

介质引发瀑布式炎症反应,从而促进 COPD 中的气道炎症发生发展^[9]。抗胆碱能药物正是通过阻断乙酰胆碱的作用来发挥抗炎作用,随着炎症得到改善,可以看到炎症细胞浸润减轻,炎症因子 TGF- β 1 下降及由 TGF- β 1 所激活的 pSmad-2/Smad-2 值的下降。另外本研究中通过 Western blot 法检测出干预组抗胆碱能药物治疗后, α -SMA 出现显著下降;病理切片 Masson 染色可以观察到相较于 COPD 模型组,肺组织胶原沉积明显减少,平滑肌组织增生情况也得到了改善,由此可推测抗胆碱能药物对气道重塑有一定的干预作用。综合实验结果分析,笔者认为其干预气道重塑的可能机制如下:①通过降低具有促气道重塑的炎症因子如 TGF- β 1 的产生来实现的;②通过直接阻断成纤维细胞及肌成纤维细胞上的胆碱能受体,从而拮抗乙酰胆碱的细胞增殖效应,抑制肌成纤维细胞的增殖,进一步抑制气道重塑的进展。本实验中干预组 α -SMA(肌成纤维细胞的表型)的显著降低从某种程度上也证实了这点。

综上所述,TGF- β 1 等参与了 COPD 病情的进展,并可能其通过 TGF- β 1/Smad 信号转导通路调控细胞增殖、分泌及凋亡,导致细胞外基质沉积增加、成纤维细胞增殖并发展为肌成纤维细胞、平滑肌细胞增殖并向合成型转变,从而在气道重塑中发挥重要作用。抗胆碱能药物通过阻断胆碱能受体,发挥抗炎效应^[5]。同时其又可通过阻断位于成纤维细胞、肌成纤维细胞表面的 M 受体拮抗 Ach 细胞增殖效应,或者通过抑制具有促重塑的炎症因子释放从而直接或

间接地干预气道重塑的进展^[10,11]。此为今后 COPD 临床治疗药物选择及开发新的靶点药物提供实验依据。有关各类炎症因子及相关受体相互作用关系、临床实际检测等仍待进一步研究。

参考文献

- 1 Brusasco V. Reducing cholinergic constriction: The major reversible mechanism in COPD[J]. EurRespir Rev,2006,15:32-36
- 2 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. [J]. Nature,2000, 405: 458-462
- 3 Barnes PJ. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Med,2004,117(Suppl 12A), 24S-32S
- 4 姚婉贞,王国扬. 慢性阻塞性肺疾病的气道毒蕈碱 M 受体变化与抗胆碱治疗的研究[J]中华结核和呼吸杂志,2005,28(7):484-485
- 5 ProfitaM, Giorgi RD, Sala A, *et al.* Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients [J], Allergy, 2005, 60: 1361-1369
- 6 宋一平,崔德健、茅培英,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(5):5-9
- 7 Sandford AJ. Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction [J]. Thorax, 2002,57(8): 736-741
- 8 Yamauchi K. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling [J] Allergol Int,2007,56(4): 321-329
- 9 Nicola AH, Amir S. Update on the pharmacologic therapy for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Clin Chest Med, 2007,28:589-607

(收稿日期:2014-03-01)

(修回日期:2014-03-26)

壳聚糖季铵盐对戊型肝炎病毒多肽疫苗免疫效果的研究

郑海群 陶 薇 何卓晶 傅 婷 陈 勇 洪 艳

摘 要 目的 研究壳聚糖季铵盐(3-氯-2-羟丙基三甲基壳聚糖,HTCC)作为免疫佐剂,对戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)多肽疫苗接种小鼠的免疫增强效果。**方法** IPTG 诱导重组质粒 pET28a-ORF23 在大肠杆菌 BL21 中表达 HEV 重组蛋白作为多肽疫苗,以 3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵(CTA)作为化学改性剂对壳聚糖进行接枝改性合成水溶性 HTCC 作为多肽疫苗佐剂。50 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 个免疫组,小鼠后腿肌内注射,共免疫 2 次,间隔 3 周。ELISA 检测 3 个免疫阶段鼠血清抗 HEV-IgG 抗体水平;末次免疫 5 周后,四色流式细胞术检测免疫小鼠全血中 CD4⁺、CD8⁺、IFN- γ ⁺ 和 IL-4⁺ 细

基金项目:浙江省公益技术研究社会发展项目(2011C23002);浙江省创新团队建设与人才培养项目(2011F20015)

作者单位:325035 温州医科大学检验医学院、生命科学院(郑海群、陈勇);310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所(陶薇、何卓晶、傅婷、洪艳);310053 杭州,浙江省医学高等专科学校(陈勇)

通讯作者:陈勇,电子信箱:cyong93@163.com;洪艳,电子信箱:hongy1008@163.com

胞的百分率;MTS 法检测小鼠脾脏 T 淋巴细胞的增殖反应。**结果** 加 HTCC 佐剂组的抗 HEV - IgG 抗体均显著高于不加佐剂组 ($P < 0.05$),其小鼠脾脏 T 淋巴细胞的蛋白刺激指数显著高于不加佐剂组 ($P < 0.05$)。各组间的 $CD4^+$ 细胞百分率无显著差异。加 HTCC 佐剂组的 $IFN - \gamma^+$ 细胞百分率显著高于不加佐剂组和两个阴性组 ($P < 0.05$),其 $IL - 4^+$ 细胞百分率显著低于不加佐剂组和两个阴性组 ($P < 0.05$)。**结论** 壳聚糖季铵盐对 HEV 重组多肽疫苗接种小鼠有一定的免疫加强效果。

关键词 壳聚糖季铵盐 戊型肝炎病毒 多肽疫苗 重组蛋白 流式细胞术

[中图分类号] R392 [文献标识码] A

Research of the Immune Effect of HTCC on Peptide Vaccine of HEV. Zheng Haiqun, Tao Wei, He Zhuojing, et al. The School of Laboratory Medicine and Life Science of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To study the strengthening effect of HTCC as an immune adjuvant on the immunization of mice with peptide vaccine of Hepatitis E virus (HEV). **Methods** As peptide vaccine of HEV, HEV recombinant protein was induced expression in Escherichia coli BL21 including recombinant plasmid pET28a - ORF23 by IPTG. As the immunoadjuvant, HTCC was synthesized by the grafting modification of chitosan and using 3 - chloro - 2 - hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride (CTA) as the chemical modifying agent. Fifty female BALB/c mice were randomly divided into five groups. Each mouse was immunized by muscle injection in the hind leg and was given an intensive vaccination after 3 weeks. Serum samples were assessed with ELISA to detect IgG. Five weeks after the last injection, $CD4^+$, $CD8^+$, $IFN - \gamma^+$ and $IL - 4^+$ cells in the whole blood were detected by four - colour flow cytometry, and mouse T lymphocyte proliferation was detected by MTS assay. **Results** The serum samples of the group added HTCC had a higher antibody titer than the group without HTCC in all three different immune period, which were statistically significant ($P < 0.05$), and the specific antigen stimulation index of mouse T lymphocyte proliferation of the group added HTCC was significantly higher than the group without HTCC ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the percentage of $CD4^+$ cell among groups. The percentage of $IFN - \gamma^+$ cell of the group added HTCC was higher than the group without HTCC and the two negative control groups ($P < 0.05$), and the percentage of $IL - 4^+$ cell of the group added HTCC was lower than the group without HTCC and the two negative control groups ($P < 0.05$). **Conclusion** HTCC has an effect of strengthening the immunization of mice with recombinant peptide vaccine of HEV to some extent.

Key words HTCC; Hepatitis E virus; Peptide vaccine; Recombinant protein; Flow cytometry

戊型肝炎病毒是戊型肝炎 (hepatitis E, HE) 的病原体,属于戊型肝炎病毒科 (Hepeviridae) 戊型肝炎病毒属 (Hepevirus)^[1]。HEV 广泛分布于全球,在经济水平低下、卫生基础设施差的地区尤为严重,常见于水源和食源污染时期。HE 已经成为当今发展中国家的主要肝炎之一,近年来发生率和病死率呈迅速上升趋势,严重危害人类健康。研制有效的疫苗对 HEV 感染的控制和预防显得尤为关键。多肽疫苗由于具有廉价、安全、特异性强、易保存和应用等优点成为研究热点。HEV 基因组为单股正链 RNA 病毒,大小约为 7.2kb,包括 3 个阅读框 (open reading frame, ORF): ORF1 编码与病毒复制相关的非结构蛋白、ORF2 编码病毒的衣壳蛋白、ORF3 编码一些特殊功能的蛋白^[2-4]。本实验室构建的重组质粒 pET28a - ORF23 包含的 ORF2 394AA ~ 660AA 基因序列和 ORF3 全部序列的,包含多个重要的抗原表位^[5,6]。

壳聚糖 (chitosan, CS) 是由自然界中的甲壳素经脱乙酰作用得到的,是天然多糖中带正电的高分子物质。CS 由于其良好的化学稳定性、无毒无害、优良的生物相容性和其产生的代谢产物无毒并能被生物体

完全吸收等优点近来被广泛研究和应用,但由于在水中溶解性较低其功能受到一定的限制。以 CS 为原料合成的壳聚糖衍生物具有良好的水溶性,其作为 DNA 疫苗的免疫佐剂的研究已经取得了一定的进展,其作为蛋白多肽类药物的载体系统起到缓释和持续释放作用^[7,8]。在本实验采用以 CS 为原料,CTA 为改性剂成功制备 HTCC^[9,10],并将 HTCC 作为免疫佐剂同戊肝重组多肽混合后免疫小鼠,通过检测重组多肽加入 HTCC 后免疫小鼠在体液免疫和细胞免疫方面的免疫指标,以评价 HTCC 作为戊肝重组多肽疫苗免疫佐剂的效果。

材料与方法

1. 主要材料:重组质粒 pET28a - ORF23 为浙江省医学科学院生物工程所构建和保存。清洁级 BALB/c 雌性小鼠购自浙江省实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK (沪) 2008 - 0016。壳聚糖购自青岛利中甲壳质公司;3 - 氯 - 2 - 羟丙基三甲基氯化铵 (CTA) 购自陕西大生有限公司;Ni - NTA His · Bind Resins 购自 Novagen 公司;Prestained Protein Marker 购自联科生物技术有限公司;HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;HRP 标记的兔抗人 IgG 购自 Boster 公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;离子霉素 (iono-

mycin), 佛波酯 (phorbol 12 - myristate 13 - acetate, PMA), 刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) 皆购自 Sigma 公司; 流式抗体 PerCP - CD4、APC - CD8a、FITC - IFN - γ 、PE - IL - 4 和流式固定破膜试剂盒购自美国 BD 公司; MTS 一步法细胞活力检测试剂盒购自 Promega 公司; 其他试剂为国产或进口分析纯试剂。

2. 实验方法: (1) HEV 重组蛋白的表达纯化、复性和鉴定: 在 200r/min, 37℃ 条件下 0.1mmol/L IPTG 诱导重组质粒 pET28a - ORF23 在大肠杆菌 BL21 表达 HEV 重组包涵体蛋白。超声后 12000r/min 离心 30min 获得包涵体蛋白沉淀。用含 3mol/L 尿素的洗涤液洗涤 3 次, 经 6mol/L 尿素溶解得到粗纯化的变性蛋白液, 按照 Novagen 公司的 Ni - NTA His · Bind Resins 说明书推荐方法纯化变性蛋白。纯化后的变性蛋白依次经尿素梯度复性液透析复性, 用适量聚乙二醇 20000 浓缩至原变性蛋白液的约 1/5 体积。取复性浓缩后的蛋白进行 SDS - PAGE 电泳分析, Bradford 法测定蛋白浓度。复性蛋白的免疫原性的鉴定: 以已知戊肝病人血清作为一抗和 HRP 标记的兔抗人 IgG 作为二抗进行 Western blot 法分析。(2) HTCC 的制备: 本实验室按照文献[9]以壳聚糖为原材料, 加入 CTA 为化学改性剂对壳聚糖进行接枝改性, 制备 HTCC。(3) 动物免疫: 50 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为以下 5 组: 加 HTCC 佐剂组 (1.5mg/ml HTCC, 0.2mg/ml HEV 重组蛋白)、阳性组 (弗氏佐剂, 0.2mg/ml HEV 重组蛋白)、不加佐剂组 (0.2mg/ml HEV 重组蛋白)、HTCC 组 (1.5mg/ml HTCC)、PBS 组。小鼠后腿肌内注射 200 微升/(只 · 次), 隔 3 周加强免疫 1 次, 剂量相同。

3. HTCC 增强 HEV 多肽疫苗免疫效果的检测: (1) 小鼠血清抗 HEV - IgG 抗体水平的检测: 各组小鼠初次免疫 2 周后、加强免疫 2 周和 5 周后分别断尾取血, 用间接 ELISA 法对血清中 HEV - IgG 抗体进行检测。100 微升/孔重组蛋白加入酶标板包被过夜; 次日加入封闭液, 37℃ 封闭 2h; 每孔先加入的样本稀释液 (含 5% 小牛血清) 95 μ l, 再加入待测血清 5 μ l, 37℃ 孵育 30min; 稀释度为 1:3000 的 HRP - 羊抗鼠 IgG 100 微升/孔, 37℃ 反应 30min; TMB 显色液 100 微升/孔孵育 10min; 2mol/L H₂SO₄ 终止显色后酶标仪检测 A₄₅₀。(2) 四色流式细胞术检测小鼠全血中 CD4⁺、CD8⁺、IFN - γ ⁺ 和 IL - 4⁺ 细胞的百分率: 加强免疫 5 周后的小鼠肝素抗凝全血加入完全 1640 培养液 (含 20ng/ml 佛波酯、1 μ mol/L 离子霉素和 0.7 μ l/ml 莫能霉素) 刺激培养 4h; 100 μ l 培养液加 2ml 红细胞裂解液室温裂解 10min 后离心; 加流式抗体 PerCP - CD4 和 APC - CD8a 室温避光孵育 15min, 染色缓冲液洗涤后离心; 加固定透化液室温避光孵育 20min, BD 缓冲液洗涤后离心; 加入流式抗体 APC - IFN - γ 和 PE - IL - 4 室温避光染色 30min, BD 缓冲液洗涤后离心; 加 PBS 500 微升/管重悬细胞, 上机检测。(3) 小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖反应的检测: 小鼠加强免疫 5 周后各组小鼠按常规方法制备脾脏细胞, 调节细胞浓度

至 5 × 10⁶ 个/ml, 细胞培养板 100 微升/孔。将细胞培养板分为 3 部分: 分别为特异性抗原刺激孔, 40 μ g/ml HEV 重组蛋白; 非特异性抗原刺激孔, 10 μ g/ml Con A; 对照孔, 1640 培养液。将细胞培养板置于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 68h, 加细胞活力检测试剂 40 微升/孔继续培养 4h, 酶标仪测 A₄₉₀ 值。计算刺激指数 SI = A₄₉₀ (刺激孔) / A₄₉₀ (细胞培养对照孔)。

4. 统计学方法: 所得各组结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 全部数据用 SPSS 20.0 软件进行 *t* 检验分析, 以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

1. HEV 重组蛋白的表达纯化和复性的鉴定结果: 重组质粒 pET28a - ORF23 在大肠杆菌 BL21 中经 IPTG 诱导, 成功表达 HEV 重组蛋白。重组蛋白经 NI 柱纯化、尿素梯度透析复性和 PEG20000 浓缩后达到浓度约为 400 μ g/ml (Bradford 法测定)。SDS - PAGE 电泳分析 (图 1) 复性蛋白, 可见清晰的目的蛋白条带。利用 Western blot 法 (图 2) 对复性浓缩后的蛋白做抗原特异性鉴定, 结果显示该 HEV 重组蛋白与已知戊型肝炎患者血清能发生特异性反应, 呈现抗原抗体结合条带, 此结果表明重组蛋白具有良好的抗原反应性和特异性。

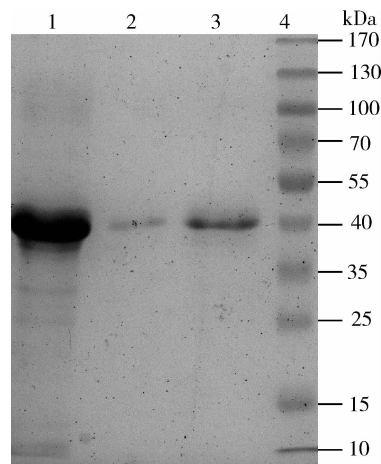


图 1 HEV 重组蛋白的表达纯化复性结果

1. 大肠杆菌培养液沉淀超声后 6mol/L 尿素溶解的变性蛋白;
2. Ni - NTA His · Bind Resins 纯化后的变性蛋白; 3. 经尿素梯度复性、PEG 浓缩后的有活性的重组蛋白; 4. 预染色蛋白标志物

2. 鼠血清中抗 HEV - IgG 抗体水平的检测: 经 SPSS 软件分析得加 HTCC 佐剂组在 3 个免疫阶段的抗 HEV - IgG 抗体水平高于不加佐剂组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 高于 HTCC 和 PBS 两个阴性组, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01, 表 1)。

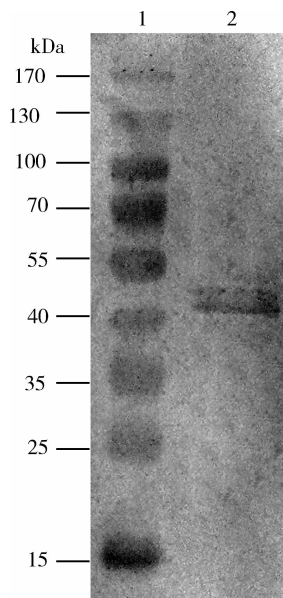


图2 复性蛋白的 Western blot 法检测结果

1. 预染色蛋白标志物;2. 复性蛋白的 Western blot 法检测结果

表1 特异性抗体效价($\bar{x} \pm s$)

组别	初免2周	加免2周	加免5周
加 HTCC 佐剂组	3.075 ± 0.189 *	3.205 ± 0.366 *	3.306 ± 0.205 *
阳性组	3.104 ± 0.245	3.284 ± 0.200	3.189 ± 0.194
不加佐剂组	2.718 ± 0.333	2.853 ± 0.191	2.702 ± 0.064
HTCC 组	0.167 ± 0.044 #	0.425 ± 0.057 #	0.180 ± 0.032 #
PBS 组	0.133 ± 0.058 #	0.424 ± 0.072 #	0.208 ± 0.047 #

与不加佐剂组相比, * $P < 0.05$; 与加 HTCC 佐剂组相比, # $P < 0.01$

3. T 细胞增殖反应的检测: 加 HTCC 佐剂组的 Con A 刺激指数和 HEV 重组蛋白的刺激指数均高于不加佐剂组、HTCC 组和 PBS 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 加 HTCC 佐剂组的 HEV 重组蛋白刺激指数高于阳性组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

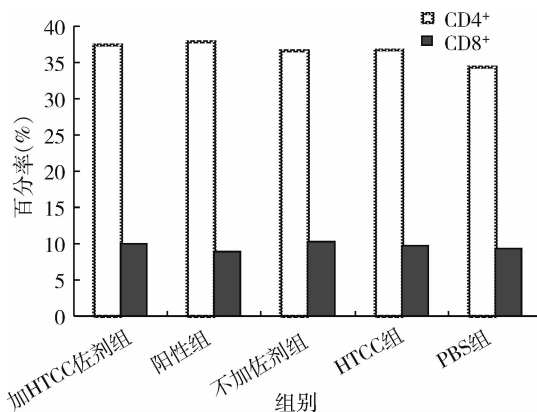
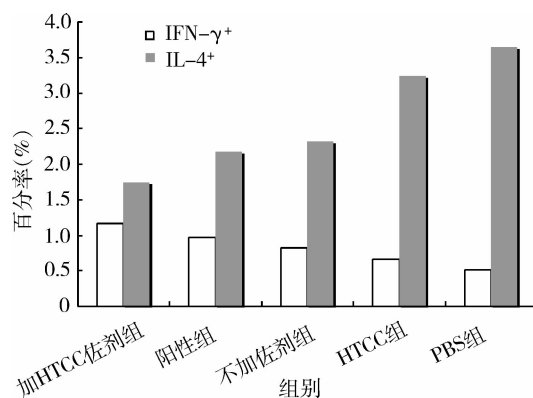
表2 T 细胞增殖反应检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Con A 刺激指数	HEV 重组蛋白刺激指数
加 HTCC 佐剂组	2.872 ± 0.228	2.942 ± 0.318 *
阳性组	3.157 ± 0.444	2.535 ± 0.405
不加佐剂组	2.440 ± 0.173 #	1.502 ± 0.161 #
HTCC 组	1.653 ± 0.168 #	0.961 ± 0.077 #
PBS 组	1.430 ± 0.258 #	0.919 ± 0.066 #

与加 HTCC 佐剂组相比, # $P < 0.01$; 与阳性组相比, * $P < 0.05$

4. 流式细胞术检测全血中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $IFN-\gamma^+$ 和 $IL-4^+$ 细胞的百分率结果显示, 加强免疫 5 周后的全血刺激培养液的四色流式检测结果显示, 加 HTCC 佐剂组的 $CD4^+$ 细胞的百分率略高于不加佐剂

组, 但各组间均无显著差异; 加 HTCC 佐剂组的 $IFN-\gamma^+$ 细胞百分率显著高于不加佐剂组、HTCC 组和 PBS 组 ($P < 0.05$); 加 HTCC 佐剂组的 $IL-4^+$ 细胞百分率显著低于不加佐剂组、HTCC 组和 PBS 组 ($P < 0.05$)。

图3 流式检测免疫小鼠全血中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞百分率图4 流式检测免疫小鼠全血中 $IFN-\gamma^+$ 和 $IL-4^+$ 细胞百分率

讨 论

壳聚糖作为天然的碱性多糖具有独特的生物特性已经被广泛研究和应用, 如作为多肽和蛋白质类药物载体、基因治疗载体、黏膜免疫佐剂的研究等^[10~15]。作为壳聚糖的衍生物, 水溶性壳聚糖季铵盐同时具有抗氧化、抗菌等性能, 比难溶性壳聚糖更大的应用空间。本实验采用的 HTCC 水溶性良好, 其性质和表征等已被熟知^[9,10]。壳聚糖以及其衍生物在肝炎疫苗中的应用已有报道。尹文国等对壳聚糖在乙肝病毒表面抗原疫苗中的应用进行了初步研究, 结果表明包封在壳聚糖微球中的 HBsAg 鼻腔免疫疫苗在到达黏膜组织前能有效地保持完整性, 壳聚糖微球可增强有效的鼻腔免疫。

目前关于壳聚糖及其衍生物作为 HEV 多肽类疫苗的研究尚无报道。本实验采用壳聚糖衍生物 HTCC 作为佐剂加入 HEV 重组蛋白一起免疫小鼠,获得了细胞免疫加强效果。加 HTCC 佐剂组的 IL-4 细胞百分率显著低于不加佐剂组 ($P < 0.05$),其小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖反应中的特异性抗原刺激指数显著高于阳性组 ($P < 0.05$)。HTCC 在 HEV 多肽疫苗的体液免疫中也有一定的加强免疫效果。

对于疫苗发挥其重要的免疫作用依赖于有效的疫苗佐剂,可以增强免疫系统对抗原或免疫原持久的、高强度的免疫应答反应。在本实验中加 HTCC 佐剂组与加弗氏佐剂的阳性组相比免疫效果上基本无显著性差异。弗氏佐剂通过与抗原形成“油包水”的乳化混合体能够有效刺激机体的体液免疫和细胞免疫应答,但在注射部位可能会引起炎症和溃烂等强烈的不良反应,故不适合用于制备疫苗。铝盐佐剂是最早被批准的可用于人的佐剂,但由于其对抗原类型的选择性和安全性限制了其应用。免疫刺激复合物 (immunostimulating complex, ISCOM) 对抗原具有选择性,只适应于含疏水性抗原。脂质体 (liposome) 作为疫苗佐剂具有安全性好,不良反应小,天然靶向性等优点,但其制备过程复杂、费用高一定程度上限制了其发展。CpG 类佐剂受自身结构的影响,具有种属差异性,其是否有作用依赖于个体遗传背景,高等动物之间遗传背景的差异限制了其作为人类佐剂的广泛应用。这些新兴的佐剂由于自身特性尚不能广泛生产和应用。

HTCC 作为壳聚糖的衍生物除具有壳聚糖的生物相容、细胞黏附性、安全性等优点,还具有比壳聚糖更高的溶解性。另外 HTCC 制备过程采用廉价的 CTA 为改性剂很大程度上降低了成本,适于广泛生产和应用。所以 HTCC 或壳聚糖的其他衍生物对于替代弗氏佐剂、铝盐佐剂和其他一些佐剂有很大的应用前景。本实验为壳聚糖衍生物作为疫苗佐剂尤其是作为肝炎多肽疫苗类的佐剂的研究和广泛应用奠定了基础。

参考文献

- 1 King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, *et al.* Virus taxonomy: the ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San

- Diego: Elsevier Science 2011;1021-1028
- 2 Tam AW, Smith MM, Guerra ME, *et al.* Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome [J]. Virology, 1991, 185(1): 120-131
- 3 Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, *et al.* Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(2): 559-563
- 4 Wang Y, Zhang H, Ling R, *et al.* The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3 [J]. J Gen Virol, 2000, 81(7): 1675-1686
- 5 Zhang H, Dai X, Shan X, *et al.* Characterization of antigenic epitopes of the ORF2 protein from hepatitis E virus genotype 4 [J]. Virus Res, 2009, 142(1): 140-143
- 6 Meng J, Dai X, Chang JC, *et al.* Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus [J]. Virology, 2001, 288(2): 203-211
- 7 傅婷, 洪艳, 陈勇, 等. 壳聚糖季铵盐 (HTCC) 载 HSV-2 型 DNA 疫苗 pgD 诱导小鼠免疫应答的初步研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(2): 205-207
- 8 徐淑芳, 徐咏梅, 陈建钢. 壳聚糖季铵盐纳米粒子的制备、表征及其缓释蛋白质药物性能 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2004, 50(06): 721-725
- 9 杨春生, 蔡照胜, 王锦堂, 等. CTA 季铵化壳聚糖合成条件的优化及其结构表征 [J]. 功能高分子学报, 2004, 17(4): 649-652
- 10 钟婧, 何卓晶, 陶薇, 等. 壳聚糖季铵盐作为基因递送载体的初步研究 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(12): 2373-2377
- 11 Pan Y, Li Y, Zhao H, *et al.* Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 249(1): 139-147
- 12 De Campos AM, Sánchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 224(1): 159-168
- 13 谢勇, 龚燕锋, 周南进, 等. 以壳聚糖为佐剂的幽门螺杆菌蛋白抗原对幽门螺杆菌感染的免疫保护作用 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(10): 813-818
- 14 Yang PT, Jia W, Skarsgard ED. In utero gene delivery using chitosan-DNA nanoparticles in mice [J]. Clinical Investigative Medicine, 2008, 31(4): S25
- 15 师秀敏, 赵忠鹏, 闫芳, 等. 壳聚糖黏膜佐剂促进黏膜免疫的研究进展 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2011, 36(2): 9-10

(收稿日期: 2014-02-26)

(修回日期: 2014-04-04)