

流感疫苗壳聚糖脂质体的制备工艺

乔建斌, 陈娜, 李强, 李培辉, 晏和贵, 鲁卫东

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 在流感疫苗脂质体的基础上制备壳聚糖脂质体载药微粒, 建立流感疫苗壳聚糖脂质体的制备工艺. **方法** 采用薄膜分散法制备流感疫苗脂质体, 以不同 N/P 比(壳聚糖中的氮和卵磷脂中的磷比值)制备壳聚糖载药微粒. 观察形态并测定其平均粒径、粒度分布、包封率与结合率. 通过对比不同 N/P 比制备壳聚糖载药微粒的包封率与结合率等指标, 确定流感疫苗壳聚糖脂质体的制备工艺. **结果** 流感疫苗脂质体形态均呈圆或椭圆形, 粒度分布较均匀, 壳聚糖包覆后脂质体仍为圆形, 平均粒径由 2.14 μm 增加到 4.05 μm . 壳聚糖包覆前后流感疫苗脂质体平均包封率由 80.41% 变为 84.37%. 比较 6 种不同 N/P 比流感疫苗壳聚糖脂质体的结合率, 当 N/P 为 5:1 时, 为壳聚糖与脂质体孵育的最佳比例, 结合率为 19.40%. **结论** 壳聚糖包覆后脂质体仍接近圆形, 粒径增加, 包封率提高, 当 N/P 为 5:1 时, 为壳聚糖与脂质体孵育的最佳比例.

[关键词] 流感疫苗; 脂质体; 壳聚糖; 包封率; 结合率

[中图分类号] R186 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 04 - 0038 - 03

Study on Preparation of Chitosan Coated Influenza Vaccine Liposome

QIAO Jian-bin, CHEN Na, LI Qiang, LI Pei-hui, YAN He-gui, LU Wei-dong

(School of Pharmacy & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To prepare chitosan microparticles based on influenza vaccine liposome, and determine the preparation technology of chitosan liposome vaccine. **Methods** We prepared chitosan microparticles with different N/P ratio based on influenza vaccine liposomes which were produced by film dispersion method. Then we observed the morphology and determined the average particle size and particle size distribution, entrapment efficiency and the binding rate. By comparing the encapsulation rate and binding rate of different N/P ratio chitosan nanoparticles, the preparation technology of chitosan liposome vaccine was preliminary determined. **Results** Influenza vaccine liposomes coated with chitosan were round or oval with uniformed particle size distribution. The average particle size increased from 2.14 μm to 4.05 μm , and the average encapsulation rate increased from 80.41% to 84.37% after coated liposomes with chitosan. By comparing 6 N/P ratio, the ration of 5:1 was the best ratio in terms of binding rate which was 19.40%. **Conclusions** Chitosan coated liposomes is circular with increased particle size and encapsulation rate. 5:1 ratio of N/P is the optimum proportion concerning the incubation of chitosan and liposome.

[Key words] Influenza vaccine; Liposomes; Chitosan; Entrapment efficiency; Binding rate

脂质体作为药物载体具有靶向性与缓释性, 能降低药物给药量, 减轻药物毒性, 提高药物稳定性, 然而脂质体也存在一些问题, 如阳离子脂质

体具有一定细胞毒性, 中性和阴性脂质体与细胞亲和力差, 且贮存过程中存在粒径变大、絮凝、渗漏的问题. 壳聚糖是一种带正电荷的多糖, 具有

[作者简介] 乔建斌 (1989~), 男, 山东新泰市人, 在读硕士研究生, 主要从事疫苗新型佐剂研究工作.

[通讯作者] 鲁卫东. E-mail: lwdsx@163.com

亲水性、生物相容性好、低毒等特点。利用壳聚糖修饰脂质体, 不仅对药物有保护和促渗作用, 还可以提高药物的缓释性, 增加靶向性, 同时可降低阳离子脂质体的毒性。本课题主要以大豆卵磷脂, 胆固醇为原料, 采用薄膜分散法制备流感疫苗脂质体, 在流感疫苗脂质体的基础上制备壳聚糖载药微粒, 建立流感疫苗壳聚糖脂质体的制备工艺。

1 材料与方法

1.1 实验材料

裂解型流感灭活疫苗单价液 (H1N1) ((HA) 含量为 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 云南沃森生物技术股份有限公司提供), 大豆卵磷脂 PC-50 (北京美亚斯磷脂技术有限公司), 胆固醇 (上海新兴化工试剂研究所), BSA (美国 Sigma), Folin 酚蛋白定量试剂盒 (北京鼎国生物技术有限公司), 无水乙醇、无水碳酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、酒石酸钾、硫酸铜, 蔗糖等其余试剂均为市售分析纯。

1.2 实验仪器

1.3.3 孵育法制备流感疫苗壳聚糖脂质体冻干粉^[4-7] 取流感疫苗脂质体与适量壳聚糖溶液于 10 $^{\circ}\text{C}$ 混合孵育 1 h。做 6 种不同 N/P 比的壳聚糖脂质体, 使壳聚糖中的氮和卵磷脂中的磷比值 (N/P) 分别为 1:4; 1:2; 1:1; 2:1; 4:1; 5:1 (卵磷脂平均分子量以 780 计, 壳聚糖单体分子量以 160 计, 1mol 卵磷脂和壳聚糖的 N/P 为 1:1)。

1.3.4 流感疫苗壳聚糖脂质体形态观察 室温下

$$\text{脂质体包封率 (En\%)} = \frac{\text{总蛋白量} - \text{游离蛋白量}}{\text{总蛋白量}} \times 100\%$$

LabconcoR 4.5L 冷冻干燥机 (美国 Labconco), RE-52AA 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生物仪器厂), SHB-III S 型循环水式多用真空泵 (郑州长城), EL204 型电子天平 (上海梅特勒-托利多), 超低温冰箱 (日本三洋), 紫外可见分光光度计 (UV7501), DHG 电热鼓风干燥箱 (上海一恒), PB-10 型 pH 酸度计 (德国 Sartorius 公司), Z300K 型台式高速低温离心机 (德国 Hemle), Motic B5 型数码电子显微镜 (厦门麦克奥迪)。

1.3 实验方法

薄膜分散法制备流感疫苗脂质体冻干粉^[1-3]。

采用薄膜分散法制备流感疫苗脂质体冻干粉。

1.3.1 流感疫苗脂质体形态观察 取制得的流感疫苗脂质体冻干粉少量复溶, 在数码电子显微镜 (Oil, 100x) 下观察其形态, 并用 Nano Measurer 软件测定其平均粒径和粒径分布情况。

1.3.2 流感疫苗脂质体包封率的测定 采用低温超速离心法测定包封率。于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 1 h, 分离游离药物与脂质体, 以 Lowry 蛋白测定法测定未离心前样品的总药物量和离心后上清液的游离药物量, 计算包封率:

用 Motic B5 型数码显微镜 (Oil, 100x) 观察脂质体形态, 并用 Nano measurer 1.2 软件对脂质体的粒径进行分析, 测定其平均粒径和粒径分布。

1.3.5 流感疫苗壳聚糖脂质体包封率与结合率测定 流感疫苗脂质体壳聚糖于冷冻超速离心机中以 40 000 r/min 离心 3 h, 收集上清。以蒸馏水-茚三酮为参比在 569 nm 处测定吸光度 A。计算上清中壳聚糖浓度, 然后计算结合率:

$$\text{结合率} = \frac{\text{壳聚糖总量} - \text{上清液中壳聚糖量}}{\text{壳聚糖总量}} \times 100\%$$

包封率测定同步步骤 1.3.2。

2 结果

2.1 流感疫苗脂质体形态及粒度分布测定结果

室温下用 Motic B5 型数码显微镜 (Oil, 100x) 观察, 流感疫苗脂质体形态均呈圆或椭圆形, 粒度分布较均匀。用 Nano measurer 1.2 软件对粒径进行分析, 平均粒径 2.14 μm , 其中小于 1.0 μm 的占 3.62%, 1.0 ~ 7.0 μm 粒径占 91.56%, 大于 7.0 μm 的占 4.82%。

2.2 流感疫苗脂质体包封率测定结果

蛋白含量测定的标准曲线为 $Y = 0.0004 \times -0.0007$, 相关系数 $r^2 = 0.9947$, 在 5 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内有良好线性关系 (见表 1、图 1)。H1N1 单价流感灭活疫苗原液的蛋白含量测得为 1 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (血凝素 HA 含量为 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 平均包封率 80.68%, 见表 2。

2.3 流感疫苗壳聚糖脂质体形态观察结果

室温下用 Motic B5 型数码显微镜 (Oil, 100x) 观察, 流感疫苗壳聚糖脂质体形态均呈圆形或椭圆形, 粒度分布较均匀。用 Nano measurer 1.2 软件对粒径进行分析, 平均粒径 4.05 μm , 其中小于 2.0 μm 的占 3.45%, 2.0 ~ 7.0

μm 粒径占 90.97%，大于 7.0 μm 的占 5.58%。

2.4 流感疫苗壳聚糖脂质体结合率和包封率测定结果

壳聚糖的标准曲线方程为 $y = 0.0001 + 0.0019x$,

相关系数 $r^2 = 0.9915$, 表明在浓度 0.03 ~ 0.08 mg/mL 范围内壳聚糖溶液线性良好 (图 2)。6 种不同 N/P 比例的流感疫苗壳聚糖脂质体结合率和包封率见表 3。

表 1 标准蛋白含量与吸光度值

Tab. 1 Standard protein content and absorbance values

Pr(μg/mL)	5	10	20	40	60	80	100
OD750	0.0032	0.0023	0.0082	0.016	0.026	0.036	0.043

表 2 流感疫苗脂质体的包封率 (%)

Tab. 2 The Entrapment efficiency of influenza vaccine liposomes (%)

编号	1	2	3	4	5	6
包封率	80.13	81.01	80.90	80.45	80.38	81.21

表 3 6 种不同 N/P 比例的流感疫苗壳聚糖脂质体结合率和包封率 (%)

Tab. 3 The binding rate and entrapment efficiency of Six different N/P ratio flu vaccine liposome chitosan (%)

N/P	1: 4	1:2	1:1	2:1	4:1	5:1
结合率	10.78	11.85	13.23	14.50	18.50	19.40
包封率	83.18	84.08	83.02	84.05	84.27	86.70

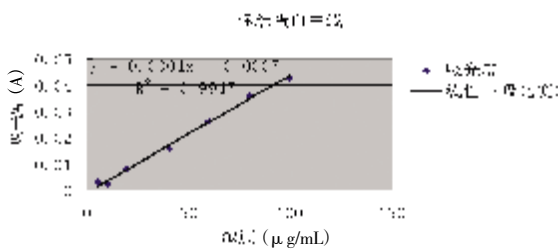


图 1 蛋白含量测定的标准曲线

Fig. 1 The standard curve of protein content

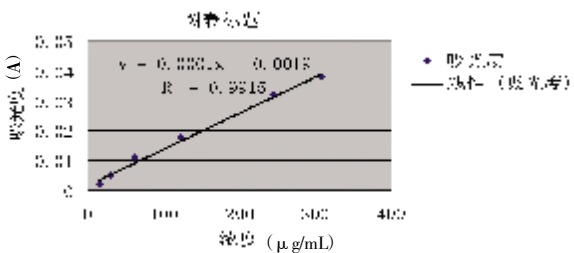


图 2 壳聚糖的标准曲线

Fig. 2 The standard curve of chitosan

3 讨论

壳聚糖与脂质体的结合机制可能是阴离子型脂质体与阳离子型的壳聚糖之间的电荷相互作用,或是未完全脱乙酰化的酰基插入到脂质体的脂膜中,使壳聚糖分子以环状和尾状物的方式吸附或镶

嵌到脂质体的表面,形成壳聚糖-脂质体复合物 [6,8,9]。壳聚糖在混合液中呈无规则线团状易吸附并黏接在脂质体的表面,其余部分又结合到另一脂质体的表面形成“化学架桥结构” [10,11],使得到的流感疫苗壳聚糖脂质体颗粒的粒径增加。

比较 6 种不同 N/P 比流感疫苗壳聚糖脂质体的结合率,随着 N/P 比值的增大,结合率由 10.78% 变为 19.40%。当 N/P 为 5:1 时,为壳聚糖与脂质体孵育的最佳比例,结合率为 19.40%。

壳聚糖包覆前后流感疫苗脂质体平均包封率由 80.41% 变为 84.37%。证明壳聚糖包覆脂质体后,可使脂质体包封率提高。其原因可能是,一方面,壳聚糖包覆脂质体后,增加了脂质体的稳定性,减少了药物渗漏;另一方面,壳聚糖在与脂质体结合的过程中,使一些游离的蛋白粘附在脂质体表面,从而增加了脂质体的包封率。

壳聚糖包覆后脂质体仍为近似圆形,粒径增加,包封率提高,当 N/P 为 5:1 时,为壳聚糖与脂质体孵育的最佳比例。

[参考文献]

[1] 石丽萍,王录焕,李英丽,等. 不同方法制备脂质体 125I-IL-8 包封率的比较[J]. 标记免疫分析与临床,

(下转第 53 页)

- black and Caucasian women with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2013, 31(1):53 – 61.
- [5] DORECKA M, SIEMIANOWICZ K, FRANCUZ T, et al. Exendin-4 and GLP-1 decreases induced expression of ICAM-1, VCAM-1 and RAGE in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(4):884 – 890.
- [6] KAHLENBERG J M, KAPLAN M J. Mechanisms of premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis and lupus [J]. *Annu Rev Med*, 2013, 64(3):249 – 263.
- [7] TANNO D, AKAHORI Y, TOYAMA M, et al. Involvement of gr-1 cells in the production of TNF- α and IL-17 and exacerbated systemic inflammatory response caused by lipopolysaccharide [J]. *Inflammation*, 2013, 12(5):214 – 220.
- [8] HOLTTA V, SIPPONEN T, WESTERHOLM – ORMIO M, et al. In crohn's disease, anti-TNF- α treatment changes the balance between mucosal IL-17, FOXP3, and CD4 Cells [J]. *ISRN Gastroenterol*, 2012, 75(3): 176 – 182.
- [9] ZHANG H P, ZHENG F L, ZHAO J H, et al. Genistein inhibits ox-LDL-induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 expression of HUVECs through heme oxygenase-1 [J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(1):13 – 20.
- [10] ASTARCI E, SADE A, CIMEN I, et al. The NF – kappaB target genes ICAM-1 and VCAM-1 are differentially regulated during spontaneous differentiation of Caco-2 cells [J]. *FEBS J*, 2012, 279(16):2 966 – 2 986.
- [11] FOTIS L, AGROGIANNIS G, VLACHOS I S, et al. Inter-cellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model [J]. *In Vivo*, 2012, 26(2): 243 – 250.
- [12] AHMED S, RIEGSECKER S, BEAMER M, et al. Larga-zole, a class I histone deacetylase inhibitor, enhances TNF- α -induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 270(2):87 – 96.
(2014 – 02 – 04 收稿)

(上接第 40 页)

- 2001, 8(3):158 – 160.
- [2] 林意菊, 马波, 鲁卫东, 等. 一种流感疫苗脂质体的制备工艺开发 [J]. *药物生物技术*, 2009, 16(3):241 – 244.
- [3] 赵梦丹, 俞飞江, 虞和永. 阿霉素脂质体的制备及其体外细胞毒活性 [J]. *浙江医学*, 2008, 30(4):337 – 391.
- [4] 陈伶俐, 宗莉, 庞瑞. 分光光度法测定壳聚糖含量 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(5):526 – 529.
- [5] 李广武. 壳聚糖孵育低分子肝素钙脂质体的制备及其包封率测定 [J]. 2007, 18(34):2 684 – 2 686.
- [6] 王海刚, 翟光喜, 吕青志, 等. 壳聚糖包覆葛根素脂质体的制备及理化性质考察 [J]. *中药材 Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 30(3):89 – 92.
- [7] HIROFUMI TAKEUEHI, YUJI MATSUT, HIKARU SUG-IHARA, et al. Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 303(1-2):160 – 170.
- [8] JANES K A, CAIVO P. Polysaccharid colloidal particles as delivery systems for macromolecules [J]. *Adv Drug Deliv*, 2001, 47(1):83 – 871.
- [9] 帅武平. 壳聚糖修饰脂质体的制备和性质研究 [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(15):1 159 – 1 163.
- [10] YANG D Z, LIU X F, LI Z, et al. On the factors influencing the antibacterial activity of chitosan [J]. *Chin J Appl Chem (应用化学)*, 2000, 17(6):598 – 602.
- [11] 赵海霞, 郭兴奎, 孙德亮, 等. 脂质体制备技术 [J]. *山东中医杂志*, 2000, 19(7):435 – 437.
(2014 – 02 – 04 收稿)