

# 离子凝聚法制备负载流感疫苗的壳聚糖微球

石晶<sup>1,3</sup>, 鲍永利<sup>1</sup>, 乌垠<sup>2</sup>, 于春雷<sup>2</sup>, 李玉新<sup>2</sup>

(1. 东北师范大学细胞与遗传研究所; 2. 国家教育部农业与医药基因工程研究中心, 长春 130024;  
3. 长春长生基因药业股份有限公司, 长春 130012)

**摘要** 采用三聚磷酸钠(TPP)作为离子交联剂, 应用离子凝聚法制备负载流感疫苗的壳聚糖微球. 筛选出壳聚糖起始质量分数为1%. TPP的浓度对壳聚糖微球的制备影响较大, 采用低浓度的TPP(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )制备的微球放置过夜均出现沉淀现象, 高浓度的TPP(800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )在制备过程中出现絮状沉淀. 固化比影响微球的释放行为, 固化比为1:1的微球爆炸式释放率达到90%, 固化比为1:3的微球6 h后逐步释放, 12 h后释放率达到95%. 固化比为1:5的微球6 h后没有明显的释放行为. 壳聚糖溶液的pH对微球的制备和释放没有显著的影响. 通过对负载流感疫苗的壳聚糖微球的制备条件和释放行为的研究结果表明, pH=5.6的壳聚糖溶液, 固化比为1:3, TPP的质量浓度为400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 是较理想的流感疫苗壳聚糖微球的制备条件.

**关键词** 离子凝聚; 壳聚糖微球; 流感疫苗; 三聚磷酸钠

**中图分类号** O631

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2008)11-2308-04

流感是一种严重的呼吸道疾病, 目前使用的流感疫苗主要是皮下接种的灭活疫苗, 只能刺激机体产生IgG抗体, 不能刺激黏膜产生分泌型IgA抗体, 降低了流感疫苗的保护作用. 寻找一种黏膜传输系统是目前国内外流感疫苗研究的热点问题<sup>[1]</sup>. 壳聚糖(CTS)是一种天然大分子化合物, 其来源广泛, 具有良好的生物相容性和体内可降解性以及毒性极小等优点<sup>[2]</sup>. 壳聚糖可形成缓释微球达到缓释目的, 又因其本身能刺激活化免疫细胞, 是一种具有很大潜力的黏膜免疫缓释材料和免疫佐剂.

离子凝聚是采用单凝聚和离子凝胶相结合的方法, 首先在高分子囊材溶液中加入凝聚剂, 使囊材溶解度降低, 再利用两相混合物的离子凝结形成壳聚糖微球. 本研究应用离子凝聚法制备流感疫苗黏膜传递系统的壳聚糖微球, 并对制备条件、微球的释放行为和表征进行了初步的研究, 为建立流感疫苗壳聚糖微球传递系统提供依据.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

乙酸、三水合乙酸钠、氯化钠、无水硫酸钠、聚三磷酸钠均为国产分析纯试剂; 壳聚糖购于浙江金壳生物化学有限公司, 等级 $M \geq 200000$ , 批号D05022123; 流感病毒标准抗原、抗体(英国NIBSC); 流感亚单位疫苗为长春长生基因药业公司制备, 批号20070502.

G-25 恒温摇床(美国NBS公司); S-6000 扫描电镜(日本日立公司); Malvern instrument Ltd., 3000HSGA 粒度分析仪(美国科美公司); Delta 320 型pH计(法国梅特勒公司).

### 1.2 实验过程

1.2.1 壳聚糖浓度的筛选 准确称量一定量的壳聚糖粉末加入注射用水, 高速乳化混匀, 分别配制

收稿日期: 2008-04-23.

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划项目基金(批准号: NCET-06-0320)和东北师范大学科技创新项目基金(批准号: NENU-STB07008)资助.

联系人简介: 李玉新, 男, 教授, 博士生导师, 从事基因工程药物研究, E-mail: liyx486@nenu.edu.cn;

鲍永利, 女, 教授, 博士生导师, 从事基因工程药物研究, E-mail: baoyl800@nenu.edu.cn

成质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 及 2.5% 的乳浊液, 根据其溶解性、流动性、黏稠度筛选适合的质量分数。

1.2.2 壳聚糖微球的制备 利用不同 pH 值(4.8, 5.2, 5.6)的醋酸缓冲溶液稀释质量分数为 1% 的壳聚糖溶液至 0.2% (CTS-0.2%)。取流感亚单位疫苗样品 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  与 50 mmol/mL 硫酸钠溶液混合, 按不同固化比加入 CTS-0.2%, 并在快速混匀器上振荡, 在振荡过程中滴加三聚磷酸钠, 终质量浓度分别为 200, 400 和 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按固化比含有硫酸钠的疫苗样品与壳聚糖溶液的比值 1:1, 1:3, 1:5 在不同的 pH 条件下分别制作载药壳聚糖微球。在 4~8  $^{\circ}\text{C}$  隔夜放置, 观察状态。

1.2.3 壳聚糖微球的表征 取 3 mL 壳聚糖微球(壳聚糖溶液 pH = 5.6, 固化比为 1:3, TPP 的质量浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 加入适量的生理盐水稀释, 调整透光度, 用粒度分析仪测定粒径的大小。分别取一滴释放前后的壳聚糖微球混悬液, 涂在盖玻片上, 室温下晾干, 喷金后用扫描电镜在加速电压 5~15 kV 下观察。

1.2.4 壳聚糖微球的释放 取 pH = 5.6 的不同固化比(1:1; 1:3; 1:5)的载药壳聚糖微球以 1200 r/min 速度离心 20 min, 加适量的生理盐水重悬, 分别置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床(100 r/min)振荡, 在 1~12 h 之间的不同时间间隔内取样, 用单向免疫扩散方法测定上清液中血凝素的含量, 按下式计算释放率:

$$\text{释放率} = (\text{游离血凝素含量} / \text{血凝素总含量}) \times 100\%$$

取固化比为 1:3 的不同 pH 值(4.8, 5.2, 5.6)的载药壳聚糖微球按上述方法测量其释放率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳聚糖浓度的筛选

壳聚糖即脱乙酰壳多糖, 是壳多糖在碱性条件下脱乙酰基的水解产物。在碱性和中性条件下溶解性很低, 在高速乳化作用下可形成乳浊液, 其溶解性、流动性和黏稠性与壳聚糖的浓度有直接关系。通过表 1 实验筛选出质量分数 1% 作为壳聚糖的起始工作浓度。

Table 1 Comparison of chitosan emulsion in different concentration\*

Item	Mass fraction of chitosan emulsion(%)				
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Solubility	+	+	-	-	-
Flowability	+	+	+	+	+
Viscosity	-	-	-	+	+

\* “+” Expresses that solubility, flowability and viscosity are higher; “-” expresses that solubility and viscosity are lower.

### 2.2 实验条件对壳聚糖微球的影响

在载药壳聚糖微球的制备过程中, 三聚磷酸钠的质量浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 固化比为 1:1, 1:3 和 1:5 时, 在所选的 3 种 pH 值条件下, 制备的载药微球均为均一乳白色悬浊液, 隔夜放置后用肉眼观察形态未有改变。当三聚磷酸钠的质量浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 微球均为乳白色悬浊液, 隔夜放置后产生沉淀, 上清液澄清。当三聚磷酸钠的质量浓度为 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时产生絮状沉淀。可见三聚磷酸钠的浓度对微球的形成有较大的影响, 浓度低时不利于成球, 浓度过高则会使得微球絮凝团聚。固化比和 pH 值则对微球的形成没有显著影响。

### 2.3 壳聚糖微球的物性表征

用扫描电镜观察载药微球的表面形貌, 证实微球分散均匀, 未发生团聚(图 1)。平均粒径为 984 nm。释放药物后的微球表面依然光滑, 形貌也以球形为主, 有部分聚合现象, 由此表明药物释放的机理为微球表面大分子链的松弛导致的药物扩散或非氢键的解吸过程。

### 2.4 壳聚糖微球的释放行为

以不同固化比绘制释放曲线(图 2), 由图 2 可见, 低的固化比具有较高的原始释放率, 随着固化比的提高, 原始释放率降低。说明随着固化比的提高, 壳聚糖微球更加紧密, 流感抗原泄漏率越低。3 种微球的爆炸式释放均在 6 h 之内完成, 固化比为 1:1 的微球爆炸式释放率达到 90%, 其它两种微球释放率分别为 74% 和 55%。固化比为 1:3 的微球, 6 h 后逐步释放, 12 h 后释放率达到 95%。固化比为

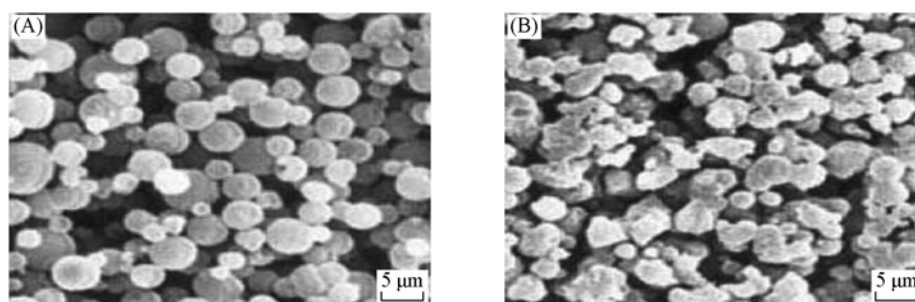


Fig. 1 SEM images of surface visualization of the chitosan microparticles before (A) and after (B) the release

1:5的微球6 h后没有明显的释放行为. 说明在微球形成的过程中,壳聚糖微球是以两种形式负载流感抗原蛋白的,一种是将抗原蛋白直接包裹在微球内,另一种是活性蛋白通过静电引力吸附在微球表面,负载抗原蛋白微球的释放是两种负载形式释放的叠加结果.

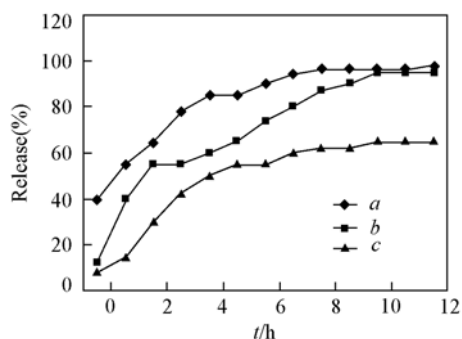


Fig. 2 Influence of cross-linking ratio on release behavior

Cross linking ratio: a. 1:1; b. 1:3; c. 1:5.

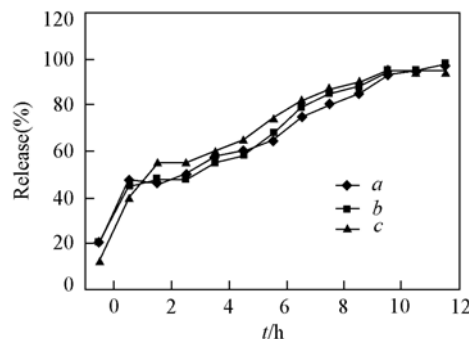


Fig. 3 Influence of pH on release behavior

pH: a. 4.8; b. 5.2; c. 5.6.

释放过程中出现初期的爆炸式释放称为突释现象,其原因主要是吸附在微粒表面或通过比较弱的键与微粒连接的药物在较短的时间内脱落而造成的,而不是载体中包载的药物的释放<sup>[3]</sup>. 由在不同pH时绘制的释放曲线(图3)可见,壳聚糖溶液的pH值的变化对释放行为没有显著的影响.

壳聚糖具有生物可降解性和低毒性,同时可加强延迟性免疫反应(DTH)和T细胞反应. 许多学者将其用于疫苗抗原的黏膜传递试验<sup>[4~7]</sup>. Read等<sup>[8]</sup>和 Ghendon等<sup>[9]</sup>报道壳聚糖能够增强流感疫苗的黏膜免疫效果. 本文采用离子凝聚法制备负载流感病毒抗原的壳聚糖微球,将应用于流感黏膜免疫的研究. 此种制备方法可以避免在壳聚糖微球化学交联<sup>[10]</sup>过程中引入有毒的有机试剂和不必要的影响,最大程度地保护疫苗抗原的活性.

三聚磷酸钠(TPP)的浓度对微球的形成有较大的影响,浓度低时不利于成球,并出现沉淀,浓度过高则会使得微球絮凝团聚. 带有离子凝聚剂的样品与壳聚糖溶液的固化比例对微球的形成影响不大,但对微球的释放行为影响明显. 固化比为1:5的微球在12 h内的释放率仅为65%,固化比为1:1微球原始的释放率达到40%,不稳定. 上述研究结果表明,pH=5.6的壳聚糖溶液,固化比为1:3,三聚磷酸钠(TPP)的质量浓度为400 μg/mL是较理想的流感疫苗壳聚糖微球的制备条件.

## 参 考 文 献

- [1] LV Jin (吕进). International Journal of Immunology (国际免疫学杂志) [J], 2007, **30**(2): 125—129
- [2] Kumar M. N. V. R.. React. Funce. Polym. [J], 2000, **46**(4): 1—27
- [3] Jain R. A.. Biomaterials [J], 2000, **21**(23): 2475—2490
- [4] Ahire V. J., Sawant K. K., Doshi J. B., et al.. Drug Dev. Ind. Pharm. [J], 2007, **33**(10): 1112—1124
- [5] Kang M. L., Jiang H. L., Kang S. G., et al.. Vaccine [J], 2007, **25**(23): 4602—4610
- [6] Lameiro M. H., Malpique R., Silva A. C., et al.. Biotechnol. [J], 2006, **126**(2): 152—162

- [ 7 ] Illum L. , Jabbal-Gill I. , Hinchcliffe M. , *et al.* . Adv. Drug. Deliv. Rev. [J] , 2001 , **51**(1—3) : 81—96
- [ 8 ] Read R. C. , Naylor S. C. , Potter C. W. , *et al.* . Vaccine[J] , 2005 , **23**(35) : 4367—4374
- [ 9 ] Ghendon Y. , Markushin S. , Krittsov G. , *et al.* . Arch. Virol. [J] , 2008 , **2** : 831—837
- [10] LIN You-Wen(林友文) , CHEN Qin(陈庆) , LUO Hong-Bin(罗红斌) . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2007 , **28**(1) : 183—187

## Preparation of Influenzal Vaccine Chitosan Microparticles by Ionic Gelation Method

SHI Jing<sup>1,3</sup> , BAO Yong-Li<sup>1\*</sup> , WU Yin<sup>2</sup> , YU Chun-Lei<sup>2</sup> , LI Yu-Xin<sup>2\*</sup>

(1. *Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University,*

2. *Research Center of Agriculture and Medicine Gene Engineering of Ministry of Education, Northeast Normal University, Changchun 130024, China;*

3. *Changsheng Gene Pharmaceutical Co. Ltd. , Changchun 130012, China)*

**Abstract** Influenzal vaccine chitosan microparticles were prepared with tripolyphosphate (TPP) by ionic gelation method. The working mass fraction of chitosan was 1%. Morphologies of chitosan microparticles were affected by concentration of TPP, lower concentration of TPP (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) made the microparticle solution give sediment overnight, Whereas, higher concentration of TPP (800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) made microparticles gather together. The release of vaccine from chitosan microparticles decreased when cross-linking ratio increased. The pH of chitosan solution had no effect on morphologies and release behavior. The results indicate that pH = 5.6, cross-linking ratio 1:3, mass concentration of TPP 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  are the optimum conditions to prepare influenza vaccine chitosan microparticles *via* morphologies and release behavior.

**Keywords** Ionic gelation; Chitosan microparticles; Influenza vaccine; Sodium tripolyphosphate

(Ed. : D, Z)