-OVA on MDCK detected by MTT assay (n=5)

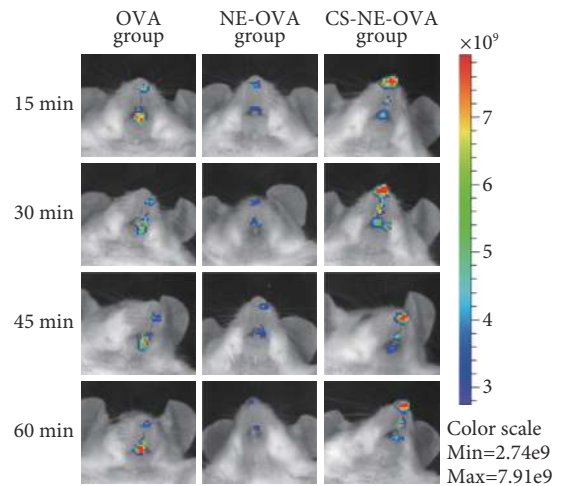


图 5 CS-NE-OVA在鼻腔滞留情况

Fig 5 Nasal residence time of CS-NE-OVA

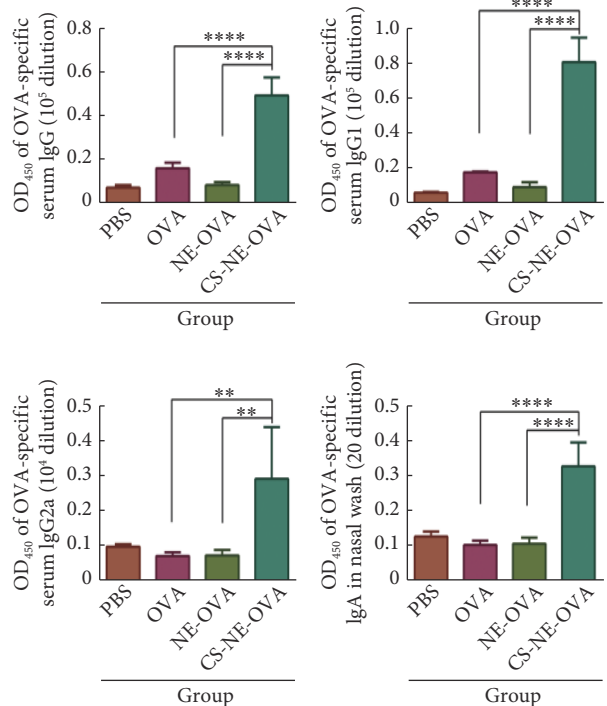


图 6 ELISA法检测血清中IgG、IgG1、IgG2a和鼻腔灌洗液中IgA的抗体水平 (n=4)

Fig 6 The levels of antibody were measured by ELISA assay: IgG, IgG1, IgG2a in serum and IgA in nasal wash (n=4)

P<0.01, **P<0.0001.

疫小鼠 (P<0.01), 显示出制剂可以诱导较高水平的系统免疫应答; 同时, 鼻腔灌洗液中IgA水平也高于OVA组和NE-OVA组, 差异有统计学意义 (P<0.0001), 说明CS-NE-OVA也可以诱导鼻腔黏膜的免疫应答。

3 讨论

鼻腔疫苗可在黏膜部位诱导免疫应答, 是抵御呼吸

道感染性疾病的有效策略^[8]。本研究通过构建一种新型的阳离子纳米乳递送系统,用于提高疫苗在鼻腔黏膜的滞留时间和摄取效率,进而诱导系统和黏膜免疫应答。由于鼻腔黏膜表面带负电荷,而通常制备的纳米乳表面也呈电负性,两者相互作用弱,不利于其滞留鼻腔并进一步发挥免疫效应^[16-17]。因此我们通过静电吸附作用在其外层包裹了生物黏附性材料CS,使纳米乳表面带正电荷,这种正电性和CS本身的黏附性增强了制剂与黏膜的作用,这有助于延长载体在鼻腔中的滞留时间,促进抗原更多地被鼻腔上皮细胞和APCs摄取,并向鼻腔相关淋巴组织转运。滞留时间考察结果显示,OVA和NE-OVA在小鼠鼻腔中短时间内就会被清除,而CS修饰后的CS-NE-OVA在给药60 min后仍显示较强荧光,这验证了CS修饰能够提高制剂在鼻腔的滞留性,这为抗原的摄取以及免疫应答的激发提供了保证。

此外,本研究检测了阳离子纳米乳疫苗鼻腔免疫小鼠血清中IgG型抗体(IgG、IgG1和IgG2a)水平,以及鼻腔灌洗液中IgA的水平。实验结果表明CS-NE-OVA诱导了较高水平的IgG、IgG1、IgG2a以及IgA抗体应答,体现了其提供系统性和黏膜免疫保护的能力。IgG1和IgG2a是IgG抗体的两种亚型,可反映不同类型的辅助性T细胞(Th)的分化情况,其中IgG1的产生与Th2型免疫应答的激活有关,IgG2a则与Th1型免疫应答相关^[18-19]。传统的纳米乳通过皮下/肌肉注射后可以诱导较高水平的IgG1抗体,其偏向于Th2型免疫应答,Th1型免疫反应则相对较弱,而疫苗效力的发挥同时依赖于Th1型和Th2型免疫响应,因此,本研究利用CS修饰纳米乳,以期提高疫苗Th1型免疫应答。CS带正电荷,其不仅具有生物黏附性,同时也是较好的疫苗佐剂^[20-21],以往研究发现,其可诱导I型干扰素依赖的树突状细胞的激活,促进Th1型免疫的产生^[11]。本研究结果显示,NE-OVA未能诱导有效的抗体水平,表明了带负电的纳米乳本身可能不适用于鼻腔免疫;而将CS包裹于纳米乳表面后,乳剂表面电荷翻转为正电性,CS-NE-OVA在提高IgG1抗体的同时也显著提高了IgG2a抗体水平,显示了CS增强Th1型免疫应答的能力,表明CS在提高疫苗递送效率的同时,也作为佐剂增强机体的免疫应答。

总之,本研究制备了一种纳米乳载体用于鼻腔疫苗递送,其对抗原具有较高的包封效率,稳定性较好,且制备中未使用有机溶剂,对鼻腔的毒性和刺激性均较小,具有较好的安全性。CS的包裹增强了制剂的生物黏附性和正电性,延长了其在鼻腔的滞留,并显著提高了APCs和鼻

腔上皮细胞的摄取。该纳米乳经过鼻腔免疫后可显著提高血清和黏膜抗体水平,有望成为一种高效递送抗原的鼻腔疫苗载体。该制剂制备方法简单易行,在制备过程中应将每次高压均质的压力和时间保持一致,进而保证该纳米乳制剂的重复性。在后续的研究中可以通过建立疾病模型进一步考察该纳米乳疫苗的保护作用,为黏膜疫苗的开发提供依据。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] LI M, WANG Y, SUN Y, *et al.* Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunol Lett*, 2020, 217: 116-125.
- [2] 王冰, 刘宏锐, 陈芳, 等. 口腔黏膜给药系统的药物动力学研究进展. *药科学报*, 2020, 55(2): 226-234.
- [3] LOBAINA MATO Y. Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. *Int J Pharm*, 2019, 572: 118813 [2021-03-15]. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118813>.
- [4] BOYAKA P N. Inducing mucosal IgA: A challenge for vaccine adjuvants and delivery systems. *J Immunol*, 2017, 199(1): 9-16.
- [5] 欧歌, 马金秋, 朱林, 等. 三磷酸腺苷脂质体鼻用凝胶制备及其抗缺氧作用. *药科学报*, 2020, 55(6): 1288-1295.
- [6] JIN Z, GAO S, CUI X, *et al.* Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *Int J Pharm*, 2019, 572: 118731[2021-03-15]. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118731>.
- [7] 范雪莲, 徐月桦, 陈刚. 氟化超支化聚酰胺-胺作为流感DNA疫苗递送载体的研究. *药科学报*, 2020, 55(6): 1282-1287.
- [8] BERNOCCHI B, CARPENTIER R, BETBEDER D. Nasal nanovaccines. *Int J Pharm*, 2017, 530(1/2): 128-138.
- [9] BRITO L A, CHAN M, SHAW C A, *et al.* A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Mol Ther*, 2014, 22(12): 2118-2129.
- [10] KO E J, KANG S M. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 2018, 14(12): 3041-3045.
- [11] SHIM S, YOO H S. The application of mucoadhesive chitosan nanoparticles in nasal drug delivery. *Mar Drugs*, 2020, 18(12): 605.
- [12] BRUINSMANN F A, PIGANA S, AGUIRRE T, *et al.* Chitosan-coated nanoparticles: Effect of chitosan molecular weight on nasal transmucosal delivery. *Pharmaceutics*, 2019, 11(2): 86.
- [13] CHRISTENSEN D, BOLLEHUUS HANSEN L, LÉBOUX R, *et al.* A liposome-based adjuvant containing two delivery systems with the ability to induce mucosal immunoglobulin A following a parenteral immunization. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 1116-1126.
- [14] LI J, DIAZ-AREVALO D, CHEN Y, *et al.* Intranasal vaccination with an engineered influenza virus expressing the receptor binding subdomain of botulinum neurotoxin provides protective immunity against botulism and

- influenza. *Front Immunol*, 2015, 6: 170[2021-03-15]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00170>.
- [15] KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL P D. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 2018(6): 469–471.
- [16] LI M, ZHAO M, FU Y, *et al*. Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. *J Control Release*, 2016, 228: 9–19.
- [17] DI COLA E, CANTU L, BROCCA P, *et al*. Novel O/W nanoemulsions for nasal administration: Structural hints in the selection of performing vehicles with enhanced mucopenetration. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 183: 110439[2021-03-15]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110439>.
- [18] JIANG Y, LI M, ZHANG Z, *et al*. Enhancement of nasal HIV vaccination with adenoviral vector-based nanocomplexes using mucoadhesive and DC-targeting adjuvants. *Pharm Res*, 2014, 31(10): 2748–2761.
- [19] LI M, LI Y, PENG K, *et al*. Engineering intranasal mRNA vaccines to enhance lymph node trafficking and immune responses. *Acta Biomater*, 2017, 64: 237–248.
- [20] MORAN H B T, TURLEY J L, ANDERSSON M, *et al*. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials*, 2018, 184: 1–9.
- [21] LI D, FU D, KANG H, *et al*. Advances and potential applications of chitosan nanoparticles as a delivery carrier for the mucosal immunity of vaccine. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14(1): 27–35.

(2021 – 03 – 15收稿, 2021 – 06 – 04修回)

编辑 余琳