

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.20

## 疫苗佐剂的研究现状和发展趋势

李娜<sup>1,2</sup>, 周伟芳<sup>3</sup>, 刘慧敏<sup>2</sup>, 李赞<sup>2</sup>, 仇华吉<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 哈尔滨维科生物技术开发公司, 黑龙江 哈尔滨 150001; 3. 上海奉贤动物卫生监督所, 上海 201400)

中图分类号: S852.5

文献标识码: B

文章编号: 1008-0589(2013)01-0081-06

疫苗佐剂是能够非特异性地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答、发挥辅助作用的一类物质。佐剂能够诱发机体产生长期、高效的特异性免疫反应, 提高机体保护能力, 同时又能减少免疫物质的用量, 降低疫苗的生产成本。长期以来, 传统疫苗(多为菌体或其裂解物)由于其免疫原性强, 佐剂的研究和使用只局限于较小的范围, 如毒素和类毒素。从巴斯德至今近百年来已开发了许多菌苗和疫苗, 但传统的菌疫苗一般多为全细菌或全病毒制成, 其中含有大量非免疫原性物质, 这些物质除具有毒副作用外也具有佐剂作用。所以一般不需要外加佐剂, 因此在这段时间里免疫佐剂并未引起人们广泛的注意。直到1925年, 法国免疫学家兼兽医学家 Gaston Ramon 发现在疫苗中加入某些与之无关的物质可以特异性地增强机体对白喉和破伤风毒素的抵抗反应<sup>[1]</sup>, 从此许多国家都不同程度的开展了这方面的研究。随着现代生物技术和基因工程技术的迅速发展, 针对不同疾病已开展了各种新型基因工程疫苗的研制, 但这些疫苗普遍存在分子小、免疫原性弱、难以诱导机体产生有效免疫应答等不足, 从而需要某种物质来增强其免疫作用, 免疫佐剂尤其是新型免疫佐剂的研究就显得尤为迫切。近年来, 为适应新型疫苗的需求, 佐剂已经从传统、单一的形式向新型、多元化形式发展, 尤其用于黏膜疫苗、DNA疫苗及肿瘤疫苗的佐剂研究成为热点。本文对传统及新型佐剂种类做了较为详细的阐述, 并针对这些佐剂提出了存在的问题, 同时对佐剂的发展趋势做了展望。

### 1 疫苗佐剂的概念

佐剂(Adjuvant)又称免疫调节剂(Immunomodulator)或免疫增强剂(Immune potentiator), 是指先于抗原或与抗原

同时应用, 能够非特异地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答, 以及增强相应抗原的免疫原性或改变免疫反应类型, 而本身无抗原性的物质。“佐剂”一词来源于拉丁文“Adjuvare”, 意味着辅助或者增强。疫苗佐剂可以用于不同的目的: (1)增强纯化的或者重组抗原的免疫原性、免疫应答速度及耐受性; (2)降低抗原的用量或者达到免疫保护所需要的接种剂量; (3)提高疫苗在婴儿、老年人或者免疫系统受损人群的免疫效力; (4)作为通过黏膜摄取抗原的抗原递送体系, 可促进胃肠黏膜对疫苗的吸收。佐剂的概念来源于在接种部位形成的溃疡, 并促进高水平特异性抗体的产生, 即使是由接种不相关的物质产生的溃疡也能够诱导高特异性抗体的产生; (5)佐剂能够增加对细胞的渗透性, 防止抗原降解, 将抗原运输到特异的抗原提呈细胞, 增强抗原的呈递或诱导细胞因子的释放。

### 2 传统佐剂

2.1 铝佐剂 自1926年首先发现铝佐剂沉淀的白喉类毒素悬液要比类毒素本身具有更高的抗原性以来, 铝佐剂已广泛应用于人类及动物疫苗制备。铝佐剂苗可以分为铝沉淀疫苗和铝吸附疫苗两种, 铝沉淀疫苗是将铝剂悬液加至抗原液中, 铝吸附疫苗是将抗原溶液加至氢氧化铝或磷酸铝中。两种铝佐剂疫苗不仅能够减少抗原用量, 还能够增强机体的免疫应答。铝佐剂通常用氢氧化铝, 其次是明矾及磷酸三钙。

长期以来关于铝佐剂疫苗的具体机制尚不明确。近年来, 人们对于氢氧化铝的作用机制有了新的认识。2007年Li等研究表明巨噬细胞主要对抗原进行吞噬和破坏作用, 铝则激活细胞内源性免疫应答相关的Nalp3炎症

收稿日期: 2011-10-23

基金项目: 国家863计划(No. 2011AA10A208)

作者简介: 李娜(1971-), 女, 河南杞县人, 博士, 主要从事动物新型疫苗研发。

\*通信作者: E-mail: huajiqu@hvri.ac.cn

复合体,促进巨噬细胞分泌产生高水平的促炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18<sup>[2]</sup>。Eisenbarth 等进一步研究表明氢氧化铝佐剂还可激活 Th2 细胞分泌 IL-4,诱导 MHC-II 类分子和 CD83、CD86 等的表达,诱导 Th2 型体液免疫应答<sup>[3]</sup>。

铝佐剂优势在于:不仅具有良好的吸附作用,能够将可溶性抗原吸附于铝佐剂分子表面;还是良好的沉淀剂,可以浓缩抗原,减少注射剂量。铝佐剂成本低廉、使用方便、无毒,是兽医生物制品中应用最广的一种佐剂,也是至今唯一被 FDA 批准可用于人类疫苗的佐剂。

铝佐剂也存在一些问题:铝盐在许多情况下并不是一个好的佐剂,尤其是在诱导细胞免疫应答上。当铝佐剂通过皮下或皮肤内注射而不是肌肉内注射的路径时通常会产生肉芽肿。另外一个副作用就是增加了 IgE 的产生、变态反应和可能的神经毒性。

**2.2 油乳佐剂** 这种类型的佐剂一般包括水包油或者油包水乳剂和水包油包水双相乳剂。油水乳剂中最著名的是弗氏佐剂(Freund's adjuvant, FA),又可分为弗氏不完全佐剂(FIA)和弗氏完全佐剂(FCA)。FCA 其中含有灭活的分枝杆菌(长介菌)成份,是标准的诱生体液和细胞免疫佐剂,可诱导 Th1 型细胞因子,能够促进 IgG 的产生,抑制 IgM 的产生,从而抑制免疫耐受的产生,推迟超敏反应,增加移植排斥,促进抗肿瘤作用。FIA 则是典型的只诱导 Th2 型细胞因子、诱生抗体的佐剂。油佐剂的作用机制主要是在注射部位形成抗原储藏库,从而使抗原缓慢释放刺激浆细胞产生抗体,但缓释功能并非油佐剂的最大优势。

矿物油不能被代谢,因此会产生一系列的副作用:包括注射部位的炎症反应、肉芽肿、溃疡和发热等。另外,矿物油以及其中的组分如姥鲛烷、正十六烷等会引起佐剂型关节炎等自身免疫反应。因此,矿物油乳佐剂毒性太大一般不能用于人类疾病预防的疫苗,尽管它们可以用于某些能够承受这些毒副作用的癌症患者。此外,乳化剂的毒性也必须注意。

随着乳化技术的进步,油佐剂中所应用的油成分逐渐降低(不高于 5%),如 Seppic 系列佐剂;或者选择可代谢油取代初期的矿物油来制备更为安全、稳定、有效的免疫佐剂,如 MF59、AS03、AF03 和 SE 等。MF59 是目前研究较热门的佐剂之一。由角鲨烯、Tween-80 和 Span-85 等组成,既可以刺激产生体液免疫也可以产生细胞免疫,已广泛用于各种亚单位疫苗佐剂,为继铝佐剂之后唯一被批准的人用佐剂。它对各种动物和各年龄段的人均可以产生高于铝佐剂水平的抗体,用量少、毒性极低<sup>[4]</sup>。

### 3 新型佐剂

近年来,活载体疫苗、DNA 疫苗等新型疫苗的研究取得了快速进展,但这些疫苗免疫原性弱,诱导机体产生的免疫应答不够强,需要配合佐剂以提高其免疫原性。然而常规佐剂存在着一定的局限性,于是新型佐剂的研究受到越来越多的关注。

**3.1 微生物来源佐剂** 微生物(布氏杆菌、沙门氏菌和结核杆菌等)和微生物产物有较强的佐剂活性。

**3.1.1 肽聚糖(PG)** PG 主要来自微生物的细胞壁,如胞壁酰二肽(MDP)、胞壁酰三肽(MTP)、蜡质 D、海藻糖双霉菌酸脂(TDM)等。其中对 MDP、MTP 研究的较多。MDP 是从分枝杆菌细胞壁中提取的一种免疫活性成份。主要增强体液免疫,将它与脂质体或与甘油混合使用可以诱导强烈的细胞免疫。与 TDM 联合使用可以有效地抑制肿瘤的生长,显著增强注射动物抗细菌和病毒感染能力。最近研究表明,MDP 能够诱导机体产生细胞因子,被认为是最有发展前途的佐剂之一。其优点是注射局部反应轻微、无抗原性、过敏性和致癌作用;相对分子量小,对生物学降解作用有抵抗力,可以口服。不良反应是存在热源性,在动物体内会出现赖特过敏综合症。

**3.1.2 革兰氏阴性菌外膜脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)** 另一种来源于革兰氏阴性菌细胞壁的重要复合物是 LPS, LPS 可激活 T 细胞和 B 细胞,对体液免疫和细胞免疫均具有佐剂作用,并可以提高蛋白对多糖抗原的免疫应答。然而他们也表现出较强的毒性作用,这种毒性作用是由巨噬细胞释放的 IL-1 和 TNF 介导的。Geurtsen 等将 LPS 或其类似物作为无细胞百日咳疫苗佐剂免疫小鼠,既可增强疫苗的效力,又可降低 型超敏反应的发生<sup>[5]</sup>。

LPS 中起佐剂效应的主要成分是类脂 A。在酸性条件下,类脂 A 可以被水解得到单磷脂 A (MPL),该复合物保持了类脂 A 的佐剂活性并降低了毒性作用。作为 Th1 型佐剂, MPL 在人和动物研究中显示出了可以接受的安全性。目前, MPL 已经在大量的人类试验中作了评估,而且已经被用于一些疫苗制剂比如作为乙型肝炎和 HSV-疫苗制剂<sup>[5,6]</sup>。目前, MPL 已经用于 HPV 疫苗佐剂<sup>[7]</sup>。

**3.1.3 分枝杆菌及其组份** 分枝杆菌在兽医中广泛地应用于疫苗,如牛分枝杆菌卡介苗是早期应用成功的一种。分枝杆菌经化学和物理方法处理,可以获得具有佐剂活性的成份,包括 MDP、MTP、蜡质 D 等。以结核杆菌为主的分枝杆菌菌体的活性因子存在于细胞骨架(CWS)中,含有 CWS 的 FCA 佐剂,能够刺激产生的循环抗体量增加,诱导细胞免疫形成,并能够持续相当长的时间。

**3.1.4 CpG 寡核苷酸(CpG ODN)** 有证据表明分枝杆菌 DNA 具有佐剂活性,由此发现佐剂活性与细菌核酸中较

高含量的 CpG 基序有关。CpG ODN 是指一类以非甲基化的胞嘧啶和鸟嘌呤核苷酸为核心的寡聚脱氧核糖核苷酸。CpG ODN 是最有效的细胞佐剂之一。

CpG ODN 可以激活 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等免疫活性细胞；刺激淋巴细胞增殖、分化及产生免疫球蛋白；诱导产生 IL-1、IL-2、IL-12 和 IFN- $\gamma$  等多种细胞因子，因此 CpG ODN 在诱导机体非特异性免疫应答、增强特异性免疫应答及调控免疫应答类型等方面发挥着重要作用。尤其是人工合成的 CpG 寡核苷酸，精炼了细菌 DNA 的有效成分，具有增强细胞免疫和体液免疫的双重作用，是一种具有潜力的新佐剂，特别是在抗过敏性疾病、肿瘤和传染病等方面具有广泛的应用前景。

虽然 CpG ODN 具有安全有效等优点，但还是有许多问题有待于解决：比如它的免疫激活机制、免疫剂量（高剂量 CpG ODN 及重复给药可能导致毒性效应）和最适免疫途径还需要进一步研究。目前 CPG 作为人用乙肝疫苗已进入临床试验。

**3.1.5 霍乱毒素(Cholera toxin, CT)** 在毒素来源的佐剂中以霍乱毒素最为有效。它是一种有效的经口服和不经肠道的佐剂，由霍乱弧菌产生，是目前试验阶段粘膜免疫效果最好的佐剂，它包括两个主要的亚单位 A 和 B。只有非毒性的五聚体亚单位 B，即霍乱类毒素 CTB 被用作佐剂。CTB 有运输抗原并促进定位的作用，通常激发一个 Th2 或者混合的 Th1/Th2 但倾向 Th2 的免疫应答<sup>[8]</sup>。在小鼠试验中，CT 还能够诱导 Th17 的免疫应答，在治疗的小鼠肺中还伴随有中性粒细胞的累积和 IL-16 的增加<sup>[9]</sup>。同时，CTB 还是一种良好的蛋白半抗原和弱免疫原的载体，共同免疫时可以赋予半抗原免疫原性，增强弱免疫原的免疫原性，CTB 作为一种良好的免疫佐剂和蛋白抗原输送载体，虽然目前距实际应用仍有一定的距离，但应用前景良好。

## 3.2 微粒抗原递送体系

**3.2.1 脂质体** 脂质体是合成的球体由脂质双分子层组成能够包裹抗原，既可以充当疫苗递送的工具又可以作为佐剂。脂质体的佐剂效力依赖于脂质双分子层的数量、电荷、组成成份以及制备的方法。脂质体包裹 DNA 疫苗可以起到缓释和保护作用，而且脂质体可以被细胞膜融合、降解，将 DNA 释放于细胞内进行表达。

研究表明，脂质体能够显著增强机体的体液免疫应答和细胞免疫应答，可以增加循环抗体滴度或抗体形成细胞的产生，同时可增强巨噬细胞的吞噬作用、抗原提呈作用以及增强免疫记忆。研究还表明，脂质体还可以作为载体与其它佐剂如脂质 A、胞壁酰二肽及其衍生物<sup>[10]</sup>、IL-1/IL-2 等<sup>[11]</sup>或 DNA 疫苗联合使用，刺激巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-12，诱导 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细

胞为主的免疫应答，同时增强 APC 的递呈能力，从而增强机体免疫应答。

作为疫苗佐剂脂质体也存在一些不足：稳定性较差，磷脂中的不饱和脂肪酸储存时会逐渐氧化，小脂质体倾向于相互融合成大脂质体，在融合过程中可以导致包入的抗原释放。脂质体在制备过程中要求一定的技术性，其费用也比其他免疫佐剂高，目前对脂质体的应用研究还主要集中在医学研究方面，在兽医疫苗研究中的应用前景还具有一定的不确定因素。

**3.2.2 聚合微球体** 在微粒聚合体系中，多聚微球体已经得到了广泛的研究。这些都是纳米大小的具有生物相容性并且可生物降解的微球体，它们能够结合不同的抗原，优点之一就是能够通过改变它们组份的相应浓度来操纵降解动力学从而控制抗原释放的时间，而且被这些粒子捕捉的抗原以一种迟发连续的或者脉冲的方式释放。近来已经表明带电荷的表面吸附抗原的聚丙交酯-乙交酯 (PLG) 微粒可以被用于递送抗原到 APC。阳离子和阴离子 PLG 已经被用于吸附各种抗原包括质粒 DNA、重组蛋白以及免疫刺激寡核苷酸，它们与铝佐剂相比较将导致显著加强的免疫应答的产生，却仅有很微小的毒副作用。表面吸附了微粒的制剂在疫苗制备方面提供了一个递送抗原的可替代的新颖的途径。

聚合微球疫苗在实际应用中也存在一些问题，如微球疫苗的安全性、抗原包载量、抗原与不同大小微球的结合程度、抗原微囊化后的稳定性及微球储存期间稳定性等。

**3.2.3 惰性纳米微球** 表面吸附抗原的固体惰性纳米微球可以用于刺激 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答，最佳纳米球的直径为 1  $\mu\text{m}$ ，近来有报道使用 0.04  $\mu\text{m}$ ~0.05  $\mu\text{m}$  的固体惰性纳米球对于有效的抗原递送到 APC、产生有效的联合的体液和 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫是一个非常具有前景的策略<sup>[12]</sup>。这种新型纳米疫苗的非凡效力通过单次免疫两周后就能够保护动物免受肿瘤的伤害而且还能够清除大的肿瘤团块的一个肿瘤攻毒试验模型中得到了证明<sup>[13]</sup>。这种纳米球与多种抗原结合，可以诱导小鼠<sup>[14]</sup>和羊分泌 IL-4 及 IFN- $\gamma$ <sup>[15]</sup>，进而产生良好的体液免疫应答和细胞免疫应答。

**3.2.4 纳米铝佐剂** 2.1 中已经陈述了铝佐剂的诸多不足，这就需要其它佐剂来替代，或者进一步研究制备粒径均一、吸附能力强、分散性好、可以减少佐剂用量的纳米铝佐剂。在国内，何萍等通过自制纳米铝佐剂，研究其对乙型肝炎病毒和狂犬病毒体液免疫应答的影响<sup>[16]</sup>。结果纳米铝佐剂在诱导 HBsAg 和狂犬病疫苗体液免疫应答的早期优于常规铝佐剂，能够快速激活和提高小鼠和豚鼠的免疫应答和应答水平。汤承等的研究表明纳米铝佐剂能够诱导雏鸡产生有效免疫保护抗体的时间比常

规油佐剂疫苗提前 4 d 并且无副反应<sup>[17]</sup>, 这对禽流感等重大传染病的紧急预防接种具有潜在的应用价值。

**3.2.5 免疫刺激复合物(Immunosimulating complexes, ISCOM)** ISCOMs 是 40 nm 的大微粒由皂苷(Quil A)、油脂、胆固醇和抗原组成, 通过前 3 个组份之间的疏水作用而结合在一起。疏水的或亲水的抗原均可以结合到其复合物上。它们是通用的灵活递送体系, 可以增加抗原呈递到 B 细胞以及被 APC 摄取的效率<sup>[18]</sup>。ISCOM 具有产生全面免疫应答的能力, 显示出优越的免疫学价值。由于 ISCOM 产生有效免疫所需的抗原很少, 使其有可能成为多价亚单位疫苗的有效佐剂。与其它佐剂相比, ISCOM 更安全, 能够形成长效生物活性反应, 刺激产生粘膜免疫, 对预防通过黏膜的致病微生物具有特别重要的意义<sup>[19]</sup>。

ISCOM 具有佐剂和抗原提呈的双重功能, 既可激发细胞介导的免疫反应, 又可刺激体液免疫。临床研究表明, ISCOM 是目前诱导 T 淋巴细胞系(CTL)反应最强的免疫刺激物。已经有许多人采用 ISCOM 技术研制兽用亚单位疫苗和遗传工程疫苗。

**3.2.6 细胞因子** 细胞因子是具有重要生物学活性的细胞调节蛋白, 是有效的免疫佐剂, 可以保护机体免受病毒、细菌和寄生虫的侵袭, 对肿瘤免疫和临床应用也有增效作用。研究表明, 白细胞介素 12(IL-12)、IL-2、IFN- $\gamma$ 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等, 在增强细胞毒性 CTL、自然杀伤细胞活性和募集抗原提呈等方面有着重要作用, 是促进 CTL 免疫应答的最佳细胞因子环境。

目前研究最多的是 IL-12, 在体内它主要参与机体的细胞免疫应答, 诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞分化, 同时激活 NK 细胞的杀伤功能, 刺激其分泌 IFN- $\gamma$ , 增强裂解活性, 具有重要的免疫调节和抗肿瘤作用。其最大特点是在极低浓度时即具有显著活性, 高于 IL-2 和 IFN。

IFN 的生物活性主要表现在抗病毒、免疫调节、抑制细胞分裂及抗肿瘤等方面。在免疫调节方面, IFN 能够增强 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞的活性。IFN 的分子质量小, 可以自由出入细胞, 作用无特异性。

在免疫反应中, GM-CSF 能够促进抗原递呈细胞的分化、成熟和表达 MHC 类抗原和 B7 共刺激因子。它通过激活和募集 APC 来增强初次免疫反应。目前 GM-CSF 作为肿瘤疫苗免疫佐剂已进入临床试验<sup>[20]</sup>。Peter 等将其用作流感疫苗的免疫佐剂, 取得了理想的免疫效果<sup>[21]</sup>。Overton 等将其尝试性用于 HIV 感染病人的乙肝预防疫苗, 但未成功<sup>[22]</sup>, 若进一步对其限制免疫应答的机制进行探索, 也许能够发现其更广泛的应用领域。

细胞因子在 DNA 疫苗应用中有特殊的潜力, 细胞因子可以和抗原在同一载体里共表达。另一方面, 直接运

用 IL-12 和其他细胞因子作为可溶性蛋白已经证明和黏膜佐剂一样有效。

**3.3 多糖(Polysaccharides)** 多糖又称多聚糖, 是一类具有广泛生物活性的生物大分子物质。植物多糖来源于植物的根、茎、皮、种子和花, 由相同或不同单糖以  $\alpha$ -或  $\beta$ -糖苷键所组成, 分子量数万甚至数百万。

菊粉(MPI)是来源于菊科植物根部的一种碳水化合物, 当形成一种微粒形式时, 它就是一种有效的体液和细胞免疫佐剂。MPI 微粒子是一种有效的交替补体路径的活化剂, 因此可以激活先天免疫系统。MPI 在推进细胞免疫应答方面尤其有效, 而没有其它佐剂比如 FCA、Montanide 或者 QS21 通常所表现出的毒性。MPI 可以与其它许多佐剂成分联合使用产生出一系列带有不同程度的 Th1 和 Th2 活性的专用佐剂。比如 Algammulin 就是 MPI 与氢氧化铝的复合物, 也被开发为佐剂, Algammulin 展示了一种比 MPI 单独使用更高比例的 Th2 向 Th1 转化的活性。MPI 可以有效地诱导出 Th1 和 Th2 免疫应答, 不会诱导出 IgE, 也不会伴随有任何局部或全身的毒性。MPI 在体内可以被代谢成简单的果糖和葡萄糖, 所以 MPI 是基础佐剂不会有安全方面的考虑。

**3.4 疱疹病毒 VP22 蛋白** 单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1) UL49 基因编码的 VP22 是近年来人类基因治疗研究的一个重要“载体”蛋白, 其独特的“蛋白转导(Protein transduction)”特性为基因转移开辟了新的途径。目前, HSV-1 VP22 已应用于抗肿瘤研究、增强 DNA 疫苗、“自主复制型”RNA 疫苗以及“自杀性”DNA 疫苗的免疫效果研究。其作用类似于分子佐剂作用。Cheng 等研究表明人乳头瘤病毒-16 型(HPV-16) E7 融合于 HSV-1 VP22 后使 E7 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞活性得到显著增强, 显示 VP22 可以增强辛德毕斯病毒(SIN) RNA 复制子体内扩散能力从而提高疫苗效力<sup>[23]</sup>。表达 VP22-E7 融合蛋白的 SIN 复制子颗粒抗肿瘤作用也显著强于编码 VP22-E7 的裸 DNA 或裸 RNA 复制子<sup>[24]</sup>。

据报道, PRV UL49 基因的编码蛋白 VP22, 也具有“蛋白转导”功能, 能够将与之融合表达的绿色荧光蛋白在无任何辅助条件介导下(如脂质体、磷酸钙、电转化、病毒载体等)直接导入细胞。我们研究证明, PRV VP22 确实能增强复制子载体 DNA 疫苗和病毒载体疫苗的免疫效果<sup>[25-26]</sup>。Sun 等构建了融合表达猪瘟病毒(CSFV) E2 基因和 PRV UL49 基因的重组腺病毒 rAdV-E2UL49<sup>[26]</sup>。动物免疫试验结果表明, 其免疫原性优于其它重组腺病毒(rAdV-optiE2 或 rAdV-E2), 可以保护家兔免于强毒攻击。

上述研究表明, 疱疹病毒的 VP22 蛋白确实能够作为佐剂增强 DNA 或者 RNA 复制子甚至腺病毒递送的 RNA 复制子疫苗的免疫效力, 这也成为佐剂研究发展的

一个方向。

### 3.5 天然来源佐剂

**3.5.1 蜂胶(Propolis)** 蜂胶是蜜蜂从植物芽孢或树干上采集的树脂(树胶),混入其上腭腺、蜡腺的分泌物加工而成的一种具有芳香气味的胶状固体物。内含几十种生物活性物质、多种维生素、氨基酸、脂肪酸、多糖及酶等,具有广谱抗病毒、抗细菌和抗霉菌作用。配合抗原注入机体,可以增强补体功能、增强免疫功能细胞及吞噬细胞数量,促进抗体产生,从而增强免疫功能。

近几年来对蜂胶的免疫功能的研究取得了许多满意的效果。据报道,用淫羊藿总黄酮和蜂胶初提物研制的淫羊藿-蜂胶佐剂(Epimedium-Propolis adjuvant, EPA)与疫苗配合使用,可以显著提高机体免疫功能<sup>[27]</sup>。赵恒章等以油乳剂、蜂胶和铝胶为佐剂,按一定比例配制成巴氏杆菌的灭活苗。经试验证明,油乳剂灭活苗的保护期和蜂胶灭活苗的保护期相当,而蜂胶灭活苗的抗体水平上升速度比油乳剂苗快并且保护率高;铝胶苗的效果不及蜂胶苗和油苗<sup>[28]</sup>。

**3.5.2 皂苷(Saponin)** 皂苷是从皂树茎秆中分离并纯化出来的一种表面活性剂,主要包括早期的 Quil A 和现在纯度更高的 QS-21。但 Quil A 存在严重的毒副作用,可以引起溶血、局部组织坏死和肉芽肿,不适用于人类。QS-21 是通过反相色谱法从 Quil A 中纯化的,具有比 Quil A 低的毒性和极强的免疫作用,能够诱导 CD4<sup>+</sup> Th1 和细胞毒性 T 淋巴细胞应答。QS-21 毒性虽然小了很多但也同样不适用于大多数人使用,除非是能够允许毒性较高的肿瘤疫苗或者以相对较低剂量使用。DEAE 葡聚糖或许可以作为疫苗中皂苷佐剂的一个有效替代物。

## 4 现行佐剂存在的主要问题

**4.1 安全性问题** 以上所述的佐剂种类繁多,效果也是明显的,但它们也有一些不可避免的缺点,主要体现在两个方面:佐剂的安全性和产生的局部副反应。

佐剂的安全性是一个十分重要的问题,但又是一个容易被忽视的问题,研究表明,绝对安全的佐剂是不存在的。人们只能根据佐剂的作用机制进行调整,尽可能做到免疫刺激作用最大化,而毒副作用最低化。临床观察设计时,要充分考虑佐剂、佐剂与疫苗使用引起的不良反应的收集。如果是新佐剂与已上市抗原的临床研究,应有与已上市疫苗(佐剂和抗原)不良反应的比较和分析。如果是新佐剂与新抗原,则应按照国家有关要求,系统地详细地收集不良反应,包括局部和全身反应、有关系统的实验室检测指标和仪器检查结果等。

**4.2 局部副反应** 一些佐剂可诱导强烈的抗体应答和细

胞免疫,但仍有个别试验者接种后出现较强的局部副反应,反应出现频率具有抗原或剂量依赖性。疫苗佐剂的质量控制是直接关系其临床试验安全性的关键因素。如在 1945~1960 年疫苗研究中广泛应用的 FIA,因其某批次出现质量问题导致脓肿发生大量增加而最终于 1960 年后被终止使用。尽管该佐剂具有较强的佐剂效应,但其不安全因素限制了进一步发展,这种不安全因素主要与其使用剂量以及组份中矿物油化学链长度相关。

**4.3 其它问题** 除了上述两个主要问题外,佐剂还存在一些问题:如油佐剂较粘稠不利于注射、乳化不好容易分层、同时在注射局部反应较严重;氢氧化铝佐剂难以诱导弱抗原的免疫反应且不能诱导细胞免疫;脂多糖佐剂存在较强的毒副作用、脂质体的稳定性有待提高,氧化甘露聚糖与抗原结合方式局限、蜂胶佐剂注射部位形成肿块等问题。某些佐剂作用机制的认识仍不够深入,使得新型佐剂的进一步发展困难重重。另外一些佐剂由于制备过程复杂,价格昂贵也限制了它们的推广应用。

## 5 佐剂的未来发展方向

尽管免疫学知识在近十年有了很大的进展,但令人吃惊的是在人类疫苗中还主要依赖铝为基础的复合物作为主要的佐剂。这种状况在未来的几十年对于已经确定的高效疫苗中都不会改变。然而新的重组亚单位和合成抗原引入到 HIV、丙型肝炎病毒、疟疾和其它严重的疾病中以及对于慢性疾病和肿瘤的治疗性疫苗的开发将会引入新的佐剂到临床试验中。

新佐剂的剂型更应该与开发针对引起病理条件的感染性病原的新疫苗相关,这些病理学条件主要以免疫缺陷、低免疫力者以及高危人群为特征。从这些高危人群开始,进一步采取措施推广新佐剂的应用,可能在不久的将来人们负担得起。

作用机制的研究将进一步阐明佐剂活动背后的分子的相互作用。这些连同生物信息学的开发将会提高新佐剂研发能力。

对佐剂的研究一直是疫苗研究过程中的重要环节,理想的佐剂应该是广谱、无副作用、对免疫系统具备有效的激活作用,同时便于生产和使用。目前,还没有任何一种佐剂具备这些要求。随着人们对各种病原体的抗原成分的不断深入了解和抗感染免疫机理的认识,对佐剂的研究也会更具有目标性。总之,多来源、多途径研发活性强、可生物降解、无毒副作用,甚至有治疗作用的新型佐剂正成为当前佐剂研究的热点,佐剂正朝着多元化方向发展。新型佐剂的出现使我们在进行疫苗研究和制备时具有更多的选择性。

## 参考文献：

- [1] 周慧, 盛贤, 平文祥. 佐剂的研究进展. 生物技术, 2004, 14(4): 84-85.
- [2] Li Han-fen, Nookala S, Fabio R E, et al. Aluminum hydroxide adjuvant activate caspase-1 and induce IL-1 beta and IL-18 release [J]. J Immunol, 2007, 178(8): 5271-5276.
- [3] Eisenbarth S C, Colegio O R, Connor W, et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants [J]. Nature, 2008, 453(7198): 1122-1126.
- [4] Viola S, Vicente D, Andreas W, et al. Safety of MF-59TM adjuvant [J]. Vaccine, 2008, 26: 3209-3222.
- [5] Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system [J]. Expert Rev Vaccines, 2007, 6(2): 133-140.
- [6] Geurtsen J, Banus H A, Gremmer E R, et al. Lipopolysaccharide analogs improve efficacy of acellular pertussis vaccine and reduce type I hypersensitivity in mice [J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(7): 821-829.
- [7] Bernstein D I, Aoki F Y, Tyring S K, et al. Safety and immunogenicity of glycoprotein D-adjuvant genital herpes vaccine [J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(9): 1271-1281.
- [8] Su Shao-bo, Silver P B, Wang Peng, et al. Cholera toxin prevents Th1-mediated autoimmune disease by inducing immune deviation [J]. J Immunol, 2004, 173(2): 755-761.
- [9] Lee J B, Jang J E, Song M K, et al. Intranasal delivery of cholera toxin induces Th17-dominated T-cell response to bystander antigens [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5190.
- [10] Kager L, Potschger U, Bielack S. Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma [J]. Ther Clin Manag, 2010, 6: 279-286.
- [11] Rosalva R C, Teresa C O, Itzel D R, et al. Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leukocytes to kill human cervical cancer cells in vitro, and significantly reduced tumor burden in immunodepressed mice [J]. Drug targeting, 2010, 18(9): 1-7.
- [12] Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors [J]. J Immunol, 2004, 173(5): 3148-3154.
- [13] Fifis T, Mottram P, Bogdanoska V, et al. Short peptide sequences containing MHC class I and/or class II epitopes linked to nano-beads induce strong immunity and inhibition of growth of antigen-specific tumor challenge in mice [J]. Vaccine, 2004, 23(2): 258-266.
- [14] Scheerlinck J P, Gloster S, Gamvrellis A, et al. Plebanski M. Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant [J]. Vaccine, 2006, 24(8): 1124-1131.
- [15] 张健鹏, 邹卫. 纳米活性炭在肿瘤外科的应用及在非小细胞肺癌手术廓清淋巴结的意义 [J]. 临床肺科, 2009, 14(6): 791-792.
- [16] 何萍, 吕凤林, 陈月, 等. 合成纳米铝佐剂及其对乙型肝炎、狂犬病毒辅佐效应的研究 [J]. 免疫学杂志, 2006, 22(1): 90-93.
- [17] 汤承, 岳华, 吕凤林, 等. 纳米铝佐剂诱导鸡提前产生抗 AIVH9 体液免疫应答 [J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2006, 32(5): 956-958.
- [18] Cox E, Verdonck F, Vanrompay D, et al. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa [J]. Vet Res, 2006, 37: 511-539.
- [19] Sanders M T, Brown L E. ISCOM-based vaccine: the second decade [J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83(2): 119-128.
- [20] Norell H, Poschke I, Charo J, et al. Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/neu together with low dose of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial [J]. J Transl Med, 2010, 8: 53-57.
- [21] Peter T, Eric J, Debbie T, et al. GM-CSF increases mucosal and systemic immunogenicity of an H1N1 influenza DNA vaccine administered into the epidermis of non-human primate [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11021.
- [22] Overton E T, Kang M. Immune response to hepatitis B vaccine in HIV-infected subjects using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as a vaccine adjuvant: ACTG study 5220 [J]. Vaccine, 2010, 28(34): 5597-5604.
- [23] Cheng Wen-fang, Hung C F, Chai C Y, et al. Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of herpes simplex virus type1 VP22 protein to antigen [J]. J Virol, 2001, 75: 2368-2376.
- [24] Cheng Wen-fang, Hung C F, Hsu K F, et al. Cancer immunotherapy using Sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion [J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(4): 553-568.
- [25] Zhao He-ping, Sun Jian-fu, Li Na, et al. Prime-boost immunization using alphavirus replicon and adenovirus vectored vaccines induces enhanced immune responses against classical swine fever virus in mice [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2009, 131(3-4): 158-166.
- [26] Sun Yuan, Li Hong-yu, Zhang Xing-juan, et al. Comparison of the protective efficacy of recombinant adenoviruses against classical swine fever [J]. Immunol Lett, 2011, 135(1-2): 43-49.
- [27] 刘家国, 胡元亮, 张宝康. 淫羊藿-蜂胶佐剂的免疫调节作用 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20(4): 383-385.
- [28] 赵恒章, 王天有, 李国旺. 鸡霍乱组织灭活苗的研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(5): 853-854.

(本文编辑: 赵晓岩)