

卵清蛋白-PLGA 抗原微球脉冲释放系统的研究

曾魁, 李军*, 黄霞

(海南大学 海洋学院 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228)

[摘要]目的: 以 OVA 为模型抗原研制具有脉冲释放特性的 OVA-PLGA 微球并对其在小鼠体内的免疫效果进行评价。方法: 复乳法研制 OVA-PLGA 微球; 光学显微镜和电子显微镜法研究微球的形态、粒径和粒径分布; Bradford 法测定微球的载药量和包封率; 微量溶出度测定法研究微球的体外释放规律; 按注射剂的要求研制含 OVA-PLGA 微球的混悬型注射剂; 小鼠皮下注射法研究 OVA-PLGA 微球的体内免疫效果。结果: 不同的 PLGA 材料制成的 OVA 微球的适当组合具有两段式或三段式脉冲释放的特性; 小鼠皮下单剂注射 OVA 抗原微球优于单剂注射 OVA 铝佐剂抗原。结论: OVA-PLGA 微球脉冲释放系统单剂注射后可产生较高水平的抗体反应。

[关键词]卵清蛋白; PLGA; 微球; 脉冲释放

[中图分类号]TQ

[文献标识码]A

[文章编号]1007-1865(2011)11-0010-02

Study on Ovalbumin-PLGA Antigen Microspheres Pulsatile Release System

Zeng Kui, Li Jun*, Huang Xia

(Hainan University of Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, the Ocean College of Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Aim: OVA was regarded as antigen model to develop OVA-PLGA microspheres with characteristics of pulsatile release, and immune effect of OVA-PLGA microspheres was evaluated in rats. Methods: OVA-PLGA microspheres were developed using double emulsion method; morphology, size and size distribution was studied by optical and electron microscopy; drug loading and encapsulation efficiency was determined by Bradford method; release of microspheres in vitro was studied by trace dissolution rate determination; OVA-PLGA suspension for injection was developed according to the requirements of injection; immune effect of OVA-PLGA microspheres were studied by subcutaneous injection in rats. Results: Appropriate combination of OVA microspheres made of different PLGAs had pulsatile release characteristics. Subcutaneous injection of OVA antigen microspheres in rats produced better immune response than that of OVA aluminum adjuvant antigen. Conclusion: Single dose injection of OVA-PLGA microspheres pulsatile system can produce higher level antibody response.

Keywords: OVA; PLGA; microsphere; pulsatile release

近年来, 蛋白微球的制备引起了广泛的重视。用可生物降解的材料制备的荷载药物、多肽、蛋白和抗原的微球传递系统不仅可以防止降解, 亦同时可以控制释放。已经使用和评价过的生物相容的可生物降解的聚合物材料包括聚乳酸(poly(lactide), PLA)、乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-DL-lactide-co-glycol, PLGA)、乳酸-聚乙二醇共聚物(poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol), PELA)、聚酸酐(polyanhydride)、聚氰基丙烯酸酯(poly(alkylcyanoacrylates), PACA)等^[1]。亮丙瑞林等多肽类抗癌药物的 PLGA 和 PLA 微球制剂已上市, 可缓释 1~4 个月。传统的灭活疫苗和新型的基因重组亚单位疫苗、合成肽疫苗由于免疫原性弱, 需多次注射方能产生有效的免疫保护作用。基于可生物降解聚合物的微粒、纳米粒疫苗递送系统的开发使用可以减少免疫次数, 提高免疫效果。

本研究以 PLGA 为材料, 以 OVA 为抗原模型, 研制具有脉冲释放特性的微球制剂, 以期通过单剂注射完成全程免疫, 这在理论上和实践上均具有重要的探索价值。

1 材料与仪器

1.1 材料

OVA 生工生物(上海)有限公司;
PLGA 济南岱罡生物科技有限公司。

1.2 仪器

激光微粒分析仪 ZWF-J6 天津天河医疗仪器有限公司;
紫外可见分光光度计 UV-2450 岛津;
电子天平 CAV214C 奥豪斯;
显微镜 YS100 尼康;
pH 计 DELTA320 梅特勒-托利多;
可调高速匀浆机 FSH-2 型 常州澳华仪器有限公司;
超声波细胞粉碎机 JYD-900 上海之信仪器有限公司;
真空冷冻干燥机 FDU-1200 TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD;
制冰机 SIM-F140 三洋;
酶标仪 VMax Molecular Devices Corporation。

1.3 动物

昆明种小白鼠, 体重约 16~18 g, 购自广东医学实验动物中心。

2 方法与结果

2.1 OVA-PLGA 微球制备工艺研究

采用复乳法制备 OVA-PLGA 微球。将 OVA 溶于纯水中制成适当浓度的溶液作为水相, 将 PLGA 溶于二氯甲烷中制成适当浓

度的溶液作为油相。将水相和油相按一定比例混合, 超声乳化得 W/O 型初乳。将初乳加入含亲水性乳化剂 PVA 的水中, 高速搅拌制得 W/O/W 型复乳。将此 W/O/W 型复乳置磁力搅拌器上继续搅拌至二氯甲烷挥干, PLGA 即逐渐固化形成微球。

2.2 OVA-PLGA 微球的质量评价

2.2.1 微球的粒径和粒径分布

采用光学显微镜观察微球的形态、大小, 测定 500 个微球的粒径, 再经统计分析得出微球的粒径分布。

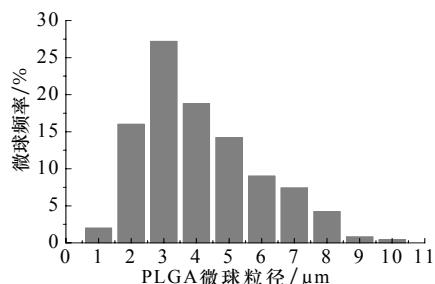


图 1 OVA-PLGA(50:50)微球粒径分布图

Fig.1 OVA-PLGA (50:50) microspheres particle size distribution

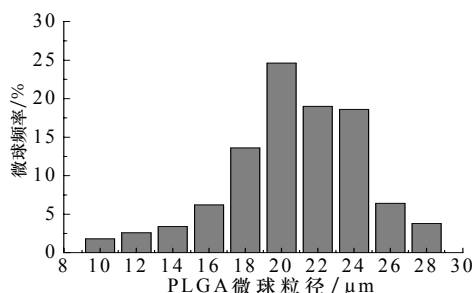


图 2 OVA-PLGA(75:25)微球粒径分布图

Fig.2 OVA-PLGA (75:25) microspheres particle size distribution

[收稿日期] 2011-07-11

[项目基金] 热带生物资源教育部重点实验室开放基金; 海南大学 211 工程研究生创新平台专项资金

[作者简介] 曾魁(1987-), 男, 湖南人, 硕士, 主要研究方向为药物新剂型和新技术。*为通讯作者。

微球的粒径如图1和图2所示,两种微球的粒径均成偏正态分布,分布范围较窄,平均粒径分别如图1和图2所示。

2.2.2 微球的形态

将微球放在贴有双面胶的金属板上,喷金后在扫描电子显微镜下观察 OVA-PLGA 微球的形状和表面形态。从图3可以看出,微球形态圆整,表面光滑。

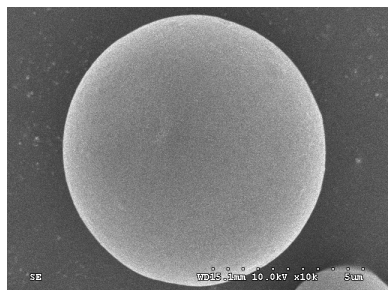


图3 OVA-PLGA 微球的扫描电镜照片(×10 K)
Fig.3 OVA-PLGA microspheres scanning electron micrograph(×10 K)

2.2.3 OVA 含量测定方法

采用 Bradford 法建立 OVA 含量测定的标准曲线和回归方程。

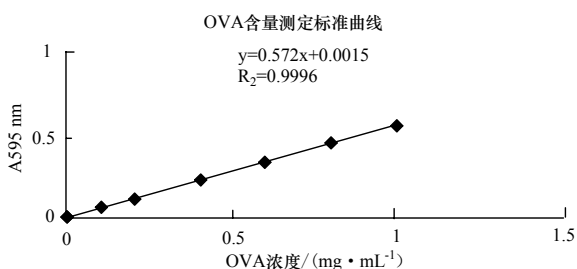


图4 OVA 含量测定标准曲线与回归方程
Fig.4 OVA assay standard curve and regression equation

2.2.4 微球载药量和包封率的测定

取冻干微球约 10 mg,精密称定,加入 4 mL 含 5% SDS 的 NaOH 溶液,37 °C 恒温震荡 24 h,使微球完全溶解。离心后取上清液,用紫外分光光度法测 OVA 含量。按如下公式计算微球的载药量和包封率:

$$\text{微球载药量} = \frac{\text{冻干微球中 OVA 总量}}{\text{冻干微球重量}} \times 100\%$$

$$\text{微球包封率} = \frac{\text{冻干微球实际载药量}}{\text{冻干微球理论载药量}} \times 100\%$$

经测定,微球的载药量为 2.19% 和 2.35%,包封率为 85.2% 和 81.6%。

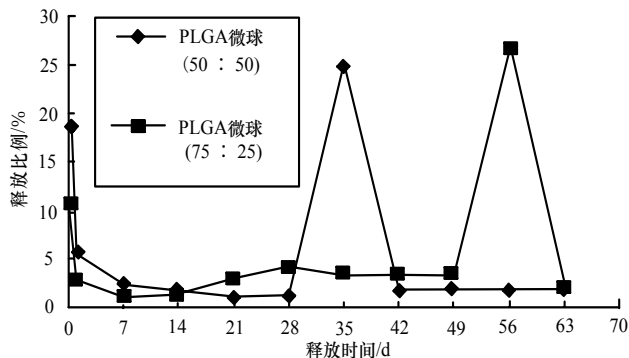


图5 抗原微球体外释放曲线
Fig.5 Antigen in vitro release profile of microspheres

2.2.5 微球体外释放研究

取冻干微球 10 mg,悬浮于 0.2 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,37 °C 恒温缓慢震荡。定时取样,取样后补加等量的磷酸盐缓冲溶液,继续震荡。上清液用紫外分光光度法测定含量。

PLGA 微球的体外释放如图5所示,在研究的时间内可观察到脉冲释放分别出现在抗原微球注射后的首日、35日和56日。

2.2.6 小鼠体内免疫研究

取小鼠 24 只,随机均分成 3 组,每组 8 只。第一组为阳性对照组,在小鼠皮下注射铝胶吸附的 OVA 抗原(40 μg/mL)0.1 mL。第二组为阴性对照组,在小鼠皮下注射灭菌生理盐水 0.1 mL。第三组为微球抗原试验组,将 OVA-PLGA 微球悬浮于灭菌生理盐水中制成混悬型抗原注射液,其中 OVA 的含量为(40 μg/mL),小鼠皮下注射微球抗原混悬液 0.1 mL。所有小鼠由眼眶后静脉丛取血,分离血清。采血时间为首次免疫后的第 1 周和第 9 周。血清中抗 OVA 抗体的滴度由间接 ELISA 法测定。

抗体测定结果见图6,在单剂注射免疫 1 周后,OVA 铝佐剂抗原与 OVA 微球抗原均产生了较低水平的抗体,但到第 10 周测定时,OVA 微球抗原产生了高水平的抗体,而 OVA 铝佐剂抗原产生的抗体水平则下降了。

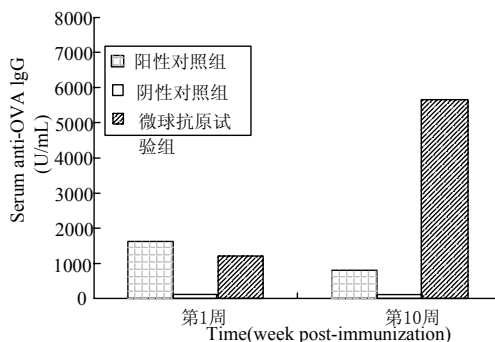


图6 动物血清抗 OVA IgG 反应
Fig.6 Anti-OVA IgG response in serum

3 讨论

OVA-PLGA(50:50)微球与 OVA-PLGA(75:50)微球具有不同的释放特性,前者释放较快,而后者释放较慢,这是因为这两种微球的基质材料组成不同,PLGA(50:50)中聚羟基乙酸(PGA)的含量较高,易于降解,故微球中包裹的蛋白释放较快,产生的免疫期较短,后者产生的免疫期较长,将这两种微球按适当的比例组合,则能够实现多次脉冲释放的效果,从而可能实现微球抗原单剂免疫达到普通抗原多次免疫的效果。

OVA-PLGA 微球采用复乳法制备。经过工艺优化制备的微球,表面光滑,能产生较多的突释。突释对于蛋白药物微球制剂来说是需要竭力避免的,但对抗原微球来说倒是可资利用的优点。抗原微球在体内能够缓慢、持续地刺激免疫应答。实验证明,单剂注射的抗原微球的免疫效果优于单剂注射的铝佐剂抗原。微球除了可以控制抗原释放,同时具有佐剂效应。抗原微球的佐剂效应与微球的粒径大小有关,到底是微粒抗原效果好,还是纳米粒抗原效果好,尚存争议,需进一步研究^[2]。抗原的释放模式有先脉冲后连续释放和脉冲释放两种,至今对哪种抗原释放模式最适合一次性免疫,尚未有定论,需进一步深入研究^[3]。

参考文献

- [1] Shi Y, Huang G. Recent developments of biodegradable and biocompatible materials based micro/nanoparticles for delivering macromolecular therapeutics[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2009, 26(1): 29-84.
- [2] Mose O Oyewumi, Amit Kumar, Zheng C R. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses[J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(9): 1095-1107.
- [3] 陈庆华, 张强. 药物微囊化新技术及应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 120-122.

(本文文献格式: 曾魁, 李军, 黄霞. 卵清蛋白-PLGA 抗原微球脉冲释放系统的研究[J]. 广东化工, 2011, 38(11): 10-11)