

分类号

密级

江南大学

硕士学位论文

题目：壳聚糖微球作为疫苗佐剂的免疫学机制和安全性评价

英文并列题目：**Immunological mechanism and security evaluation
of chitosan microspheres vaccine adjuvant**

研究生：吴晶晶

专业：微生物学

研究方向：微生物遗传改良

导师：中西秀树教授

指导小组成员：高晓冬教授

学位授予日期：二〇一六年六月二十日

答辩委员会主席：周哲敏

江南大学

地址：无锡市蠡湖大道 1800 号

二〇一六年六月

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签名: 吴萌萌 日期: 2016年 6月 8日

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签名: 吴萌萌 导师签名: 中西秀村

日期: 2016年 6月 8日

摘要

壳聚糖（Chitosan）是一种碱性多糖，在自然界中储量丰富，来源广泛。其自身及其分解产物无毒，具有极好的生物相容性，是一种理想的生物医用材料。由壳聚糖及其衍生物制备的微球，不仅兼具壳聚糖生物相容性好的优点，更重要的是还具有微球的抗原递呈细胞靶向性，控制抗原释放，有效保护抗原降解失活等优势。

壳聚糖类微球凭借上述独特的理化性质和生物学特点，已成为近年来全世界范围内疫苗佐剂研究的热点。本论文对这一新领域进行了探索，利用高压均质技术制得粒径均一可控的壳聚糖季铵盐微球，并利用该微球装载H5N1裂解疫苗，考察其作为注射用疫苗佐剂的有效性和安全性。

论文具体开展的研究工作如下：首先是利用高压均质技术制得壳聚糖季铵盐微球。全面考察各关键制备条件对壳聚糖季铵盐微球粒径均一性和结构的影响，并成功制得粒径均一的壳聚糖季铵盐微球。然后在细胞水平和动物水平上考察壳聚糖季铵盐微球作为H5N1裂解疫苗佐剂的免疫效果。首先，用髓源树突细胞考察壳聚糖季铵盐微球的免疫效果，结果表明壳聚糖季铵盐微球可促进抗原递呈细胞对抗原的吞噬以及抗原递呈细胞的活化，从而引发高效免疫应答；其次，在动物水平考察其作为H5N1裂解疫苗佐剂对免疫效果的影响。结果显示，壳聚糖季铵盐微球可提高小鼠血清中特异性抗体的滴度，提升CD4⁺CD8⁺T淋巴细胞亚群比例，且明显高于商品化铝佐剂组，表明微球能产生更有效的免疫活化效果。最后以小鼠、大鼠、豚鼠、新西兰大白兔等为动物模型，对壳聚糖季铵盐微球作为注射疫苗佐剂进行安全性评价。安全性实验包括小鼠急性毒性实验和异常毒性实验、大鼠重复毒性实验、豚鼠过敏实验、新西兰大白兔肌肉刺激性实验、体外溶血实验等。结果表明，制剂注射后无毒性反应，刺激性较弱，不会引起血细胞溶血，说明壳聚糖季铵盐微球安全性良好，可用于肌肉注射给药。

以上结果表明，壳聚糖季铵盐微球作为H5N1裂解疫苗的佐剂，是一种安全有效的新型疫苗佐剂，有望实现其在临床上的应用。

关键词：壳聚糖；微球；疫苗佐剂；有效性评价；安全性评价

Abstract

Chitosan, a kind of alkaline polysaccharide, has abundant reserves and wide variety of sources in nature. It becomes an ideal biomedical material as itself and derivatives are non-toxic and biocompatible. Microspheres prepared from chitosan and its derivatives, not only are biological compatibility as good as chitosan, but also have advantages of microspheres such as APC-targeting, antigen releasing control, effective protection of antigen from degradation and inactivation. Chitosan has become a worldwide hot topic as vaccine adjuvant in recent years because of its unique physicochemical and biological characteristics. In this thesis, high pressure homogeneous technique was used to prepare uniform-sized N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride microspheres (HTCC MP) with controllable sizes. The prepared microspheres were used to load H5N1 split vaccines, and the effectivity and security were evaluated as parenteral vaccine adjuvant.

In detail, this thesis mainly contained the following issues. **The first part was to prepare HTCC MP by the high pressure homogeneous technique.** The effect of key parameters in preparation process on the uniformity and structure of HTCC MP were systematically investigated. And uniform-sized HTCC MP were successfully prepared. **The second part was to evaluate the effectivity of HTCC microspheres as H5N1 split vaccines adjuvant *in vitro* and *in vivo*.** Firstly, immune effects of HTCC microspheres were investigated in bone marrow-derived dendritic cells. The results suggested that the HTCC microspheres could promote APCs activation and antigen internalization, and effectively enhanced the immune response. Then the effect of HTCC microspheres as H5N1 split vaccines adjuvant on humoral and cellular immunity was evaluated. The results suggested that HTCC microspheres could significantly enhance the specific antibody in the serum of immunized mice and powerfully improve CD4⁺CD8⁺ T lymphocyte subgroup percentage compared with aluminum adjuvant. It was suggested that HTCC microspheres could more effectively induce immune response than aluminum adjuvant.

The third part was to evaluate the security evaluation of HTCC microspheres as parenteral vaccine adjuvant in mice, SD rats, guinea pigs and rabbits. The security evaluation included acute toxicity test and abnormal toxicity test in mice, multiple toxicity test in SD rats, allergy test in guinea pigs, muscle stimulation test on rabbits' thigh muscles and hemolytic test *in vitro*. Results showed that the security of HTCC microspheres was good. No toxicity, irritation and hemolysis were found after injection of HTCC microspheres. The HTCC microspheres could be used for intramuscular injection.

The above results showed that the HTCC microspheres were safe and effective vaccine adjuvant for H5N1 split vaccine. And the HTCC MP adjuvants have strong potential for clinic applications.

Key words: HTCC; microspheres; vaccine adjuvant; effectivity evaluation; security evaluation

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
目录.....	I
第一章 绪论.....	1
1.1 概述.....	1
1.1.1 疫苗佐剂.....	1
1.1.2 疫苗佐剂的作用机理.....	2
1.2 壳聚糖微球疫苗佐剂.....	2
1.2.1 壳聚糖疫苗佐剂的种类.....	3
1.2.2 壳聚糖微球作为疫苗佐剂的研究进展.....	3
1.3 传统方法制备壳聚糖微球存在的弊端.....	4
1.4 本论文的立题依据及意义.....	4
1.5 本论文的主要研究内容.....	5
第二章 材料与方法.....	6
2.1 实验材料和方法.....	6
2.1.1 实验材料.....	6
2.1.2 实验仪器.....	6
2.2 实验方法.....	7
2.2.1 壳聚糖季铵盐微球的制备与表征.....	7
2.2.2 疫苗制剂的制备及表征.....	8
2.2.3 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的有效性评价.....	9
2.2.4 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的安全性评价.....	11
第三章 结果与讨论.....	15
3.1 壳聚糖季铵盐微球的制备工艺优化.....	15
3.1.1 壳聚糖季铵盐浓度对壳聚糖季铵盐微球制备的影响.....	15
3.1.2 均质压力对壳聚糖季铵盐微球制备的影响.....	15
3.1.3 水油相体积比对壳聚糖季铵盐微球制备的影响.....	16
3.1.4 小结.....	16
3.2 壳聚糖季铵盐微球对抗原的吸附情况.....	17
3.3 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的有效性评价结果.....	18
3.3.1 细胞水平.....	18
3.3.2 动物水平.....	20
3.3.3 小结.....	21
3.4 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的安全性评价结果.....	21
3.4.1 急性毒性实验结果.....	21

3.4.2 重复毒性实验结果.....	22
3.4.3 异常毒性实验结果.....	25
3.4.4 肌肉刺激实验结果.....	25
3.4.5 全身过敏实验结果.....	26
3.4.6 体外溶血实验结果.....	26
3.4.7 小结.....	27
主要结论与展望.....	30
致谢.....	30
参考文献.....	32
附录：作者在攻读硕士期间发表的论文.....	36

第一章 绪论

1.1 概述

1.1.1 疫苗佐剂

20 世纪中期, 流行一时的天花、破伤风、脊髓灰质炎等急性传染病的纷纷败倒, 这主要归功于免疫学史上最伟大的发明之一——疫苗。在公共卫生不断发展的今天, 接种疫苗仍被认为是最有效的卫生干预措施之一。

为增强疫苗抗原的免疫原性, 常常需要在疫苗中加入佐剂。目前应用最多的疫苗佐剂还是铝佐剂, 但是它有较多的局限性。首先, 铝佐剂本身具有冰冻敏感性, 无法冷冻干燥^[1]。其次, 铝佐剂对许多疫苗不起作用, 尤其是以细胞免疫为主的疫苗, 由于它主要刺激辅助 T 淋巴细胞 (Helper T cells, Th) Th2 相关抗体的产生, 不能诱导 Th1 反应谱, 也不能增强细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic lymphocyte, CTL) 的活性^[2]。此外, 铝佐剂应用于多肽疫苗或者亚单位疫苗 (如 H5N1 裂解疫苗) 时, 保护效果并不理想^[3]。最后, 有报道也指出, 铝佐剂在使用中会引起不良反应, 尤其是免疫球蛋白 IgE 的产生, 可引起 I 型超敏反应^[4]。

随着科学技术的急速发展, 针对不同疾病已开发研制出不同疫苗, 包括细胞类佐剂、DNA 疫苗佐剂、复合佐剂等, 但这些疫苗普遍存在一些不足, 并且大多数疫苗的免疫机制还不清楚^[5]。传统疫苗的研发思路在 SARS、乙肝病毒、艾滋病毒、登革热等新型传染病疫苗的研发中遭遇瓶颈, 新型免疫佐剂的研究就显得尤为迫切。因此, 必须找到一种高效且能强有力刺激组织的新型佐剂, 来均衡提升体液免疫和细胞免疫。

自从 80 多年前铝盐佐剂应用于疫苗以来, 安全性问题一直阻碍着疫苗佐剂的发展。一些免疫佐剂在有效诱导免疫应答的同时, 也可能产生自身免疫性疾病等不良反应或毒性太大而无法实现临床应用。迄今为止, 铝佐剂是获得美国 FDA 批准的佐剂, MF59 刚被美国 FDA 批准用于预防 65 岁以及 65 岁以上的人群季节性流感三价疫苗 Flud^[6], AS03 获得欧盟的批准用于乙肝疫苗和人乳头瘤病毒疫苗的佐剂, 其它佐剂均处于研究状态^[7]。另外, 目前缺乏合适的动物模型来预测佐剂的安全性, 而且仅使用动物进行研究, 常常不能完全预测在人体中的不良反应。同时需要考虑影响疫苗免疫活性及稳定性等许多因素, 包括免疫反应、给药途径、佐剂的物理化学特性等。这些都将延缓新型佐剂开发向临床应用的转化时间。

1.1.2 疫苗佐剂的作用机理

佐剂的作用是加强抗原特异性的免疫应答、调整免疫应答类型或延长免疫应答有效时间等。不同种类的佐剂可以通过多种机制调节免疫应答。

佐剂加强免疫应答的机制有以下几个方面：一是对抗原的作用，增加抗原分子的表面积，增加抗原与机体免疫系统的接触程度，增加抗原的免疫原性，延长抗原在机体内的滞留时间，进而延缓抗原的降解和排除，保持对免疫系统的持续激活。脂质体可与细胞膜融合，易被吞噬细胞摄取并能实现生物降解。脂质体包裹抗原，成为抗原缓释系统，从而能不断刺激免疫系统^[8]。二是对机体本身的作用，①抗原递呈细胞（Antigen presenting cells, APCs）的靶向性，佐剂通过与 APCs 表面的受体特异性结合，从而将其携带的抗原靶向该 APCs，从而促进其对抗原的摄取，增强其对抗原的加工和递呈能力。利用基因工程表达模式疫苗，可以诱导 Toll 样受体（Toll-like receptors, TLR）信号通路的激活，Khan S 等将卵白蛋白 CTL 表位肽与 TLR2 的配体 Pam3CysSK4 耦合，发现耦合物能有效促进抗原肽的递呈以及树突细胞（Dendritic cells, DCs）的成熟，同时能提升 CD8⁺T 淋巴细胞数以及细胞因子滴度^[9]。②诱导注射部位的局部炎症反应，引起细胞浸润，出现巨噬细胞、淋巴细胞及浆细胞的募集、增殖、分化，从而增强和扩大免疫应答的能力。AS04 作为 Cervarix 宫颈癌疫苗佐剂，注射后能有效介导局部固有免疫调节因子 NF- κ B 的转录，并诱导细胞因子的生成，刺激淋巴结中 DCs 和单核细胞的增殖^[10]。③诱导分布于组织中的巨噬细胞分泌趋化因子和相关炎症因子，快速募集单核细胞到注射位点^[11]，有利于佐剂免疫效果的发挥。例如，刚被 FDA 批准的流感疫苗佐剂 MF59 乳剂，能够招募粒细胞和单核细胞到注射部位，通过抗原活化的 DCs，促进 CC 类趋化因子受体 7 的成熟和上调，促进抗原迁移至引流淋巴结^[12]，从而更有效地诱导机体产生体液免疫应答和 Th1 型细胞介导的免疫应答。④可以通过活化炎症小体诱导获得性免疫应答。普遍应用于临床的铝佐剂，能直接或间接诱导炎症小体亚型 NLRP3 的表达，提升相关细胞因子白介素 IL-1 β 、IL-18（Interleukin, IL）的表达量，从而激活获得性免疫应答^[13]。⑤通过调节主要组织相容性复合物（Major histocompatibility complex, MHC）MHC I/MHC II 类分子途径的倾向性，进而改变 APCs 的抗原提呈途径，调节免疫应答的类型。MHC I 类和 II 类分子分别参与对内源性和外源性抗原的加工和递呈，壳聚糖季铵盐微球佐剂因带有正电性，可以促进自身所携带的外源性抗原从溶酶体逃逸到细胞质中，然后由胞质转运到内质网，并与 MHC I 类分子组装成抗原肽-MHC I 复合物后转运至细胞表面，被 CD8⁺T 淋巴细胞识别，诱导机体的细胞免疫应答，按内源性抗原提呈途径进行加工和处理^[14]。以及其它一些还未发现的作用机制。

对疫苗佐剂作用机制的详尽认识，可为疫苗佐剂的设计、选择及使用提供宝贵的理论依据和实验指导。不同的佐剂的作用机制也不尽相同，因此在研发新型疫苗时，应针对不同抗原的特性选择利于免疫效果发挥的佐剂。纳米微粒、复合佐剂、DCs 佐剂等新型佐剂是未来佐剂的发展方向，选择黏膜、口服或者微针等其它免疫途径也成为近年来的研究热点。

1.2 壳聚糖微球疫苗佐剂

1.2.1 壳聚糖疫苗佐剂的种类

为了克服壳聚糖在中性溶液中溶解性差的问题,通过化学改性亲水性基团或直接嫁接聚乙二醇(PEG)等水溶性聚合物,开发出各种壳聚糖衍生物^[15]。壳聚糖衍生物佐剂包括文献报道的壳聚糖盐酸盐佐剂,三甲基壳聚糖佐剂,羧甲基化壳聚糖佐剂,甘露糖化壳聚糖佐剂,壳聚糖季铵盐佐剂等。

Ana Vila 等制备的壳聚糖微球,微球粒径为 150-450 nm,用作破伤风疫苗佐剂,给 BALB/c 小鼠喷鼻给药,结果表明微球能持续显著地增强小鼠的体液免疫应答,上调 IgG 和 IgA 水平^[16]。T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)通过盐桥与 CD3 分子相连,参与 T 细胞的信号转导。Ghendon 等将壳聚糖溶液用作一价和三价灭活流感疫苗佐剂,发现壳聚糖通过与 TCR-CD3 受体复合体结合,激活凝集素受体信号通路^[17],促进脾脏中 CTL、自然杀伤细胞、单核淋巴细胞的增殖。用 PEG 修饰的壳聚糖制备纳米微粒(粒径 100-500 nm),作为白喉杆菌疫苗佐剂,能明显上调 IgA 和 IgG 表达水平,且明显高于未用 PEG 修饰的壳聚糖制备的微球组,这可能归功于微球对抗原的缓释作用^[18]。Prego 等^[19]制备的盐酸盐微球(粒径 241.1 ± 17.8 nm),用作乙肝注射疫苗佐剂,将动物免疫时间延伸至 163 d,结果发现壳聚糖组抗体滴度从 133 d 才开始下降趋势,而铝佐剂组从 73 d 就开始下降,表明壳聚糖具有有效控释抗原的作用。三甲基壳聚糖纳微球作为 H3N2 亚单位疫苗佐剂喷鼻给药,较单纯抗原注射组,微球能明显提升 IgG 和 IgA 的表达水平,较好地平衡细胞免疫和体液免疫^[20]。Kim 等^[21]制备的羧甲基壳聚糖纳米微球佐剂,能促进抗原的吞噬,并增强干扰素 IL-6、IL-12p70、肿瘤坏死因子 TNF- α (Tumor necrosis factor, TNF)的分泌,有效地激活抗原特异性细胞 Th1,进而增强体液免疫和细胞免疫反应。甘露糖化壳聚糖微球(粒径 3-5 μ m)作为皮肤坏死性毒素疫苗,采用巨噬细胞进行体外实验,微球能显著提升抗体 IgA 和细胞因子 IL-6、TNF- α 的表达^[22]。王月琦等在前期研究中对壳聚糖进行季铵化修饰,可显著增强壳聚糖的 pH 敏感性,并结合微孔膜乳化技术制备出一系列粒径均一、大小可控的壳聚糖季铵盐微球,该微球可促进 APCs 摄取,帮助抗原实现溶酶体逃逸。动物实验表明其能有效地提高 H5N1 疫苗的免疫效果,促进体液免疫和细胞免疫双重免疫应答^[15]。

开发壳聚糖衍生物,不仅可以提高其水溶性,还增强材料的阳离子性质,增进壳聚糖与抗原或细胞膜的相互作用,促进抗原吸附、包裹和细胞内化的能力,使得壳聚糖能更广泛地应用于疫苗制剂中。

1.2.2 壳聚糖微球作为疫苗佐剂的研究进展

由于其所具有的特殊生物、理化性质,壳聚糖已成为一种理想的新型疫苗佐剂。虽然近年来对它的研究取得较大进展,但进入临床实验和获批的壳聚糖疫苗产品少之又少,以注射免疫用 Viscogel 干粉和黏膜免疫用 ChiSys 粉剂为主^[23]。

Viscogel 干粉主要是将原材料壳聚糖盐酸盐以溶液形式与方酸二乙酯交联,40℃形成凝胶后进行机械破碎,然后冻干成喷鼻用干粉。干粉颗粒粒径大约在 200 μ m 左右。

动物实验表明, Viscogel 作为 Act-HIB 流感嗜血杆菌疫苗佐剂, 可以显著提高体液免疫应答能力, 目前已进入临床 I/II 期。临床前常规毒理学实验结果显示, 注射佐剂后的主要副反应为皮肤红疹, 注射部位的局部炎症反应。上述结果表明该佐剂总体是一个安全、耐受、理想的疫苗佐剂^[24]。另一种进入临床 I/II 期的 ChiSys 粉剂, 用于感染性腹泻致病菌诺如病毒喷鼻疫苗的佐剂。该佐剂除了含有壳聚糖, 还添加有单磷酸脂质 A 和冻干保护剂。在接种疫苗后, 病毒性肠胃炎的发病率由 69.2% 减少到 36.8%。免疫后疫苗组和安慰剂组发生不良事件的频率相似, 最常见症状有鼻充血, 鼻塞和打喷嚏等^[25], 表明该佐剂安全性良好。

从目前已进入临床的产品来看, 壳聚糖微球佐剂总体来说是一种安全、有效、有潜力的疫苗佐剂。

1.3 传统方法制备壳聚糖微球存在的弊端

传统制备方法所制壳聚糖微球尚存在一些弊端, 需要进一步研究解决。首先利用传统方法制备的壳聚糖微球粒径不均一、结构差异大。微球粒径会影响抗原吸附量和分布, 从而影响免疫效果。微球结构差异大, 表面微孔的大小差异大, 抗原释放的速率调控不一, 不利于微球作用机理的研究。其次, 微球交联剂多为戊二醛、甲醛等毒性较大的醛类, 后期洗涤难以清除, 可能残留的外源物质易引起异常毒性和意外不安全因素, 生物安全性差。最后, 传统方法每批制备出的微球产量小且产率低, 批次间不可控地出现差异, 不仅难以保障质量, 而且无法实现向批量生产的转化。

1.4 本论文的立题依据及意义

由壳聚糖及其衍生物制备的微球佐剂, 不仅在加强疫苗抗原的免疫原性、促进细胞免疫和体液免疫、优化免疫应答, 降低抗原使用量等方面发挥着重要作用。但是传统制备方法制备的壳聚糖微球仍存在粒径不均一、安全性差、产率低等问题。

针对以上问题, 本论文提出了一种新的解决思路。即利用高压均质技术制备出粒径均一, 高产率的壳聚糖季铵盐微球, 并在细胞和动物水平上考察微球作为 H5N1 裂解疫苗佐剂的免疫效果, 最后用动物模型考察微球作为注射疫苗佐剂的安全性。

首先, 本论文采用高压均质法制得的壳聚糖季铵盐微球, 微球制备技术简单易行, 便于规模化生产; 其次, 微球主体是生物相容性良好的壳聚糖季铵盐, 交联剂是药用级 α - β -GP, 制得的微球生物安全性良好; 此外将微球用作 H5N1 裂解疫苗佐剂, 既能增强疫苗的免疫效果, 又能持续刺激机体产生高效特异性抗体。最后对模型动物的体重变化、摄食量、血清生化指标、脏器重、脏器系数等多个指标进行检测分析, 全面系统地验证了壳聚糖季铵盐微球的安全性。

本研究为壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的有效性、安全性评价及可能的临床应用提供了实验依据, 微球有望作为疫苗佐剂或药物载体实现其在生物医学领域的临床应用。

1.5 本论文的主要研究内容

为了克服传统方法制备的壳聚糖季铵盐微球存在的问题, 本论文首先利用高压均质

技术制得壳聚糖季铵盐微球。系统考察各关键制备条件对微球粒径均一性和结构的影响，并成功制备出粒径均一的微球。然后将微球用作 H5N1 裂解疫苗佐剂，并在细胞水平和动物水平上考察微球的免疫效果。首先在用髓源树突细胞考察微球的抗原内吞和 APCs 活化作用，然后在动物水平考察了其作为 H5N1 裂解疫苗佐剂对体液免疫和细胞免疫的影响。最后以小鼠、大鼠、豚鼠、新西兰大白兔等为动物模型，对微球进行一系列安全性实验，包括小鼠急性毒性实验和异常毒性实验、大鼠重复毒性实验，豚鼠过敏实验，新西兰大白兔肌肉刺激性实验，体外溶血实验等。



苏州微流纳米生物技术
高压均质机 细胞破碎仪 脂质体挤出器



2.1 实验材料和方法

2.1.1 实验材料

壳聚糖季铵盐（季铵取代度 40%）	自制
乳酸（AR）	国药集团化学试剂有限公司
α - β -甘油磷酸钠（ α - β -GP，药用级）	山西运城风陵渡开元药化有限公司
液体石蜡（AR）	国药集团化学试剂有限公司
石油醚（AR）	国药集团化学试剂有限公司
PO-500	日本 Sakamoto Yakuhin Kogyo 公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
乙醇（AR）	国药集团化学试剂有限公司
RPMI-1640 细胞培养基	美国 Gibco 公司
白细胞介素-4	美国 PeproTech 公司
巨噬细胞集落刺激因子	美国 PeproTech 公司
红细胞裂解液	美国 Affymetrix eBioscience 公司
青霉素、链霉素、胎牛血清	美国 Hyclone 公司
卵清蛋白	美国 Sigma 公司
异硫氰酸荧光素	美国 Affymetrix eBioscience 公司
H5N1 禽流感裂解疫苗	华兰生物工程股份有限公司
铝佐剂	华兰生物工程股份有限公司
血凝素	北京义翘神州生物技术有限公司
用于流式细胞检测的抗体	美国 Affymetrix eBioscience 公司
CCK8 试剂盒	日本同仁化学有限公司
注射器	常州悦康医疗器械有限公司
细胞筛	美国 Falcon 公司
细胞培养板	美国康宁公司
0.9%生理盐水注射液	石家庄四药有限公司
霍乱滤液	美国 SIGMA 公司
受体破坏酶	日本生研株式会社
鸡血	北京梅里亚维通实验动物技术有限公司
东芝专用生化试剂	浙江世纪康大医疗科技股份有限公司
BALB/c 小鼠	北京维通利华实验动物技术有限公司
SD 大鼠	北京维通利华实验动物技术有限公司
豚鼠	北京维通利华实验动物技术有限公司
新西兰大白兔	北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司

2.1.2 实验仪器

BS 110S 型电子天平	德国 Sartorius 公司
Avestin C3 高压均质机	加拿大 AVESTIN 公司
RCT basic 磁力搅拌器	德国 IKA 公司
滚轴式混合器	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
3K30 高速离心机	美国 Sigma 公司

循环式真空水泵	巩义市英峪予华仪器厂
超声波清洗机	宁波新芝生物科技股份有限公司
Zetasizer Nano ZS 动态光散射粒度仪	英国 Malvern Instruments 公司
JSM-6700F 冷场发射扫描电子显微镜	日本 JEOL 公司
高压灭菌锅	江苏江阴滨江医疗设备有限公司
电热恒温鼓风干燥器	上海福玛实验设备有限公司
YT-CJ-2ND 型超净工作台	北京亚泰公司
CKX41 型生物显微镜	日本 OLYMPUS 公司
二氧化碳培养箱	日本三洋公司
多功能酶标仪	瑞士 Tecan 公司
垂直混合仪	宁波新芝生物股份科技有限公司
手持式细胞计数器	美国 Millipore 公司
流式细胞仪	Beckman Coulter (CyAn™ ADP)
移液器	Eppendorf (Research plus)
东芝 TBA-40FR 全自动生化分析仪	日本东芝公司

2.2 实验方法

2.2.1 壳聚糖季铵盐微球的制备与表征

2.2.1.1 壳聚糖季铵盐微球的制备

自制壳聚糖季铵盐 (2-羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖季铵盐, N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium Chitosan Chloride, HTCC, 分子量 78 万, 季铵取代度 40%, 脱乙酰度 95%), 制备壳聚糖季铵盐微球 (HTCC microspheres, HTCC MP, 下文记为 HTCC 微球) 的制备流程如图 2-1 所示。

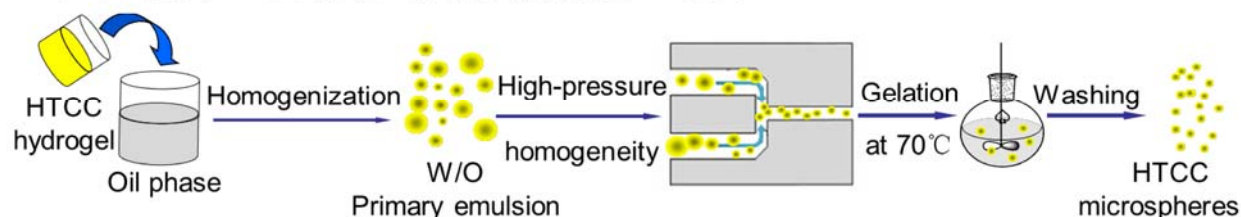


图 2-1 壳聚糖季铵盐微球的制备流程图

Fig.2-1 Flow diagram of preparation of HTCC microspheres

称取 0.168 g HTCC 溶解于 2.5 mL 0.1 mol/L 乳酸中, 搅拌 30 min 左右, 至 HTCC 完全溶解。之后向其中加入 1.5 mL 去离子水, 搅拌均匀。冰浴条件下, 向上述溶液中滴加 1 mL 0.4 g/mL 的 α - β -GP 溶液, 交联 5 min, 形成水凝胶, 作为水相。将液体石蜡与石油醚按体积比 1:2 混合, 并加入乳化剂 PO-500 至终浓度为 6.0 wt %, 作为油相。将配制好的油相倒入高压均质机中, 再将水相缓慢加入至油相, 尽量避免气泡产生, 打开均质气阀预均质制备初乳液。打开均质气阀, 调节均质压力, 高压均质 6 min, 得到均一乳液。然后将乳液置于装有磁力搅拌子的三角烧瓶中, 70 °C 下油浴固化 3 h, 同时

以 150 rpm 的转速搅拌,完成微球的固化。最后,将固化后的乳液分装至 50 mL 的离心管中,加入沸程 60-90 的石油醚至总体积为 45 mL,在滚轴混合器上混合 5 min,2000 rpm 离心 3 min,洗涤 3 次。再用沸程 30-60 的石油醚洗涤两次。将得到的沉淀用 10 mL 沸程为 30-60 的石油醚重悬,移至装有磁力搅拌子的三角烧瓶中,加入 10 mL 20%异丙醇,充分搅拌使异丙醇和石油醚置换。在 37 °C 水浴条件下抽真空,抽至瓶内液体体积为 5-8 mL 之间,结束抽真空。将所得液体移至 10 mL 离心管,用去离子水洗球 3 次,得到 HTCC 微球,4°C 保存备用。

无特别说明情况下,加入的水相体积为 5 mL,油相中石油醚和液体石蜡的体积比为 1:2,油相乳化剂 PO-500 浓度为 6.0 wt %,均质时间为 6 min。

2.2.1.2 微球粒径分布和表面电位的测定

采用 Zetasizer Nano ZS 动态光散射粒度仪测定 HTCC 微球的粒径分布,将 HTCC 微球分散于去离子水中,取 1 mL 悬浮液置于样品池中,放入动态光散射粒度仪中测定。HTCC 微球的均一性由多分散性指数 (Polydispersity, PDI) 表征, PDI 数值越小,粒径分布就越窄、粒径均一性就越好。

2.2.1.3 微球表面形貌的观察

HTCC 微球表面形貌采用 JEM-6700F 扫描电镜进行观察。首先将 HTCC 微球溶液滴加到干净的锡箔纸上,自然风干。取导电胶贴于样品台上,然后将附着有干燥 HTCC 微球的锡箔纸固定于该导电胶上。用真空离子溅射机对样品进行喷金,条件为 20 mA、120 s。最后将样品台放入电镜样品室中进行观察。

2.2.2 疫苗制剂的制备及表征

取 500 μ L HTCC 微球置于称量瓶中,120 °C 干燥箱烘干 2 h 至恒重,计算得到 HTCC 微球浓度。将一定体积 HTCC 微球与 H5N1 裂解病毒原液混合,使加入的抗原质量为 15 μ g, HTCC 微球质量为 100 μ g(临床拟使用剂量抗原 15 μ g/dosage,佐剂 100 μ g/dosage),分散于 PBS (pH 7.2-7.4) 中,充分混匀,置 4 °C 恒温箱内,在垂直混合仪上以 20 r/min 的转速旋转混悬 12 h。

吸附结束后,取出垂直混悬吸附后的抗原-HTCC 微球混合溶液,5000 g 离心 5 min,取上清,采用 Micro BCA 试剂盒测定上清中蛋白质含量。HTCC 微球对抗原吸附率 (Adsorption Efficiency, AE) 按以下公式计算: $AE (\%) = (\text{吸附前抗原质量} - \text{吸附后上清液中抗原质量}) / \text{吸附前抗原质量} \times 100\%$ 。

2.2.3 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的有效性评价

2.2.3.1 细胞水平

成熟 DCs 是体内功能最强大的专职 APCs,能有效激活 T 细胞介导的免疫应答,是不可或缺的免疫哨兵^[26]。从 BALB/c 小鼠股骨和胫骨中提取到髓样 DCs,在刺激因子的作用下,富集获得小鼠骨髓来源的树突细胞 (Bone marrow-derived dendritic cell,

BMDCs)。采用 BMDCs 进行抗原内吞以及活化实验，可初步快速地考察 HTCC 微球作为疫苗佐剂，能否引发高效的免疫应答。

2.2.3.1.1 髓源树突细胞 BMDCs 的提取与培养

颈椎脱臼法处死 BALB/c 小鼠，开腹去皮，从可以活动的部位剪下股骨和胫骨，剔除多余韧带和组织，浸泡在冰浴的 RPMI-1640 培养基中；用 1 mL 注射器针头分别于骨头两端扎孔，用另一吸取有低温 RPMI-1640 培养液的 1 mL 注射器，从骨干的一端扎入骨髓腔，冲洗骨髓到 15 mL 无菌离心管中，股骨冲三次（3 mL），胫骨冲两次（2 mL）；收集细胞悬浮液，1500 rpm，5 min 离心去上清，加入 2 mL 无菌 Tris-NH₄Cl 红细胞裂解液，吹打使细胞悬浮，室温静置裂解 60 s，溶解红细胞，加入 6 mL RPMI-1640 培养液终止反应后，1200 rpm，5 min 离心并弃上清；加入 3 mL 1640 培养液吹悬，1500 rpm，5 min 离心并弃上清，将洗涤后的细胞用 12 mL 含 10 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和 20 ng/mL IL-4 的完全培养基悬浮，分至 24 孔板，每孔 0.5 mL，再其中加 0.5 mL 含刺激的完全培养基。培养至 48 h 后，轻微摇晃孔板，吸弃连同培养液的悬浮细胞，仅留贴壁细胞，加入含刺激完全培养基 0.8 mL，继续培养；培养至第四天，半量换液，尽量保留悬浮细胞，此后每天半量换液。继续培养至第六天，即富集获得小鼠骨髓来源的树突状细胞 BMDCs。

2.2.3.1.2 BMDCs 对抗原的摄取实验

向 2.2.3.1.1 中富集得到的 BMDCs 中加入不同佐剂的疫苗（FITC-OVA 是异硫氰酸荧光素标记的卵清蛋白，作为模型抗原），具体的实验分组及相应疫苗配比如表 2-1 所示，每个样品设置 3 个副孔，作为平行。继续培养细胞 12 h 后收集细胞，使用流式细胞仪检测 BMDCs 对抗原的摄取情况。

表 2-1 BMDCs 对抗原的摄取实验分组及对应疫苗配方

Table 2-1 Groups of microspheres uptake by BMDCs and corresponding vaccine formulations

Group	Dosage of H5N1 (μg)	Dosage of adjuvant (μg)	Volume (μL)
FITC-OVA	15	--	100
Al	15	100	100
HTCC MP	15	100	100

2.2.3.1.3 壳聚糖季铵盐微球对 BMDCs 的活化作用

向 2.2.3.1.1 中富集得到的 BMDCs 中加入不同佐剂的疫苗，每个样品设置 3 个平行，具体的实验分组及相应疫苗配比如表 2-2 所示。继续培养 12 h 后收集 24 孔板中的细胞至 1.5 mL 离心管中，500 g 离心 5 min。加入 1 mL Staining buffer 洗涤 1 次。去掉上清，垂直滴加荧光抗体染液（CD11c-Alex-Flour488、CD40-PE、CD80-Pe-cy7、MHC I-PE-Cy5、MHC II-Violet），对 BMDCs 进行流式抗体标记。吹匀细胞后放入 4 °C 反应 40 min。取出后加入 1 mL Staining buffer 重悬，洗涤三次。离心后加入 500 μL Staining buffer 吹匀重悬细胞，过 200 目细胞筛转移至流式管中即可上样进行流式检测。

表 2-2 壳聚糖季铵盐微球对 BMDCs 的活化作用实验分组及相应疫苗配比

Table 2-2 Groups of BMDCs activation by HTCC microspheres and corresponding vaccine formulations

Group	Dosage of H5N1 (μg)	Dosage of adjuvant (μg)	Volume (μL)
H5N1	15	--	100
Al	15	100	100
HTCC MP	15	100	100

2.2.3.2 动物水平

面对机体复杂的结构和信号通路,动物实验更能反映受试物的真实作用情况。为了考察 HTCC 微球的免疫效果和原理,选用应用广泛、个体差异小、遗传背景清晰的模型动物 BALB/c 小鼠按免疫程序进行免疫。

2.2.3.2.1 动物实验免疫方案

选择 4-6 周 BALB/c 小鼠,采用股部肌肉注射免疫,每组 8 只,4 雄 4 雌,每只小鼠给药体积为 100 μL 。具体的实验分组及相应疫苗配比同 2.2.3.1.3 壳聚糖季铵盐微球对 BMDCs 的活化作用实验分组。免疫针次按 0 d, 21 d 免疫两次,每周采血,分离血清进行抗体检测,首免后 35 天取脾淋巴细胞,进行脾淋巴细胞增殖及其亚型的检测,综合评价 HTCC 微球对 H5N1 裂解病毒的免疫增强效果。



图2-2 小鼠免疫方案

Fig. 2-2 Scheme of mice immunization

2.2.3.2.2 血凝抑制法测定血凝抑制抗体滴度

血凝抑制实验测定血清的血凝抑制 (haemagglutinin inhibition, HI) 抗体效价的具体步骤如下: 取 40 μL 血清与 160 μL 霍乱滤液 (即血清样品 1: 5 稀释) 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 16-18 h, 再经 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 50 min。样品放置室温后, 加入 40 μL 原倍鸡红细胞, 充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 1500 r/min 离心 5 min, 收集的上清即为处理好的血清样品; 血凝板每排第 2 孔至第 12 孔各加生理氯化钠溶液 25 μL , 然后每排第 1 孔加处理好的血清样品 50 μL , 从每排第 1 孔吸 25 μL 到第 2 孔反复吹打混匀, 再从第 2 孔吸 25 μL 到第 3 孔, 以此类推倍比稀释至第 11 孔, 从第 11 孔吸出 25 μL 弃去; 然后向每排第 1 到 11 孔加 4 个血凝单位的抗原 25 μL , 在第 12 排的 A-C 孔加 25 μL 抗原为阳性对照, D-F 孔加 25 μL 生理盐水为阴性对照, 震荡混匀, 室温下孵育 30 min; 最后向反应体系里加入 25 μL 1% (v/v) 鸡红细胞悬液, 室温下孵育 30 min。结果判定方法: 以能完全抑制红细胞凝集的最高血清稀释度倒数为血凝抑制滴度。将血凝板倾斜 60 $^{\circ}$ 放置 30 s, 使没有被凝集的

鸡红细胞自由下滑呈泪滴状，而被凝集的鸡红细胞则不能下滑，即在阴性对照孔呈泪滴状下垂时立即判定结果。

2.2.3.2.3 脾细胞悬液的制备

将小鼠脱颈椎处死，在 75% 的乙醇中浸泡 5 min；无菌环境下，开左上腹取脾，置于装有 RPMI-1640 培养基平皿内的 200 目细胞筛上，用 5 mL BD 注射器针芯研磨，使其分散成单个细胞，收集细胞悬液至 50 mL 离心管中，定容为 25 mL，10℃，500 g 离心 5 min；去上清，加入 5 mL 红细胞裂解液裂解红细胞，4 min 后加入 15 mL RPMI-1640 培养基终止反应，10℃，500 g 离心 5 min 并弃上清；加少许 RPMI-1640 培养基重悬细胞沉淀，挑出残留组织块，加 RPMI-1640 培养基定容至 15 mL，10℃，500 g 离心 5 min 并弃上清；用 1 mL 含血清双抗（10% FBS 与 1% 双抗）的 RPMI-1640 完全培养基充分重悬细胞沉淀，并对细胞进行计数，将其用 RPMI-1640 完全培养基调整至浓度为 5.0×10^6 cells/mL 备用。

2.2.3.2.4 流式细胞仪测定小鼠脾脏淋巴细胞及其亚群

将 2.2.3.2.3 获得的脾细胞悬液种板至 24 孔板，每孔 500 μ L，然后每孔补加 500 μ L 含 4 μ g/mL 的血凝素 (haemagglutinin, HA) 刺激物的 PRIM-1640 完全培养基，即：1 mL/well（24 孔板），刺激物终浓度为 2 μ g/mL，脾细胞终浓度为 2.5×10^6 cells/mL。将 24 孔板在细胞培养箱（37℃、5% CO₂）中培养 60 h 后，将细胞从 24 孔板中收集到离心管，离心（500 g，5 min），下层细胞沉淀用 PBS 洗涤等流式前处理，对脾细胞进行流式抗体标记（CD5-Alex-Flour700、CD4-eFluor450、CD8-FITC、CD44-PE、CD62L-APC、CD69-Pe-cy7），进行流式细胞仪检测。

2.2.3.2.5 统计学分析

本章数据采用 Student t test 检验进行统计学分析（GraphPad Prism 6 软件）。实验数据结果以平均值 $\pm$ 标准偏差（ $\bar{x} \pm s$ ）来表示。P > 0.05 时，认为没有显著差异；0.01 < P < 0.05 时，认为有显著差异，以“*”表示；P < 0.01 时，代表有极显著差异，以“**”表示；0.001 < P < 0.01 时，认为有十分显著差异，以“***”表示。

2.2.4 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的安全性评价

作为一种新型佐剂，能否最终应用到临床，除开有效性，安全性也是不可或缺的重要因素。通过相关动物来评判疫苗佐剂的安全性，不仅可预测它在大范围人群使用时可能出现的不良反应，并为临床实验方案的制订提供依据。目前除了上述进入临床阶段的壳聚糖盐酸盐微球其安全性已被研究之外，针对 HTCC 微球的安全性研究尚未报道。此外，佐剂的安全性评价指导原则和参考方法相当匮乏，尤其是针对壳聚糖季铵盐微球相关的安全性评价文献报道较少。本研究通过调研大量文献，查阅《中国药典》（2015 版）第三部已有的生物制品相关内容，依据《预防用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则》，采用小鼠、大鼠、豚鼠、新西兰大白兔为动物模型，对 HTCC 微球进行了初步的安全性评价^[27-30]，包括急性毒性实验、重复毒性实验、异常毒性实验、肌肉刺激实

验、全身过敏实验、体外溶血实验等，为其临床应用提供了实验支持。

根据《预防用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则》以及《中国药典》（2015 版）第三部具体规定，分别使用小鼠、大鼠、豚鼠、新西兰大白兔等评价制得的 HTCC 微球的安全性。

2.2.4.1 急性毒性实验

选用 SPF 级 BALB/c 小鼠共 40 只，其中雌雄各 20 只。最大给药剂量以可供最大给药浓度（50.0 mg/mL）、小鼠可承受的最大给药容量 0.1 mL 设置最大给药剂量为 5.0 mg/mL，最小给药剂量设置为临床拟给药剂量 0.1 mg/人，一共选用四个剂量 0.1 mg/只、0.3 mg/只、1.0 mg/只、5.0 mg/只，对照组为 0.9%氯化钠注射液，分别对 4 只 3-4 周龄雌雄 BALB/c 小鼠股部肌肉单次注射给药^[31]，给药体积为 0.1 mL/只，连续观察两周。观察指标包括摄食量，动物死亡情况，给药前（0 d）、给药后第 7（8 d）、14 天（15 d）动物体重变化。实验过程中，及时对死亡动物进行大体解剖，剩余动物在观察期结束后处死并进行大体解剖。当组织器官的颜色、质地、体积、质量等发生改变时，应详细记录并进行组织病理学检查。实验结果的统计分析：不同剂量组动物的体重数据以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，组间进行成组“t”检验。毒性效果评价以最大耐受剂量（Maximum tolerated dose, MTD）来表示，如未见动物死亡，则 MTD 大于等于该给药剂量^[32]。

2.2.4.2 重复毒性实验

选用中剂量（0.3 mg/只）和高剂量（5.0 mg/只），分别在第 1 天和第 22 天对 6 只 5 周龄雌雄 SD 大鼠股部进行肌肉注射给药，注射体积为 0.5 mL。持续观察 42 d，观察大鼠死亡情况、精神状态、食欲、生长状况等一般症状，定期测量体重、摄食量。定期取血，分别于 0 d、1 d、22 d、43 d 时使用东芝 TBA-40FR 生化分析仪测定相关血清生化指标，包括大鼠的心肌指标（肌酸激酶 CK、乳酸脱氢酶 LDH）、肝功指标（丙氨酸转氨酶 ALT、天门冬氨酸转氨酶 AST、碱性磷酸酶 ALP）、肾功指标（尿素氮 BUN）、炎症指标（C 反应蛋白 CPR）等。实验结束后，对大鼠进行大体解剖，解离心脏、肝脏、肾脏、肺、生殖器以及主要免疫器官脾脏、淋巴结等，测定脏器重量，计算脏器系数^[33-35]，并将脏器进行组织病理学检查。

2.2.4.3 异常毒性实验

依据《中国药典》（2015 版）第三部通则 94 异常毒性检查法，给 6 只 3-4 周龄雄性 BALB/c 小鼠腹腔单次给药 0.1 mg，注射体积为 0.5 mL，观察 7 d。观察指标包括动物摄食量、体重变化、动物死亡情况，所有的实验动物应进行大体解剖，当组织器官出现颜色、质地、体积、质量等发生改变时，应详细记录并进行组织病理学检查。观察期间，小鼠全部健在，且无异常反应，到期时每只小鼠体重应增加，判定供试品合格。

2.2.4.4 肌肉刺激实验

本实验给 2-3 个月龄普通级雄性新西兰大白兔右股单次和多次给药, 每组 4 只, 采用自身对照, 注射剂量为 0.1 mg、0.3 mg, 注射体积 0.5 mL。每天观察动物活动、摄食、饮水等一般表现。给药后 2 d 内, 观察注射部位是否有硬结、红肿和溃疡等症状。于单次和多次给药末次药后 2 d 将 4 只动物(每组 2 只)实施安乐死, 解剖取出注射部位肌肉, 纵向切开, 观察肌肉组织充血、红肿、变性、坏死等情况, 如有需要则进行病理组织学检查。剩下的动物继续观察, 末次给药后 14 d 实施安乐死, 进行肌肉刺激观察和病理组织学检查, 以了解刺激性反应的可逆程度。根据大体观察和解剖检查结果, 与对照的注射部位进行比较评价。

2.2.4.5 全身过敏实验

分别用 1.0 mg HTCC 微球在第 1、3、5 天对初始体重为 300-400 g 雄性 Hartley 豚鼠进行腹腔注射致敏, 然后用 2.0 mg HTCC 微球在第 15 天静脉注射激发。实验中以氯化钠注射液为阴性对照, 5.0 mg 牛血清白蛋白为阳性对照, 注射剂量为 0.5 mL/只/次, 每组 6 只。测定初次(1 d)、最后一次致敏(5 d)和激发当日(15 d)体重, 观察豚鼠一般状态有无异常。对于静脉注射激发给药后 30 min 内的动物, 如果出现过敏反应症状, 则观察时间延长至症状消失, 最长观察 3 h^[36]。过敏反应包括: 过敏反应阴性(正常, -), 过敏反应弱阳性(躁动、竖毛、颤抖、搔鼻, +), 过敏反应阳性(喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪, ++), 过敏反应强阳性(呼吸困难、哮鸣音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、旋转、潮式呼吸, +++), 过敏反应极强阳性(死亡, ++++)。

2.2.4.6 体外溶血实验

取新鲜兔血 10-20 mL, 用玻璃棒搅拌以除去纤维蛋白, 再用生理盐水冲洗 3-5 次, 直至上清液不呈红色为止, 按所得红细胞的容积, 用生理盐水制得 2% 的悬液。取试管 7 只, 编以号码, 按表 2-3 加入各种溶液。HTCC 微球临床拟给药剂量为 0.1 mg, 实验使用体积分别为 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL。6 号管不加入供试品, 作为空白对照。7 号管不加供试品并用蒸馏水代替生理盐水, 作为完全溶血对照。轻轻摇匀, 置于 37℃ 水浴中保温一定时间后, 镜检观察红细胞状态。全溶血: 溶液澄明, 红色, 管底无红细胞残留。部分溶血: 溶液澄明, 红色或棕色, 底部尚有少量红细胞残留。镜检红细胞稀少或变形。不溶血: 红细胞全部下沉, 上层液体无色澄明。镜检红细胞不粘集。一般认为, 凡 1 h 后第 3 号管以及第 3 号以前的各管出现溶血或部分溶血反应的制剂即不宜供静脉注射之用。

表 2-3 体外溶血实验加样表

Table 2-3 The formulation of solution in hemolysis test in vitro

Group number	1	2	3	4	5	6	7
Microspheres dosage (mg)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	Negative control	Positive control
Administration volume (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5		
normal saline (mL)	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5	2.5
2% red cell suspension (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

苏州微流纳米生物技术 www.willnano.cn

高压均质机 脂质体挤出器 细胞破碎仪 压力: 3,100bar 控温-4℃

纳米材料 纤维素 MLCC 锂电池导电涂层 细胞破碎 白蛋白纳米粒



第三章 结果与讨论

3.1 壳聚糖季铵盐微球的制备工艺优化

查阅文献并结合前期实验结果发现,采用高压均质法制备 HTCC 微球的主要影响因素有:1)壳聚糖季铵盐浓度影响乳滴的稳定性;2)高压均质压力影响 HTCC 微球粒径及其分布^[37];3)油水相体积比影响乳液黏度及浓度^[38]。本研究主要针对上述因素考察它们对 HTCC 微球制备过程的影响,并优化 HTCC 微球制备条件。

3.1.1 壳聚糖季铵盐浓度对壳聚糖季铵盐微球制备的影响

壳聚糖季铵盐作为HTCC微球制备体系的主体,其浓度一方面会影响水相黏度及乳液黏度,另一方面还会影响乳滴固化成球时间及HTCC微球交联致密程度。HTCC浓度越低,水相黏度越低,容易通过高压均质机,但是HTCC浓度太低,水相不易胶凝或者胶凝时间延长,而且形成的乳滴在固化过程中易发生破碎或合并,造成HTCC微球的粒径不均一;HTCC的浓度越高,水相胶凝时间越短,乳滴越能快速固化成球,但是HTCC浓度过高时,体系的黏度过高,高压均质机机会发生堵塞,直接影响HTCC微球的制备。从表3-1可以看出,当HTCC为0.06 g/mL时,浓度适中,且制得的HTCC微球粒径分布最窄。

表3-1 不同壳聚糖季铵盐浓度所制备微球的粒径及分布

Table 3-1 Size distribution of prepared microspheres with different HTCC concentrations

HTCC concentration (wt %)	Particle size (nm)	PDI
3.75	2052	0.167
5.25	2211	0.148
6.00	1584	0.019
6.50	——	——

3.1.2 高压均质压力对壳聚糖季铵盐微球制备的影响

考察了高压均质压力对 HTCC 微球粒径及其分布的影响。分别在 3500 psi 和 7500 psi 的高压均质压力下制备 HTCC 微球,所得 HTCC 微球的粒径分布及电镜照片如图 3-1 所示。当压力为 7500 psi 时,均质压力大,剪切力大,壳聚糖分子链易断裂,壳聚糖易降解,微球易破碎。同时,制备出来的 HTCC 微球粒径较小,需要在较高离心力下才能收集,球形易破坏;降低压力到 3500 psi 时,HTCC 微球粒径大小在 2 μm 左右,且分散性良好,离心洗球过程较为容易,球形也能得到很好的保持。

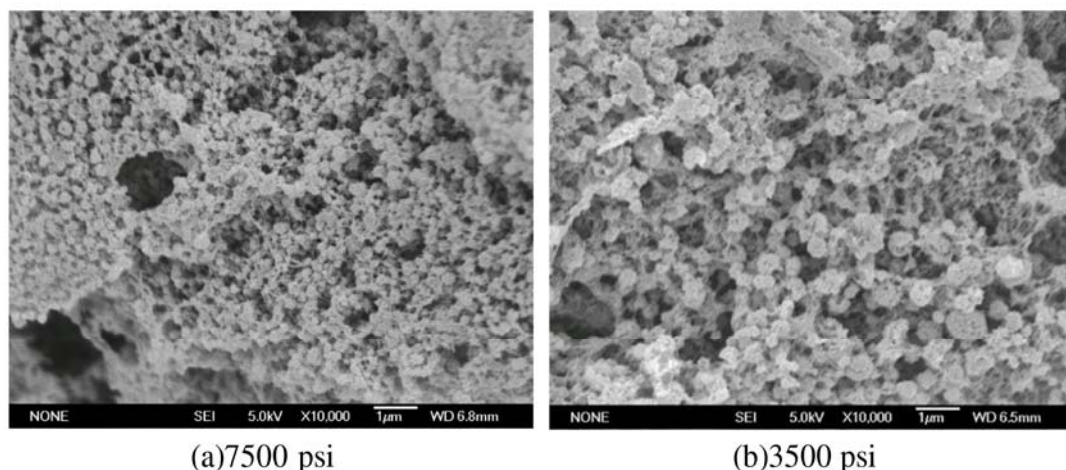


图3-1 不同均质压力下所制备的微球的电镜照片

Fig.3-1 SEM photographs of microspheres prepared by using different homogeneous pressures

3.1.3 水油相体积比对壳聚糖季铵盐微球制备的影响

油水相体积比直接影响乳液黏度及乳液中乳滴的浓度,进而对 HTCC 微球的制备过程造成影响。当油水相体积比过高时,乳液黏度低,流动性好,致使乳液剪切不充分,最终所得 HTCC 微球粒径偏大,且粒径分布较宽。并且油水相体积比高,即所用的油相较多,造成有机溶剂的大量消耗及残留,一方面提高了 HTCC 微球制备的成本,另一方面也增加了后续 HTCC 微球洗涤的难度,影响 HTCC 微球的安全性;当油水相体积比过低时,导致样品黏度提高,高压均质机易发生堵塞且不易清洗,直接影响了 HTCC 微球的制备。本研究分别在油水相体积比为 20:1、10:1、8:1、6:1、5:1、4:1、3:1 的条件下制备 HTCC 微球,所制备 HTCC 微球的粒径分布如表 3-2 所示。实验结果表明,当油水相体积比为 6:1 时,HTCC 微球粒径分布最窄,均一性好。

表 3-2 不同油水相体积比所制备微球的粒径及分布

Table 3-2 Size distribution of microspheres with different volume ratios of oil to water phase

Oil/Water (V:V)	Particle size (nm)	PDI
20:1	2403	0.763
10:1	2286	0.550
8:1	1722	0.167
6:1	1585	0.019
5:1	2824	0.269
4:1	2186	0.459
3:1	2829	0.753

3.1.4 小结

通过优化高压均质法制备 HTCC 微球的各关键条件,如 HTCC 浓度、油水比、乳化剂、HTCC 浓度、洗球方式、以及高压均质的压力和时间对 HTCC 微球粒径均一性的影响,制备出粒径均一、分散性良好的 HTCC 微球。制备均一 HTCC 微球的优化条件是:水相 HTCC 浓度 6.00 wt %,水相 α - β -GP 的浓度为 10.0 wt %,油水相体积比 6:1,油相乳化剂 6.0 wt % PO-500,高压均质压力 3500 psi,高压

均质时间 6 min。该条件下所制备得到的 HTCC 微球粒径为 1477 ± 87.67 nm, ζ 电位 +13.85, PDI 为 0.019, 大小均一 (图 3-2)。HTCC 微球表面光滑, 结构疏松多孔 (图 3-3)。

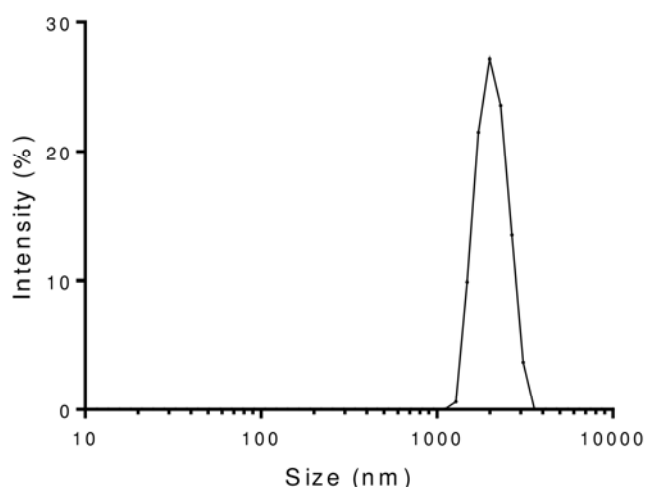


图3-2 高压均质机制备的壳聚糖季铵盐微球的粒径分布

Fig.3-2 Size distribution of HTCC microspheres prepared with high-pressure homogenization

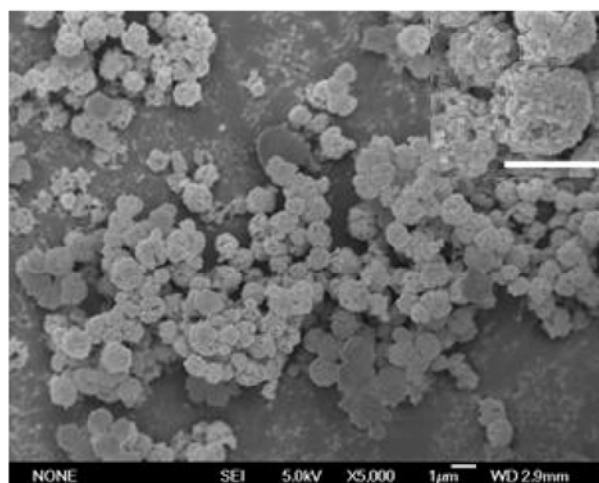


图 3-3 高压均质法制备的壳聚糖季铵盐微球电镜照片

Fig.3-3 SEM photograph of HTCC microspheres prepared with high-pressure homogenization

3.2 壳聚糖季铵盐微球对抗原的吸附情况

铝佐剂主要通过静电作用和磷酸配位基交换作用等较强作用力吸附抗原^[39], 吸附率较高, 结果显示铝佐剂对抗原的吸附率高达 90%以上, 而 HTCC 微球通过疏水作用和静电作用等弱作用力吸附抗原^[40], 吸附率稍低 (47.39%) (表 3-3)。

表3-3 不同佐剂对抗原的吸附率
Table 3-3 Adsorption efficiency of different adjuvants for antigen

Microspheres	Absorption efficiency (%)
HTCC MP	47.39
Al	94.78

3.3 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的有效性评价结果

3.3.1 细胞水平

3.3.1.1 BMDCs 对抗原的摄取情况

APCs 在抗原递呈和后续免疫应答的启动上发挥着重要作用，DCs 是主要专职抗原递呈细胞。抗原能否被 APCs 有效地摄取，是引发后续免疫应答的首要步骤。为评价 HTCC 微球促进抗原摄取的效果，实验选用 BMDCs 进行抗原吞噬实验。

向 BMDCs 细胞中加入不同的微球佐剂疫苗培养过夜后，采用流式细胞术测定摄取了抗原的 BMDCs 细胞比例，并使用流式细胞软件 Summit software (version 4.3) 进行数据分析。从图 3-4 中可以看出以后，模式抗原 OVA 的摄取率排序：HTCC MP > AI > FITC OVA，且 HTCC 微球的抗原摄取率显著高于铝佐剂 ($P < 0.01$)，说明 HTCC 微球能有效地促进抗原的摄取，为后续免疫效用的发挥奠定了坚实的基础。

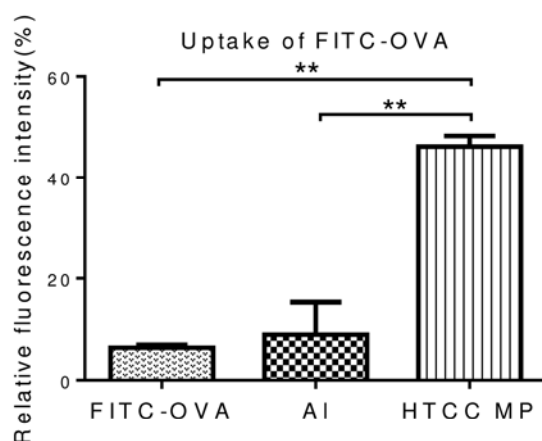


图3-4 髓源树突细胞对不同疫苗制剂的摄取情况

Fig. 3-4 Different vaccines uptake by BMDCs

3.3.1.2 壳聚糖季铵盐微球对 BMDCs 的活化效果

抗原被摄取后，经过 APCs 有效的加工和提呈是引发免疫应答的第二步。抗原经加工后，可以为 T 细胞活化提供抗原识别信号和共刺激信号，从而激活后续的获得性免疫应答。抗原识别信号包括 MHC I 和 MHC II 分子。实验同样采用专职抗原递呈细胞 BMDCs 进行细胞活化实验，加入不同的微球佐剂疫苗培养过夜后，采用流式细胞术测定摄取了抗原的 BMDCs 细胞比例，并使用流式细胞软件 Summit software (version 4.3) 进行数据分析。

H5N1 作为外源性抗原由 APCs 从细胞外部摄取后，在溶酶体内被加工成抗原肽，同时，MHC II 分子在内质网合成并形成囊泡。含有抗原肽的溶酶体和携带 MHC II 的囊泡融合，MHC II 和抗原肽形成复合物，复合物转运到 APCs 表面，被 CD4⁺T 淋巴细胞识别，从而诱导机体的体液免疫应答。同时，因 HTCC 微球佐剂带有正电性，可以促进携带外源性抗原从溶酶体逃逸到细胞质中，然后由胞质转运到内质网，并与 MHC I 类分子组装成抗原肽-MHC I 复合物后转运至细胞表面，被 CD8⁺T 淋巴细胞识别，从而诱

导机体的细胞免疫应答^[14]。活化实验表明（图 3-5），HTCC 微球能有效提升抗原提呈信号 MHC I 和 II 分子的表达，说明 HTCC 微球能同时提升细胞免疫和体液免疫水平。

APCs 表面的共刺激信号包括 CD40、CD80 等，它们与 T、B 细胞相应配体结合，诱导转录因子活化，促进细胞因子的产生，促进 T、B 细胞的增殖和分化。从图 3-5 可以看出，HTCC 微球对抗原提呈第二信号 CD40、CD80 也有明显提升。

总的结果表明 HTCC 微球能有效促进 BMDCs 的活化。在双信号的共同作用下，完成 T 细胞的活化，为后续获得性免疫应答提供条件。细胞水平实验结果表明 HTCC 微球能有效促进 BMDCs 内吞与活化。

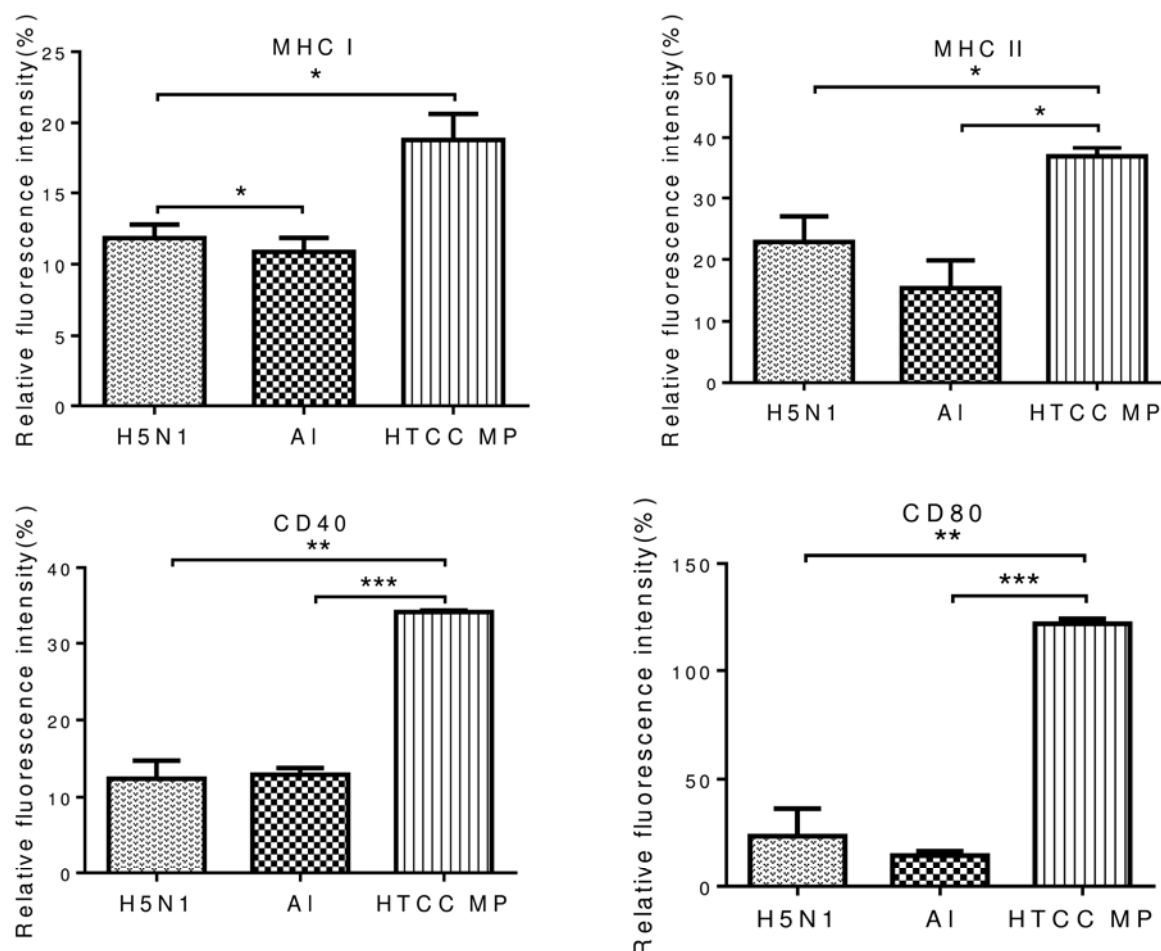


图3-5 不同疫苗制剂对髓源树突细胞的活化作用
Fig. 3-5 Activation effects of different vaccines by BMDCs

3.3.2 动物水平

3.3.2.1 抗体滴度 HI 水平

细胞水平实验结果表明 HTCC 微球能有效促进 BMDCs 内吞与活化，为进一步确定 HTCC 微球促进 H5N1 抗原特异性免疫应答的佐剂效果，我们进行了动物体内实验。以肌肉注射的方式对小鼠各种佐剂的疫苗制剂，每周采血，分离血清，采用血凝抑制法检测 H5N1 特异性抗体滴度。

H5N1 禽流感病毒表面有 HA，其能使红细胞产生凝集，发生血凝现象。若在病毒悬浮液中加入特异性的抗体，且这种抗体含量足以抑制病毒颗粒或其血凝素，此时红

细胞表面的受体无法与病毒颗粒或其血凝素直接接触。红细胞凝集受到抑制的现象称为血凝集抑制反应，利用这种特征设计的实验称血凝实验^[41]。实验结果判定标准为以能完全抑制红细胞凝集的最高血清稀释度的倒数为血凝抑制抗体效价（haemagglutinin inhibition titer, HI titer）。

血凝抑制实验结果如图 3-6 所示。首次免疫后的 21 d，各组抗体水平均提升，并且 HTCC 微球组的 HI 抗体水平高于单纯疫苗组和铝佐剂组。28 d 各组抗体水平进一步提升，达到最高值，且 HTCC 微球组的 HI 抗体水平显著高于单纯疫苗组和铝佐剂组。以上结果表明，HTCC 微球能够提升血清中 H5N1 特异性 HI 抗体效价，且至 35 d 还能跟铝佐剂持平。

血凝抑制实验结果表明，HTCC 微球能显著提升 H5N1 特异性抗体滴度效价，且显著优于对照组铝佐剂组和单纯抗原组，说明 HTCC 微球具有更强的佐剂活性。

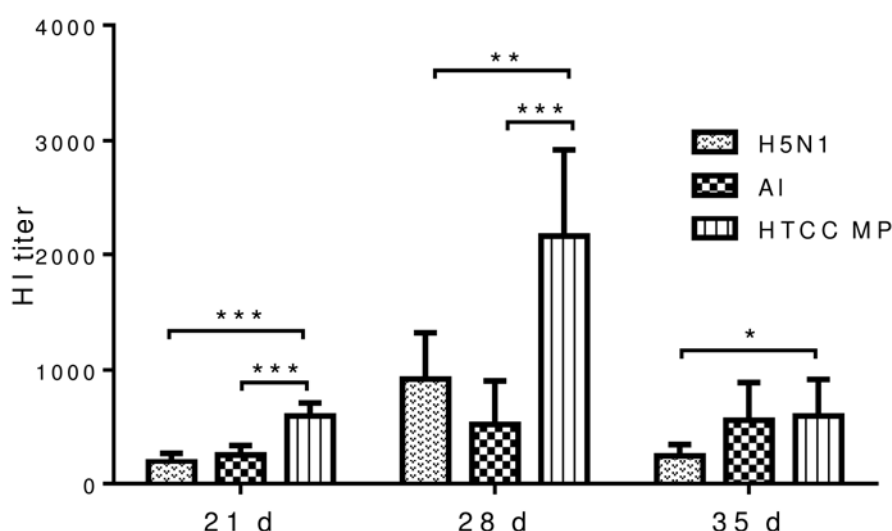


图 3-6 免疫小鼠血清中 H5N1 特异性 HI 抗体滴度

Fig. 3-6 H5N1-specific HI antibody titers in the serum of immunized mice

3.3.2.2 脾脏淋巴细胞及其亚群

实验结束后，杀鼠取脾，分离脾细胞，加入含有不同佐剂的疫苗制剂，过夜培养后，流式细胞术测定脾细胞的分化情况。

根据表面标志，小鼠 T 淋巴细胞可分为 CD4⁺T 淋巴细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞。CD4⁺T 淋巴细胞在免疫反应中主要涉及到 Th1 型细胞因子，同时抗原特异性 CD4⁺T 淋巴细胞也可通过分泌细胞因子杀灭吞噬了抗原的巨噬细胞；而 CD8⁺T 淋巴细胞主要是溶解抗原感染的巨噬细胞并杀灭细胞内的病原体，且 CD8⁺T 淋巴细胞还可合成 Th1 型细胞因子^[42]；DPT（CD4⁺CD8⁺双阳 T 淋巴细胞，double positive T cells, DPT）则既具有 CD4⁺T 又具有 CD8⁺T 的功能。

国内外细胞免疫学研究已经证实 DPT 存在于外周血中^[43-44]，通常外周血中的 DPT 是由未成熟 CD4⁺CD8⁺双阳胸腺细胞释放到外周循环的结果，数量仅占淋巴细胞的 5.0% 左右。但研究发现被某些病毒感染后，DPT 的比例提升到 20% 以上^[45]。研究还发现，DPT 比 CD4⁺T 淋巴细胞更易向组织迁移，DPT 具有更强大的免疫应答功能^[46]。

图 3-7 为免疫不同佐剂制备的疫苗后外周血淋巴细胞中 $CD4^+CD8^+$ 双阳 T 淋巴细胞所占比例，流式结果可以看出，HTCC 微球能诱导 DPT 分化的能力，且显著高于单纯疫苗组 ($0.01 < p < 0.05$) 及铝佐剂组 ($0.001 < p < 0.01$)，这表明 HTCC 微球能诱导产生比铝佐剂更强的免疫活化效果，与上述 HI 抗体结果相一致。

综上所述，动物水平上，HTCC 微球能提升抗体滴度和 DPT 淋巴细胞亚群比例，起到疫苗佐剂免疫增强活化效果。

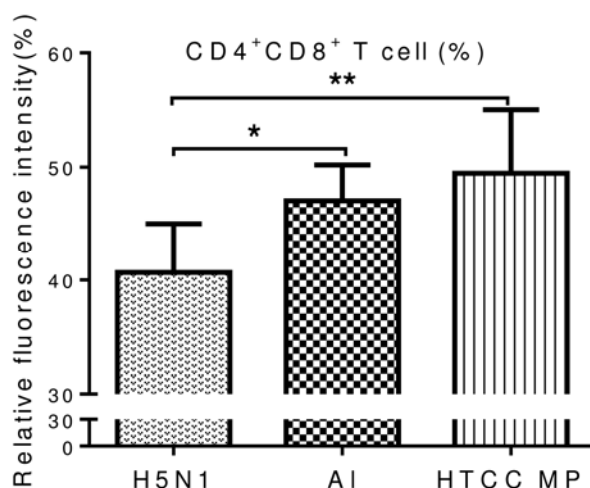


图3-7 免疫小鼠脾脏淋巴细胞中 $CD4^+CD8^+$ T淋巴细胞的比例
Fig. 3-7 Proportions of $CD4^+CD8^+$ T cells of PBMCs in mice immunized

3.3.3 小结

本章采用制得的 HTCC 微球吸附禽流感裂解疫苗 H5N1，在细胞和动物水平上考察了 HTCC 微球作为 H5N1 注射疫苗佐剂的免疫增强效果，得到如下结论：

(1) 实验采用 BMDCs 进行抗原吞噬和细胞活化实验，实验结果表明 HTCC 微球能有效促进抗原 H5N1 的捕获，并能有效活化 APCs，同时提升细胞免疫和体液免疫水平，为后续获得性免疫应答提供条件。

(2) 进一步在动物水平确定 HTCC 微球的免疫增强效果，利用血凝抑制测定免疫小鼠血清抗体滴度，结果表明 HTCC 微球能提升抗体滴度。并采用流式细胞技术检测免疫小鼠脾脏淋巴细胞及其亚群，结果提示 HTCC 微球组 $CD4^+CD8^+$ T 淋巴细胞亚群比例明显高于单纯疫苗组，且高于铝佐剂组，即 HTCC 微球能够诱导更高水平的免疫应答。动物实验结果与体外细胞实验结果一致。

(3) 抗原吸附率的多少并不与免疫效果成正比关系。虽然铝佐剂的吸附率远高于 HTCC 微球，但是细胞实验和动物实验的结果显示，HTCC 微球能显著增强免疫活化效果，且显著优于商品化铝佐剂。

3.4 壳聚糖季铵盐微球作为疫苗佐剂的安全性评价结果

3.4.1 急性毒性实验结果

急性毒性是指药物在单次给药后一定时间内所产生的毒性反应。通过观察佐剂单次

给药后动物所产生的急性中毒反应和死亡情况，可预测临床使用该制剂时的不良反应。HTCC 微球经注射后，即使在临床拟给药剂量 50 倍（5.0 mg/只）情况下，雌雄小鼠的摄食、运动能力、反射、排粪、排尿等都显示正常，且实验结束后没有体重减轻（图 3-8）和死亡情况发生，大体解剖无肉眼可见的病变。因此在当前各个剂量下，HTCC 微球对小鼠无可见作用水平，且 HTCC 微球的 $MTD \geq 5.0$ mg/只。

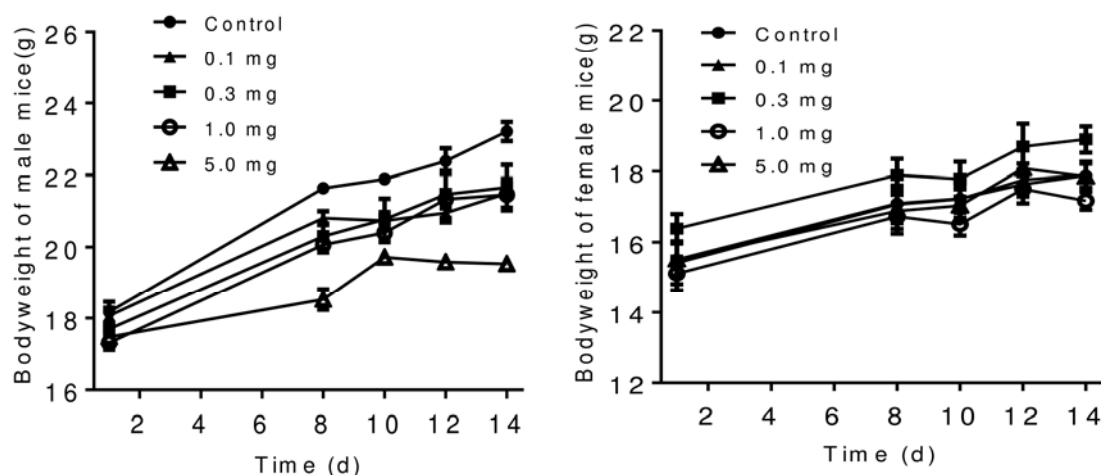


图 3-8 急性毒性实验期间小鼠的体重变化

Fig.3-8 Variation of body weight of mice in acute toxicity test with time

3.4.2 重复毒性实验结果

疫苗通常需要注射一次及以上，才能达到有效的保护和治疗效果，通过连续反复多次给药观察 HTCC 微球佐剂对实验动物的长期毒性反应非常重要。为了更全面反应和预测 HTCC 微球佐剂的重复毒性，本实验不仅选用了 3 倍中剂量（0.3 mg），还选用了 50 倍超高剂量（5.0 mg）。实验期间各组雌雄大鼠无死亡，精神状态、食欲及生长状况均正常。各 HTCC 微球注射组大鼠总增重、总进食量及食物利用率（表 3-4）与对照组比较无明显差异。实验结束后，将实验大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏等脏器进行解离并称重，各 HTCC 微球注射组大鼠脏器重和脏器系数（表 3-5）没有明显变小，表明大鼠生长状况良好。血液生化结果（表 3-6）显示中剂量 HTCC 微球组大鼠的心肌指标（肌酸激酶 CK、乳酸脱氢酶 LDH）、肝功指标（丙氨酸转氨酶 ALT、天门冬氨酸转氨酶 AST、碱性磷酸酶 ALP）、肾功指标（尿素氮 BUN）、炎症指标（C 反应蛋白 CPR）与对照组比较无明显差异。50 倍高剂量组 43 d 时大鼠心肌指标 LDH 略有升高，然而病理切片（图 3-9）复验结果显示大鼠心脏无明显异常。除此之外，病理切片和脏器系数显示实验大鼠的其它重要器官如肝脏、肺、肾脏、生殖器以及主要免疫器官脾脏、淋巴结，也均未见病理性变化。结果表明，在 HTCC 微球临床拟给药剂量 3 倍的情况下，无重复毒性；即使在 50 倍高剂量下反复注射，安全性仍然较好。

表 3-4 重复毒性实验中大鼠体重及摄食情况(n=6, $\bar{x}\pm s$)
Table 3-4 Body weight and food intake of SD rats in repetitive dose toxicity test(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Sex	Microspheres dosage (mg)	Initial body weight (g)	Intermediate body weight (g)	Final body weight (g)	Total gain (g)	Total food intake (g)	Food utilization rate (%)
Male	0.0	349.8±6.3	430.5±15.6	504.9±8.4	155.1±14.4	2878.5	5.4
Male	0.3	365.5±4.6	452.1±2.8	524.6±4.8	159.1±0.2	2743.2	5.8
Male	5.0	341.3±6.3	414.4±9.3	471.5±17.4	130.2±11.1	2630.6	4.9
Female	0.0	249.1±13.6	290.3±7.9	319.0±20.4	69.9±9.6	1436.5	4.8
Female	0.3	245.0±1.0	289.3±11.3	323.1±3.4	78.1±2.4	1345.2	5.8
Female	5.0	242.3±2.8	278.1±0.5	295.3±5.9	53.1±3.1	1268.0	4.2

表 3-5 重复毒性实验中大鼠脏器重及脏器系数 (n=6, $\bar{x}\pm s$)
Table 3-5 Viscera weight and viscera/body weight ratio of SD rats in repetitive dose toxicity test (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Sex	Microspheres dosage (mg)	Heart weight (g)	Heart weight/ Body weight (%)	Liver weight (g)	Liver weight/ Body weight (%)	Spleen weight (g)	Spleen weight/ Body weight (%)	Lung weight (g)	Lung weight/ Body weight (%)	Kidney weight (g)	Kidney weight/ Body weight (%)
Male	0.0	1.56±0.03	0.31±0.01	18.41±1.33	3.60±0.26	0.75±0.04	0.15±0.01	1.98±0.01	0.39±0.01	1.73±0.11	0.34±0.02
	0.3	1.65±0.08	0.30±0.01	18.82±0.89	3.45±0.12	0.93±0.15	0.17±0.02	2.17±0.18	0.40±0.03	1.73±0.03	0.31±0.01
	5.0	1.61±0.05	0.30±0.01	18.68±0.08	3.46±0.26	0.81±0.09	0.15±0.01	3.12±0.08	0.57±0.05	1.62±0.15	0.30±0.01
Female	0.0	1.21±0.03	0.37±0.03	12.24±0.83	3.75±0.05	0.63±0.01	0.19±0.01	2.79±0.17	0.85±0.01	1.20±0.08	0.34±0.01
	0.3	1.10±0.06	0.34±0.02	12.56±1.15	3.85±0.35	0.60±0.07	0.19±0.02	2.58±0.14	0.79±0.04	1.10±0.07	0.34±0.02
	5.0	1.02±0.05	0.34±0.02	12.95±0.59	4.29±0.13	0.58±0.60	0.19±0.03	2.58±0.11	0.86±0.02	1.13±0.03	0.37±0.01

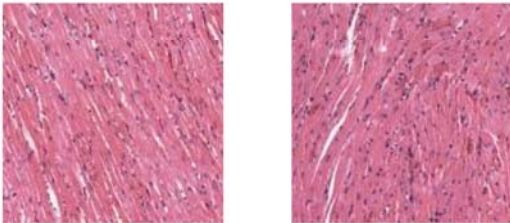


图 3-9 重复毒性实验中大鼠心肌病理切片 (HE 染色)
Fig.3-9 Pathological across sections of myocardium in repetitive dose toxicity test (HE staining)

表 3-6 重复毒性实验中大鼠血液生化指标(n=6, $\bar{x} \pm s$)Table 3-6 Blood biochemistry parameter in repetitive dose toxicity test (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Sex	Days (d)	Dosage (mg)	CK (U/L)	LDH (U/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	BUN (mmol/L)	CRP (mg/L)
Male	0	0.0	1185.0±75.0	3020.0±60.0	115.0±5.0	320.0±80.0	360.0±20.0	4.1±0.3	10.5±0.5
Male	0	0.3	1570.0±59.0	3130.0±150.0	60.0±30.0	190.0±30.0	230.0±10.0	2.3±0.6	7.5±0.5
Male	0	5.0	1130.0±160.0	2370.0±380.0	40.0±10.0	145.0±15.0	185.0±5.0	3.1±0.3	9.5±0.5
Male	1	0.0	835.0±45.0	2360.0±70.0	30.0±0.0	130.0±0.0	155.0±15.0	2.9±0.7	23.5±0.5
Male	1	0.3	750.0±130.0	2480.0±410.0	35.0±5.0	190.0±50.0	145.0±35.0	2.1±0.3	24.5±0.5
Male	1	5.0	845.0±215.0	2710.0±260.0	30.0±10.0	150.0±20.0	130.0±30.0	2.2±0.5	29.5±0.5
Male	22	0.0	910.0±80.0	2260.0±130.0	50.0±10.0	140.0±20.0	185.0±35.0	3.0±0.0	55.5±0.5
Male	22	0.3	1115.0±55.0	2375.0±45.0	45.0±5.0	185.0±25.0	205.0±15.0	3.3±0.3	51.5±0.5
Male	22	5.0	1055.0±635.0	2135.0±305.0	50.0±20.0	155.0±25.0	160.0±10.0	3.2±0.7	53.5±0.5
Male	43	0.0	1625.0±705.0	2850.5±0.5	55.0±5.0	175.0±35.0	135.0±35.0	2.8±0.4	67.5±0.5
Male	43	0.3	1380.0±110.0	3590.0±850.0	45.0±5.0	125.0±15.0	140.0±10.0	2.8±0.2	73.5±0.5
Male	43	5.0	1120.0±190.0	4840.0±260.0	40.0±10.0	155.0±45.0	120.0±10.0	3.3±0.0	72.5±0.5
Female	0	0.0	2070.0±210.0	3280.0±760.0	70.0±10.0	325.0±15.0	215.0±35.0	3.4±0.6	14.5±0.5
Female	0	0.3	1035.0±5.0	2470.0±410.0	35.0±5.0	140.0±0.0	90.0±10.0	1.9±0.4	11.5±0.5
Female	0	5.0	970.0±50.0	2990.0±400.0	35.0±5.0	160.0±10.0	110.0±20.0	1.9±0.3	13.5±0.5
Female	1	0.0	1065.0±195.0	3105.0±495.0	40.0±10.0	155.0±25.0	95.0±15.0	2.6±0.6	36.5±0.5
Female	1	0.3	1050.0±110.0	3055.0±575.0	35.0±15.0	165.0±25.0	85.0±15.0	2.7±0.5	33.5±0.5
Female	1	5.0	930.0±50.0	3185.0±195.0	45.0±5.0	195.0±5.0	110.0±20.0	2.4±0.0	35.5±0.5
Female	22	0.0	1095.0±105.0	3005.0±755.0	42.0±0.0	150.0±20.0	85.0±5.0	3.9±0.5	58.5±0.5
Female	22	0.3	955.0±65.0	2160.0±20.0	40.0±10.0	125.0±25.0	100.0±20.0	4.7±0.6	55.5±0.5
Female	22	5.0	1130.0±100.0	3100.0±140.0	40.0±10.0	180.0±10.0	110.0±30.0	4.2±0.2	57.5±0.5
Female	43	0.0	1115.0±35.0	2445.0±655.0	35.0±5.0	115.0±25.0	70.0±20.0	3.4±0.1	78.5±0.5
Female	43	0.3	1020.0±110.0	3370.0±340.0	30.0±0.0	155.0±25.0	70.0±0.0	3.4±0.2	77.5±0.5
Female	43	5.0	1205.0±35.0	4300.0±60.0	33.0±10.0	175.0±5.0	95.0±15.0	3.8±0.2	79.5±0.5

3.4.3 异常毒性实验结果

由于 HTCC 微球制备时需要使用一定的有机试剂,虽经反复洗涤清除,但为了确保安全性,仍需排除可能残留的外源物质引起异常毒性和意外不安全因素,使用雄性小鼠进行了异常毒性实验。实验过程中,小鼠全部健在,无异常反应。HTCC 微球腹腔注射后的小鼠体重涨幅(Δ)虽小于对照组(Δ HTCC MP=2.42 g, Δ Control=3.47 g),但呈现持续增长趋势(图 3-10)。依据《中国药典》(2015 版)第三部通则 94 判定标准,HTCC 微球不存在意外不安全因素。

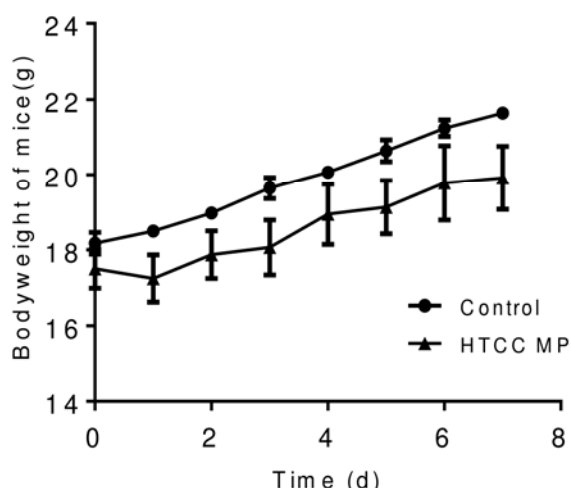


图 3-10 异常毒性实验期间小鼠体重变化

Fig.3-10 Variation of body weight in abnormal toxicity test with time

3.4.4 肌肉刺激实验结果

HTCC 微球发挥有效性机理之一在于诱导分布于组织中的巨噬细胞分泌趋化因子和相关炎症因子,快速募集单核细胞到注射部位^[47]。然而 HTCC 微球注射后是否会引发严重的炎症、组织坏死等不良反应,需要进一步考察 HTCC 微球对肌肉的刺激情况。单次和多次股部肌肉注射给药后,雄性新西兰大白兔活动正常,注射部位均无硬结、红肿和溃疡等异常现象。病理切片扫描结果(图 3-11)显示给药后 2 天肌肉组织有轻微炎症反应,然而 14 天之后炎症消失,与对照组相比没有异常。该结果提示 HTCC 微球注射初期的确引发了单核细胞的募集,有利于佐剂免疫效果的发挥。但随着时间的增加,炎症消除,说明该轻微的炎症反应是可逆的,表明 HTCC 微球无明显肌肉刺激性。

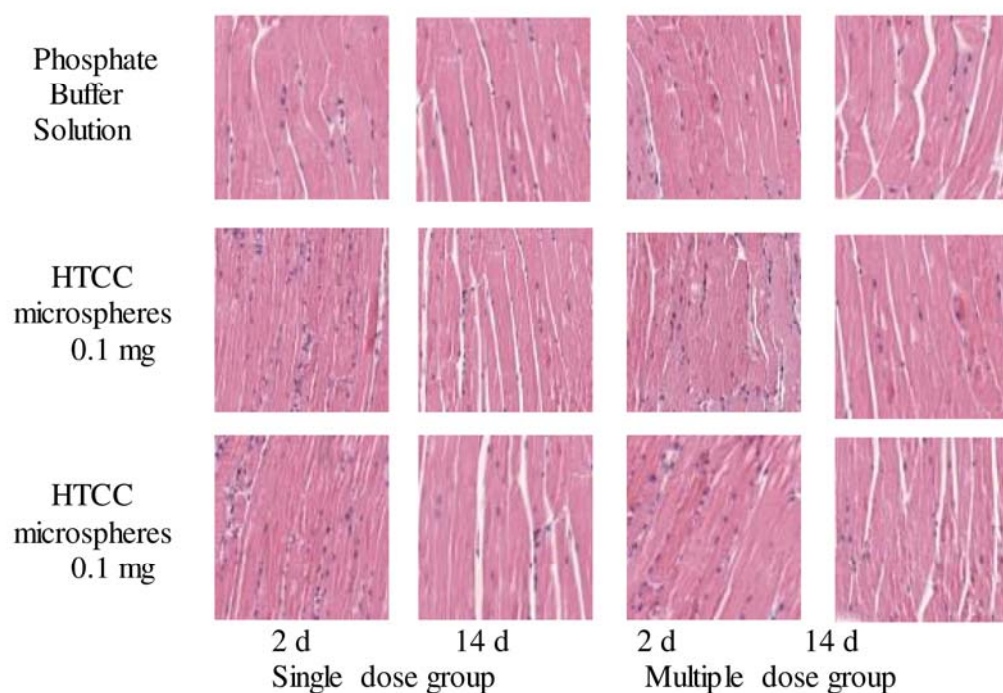


图 3-11 肌肉刺激实验中注射部位病理切片 (HE 染色)

Fig.3-11 Pathological across sections of injection site in muscle stimulation test (HE staining)

3.4.5 全身过敏实验结果

为预测 HTCC 微球佐剂给药后是否引起过敏症状,采用雄性豚鼠经致敏、激发后观察其全身过敏反应,为临床用药安全提供参考。观察时间内,各组豚鼠体重呈上升趋势(图 3-12),阳性对照组豚鼠在观察期间有明显的竖毛、发抖、步态不稳等过敏症状,并在第 14 天出现死亡,而 HTCC 微球组未出现上述阳性组过敏反应症状,且无死亡情况,与阴性组接近。该实验说明 HTCC 微球在受试浓度下不会引起过敏反应。

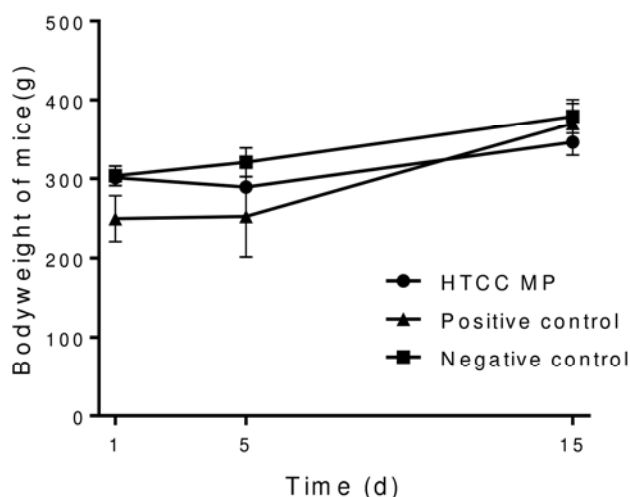


图 3-12 全身过敏实验期间豚鼠体重变化

Fig.3-12 Variation of body weight of guinea pigs in allergy test with time

3.4.6 体外溶血实验结果

注射类疫苗制剂如果出现溶血现象,可能会引起红细胞膨胀或者沉积,引发

血液循环功能障碍等不良反应，本实验旨在观察 HTCC 微球佐剂对红细胞状态的影响情况。从图 3-13 可以看出，观察期内阳性对照组呈澄明红色，发生溶血，而 HTCC 微球各剂量组与阴性对照均未出现溶血情况。说明 HTCC 微球不会引起红细胞溶血，在当前剂量下使用安全，可用于注射。



图 3-13 不同浓度壳聚糖季铵盐微球的体外溶血实验结果

Fig.3-13 Hemolytic test results of different concentration of HTCC microspheres *in vitro*

注：1~5：供试品；6：阴性对照；7：阳性对照。

Note: 1~5: Sample; 6: Negative control; 7: Positive control.

3.4.7 小结

本章采用小鼠、大鼠、豚鼠、新西兰大白兔为动物模型，展开对 HTCC 微球佐剂的安全性评价，包括急性毒性实验、重复毒性实验、异常毒性实验、肌肉刺激实验、全身过敏实验、体外溶血实验等，得到如下结论：

(1) 急性毒性实验表明，即使在临床拟给药剂量 50 倍（5.0 mg/只）情况下，实验结束后小鼠没有体重减轻，雌雄小鼠体重涨幅分别为 2.34 g 和 2.05 g，且无死亡情况，耐受性良好，没有引起急性中毒反应和死亡情况等不良反应；SD 大鼠股部肌肉连续给药两次，中剂量组大鼠各组织器官及血液生化指标与对照组比较无显著差异（ $p>0.05$ ），50 倍高剂量组连续注射两次，仍未出现死亡情况，偶有提示心肌指标 LDH 略高，但大体解剖后各组织器官脏器系数没有明显变小（ $p>0.05$ ），病理切片检查无异常。该重复毒性实验结果表明 HTCC 微球不会引起重复毒性。临床拟给药剂量 50（5.0 mg/只）使用安全，且可用于反复注射。

(2) 异常毒性实验小鼠给药后体征正常，体重增加 2.42 g，从而排除 HTCC 微球制备过程中因为引入外源物质而造成异常毒性和意外不安全因素；易感动物豚鼠注射 HTCC 微球后，未见阳性对照组的竖毛、发抖、步态不稳、死亡（过敏反应极强阳性（++++））等过敏症状，说明 HTCC 微球不会引起过敏反应。HTCC 微球不含引起异常毒性、意外不安全以及过敏的因素，因此注射 HTCC 微球不会引起异常和过敏反应。

(3) 新西兰大白兔肌肉刺激实验中，在给药初期由于佐剂效果的发挥，引起炎症细胞的募集，但并未发生红肿、溃疡，在给药 14 d 后，肌肉组织与对照组无明显差异，说明炎症反应可逆消除；体外溶血实验表明，HTCC 微球不引起红细胞溶血。注射 HTCC 微球后，肌肉轻微炎症反应会在给药 14 d 后可逆消除，且体外溶血实验为阴性，说明 HTCC 微球可用于肌肉注射。

主要结论与展望

主要结论

本论文利用高压均质法制得壳聚糖季铵盐微球，考察了壳聚糖季铵盐微球作为禽流感裂解疫苗 H5N1 注射疫苗佐剂的有效性和安全性。

(1) 首先，利用高压均质技术制备出壳聚糖季铵盐微球。通过优化关键制备条件，成功制得粒径均一、分散性良好的壳聚糖季铵盐微球，该条件下所制得到的壳聚糖季铵盐微球粒径为 1477 ± 87.67 nm， ζ 电位+13.85，PDI 为 0.019。

(2) 然后，将其用作 H5N1 裂解疫苗佐剂，在细胞水平和动物水平上获得较好的免疫效果。体外细胞实验结果显示，壳聚糖季铵盐微球能促进 BMDCs 对抗原的摄取以及对 APCs 的活化；动物水平上，壳聚糖季铵盐微球能提升抗体滴度和 $CD4^+CD8^+$ T 淋巴细胞亚群比例，明显高于单纯疫苗组和铝佐剂组；且壳聚糖季铵盐微球的免疫效果与抗原吸附率无关。

(3) 最后，以小鼠、大鼠、豚鼠、新西兰大白兔等为动物模型，对壳聚糖季铵盐壳聚糖季铵盐微球进行一系列安全性实验。实验结果表明壳聚糖季铵盐微球安全性良好，临床拟使用剂量 50 倍 (5.0 mg/只) 下使用安全，壳聚糖季铵盐微球注射后无异常和过敏反应，且可用于肌肉注射给药。

本文利用高压均质法制备出粒径均一，分散性良好的壳聚糖季铵盐微球，有效性和安全性实验证实，壳聚糖季铵盐微球是一种有效、安全的疫苗佐剂，为其临床应用提供了实验支持。

展望

本文利用高压均质法制得 HTCC 微球，解决了均一性和产率低的问题，并将其成功地用作 H5N1 注射疫苗佐剂，有效性和安全性实验证实，HTCC 微球是一种安全有效的免疫佐剂。本实验为这种新型材料作为佐剂的有效性评价、安全性评价及可能的临床应用提供了实验依据，作者相信进一步的研究有望推动其作为疫苗佐剂或药物载体实现其在生物医学领域的临床应用。



苏州微流纳米生物技术
高压均质机 细胞破碎仪 脂质体挤出器



致谢

转眼间，三年的研究生学习生活即将结束，而入学仿佛还是昨天的事情，初来江大的场景历历在目。回忆起这三年的点点滴滴，感慨不已，庆幸的是我来到了一个很好的环境，遇到了很多的良师益友，给了我很多的指引和帮助，使我能够顺利地完成学业，再次谨向你们表示衷心的感谢！

我要衷心的感谢我的导师中西秀树教授以及高晓冬教授，我很荣幸能够进入江南大学细胞糖生物学教育部重点实验室学习。谢谢你们为我们创造的良好科研环境、浓厚的学术氛围、和谐的师生关系。

读研期间，有幸来到中国科学院过程工程研究所马光辉老师课题组进行联合培养，马老师严于律己、宽以待人的高尚品德、敏捷的科研思维、严谨的治学态度永远是我学习的楷模。马老师对我的敬业精神也使我深深地理解了什么才是科研之路，为我以后的工作和学习树立了优秀的榜样。

感谢吴颀老师和岳华老师在我的课题开展和论文写作过程中给予的悉心指导和谆谆教诲。在课题各项工作的开展和论文的写作过程中，你们不厌其烦地指点我，提出许多中肯的意见，使我在研究和写作过程中不致迷失方向。我从老师身上学到了做学问的态度、方法与知识，但更重要的是学到了做人的道理与做任何事情都应有的认真、严谨的态度，这将使我受用终身。

感谢老师们等对我的论文工作和生活上给予的热心帮助，使我能顺利完成学业。感谢师兄、师姐给予的细心指导，在实验工作中与你们的诸多讨论和分析，使我受益匪浅。实验过程中还得到工作人员的鼎力相助，在此表示诚挚的感谢。还要感谢许多没有直接参与本课题研究的老师、长辈、师兄、师姐、师弟、师妹、朋友，在生活和学习中给与的莫大关怀和帮助。

最后，我要感谢参与我论文评审和答辩的各位老师，谢谢你们们的辛勤工作，给予我审视自己三年学习生活成果的机会。祝老师们工作顺利、家庭幸福。

感谢所有关心过和帮助过我的人，没有你们对我的关注，就没有我今天的任何成绩。感谢江南大学，她给我的人生添上了精彩的一笔，给我了一个更新更高的起点，让我更加从容自信地面对未来的挑战！

参考文献

- [1] Clausi A L, Merkley S A, Carpenter J F, et al. Inhibition of aggregation of aluminum hydroxide adjuvant during freezing and drying [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(6): 2049-2061.
- [2] Guven E, Duus K, Laursen I, et al. Aluminum hydroxide adjuvant differentially activates the three complement pathways with major involvement of the alternative pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74445.
- [3] Y. Ghendon, S. Markushin, G. Krivtsov, et al. Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines [J]. *Arch. Virol*, 2008, 153(5): 831-837.
- [4] Gris D, Ye Z, Iocca H A, et al. NLRP3 Plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses [J]. *J Immunol*, 2010, 185(2): 974-981.
- [5] Donne U J J. New developments in adjuvants [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1997, 93(1): 171-177.
- [6] Donald Kaye, 15 February News [N]. *Clinical Infectious Diseases*, 2016, 62 (4) : i-ii.
- [7] Hafner A M, Cortesy B, Merkle H P. Particulate formulations for the delivery of poly (I:C) as vaccine adjuvant [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(10): 1386-1399.
- [8] Johnston M J, Semple S C, Klimuk S K, et al. Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulation [J]. *Biochemical et biophysics Acta*. 2006, 1758(1): 55-64.
- [9] Khan S, Bijker M S, Weterings J J, et al. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(29): 21145-21159.
- [10] Didierlaurent A M, Morel S, Lockman L, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity [J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(10): 6186-6197.
- [11] Seubert A, Monaci E, Pizza M, et al. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells [J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(8): 5402-5412.
- [12] Calabro S, Tortoli M, Baudner B C, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes [J]. *Vaccine*, 2011, 29(9): 1812-1823.
- [13] Kool M, Petrilli V, De Smedt T, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 Inflammasome [J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 181(6): 3755-3759.
- [14] Wang Y Q, Wu J, Fan Q Z, et al. Novel vaccine delivery system induces robust humoral and cellular immune responses based on multiple mechanisms [J]. *Advanced healthcare materials*, 2014, 3(5): 670-681.
- [15] Termsarasab U, Yoon I S, Park J H, et al. Polyethylene glycol-modified arachidyl chitosan-based nanoparticles for prolonged blood circulation of doxorubicin [J]. *Int J Pharm*, 2014, 464(1-2): 127-134.
- [16] Vila A, Sanchez A, Janes K, et al. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 57(1): 123-131.
- [17] Ghendon Y, Markushin S, Vasiliev Y, et al. Evaluation of properties of chitosan as an adjuvant for inactivated influenza vaccines administered parenterally [J]. *J Med Virol*, 2009, 81(3): 494-506.
- [18] Rezaei Mokarram A, Alonso M J. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing Diphtheria toxoid as new carriers for nasal vaccine delivery in mice [J]. *Archives of Razi Institute*, 2007, 61(1): 13-25.

- [19] Prego C, Paolicelli P, Diaz B, et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection [J]. *Vaccine*, 2010, 28(14): 2607-2614.
- [20] Verheul R J, Hagens N, Van Es T, et al. A step-by-step approach to study the influence of N-acetylation on the adjuvanticity of N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) in an intranasal nanoparticulate influenza virus vaccine [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 45(4): 467-474.
- [21] Kim J J, Nam J P, Nah J W, et al. Immunoadjuvant efficacy of N-carboxymethyl chitosan for vaccination via dendritic cell activation [J]. *Journal of medicinal food*, 2014, 17(2): 268-277.
- [22] Jiang H L, Kang M L, Quan J S, et al. The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1931-1931.
- [23] Vasiliev Y M. Chitosan-based Vaccine Adjuvants: Incomplete Characterization Complicates Preclinical and Clinical Evaluation [J]. *Expert Rev Vaccine*, 2015, 14(1): 37-53.
- [24] Neimert-Andersson T, Binnmyr J, Enoksson M, et al. Evaluation of safety and efficacy as an adjuvant for the chitosan-based vaccine delivery vehicle ViscoGel in a single-blind randomised Phase I/IIa clinical trial [J]. *Vaccine*, 2014, 32(45): 5967-5974.
- [25] Bernstein D I, Atmar R L, Lyon G M, et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults [J]. *The Journal of infectious diseases*, 2015, 211(6): 870-878.
- [26] Puhr S, Lee J, Zvezdova E, et al. Dendritic cell development-History, advances, and open questions [J]. *Semin Immunol*, 2015, 27(6): 388-396.
- [27] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2015 年版 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 通则 94.
- [28] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 预防用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则 [S]. 2005.
- [29] 张若明. 疫苗的临前安全性评价 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(13): 1176-1179.
- [30] European Medicines Agency. Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines [S]. 1997.
- [31] Cha E, Lee J, Lee S, et al. Single-dose Toxicity of ShinYangHur Herbal Acupuncture [J]. *Journal of pharmacopuncture*, 2015, 18(2): 67-75.
- [32] Nam I F, Zhuk V V. Preclinical animal acute toxicity studies of new developed MRI contrast agent based on gadolinium [J]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2015, 81(1): 012092.
- [33] Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation [M]. New York: Elsevier Science, 1990: 76-77.
- [34] Ross T. Fundamentals of Toxicologic Pathology [J]. *Australian Veterinary Journal*, 2010, 88(6): 235-236.
- [35] Tryphonas L, Schwartz L W, Levin S, et al. Toxicologic Pathology: Modern Challenges and the Need for a New Educational Strategy [J]. *Veterinary pathology*, 1995, 32(2): 208-210.
- [36] 国家食品药品监督管理局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2005.
- [37] 胡婷婷, 乐园, 赵宏, 沈志刚, 陈建峰. 高压均质技术结合喷雾干燥法制备布地奈德多孔微球 [J]. *北京化工大学学报*, 2009, 36(2): 9-13.
- [38] Meng F T, Ma G H, Qiu W. W/O/W Double Emulsion Technique Using Ethyl Acetate as Organic Solvent: Effects of its diffusion rate on the characteristics of microspheres [J]. *J. Controlled Release*, 2003, 31(3): 281-295.
- [39] al-Shakhshir R H, Regnier F E, White J L, et al. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants [J]. *Vaccine*, 1995, 13(1): 41-44.
- [40] 高群, 王国建, 李文涛. 壳聚糖在稀溶液中的分子构象及其影响因素 [J]. *化学通报*, 2009, 4(11):

340-341.

[41] 国家药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 2015 年版[S]. 2011, 45(8): 29-32

[42] Yang C, Wang Y W, Yi Z J, et al. Therapeutic effects Of gran-ulyisin/interleukin-12 recombinant M. smegmatis in a murine model of M. tuberculosis infection [J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2007, 30(2): 133-137.

[43] Stenger S, Hanson D A, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of Cytolytic T cells mediated by granulysin [J]. Science, 1998. 282(5386): 121-125.

[44] Jimenez E, Sacedon R, Vicente A, et al. Rat peripheral CD4⁺CD8⁺T lymphocyte are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4⁺T lymphocyte [J]. The Journal of Immunology, 2002, 168(10): 5005-5013.

[45] Nascimbeni M, Pol S, Saunier B. Distinct CD4(+)CD8(+) Double-Positive T Cells in the Blood and Liver of Patients During Chronic Hepatitis B and C [J]. PloS One, 2011, 6(5): 1-8.

[46] Nascimbeni M, Shin E C, Chiriboga L, et al. Peripheral CD4(+)CD8(+) T Cells Are Differentiated Effector Memory Cells with Antiviral Functions [J]. Blood, 2004, 104(2): 478-486.

[47] Seubert A, Monaci E, Pizza M, et al. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells [J]. The Journal of Immunology, 2008, 180(8): 5402-5412.

附录：作者在攻读硕士期间发表的论文

吴晶晶, 吴楠, 岳华, 等.壳聚糖季铵盐微球作为注射疫苗佐剂的安全性评价 [J].
过程工程学报, 2016. (已录用)