

无针粉末注射破伤风类毒素对小鼠血清 IgG 抗体的影响

王伽伯^{1†}, 周旭^{1†}, 王喆桅^{1,2}, 金城¹, 肖小河^{1*}

(1. 解放军中药研究所解放军第三〇二医院, 北京 100039; 2. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘要: 本文以破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT) 为研究对象, 对比自制的无针粉末注射系统与普通皮下注射方式给药对小鼠的免疫效果。考察氢氧化铝吸附破伤风类毒素 ($\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$) 粉末的制备工艺, 并采用光学显微镜和激光粒度分析仪等考察其微粉学性质。结果表明, 增加盐浓度、延长吸附时间均可提高吸附药量。 NaCl 浓度为 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吸附效果较好, 大于 $0.8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛋白会发生盐析; 反应 10 min 后吸附量趋于稳定。体系 pH 值及温度在考察的范围内对吸附药量影响不大。根据优化后工艺制备的 $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 平均粒径为 $(60.6 \pm 4.4) \mu\text{m}$ 。将自制的 $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 无针粉末注射剂与普通皮下注射剂对比, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测破伤风抗毒素 IgG 抗体浓度。结果表明, $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ (含 TT $30 \mu\text{g}$) 无针粉末注射小鼠, 4 周后破伤风抗毒素 IgG 抗体浓度为 $(6.19 \pm 0.52) \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, 8 周后为 $(10.70 \pm 0.78) \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, 而普通皮下注射组 (含 TT $20 \mu\text{g}$) 分别为 (4.25 ± 0.58) 、 $(7.48 \pm 0.57) \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示自制的 $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 无针粉末注射剂免疫原性较好, 为进一步开发破伤风类毒素无针粉末注射剂提供了技术参考。

关键词: 无针粉末注射; 破伤风类毒素; 抗体; 酶联免疫吸附法

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1406-04

Effect of tetanus toxoid powder needleless injection on the concentration of serum antibody IgG in mice

WANG Jia-bo^{1†}, ZHOU Xu^{1†}, WANG Zhe-wei^{1,2}, JIN Cheng¹, XIAO Xiao-he^{1*}

(1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China;

2. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: In this study, a self-designed powder needleless injection system was compared with subcutaneous injection using a needle and syringe to deliver tetanus toxoid (TT) into mice to elicit immunity. First of all, factors influencing the preparation of TT into powder by being absorbed on aluminium hydroxide were investigated and the micromeritic characters of $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ powder were observed with optical microscope and laser particle analyzer. The results showed that salt concentration and absorption time had an enhance effect on drug loading, but the pH value and temperature did not influence the absorption reaction obviously. The absorption reaction was optimized with sodium chloride concentration of $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and lasting for 10 min. The average diameter of $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ powder prepared with conditions optimized above was $(60.6 \pm 4.4) \mu\text{m}$. The immunization effect of TT was determined through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of the concentration of IgG antibody elicited by TT. With delivery of $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ (of $30 \mu\text{g}$ TT) by powder needleless injection to mice, the IgG antibody concentration were (6.19 ± 0.52) and $(10.70 \pm 0.78) \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ after immunization of 4 and 8 weeks, respectively, while the values were (4.25 ± 0.58) and $(7.48 \pm 0.57) \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ by subcutaneous injection (of $20 \mu\text{g}$ TT) using a needle and syringe. The results suggested that the self-designed powder

收稿日期: 2009-06-08.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 重大专项课题 (2004AA2Z3402); 国家科技重大专项课题 (2008ZXJ09014-004).

[†]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-66933322, Fax: 86-10-63879915, E-mail: pharmacy302@126.com

needleless injection of $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ was comparable to subcutaneous injection with a good immunity.

Key words: powder needleless injection; tetanus toxoid; antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

无针粉末注射 (powder needleless injection, PNI) 主要是利用高速气体喷射, 将药物递送至皮内、皮下或黏膜部位, 具有无针、无痛、无交叉感染, 便捷、微量、高效和安全等特点, 适用于多种类型特别是对酸和酶不稳定的蛋白、多肽等生物工程药物^[1-3]。现代研究表明, 皮肤是人体最大的免疫器官, 尤其是表皮层具有丰富的抗原呈递细胞 (antigen presenting cells, APCs), 可产生较高的抗体滴度, 特别适合疫苗免疫^[4, 5]。但表皮层分布于皮肤表面下 100~200 μm 处, 常规针头注射方式一般很难准确将药物递送至此层; 而无针粉末注射技术可通过控制载药粉末大小、速度等参数将药物递送至表皮层^[6], 从而利用该层丰富的抗原呈递细胞, 大大提高免疫效率^[7]。国外文献研究表明, 无针粉末注射给予流感病毒可达到与普通针头注射相当或更高的免疫效果^[8, 9]。

本课题组在前期自制无针粉末注射给药系统的基础上^[10, 11], 进一步研制了破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT) 无针粉末注射剂, 免疫小鼠后通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测破伤风抗毒素 IgG 抗体浓度, 并与普通注射剂对比, 验证无针粉末注射剂的免疫效果。

材料与方法

药品与试剂 精制破伤风类毒素 (270 Lf/mg $\times$ 4 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$), 北京纵横洋洲生物科技公司; BCA 蛋白质测定试剂盒, 美国 Pierce 公司; 破伤风抗体检测试剂盒, 珠海海泰生物制药有限公司。

仪器设备 LS800 型激光粒度分析仪, OMEC 公司; ZS-3 板式酶标仪, 北京毓新仪器公司; 自制无针粉末注射器的结构主要由微型气瓶、控制阀门、药匣、超音速喷管、消声器等组成, 详见文献^[10, 11]。自制无针粉末注射器的工作原理: 高压气体携带药物粉末, 通过超音速喷管 (拉伐尔喷管) 加速达到 500~1 000 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, 喷射向皮肤表面, 气体碰到皮肤后弹开从排气孔逸出, 而药物粉末由于惯性作用于皮肤角质层, 由于粉末具有高动能因而突破角质层障碍, 进入皮内或皮下, 实现给药目的。给药深度可通过粉末速度及大小等调节。使用前, 在洁净台将药物粉末加入药匣密封, 装入无针粉末注射器, 将注射器紧贴给药部位皮肤, 打开阀门开关, 高压气体 (4 MPa) 迅速释

出并冲破药匣内的密封薄膜, 气流携带粉末加速实现给药。

实验动物 清洁级 KM 小鼠, 体重 18~20 g, 雌雄各半, 购自军事医学科学院实验动物中心 (许可证号 SCXK2007-004)。

$\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 载药粉末的制备 取明矾 4.0 g 和碳酸钠 1.8 g, 分别溶于 50 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水 40 mL 和 15 mL, 并转移入分液漏斗中, 同时开启两个活塞缓缓将两种溶液注入预先盛有 10 mL 蒸馏水 (50 $^{\circ}\text{C}$) 的烧杯并搅拌 (约 40~45 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 以控制粉末粒度和驱散二氧化碳。待反应完毕, 在搅拌下用碱液调节 pH 为 7.2~7.6, 静置 0.5 h。反应液过 200 目筛, 沉淀转移至布氏漏斗中抽滤, 蒸馏水洗涤 5 次, 沉淀真空干燥, 收集通过 120 目筛的粉末, 即得 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末。

精密称取 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末约 10 mg, 加入 NaCl 溶液 5 mL, 超声分散 30 min, 加入破伤风类毒素溶液使终质量浓度为 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 室温静置, 3 000 $\times g$ 离心 30 min, 沉淀物真空干燥, 即得 $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 载药粉末。

盐浓度对吸附量的影响 取适量 TT 蛋白和 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末, 加入不同浓度的 NaCl 溶液 (0、0.2、0.4、0.8、1.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中, 室温条件下, 按上述方法制备 $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 粉末。

pH 值对载药性能的影响 室温条件下, 在 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中, 调节 pH 值分别为 2、4、7、9、11, 按上述方法制备 $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 粉末。

温度对载药性能的影响 在 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中, pH 值 7.0 条件下, 考察不同温度 (0、20、50 $^{\circ}\text{C}$) 对 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 吸附 TT 的影响。

时间对微粒载药性能的影响 室温条件下, 在 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中, pH 值 7.0, 考察不同吸附时间对 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 吸附 TT 的影响。

$\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 粉末吸附率测定 取上述吸附后上清液, 采用 BCA 法检测 TT 蛋白含量, 计算吸附率。吸附率 = (加入 TT 蛋白量 - 上清液蛋白量) / 加入 TT 蛋白量 $\times 100\%$ 。

$\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 粉末的粉体学性质考察 通过肉眼和光学显微镜观察 $\text{Al}(\text{OH})_3\text{-TT}$ 粉末形态。采用量筒法测定粉末堆密度, 即将一定质量 (m) 的粉末充填至量筒中, 振动量筒, 直到量筒内粉末体积不再减少, 测得粉末体积 (v), 计算堆密度 (bulk density, ρ_b),

$\rho_b = m/v$ 。采用液体置换法测定粉末粒密度 (granule density, ρ_g)，即将一定质量的粉末填充至量筒中，振荡量筒，直到量筒内粉末体积不再减少，加入丙酮体积为 v_1 ，记录加入丙酮后的体积 v_2 ，粉末的粒密度 $\rho_g = m/(v_2 - v_1)$ 。采用漏斗法测定粉末休止角，即将粉末经漏斗流下并成圆锥体堆，测量锥体高 (H) 和底部半径 (R)，计算休止角 $\alpha = \arctan H/R$ 。采用激光粒度分析仪测量粉末的粒径分布。

破伤风类毒素无针粉末注射剂的免疫效果评价 小鼠 36 只随机分为 3 组，每组 12 只，分别为空白对照组 (control group, CG)、针头注射组 (needle injection group, NIG) 和无针粉末注射组 (powder needleless injection group, PNLIG)。无针粉末注射组动物在试验前一天用电动剃毛器剃去小鼠股部外侧皮毛，然后用硫化钠溶液褪去剩余绒毛，清水洗净残余硫化钠后涂抹凡士林保养。针头注射组分别于第 0 和 14 天皮下注射精制破伤风类毒素稀释液 5Lf (约 20 μg TT)；无针粉末注射组于相同时间给药 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 粉末 2 mg (约 30 μg TT)；小鼠分别于第 1 次给药后的第 0、2、4、8 周采集眼眶血，稀释 1 000 倍，采用 ELISA 法检测血清中破伤风抗毒素 IgG 抗体浓度。

统计分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验统计分析，显著性概率水平为 0.05。

结果

1 制备工艺条件对 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 粉末载药性能的影响

1.1 盐浓度对吸附率的影响 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末吸附 TT 蛋白的过程与表面的 ζ 电位有关。通常情况下，在体系中加入盐，增加溶液离子强度可增大 ζ 电位，使表面电势差加大，易于蛋白吸附包裹在微粒上，增加粉末吸附药量。结果表明， $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末对 TT 蛋白的吸

附率随 NaCl 溶液浓度增加呈明显增大趋势。NaCl 溶液浓度为 0、0.2、0.4、0.8、1.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，吸附率分别为 66.2%、80.8%、93.6%、96.7% 和 99.9%，但 NaCl 溶液浓度达到 0.8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，TT 蛋白出现盐析沉淀 (沉淀率 14.3%)，当 1.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时已完全盐析沉淀。因此，初步确定 NaCl 溶液浓度 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2 溶液 pH 值对吸附率的影响 溶液 pH 值在 2.0~11.0 内，对 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末吸附 TT 蛋白量无显著影响，故选择近中性 pH 条件，避免 TT 蛋白变性。

1.3 温度对吸附率的影响 在 0~50 $^{\circ}\text{C}$ 内，反应体系温度对吸附率无显著影响，故选择室温条件。

1.4 吸附时间对吸附率的影响 在室温条件下，在 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中，pH 值 7.0， $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末吸附 TT 蛋白在 2、5、8、10 和 15 min 时的吸附率分别为 76.3%、88.3%、91.8%、96.2% 和 96.4%，可见 10 min 后吸附反应已趋于稳定，故确定吸附时间为 10 min。

依据上述结果确定 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 粉末制备方法为：精密称取适量 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 粉末，加入 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中，超声分散 30 min，加入破伤风类毒素溶液使终质量浓度为 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，室温静置 10 min，3 000×g 离心 30 min，沉淀物真空干燥，即得 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 粉末。

2 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 粉末的一般粉体学性质

$\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 粉末在未干燥前为白色黏稠的混悬液，静置析出少量水分，遇红色或蓝色石蕊试纸几乎无反应；干燥后呈白色粉末状。显微镜下观察微粒形态不规则 (图 1a)。自制 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 粉末的堆密度 (1.30 ± 0.08) $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，粒密度 (2.39 ± 0.05) $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，休止角 (0.53 ± 0.02) $^{\circ}$ 。激光粒度分析仪测量结果 (图 1b) 表明， $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT 无针注射粉末的微粒平均粒径为 (60.6 ± 4.4) μm ，呈偏态分布，约 60% 粉末的微粒粒径在 20~120 μm 。

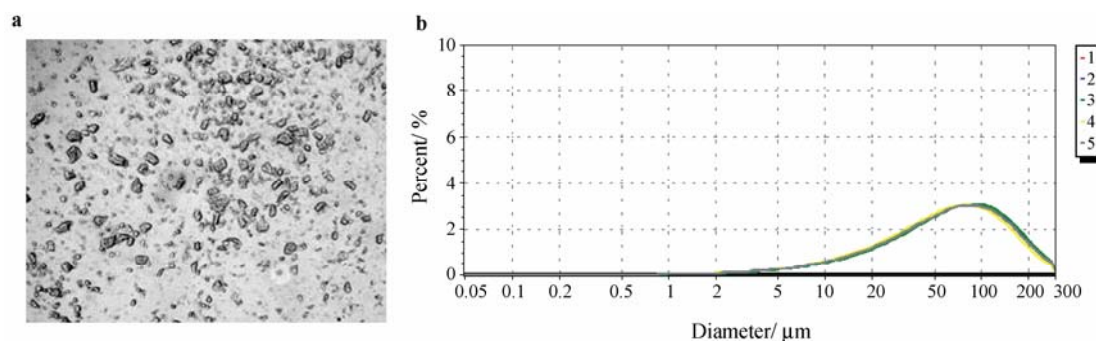


Figure 1 Micrograph of $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT powder ($\times 200$) (a) and size distribution of $\text{Al}(\text{OH})_3$ -TT (b)

3 破伤风类毒素无针粉末注射剂的免疫效果

ELISA 法检测破伤风抗毒素 IgG 抗体的回归方程为: $C = 6.443A + 0.3885$, $R = 0.9973$, 其中 C 为 IgG 浓度 ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$), A 为吸光度值的平方。经方法学考察符合试剂盒检测要求。

分别于免疫后第 0、2、4、8 周, 检测各组动物血清中破伤风抗毒素 IgG 抗体浓度, 结果见表 1。从表中结果可以看出, 小鼠免疫后 2 周已产生抗体并逐渐增高, 无针粉末注射组在给药后第 8 周达到 $10 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。按剂量折算, 无针粉末注射组与常规针头注射组抗体水平相当而略低。

Table 1 The IgG antibody concentrations of mice treated with tetanus toxoid (TT) via different routes

Group	IgG antibody concentration/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$			
	0 w	2 w	4 w	8 w
CG	—	—	—	—
NIG	—	1.16 ± 0.65	4.25 ± 0.58	7.48 ± 0.57
PNLIG	—	1.55 ± 0.90	$6.19 \pm 0.52^{**}$	$10.70 \pm 0.78^{**}$

CG: Control group; NIG: Needle injection group; PNLIG: Powder needleless injection group. $^{**}P < 0.01$ vs NIG

讨论

氢氧化铝是良好的吸附剂, 对蛋白等大分子物质具有很好的吸附效果; 氢氧化铝还是疫苗中常用的免疫佐剂^[12]。因此, 氢氧化铝非常适合作为吸附剂, 将蛋白抗原吸附实现粉末化, 从而通过无针粉末注射给药, 将载药粉末递送至表皮层, 利用表皮层丰富的抗原呈递细胞达到良好的免疫效果。国外文献报道, 相比普通针头肌肉注射方式, 采用无针粉末注射方式递送流感病毒疫苗可提高抗体滴度 2 倍以上^[13]。根据作者前期研究结果, 自制的无针粉末注射器生物利用度大致在 30%~40%^[11], 故本文在设计 TT 剂量时, 在普通针头注射的剂量 ($20 \mu\text{g}$) 基础上适当提高了无针粉末注射组的剂量 ($30 \mu\text{g}$), 从产生的抗体浓度看, 无针粉末注射方式免疫效果较好。优化自制无针粉末注射器的药物递送性能将进一步提高免疫效果。

本文初步建立了一种新型的破伤风类毒素免疫方式——无针粉末注射给药, 与传统针头注射方式相比, 无针粉末注射给药具有无针、无痛、无交叉感染的优点; 将载药粉末预封装入一次性药芯, 并通过

多次连续注射装置给药, 可实现快速疫苗接种, 特别适用于军队战前大规模免疫以及突发公共卫生事件的快速免疫, 潜在的军事和社会意义重大。

References

- [1] Mitchell TJ, Kendall MAF, Bellhouse BJ. A ballistic study of micro-particle penetration to the oral mucosa [J]. *Int J Impact Eng*, 2003, 28: 581–599.
- [2] Xu Zhou, Cheng JI, Wang JB. Pilot study of needle-free powder jet injection drug delivery system [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药学报)*, 2006, 22: 88–90.
- [3] Wang JB, Zhou X, Cheng JI, et al. Progress in the research of powder needleless injection technology [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药学报)*, 2006, 22: 292–295.
- [4] Cruz PD Jr, Bergstresser PR. Antigen processing and presentation by epidermal Langerhans cells. Induction of immunity or unresponsiveness [J]. *Dermatol Clin*, 1990, 8: 633–647.
- [5] Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology [J]. *Immunol Today*, 1993, 14: 75–78.
- [6] Kendall M, Mitchell T, Wrighton-Smith P. Intradermal ballistic delivery of micro-particles into excised human skin for pharmaceutical applications [J]. *J Biomech*, 2004, 37: 1733–1741.
- [7] Chen D, Erickson CA, Endres RL, et al. Adjuvantation of epidermal powder immunization [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 2908–2917.
- [8] Dean HJ, Chen D. Epidermal powder immunization against influenza [J]. *Vaccine*, 2004, 23: 681–686.
- [9] Chen D, Endres RL, Erickson CA, et al. Epidermal immunization by a needle-free powder delivery technology: immunogenicity of influenza vaccine and protection in mice [J]. *Nat Med*, 2000, 6: 1187–1190.
- [10] Wang JB, Zhou X, Cao L, et al. The *in vitro* evaluation on the drug delivery rate of self-designed powder needleless injection system [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药学报)*, 2006, 21: 11–14.
- [11] Wang JB, Zhou X, Li W, et al. Bioavailability and influencing factors of self-designed powder needleless injection system on rabbits [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 424–428.
- [12] Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends [J]. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82: 488–496.
- [13] Chen DX, Burger M, Chu Q, et al. Epidermal powder immunization: cellular and molecular mechanisms for enhancing vaccine immunogenicity [J]. *Virus Res*, 2004, 103: 147–153.