论文

用于疫苗输送的功能化磷酸钙纳米载体的制备

王倩^①, 王康^①, 梁欢^①, 刘新荣^①, 魏桂花^①, 晏为力^{①*}, 周绍兵^{②*}^① 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031^② 西南交通大学材料科学与工程学院, 成都 610031

*通讯作者, E-mail: yanweili@gmail.com; shaobingzhou@swjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-23; 接受日期: 2016-02-23; 网络版发表日期: 2016-06-21

四川省科技厅项目(编号: 2015JY0202)、国家自然科学基金面上项目(编号: 21574105)、四川省高校创新研究团队建设项目(编号: 14TD0050)和成都市科技惠民项目(编号: 2015-HM01-00047-SF)资助项目

摘要 利用高碘酸钠(NaIO_4)氧化甘露聚糖(mannan, MN)得到了多醛基氧化甘露聚糖, 再以帕米麟酸二钠(Pa)修饰, 获得带有双磷酸根的甘露聚糖(Pa-MN). 以此产物为基础, 利用双磷酸根与钙离子的特异亲和作用通过共沉淀法制备了功能化磷酸钙(CAP)纳米粒, 并研究了该纳米粒作为模型抗原鸡卵清蛋白(OVA)佐剂的免疫刺激效果. 采用核磁共振、元素分析技术证明甘露聚糖被成功修饰. 与伴刀豆球蛋白 A (ConA)的特异性结合实验表明, 合适的修饰度可保持甘露聚糖结构的完整性. 通过动态光散射(DLS)粒度仪、扫描电子显微镜(SEM)、透射电子显微镜(TEM)表征发现, 该功能化纳米粒平均粒径为 130.4 ± 1.9 nm, 且分散性良好. Elisa 实验测定血清中抗 OVA 的 IgG 水平, 结果表明该功能化纳米粒具有良好的免疫刺激效果.

关键词 甘露聚糖, 磷酸钙纳米粒, 免疫佐剂

1 引言

目前为止, 批准上市的疫苗超过 70 种, 尽管数量较多, 但大多是减毒或灭活疫苗, 其安全性和有效性方面还有很大的提升空间. 生物技术的进步带来了更加安全的亚单位抗原, 但其仍存在不足, 如免疫活性不高, 这就需要强有力的佐剂来增强疫苗的免疫反应^[1]. 迄今为止, 氢氧化铝是唯一获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准的用于人体的疫苗佐剂, 尽管是疫苗的传统佐剂, 也存在着一些限制, 如需低温保存、对多肽类抗原佐剂效果不佳、无法刺激产生 Th1 免疫应答等^[1,2]. 因此寻求更安全有效的佐剂很

有必要. 纳米粒因为能提高疫苗安全性和有效性, 成为了疫苗研究的热点, 具有作为疫苗佐剂的潜力^[1-4], 将蛋白包裹于纳米颗粒中成为了有效触发免疫反应的途径^[4]. Swaminathan 等^[5]利用快速沉淀法制备了一种脂质纳米佐剂, 相比于常用的疫苗佐剂如氢氧化铝、免疫调节性寡核苷酸(IMO)、TLR4 激动剂等, 能显著增强 B 细胞应答; 该纳米粒结合免疫调节性寡核苷酸(IMO)激动剂后, 相比于 IMO 能引起更强烈的 Th1 型应答反应; 此外, 该纳米佐剂能显著增加抗原特异性细胞免疫反应. 纳米佐剂在肿瘤疫苗方面的应用, 近年来也备受关注, 利用纳米佐剂具有的运载和增强免疫应答等多种功能, 可提高肿瘤疫苗的免疫效应和

引用格式: 王倩, 王康, 梁欢, 刘新荣, 魏桂花, 晏为力, 周绍兵. 用于疫苗输送的功能化磷酸钙纳米载体的制备. 中国科学: 化学, 2016, 46: 891-899
Wang Q, Wang K, Liang H, Liu XR, Wei GH, Yan WL, Zhou SB. Preparation of functional calcium phosphate nanoparticles for vaccine delivery. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 891-899, doi: 10.1360/N032016-00016

治疗效果^[6]. Rosalia 等^[7]制备了一种复合 PLGA 纳米疫苗, 同时装载蛋白抗原、佐剂和 CD40 单抗隆抗体激动剂, 通过 CD40 靶向传递疫苗到树突状细胞能有效刺激特异性 T 细胞应答, 树突状细胞对疫苗的内化诱导了 CD8⁺T 细胞的成熟, 从而延长了荷瘤小鼠的存活期.

磷酸钙是骨骼、牙齿等组织的主要组成成分. 以特定聚合物修饰的磷酸钙具有靶向功能, 可实现在体内的定点释药. 由于其具有良好的生物相容性、低毒性、易使用、吸附 DNA 能力强等特点, 因此可作为良好的药物载体, 如可作为 DNA、抗生素、蛋白、生长因子等药物的载体^[8]. 磷酸钙纳米颗粒成为了目前广泛应用的非病毒载体之一, 在药物、疫苗及诊断试剂的靶向输送等方面取得了很好的效果^[8].

甘露聚糖是酵母细胞壁的主要成分, 由甘露糖通过糖苷键连接而成, 以 α -1,6 糖苷键为骨架结构, 主链上具有丰富的残基, 糖残基大部分甚至全部以 α -1,2 或 α -1,3 糖苷键连接, 是酵母细胞壁多糖中免疫功能最强的多糖, 还具有抗肿瘤、抗氧化和增加动物体液免疫和细胞免疫能力等活性功能^[9,10]. 甘露聚糖作为一个重要的生物反应调节剂已被广泛研究. 它通过结合树突状细胞、巨噬细胞等抗原呈递细胞表面甘露糖受体, 增加细胞的摄取率, 从而提高宿主的免疫应答能力^[10-13]. Weinberger 等^[14]通过开环氧化得到多醛基化合物, 与蛋白中氨基相连制备了一种甘露聚糖-蛋白复合物, 在最大限度保持甘露聚糖活性的情况下, 该复合物能有效地被巨噬细胞吞噬, 从而增强体液免疫反应.

我们制备了一种甘露聚糖修饰的磷酸钙纳米粒, 甘露聚糖可结合巨噬细胞表面甘露糖受体, 提高所携带疫苗的生物利用度, 同时纳米尺寸的颗粒增加了巨噬细胞的摄取率, 从而有利于增强甘露聚糖的免疫佐剂活性和模型抗原的免疫刺激效应.

2 实验部分

2.1 试剂

甘露聚糖(mannan from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich, 美国); 伴刀豆球蛋白 A (Concavalin A from *Canavalia ensiformis*, ConA, Sigma-Aldrich, 美国); 鸡卵清蛋白(albumin from chicken egg white, OVA, Sigma-Aldrich, 美国); 铝佐剂(aluminum, SERVA Electrophoresis G, 德国); goat

anti-mouse IgG (Southern Biotech, 美国); 高碘酸钠(NaIO_4 , AR, 成都科龙化工试剂厂, 中国); 帕米麟酸二钠(Pa, AR, 南京康满林生物医药有限公司, 中国); 硼氢化钠(AR, 成都科龙化工试剂厂, 中国); 其他试剂均为分析纯, 使用前未经过纯化处理.

2.2 方法

2.2.1 Mannan 的结构修饰(Pa-MN 的合成)

将 mannan (100 mg, 照单糖计 0.56 mmol)溶于 4℃ 去离子水中, 加入 NaIO_4 (终浓度为 50 mmol/L), 其中 mannan (照单糖计): NaIO_4 摩尔比分别为 10:1、5:1、3:1, 黑暗下冰水浴中, 1000 r/min 搅拌反应 2 h, 加入乙二醇终止反应, 在相同条件下继续搅拌 1 h, 以去离子水为介质黑暗下冰水浴中透析 72 h, 冷冻干燥, 固体-20℃ 保存, 醛基含量采用 Amplite 比色法醛类定量检测试剂盒(colorimetric aldehyde quantitation kit, Biomol, 德国)检测^[14-18].

将帕米麟酸二钠(Pa)溶于去离子水中, 加入氰基硼氢化钠与多醛基氧化甘露聚糖(帕米麟酸二钠:醛:氰基硼氢化钠摩尔比为 4:1:4), 搅拌反应 24 h, 反应完毕, 向其中加入硼氢化钠继续搅拌 24 h 还原未反应的醛基, 以去离子水为介质透析 72 h, 冷冻干燥得 Pa-MN 固体-20℃ 保存^[17-20], Pa-MN 结构采用核磁共振技术 ^1H NMR (600 MHz, D_2O)和元素分析进行鉴定. 按照氧化比例的不同将 mannan (照单糖计): NaIO_4 摩尔比为 10:1、5:1、3:1 修饰物依次命名为 Pa-MN1、Pa-MN2、Pa-MN3. Pa-MN 的化学结构和反应过程分别如图 1^[17]和图 2^[18]所示.

图 1 Pa-MN 的化学结构图

图2 Pa-MN 的制备流程图

2.2.2 Pa-MN 的定性鉴定(与羟基磷灰石结合实验)

将羟基磷灰石(100 mg)分别加入到 1、2、3、4 号试管中, 1 号加入 mannan (1 mL, 1 mg/mL)溶液, 2、3、4 号分别加入 Pa-MN1、Pa-MN2、Pa-MN3 溶液(1 mL, 1 mg/mL), 振荡 30 min 使充分结合(图 3), 离心取上层清液, 向每支试管中加入 500 μL 水, 振荡 15 min 后离心, 合并上层清液, 重复 5 次, 设置 3 次平行实验^[17,19]. 参照硫酸蒽酮法测上层清液中的多糖含量, 得出多糖与羟基磷灰石的结合率^[21].

2.2.3 Pa-MN 结构完整性鉴定

将 Pa-MN1、Pa-MN2、Pa-MN3、mannan 用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L Na_3PO_4 , 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH 7)溶解成浓度依次为 400、200、100、50 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 各

图3 Pa-MN 与羟基磷灰石结合示意图(网络版彩图)

浓度取 500 μL 加入到 500 μL 、230 $\mu\text{g/mL}$ ConA 溶液中, ConA 用上述磷酸盐缓冲液溶解, 剧烈振荡反应 2 h, 8400 $\times g$ 、室温下离心 10 min, 弃去上层清液, 沉淀用 1 mL、1 mol/L NaCl 清洗 2 次, 固体沉淀溶解在 100 μL 50 mmol/L Na_3PO_4 (pH 10.5)溶液中, 在 405 nm 处测定浊度, 各组实验均设置 3 次平行实验^[14].

2.2.4 功能化磷酸钙纳米粒(Pa-MN CAP nanoparticles)的制备及抗原的结合

根据结构完整性实验结果, 选择最大限度保留 mannan 活性的 Pa-MN1 制备功能化磷酸钙纳米粒, 根据 Pa-MN1 中 PO_3^{3-} 和溶液中游离 Ca^{2+} 正负电荷的相互作用, 采用共沉淀法制备磷酸钙纳米粒^[22~24], 并对 Pa-MN1、硝酸钙、磷酸氢二铵溶液浓度对纳米粒的性能影响进行了探究. 功能化纳米粒的形成过程如图 4 所示.

(1) Pa-MN 浓度对纳米粒性能的影响. 取 5 份浓度分别 1、2、3、4 和 5 mg/mL 的 Pa-MN1 溶液 0.5 mL, 室温下磁力搅拌, 加入 0.5 mL、6.25 mmol/L 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 8~9, 搅拌 15 min, 逐滴加入 3.74 mmol/L 磷酸氢二铵溶液 0.5 mL, 调节 pH 8~9, 继续搅拌 15 min 即得.

(2) 硝酸钙浓度对纳米粒性能的影响. 为保证形成的 Pa-MN CAP 纳米粒具有适宜的浓度, 选择 3 mg/mL 的 Pa-MN1 制备磷酸钙纳米粒, 室温下磁力搅拌, 取 3 mg/mL Pa-MN1 溶液 0.5 mL, 分别加入 6.25、12.5、18.75、25 和 31.25 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液 0.5 mL, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 8~9, 搅拌 15 min, 逐滴加入 3.74 mmol/L 磷酸氢二铵溶液 0.5 mL, 调节 pH 8~9, 继续搅拌 15 min 即得.

(3) 磷酸氢二铵浓度对纳米粒性能的影响. 室温下磁力搅拌, 取 3 mg/mL Pa-MN1 溶液 0.5 mL, 分别加入 3.74、7.48、11.22、14.96 和 18.7 mmol/L 磷酸氢二铵溶液 0.5 mL, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 8~9, 搅拌 15 min, 逐滴加入 6.25 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

溶液 0.5 mL, 调节 pH 8~9, 继续搅拌 15 min 即得.

选择合适的各组分浓度用于制备结合 OVA 的功能化 CAP 纳米粒, 制备好的纳米粒经冷冻干燥除去 OH^- , 复溶, 加入 OVA, 形成混合溶液用于免疫实验. 制备好的功能化 CAP 纳米粒, 采用动态光散射法 (DLS; Malvern Zeta-sizer Nano Series, Worcestershire, ZEN3600, UK) 进行表征, 纳米粒的形貌利用扫描电子显微镜 (SEM; JEOL JSM-7001F, 日本) 和透射电子显微镜 (TEM; JEOL JEM-2100F, 日本) 观察.

2.2.5 免疫刺激实验

纳米颗粒与蛋白相互作用, 能显著提高纳米颗粒的相容性^[25], 同时纳米级载体被巨噬细胞吞噬的特点可提高 OVA 的利用率, 功能化的纳米粒还可作为 OVA 的佐剂, 因此采用小鼠免疫实验来研究功能化 CAP 纳米粒作为佐剂的效果. 将实验样品分为 4 组: 阴性对照组 (negative, 不免疫)、阳性对照组 (OVA+aluminum)、free mannan+free OVA 组、功能化磷酸钙纳米粒 (Pa-MN CAP nanoparticles)+free OVA 组.

选择 6~8 周龄、体重 18~22 g Balb/c 雄鼠 32 只 (购自成都达硕生物科技公司, 中国), 随机分为 4 组. 每只鼠均于第 0 d 皮下注射每剂样品 100 μL , 每剂样品中 OVA 含量均为 5 μg , 铝佐剂为 10 μg , mannan 为 20 μg . 于第 14 d 使用相同剂量加强免疫, 第 28 d 取血 200 μL , 离心分离血清, 血清样品稀释 10^{-4} , 采用酶联免疫实验测定抗体滴度 (OVA-specific antibody) 水平^[18,26~30].

图 4 功能化磷酸钙纳米粒的制备及 OVA 结合示意图(网络版彩图)

2.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件处理本实验所得数据, 处理结果以(平均数 $\pm$ 标准差)表示, $p < 0.05$ 表示数据间存在统计学差异.

3 结果与讨论

3.1 氧化甘露聚糖中醛含量

为了在 mannan 中引入磷酸根, 利用 NaIO_4 开环氧化 mannan 中邻二醇结构得到多醛基化合物, 再与 Pa 结构中氨基反应^[18]. 参照 colorimetric aldehyde quantitation kit 试剂盒方法^[13]测定醛含量, 结果见表 1. Mannan (照单糖计): NaIO_4 摩尔比为 10:1、5:1、3:1 氧化, 分别得到含醛基 0.28、0.59 和 1.47 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 的氧化甘露聚糖.

3.2 Pa-MN 中 Pa 的取代度

Mannan 本身不含 N 元素, 经修饰后因接入 Pa 而引入 N 元素, 采用元素分析测定 Pa-MN 中 N 元素含量, 可计算出 Pa-MN 中 Pa 的取代度. Mannan (照单糖计): NaIO_4 摩尔比为 10:1、5:1、3:1 氧化, 经后续反应分别得到 3.91%、9.12%、21.18% 双磷酸盐取代的甘露聚糖(Pa-MN), 结果见表 2.

3.3 Pa-MN 的结构鉴定

Pa-MN 的 ^1H NMR (600 MHz, D_2O) 结果如图 5 所示. 由于溶剂为氘代重水, 发生活泼氢交换, 因此不能看到羟基和胺基的峰. 图中新增两个峰为亚甲

基峰, a 为临近胺基的亚甲基峰质子峰($\delta=3.36$ ppm), b 为 Pa-MN 中远离胺基的亚甲基质子峰($\delta=1.08$ ppm). 该结果表示 Pa 成功修饰了 mannan.

3.4 结构完整性分析

经开环氧化后 mannan 中糖环打开, 为确保 mannan 活性, 与伴刀豆球蛋白 A (ConA) 结合证明甘露糖结构完整性. ConA 是植物凝集素蛋白的一种, 在中性 pH 条件下以四聚体的形式存在, ConA 中每个亚单位含有 1 个糖残基结合位点, 能特异性地结合 α -甘露糖并产生沉淀. 利用 ConA 与甘露糖特异性结合的特点, 证明 Pa-MN 结构完整性^[14-17].

结合实验发现, Pa-MN1、Pa-MN2 组与 mannan 组相比光密度(OD)曲线接近, 其中 Pa-MN1 与 mannan 组最为接近, 而 Pa-MN3 组差异较大(图 6). 由此可知, Pa-MN1 和 Pa-MN2 的修饰结果能基本保证结构的完整性, 而 Pa-MN3 由于过度修饰使得结构的完整性遭到破坏^[14], 因此在最大限度保证 mannan

表 1 氧化甘露聚糖中醛的含量

单糖: NaIO_4 (摩尔比)	醛含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	单糖:醛(摩尔比)
10:1	0.28	20:1
10:2	0.59	9.4:1
10:3	1.47	3.77:1

表 2 Pa-MN 中 Pa 的取代度

单糖: NaIO_4 (摩尔比)	N (%)	取代度(%)
10:1	0.71	3.91%
5:1	0.87	9.12%
3:1	1.24	21.18%

图 5 Pa-MN 的 ^1H NMR 谱图. 上图为 mannan 谱图, 下图为 Pa-MN 谱图

活性的前提下, 后续实验中均采用 Pa-MN1 组制备磷酸钙纳米粒.

3.5 Pa-MN 的定性鉴别

为确定 mannan 被 Pa 成功取代, 与羟基磷灰石结合证明 Pa-MN 结构, Pa-MN 中的 PO_4^{3-} 与羟基磷灰石中的 Ca^{2+} 具有天然的亲和力, 而 mannan 中无 PO_4^{3-} , 与羟基磷灰石不结合或少量结合^[17](表 3). Mannan 本身与羟基磷灰石以非特异性的形式少量结合, 而修饰后的 mannan 由于带有了 PO_4^{3-} , 与羟基磷灰石的结合率大大增加, 且随着取代度的增加结合率也逐渐增大, 由此可知在 mannan 结构中成功地接入了磷酸根.

3.6 不同组分浓度对磷酸钙纳米载体性能的影响

3.6.1 MN1 溶液浓度

由表 4 可知, 随着 Pa-MN1 浓度的增加, 纳米粒平均粒径、Zeta 电位减小, 多分散性(PDI)增大, mannan 抑制了磷酸钙的团聚使粒径维持在纳米范围内. 方源豪等^[31]以 mPEG-壳聚糖为稳定剂制备磷酸钙复合纳米粒, 发现稳定剂过多或过低对纳米粒的形成有很大影响, 若加入过量聚合物, 其成胶性质使纳米粒稳定在较小粒径范围内. 但随着多糖浓度增加, 多

图 6 Mannan 结构完整性的鉴定(网络版彩图)

表 3 Pa-MN 与羟基磷灰石结合率

项目	Mannan	Pa-MN1	Pa-MN2	Pa-MN3
结合率	32.00%	81.61%	85.83%	91.80%

分散性却随之增大, 这可能是因为高浓度 mannan 间相互竞争, 反而不利于磷酸钙纳米粒的稳定, 使粒径分布不均匀. Pa-MN 浓度在 1~3 mg/mL 时, 形成的纳米粒粒度均匀, 浓度超过 3 mg/mL 时, 纳米粒分散性较差. 为保证纳米粒具有合适的浓度和良好的多分散性, 选择 3 mg/mL 的 Pa-MN1 进行后续实验.

3.6.2 硝酸钙浓度

由表 5 可知, 随着钙离子浓度的增加, 体系中阳离子浓度增加, Zeta 电位升高, 纳米粒粒径逐渐增大. 由于钙离子不断与 Pa-MN 中 PO_4^{3-} 及体系中游离 PO_4^{3-} 结合, 使得纳米粒粒径增加, 纳米粒多分散性良好, 18.75 mmol/L 的硝酸钙制备的纳米粒显示出最小的 PDI, 且纳米粒粒径适宜, 因此后续实验中选择 18.75 mmol/L 的硝酸钙浓度进行研究.

3.6.3 磷酸氢二铵浓度

磷酸钙纳米早已被广泛用作药物传递系统, 但制备后晶核不可控的快速增长导致了磷酸钙的沉积, 使得粒径增加^[32]. 由表 6 可知, 磷酸根离子的浓度对纳米粒的形成影响较大, 随着浓度的增加, 纳米粒粒径大幅度增加, PDI 较大, 说明该体系中纳米粒粒径分布极不均匀, 不利于纳米粒的稳定. 这可能是因为带负电荷的磷酸根离子增加, 在室温状态下磷酸根与钙离子沉积, 形成了易团聚的磷酸钙沉淀, 使得体

表 4 Pa-MN 浓度对纳米粒的影响^{a)}

Pa-MN1 浓度 (mg/mL)	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
1	120.8±2.0	0.186±0.025	-11.7±1.0
2	101.2±5.1	0.332±0.045	-13.0±1.0
3	60.4±5.1	0.361±0.058	-15.5±1.7
4	52.9±5.4	0.466±0.057	-15.5±1.8
5	43.1±7.8	0.551±0.071	-18.2±1.3

a) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液浓度 6.25 mmol/L, 磷酸氢二铵溶液浓度 3.74 mmol/L

表 5 钙离子浓度对纳米粒的影响

硝酸钙浓度 (mmol/L)	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
6.25	78.8±5.1	0.285±0.058	-21.2±1.7
12.50	95.8±4.8	0.228±0.029	-19.0±1.4
18.75	130.4±1.9	0.189±0.011	-14.9±0.7
25.00	151.7±6.3	0.240±0.018	-10.0±1.4
31.25	206.4±10.8	0.314±0.037	-5.2±0.7

系稳定状态被破坏, 因此控制磷酸根浓度在较小的范围内有利于形成稳定的纳米粒.

由以上实验可知, 当 Pa-MN1 浓度在 1~3 mg/mL, 钙离子浓度在 6.25~31.25 mmol/L, 磷酸根离子浓度在 3.74~7.48 mmol/L 时, 制得的纳米粒粒度均小于 200 nm, 分布均匀. 选择 3 mg/mL Pa-MN1、18.75 mmol/L 硝酸钙、3.74 mmol/L 磷酸氢二铵制备的纳米粒, 动态光散射(DLS)测得平均粒径为 130.4 ± 1.9 nm, 多分散性为 0.189 ± 0.011 , Zeta 电位为 -14.9 ± 0.7 mV (图 7(a)). SEM (图 7(b)) 和 TEM (图 7(c)) 观察结果与 DLS 结果吻合.

3.7 抗体滴度水平

Mannan 作为免疫刺激剂已有报道, mannan 以甘露糖为单元可靶向结合抗原呈递细胞表面甘露糖受体^[22,26]. 功能化的 CAP 纳米粒具有 mannan 特点, 可将纳米粒定向输送到抗原呈递细胞, 用受体介导的胞吞作用被抗原呈递细胞摄取, 提高佐剂的利用率^[33], 增强 OVA 的免疫刺激效果. 测定免疫 28 d 后小鼠血清中抗体滴度(IgG)水平, 结果如图 8 所示. Pa-MN CAP nanoparticles+free OVA 组的抗体水平平均高于其他组, 可见功能化的 CAP 纳米粒显示出了良

表 6 磷酸根离子浓度对纳米粒的影响

磷酸氢二铵浓度(mmol/L)	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
3.74	78.8 ± 5.1	0.285 ± 0.058	-21.2 ± 1.7
7.48	88.5 ± 14.8	0.308 ± 0.048	-21.8 ± 0.7
11.22	142.2 ± 16.6	0.353 ± 0.100	-24.4 ± 0.7
14.96	293.5 ± 18.4	0.340 ± 0.123	-27.3 ± 1.3
18.70	429.4 ± 20.4	0.425 ± 0.112	-27.2 ± 1.6

图 7 功能化磷酸钙纳米粒的 DLS (a)、SEM (b) 和 TEM 图(c)

图8 免疫28 d后小鼠血清中抗体滴度水平。*: $p < 0.05$, 相比于 free mannan+free OVA 组; **: $p < 0.01$, 相比于阳性对照组(OVA+aluminum)

好的佐剂效果, 增强 OVA 的免疫刺激能力。

4 结论

本文利用高碘酸钠氧化 mannan 得到氧化甘露聚糖, 经过席夫碱反应得到了带有 PO_3^{3-} 的 Pa-MN, 经过 ^1H NMR、元素分析等证明了 Pa-MN 的结构特征, 与 ConA 的结合实验说明合适的修饰度可保持 mannan 的活性。本文在最大限度保留甘露聚糖结构完整性的基础上, 以 Pa-MN 为稳定剂利用共沉淀法制备了功能化的 CAP 纳米粒子(130.4 ± 1.9 nm), 得到的纳米粒多分散性良好。该纳米粒以 Pa-MN 为基础, 具有 mannan 的免疫刺激功能, 同时纳米尺寸的粒子增强了细胞的吞噬, 在动物实验中, 实现了对模型抗原 OVA 的传递, 且显著增强了 OVA 的免疫刺激能力。

参考文献

- Cordeiro AS, Alonso MJ, De la fuente M. *Biotech Adv*, 2015, 33: 1279–1293
- 许利耕, 陈春英. 科学通报, 2012, 57: 2341–2353
- van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 74: 28–34
- Isabelle DP, Rodolphe C, Thi TL, Fatima D, Celine D, Didier B. *Biomaterials*, 2015, 50: 167–175
- Swaminathan G, Thoryk EA, Cox KS, Meschino S, Dubey SA, Vora KA, Celano R, Gindy M, Casimiro DR, Bett AJ. *Vaccine*, 2016, 34: 110–119
- 张茜, 朱艳红, 徐辉碧, 杨祥良. 化学进展, 2015, 27: 275–285
- Rosalía RA, Cruz LJ, van Duikerens S, Tromp AT, Silva AL, Jiskoot W, de Gruijl T, Löwik C, Oostendorp J, van der Burg SH, Ossendorp F. *Biomaterials*, 2015, 40: 88–97
- 钟铁诚, 柯学. 药学进展, 2011, 35: 409–416
- 刘红芝, 王强, 周素梅. 食品科学, 2008, 29: 465–468
- Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsper JPF, van Griensven LJLD. *Food Chem*, 2011, 129: 1667–1675
- Hotaling NA, Cummings RD, Ratner DM, Babensee JE. *Biomaterials*, 2014, 35: 5862–5874
- Li HS, Singh B, Park TE, Hong ZS, Kang SK, Cho CS, Choi YJ. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 80: 16–25
- Haddadi A, Hamdy S, Ghotbi Z, Samuel J, Lavasanifar A. *Nanotechnology*, 2014, 25: 355101
- Weinberger EE, Himly M, Myschik J, Hauser M, Altmann F, Isakovic A, Scheibhofer S, Thalhamer J, Weiss R. *J Control Release*, 2013, 165: 101–109
- Machová E, Bystrický P, Malovíková A, Bystrický S. *Carbohydr Polym*, 2014, 110: 219–223
- Mislovičová D, Masárová J, Švitel J, Mendichi R, Šoltés L, Gemeiner P, Danielsson B. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13: 136–142
- 蔡林, 余黎. 一种骨靶向载体和药物. 中国专利, 201110229725.4, 2012-01-25
- Zhan X, Jia L, Niu Y, Qi H, Chen X, Zhang Q, Zhang J, Wang Y, Dong L, Wang C. *Biomaterials*, 2014, 35: 10046–10057
- Karmakar P, Pujol CA, Damonte EB, Ghosh T, Ray B. *Carbohydr Polym*, 2010, 80: 513–520
- Đurana R, Lacík I, Paulovičová E, Bystrický S. *Carbohydr Polym*, 2006, 63: 72–81
- Zhang J, Liu X, Deng T, Yao P, Song H, Zhou S, Yan W. *J Nanomater*, 2015, 2015: 1–12
- Li WM, Su CW, Chen YW, Chen SY. *Acta Biomaterialia*, 2015, 15: 191–199
- Kovach I, Kosmella S, Prietzel C, Bagdahn C, Koetz J. *Colloid Surface B*, 2015, 132: 246–252
- 武承林, 贺欢, 高红军, 刘赣, 马如江, 安英丽, 史林启. 中国科学: 化学, 2010, 40: 269–275
- 夏凯, 孔华庭, 李晓霞, 孙艳红, 黄庆, 诸颖. 中国科学: 化学, 2015, 45: 671–678

- 26 杨辉, 王栋, 蔡日强. 精细化工, 2010, 27: 5–10
- 27 Silva JM, Zupancic E, Vandermeulen G, Oliveira VG, Salgado A, Videira M, Gaspar M, Graca L, Prat V, Florindo HF. *J Control Releas*, 2015, 198: 91–103
- 28 Fox EM, Torrero MN, Evans H, Mitre E. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135: 1341–1351
- 29 Li D, Kordalivand N, Fransen MF, Ossendorp F, Raemdonck K, Vermonden T, Hennink WE, van Nostrum CF. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 2993–3003
- 30 Sheng KC, Kalkanidis M, Pouniotis DS, Esparon S, Tang CK, Apostolopoulos V, Pietersz GA. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 424–436
- 31 方源豪, 王远明, 刘培峰, 段友容. 磷酸钙与 mPEG-壳聚糖复合纳米颗粒的制备. In: 上海市化学化工学会学术年会. 上海, 2012. 10–12
- 32 Zhang J, Sun X, Shao R, Liang W, Gao J, Chen J. *J Drug Deliv Sci Tech*, 2015, 30: 1–6
- 33 Ferreira SA, Oslakovic C, Cukalevski R, Frohm B, Dahlbck B, Linse S, Gama FM, Cedervall T. *BBA-Gen Subjects*, 2012, 1820: 1043–1051

Preparation of functional calcium phosphate nanoparticles for vaccine delivery

Qian Wang¹, Kang Wang¹, Huan Liang¹, Xinrong Liu¹, Guihua Wei¹, Weili Yan^{1*}, Shaobing Zhou^{2*}

¹ College of life Science and Engineering, Southwest Jiao Tong University, Chengdu 610031, China

² School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiao Tong University, Chengdu 610031, China

*Corresponding authors (email: yanweili@gmail.com; shaobingzhou@swjtu.edu.cn)

Abstract: In order to fabricate mannan functionalized nanoparticle for vaccine adjuvant delivery, we used sodium periodate to oxidize mannan, which contains adjacent structure of diol, to obtain the aldehyde modified mannan. Then the mannan-aldehyde reacted with pamidronate (Pa) to obtain Pa-modified mannan (Pa-MN). Next, the Pa-MN was used as stabilizer to prepare calcium phosphate (CAP) nanoparticles by coprecipitation method. And we also studied the adjuvant activity of nanoparticles using a model antigen ovalbumin (OVA). The ¹H NMR spectra and elemental analysis techniques demonstrated that mannan was successfully modified, and the concanavalin A (ConA) specific binding experiments showed that the Pa-MN with appropriate modification degree can maintain the integrity of mannan structure. The nanoparticles were further characterized by dynamic light scattering (DLS), SEM and TEM. The average particle size of the nanoparticles is 130.4±1.8 nm, and the dispersion was good. The *in vivo* immunization experiments indicated that the Pa-MN-CAP nanoparticles had superior adjuvant activity compared to free mannan and gold standard alum adjuvant. In conclusion, the Pa-MN-CAP nanoparticles have potential to be used as a potent adjuvant for boosting vaccine activity.

Keywords: mannan, calcium phosphate nanoparticles, vaccine adjuvant

doi: 10.1360/N032016-00016