

流感疫苗脂质体干粉制备方法对其免疫原性影响研究

陈建雯¹, 马波², 林华¹, 乔建斌¹, 王礼燕¹, 鲁卫东^{1*}

(¹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; ²云南沃森生物技术股份有限公司, 云南 昆明 650106)

[摘要] 目的: 考察薄膜分散及冻融冻干法制备 H1N1 单价流感疫苗脂质体呼吸道免疫效果, 为减毒活疫苗脂质体的制备奠定基础。方法: 将实验小鼠分为 4 个实验组(脂质体疫苗干粉肺部免疫组、腹腔免疫组, 非脂质体疫苗原液肺部免疫组、腹腔免疫组), 和 1 个阴性对照组。实验组以每只 4 μg 和 6 μg 血凝素含量(H1N1 亚型)肺部免疫或腹腔免疫, 以未免疫小鼠(PBS 给药)为阴性对照。免疫 7、14、28 d, 血凝抑制试验(HI)检测免疫后小鼠血清抗 HA 抗体水平, ELISA 检测血清中细胞因子含量。结果: 两种方法制备的脂质体组 6 μg 剂量肺部免疫抗体滴度高于 4 μg 剂量肺部免疫($P < 0.05$); 两种方法制备脂质体肺部免疫抗 HA 抗体滴度高于非脂质体肺部免疫($P < 0.05$)。脂质体组肺部免疫抗 HA 抗体滴度高于非脂质体组腹腔免疫($P < 0.01$); 薄膜分散法优于冻融冻干法组; 两种方法制备的脂质体肺部免疫产生的白细胞介素(IL)-2 与干扰素(IFN)- γ 水平高于疫苗原液腹腔免疫, 均高于阴性对照组。结论: 两种方法制备流感疫苗脂质体肺部给药均能有效诱发体液免疫及细胞免疫, 薄膜分散法优于冻融冻干法, 均高于疫苗原液组; 冻融冻干法肺部免疫 14 d 即产生免疫应答, 而原液腹腔免疫抗体滴度比仅为 1.8。冻融冻干法组脂质体肺部免疫产生的细胞因子水平也明显高于疫苗原液腹腔免疫组。说明冻融冻干法在疫苗脂质体制备中具有可行性。

[关键词] 流感疫苗; 冻干脂质体; 肺部给药; 血凝抑制试验; 细胞因子

[中图分类号] R944.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-1019-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130735

A study on immunogenicity of influenza vaccine lyophilized liposome prepared by different methods

Chen Jianwen¹, Ma Bo², Lin Hua¹, Qiao Jianbin¹, Wang Liyan¹, Lu Weidong^{1*}

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

[Abstract] **Objective:** To evaluate the immunity effect of H1N1 influenza vaccine prepared by film-dispersion and freeze-thawing method, and to provide experimental foundation for attenuated live vaccine liposome preparation. **Methods:** Experimental mice were divided into the influenza vaccine non-liposome group, the film-dispersion prepared H1N1 influenza vaccine liposome group, the freeze-thawing lyophilized prepared H1N1 influenza vaccine liposome group, the positive control group and the negative control group ($n=5$). 4 μg and 6 μg hemagglutinin of H1N1 subtype per mouse were tracheally delivered to the mice for the non-liposome group and the lyophilized liposome groups, with the same dose intraperitoneally delivered groups as the positive control, and the PBS intraperitoneal injection group as the negative control. After 7, 14 and 28 d of immunization, serum levels of HA antibodies were measured by the hemagglutination-inhibition method, and serum cytokine levels were measured by the ELISA method. **Results:** By pulmonary injection of the two liposome groups, the antibody titers of 6 μg dose groups were higher than those of 4 μg dose groups ($P < 0.05$). HA antibody titers of the two pulmonarily delivered liposome groups were higher than those of the pulmonarily ($P < 0.05$) and intraperitoneally ($P < 0.01$) injected non-liposome group. Antibody titers of the film-dispersion liposome group for both doses were higher than those of the freeze-thawing lyophilized liposome group. IL-2 and IFN- γ produced by the pulmonary injected liposome groups were higher than those of the intraperitoneally delivered non-liposome group. **Conclusion:** The humeral and cellular

[基金项目] 云南省科技厅应用基础研究面上项目(2008ZC113M)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lwdnsx@163.com

immunities could be effectively induced by pulmonarily delivered vaccine liposomes; The film-dispersion method group is better than the freeze-thawing lyophilized group in terms of immunity strength. For the freeze-thawing lyophilized prepared H1N1 influenza vaccine liposome group, the immune response occurs at 14 d after vaccination, while the titer ratio is only 1.8 for normal vaccinated flu vaccine. The freeze-thawing lyophilized liposome vaccine also stimulates higher levels of cytokines.

[Key words] influenza vaccine; lyophilized liposome; pulmonary delivery; hemagglutination-inhibition test; cytokines

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7): 1019-1023]

流行性感冒是由流感病毒引起的上呼吸道急性传染病,防治唯一有效手段是疫苗接种^[1],传统接种途径多为注射给药,往往导致多种弊端,吸入给药已慢慢取代注射给药途径^[2],开发疫苗佐剂新的免疫途径是提高免疫效果的有效手段。佐剂可以激活机体产生体液免疫或细胞免疫,诱导产生细胞因子如白细胞介素(interleukin, IL)-2, IL-4, IL-12 和干扰素(interferon, IFN)- γ 等。免疫佐剂又称非特异性免疫增生剂,本身并不提供免疫,只有在与免疫原组成一种制剂时,才能够改善由疫苗诱导产生的免疫应答的广度和效力^[3-4]。在疫苗制剂中加入佐剂能刺激机体产生保护性抗体。脂质体作为一种新的疫苗佐剂,是目前研究较热门的理想的疫苗佐剂之一。

脂质体呼吸道给药具有良好的组织相容性,提高生物利用度及长效缓释作用。薄膜分散法是制备脂质体最基本和应用最广泛的方法,该法工艺简单,是制备蛋白质药物脂质体的首选,利于规模化生产。鲁卫东等^[5-6]曾对薄膜分散法制备流感疫苗脂质体稳定性作了系统的研究,并考察了其体液免疫、黏膜免疫和细胞免疫效果,免疫原性均有明显提高,但薄膜分散法在制备过程中温度较高,不适用于活疫苗脂质体的制备,冷冻干燥法的出现,增加了脂质体储存的稳定性,避免了磷脂和药物的水解、药物泄露等问题的出现。本研究在原有方法基础上,初步确立了另外一种方法——冻融冻干制备流感疫苗脂质体,与之比较,考察两种方法制备疫苗脂质体诱发呼吸道免疫效果,比较两种方法诱导呼吸道产生抗体及细胞因子水平,进一步寻求多种方法从呼吸道免疫角度考察流感疫苗脂质体的免疫原性,为减毒活疫苗脂质体的制备奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

洁净级昆明种小鼠,体重 18~22 g,雌性,由昆明医科大学实验动物中心提供。

裂解型流感灭活疫苗单剂液(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),标准 H1N1 流感抗原(英国国家生物制品检定所),大豆卵磷脂(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 公司),V 底 96 孔微量血凝板(德国 Greiner 公司),Folin 酚试剂(北京鼎国),小鼠 IL-2 检测试剂盒(美国 Bio-Swamp 公司),小鼠 IFN- γ 检测试剂盒(美国 Bio-Swamp 公司),其余试剂均为市售分析醇。LabconcoR 4.5L 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),RE-52AA 型旋转蒸发器(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),Z300K 型台式高速低温离心机(德国 Hemle 公司),VCX-130 型探头式超声波破碎仪(美国 Sonic 公司),Motic B5 型数码电子显微镜(厦门麦克奥迪),Spectramax190 型酶标仪(美国 MD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 流感疫苗脂质体干粉制备

采用薄膜分散法及冻融冻干法分别制备流感疫苗脂质体干粉。取制得的流感疫苗脂质体干粉少量复溶,在数码电子显微镜(Oil, 100 倍)下观察其形态,并用 Nano Measurer 1.2 软件测定其平均粒径和粒径分布情况。

1.2.2 动物分组与免疫

将洁净级昆明种小鼠分为 5 组 ($n = 5$):4 个实验组为:脂质体疫苗干粉肺部免疫组、腹腔免疫组,非脂质体疫苗原液肺部免疫组、腹腔免疫组,以每只 4 μg 和 6 μg 血凝素含量(H1N1 亚型)肺部免疫或腹腔给药,免疫时间为 28 d;1 个阴性对照组,为未免疫小鼠(予 PBS)。

1.2.3 免疫效果评价及细胞因子检测

小鼠免疫后 7 d 眼眶采血,14~28 d 摘眼球采血,全血于常温放置 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 低温放置 2 h,以 3 500 r/min 离心 30 min,分离血清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存备用。用 HI(hemagglutination-inhibition)方法检测特异性抗体抗 HA 抗体水平(抗血凝素抗体)。采用

ELISA 检测免疫后 28 d 小鼠血清中 IL-2 与 IFN- γ 的水平。按试剂盒说明绘制标准曲线,分别测得各组小鼠血清中 IL-2 与 IFN- γ 的含量。

1.3 统计学方法

应用 SPSS11.5 统计软件进行分析,组间比较行重复测量的方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流感疫苗脂质体的形态及粒径分布

室温下用型数码显微镜观察,薄膜分散法和冻融冻干法制得的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,薄膜分散法制得脂质体平均粒径 2.44 μm , 0.8~4.0 μm 粒径占 92.6%;冻融冻干法制得的脂质体平均粒径 3.57 μm , 1.8~5.8 μm 粒径占 96.1%。薄膜分散法脂质体的平均粒径较冻融冻干法脂质体粒径更趋于均匀化(图 1)。

2.2 抗 HA 抗体滴度检测结果

统计分析结果显示,非脂质体疫苗原液组与脂质体疫苗干粉组在相同的给药剂量下相同时间点组间有显著性差异($P < 0.05$);薄膜分散法制备脂质体组与冻融冻干法制备脂质体组相同时间点组间比较有显著性差异($P < 0.05$);并且两种方法制备脂质体肺部免疫与非脂质体腹腔免疫比较,两组间有显著性差异($P < 0.05$),见表 1。

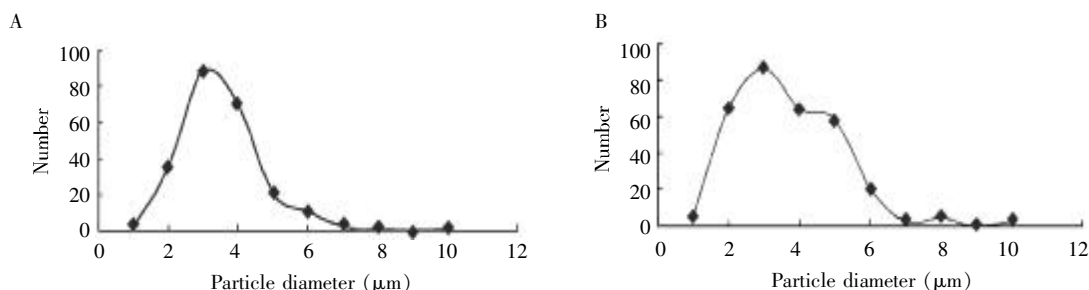


图 1 薄膜分散法(A)与冻融冻干法(B)制得流感疫苗脂质体粒径分布

Figure 1 Size distribution of influenza vaccine liposome powder by film-dispersion lyophilize(A) and freeze-thawing lyophilize(B)

表 1 两种方法制备脂质体免疫小鼠 7~28 d 抗 HA 抗体滴度比

Table 1 The ratio of titer of mice immuned 7 d to 28 d with two methods liposome preparation

组 别	薄膜分散法						冻融冻干法					
	7 d		14 d		28 d		7 d		14 d		28 d	
	4 μg	6 μg	4 μg	6 μg	4 μg	6 μg	4 μg	6 μg	4 μg	6 μg	4 μg	6 μg
脂质体疫苗干粉组肺部免疫	2.5	3.3	3.6	5.3	4.5	7.3	2.5	3.1	3.2	4.3	4.0	4.8
脂质体疫苗干粉组腹腔免疫	2.1	1.5	2.2	1.9	2.5	2.4	1.3	1.3	1.2	1.6	2.2	1.8
非脂质体疫苗原液组肺部免疫	1.1	1.3	1.5	1.8	1.8	1.8	1.1	1.3	1.5	1.8	1.8	1.8
非脂质体疫苗原液组腹腔免疫	1.0	1.2	1.2	1.6	1.5	1.9	1.0	1.2	1.2	1.6	1.5	1.9
阴性对照	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

两种方法实验组 6 μg 剂量肺部免疫产生抗 HA 抗体水平明显优于 4 μg 剂量,并且流感疫苗脂质体肺部免疫途径效果明显优于腹腔注射途径;相同条件下(相同给药途径和相同给药剂量),体液免疫血清抗 HA 抗体滴度水平,脂质体疫苗组和疫苗原液组肺部免疫高于腹腔给药组,脂质体疫苗组高于疫苗原液组;且两种方法试验组各组抗 HA 平均值均 > 40 ,可判为产生特异性血凝素抗体。免疫后小鼠抗 HA 抗体水平不断升高,到第 4 周达到峰值,薄膜分散法优于冻融冻干法;特别是薄膜分散法制备流感疫苗脂质体肺部免疫组,其免疫效果是相应疫

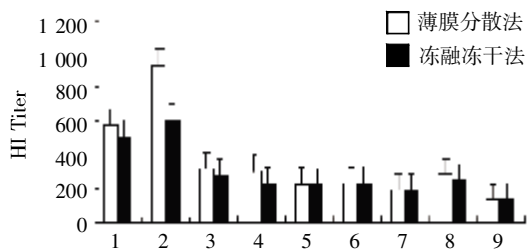
苗原液腹腔免疫组的 2~4 倍,图 2。

2.3 小鼠细胞因子 IL-2 与 IFN- γ 水平检测结果

无论是 4 μg 抗原组还是 6 μg 抗原组,两种方法制备的脂质体肺部免疫高于疫苗原液腹腔免疫,均高于阴性对照组。脂质体疫苗组可刺激机体产生更高水平的细胞因子,刺激产生的 IL-2 水平明显高于 IFN- γ 水平。见图 3、4。

3 讨论

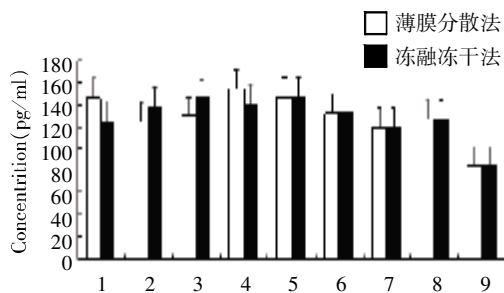
药物颗粒粒径 2~5 μm 的粒子易到达呼吸道深部,本实验脂质体粒径分布情况表明,薄膜分散法制



1,2:脂质体疫苗干粉肺部免疫4、6 μg 剂量组;3,4:脂质体疫苗干粉腹腔免疫4、6 μg 剂量组;5,6:非脂质体疫苗原液肺部免疫4、6 μg 剂量组;7,8:非脂质体疫苗原液组腹腔免疫4、6 μg 剂量组;9:阴性对照组。

图2 两种方法免疫后28 d小鼠HI结果

Figure 2 HI titer results of two methods after 28 d

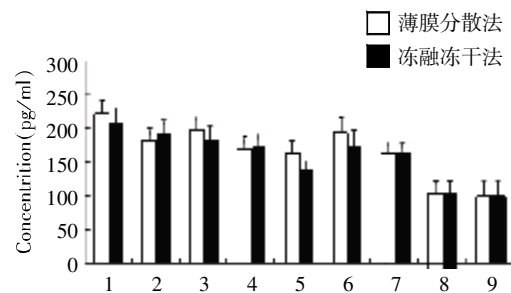


1,2:脂质体疫苗干粉肺部免疫4、6 μg 剂量组;3,4:脂质体疫苗干粉腹腔免疫4、6 μg 剂量组;5,6:非脂质体疫苗原液肺部免疫4、6 μg 剂量组;7,8:非脂质体疫苗原液组腹腔免疫4、6 μg 剂量组;9:阴性对照组。

图3 两种方法免疫后28 d小鼠血清IFN-γ水平测定结果
Figure 3 The test results serum levels of IFN-γ with two methods after 28 d

得的脂质体平均粒径2.44 μm,冻融冻干法制得的脂质体平均粒径3.57 μm,90%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。

脂质体佐剂作用机制主要有^[8]:①靶向性;脂质体易定位于网状内皮系统丰富的器官,如肝、脾等单核吞噬细胞丰富的器官,延长在体内停留时间,巨噬细胞等吞噬了含有抗原的脂质体,经溶酶体酶的消化作用,释放抗原,激活T细胞及B细胞;②免疫增强作用;③储库效应,能延长抗原在局部组织的存留时间,刺激机体产生抗体;此外,它还直接作用于病



1,2:脂质体疫苗干粉肺部免疫组4、6 μg 剂量组;3,4:脂质体疫苗干粉腹腔免疫组4、6 μg 剂量组;5,6:非脂质体疫苗原液肺部免疫组4、6 μg 剂量组;7,8:非脂质体疫苗原液组腹腔免疫4、6 μg 剂量组;9:阴性对照组。

图4 两种方法免疫后28 d小鼠血清IL-2水平测定结果
Figure 4 The test results serum levels of IL-2 with two methods after 28 d

毒感染细胞,或释放细胞因子介导并放大其他类型细胞的保护性应答,提高免疫功能。CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞在慢性胞内感染等疾病的治疗中具有重要作用^[9]。蛋白和多肽等外源性抗原能够通过交叉提呈和交叉致敏诱导CD8⁺CTL反应,但通常需要有有效的疫苗佐剂来增强抗原递呈和共刺激信号,并提供Th1类细胞因子环境^[10-11],脂质体作为疫苗佐剂,可作为一种渗透性屏障控制抗原的释放^[4],本研究表明,两种方法制备的脂质体疫苗冻干粉组4 μg剂量肺部免疫抗体滴度高于6 μg剂量肺部免疫($P < 0.05$),脂质体疫苗冻干粉组肺部免疫抗体滴度高于脂质体疫苗干粉腹腔免疫组($P < 0.01$),薄膜分散法制备脂质体组抗体滴度高于冻融冻干法制备脂质体抗体滴度,两种方法制备脂质体肺部免疫抗体滴度高于非脂质体腹腔免疫($P < 0.05$)。流感疫苗脂质体肺部给药能有效诱发体液免疫,有效证明了脂质体作为佐剂的免疫增强作用,并且两种方法制备的脂质体疫苗组可刺激机体产生更高水平的细胞因

子。细胞因子流感病毒天然感染后,7 d内是以细胞免疫为主,此时IL-2与IFN-γ会有显著升高,而本研究是在晚期从血清中测到高水平的IL-2与IFN-γ,细胞因子可由淋巴细胞产生,并且最终可以到达全身血液循环,细胞因子半衰期很短,但经过持续刺激可以持续产生,Th1类CD4⁺T细胞反应可产生IL-2分泌,CD8⁺T细胞产生IFN-γ分泌,蛋白和多肽等外源性抗原能够通过交叉递呈和交叉致敏诱导CD8⁺CTL反应,脂质体佐剂具有储库效应,作为疫苗佐剂增强抗原提呈和共刺激信号,并提供Th1类细胞因子环境,因而诱导产生长效细胞因子释放。较低剂量的药物就能诱导肺部较高水平的免疫应答。冻融冻干法在免疫效果方面虽然不如薄膜分散法,但与疫苗原液相比具有优势,可用于活疫苗的制备,在减毒活疫苗脂质体的制备上增加了一种新的方法。

本研究通过比较两种方法制备流感疫苗脂质体粒径分布大小,并用HI法检测免疫小鼠血清的抗

体抗 HA 水平及 ELISA 检测小鼠血清中细胞因子 IL-2 与 IFN- γ 水平, 检测结果表明流感疫苗脂质体干粉经呼吸道给药可以诱导更高效的体液免疫, 而且能够激发机体产生更高的细胞免疫, 冷冻干燥法的出现, 弥补了薄膜分散法制备过程中由于温度升高, 不适用于活疫苗脂质体制备的不足, 增加了脂质体储存的稳定性, 避免了磷脂和药物的水解、药物泄露等问题的出现, 因而本研究在原有方法基础上, 初步确立冻融冻干制备流感疫苗脂质体。研究表明, 脂质体流感疫苗在减少使用剂量及降低成本, 提高对易感人群保护率方面具有很大的理论与实践意义。

[参考文献]

- [1] Combadière B, Sibénil S, Duffy D. Keeping the memory of influenza viruses [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(2): e79-86
- [2] 刘建峰, 肖 琅. 吸入给药肺沉积的研究进展[J]. *武警医学院学报*, 2005, 14(2): 133-135
- [3] 周红蕾, 李春玲, 王贵平, 等. 脂质体作为疫苗免疫佐剂的应用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(2): 34-38
- [4] 江丽君. 用于疫苗的免疫增强剂和递送系统[J]. *微生物学免疫学进展*, 2012, 40(3): 1-7
- [5] 鲁卫东, 林意菊, 代云波, 等. 流感疫苗脂质体冻干粉的制备及其免疫原性 [J]. *中国药科大学学报*, 2009, 40(3): 218-221
- [6] 刘 洁, 马 波, 鲁卫东, 等. 单价流感疫苗脂质体干粉细胞免疫研究 [J]. *南京工业大学学报: 自然科学版*, 2011, 33(6): 102-106
- [7] 陈丽芳, 郭春叶. 浅谈血凝抑制试验中存在的问题及处理方法[J]. *卫生检验*, 2008, 11: 43
- [8] 王晓娟, 廖雪雁. 疫苗佐剂的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2008, 36(3): 96-98
- [9] 王美菊, 刘 颖, 罗 兴, 等. 复合疫苗佐剂促进蛋白抗原通过交叉提呈和交叉致敏诱导 CD8⁺ CTL 反应的研究[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(9): 1085-1090
- [10] Kurts C, Robinson BW, Knolle PA. Cross-priming in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(6): 403-414
- [11] Yewdell JW. Designing CD8⁺ T cell vaccines: it's not rocket science (yet) [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(3): 402-410

[收稿日期] 2013-04-17

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。