

幽门螺杆菌微球疫苗非临床实验初步研究^{*}

王毅超, 邹全明, 毛旭虎, 郭刚, 解庆华

(第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室暨重庆市
生物制药工程技术研究中心, 重庆 400038)

[摘要] **目的:**通过考察幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)微球生物学行为,探讨其作为口服蛋白疫苗的可行性。**方法:**用可降解天然高分子材料壳聚糖和海藻酸钠制备 Hp全菌蛋白微球 (HpWCP-CAMS),通过 BCA方法测定微球中蛋白质的包裹效率及包裹量,测定微球在体外的药物释放度。并进行小鼠体内微球的靶向试验,微球的体内外毒性试验和淋巴细胞致敏试验。**结果:** HpWCP-CAMS中蛋白包裹量为 31.5%,蛋白包裹效率为 61.0%。微球中药物缓释周期可长达 20 d,靶向试验结果显示微球能在肠黏膜、PP结及脾脏富集并能有效诱导淋巴细胞致敏。体外毒性显示 125 μL 微球 ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)对 HeLa细胞生长无明显影响,体内实验结果显示其对小鼠生长也没有影响。**结论:** HpWCP-CAMS具有良好的靶向性和缓释特征,无细胞毒性,有望作为疫苗进一步研究。

[关键词] 微球疫苗;幽门螺杆菌;包封率;药物释放度;毒性试验

[中图分类号] R944.9; R915.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2007)07-0539-05

A preliminary non-clinical study of *Helicobacter pylori* microspheres vaccine

WANG Yi-chao, ZOU Quan-ming, MAO Xu-hu, GUO Gang, XIE Qing-hua

(Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, The Third Military Medical University, Chongqing Engineering Technology Research Center of Biopharmaceuticals, Chongqing 400038, China)

[Abstract] Objective: To study the feasibility of *Helicobacter pylori* (Hp) microsphere used as an oral vaccine. **Methods:** Used the biodegradable polymers chitosan and sodium alginate as carrier matrices, a Hp WCP-CAMS (whole cell protein-chitosan-alginate microsphere) was prepared by isoproject method. The entrapment rate and quantity of the protein loaded in the microspheres were measured by a BCA test. Other features including the dissolution rate *in vitro*, targeting delivery to tissues *in vivo*, toxicities and lymphocyte sensitization *in vitro* and *in vivo* of mice were determined. **Results:** The HpWCP-CAMS characterized an entrapment rate of the protein of 61.0%, the loading quantity of the protein of 31.5%, the sustained release rate of 20 days, and the targeting delivery toward intestinal mucosa, peyer's patch and spleen. No toxicity of HeLa cells *in vitro* and inhibition of the mice growth *in vivo* were found by the microspheres 125 μL ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). **Conclusion:** The *Helicobacter pylori* microspheres showed a targeted and sustained release and safety profile, which has the potential for further investigations to be used as the oral vaccine.

[Key words] microsphere vaccine; *Helicobacter pylori*; entrapment rate; drug release; toxicity

随着蛋白组学研究的逐步深入,蛋白质结构与功能的关系逐渐被破解,近年来越来越多的蛋白质药物在诊断、治疗或作为疫苗预防各种疾病方面发挥着重要作用^[1-3]。与小分子药物相比,蛋白质药物稳定性差、易被酶降解、生物半衰期短,而扩散差、

分配系数小的不足又使其难以通过生物屏障及脂质膜。所以,如何将蛋白质药物有效地运送到人体相应部位,一直是制剂研究的热点问题。近来以可降解天然高分子材料为载体的缓释微球制剂在蛋白质类药物的给药途径中受到关注,尤其是在口服给药

*基金项目:国家“十五”863课题(2001AA215161, 2003AA215020)

途径中其以保护抗原、靶向性、长效缓释等诸多作用而备受关注^[4-6]。

本研究采用可降解天然高分子材料壳聚糖、海藻酸钠为主要原料制备幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)缓释微球疫苗。体外实验表明,所制备 Hp 全菌蛋白微球 (Hp whole cell protein-chitosan-alginate microsphere, HpWCP-CAMS)具有较好的包裹量及蛋白包裹效率,微球缓释特性明显,不具有细胞毒性;小鼠体内实验表明其具有明显的肠黏膜派伊尔氏结 (peyer's patch, PP结)靶向性,并能有效诱导淋巴细胞致敏。

材料与方法

主要试剂与仪器

壳聚糖 (浙江温州化学试剂厂);海藻酸钠 (浙江温州化学试剂厂);脑心浸液培养基 (本室制备);³H标记牛血清白蛋白 (³H-BSA,西南医院核医学科提供);RPM 11640 (Sigma公司);BCA蛋白浓度检测试剂盒 (碧云天试剂公司 20031215);高速乳化制作器 T25B (美国 Beckman公司);CO₂培养箱 (HARRIS, USA);细胞筛 (华美公司);放射免疫计数器 (中国科学技术大学 GC-911型);TA型库尔特计数器 (英国库尔特公司);人工胃液:取稀盐酸 16.4 mL,加水约 800 mL与蛋白酶 10 g,摇匀后加水稀释为 1 000 mL。

抗原的制备

Hp菌株采用澳大利亚悉尼株 (Sydney strain, SS1),为鼠高感染适应株,由澳大利亚 Lee教授馈赠并由本室保存。微需氧条件常规方法液体培养 SS1菌株,种子菌接种量为 1×10^6 CFU·mL⁻¹,接近 28 h 到达摇瓶液体培养峰值,浓度约为 10^8 CFU·mL⁻¹,3 000 r·min⁻¹离心 10 min收集细菌,pH 7.4的磷酸盐缓冲液 (PBS)洗涤 3次后重悬,10%甲醛溶液灭活 12 h后洗涤,3 000 r·min⁻¹离心 10 min收集细菌。超声裂解菌体后 12 000 ×g离心 30 min,分离上清得到 Hp全菌抗原 (Hp whole cell protein, HpWCP)。

微球疫苗的制备

选择 20 g·L⁻¹作为海藻酸钠的工作浓度,植物油与海藻酸钠乳液的体积比例为 2:8,壳聚糖的浓度为 10 g·L⁻¹,调整蛋白浓度为 2 mg·mL⁻¹,在搅拌速率 800 r·min⁻¹、制备温度 25℃和搅拌时间 30 min的参数条件下制备出粒径约 3.33 μm的 HpWCP-

CAMS。

实验动物

Balb/c小鼠:6~8周龄,体重 18~22 g,由四川大学实验动物中心提供,动物质量合格证号:医动字第 24101110号。

微球中蛋白包裹效率和包裹量测定

称取低温干燥的 HpWCP-CAMS 3份,各 20 mg,将其置于小烧杯中,加入 pH值 7.4的 PBS 50 mL,冰浴中超声破碎,待镜检微球破碎完全时,离心取上清,BCA方法测定上清中蛋白浓度,并由以下公式计算出蛋白包裹量及包裹效率:BSA包裹量/% = 微球中蛋白含量/微球总质量 × 100;BSA包裹效率/% = 微球中蛋白含量/制备微球时加入蛋白的总量 × 100。

体外释放度检测

参照《中华人民共和国药典》(2000年版)规定的溶出度测定法第三法^[7],精密称取 HpWCP-CAMS (含 HpWCP蛋白约 20 mg)置于透析袋中两端扎紧后放入盛有 200 mL pH值 7.4的 PBS的溶出杯中,在 50 r·min⁻¹搅拌速度和 (37 ± 0.5)℃介质温度下进行微球的释放度测定。在 1, 2, 5, 12 h和 1, 2, 5, 10, 13, 15, 18和 20 d各取样 0.5 mL,测定蛋白累积释放量,绘制 HpWCP-CAMS的释药时间曲线。

微球体内靶向实验

用³H-BSA替代 HpWCP制备³H-BSA-CAMS进行小鼠体内靶向试验。60只 Balb/c小鼠被随机分为 3组:PBS组、³H-BSA对照和³H-BSA-CAMS给药组。为减少因胃酸分泌对实验用蛋白的破坏,小鼠在实验前 12 h禁食禁水,给药组灌喂 0.2 mL³H-BSA-CAMS(用 pH值 7.4的 PBS稀释,放射总量 20 μCi),PBS组灌喂 0.2 mL的 PBS,³H-BSA对照组灌胃 0.2 mL³H-BSA(用 pH值 7.4的 PBS稀释,放射总量 20 μCi)。灌胃后 1 h, 8和 15 d每组分别取 6只小鼠,取外周血 200 μL、胃黏膜、小肠、PP结和脏脾等标本,小肠取其回肠中段约 3 cm,其他取全器官,用放射免疫计数器检测其 CPM值,计算单位重量 CPM值 (CPM·g⁻¹)。

8 HpWCP-CAMS毒性试验

8.1 体外毒性试验^[8]

采用 MTT比色法测定 HpWCP-CAMS对 HeLa细胞的毒性。将 HeLa细胞株接种至培养板中,每孔体积 200 μL (2×10^5 个·mL⁻¹)。培养 18 h后,吸出培养液,加入无血清 RPMI-1640培养液 200 μL。将

HpWCP-CAMS用无血清培养基稀释为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,分别取 25, 50, 75, 100和 125 μL 加入上述培养孔中,作用不同时间(6, 12, 24, 48, 72 h)后,倾出上述培养液,洗涤换新鲜含血清培养基。继续培养 48 h,每孔加入 MTT溶液 ($3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 20 μL 孵育 4 h,终止培养,吸弃培养上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,选择 570 nm 波长测定各孔吸收度值(A),计算细胞存活率 [$A(\text{样品})/A(\text{对照}) \times 100\%$]。所得数据用 pEMS 3.0 统计软件包进行统计分析。

8.2 体内毒性试验

参照《中国生物制品规程》相关规定进行^[9]。

8.2.1 急性毒性试验 选用体重 17~20 g Balb/c 小鼠 40 只,雌雄各半,随机分为 4 组,分别灌喂 HpWCP-CAMS 75, 60, 48, 38.4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按 HpWCP 计),灌喂体积为 25 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,观察 1 周内动物中毒症状及死亡情况。

8.2.2 异常毒性试验 取 5 只体重 17~20 g 的 Balb/c 小鼠,每只腹腔注射 0.5 mL HpWCP-CAMS (含 HpWCP-CAMS 为 480 μg),7 d 后观察小鼠生存情况、有无异常反应及体重增加与否。

9 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测淋巴细胞增殖反应

每只小鼠灌胃给予 HpWCP-CAMS 480 μg (含 HpWCP 约 150 μg) 进行免疫,共免疫 4 次,免疫周期为 0, 1, 2 和 4 周。在免疫开始后的第 0, 2, 4, 8 周取小鼠外周血分离单个核细胞,调整浓度至 1.0×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,于 96 孔板中各加培养基 20 μL , $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HpWCP-CAMS 或生理氯化钠溶液 20 μL , 各加 4 孔。然后向各孔加入上述细胞悬液 100 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内培养 3 d,每孔加入 20 μL $^3\text{H-TdR}$ 继续培养 4 h,细胞收集器收集细胞,洗去游离的 $^3\text{H-TdR}$,

滴加 5% 三氯醋酸固定细胞,闪烁仪自动检测样品放射值,计算刺激指数 (SI, 给药组平均 CPM 值 / 对照组 CPM 值)。

结 果

1 HpWCP-CAMS 中蛋白包裹量和包裹效率

3 批 HpWCP-CAMS 中蛋白的包裹量分别为 30.2%, 32.7% 和 31.6%, 平均为 31.5%; 包裹效率分别为 61.2%, 59.6% 和 62.2%, 平均为 61.0%。

体外释放度检测

HpWCP-CAMS 体外具有明显的缓释效果,其缓释周期可长达 20 d,见图 1。

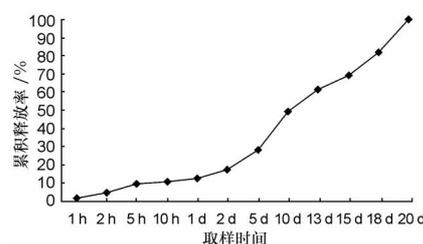


图 1 HpWCP-CAMS 体外释药曲线

3 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 体内靶向实验

与 PBS 组比较, $^3\text{H-BSA}$ 组在给药 1 h 后血液、胃、肠、脾脏中单位重量的 CPM 值 ($\text{CPM} \cdot \text{g}^{-1}$) 显著增加 ($P < 0.01$), 而 PP 结无显著变化 ($P > 0.05$), 但在给药 8 d 和 15 d 后各脏器的 CPM 值均无统计学差异 ($P > 0.05$)。 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 组在给药 1 h 后胃、肠单位重量的 CPM 值显著大于 PBS 组 ($P < 0.01$), 血液、PP 结及脾脏差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 组在 1 h 后血液、脾脏单位重量的 CPM 值显著低于 $^3\text{H-BSA}$ 组 ($P < 0.01$), 8 和 15 d 后 PP 结与脾脏的单位重量的 CPM 值较 PBS 组和 $^3\text{H-BSA}$ 组均显著增加 ($P < 0.01$)。结果见表 1 和图 2。

表 1 Balb/c 小鼠灌胃 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 后不同时间点单位重量脏器的 CPM 值比较 $\bar{x} \pm s, \text{CPM} \cdot \text{g}^{-1}, n = 6$

组别	时间	血液	胃	肠	PP 结	脾脏
PBS	1 h	1 560 \pm 215	2 310 \pm 169	2 010 \pm 198	1 654 \pm 125	2 311 \pm 156
	8 d	2 510 \pm 254	1 045 \pm 215	2 351 \pm 321	1 966 \pm 203	2 417 \pm 147
	15 d	2 105 \pm 365	1 857 \pm 326	2 130 \pm 256	1 698 \pm 214	2 154 \pm 156
$^3\text{H-BSA}$	1 h	235 486 \pm 3 013 ^a	185 436 \pm 1 029 ^a	98 745 \pm 1 365 ^a	2 154 \pm 126	154 692 \pm 1 635 ^a
	8 d	2 564 \pm 125	2 147 \pm 265	1 548 \pm 136	2 365 \pm 165	1 548 \pm 104
	15 d	2 541 \pm 126	1 658 \pm 165	1 025 \pm 145	2 354 \pm 236	1 632 \pm 186
$^3\text{H-BSA-CAMS}$	1 h	2 568 \pm 236 ^b	102 543 \pm 1 026 ^a	102 589 \pm 1 114 ^a	3 427 \pm 238	3 652 \pm 226 ^b
	8 d	3 532 \pm 254	2 546 \pm 204	3 215 \pm 256	102 546 \pm 1 089 ^{ab}	98 547 \pm 989 ^{ab}
	15 d	3 325 \pm 268	2 365 \pm 224	2 654 \pm 289	53 547 \pm 569 ^{ab}	62 654 \pm 566 ^{ab}

与 PBS 组比较, a: $P < 0.01$; 与 $^3\text{H-BSA}$ 组比较, b: $P < 0.01$

4 HpWCP-CAMS 的毒性试验

4.1 体外毒性试验

HpWCP-CAMS 最大加入体积为 125 μL , 最长作用时间 72 h 后 HeLa 细胞存活仍不受影响, 结果见表 2。

表 2 HpWCP-CAMS不同剂量、不同时间作用后 HeLa细胞的存活率

 $\bar{x} \pm s, n=5$

加入体积 / μL	细胞存活率 /%				
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
25	101.2 \pm 3.0	105.1 \pm 2.0	99.6 \pm 4.1	100.2 \pm 2.7	102.5 \pm 2.4
50	99.6 \pm 3.2	102.1 \pm 3.6	102.3 \pm 2.6	99.6 \pm 3.6	101.1 \pm 2.1
75	102.3 \pm 3.2	99.6 \pm 3.2	101.2 \pm 2.1	99.6 \pm 3.7	100.2 \pm 2.6
100	101.2 \pm 4.0	100.2 \pm 2.6	99.8 \pm 3.7	100.2 \pm 2.4	99.8 \pm 3.3
125	100.5 \pm 1.5	100.2 \pm 2.3	99.9 \pm 3.9	100.9 \pm 2.6	101.3 \pm 2.0

采用 SNK-q 检验 (Student-Newman-Keuls法), 分别对均数间进行两两比较, 其分析结果显示: 在上述各处理条件下, 细胞的存活率均在 99% 以上, 各处理组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。该结果表明, 所制备的 HpWCP-CAMS 在浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 加入量为 $125 \mu\text{L}$, 作用时间 72 h 条件下对 HeLa 细胞仍无毒性。

体内毒性试验

4.2.1 急性毒性试验 HpWCP-CAMS 经口灌胃 Balb/c 小鼠后, 1 周内动物均无中毒症状及死亡情况发生。结果见表 3。

表 3 HpWCP-CAMS 急性毒性试验 $n=10$

剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	生存情况	异常反应	实验前体重 /g	实验后体重 /g
75	健存	无	17.9 \pm 0.2	18.2 \pm 0.2
60	健存	无	18.4 \pm 0.2	18.6 \pm 0.2
48	健存	无	18.3 \pm 0.1	18.9 \pm 0.1
38.4	健存	无	18.6 \pm 0.1	18.7 \pm 0.2

4.2.2 异常毒性试验 小鼠每只腹腔注射 0.5 mL HpWCP-CAMS, 7 d 后观察小鼠生存状况良好, 并无异常反应, 体重较实验前有所增加。结果见表 4。

表 4 HpWCP-CAMS 异常毒性试验

鼠号	生存情况	异常反应	实验前体重 /g	实验后体重 /g
	健存	无	18.2	18.9
	健存	无	18.9	19.3
	健存	无	19.2	20.2
	健存	无	18.5	19.4
	健存	无	19.3	19.9

5 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测淋巴细胞增殖实验

在第 2, 4, 8 周, 试验组的 CPM 值均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 但是 2, 4, 8 周之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明给药后 2 周淋巴细胞已经致敏, 至第 8 周时淋巴细胞仍具有较明显的致敏性。结果见表 5。

表 5 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测淋巴细胞增殖反应实验结果 $\bar{x} \pm s, n=4$

	0周	2周	4周	8周
对照组 CPM 值	451 \pm 10	496 \pm 12	511 \pm 122	529 \pm 122
实验组 CPM 值	524 \pm 122	1 865 \pm 40 ^a	2 097 \pm 45 ^a	2 008 \pm 42 ^a
SI	1.16 \pm 0.03	3.76 \pm 0.12	4.10 \pm 0.16	3.80 \pm 0.15

与对照组比较, a: $P < 0.01$

讨 论

在体内靶向实验研究中, $^3\text{H-BSA}$ 组给药 1 h 后

在血液、脾脏、胃及肠部单位重量的 CPM 值较高, 可能因为 ^3H 在口服后 1 h 一部分仍在胃肠消化道中残存, 另有一部分被有效吸收入血并随循环转运脾脏, 而 PP 结中的读数较低, 说明 PP 结不能对其有效摄取; 而 8 及 15 d 以上组织或器官中的读数均比较低说明此时 ^3H 已被机体清除。与之相对应, 验证 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 在体内靶向性时发现, 由于 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 在消化内的残存以及经 M 细胞摄取后还需要一段时间的运输过程, 所以 1 h 时主要表现胃肠道中单位重量的 CPM 值较高, 而在 PP 结未有明显变化; 8 d 时胃肠道中的 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 已被清除干净, 而此时 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 已被有效转运到 PP 结及脾脏, 故造成以上两部位的 CPM 升高; 15 d 时 PP 结及脾脏的 CPM 仍然偏高可能由于 $^3\text{H-BSA-CAMS}$ 还未完全降解所致。微球体内靶向实验中, 不同时间点血液中的 CPM 读数一直未有明显变化, 说明微球不能被吸收入血。应用荧光标记微球进行体内定位实验中发现, 12 h 后肠黏膜吞噬细胞内含有大量的微球, 说明此时经 M 细胞摄取的微球已经被转运至肠黏膜下结缔组织并被巨噬细胞所摄取, 为后期向局部淋巴结组织做准备。以上实验证明所制备微球具有明显的肠黏膜靶向性, 与预期实验结果及文献报道相同。

微球具有对特定器官、组织的靶向性, 药物在靶区浓集并缓慢释放, 维持较长时间的有效浓度是靶向给药的目的, 药物的控释是靶向给药的基础, 受到药物的理化性质、载体及骨架类型、药物在微球中的位置及分布、药物与骨架的相互作用、骨架的空隙度及孔道的弯曲度、所载药物在释放介质中的溶解度、药物在微球中所处的物理状态、药物与微球的亲和力等多因素的影响^[10, 11]。本研究通过系统筛选微球制备材料的配比, 制备出释药时间可达到 20 d 左右的微球, 说明所制备微球具有很好的缓释功能。无毒性及稳定性是对药物制剂的基本要求, 本部分实验中根据相关法规对上述 2 项指标进行检测, 发现冻干品在冻干前后对其所包裹的 HpWCP 的稳定性及抗原活性均没有明显影响, 说明微球具有很好的稳定性。毒性试验中, 无论是体外试验还是体内

试验,受试细胞或动物均未出现明显的中毒症状,其各项检测指标均符合相关法规要求,说明此微球产品符合相关规定要求。

在致敏淋巴细胞增殖实验中,小鼠灌胃 HpWCP-CAMS后 2周外周血淋巴细胞就已经对抗原物质致敏并具备了很好的增殖活性,说明此时微球已在 PP结、脾脏等相关淋巴组织释放抗原物质并激发免疫细胞产生相应的应答,而 4及 8周时淋巴细胞仍具有明显的致敏性,可能原因是因为微球的缓释作用使抗原物质缓慢释放的结果,另外可能还与淋巴细胞的记忆功能有关。

[作者简介] 王毅超(1973-),男,讲师,博士,主要从事幽门螺杆菌疫苗方面的研究。联系电话:(023)68752300,13608306861,E-mail:wycqh@mail.tmmu.com.cn

[参 考 文 献]

- [1] EVANS JT, WARD JR, KBM J, *et al* A single vaccination with protein microspheres elicits a strong CD8 T-cell-mediated immune response against *Mycobacterium tuberculosis* antigen Mtb8.4[J]. *Vaccine*, 2004, 22(15/16): 1964 - 1972.
- [2] FELDER CHB, BLANCO MJ, HELMANN J, *et al* Ultrasonic atomization and subsequent polymer desolvation for peptide and protein microencapsulation into biodegradable polyesters[J]. *J Microencapsul*, 2003, 20(5): 553 - 567.
- [3] MIHL, SHYU SS, LIN YM, *et al* Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: a new delivery system for

protein[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(27): 5023 - 5036

- [4] JIANG W, SCHWENDEMAN SP. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends[J]. *Pharm Res*, 2001, 18(6): 878 - 885.
- [5] YANG CY, TSAI SY, TSIANG RC, *et al* Encapsulating aspirin into a surfactant-free ethyl cellulose microsphere using non-toxic solvents by emulsion solvent-evaporation technique[J]. *J Microencapsul*, 2001, 18(2): 223 - 236.
- [6] LIX, BENJAN N IS, NAFAL N R, *et al* Location and function of intrahepatic shunts in anaesthetised rats[J]. *Gut*, 2003, 52(9): 1339 - 1346.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2000年版. 第二部. 北京:化学工业出版社,2000:附录 75.
- [8] CAMPOUS AM, DIEBOLD Y, CARVALBO EL, *et al* Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: *in vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(5): 803 - 810.
- [9] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程[S]. 2000年版. 北京:化学工业出版社,2000:40.
- [10] DEROSA G, QUAGLIA F, BOCHOT A, *et al* Long-term release and improved intracellular penetration of oligonucleotide-polyethylenimine complexes entrapped in biodegradable microspheres[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(3): 529 - 536.
- [11] ENDLA AO, HAMMER DA. Artificial polymeric cells for targeted drug delivery[J]. *J Controlled Release*, 2003, 87(1/3): 15 - 22.

编辑:朱振家 接受日期:2006-08-17

N-正辛基-N-琥珀酰基壳聚糖胶束的制备及特征研究*

李玲¹,许向阳^{1,2},周建平¹

(1 中国药科大学药剂学教研室,南京 210009; 2 江苏先声药物研究有限公司,南京 210042)

[摘要] 目的:制备两亲性的 N-正辛基-N-琥珀酰基壳聚糖(OSC)胶束,并研究其制剂学特征。方法:采用超声方法制备 OSC胶束,并考察 OSC的胶束化行为、胶束的形态、粒径及 电位。结果:OSC胶束具有较低的临界胶束浓度,胶束粒子呈较规则的球形,粒径为 200~250 nm, 电位在 -40.0~-30.0 mV,且疏水链段取代度增加,粒径变大,临界胶束浓度降低。结论:OSC胶束具有较好的物理稳定性。

[关键词] N-正辛基-N-琥珀酰基壳聚糖;临界胶束浓度;粒径;胶束

[中图分类号] R943.42 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2007)07-0543-05

Preparation and characterization of N-octyl-N-succinyl chitosan micelles

LILING¹, XU Xiang-yang^{1,2}, ZHOU Jian-ping¹

(1 Department of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2 Jiangsu Sincere Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210042, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare N-octyl-N-succinyl chitosan micelles **Methods:** N-octyl-N-

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472105)