第二军医大学学报
Acad J Sec Mil Med Univ 2004 Jan;25(1)

· 论 著 ·

DNA 疫苗海藻酸钠微球的制备及体外释药

刘善奎[1],高 申[1*],钟延强[1],张洪英[2],孙树汉[2]
(1. 第二军医大学药学院药剂学教研室,上海 200433; 2. 基础医学部医学遗传学教研室)

[摘要] **目的**:研制 DNA 疫苗海藻酸钠微球,并对其体外释药特性进行考察。**方法**:以海藻酸钠为载体,采用 *W/O* 乳化-离子交联法制备 DNA 疫苗海藻酸钠微球;考察粒径大小、外观、载药量等理化特性;考察微球的体外释药特性及影响因素。**结果**:微球球形圆整,分散性好,平均粒径为(12.03±6.9) μm,载药量可达 5%,包封率为 56.0%;微球的体外释放速率与载药量呈正相关,与壳聚糖的交联固化度呈负相关。**结论**:海藻酸钠可以作为 DNA 疫苗微球的可生物降解辅料;乳化离子交联法的制备工艺简便,有利于 DNA 疫苗结构和功能的稳定性;海藻酸钠微球是 DNA 疫苗的一种理想给药系统。

[关键词] 疫苗,DNA;海藻酸钠;微球;体外释药
[中图分类号] R 392-33 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2004)01-0058-03

Preparation and *in vitro* release of DNA vaccine loaded sodium alginate microspheres

LIU Shan-Kui[1], GAO Shen[1*], ZHONG Yan-Qiang[1], ZHANG Hong-Ying[2], SUN Shu-Han[2] (1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences)

[ABSTRACT] **Objective**: To prepare DNA vaccine loaded sodium alginate microspheres (DNA-SA-MS) and to evaluate its dissolution characteristics *in vitro*. **Methods**: DNA-SA-MS was prepared with sodium alginate as carriers by the water in oil (*W/O*) emulsion-ion cross-linking method. Physical and chemical characteristics of microspheres, such as mean diameter, morphology and drug loading were detected. The release characteristics *in vitro* and its influencing factors were also detected. **Results**: Microspheres with good shape and dispersity were prepared. The mean diameters, drug loading and drug entrapment efficiency were (12.03±6.9) μm, 5% and 56.0% respectively. Release rate was negatively correlated with cross-linking extent of chitosan, positively correlated with the drug contents. **Conclusion**: Sodium alginate can be used as biodegradable carriers for the preparation of DNA vaccines microspheres and the microspheres can be used as ideal drug delivery system for DNA vaccines. The *W/O* emulsion-ion cross-linking method is simple and particularly good for the structural and functional integrity of DNA vaccines.

[KEY WORDS] DNA vaccine; sodium alginate; microspheres; *in vitro* release
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 58-60]

DNA 疫苗是在基因治疗和转基因技术基础上产生的第 3 代疫苗,它兼有灭活疫苗的免疫效能和基因工程疫苗的安全特性,是疫苗发展史上的一次革命,在预防病毒、细菌、寄生虫等传染性疾病和治疗癌症等方面具有广阔的应用前景[1]。目前 DNA 疫苗的常用剂型为水溶液注射剂,肌注为常用的给药方法。动物实验和人体临床实验表明,此种剂型给药存在着生物利用度低、给药剂量大、免疫效果不够理想的缺点,从而限制了 DNA 疫苗的研究进展[2,3]。其主要原因是由于 DNA 疫苗相对分子质量量大(一般为几百万),水溶性强,易于被 DNA 酶降解而失活。因此研制新的给药剂型,提高 DNA 疫苗的转运效率,提高免疫效果,降低给药剂量是目前 DNA 疫苗研究中亟需攻克的难题。

DNA 疫苗制备成微球给药剂型后具有靶向抗原提呈细胞、保护 DNA 疫苗的作用,从而可达到提高转运效率、提高免疫效果的目的,具有很好的发展应用前景[4~6]。海藻酸钠为天然高分子多糖,可生物降解,生物相容性好,并且具有一定的免疫佐剂作用,海藻酸钠易与 2 价阳离子交联固化,利用这一特性,可通过乳化离子交联法制备海藻酸钠微球。国外已有不少用海藻酸钠包裹蛋白、多肽类疫苗而提高免疫效果的报道,但对 DNA 疫苗海藻酸钠微球的研究报道少[7,8]。本文研制了 DNA 疫苗的海藻酸钠微球(DNA-SA-MS)并对其体外释药特性进行了考察。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 海藻酸钠(青岛胶南明月海藻化

[基金项目] 上海市科委科技攻关重大项目(03DZ19232).
[作者简介] 刘善奎(1971-),男(汉族),博士生,主管药师.
*Corresponding author. E-mail: liullk@shanghai.online

工有限公司,药用级,批号:20010611);壳聚糖(青岛利中甲壳质公司,医用级,批号:20020926);口蹄疫 DNA 疫苗(第二军医大学基础部医学遗传学教研室研制,批号:20020926);司盘-85、吐温-85(化学纯,上海化学试剂商店);玉米油(食品级,市售);DNA marker(2 000 bp,上海晶美生物技术有限公司);醋酸钙、醋酸锌、浓盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钾等均为分析纯。

1.2 仪器 751G 紫外分光光度仪(上海分析仪器厂);UV-256 紫外分光光度仪(日本岛津公司);XW-80 型旋涡混合器(上海第一医学院仪器厂);800 型离心沉淀器(上海手术器械厂);增力电动搅拌器(上海标本模型厂);相衬显微镜(日本 Olympus 公司);LS 230 激光粒度分析仪(美国 Coulters 仪器公司)

1.3 微球的制备 采用改良的乳化离子交联法制备[8]。经均匀设计优化处方和工艺,最佳处方和制备工艺如下:取 DNA 疫苗 PBS 溶液(8.65 mg/ml) 1.5 ml,加入 5 ml 1.5%的海藻酸钠溶液,混合均匀,作为水相;取玉米油 40 ml,加入 2 ml 司盘- 85 和0.4 ml吐温-85,混合均匀,作为油相。在 4 000 r/min 搅拌下,将水相滴加至油相中,搅拌 3 min,形成 *W/O* 乳剂;然后降低搅拌速度为 1 000 r/min,加入 4 ml 离子交联剂(5% $CaAc_2$和 10% $ZnAc_2$ 的混合溶液),搅拌 5 min,然后降低转速为 300 r/min,继续搅拌 10 min,交联固化;将乳剂转移至分液漏斗中,静置 5 h,取下层 2 000 r/min 离心 3 min,分离微球,用灭菌注射用水洗涤 3 次,用 5 ml 灭菌注射用水混悬。取微球混悬液 5 ml 至烧杯中,加入灭菌注射用水 15 ml,1 000 r/min 搅拌条件,逐渐滴加 0.05%壳聚糖溶液(pH 5～6,含有 3% $CaAc_2$)3.75 ml,继续搅拌 10 min,2 000 r/min 离心 3 min,分离微球,用灭菌注射用水洗涤 3 次,用 5 ml 灭菌注射用水混悬,置冰箱 4℃或冻干保存,备用。

1.4 微球的冷冻干燥工艺 取 DNA 疫苗海藻酸钠微球混悬液 1 ml,分别加入 1 ml 水、1 ml 10%甘露醇溶液、2 ml 10%甘露醇溶液,混合,置低温冰箱中冷冻,然后置冷冻干燥机中冷冻干燥 15 h,取出适量,加入 1 ml 水,振摇,光学显微镜下观察微球的形状和重新分散性能。

1.5 微球载药量和包封率的测定 把海藻酸钠微球混悬液于旋涡混悬器上混悬均匀,精密吸取混悬液 1 ml,加入 2 ml 3%柠檬酸钠溶液,涡旋混合 5 min,使微球溶解至透明,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液测定紫外吸收光密度值(D_{260}),以标准曲线法计算 DNA 的含量。

包封率(%)= 海藻酸钠微球混悬液的质量浓度(μg /ml)×混悬液的体积(ml)/制备时 DNA 疫苗的投药量(μg)×100%

1.6 微球的形态、粒径大小和分布 取 1 滴海藻酸钠微球混悬液,加入适量水稀释,加入 1 滴碳素墨水,混合,以降低背景的透光性能,于相衬显微镜下观察,拍照。取海藻酸钠微球混悬液 3 ml,加入适量蒸馏水稀释,调整透光度,采用 LS 230 激光粒径测定仪测定粒径大小和分布。

1.7 DNA 疫苗结构完整性的考察 取海藻酸钠微球混悬液或海藻酸钠微球冷冻干燥粉末适量,加入 3%柠檬酸钠溶液,涡旋混合 5 min,使微球溶解完全,3 000 r/min 离心 3 min。取上清液 20 μl,1%琼脂糖电泳分析,EB 染色,以未经包裹的 DNA 疫苗为对照,观察 DNA 疫苗超螺旋、开环和线性 3 种构形及其比例的变化情况。

1.8 体外释放实验[9] 取 DNA 疫苗海藻酸钠微球混悬液适量(约含 DNA 疫苗 1 mg),加入 4 ml PBS(pH 7.4),置 37℃水浴摇床 100 r/min 振荡,定时取出,3 000 r/min 离心 3 min,吸取上清液 4 ml,重新加入 4 ml PBS(pH 7.4),以紫外分光光度计测定 D_{260},计算药物累积释放百分率。以载药量分别为 0.5%、2.5%、5%微球(壳聚糖固化比例均为 5%)和壳聚糖固化比例分别为 0、5%、10%微球(载药量均为 5%)进行体外释放试验,定时取样,考察载药量和壳聚糖固化比例对释药特性的影响。

2 结 果

2.1 微球的理化特性 用相衬显微镜观察,可见微球球形圆整性好,分散性好,不粘连,破损少。微球平均粒径为(12.03±6.9) μm,粒径分布范围较窄,98.3%的微球粒径<20 μm。采用最佳处方和工艺制备的微球载药量为 1 000 μg/ml,冷冻干燥微球的含药量可达 5%(*W/W*),包封率 56%。冷冻干燥实验表明采用甘露醇为分散剂,微球重新水化后,重新分散性好,不粘连,球形圆整。

2.2 制备工艺和冷冻干燥工艺对 DNA 疫苗结构完整性的影响 DNA 疫苗 3 种构象的比例没有明显的改变,没有产生线性 DNA,这表明乳化-离子交联工艺有利于 DNA 疫苗的稳定性。

2.3 影响粒径大小和包封率的因素 均匀设计实验结果表明搅拌速度是影响粒径大小的最重要因素,搅拌速度与粒径大小呈负相关。搅拌速度为 5 000 r/min 时,平均粒径为 11 μm;当搅拌速度降

为 3 000 r/min 时，平均粒径为 20 μm。由于受注射给药体积的限制，制备的微球应达到一定的载药量，本实验采用理论载药量为 10%。结果表明，选定的最佳处方和工艺，达到了这一要求。

2.4　载药量对微球释药的影响　见图 1A。不同载药量的微球体外释药曲线形状一致，开始 1 d 内为快速释放（突释），2～6 d 内释放速率较为稳定，但速率变慢，6～10 d 内释药速率变快，10 d 以后基本释药完全，速率变慢，处于平台期。载药量高的微球，累积释药速率略快。

2.5　壳聚糖固化比例对微球释药的影响　见图 1B。壳聚糖固化后可显著延缓微球的释放，固化比例越高，释药速率越慢。这是由于交联固化的壳聚糖，减少了海藻酸钠微球表面的孔隙率，阻滞药物的扩散释放。

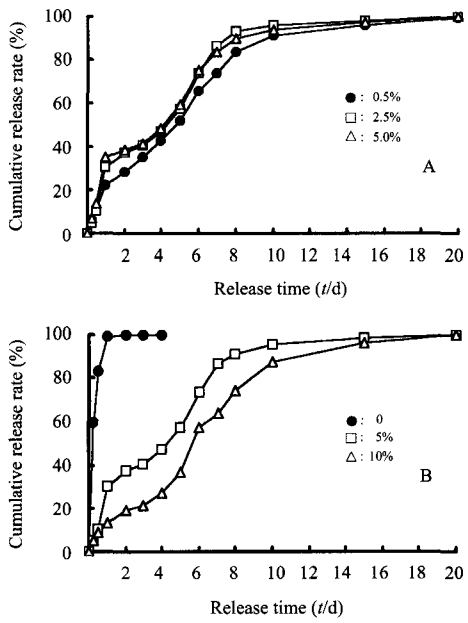

图 1　载药量（A）及壳聚糖固化比例（B）对微球的累积释药速率的影响

Fig 1　Cumulative release rate of microspheres with different drug loading (A) and with different cross-linking extent of chitosan (B)

3　讨　论

本实验采用乳化-离子交联法制备了 DNA 海藻酸钠微球，该工艺有利于 DNA 疫苗的稳定性，微球中的 DNA 疫苗保持了较高比例的超螺旋 DNA。这是由于该法不需要超声、有机溶剂等易于造成 DNA 降解的工艺和试剂，且搅拌速率较低，因而较好地保持了药物的活性。并且本实验采用价廉的壳聚糖替代昂贵的聚赖氨酸[8]，改良了制备方法，有利于 DNA 疫苗微球制备的产业化。

DNA 疫苗微球通过吞噬细胞等抗原提呈细胞的吞噬作用而具有靶向作用，从而可提高转运效率和免疫效果。微球的粒径大小对体内微球的吞噬有直接的影响，关于最适宜吞噬的粒径分布范围一般认为应＜20 μm[6]。本实验制备的微球粒径符合吞噬作用的要求。

DNA 疫苗微球的释药速率同免疫效果的关系，目前还没有定论。从吞噬机制推论可知，受吞噬细胞生命周期（一般为 2～3 周）的限制，微球的释药应在此时间内释放完全为宜[10]。本实验筛选的最佳处方可在 10 d 内缓慢释放至完全，达到了释药速率的要求。

DNA 疫苗微球的体外、体内免疫效果有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 孙树汉. 核酸疫苗[M]. 上海：第二军医大学出版社，2000. 1-7.

[2] Pachuk CJ, McCallus DE, Weiner DB, *et al*. DNA vaccines—challenges in delivery[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2000, 2(2): 188-198.

[3] Dubensky TW Jr, Liu MA, Ulmer JB. Delivery systems for gene-based vaccines [J]. *Mol Med*, 2000, 6(9): 723-732.

[4] Singh M, Briones M, Ott G, *et al*. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 811-816.

[5] Wang DQ, Robinson DR, Kwon GS, *et al*. Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly (*D*, *L*-lactide-co-glycolic acid) microspheres as novel approach for immunogene delivery [J]. *J Control Release*, 1999, 57(1): 9-18.

[6] Walter E, Dreher D, Kok M, *et al*. Hydrophilic poly(*D*, *L*-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells[J]. *J Control Release*, 2001, 76(1-2): 149-168.

[7] Aggarwal N, HogenEsch H, Guo P, *et al*. Biodegradable alginate microspheres as a delivery system for naked DNA[J]. *Can J Vet Res*, 1999, 63(2): 148-152.

[8] Mittal SK, Aggarwal N, Sailaja G, *et al*. Immunization with DNA, adenovirus or both in biodegradable alginate microspheres: effect of route of inoculation on immune response[J]. *Vaccine*, 2000, 19(2-3): 253-263.

[9] Coppi G, Iannuccelli V, Leo E, *et al*. Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles[J]. *J Microencapsul*, 2002, 19(1): 37-44.

[10] Hao T, McKeever U, Hedley ML. Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA[J]. *J Control Release*, 2000, 69(2): 249-259.

[收稿日期]　2003-08-26　　**[修回日期]**　2003-11-26

[本文编辑]　尹　荼