

冻融-冻干法制备的流感疫苗脂质体的细胞免疫研究

徐菀佚¹, 乔建斌¹, 马 波², 王 然¹, 钱 雯^{2*}, 鲁卫东^{1**}(¹昆明医科大学药学院云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500; ²云南沃森生物技术股份有限公司, 昆明 650106)

摘 要 分别用冻融-冻干法、薄膜分散-冻干法制备流感疫苗脂质体干粉, 通过小鼠肺部免疫后, 从细胞免疫水平考察两种方法制备脂质体的免疫原性。将小鼠分为非脂质体疫苗原液组(non-liposome)、薄膜分散-冻干法制备流感疫苗脂质体组、冻融-冻干法制备流感疫苗脂质体组、阳性对照和阴性对照组($n=5$)。脂质体疫苗冻干粉组以每只血凝素含量(以H1N1计)6 μg 肺部免疫, 以非脂质体疫苗原液每只血凝素含量6 μg 腹腔给药作为阳性对照, 以未免疫小鼠(PBS给药)为阴性对照。免疫28 d, MTT法检测脾淋巴细胞的增殖, 流式细胞术检测CD4⁺与CD8⁺细胞。结果显示: 两种方法制备的流感疫苗脂质体冻干粉均可诱导细胞免疫, 且免疫效果相当, 说明冻融-冻干法有望进一步应用于减毒活疫苗制备。

关键词 流感疫苗脂质体; 冻融-冻干法; 细胞免疫

中图分类号 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)06-0730-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150616

Cellular immunity of influenza vaccine lyophilized liposome produced by freeze-thawing

XU Wanyi¹, QIAO Jianbin¹, MA Bo², WANG Ran¹, QIAN Wen^{2*}, LU Weidong^{1**}

¹ Yunnan Provincial Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products & School of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500; ² Walvax Biotech Co., Ltd., Kunming 650106, China

Abstract To investigate the cellular immunogenicity of influenza vaccine liposomes dry powder using the film-dispersion and freeze-thawing. Mice were divided into the non-liposomal influenza vaccine group, film-dispersion prepared liposomal influenza vaccine group, freeze-thawing lyophilized influenza vaccine liposome group, positive control group and negative control group ($n=5$). 6 μg of hemagglutinin of H1N1 subtype per mouse was delivered tracheally to the mice of lyophilized liposomes groups, with the same dose for non-liposomes intraperitoneally delivered groups as the positive control, and PBS intraperitoneal injection group as the negative control. After 28-day of immunization, the proliferation of splenic lymphocytes was detected by MTT assay; CD4⁺ cell and CD8⁺ cell were analyzed by flow cytometry. The dry powder of influenza vaccine liposomes prepared by the above two methods, both induce cellular immunity, with no significant difference in the induced immunogenicity between the prepared products ($P<0.05$). The results showed that freeze-thawing method is feasible in the preparation of vaccine liposomes, leading to the attenuated live vaccine liposome preparation.

Key words influenza vaccine liposome; freeze-thawing methods; cellular immunity

This study was supported by the Construction Plan of Science and Technology Condition Platform of Yunnan Province (No. 2009DA010)

脂质体具有良好的免疫佐剂功能, 可增强机体的体液免疫和细胞免疫。脂质体呼吸道给药可提

高生物利用度, 具有良好的组织相容性及长效缓释作用^[1-2]。制备脂质体应用最广泛的方法是薄膜

分散法^[1],该方法工艺简单,为制备蛋白质类脂质体的首选,利于规模化大生产。本课题组前期已经系统地研究了薄膜分散-冻干法制备流感疫苗脂质体^[3-4]的体液免疫、细胞免疫效果和黏膜免疫,免疫原性均有明显提高^[4-7]。由于薄膜分散法制备中有温度升高的过程,使疫苗接触高温后容易失活,所以不适用于减毒活疫苗脂质体的制备。本研究在原有方法基础上,确立了另外一种可在低温条件下制备流感疫苗脂质体的方法——冻融-冻干法。本研究比较两种方法制备疫苗脂质体诱发细胞免疫水平,为冻融-冻干法应用于减毒活疫苗脂质体的制备奠定理论基础。

1 材 料

1.1 药品与试剂

流行型感冒病毒裂解单价液(以 H1N1 血凝素计 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$,云南沃森生物技术股份有限公司);胆固醇(上海新兴化工试剂研究所);大豆卵磷脂(北京美亚斯磷脂技术有限公司);牛血清白蛋白(BSA,美国西格玛公司);福林酚试剂(北京鼎国生物技术有限公司);标准胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限公司);RPMI-1640 培养基(美国 HyClone 公司);刀豆蛋白(ConA),MTT(北京科昊泽生物技术有限公司);红细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司);抗小鼠 CD8 荧光标记,抗小鼠 CD4 抗体(美国 eBioscience 公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 动 物

SPF 级昆明种雌性小鼠,体重 18 ~ 22 g,购自昆明医科大学实验动物中心(合格证号:SCXK(滇)2005-0008)。

1.3 仪 器

EL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司);紫外可见分光光度计(UV7501);Motic B5 型数码电子显微镜(厦门麦克奥迪有限公司);Z300K 型台式高速低温离心机(德国 Hemle 公司);Spectramax190 型酶标仪(美国 MD 公司)。

2 方 法

2.1 冻融-冻干法制备流感疫苗脂质体

称取大豆卵磷脂 300 mg 和胆固醇 100 mg 置于磨口圆底烧瓶中加入无水乙醇 20 mL,放置

50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中搅拌使其溶解后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴旋转蒸发仪上减压蒸发除去乙醇,此时脂质在圆底烧瓶上形成一层均匀的薄膜。加入 PBS 常压下水化约 45 min,制得乳白色脂质体混悬液,常温静置 2 h 形成大单室脂质体,冰水浴探头超声,即得小单室脂质体混悬液。取适量脂质体混悬液与疫苗原液混合均匀,加入蔗糖 100 mg 作为冻干保护剂,放入 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行反复冻融,经冷冻干燥后即得流感疫苗脂质体冻干粉

2.2 流感疫苗脂质体干粉形态学研究

分别取少量薄膜分散-冻干法^[3]与冻融-冻干法制得的流感疫苗脂质体冻干粉复溶,利用数码电子显微镜观察其形态,通过粒径分析软件 Nano Measurer 1.2 测定平均粒径以及粒径分布情况。

2.3 两种方法制备流感疫苗脂质体细胞免疫效果评价

2.3.1 动物分组与免疫 将小鼠分为 4 组($n = 5$),分别为 PBS 腹部给药组、膜分散法制备疫苗脂质体冻干粉肺部给药组、冻融-冻干法制备疫苗脂质体冻干粉肺部给药组、非脂质体流感疫苗原液肺腹给药组,除 PBS 腹部给药组外,其余各组免疫剂量为每只 6 μg (以 H1N1 血凝素计)。阳性对照为非脂质体流感疫苗原液组腹腔给药组。阴性对照为小鼠 PBS 腹腔给药组,免疫时间为 28 d。

2.3.2 脾淋巴细胞增殖及 T 淋巴细胞表面标记检测 参考文献[5],研磨制备脾淋巴细胞悬液,MTT 法检测脾淋巴细胞悬液中细胞的增殖情况,于酶标仪 570 nm 处测定吸收度,并用流式细胞仪检测 T 淋巴细胞表面标记情况,用贝克曼库尔特分析。

3 结 果

3.1 流感疫苗脂质体的形态及粒径分布和包封率

用数码显微镜观察(图 1),两种方法制得的脂质体外观均呈圆或椭圆形,粒度分布较均匀。粒径分析软件 Nano measurer 1.2 对粒径进行分析,薄膜分散-冻干法制得的脂质体平均粒径 3.24 μm ($n = 3$),1.0 ~ 4.0 μm 粒径占 83.6%。包封率为 $(82.53 \pm 2.875)\%$ ($n = 3$)。冻融-冻干法制得的脂质体平均粒径 1.91 μm ($n = 3$),1.0 ~ 4.0 μm 粒径占 95.6%。包封率为 $(84.14 \pm 2.134)\%$ ($n = 3$)。平均粒径比较,冻融-冻干法脂质体小于薄膜

分散-冻干法脂质体,且其粒径更加均匀(图2)。

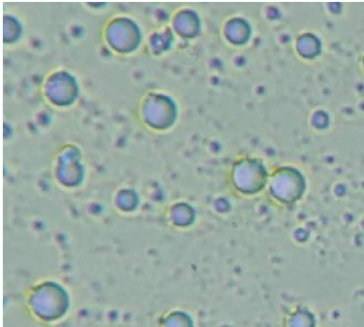


Figure 1 Image of influenza vaccine liposome suspension under digital electron microscope (oil, $\times 100$)

3.2 脾淋巴细胞增殖实验及T淋巴细胞表面标记检测

将测得的各小鼠刀豆蛋白(ConA)组的3个孔的吸收度取平均值,空白对照组的3个孔的吸收度取平均值。刺激指数(SI)为每只小鼠的ConA组的平均吸收度与空白对照组的平均吸收度的比。根据流式细胞仪检测结果计算 $CD4^+/CD8^+$ 的比,

Table 1 ConA SI and $CD4^+/CD8^+$ ratio of T-lymphocyte after 28 d of immunization ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Sample	PBS intraperitoneal	Film-dispersion pulmonary	Freeze-thawing pulmonary	Non-liposome intraperitoneal
ConA SI	1.227 ± 0.031	$2.790 \pm 0.094^*$	$2.823 \pm 0.072^*$	2.426 ± 0.089
$CD4^+/CD8^+$	2.29 ± 0.119	$4.284 \pm 0.199^*$	$4.418 \pm 0.355^*$	2.928 ± 0.31

ConA SI and $CD4^+/CD8^+$ ratio of T-lymphocyte after 28 d of immunization. $^* P < 0.05$ vs non-liposome intraperitoneal group

从表1脾淋巴细胞增殖实验结果和T淋巴细胞表面标记 $CD4^+/CD8^+$ 检测的结果来看,应用SPSS 17.0软件进行统计分析。将薄膜分散-冻干法脂质体肺部免疫组、冻融-冻干法脂质体肺部免疫组、阳性对照组与阴性对照组比较,经方差分析($P < 0.05$),说明有显著性差异,表明薄膜分散-冻干法脂质体肺部免疫组、冻融-冻干法脂质体肺部免疫组、阳性对照组均诱导产生细胞免疫反应。薄膜分散-冻干法脂质体肺部免疫组、冻融-冻干法脂质体肺部免疫组和阳性对照组进行比较,经方差分析($P < 0.05$),说明有显著性差异,表明流感疫苗脂质体经肺部免疫诱导产生的细胞免疫水平明显高于疫苗原液腹腔注射诱导产生的细胞免疫水平。比较两种不同制备方法得到的脂质体,经方差分析($P > 0.05$),表明两种方法制备脂质体的细胞免疫水平无显著性差异。

4 讨论

流感病毒主要通过感染呼吸道上皮细胞,经呼

免疫28 d后,4个组的小鼠的刺激指数及 $CD4^+/CD8^+$ 的比见表1。

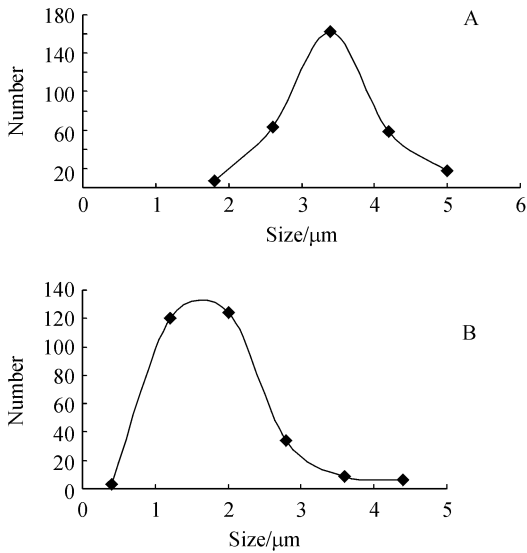


Figure 2 Diameter distribution chart of influenza vaccine lyophilized liposome by film-dispersion method (A) and freeze-thawing method (B)

吸道黏膜进入人体。目前,通过肺部将药物传到全身从而发挥作用的研究受到广泛的关注。肺部给药主要是由于肺部血流丰富,药物通过呼吸进入肺泡,并随着血液循环输送到全身而发挥作用,并且肺部给药可以避免肝脏首过效应。脂质体作为肺部给药的良好佐剂是由于肺部主要由大量的肺泡组成,而肺泡的主要成分为脂质,脂质体也由磷脂构成,所以两者具有很好的组织相容性,通过脂质体包封后可以显著提高药物的生物利用度。本实验采用冻融-冻干法制备脂质体,其超声的过程使大单室脂质体破碎形成大小均一的小单室脂质体,通过调节超声的功率和超声的次数来控制脂质体粒径的大小。反复冻融过程中伴随脂质膜的破裂和融合,受磷脂非极性头基空间位阻和脂质膜曲率半径的双重影响,粒径小的脂质体融合成稍大脂质体,粒径大的脂质体裂解成稍小脂质体,过大或过小的脂质体均无法形成,使粒径趋于均匀化。本实验中薄膜分散-冻干法制得的脂质体平均粒径 $3.44\text{ }\mu\text{m}$,冻融-冻干法制得的脂质体平均粒径 $1.91\text{ }\mu\text{m}$,且80%

粒径范围在5 μm 以下,大部分药物颗粒均能被呼吸道黏膜及肺泡有效的摄取和吸收,最后通过血液循环发挥全身作用。

本研究表明,两种方法制备的流感疫苗脂质体冻干粉细胞免疫效果均高于疫苗原液腹部给药,表明两种方法制备的流感疫苗脂质体冻干粉均可有效诱发细胞免疫,且与疫苗原液相比,具有优势。两种方法制备的脂质体都有很好的细胞免疫效果,且免疫效果无显著性差异,表明冻融-冻干法制备的脂质体与薄膜分散-冻干法制备的脂质体在细胞免疫效果方面免疫效果相当,说明冻融-冻干法是一种可行的在低温条件下制备流感疫苗脂质体的方法,为该法将来应用于减毒活疫苗奠定了基础。本文通过肺部免疫研究脂质体流感疫苗,为今后制成粉雾剂、吸入剂方便患者给药,快速发挥药效奠定基础。

参考文献

[1] Degen WG, Jansen T, Schijns VE. Vaccine adjuvant technology:

- from mechanistic concepts to practical applications [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2003, **2**(2):327-335.
- [2] Ghaffar KA, Giddam AK, Zaman M, et al. Liposomes as nanovaccine delivery systems[J]. *Curr Topics Med Chem*, 2014, **14**(9):1194-1208.
- [3] Lu WD, Lin YJ, Ma B, et al. Stability of influenza vaccine liposome powder[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2010, **41**(4):360-362.
- [4] Lu WD, Lin YJ, Dai YB, et al. Preparation and immunogenicity of influenza vaccine lyophilized liposomes[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2009, **40**(3):218-221.
- [5] Liu J, Ma B, Lu WD, et al. Cellular immunity of monovalent influenza vaccine lyophilized liposome[J]. *J Nanjing Tech Univ* (南京工业大学学报), 2011, **33**(6):102-106.
- [6] Liu J. The cellular immunity research of influenza vaccine lyophilized liposome (流感疫苗脂质体干粉细胞免疫研究)[D]. Kunming: Kunming Medical College, 2011.
- [7] Che JW, Ma B, Lin H, et al. A study on immunogenicity of influenza vaccine lyophilized liposome prepared by different methods [J]. *Acta Acad Med Nanjing* (南京医科大学学报), 2013, **33**(7):1019-1023.