

杨云涵, 邓锴, 涂志文, 等. 壳聚糖-苯二酚修饰灭活 PEDV 的口服免疫效果评价[J]. 华中农业大学学报, 2025, 44(1): 217-224.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.024

壳聚糖-苯二酚修饰灭活 PEDV 的口服免疫效果评价

杨云涵, 邓锴, 涂志文, 赵兴洪, 万红平

四川农业大学动物医学院, 成都 611130

摘要 为评估壳聚糖-苯二酚(chitosan-catechol, Chic)修饰的灭活猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)疫苗的口服免疫效果, 通过控制 Chic 的量制备出由不同质量浓度 Chic(0.2、0.4 mg/mL)包裹的灭活 PEDV(0.5 mg/mL), 命名为 C1+P 和 C2+P, 建立小鼠模型进行免疫试验。采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测小鼠黏膜 sIgA 和血清 IgG、IgG1、IgG2a 抗体水平, 并通过流式细胞术和 CCK-8 试验检测脾细胞的分型和增殖活化情况。结果显示, 经 2 次口服免疫后, C2+P 组诱导的免疫效果与昂贵的霍乱毒素 B 亚单位(CTB)佐剂组效果相当; 与未经 Chic 修饰的 PEDV 组相比, C1+P、C2+P 组诱导的鼻黏膜、肺泡、小肠黏膜特异性 sIgA 的抗体效价分别提高了 6.09、6.37 倍, 5.35、5.65 倍和 5.64、5.89 倍, 血清特异性 IgG、IgG1、IgG2a 分别提高了 8.83、9.65 倍, 13.54、15.07 倍和 4.27、5.07 倍; CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞比例分别提升了 1.15、1.17 倍和 1.11、1.11 倍; 脾细胞的增殖活化情况也显著增加($P < 0.05$)。结果表明, 口服免疫 C1+P 和 C2+P 成功诱导了小鼠体内黏膜免疫和系统性免疫应答效应, 显示出 Chic 作为黏膜免疫佐剂的潜力, 表明 Chic 修饰的灭活 PEDV 疫苗在有效诱导免疫应答方面具有可行性。

关键词 猪流行性腹泻病毒; 灭活疫苗; 黏膜免疫; 口服免疫; 佐剂; 壳聚糖-苯二酚

中图分类号 S852.659.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)01-0217-08

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的一种高传染性、高致死率的急性肠道传染病^[1-2]。该病可感染所有年龄段的猪, 尤其新生哺乳仔猪最易感, 发病率和死亡率高达 90%, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失^[3]。PEDV 主要通过粪-口^[4]、呼吸道^[3]和生殖道^[5]等黏膜途径传播, 故开发安全、有效的黏膜免疫被认为是实现 PEDV 有效防控的重要策略。然而, 途经黏膜递送的疫苗或抗原容易被黏膜中的黏液-纤毛屏障清除, 导致黏膜免疫的效率降低^[6]。

壳聚糖具有很良好的黏膜黏附性和佐剂活性, 但低水溶性限制了其生物学应用。参考贻贝黏附蛋白的强黏附力的相关研究^[7-8], Deng 等^[9]将黏附能力强的邻苯二酚基团^[10]通过酰胺反应引入壳聚糖形成壳聚糖-苯二酚(chitosan-catechol, Chic)复合物, 并利用 Chic 修饰了灭活的 PEDV, 滴鼻小鼠成功诱导了黏膜免疫反应。但 PEDV 主要通过粪-口途径传

播^[4], 是否能通过口服免疫的方式来引起机体在消化道产生免疫应答反应的研究较少。因此, 本研究将不同浓度 Chic 修饰的灭活 PEDV 纳米粒对小鼠进行口服免疫, 并对其血清 IgG、IgG1、IgG2a 抗体、黏膜 sIgA 抗体、脾脏淋巴细胞亚型、脾细胞特异性增殖活化情况进行检测和分析, 旨在对 Chic 修饰的灭活 PEDV 口服免疫效果做一综合评价, 扩宽黏膜黏着剂和免疫佐剂 Chic 在黏膜免疫中的应用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PBS 缓冲液、牛血清白蛋白(BSA)、红细胞裂解液、磷钨酸负染液、吐温-20(Tween-20)均购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自白鲨生物科技有限公司; RPMI-1640 培养基、胎牛血清、100×青-链霉素抗生素、0.25% 胰酶购自 GIBCO(Grand Island Biological Company)公司; 霍乱毒素 B 亚单位(CTB)购自爱必信(上海)生

收稿日期: 2024-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(2122999007); 中央引导地方科技发展专项(2212129410)

杨云涵, E-mail: yhyang123000@163.com;

通信作者: 万红平, E-mail: hpwan@sicau.edu.cn

物科技有限公司;用于流式细胞术的抗体包括:PE-仓鼠抗小鼠CD3抗体、FITC-大鼠抗小鼠CD4抗体、FITC-大鼠抗小鼠CD8抗体、FITC-大鼠抗小鼠CD69抗体,用于ELISA检测的抗体包括:HRP-山羊抗小鼠IgG抗体、HRP-山羊抗小鼠IgG1抗体、HRP-山羊抗小鼠IgG2a抗体、HRP-山羊抗小鼠IgA抗体,均购自武汉三鹰生物技术有限公司;无水乙醇、碳酸钠(Na_2CO_3)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、浓硫酸(H_2SO_4)等化学试剂均购自成都市科隆化学品有限公司。

非洲绿猴肾细胞(Vero)、PEDV ZJ-08毒株由动物疫病与人类健康四川省重点实验室中的动物传染病控制课题组保存;SPF级6~8周龄Balb/c雌性小鼠购自成都达硕生物科技有限公司,本研究所有涉及动物的实验操作均经过四川农业大学动物伦理委员会的审查和批准,所有相关试验动物的所有程序严格按照“四川农业大学动物伦理委员会实验动物护理指南”(SYXK 2019-187,中国成都)实施。

1.2 PEDV 的纯化及 C1+P 和 C2+P 的合成及表征

将PEDV ZJ-08毒株以0.01 MOI感染Vero细胞并扩增,待细胞病变达到90%时,收集病毒并使用Reed-Muench法^[11]检测其TCID₅₀。病毒通过超滤浓缩收集(截留分子质量100 ku),并使用超速离心机(MTX 150 Thermo Scientific, USA)通过蔗糖梯度密度离心法(20%、40%、60%)在4℃以300 000 r/min的离心力离心2 h^[12]。收集位于40%(1.168 mol/L)与60%(1.75 mol/L)浓度蔗糖溶液之间的白色条带,并使用无菌PBS透析以去除蔗糖及小分子蛋白。使用BCA蛋白定量试剂盒测量纯化病毒体的蛋白浓度,并用PBS调节至0.5 mg/mL,随后在56℃下热灭活病毒0.5 h^[3]。

Chic参照Wan等^[13]的方法合成。在蛋白0.5 mg/mL的灭活PEDV中分别加入等体积0.2、0.4 mg/mL的Chic,以600 r/min的转速搅拌反应12 h后,使用无菌PBS进行透析,并将其分别命名为C1+P、C2+P。将PEDV、C1+P和C2+P溶液滴于铜网上,滴加磷钨酸负染液染色后置于透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, JEOL, JEM-2100Plus, Japan)下观察并采集图像。利用激光粒度仪(Malvern nano s90, Malvern, UK)检测PEDV、C1+P和C2+P的动态光散射粒径(dynamic light scattering, DLS)和电位(zeta potentials)。

1.3 免疫程序及样品采集

选取30只6~8周龄雌性SPF级Balb/c小鼠,随机分为5组($n=6$),即PBS(空白对照)组、PEDV组、C1+P组、C2+P组以及添加黏膜免疫佐剂CTB的CTB+P组(CTB与PEDV质量比为1:3)。在第1天对小鼠进行首次免疫,在第15天对小鼠进行加强免疫,免疫组各组每只每次灌胃200 μL 蛋白含量为100 μg 的PEDV溶液,对照组小鼠灌胃相同体积的PBS溶液,整个免疫周期为28 d。

免疫周期结束后,采集各组小鼠血液收集血清、鼻腔灌洗液、肺泡灌洗液和小肠灌洗液并储存于-80℃冰箱中。随后将小鼠于75%乙醇中浸泡8 min消毒后采集脾脏,并利用孔径0.074 mm细胞筛网研磨后以1 000 r/min的转速离心收集脾细胞,加入红细胞裂解液,37℃孵育5 min,1 000 r/min的转速离心,收集细胞沉淀并重悬于RPMI-1640培养基并用细胞计数板进行计数。

1.4 黏膜灌洗液特异性 IgA 抗体水平检测

采用间接ELISA的方法检测小鼠黏膜特异性IgA抗体效价。先用碳酸氢盐缓冲液将灭活PEDV稀释至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板并于4℃包被12 h;弃去包被液后,洗涤缓冲液(PBST)洗涤酶标板并拍干;再加入3% BSA溶液37℃封闭1 h;PBST洗涤酶标板后,加入稀释一定倍数的鼻腔灌洗液、肺泡灌洗液和小肠灌洗液,37℃恒温孵育1 h;弃去样品稀释液,PBST洗涤并拍干,加入稀释比例为1:1 000的辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠IgA作为二抗,37℃恒温孵育1 h;弃去二抗,PBST洗涤酶标板并拍干;随后加入TMB显色液,37℃恒温避光孵育15 min;最后加入2 mol/L H₂SO₄溶液终止显色,在波长450 nm处测量吸光度(OD)值。判读标准为以样品OD值大于阴性OD值的2倍为有效抗体效价,最高的稀释倍数即为该样品中最终的抗体效价。每个样本均进行5次独立重复检测。

1.5 血清特异性抗体水平检测

采用间接ELISA方法对小鼠血清特异性IgG、IgG1和IgG2a进行抗体效价检测。将稀释一定比例的HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:20 000)、IgG1(1:10 000)和IgG2a(1:10 000)作为二抗,其余步骤同本文“1.4”。每个样本均进行5次独立重复检测。

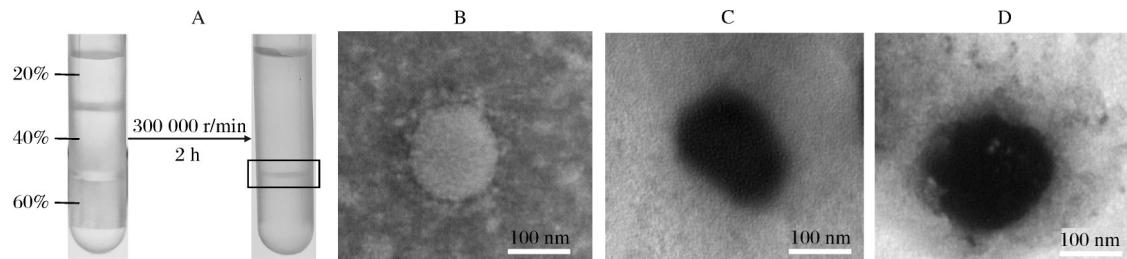
1.6 脾脏淋巴细胞亚型检测

将本文“1.3”中采集到的脾细胞调整到细胞浓度

为 10^6 个/mL,离心后重悬于PBS溶液中,分别加入CD3、CD4和CD8流式抗体并在4℃下避光孵育30 min,孵育结束后,离心收集细胞,用PBS缓冲液洗去抗体后重悬,再使用流式细胞仪检测脾脏T淋巴细胞分型情况。CD3⁺T细胞标记为CD3⁺,辅助性T细胞(T helper cell, Th)标记为CD3⁺CD4⁺,细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL)标记为CD3⁺CD8⁺。每个样本均进行5次独立重复检测。

1.7 脾细胞增殖与活化情况检测

将本文“1.3”中采集到的脾细胞以 10^5 个/孔细胞接种于96孔细胞板,每孔加入PEDV灭活病毒刺激,在细胞培养箱内培养72 h后,分别加入10 μL/孔的CCK-8试剂并在培养箱内避光孵育2 h后用酶标仪检测OD_{450 nm}值,每个样本均进行5次独立重复检测。将脾细胞以 10^6 个/孔细胞接种在24孔细胞板中,每孔用PEDV灭活病毒刺激72 h后,收集细胞并于PBS重悬后,加入流式抗体CD69避光孵育30 min。孵育结束后,用PBS洗去抗体并重悬,用流式细胞仪进行检测,每个样本均进行5次独立重复检测。



A:蔗糖密度梯度离心分离纯化PEDV;B:PEDV透射电镜图;C:C1+P透射电镜图;D:C2+P透射电镜图。A. Purification of PEDV by sucrose density gradient centrifugation; B: TEM image of PEDV; C: TEM image of C1+P; D: TEM image of C2+P.

图1 PEDV的分离纯化及PEDV、C1+P、C2+P透射电镜图

Fig.1 Purification of PEDV and TEM images of PEDV, C1+P and C2+P

表1 PEDV、C1+P、C2+P粒径及电位

Table 1 Diameters and zeta potentials of PEDV, C1+P and C2+P

样品 Samples	粒径/nm Diameters	电位/mV Zeta potentials
PEDV	179.8±23.7	-12.2±1.06
C1+P	234.0±69.2	2.18±1.04
C2+P	269.8±47.9	3.95±0.61

2.2 黏膜灌洗液特异性sIgA抗体水平对比

通过间接ELISA的方法检测免疫后小鼠鼻腔灌洗液、肺泡灌洗液、小肠灌洗液中黏膜特异性sIgA抗体效价,检测结果如图2所示。口服灭活PEDV刺激机体产生的鼻黏膜、肺黏膜及小肠黏膜特异性sIgA抗体与PBS组无显著差异,但C1+P、C2+P、

1.8 数据分析

采用GraphPad Prism 8.0进行数据统计并作图,采用t检验统计学分析显著性,结果以“平均值±标准差”表示。每个数据均进行5次独立重复试验。

2 结果与分析

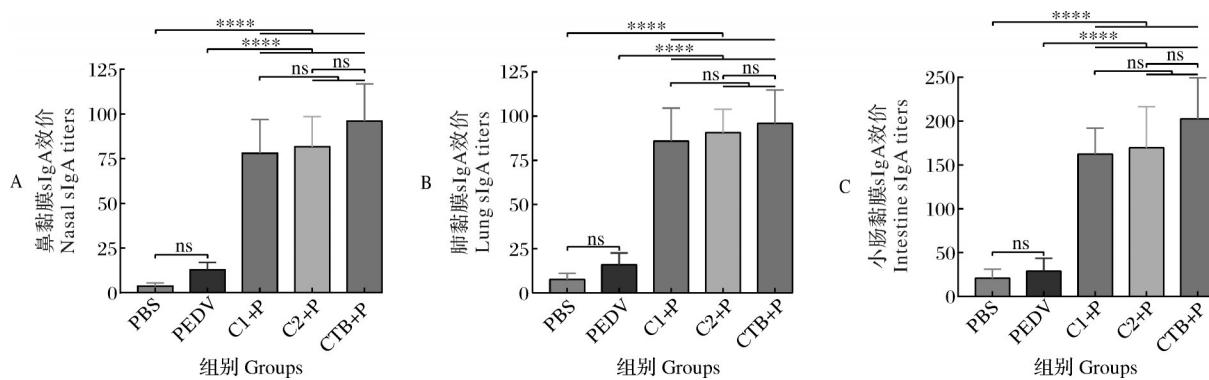
2.1 C1+P、C2+P透射电镜表征

根据Reed-Muench法检测到所收集PEDV病毒滴度为 $7.25 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。利用蔗糖梯度密度离心分离纯化PEDV后,在40%和60%蔗糖溶液之间观察到明显的白色条带,如图1A所示。收集白色条带并通过TEM观察如图1B所示,PEDV病毒粒子大小约100 nm,呈经典的冠状病毒状;而经过Chic在表面修饰的PEDV,刺突状不明显,粒径增加,如图1C、图1D所示。与TEM结果一致,DLS粒径检测显示(表1),Chic修饰后的PEDV粒径增加至(234.0 ± 69.2) nm(C1+P)和(269.8 ± 47.9) nm(C2+P);C1+P和C2+P粒子均为正电位,且电位与Chic修饰量呈正相关。TEM与DLS结果均证明Chic成功修饰至PEDV表面。

CTB+P组均显著提高了黏膜sIgA特异性抗体效价($P<0.0001$)。与PEDV组相比,C1+P、C2+P组鼻黏膜sIgA分别提升了6.09、6.37倍,肺黏膜sIgA分别提升了5.35、5.65倍,小肠黏膜sIgA分别提升了5.64、5.89倍。但与阳性对照CTB+P组相比,C1+P、C2+P鼻腔、肺黏膜、小肠黏膜sIgA抗体效价均无显著差异。

2.3 血清特异性抗体水平对比

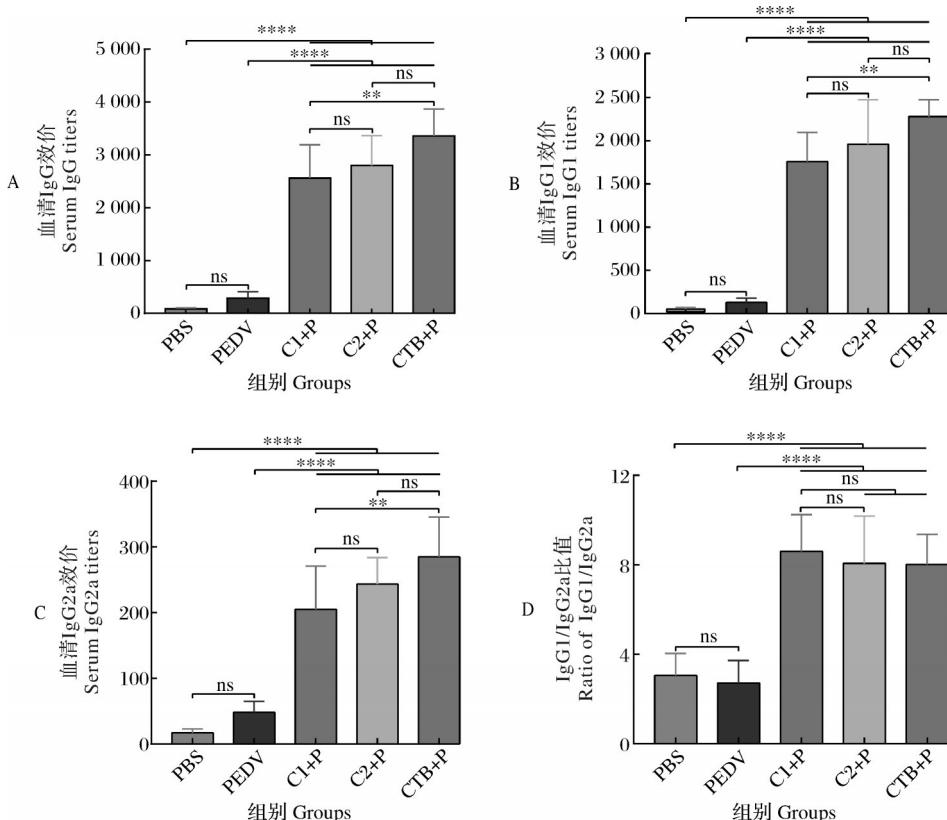
利用间接ELISA的方法检测小鼠血液IgG、IgG1和IgG2a抗体效价,并计算IgG1/IgG2a值。如图3A所示,经过2次口服免疫后,C1+P和C2+P组血清特异性IgG抗体效价与PEDV组相比分别提升了8.83、9.65倍;IgG1抗体效价与PEDV组相比分别



A: 鼻黏膜; B: 肺黏膜; C: 小肠黏膜。A: Nasal mucosa sIgA titers; B: Lung mucosa sIgA titers; C: Intestinal mucosa sIgA titers.“ns”表示差异不显著($P>0.05$)，“*”“**”“***”“****”分别表示 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.0001$,下同。“ns”indicates no significant differences($P>0.05$)，“*”“**”“***”“****”indicates $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$,respectively.The same as below.

图2 黏膜 sIgA 抗体效价

Fig. 2 Mucosa sIgA titers



A:IgG; B:IgG1; C:IgG2a; D:IgG1/IgG2a.

图3 血清 IgG 抗体效价

Fig. 3 Serum IgG titers

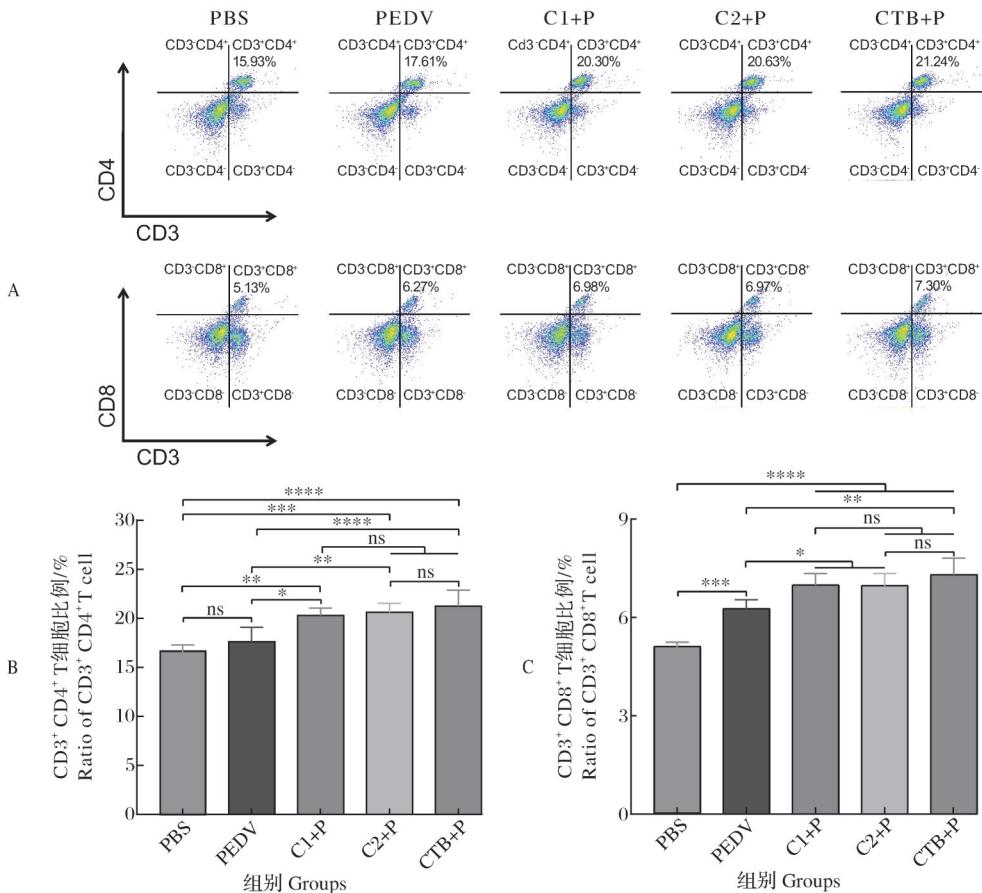
提升了13.54、15.07倍(图3B); IgG2a抗体效价与PEDV组相比分别提升了4.27、5.07倍(图3C)。但C2+P组血清特异性IgG、IgG1和IgG2a抗体效价与CTB+P组相比均无显著差异,证明Chic修饰的PEDV C2+P具有与CTB联合PEDV相近的免疫效果。由图3D可知,各组IgG1/IgG2a值均 >1 ,C1+P、C2+P和CTB+P处理显著提高了

IgG1/IgG2a值,表明口服免疫灭活PEDV或Chic修饰的灭活PEDV C1+P、C2+P均更倾向于促进Th2型免疫反应。

2.4 脾脏淋巴细胞亚型的检测

为探讨口服免疫灭活PEDV对小鼠脾脏T淋巴细胞亚群的影响,使用流式细胞仪检测CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ T淋巴细胞,T淋巴细胞亚群检测圈门策略、细胞分

型检测结果及比例如图4所示。C1+P、C2+P、CTB+P组与PEDV组相比,CD4⁺ T淋巴细胞、CD8⁺ T淋巴细胞比例均显著提高($P<0.05$),分别提升了1.15、1.17、1.21倍和1.11、1.11、1.16倍,C1+P、C2+P、CTB+P组之间CD4⁺ T淋巴细胞、CD8⁺ T淋巴细胞比例无显著差异。



A:脾脏T淋巴细胞流式图;B:脾脏CD4⁺型T淋巴细胞比例;C:脾脏CD8⁺型T淋巴细胞比例。A:Flow diagram of spleen T lymphocytes; B:Ratio of CD4⁺ spleen T lymphocyte; C:Ratio of CD8⁺ spleen T lymphocyte.

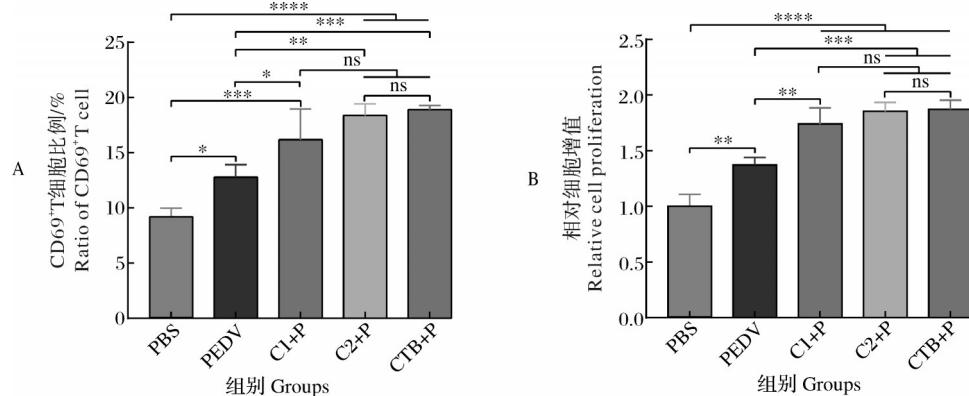
图4 流式细胞术检测脾脏T淋巴细胞分型

Fig. 4 Spleen T lymphocyte typing test by FCM

2.5 脾细胞增殖与活化情况对比

使用10 μg/mL的灭活PEDV对免疫小鼠脾细

胞进行刺激,72 h后使用流式细胞仪检测脾细胞表面CD69活化情况。如图5A所示,C1+P、C2+P、



A:CD69⁺脾细胞;B:脾细胞CCK-8试验。A:Splenocyte CD69 ; B: Splenocyte proliferation by CCK-8 assay.

图5 脾细胞增殖活化情况

Fig. 5 Splenocyte proliferation

CTB+P组脾细胞增殖活化情况均显著高于PEDV组($P<0.05$),但C1+P、C2+P、CTB+P组之间无显著差异。使用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的灭活PEDV对免疫小鼠脾细胞进行刺激,72 h后通过CCK-8试验评估其增殖活化情况。如图5B所示,C1+P、C2+P、CTB+P组脾细胞增殖活化情况均显著高于PEDV组($P<0.01$),C1+P、C2+P、CTB+P组之间无显著差异,结果趋势与CD69流式检测结果一致。

3 讨 论

猪流行性腹泻病毒途经黏膜入侵可感染所有年龄段的猪,对养猪业发展存在严重的威胁,防控PED成为养猪业的重中之重^[5,14]。目前,接种疫苗是最为经济有效的预防措施,有效的黏膜免疫可以诱导机体在黏膜处产生特异性分泌型sIgA抗体,sIgA可将PEDV的传播扼杀在最初阶段,因此被认为是抑制PEDV传播的重要手段^[15]。经过苯二酚修饰壳聚糖改良的黏膜黏着剂——Chic具有良好的黏膜黏附性和佐剂活性^[9,16],因此在本研究中,将不同浓度Chic修饰的灭活PEDV形成C1+P和C2+P纳米粒子口服免疫小鼠,并使用间接ELISA、流式细胞术等方法综合评价其免疫效果。黏膜黏着剂Chic被证实有佐剂活性和黏膜黏附性^[9,16-18],因正电荷特性,Chic容易实现对负电荷的抗原或药物的包被^[19],也易实现对带有负电荷的黏膜表面的黏附。此外,Chic有较强的黏膜黏附性,可以延长抗原和药物在黏膜处的滞留时间,对黏膜免疫具有很强的适应性。本研究中,基于TEM与DLS结果(图1),笔者证实了PEDV可被Chic修饰,这拓宽了黏膜黏着剂在黏膜免疫中抗原递送的应用。

Wilson等^[20]研究表明共同黏膜免疫系统^[21]理论是黏膜免疫的基础,有效的黏膜免疫可同时诱导局部和远端黏膜免疫应答。在本试验中,经过口服免疫,C1+P、C2+P、CTB+P组在消化道产生的sIgA抗体均显著高于PEDV组,相似的结果同样在鼻腔、肺部发现(图2),证明Chic修饰的PEDV经过口服递送成功诱导了局部和远端黏膜免疫应答。本研究结果可为途经消化道感染的病毒防控工作提供一定研究基础。有效的黏膜免疫可激活机体系统性的免疫反应并产生特异性IgG抗体来提供免疫保护^[22-24],本试验结果发现,Chic修饰的灭活PEDV可刺激小鼠产生特异性IgG抗体,且IgG1/IgG2a>1(图3),表明该免疫方式更倾向于促进Th2型免疫反

应^[25],这对于有效清除病毒和提供免疫保护是有利的。同时,C2+P组诱导IgG产生的效果优于C1+P组,说明Chic对增强免疫应答反应可能存在一定的剂量依耐性。T淋巴细胞在免疫系统的调节中起着核心作用^[26],本试验发现,C1+P、C2+P、CTB+P组小鼠CD4⁺、CD8⁺ T淋巴细胞比值与PEDV组相比显著提升(图4),表明C1+P、C2+P、CTB+P可以有效增强辅助性T细胞、细胞毒性T细胞的免疫反应和活化状态,有助于提高机体直接杀伤病毒感染细胞的能力以及免疫系统的总体效能^[27]。

目前,针对PEDV口服疫苗主要集中PEDV S基因的重组载体菌如干酪乳酸菌^[28-30]、减毒沙门氏菌^[31-32]的构建。使用工程菌作为抗原载体可以刺激机体产生特异性免疫应答,但外来微生物的入侵对于肠道的微生态菌群是潜在的威胁。另外,结合免疫佐剂也是有效诱导免疫应答的方式之一,CTB被认为是有效的黏膜佐剂^[33-34],本研究中CTB显示出有效的黏膜免疫佐剂活性,这与Zhou等^[35]和Matsumoto等^[36]的研究结果一致。但相比于昂贵的CTB,Chic的廉价易得有利于其在动物疫病防控中的临床应用。本研究证明黏膜黏着剂Chic可实现PEDV抗原的口服递送,后续将系统开展动物免疫后攻毒保护效果评价以及免疫应答相关机制的深入研究。

参考文献 References

- [1] SUN D B, WANG X Y, WEI S, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review [J]. Journal of veterinary medical science, 2016, 78 (3) : 355-363.
- [2] 翟娟.猪流行性腹泻的诊断及防治[J].养殖与饲料,2022,21(6): 69-71. ZHAI J. Diagnosis and prevention of porcine epidemic diarrhea[J]. Animal breeding and feed, 2022, 21(6): 69-71 (in Chinese).
- [3] LI Y C, WU Q X, HUANG L L, et al. An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine[J/OL]. Nature communications, 2018, 9(1): 3811 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06056-w>.
- [4] JUNG K, SAIF L J, WANG Q H. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): an update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control[J/OL]. Virus research, 2020, 286: 198045 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198045>.
- [5] GALLIEN S, MORO A, LEDIGUERHER G, et al. Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen

- from infected specific pathogen-free boars [J/OL]. Veterinary research, 2018, 49 (1) : 7 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0505-2>.
- [6] VAJDY M, BAUDNER B, DEL GIUDICE G, et al. A vaccination strategy to enhance mucosal and systemic antibody and T cell responses against influenza [J]. Clinical immunology, 2007, 123(2):166-175.
- [7] WEI Q, BECHERER T, ANGIOLETTI-UBERTI S, et al. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials [J]. Angewandte chemie international edition, 2014, 53(31):8004-8031.
- [8] PINNATAIP R, LEE B P. Oxidation chemistry of catechol utilized in designing stimuli-responsive adhesives and antipathogenic biomaterials [J]. ACS omega, 2021, 6(8):5113-5118.
- [9] DENG K, HUANG Z Q, JING B, et al. Mucoadhesive chitosan-catechol as an efficient vaccine delivery system for intranasal immunization [J/OL]. International journal of biological macromolecules, 2024, 273: 133008 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133008>.
- [10] DANG Y, XING C M, QUAN M, et al. Substrate independent coating formation and anti-biofouling performance improvement of mussel inspired polydopamine [J]. Journal of materials chemistry B, 2015, 3(20):4181-4190.
- [11] LEI C F, YANG J, HU J, et al. On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity [J]. Virologica sinica, 2021, 36(1):141-144.
- [12] CHEN J N, JIN L, WANG Z M, et al. N6-methyladenosine regulates PEDV replication and host gene expression [J]. Virology, 2020, 548:59-72.
- [13] WAN H P, REN K, KAPER H J, et al. A bioinspired mucoadhesive restores lubrication of degraded cartilage through reestablishment of *Lamina splendens* [J/OL]. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2020, 193: 110977 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110977>.
- [14] COHEN B J, AUDET S, ANDREWS N, et al. Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: description of a standardised laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination [J]. Vaccine, 2007, 26(1):59-66.
- [15] 卢思嘉, 郑兰兰. 猪流行性腹泻病毒疫苗研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(7): 2931-2940. LU S J, ZHENG L L. Research progress on porcine epidemic diarrhea virus vaccines [J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2023, 50(7): 2931-2940 (in Chinese with English abstract).
- [16] WAN H P, DENG K, HUANG Z Q, et al. Pathogen-mimicking nanoparticles based on rigid nanomaterials as an efficient subunit vaccine delivery system for intranasal immunization [J/OL]. Advanced healthcare materials, 2024, 13(26): e2401120 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1002/adhm.202401120>.
- [17] GUYOT C, CERRUTI M, LEROUGE S. Injectable, strong and bioadhesive catechol-chitosan hydrogels physically cross-linked using sodium bicarbonate [J/OL]. Materials science and engineering: C, 2021, 118: 111529 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111529>.
- [18] KIM K, KIM K, RYU J H, et al. Chitosan-catechol: a polymer with long-lasting mucoadhesive properties [J]. Biomaterials, 2015, 52: 161-170.
- [19] 李星星, 左涵琪, 李春巧, 等. 氧化石墨烯基二维复合纳米片对猪流行性腹泻病毒的抑制作用研究 [J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(3): 267-274. LI X X, ZUO H Q, LI C Q, et al. Inhibition effect of oxidized graphene based two-dimensional composite nanosheets on porcine epidemic diarrhea virus [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2024, 43(3): 267-274 (in Chinese with English abstract).
- [20] WILSON H L, OBRADOVIC M R. Evidence for a common mucosal immune system in the pig [J]. Molecular immunology, 2015, 66(1): 22-34.
- [21] KUNISAWA J, NOCHI T, KIYONO H. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity [J]. Trends in immunology, 2008, 29(11): 505-513.
- [22] KAETZEL C S. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces [J]. Immunological reviews, 2005, 206(1): 83-99.
- [23] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. Virus genes, 2012, 44(2): 167-175.
- [24] CHEN K, MAGRI G, GRASSET E K, et al. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA [J]. Nature reviews: immunology, 2020, 20(7): 427-441.
- [25] ZHU J F, YAMANE H, PAUL W E. Differentiation of effector CD4 T cell populations [J]. Annual review of immunology, 2010, 28: 445-489.
- [26] 王增博, 刘铭洋, 刘飞, 等. 动物双歧杆菌乳亚种XLTG11对免疫抑制小鼠免疫功能及肠道菌群的影响 [J]. 食品科学, 2024, 45(15): 103-111. WANG Z B, LIU M Y, LIU F, et al. Effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11 on immune function and intestinal flora in cyclophosphamide-immunosuppressed mice [J]. Food science, 45(15): 103-111 (in Chinese with English abstract).
- [27] CHEN L P, FLIES D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. Nature reviews: immunology, 2013, 13(4): 227-242.
- [28] LI X W, ZHANG B Z, ZHANG D S, et al. The construction of recombinant *Lactobacillus casei* vaccine of PEDV and its immune responses in mice [J/OL]. BMC veterinary research, 2021, 17 (1) : 18 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02885-y>.
- [29] XIAO Y, WANG X N, LI Y, et al. Evaluation of the immunogenicity in mice orally immunized with recombinant *Lactobacillus casei* expressing porcine epidemic diarrhea virus S1 protein [J/OL]. Viruses, 2022, 14(5): 890 [2024-07-28]. <https://doi.org/10.3390/v14050890>.
- [30] HOU X Y, JIANG X P, JIANG Y P, et al. Oral immunization

- against PEDV with recombinant *Lactobacillus casei* expressing dendritic cell-targeting peptide fusing COE protein of PEDV in piglets [J/OL]. *Viruses*, 2018, 10(3): 106 [2024-07-28].<https://doi.org/10.3390/v10030106>.
- [31] ZHANG Y D, ZHANG X H, LIAO X D, et al. Construction of a bivalent DNA vaccine co-expressing S genes of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *Virus genes*, 2016, 52(3): 354-364.
- [32] 梁恩涛, 廖晓丹, 黄小波, 等. 携带猪流行性腹泻病毒S基因的减毒鼠伤寒沙门菌的构建与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(3): 264-270. LIANG E T, LIAO X D, HUANG X B, et al. Construction and identification of attenuated *Salmonella* construction and identification of attenuated *Salmonella* [J]. Chinese veterinary science, 2014, 44(3): 264-270(in Chinese with English abstract).
- [33] STRATMANN T. Cholera toxin subunit B as adjuvant: an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity [J]. *Vaccines*, 2015, 3(3): 579-596.
- [34] SUN J B, CZERKINSKY C, HOLMGREN J. Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit [J]. *Scandinavian journal of immunology*, 2010, 71(1): 1-11.
- [35] ZHOU Z W, DONG H, HUANG Y M, et al. Recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing cholera toxin B subunit and *Helicobacter pylori* urease B confer protection against *H. pylori* in mice [J]. *Journal of medical microbiology*, 2017, 66(1): 83-89.
- [36] MATSUMOTO Y, SUZUKI S, NOZOYE T, et al. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of transgenic rice plants producing a vaccine candidate antigen (As16) of *Ascaris suum* fused with cholera toxin B subunit [J]. *Transgenic research*, 2009, 18(2): 185-192.

Evaluating oral immunization of inactivated PEDV vaccine modified with chitosan-catechol

YANG Yunhan, DENG Kai, TU Zhiwen, ZHAO Xinghong, WAN Hongping

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract Inactivated PEDV (0.5 mg/mL) encapsulated with different concentrations of chitosan-catechol (Chic) including 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL named as C1+P and C2+P was prepared by controlling the amount of Chic, and a mouse model was established for immunization testing to evaluate the oral immunization efficacy of inactivated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine modified with Chic. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of sIgA in mouse mucosa and IgG, IgG1, IgG2a antibodies in serum. Flow cytometry and CCK-8 assay were used to detect the phenotyping and proliferation activation of spleen cells. The results showed that the immune response induced by the C2+P group was comparable to that of the expensive cholera toxin B subunit (CTB) adjuvant group after two oral immunizations. Compared with the PEDV group without Chic modification, the antibody titer of nasal, lung, and small intestine mucosa-specific sIgA in the C1+P group and C2+P group was increased by 6.09, 6.37 times, and 5.35, 5.65 times, and 5.64, 5.89 times, respectively. The serum specific IgG, IgG1, and IgG2a in the C1+P group and C2+P group increased by 8.83, 9.65 times, 13.54, 15.07 times, and 4.27, 5.07 times, respectively. The proportion of CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes in the C1+P group and C2+P group increased by 1.15, 1.17 times and 1.11, 1.11 times, respectively. The proliferation and activation of spleen cells significantly increased as well ($P < 0.05$). It is indicated that oral immunization with C1+P and C2+P successfully induced mucosal and systemic immune responses in mice, demonstrating the potential of Chic as a mucosal immune adjuvant and the feasibility of inactivated PEDV vaccines modified with Chic in effectively inducing immune responses.

Keywords porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); inactivated vaccine; mucosal immunization; oral immunization; adjuvants; chitosan-catechol (Chic)

(责任编辑:赵琳琳)