

# 生物可降解微球作为乙型肝炎基因免疫佐剂的研究

龚 非 姜述德 李卫东 陈俊英

(中国医学科学院医学生物学研究所 昆明 650118)

**摘要:**探讨生物可降解微球对基因免疫的增强作用。采用有机溶剂蒸发法制备聚乳酸聚乙醇酸共聚物(PLGA)微球,构建含有乙型肝炎病毒表面抗原S基因的pRc-CMV真核表达载体,用微球与基因载体共孵育法制备其混合物。肌肉注射免疫Balb/c小鼠。结果表明:微球注射组的血清抗体滴度达到 $1:1600$ ,其效果与乙型肝炎病毒表面抗原加铝佐剂注射组相近,而裸DNA注射组没有反应。说明了生物可降解微球可显著的提高基因免疫的免疫反应。

**关键词:**聚乳酸聚乙醇酸共聚物(PLGA),DNA免疫,乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)

**中图分类号:**Q939.91,R392.11,R512.62 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0068-05

## BIODEGRADABLE POLY (D,L-LACTIDE-CO-GLYCOLIC ACID) MICROSPHERES USED AS ADJUVANT IN DNA IMMUNIZATION OF HEPATITIS B VIRUS S GENE

GONG Fei JIANG Shu-De LI Wei-Dong CHEN Jun-Ying

(Chinese Academy of Medical Sciences, Institut of medical and biology, Kunming 650118)

**Abstract:** Study the immunological adjuvant function of biodegradable microspheres for DNA immunization. Empty poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) microspheres were prepared using the water-in-oil-in-water(w-o-w) technique; A plasmid DNA pRc-CMV encoding hepatitis B virus S antigen was constructed; The mixture of the microspheres and the plasmid DNA was prepared by incubation method. The mixture was administered to Balb/c mice by intramuscular injection. Result: The high antibody titer( $1:1600$ ) of intramuscular injection of the mixture of microspheres and the plasmid DNA was obtained, similar to that of intramuscular injection of the mixture of  $Al(OH)_3$  and hepatitis B virus S antigen; while intramuscular injection the plasmid DNA elicited no serum antibody responses. Conclusion: biodegradable microspheres may be used as an good adjuvant for DNA immunization.

**Key words:** Poly(D,L-lactide-co-glycolic acid),DNA immunization, Hepatitis B virus S antigen(HBsAg)

收稿日期:2000-01-15,修回日期:2000-08-08

生物可降解微球作为基因免疫的佐剂,是近两年来发展起来的新型基因免疫方法。微球给药技术曾广泛用于药物及多肽、蛋白、病毒等疫苗的投递研究<sup>[1~3]</sup>,微球剂疫苗不仅可以很好地保护抗原性物质,而且还能控释缓释疫苗增强其免疫效果,起到免疫佐剂的作用。生物可降解微球的制备材料中使用最多的是聚乳酸(PLA)和聚乳酸聚乙醇酸共聚物(PLGA),它们可在体内随机降解并被吸收,不会对机体造成损伤。生物可降解微球在基因免疫中也起到很好的作用<sup>[4~7]</sup>,有利于基因的吸收,而且可通过口服、注射等途径进行免疫研究,但是在微球的制备过程中,基因易受损伤而且其包裹效率也不高。

我们研究了生物可降解微球的制备条件及包含乙型肝炎病毒表面抗原S基因的真核表达载体的构建,采用微球与基因载体共孵育法制备其混合物。本文主要报告微球的制备、真核表达载体的构建及免疫效果的有关实验结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物可降解微球的制备

PLGA(50:50,wt=40,000)、PLGA(85:15,wt=105,600)、PLA(wt=103,000)、聚乙醇(PVA)购于SIGMA公司;实验采用油包水、水包油(W/O/W)的溶剂蒸发法制备微球<sup>[2,3]</sup>;把共聚物材料溶解于二氯甲烷配成6%的溶液,按不同体积比与水混合,在50W的超声波下处理90~120s,将这一混合物加入到不同浓度的PVA溶液中,剧烈搅拌1100r/min,蒸发溶剂12~18h。12,000r/min离心10min收集微球,用蒸馏水洗微球3次,离心收集冻干,4℃保存备用。电镜及光镜下观察微球,在光镜的目镜上安装比例尺测定微球的平均粒径,选取微球粒径适合的备用。为了制备颗粒均匀、平均粒径合适的微球,采用以下条件:

(1)3种不同共聚物材料在相同条件下制备:二氯甲烷溶液与水的体积比1:1;PVA溶液体积50mL,浓度5%。(2)共聚物材料采用PLGA(50:50,wt=40,000),二氯甲烷溶液与水的体积比为5:1、3:1、2:1、1:1、1:2;PVA溶液体积50mL,浓度5%。(3)共聚物材料采用PLGA(50:50,wt=40,000),二氯甲烷溶液与水的体积比1:1;PVA溶液体积50mL,浓度为1、2、5、10%。(4)共聚物材料采用PLGA(50:50,wt=40,000),二氯甲烷溶液与水的体积比1:1;PVA溶液浓度为10%、体积为10、30、50、100mL。

### 1.2 载体的构建

我国adr型HBV表面抗原S基因和pRc-CMV真核表达载体由本所免疫室李琦涵老师惠赠。菌株DH5 $\alpha$ 购自Gibco BRL公司,用于载体构建及扩增。各种工具酶购于华美及宝生物公司。依据表达载体多克隆位点中的限制性内切酶HindⅢ、ApaⅠ设计引物:5'引物为:5'-AGTCAAGCTTATGGAGAACACAGCAT-3';3'引物为:5'-GTCAGGGCCCTCAAATGTATACCCAAAGAC-3'。用PCR将目的基因从基因组中调出来,酶切后联接到表达载体中,见图1。具体操作按文献[4],常规表达载体构建。完成后用限制性内切酶酶切、DNA测序方法鉴定基因的完整性;瞬时表达鉴定载体的功能:采用磷酸钙转染法使表达载体转染COS-7细胞(本实验室保存),72h后离心收细胞,加入细胞裂解液,超声波下处理后,13,500r/min离心10min,取上清,用乙肝表面抗原检测试剂盒(上海科华公司的立可测)检测抗原滴度。

### 1.3 微球与基因载体混合物的制备

微球与基因载体按比例混和后,37℃、200r/min摇动孵育8~10h,制备完后立即使用。

### 1.4 动物免疫及免疫后检测

实验动物为6至8周龄雌性Balb/c小鼠(购于中国医学科学院实验动物所繁育厂)。分3

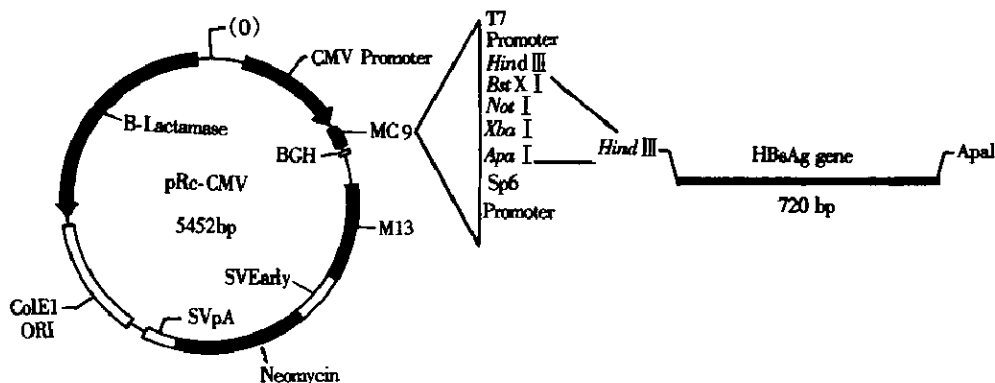


图 1 表达载体构建示意图

组按常规用量免疫, 每组 8 只。第 1 组: 用  $100\mu\text{g}$  裸 DNA 肌肉注射免疫 Balb/c 小鼠作为基因免疫对照; 第 2 组: 用 HBV 表面抗原(HBsAg) +  $\text{AL}(\text{OH})_3$  (购于北京华尔盾生物技术公司)  $10\mu\text{g}/\text{只}$  肌肉注射免疫 Balb/c 小鼠作为阳性对照; 第 3 组: 用微球与基因载体混合物(含基因  $100\mu\text{g}$ ) 肌肉注射免疫 Balb/c 小鼠。注射部位均采用双侧胫前肌。免疫后两周起, 连续采血 6 个月, 每月 1 次, 从小鼠尾采血, 离心取血清, 采用乙肝表面抗体检测试剂盒(上海科华公司的立可读)检测小鼠体内抗体滴度。用小牛血清稀释样品, 采用双抗夹心法在 BioRad 550 酶标仪 UV 450nm (以 630nm 为参照) 测血清样品抗体酶标 OD 值, 实验测定值取组内小鼠测定值的平均值。

### 1.5 统计处理

采用两样本均数比较的 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 微球的制备及选择

(1) 在相同条件下 3 种不同共聚物材料所制备的微球大小差异显著: PLGA(50 : 50, wt = 40,000) 微球的平均粒径  $12.5(\pm 4.8)\mu\text{m}$ , PLGA(85 : 15, wt = 105,600) 微球的平均粒径  $58.4(\pm 23.6)\mu\text{m}$ , PLA(wt = 103,000) 微球的平均粒径  $45.5(\pm 22.3)\mu\text{m}$ 。(2) 当二氯甲烷溶液与水的体积比为 5 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2 时微球的平均粒径分别为  $4.7(\pm 2.5)$ 、 $5.5(\pm 2.8)$ 、 $6.4(\pm 3.3)$ 、 $12.5(\pm 4.8)$ 、 $39.8(\pm 15.6)\mu\text{m}$ 。(3) 当 PVA 溶液体积 50mL、浓度为 1、2、5、10% 时, 微球的平均粒径为  $58.6(\pm 24.8)$ 、 $28.5(\pm 13.5)$ 、 $12.5(\pm 4.8)$ 、 $5.3(3.0)\mu\text{m}$ 。(4) 当 PVA 溶液浓度为 10%、体积为 10、30、50、100mL 时, 微球平均粒径为  $3.9(\pm 2.5)$ 、 $4.2(\pm 2.0)$ 、 $5.3(\pm 3.0)$ 、 $8.7(\pm 4.5)\mu\text{m}$ 。(5) 微球的大小决定免疫效果的好坏, 微球大小在小于  $10\mu\text{m}$  时易于被巨噬细胞吞噬, 小于  $5\mu\text{m}$  时还易转移到脾脏等淋巴组织, 更有利于产生免疫反应<sup>[8,9]</sup>。在微球制备时采用 2 : 1 的油水体积比混合, 超声波下处理 120s, PVA 浓度为 10%, 体积为 30mL, 蒸发搅拌 18h, 产生的微球平均粒径大小为  $4.2\mu\text{m}$ , 而且均匀程度高, 因此选择这一微球用于免疫(见图 2、图 3)。

### 2.2 载体的鉴定

通过 PCR、限制性内切酶酶切、酶切片段连结等技术, 构建成功含有 HBV 表面抗原 S 基

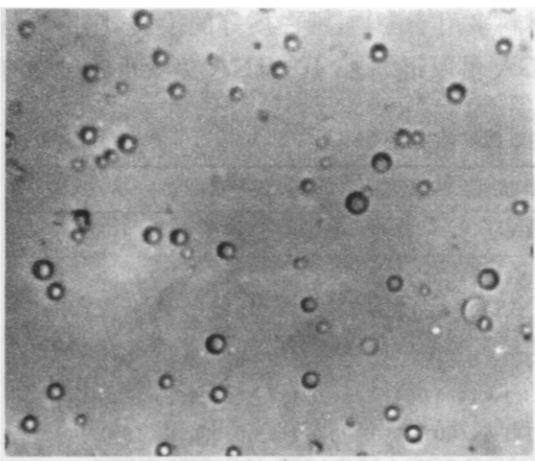


图 2 微球显微照片(×400)

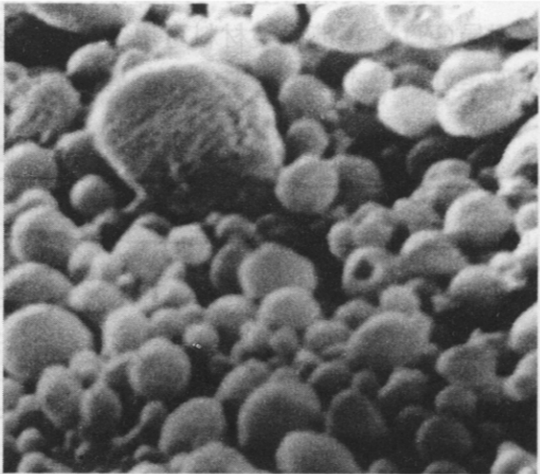


图 3 PLGA 微球电镜照片(×1000)

因的 pRc-CMV 真核表达载体,其双酶切鉴定电泳图,见图 4;测序结果(宝生物公司)与基因原序列完全相同<sup>[10]</sup>;用乙肝表面抗原检测试剂盒检测,所有转染过的 COS-7 细胞均是阳性,最高抗原滴度为 1 : 32。

2.3 动物免疫结果测定及不同实验组间的比较

3 个实验组不同时间的测定结果,按试剂盒规定 P/N 大于 2.1 为阳性,因此 OD 大于 0.105 为阳性,见表 1。以上结果显示,微球与基因共免疫的效果明显优于裸基因免疫组 ( $P<0.01$ ),其最大抗体滴度可达到 1 : 1600。与 HBsAg+AL(OH)<sub>3</sub> 注射组相比,微球组产生抗体的时间较晚,但可同时达到抗体峰值,只是在第六月的时候抗体水平有下降,根据测试结果绘制抗体滴度平均值与检测时间曲线图见图 5。

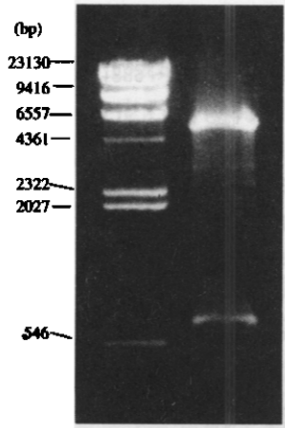


图 4 Hind III +Apa I 双酶切电泳图  
注,lambdadaDNA Hind III Marker

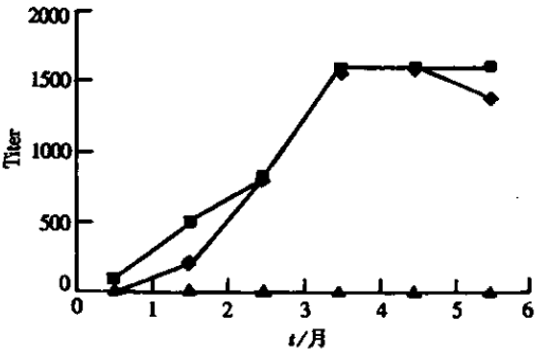


图 5 抗体滴度平均值与检测时间曲线  
注,组 1 注射 100μg DNA,组 2 注射含 10μg HBVsAg 的铝佐剂混合物,组 3 注射含 100μg DNA 的微球混合物  
-▲-组 1,-■-组 2,-◆-组 3

### 3 讨论

PLGA 是一类聚脂生物可降解材料,其生物相容性好,无毒副作用,1990 年美国食品与药物管理局(FDA)批准此类材料可用于人体。这类材料多用于药物、蛋白质等的投递,应用于基因免疫是近两年才发展起来的。在基因免疫中 PLGA 可以很好地保护 DNA 免受投递过程的

表 1 免疫后小鼠血清测抗-HBs 检测结果

免疫后 (月)	OD <sub>450nm</sub> (以 OD <sub>630nm</sub> 为参照)		
	组 1	组 2	组 3
1	0.005±0.001(1:10)	0.120±0.011(1:100)	0.015±0.004(1:10)
2	0.004±0.002(1:5)	0.167±0.035(1:500)	0.197±0.023(1:200)
3	0.003±0.001(1:5)	0.221±0.021(1:800)	0.155±0.042(1:800)
4	0.006±0.002(1:5)	0.147±0.043(1:1600)	0.133±0.025(1:1600)
5	0.004±0.003(1:5)	0.154±0.027(1:1600)	0.148±0.036(1:1600)
6	0.006±0.004(1:5)	0.138±0.024(1:1600)	0.137±0.011(1:1400)

损失,并且有利于 DNA 被细胞吸收。随着微球材料的不断降解,DNA 可持续释放,起到持续免疫的效果。但在微球的制备过程中,尤其是采用溶剂蒸发法制备时,DNA 易受超声波或强机械搅拌的作用而严重损伤,而且其包裹效率也不高。为了避免 DNA 的损伤和在包裹过程中大量丢失,我们采用 DNA 与微球直接混合法,使 DNA 吸附于微球表面,借助微球的免疫佐剂作用,使 DNA 更易吸收。从我们的实验结果来看,微球的确显著提高了基因免疫的免疫反应,效果甚至与乙型肝炎病毒表面抗原加铝佐剂相近,而裸 DNA 注射的结果很低,有的甚至没有反应。由此可以看出生物可降解微球对基因免疫有很好的佐剂作用,为发展有效的基因疫苗带来了希望。

### 参 考 文 献

- [1] Jong E O, Yoon S N, Keun H L, *et al.* Journal of Controlled Release, 1999, **57**:269~280.
- [2] Manmohan S, Li X M, McGee J P, *et al.* Vaccine, 1997, **15**:475~481.
- [3] Sarat C C, Appu R, Sudip K D, *et al.* Journal of Controlled Release, 1999, **58**:223~232.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂期 T. 《分子克隆实验指南》第二版, 304~324, 672~688, 765~810.
- [5] Jones D H, Corris S, McDonald S, *et al.* Vaccine, 1997, **15**:814~817.
- [6] Wang D Q, Deborah R R, Glen S K, *et al.* Journal of Controlled Release, 1999, **57**:9~18.
- [7] Luo D, Kim W M, Nadya B, *et al.* Pharmaceutical Research, 1999, **16**:1300~1308.
- [8] Eldridge J H, Staas J K, Meulbroek J A, *et al.* Infection and immunity, 1991, **59**:2978~2986.
- [9] Yasuhiko T, Yoshiharu I, Yoshito I, *et al.* Vaccine, 1996, **14**:1677~1685.
- [10] 琦祖和, 熊伟军, 袁建刚, 等. 中国科学 B 辑, 1988, 1300~1304.