

新城疫纳米乳疫苗研制及其免疫效力试验^{*}

陈建民, 欧阳五庆, 张旭, 胡帅

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 研制新城疫纳米乳疫苗, 并考察其免疫效果。利用伪三元相图法优选配方, 并考察其结构类型、形态粒径、稳定性、安全性及免疫效果。结果表明: 新城疫纳米乳疫苗为 W/O 型, 澄明均一, 乳滴呈球形, 平均粒径 364 nm; 稳定性良好; 注射、口服接种安全; 每只 0.75、1.0 mL 免疫剂量可产生良好的免疫效果。新城疫纳米乳疫苗安全、稳定、免疫效果好, 具有临床应用前景。

关键词: 新城疫; 纳米乳; 制备; 抗体滴度

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2010)09-0034-04

Preparation and Test of Newcastle Disease Vaccine Nanoemulsion

CHEN Jianmin, OUYANG Wuqing, ZHANG Xu and HU Shuai

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: To study the preparation and immunity test of Newcastle Disease Vaccine Nanoemulsion. Nanoemulsion was optimized by studying the pseudoternary phase diagrams, and its structural type, appearance, particle size, physical stability, safety and immune effect were tested respectively. The prepared nanoemulsion was the type of water-in-oil, transparent and homogeneous; Nanoemulsion was spherical under TEM; with the average diameter of 364 nm and stable; Nanoemulsion was safe to immunize by oral, injection vaccination; Nanoemulsion could produce better immune effect at 0.75, 1.0 mL per chicken. The Newcastle Disease Vaccine Nanoemulsion has a promising clinical prospect.

Key words: Newcastle disease; Nanoemulsion; Preparation; Antibody titer

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种高度接触性传染病, 是养鸡业中危害最严重的传染病之一^[1-2], 尚未有行而有效的治疗方法。目前, 控制 ND 的基本措施就是接种疫苗。常用的新城疫疫苗是弱毒活疫苗和灭活疫苗, 但二者在实际应用中尚存在一定的局限性, ND 灭活疫苗刺激机体产生细胞免疫和粘膜免疫的作用较弱并伴有接种反应, ND 弱毒活疫苗储存不方便、安全性较低。

纳米乳是由油相、水相、表面活性剂和助表面活性剂按适当比例形成的一种透明、低黏度且热力学稳定的分散体系^[3]。近年来研究表明, 纳米

乳具有稳定性好、安全性高、生物利用度高等优点, 是一种极具潜力的新型药物载体。

本研究采用先进的纳米技术, 将新城疫抗原包裹于纳米乳中, 制备成油包水型新城疫纳米乳疫苗(Newcastle disease virus nanoemulsion, NDV-NE), 以通过纳米载体的稳定、安全、靶向^[4]、缓释^[5]等优点来克服普通疫苗的缺点, 研发出有效预防新城疫的新型疫苗。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物与样品 1 日龄健康雏鸡, 购自杨凌某蛋鸡孵化场; 新城疫抗原(La sota 株,

* 收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-01-15

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD04A11); 陕西省科技攻关项目(2008K02-01)。

第一作者: 陈建民, 在读硕士, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: homework045@163.com

通讯作者: 欧阳五庆, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米药理学、细胞生物学研究。E-mail: oywq506@sina.com

$EID_{50} = 10^{8.83}$), 杨凌绿方生物工程有限公司提供;新城疫标准抗原,西北农林科技大学动物医学院传染病学实验室提供;白油佐剂苗,西北农林科技大学动物医学院生理学实验室自制。

1.1.2 试剂与仪器 斯盘 80(Span 80)、斯盘 85(Span 85)、吐温 20(Tween 20)、吐温 80(Tween 80),天津市登峰化学试剂厂;液体石蜡,天津天大化学试剂厂;无水乙醇、1,2-丙二醇、1,3-丁二醇,西安化学试剂厂。JEM-1230 透射电镜(日本 JE-OL 公司);Zetasizer Nano ZS 型激光粒度分析仪(英国 Malvern Instrument 公司)。

1.2 方法

1.2.1 空白纳米乳的配方筛选 利用伪三元相图法筛选纳米乳配方。分别按 Tween 80、Tween 20、Span 80、Span 85 不同质量配比 [m (斯盘类): m (吐温类)=3:1,3:2,3:3]来选取表面活性剂,从乙醇、1,2-丙二醇、1,3-丁二醇中选取助表面活性剂,从麦芽油、液体石蜡、花生油中选取油相,使表面活性剂/助表面活性剂($K_m = 5:1, 5:2, 5:4$)与油相分别按照 9.9:0.1, 9:1, 8:2, 7.5:2.5, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 的质量比变化。准确称取各组分后,置烧杯中,室温下搅拌,同时逐滴滴加 PBS 缓冲液,记录体系状态变化的临界点(由清至浊或由浊至清),记录此时 PBS 的质量。应用 Origin Pro 7.5 软件,绘制伪三元相图,确定纳米乳区。根据相图中纳米乳区的大小,确定其组分及比例,筛选出最佳配方。

1.2.2 NDV-NE 的制备 将适量盐酸左旋咪唑溶于新城疫抗原溶液中,作为水相,按“1.2.1”操作制备 NDV-NE。

1.3 NDV-NE 品质评价

1.3.1 NDV-NE 结构类型的鉴别^[6] 分别采用离心法和染色法鉴别所制备的乳液是否为纳米乳及其结构类型^[7-8]。

1.3.2 NDV-NE 微观形态观察及其粒径分布 取 NDV-NE 10 mL,用无水乙醇稀释 200 倍后磷酸钨酸负染,透射电镜下观察其微观形态;采用激光粒度分析仪测定其平均粒径、多分散系数(Polydispersity index, PDI)及强度粒径分布。

1.3.3 NDV-NE 稳定性试验^[10] 将 3 批 NDV-NE 密封于 5 mL 西林瓶中,分别在 4℃、20℃、40℃,相对湿度 60%±5%的条件下放置 6 个月,分别于试验开始时及 1、3、6 月末取样,对其外观

进行考察。

1.4 NDV-NE 的安全性评价^[9]

取 1 月龄雏鸡 40 只,随机分成 4 组,每组 10 只。第 1 组每只肌肉注射 1 mL NDV-NE,第 2 组每只肌肉注射 1 mL PBS 作为对照,第 3 组每只口服 2 mL NDV-NE,第 4 组每只口服 2 mL PBS 作为对照。观察 14 d,并记录临床反应及注射局部有无严重反应。

1.5 NDV-NE 免疫效力试验

1.5.1 试验分组及接种 1 月龄雏鸡 50 只,将其分成 A~E 5 个组,每组 10 只,其中 A~C 组分别以每只 0.5、0.75、1.0 mL 剂量口服接种 NDV-NE;D 组每只注射 0.5 mL 白油佐剂疫苗;E 组为对照组,每只口服 PBS 1 mL。免疫当天及其后每周各采血 1 次,分离血清,置 -20℃ 冰箱保存备用。

1.5.2 抗体效价检测 采用血凝抑制试验测定新城疫抗体效价,并利用 Spss 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 NDV-NE 最佳配方的筛选

以 Span 80 和 Tween 80 为表面活性剂,乙醇为助表面活性剂,液体石蜡为油相,所制备的纳米乳区最大,性质稳定。由图 1 可见,当表面活性剂与油相的质量比为 6:4、表面活性剂与助表面活性剂 K_m 为 5:2 时制备的纳米乳抗原含量高,体系最稳定。因此,NDV-NE 最佳配方为:Span 80 为 16.13%,Tween 80 为 16.13%,无水乙醇为 12.19%,液体石蜡为 24.19%,盐酸左旋咪唑 1%,新城疫抗原为 30.36%(组分含量均为质量分数)。

2.2 NDV-NE 品质评价

2.2.1 NDV-NE 结构类型的鉴别 NDV-NE 经高速离心,仍保持澄清、透明,未见分层、絮凝,判定该乳液为纳米乳;染色结果显示,苏丹红 III(红色)扩散速度大于亚甲基兰(蓝色),表明该体系为 W/O 型。

2.2.2 NDV-NE 微观形态观察及其粒径分布 透射电镜观察可见,纳米乳液滴呈球形,大小均匀,分散性良好(图 2);粒度分析结果表明,纳米乳平均粒径为 364 nm,粒径范围为 90~700 nm,基本呈正态分布(图 3)。

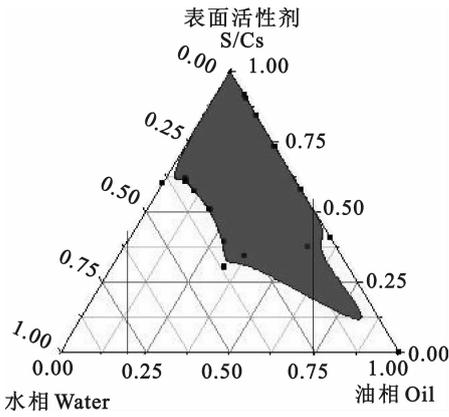


图 1 空白纳米乳的伪三元相图

Fig. 1 Pseudoternary phase diagram of nonleaded nanoemulsion

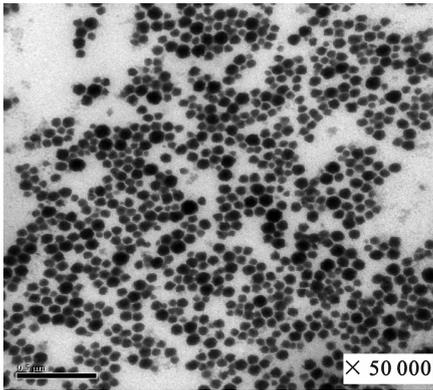


图 2 NDV-NE 的透射电镜观察结果

Fig. 2 Transmission electron micrograph of NDV-NE

2.2.3 NDV-NE 稳定性试验 NDV-NE 在 40℃ 放置 1 个月, 4℃、20℃ 放置 6 个月, 均保持澄

清透明液体状, 无絮状、分层、破乳等现象, 表明其稳定性良好。

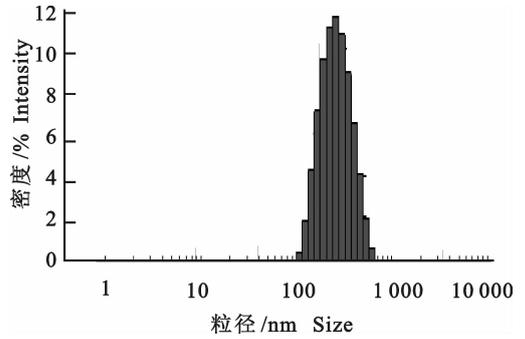


图 3 NDV-NE 的强度粒径分布

Fig. 3 Size distribution by intensity of DNV-NE

2.3 NDV-NE 的安全性评价

NDV-NE 组及对照组免疫接种后, 观察 14 d 均未出现疫苗引起的任何局部和全身不良反应, 且全部健活。

2.4 NDV-NE 免疫效力试验

2.4.1 免疫后不同日龄抗体检测 利用 Spss 统计分析软件对以上免疫后不同时间的平均抗体水平进行处理。由表 1 可见, A~D 组与对照组 E 抗体滴度均具有显著性差异, 其抗体水平都上升。各免疫组抗体水平上升的幅度不同, 其中 NDV-NE 抗体水平随免疫剂量的增加而相应增高, 但 B 与 C 组无显著统计学差异。从 1~5 周, B 组、C 组抗体水平比白油佐剂苗高, 表明 NDV-NE 高 (C 组)、中 (B 组) 剂量组在免疫应答上比白油疫苗组好。

表 1 免疫后不同时间各组的抗体滴度检测结果

Table 1 Antibody titer of different groups after immunization

组别 Group	免疫方式 Immune method	免疫后不同时间抗体滴度 (lg2) Antibody titer after immunization									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	0.5 mL NDV-NE	2.0	5.7	7.5	7.1	6.3	5.8	4.5	3.3	3.0	
B	0.75 mL NDV-NE	2.1	6.7	9.3	9.0	9.2	7.9	6.1	5.8	4.3	
C	1.0 mL NDV-NE	2.2	8.3	9.5	9.2	9.4	8.1	7.5	6.6	5.2	
D	白油佐剂苗组 Oil-adjuvant vaccine	1.9	5.1	7.3	8.7	8.5	7.9	6.8	6.2	6.0	
E	对照组 (1 mL PBS) (CK)	2.0	1.7	1.4	1.0	0.8	0.4	0.4	0.2	0.2	

2.4.2 抗体消长规律 图 4 显示, 疫苗免疫后, A~E 组的抗体滴度均上升; 第 2 周, A~C 组均达到抗体高峰, 而 D 组在免疫后第 3 周才出现高峰; A 组和 B 组抗体水平均维持到 5 周, C 组和 D 组各组抗体水平均维持到 6 周。

3 讨论

纳米乳作为一种新型的 药物载体, 具有许多不可比拟的优点^[11-12]。HLB 值是纳米乳处方设计的一个初步指标, 其在 3~6 时易形成 W/O 型

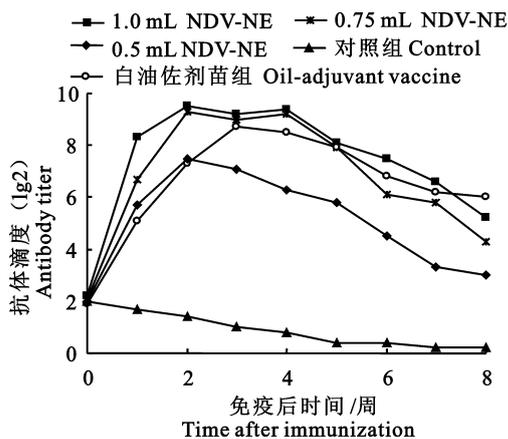


图4 免疫后不同时间各组的抗体消灭规律

Fig. 4 Variation in antibody titer of different groups after immunization

纳米乳。体系 HLB 值是由乳化剂和助乳化剂的种类及数量决定,只要各组分比例恰当,混合均匀后可自发形成纳米乳。因此,纳米乳配方的筛选就是选择合适组分和恰当的比例^[13]。本研究采用伪三元相图法,筛选出最佳配方并制备出油包水型纳米乳 NDV-NE。该纳米乳在 4℃、20℃、40℃ 留样观察,其外观性状无变化,表明其稳定性良好,易于保存。

本研究制备的 NDV-NE 采用口服免疫,改变了常规的注射接种方式,接种安全,无不良反应。研究表明^[14],纳米乳疫苗口服接种时,能提高抗原在胃肠道中的稳定性,保护抗原免遭蛋白酶降解,保持其活性,从而诱导机体产生免疫应答。该纳米乳滴粒径较小(90~700 nm),比表面积大,可增加抗原与肠壁的接触面积,有利于肠黏膜对抗原的摄取和转运,从而提高抗原的生物利用度,刺激机体产生高水平的抗体滴度。

免疫效力试验表明,0.75 mL 和 1.0 mL NDV-NE 组的鸡群产生的抗体滴度比常规白油组水平高,并且随着免疫剂量的增加,其抗体水平相应提高,维持时间也延长。同时,NDV-NE 组到达抗体高峰的时间早于白油组。上述结果表明,纳米乳载体具有佐剂效应^[15],提高了抗原的免疫原性,免疫效果良好。

本研究制备的 NDV-NE 稳定性良好,接种安全,诱导机体产生较高的抗体水平,因此该纳米乳

疫苗具有常规疫苗不可比拟的优势,但其免疫机理和作用仍需深入研究。

参考文献:

- [1] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997:629-637.
- [2] 王贺民, 秦素琴, 魏涛. 鸡新城疫疫苗研究进展[J]. 中国家禽, 2006,28(18):48-51.
- [3] DANIELSSONI, LINDMANB. The definition of a microemulsion [J]. Colloids and Surfaces, 1981(3):391.
- [4] EROLY, HANS-HUBERTB. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005,60: 91-98.
- [5] ADWAO, NORNOO, DIANASLC. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel II. Stability, in vitro release and pharmacokinetics [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008,349:117-123.
- [6] Suchat W, Nigel M D, Thomas R, *et al.* Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions [J]. Pharm Res, 2000(6):684-689.
- [7] 黄仁杰. 低毒药用微乳的研制[J]. 海峡药学, 2003,15(6): 19-21.
- [8] Ho HO, Hsiao CC, Sheu MT. Preparation of microemulsion using polycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs [J]. J Pharm Sci, 1996,85(2): 138-143.
- [9] 邢钊, 张健, 范琳. 兽医生物制品实用技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000:165-166.
- [10] 王晓黎, 蒋雪涛, 刘皋林, 等. 环孢素 A 微乳口服液的制备及稳定性研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2004,21(2): 40-43.
- [11] 孙江才, 欧阳五庆, 许利耕, 等. 复方呋喃西林纳米乳对子宫内膜炎主要致病菌体外抗菌活性研究 [J]. 西北农业学报, 2008,17(5):6-10.
- [12] 杨宝平, 欧阳五庆, 吴旭锦, 等. 白藜芦醇纳米乳的制备及其质量评价 [J]. 西北农业学报, 2008,17(2):20-23.
- [13] 史同瑞, 许腊梅, 于万才, 等. 微乳基质成乳条件与稳定性研究 [J]. 动物医学进展, 2005,26(7):97-99.
- [14] Florence AT. Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting [J]. Drug Target, 2004, 12(2):65.
- [15] Anna U Bielinska, Katarzyna W Janeczak, Jeffrey J Landers, *et al.* Mucosal Immunization with a Novel Nanoemulsion-Based Recombinant Anthrax Protective Antigen Vaccine Protects against Bacillus anthracis Spore Challenge [J]. Infection and Immunity, 2007, 75(8): 4 020-4 029.