

PRRS 聚乳酸乙醇酸微粒 DNA 疫苗的制备及其免疫原性

张 辉*, 王光利, 韩秀英, 周 磊
(淮北师范大学 生命科学学院, 淮北 235000)

摘 要: 为增强 DNA 疫苗的免疫效果, 采用溶剂挥发法制备聚乳酸乙醇酸[poly(lactide-co-glycolide)(PLGA)]微粒, 将猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)DNA 疫苗 pCI-ORF5 吸附到该微粒表面, 检测 PLGA 微粒对 DNA 的吸附量、体外释放情况以及在小鼠体内的免疫原性。结果表明在 6 h 内 PLGA 微粒的 DNA 吸附量可达到 0.9%, 在体外的释放情况受到 CTAB 含量、PLGA 分子量、PLGA 浓度和内水相体积等诸多因素的影响。与裸 DNA 疫苗同时免疫小鼠后, 发现 PLGA 微粒可显著增强所吸附 DNA 疫苗诱导的体液免疫和细胞免疫, 显示其作为载体递送 DNA 疫苗方面具有较好的应用前景。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征; DNA 疫苗; 聚乳酸乙醇酸; DNA 递送

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)07-1117-07

Preparation and Immunogenicity of Ploy (Lactide-Co-Glycolide) Microparticles DNA Vaccine against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

ZHANG Hui*, WANG Guang-li, HAN Xiu-ying, ZHOU Lei
(School of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China)

Abstract: To enhance immune response induced by DNA vaccines, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) DNA vaccines pCI-ORF5 was adsorbed on the surface of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles. The microparticles were prepared using a solvent evaporation method and the adsorption amount, *in vitro* release profiles and *in vivo* immunogenicity were evaluated. The results indicated that the DNA adsorbed on PLGA microparticles was about 0.9% in 6 hours, and the release behaviors were influenced by some parameters such as CTAB content, PLGA molecular weight, PLGA concentration, internal aqueous phase volume. The PLGA microparticles with adsorbed DNA induced significantly enhanced humoral and cellular response in comparison to naked DNA in mice. It suggests that PLGA microparticles could be a promising vector for the delivery of DNA vaccines.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; DNA vaccine; poly(lactide-co-glycolide); DNA delivery

DNA 疫苗已在动物疾病预防中使用多年, 具有制备周期短、针对性强、安全性高、可同时诱导机体产生细胞免疫和体液免疫的优势。但与其它疫苗相

比, 其免疫效果相对较差, 且需要多次、大剂量的注射, 极大地限制了 DNA 疫苗的广泛应用^[1-2]。猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是严重危害养猪业且极难

收稿日期: 2013-01-31

基金项目: 安徽省自然科学基金(KJ2010B192; KJ2011B149); 安徽省优秀青年人才基金(2010SQRL082)

作者简介: 张 辉(1980-), 男, 安徽淮北人, 副教授, 博士, 主要从事动物病毒学研究

* 通信作者: 张 辉, E-mail: guzhang503@sina.cn

有效防治的重要传染病之一。目前研究表明, *ORF5* 是猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 主要的保护性抗原基因, 其中 *ORF5* 编码的 GP5 囊膜糖蛋白是诱导中和抗体和细胞免疫重要的靶蛋白, 但基于 *ORF5* 构建的 PRRS DNA 疫苗往往存在免疫效价低和保护性不高等问题。为提高 PRRS DNA 疫苗的免疫效果, 首先可以通过修饰载体以增强目标抗原的表达量; 其次, 将 DNA 疫苗与佐剂联合使用; 第三, 可以改变 DNA 疫苗的递送方式。采用在生物体内可降解的高分子聚合物作为载体递送 DNA 疫苗, 这不仅有助于提高 DNA 疫苗的免疫效价, 还能大大减少 DNA 疫苗的接种量和接种次数, 为 DNA 疫苗的使用提供新的思路^[3]。

聚乳酸-乙醇酸 (PLGA) 是一种生物可降解的高分子聚合物, 具有良好的生物相容性, 被广泛应用于制药, 特别是作为大分子药物递送载体方面^[4-5]。由 PLGA 制备的表面带正电荷 PLGA/CTAB 微粒可以有效地吸附并保护 DNA, 通过缓慢释放能够提高所吸附 DNA 疫苗在体内的半衰期和免疫效果^[6]。目前在人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和口蹄疫病毒 (FMDV) 的研究中已证实, PLGA/CTAB 微粒可显著增强 DNA 疫苗所诱导的免疫应答^[7-8]。本研究首先采用溶媒挥发法制备表面带正电荷的 PLGA/CTAB 微粒, 再将 DNA 疫苗吸附到其表面, 然后检测所制备 PLGA/CTAB-DNA 微粒对 DNA 的吸附量和体外释放情况, 免疫小鼠后检测 PLGA/CTAB 微粒对 PRRS DNA 疫苗的免疫增强效果, 这将为开发新型的 DNA 疫苗递送系统提供重要的依据。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞、菌株和质粒

PRRSV YA1 毒株和 PRRSV *ORF5* 基因重组真核表达质粒 pCI-ORF5 由华中农业大学动物病毒室提供。大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)、绿猴肾细胞 (Marc-145) 由本实验室保存。PRRSV GP5 蛋白的原核表达重组质粒 pKG-GP5 由本实验室构建。

1.2 主要试剂

3 种分子量分别为 20、60、100 ku 的聚乳酸-乙醇酸 (PLGA, 乳酸与乙醇酸聚合比例为 50 : 50) 购于济南岱罡生物科技有限公司; 二氯甲烷、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 购自上海国药集团化学试剂

有限公司; DMEM、RPMI1640、小牛血清均为 Invitrogen 公司产品。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗为武汉爱博泰克生物科技有限公司产品。

1.3 PLGA/CTAB 微粒的制备

称取 0.5 g 分子量为 60 ku 的 PLGA 装于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 二氯甲烷轻轻振荡, 使 PLGA 完全溶解, 然后向离心管中加入 1 mL PBS (pH7.4), 超速匀浆机混匀 3 min, 形成油/水的微球。再逐滴加入 50 mL 0.5% CTAB 水溶液, 再次用超速匀浆机混匀 5 min, 形成水/油/水的微球。最后将混合物置于敞口的 100 mL 三角瓶中, 室温下于磁力搅拌器上搅拌过夜, 完全去除二氯甲烷。将三角瓶中的混合溶液转移至 50 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 无菌 ddH₂O 洗涤沉淀 2 次, 于冷冻干燥机中冻干 48 h 至粉末状, 即为表面带正电荷的 PLGA/CTAB 微粒。

1.4 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的吸附

称取 10 mg PLGA/CTAB 微粒装于 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL PRRSV DNA 疫苗 pCI-CRF5 (浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 置于水平摇床上 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻微振荡 6 h, 使 DNA 吸附到 PLGA/CTAB 微粒表面。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸去上清, 500 μL TE 洗涤一次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸尽上清, 置于冷冻干燥机中冻干 36 h 至粉末状, 即为 PLGA/CTAB-DNA 微粒。

1.5 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 吸附量的检测

将 PLGA/CTAB-DNA 微粒置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 0.2 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 充分混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 h, 使 PLGA 降解, 释放出所吸附的 DNA, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后收集上清, 通过分光光度计测定上清中 DNA 含量, 计算 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的吸附量 (吸附量 = 被吸附 DNA 质量 / PLGA 微粒质量 $\times 100\%$)。

1.6 PLGA/CTAB-DNA 微粒在体外对 DNA 缓释的检测

将 PLGA/CTAB-DNA 微粒置于 1.5 mL 离心管中, 向离心管中加入 1 mL PBS 缓冲液, 用封口膜封住, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中, 每隔 1 d 离心后取出上清, 通过分光光度计检测所释放的 DNA 量, 绘制 PLGA/CTAB-DNA 微粒对 DNA 的缓释曲线, 沉淀重新用 1 mL PBS 缓冲液重悬, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中直至 30 d。

1.7 小鼠免疫

将 5~6 周龄 BALB/c(购自湖北省医学科学院实验动物中心)随机分成 6 组,每组 8 只,其中 A 组接种 PLGA, B、D 组分别接种 PRRSV 裸 DNA 疫苗 pCI-ORF5, C、E 组分别接种 PLGA/CTAB-pCI-ORF5 微粒; B、C 两组接种 DNA 量为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$, D、E 两组接种 DNA 量为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$, 采取后腿肌肉注射, 共免疫 2 次, 每次间隔 2 周, 分别在首次免疫后 2、4、6、8 周采血分离血清。

1.8 PRRSV GP5 蛋白 ELISA 抗体检测

将 PRRSV GP5 蛋白的原核表达重组质粒 pKG-GP5 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 通过 IPTG 诱导表达, 提取、纯化 GP5 蛋白作为包被抗原, 检测首免后 2、4、6、8 周血清中抗 GP5 蛋白的 ELISA 抗体水平, 所使用二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 工作浓度为 1:5 000。

1.9 中和抗体检测

将首免后 8 周分离的血清于 56°C 灭活后, 在 96 孔细胞培养板中将血清作连续倍比稀释, 从 1:2 至 1:256, 每孔 $50 \mu\text{L}$; 用 DMEM 将 PRRSV 稀释为 100TCID_{50} , 加入培养板中, 每孔 $50 \mu\text{L}$, 37°C , 5% CO_2 培养箱中作用 1 h, 再滴加 Marc-145 细胞悬液 $100 \mu\text{L}(2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1})$, 培养箱中培养 4~6 d, 逐日观察并记录细胞病变情况, 按 Reed-Muench 两氏法计算待检血清抗 PRRSV 特异性中和抗体的滴度。

1.10 淋巴细胞增殖检测

于首免后 8 周无菌取出小鼠脾脏制成脾淋巴细胞悬液, 用含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基(完全 1640 培养基)调整细胞浓度为 $4 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液加于 96 孔板中, 再加入 $20 \mu\text{L}$ 完全 1640 培养基(空白对照)或纯化的经紫外线照射灭活的 PRRSV 作刺激原, 各 4 个重复, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱培养 72 h。然后每孔加入 $20 \mu\text{L}$ 四氮唑(MTS), 混匀后继续培养 4~6 h, 用酶标仪测定 $\text{OD}_{492 \text{nm}}$ 值, 以刺激指数 ($\text{SI} = \text{试验孔 } \text{OD}_{492 \text{nm}} \text{ 均值} / \text{对照孔 } \text{OD}_{492 \text{nm}} \text{ 均值}$) 判断淋巴细胞增殖滴度。

1.11 数据分析

各免疫组小鼠产生的抗体水平和细胞免疫水平的差异均采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 吸附时间对 PLGA/CTAB 微粒吸附 DNA 的影响

将 6 份 $110 \mu\text{g}$ 质粒 DNA pCI-ORF5 分别与 10mg PLGA/CTAB 微粒混合, 于吸附后 0、1、2、4、6、8 h 分别检测 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的吸附量。结果显示, PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的吸附快速、有效, 在 1 h 内吸附量可达到 0.5%, 随后吸附速度逐渐变缓, 吸附后 6 h 达到最大, 约 0.9% (图 1)。

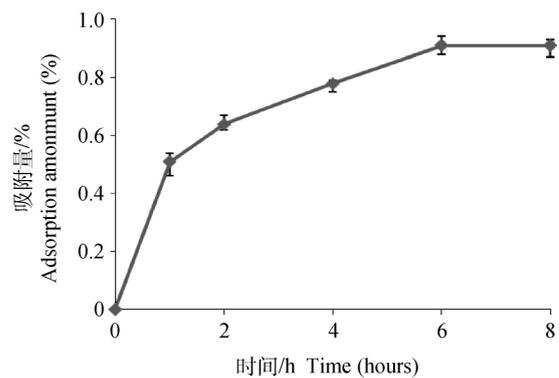


图 1 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的吸附量随吸附时间的变化

Fig. 1 Adsorption amount of PLGA/CTAB microparticles with increasing time

2.2 CTAB 含量对 PLGA/CTAB 微粒吸附 DNA 的影响

为获得 CTAB 含量不同的 PLGA/CTAB 微粒, 磁力搅拌器搅拌过夜后用无菌 ddH_2O 分别洗涤沉淀 1、2、3、4 次来制备 PLGA/CTAB 微粒^[9], 与质粒 DNA pCI-ORF5 吸附后分别检测其对 DNA 的吸附量和缓释情况。结果发现随着洗涤次数的增加, CTAB 含量的逐渐减少, 洗涤 1 次、2 次的 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 吸附量相差不大, 均在 0.9% 左右; 而洗涤 3 次、4 次的 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的吸附量明显降低(表 1)。通过高效液相色谱(HPLC)检测洗涤不同次数制备的 PLGA/CTAB 微粒, 证实随着洗涤次数的增加, PLGA/CTAB 微粒中 CTAB 的含量逐渐减少, 说明 PLGA/CTAB 微粒中的 CTAB 含量对 DNA 的吸附有较大影响。

表 1 CTAB 含量对 PLGA/CTAB 微粒 DNA 吸附的影响
Table 1 Effect of CTAB content on DNA adsorption of PLGA/CTAB microparticles %

| 洗涤次数 Washing times | CTAB 含量 CTAB content | DNA 吸附量 Amount of absorbed DNA |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 1.30 | 0.92 |
| 2 | 0.83 | 0.88 |
| 3 | 0.51 | 0.71 |
| 4 | 0.24 | 0.48 |

数值为 2 次试验的平均值

Values represent a mean of two measurements

2.3 CTAB 含量对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

将 CTAB 含量不同的 PLGA/CTAB 微粒与质粒 DNA pCI-ORF5 吸附后冻干,加入 PBS,于 37 °C 每隔 1 d 检测所释放的 DNA 量。由图 2 可以看出,虽然 4 种 PLGA/CTAB-DNA 微粒的 CTAB 含量不同,但均存在 1 周左右的 DNA 爆发性释放,随着洗涤次数的增加,CTAB 含量越低,PLGA/CTAB-DNA 微粒的 DNA 爆发性释放越早,释放量越大,总的释放速度也越快。

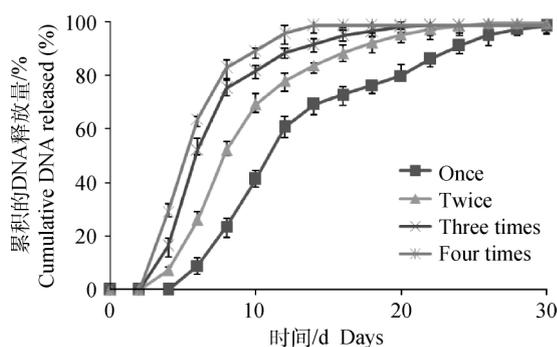


图 2 CTAB 含量对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

Fig. 2 Effect of CTAB content on the release profiles of PLGA/CTAB-DNA microparticles

2.4 PLGA 分子量对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

分别用分子量 20、60、100 ku 的 PLGA 制备 PLGA/CTAB 微粒,吸附 DNA 后冻干,加入 PBS,于 37 °C 每隔 1 d 检测所释放的 DNA 量。结果显示 PLGA 分子量为 20 ku 时,在第 1 周 DNA 就几乎被完全释放;分子量为 100 ku 时则在第 2 周才开始释

放 DNA,大约 1 周内释放完毕;而分子量为 60 ku 时在第 3 天开始释放 DNA,爆发性释放约 2 周,且整个释放过程相对较为平缓(图 3)。

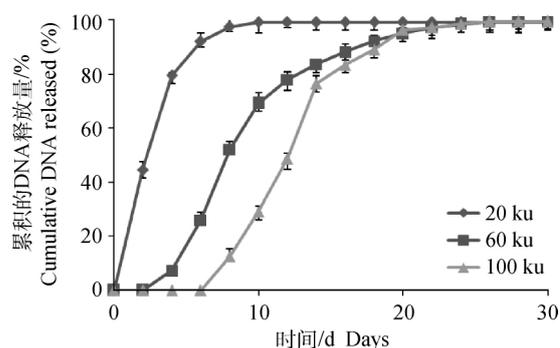


图 3 PLGA 分子量对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

Fig. 3 Effect of PLGA molecular weight on the release profiles of PLGA/CTAB-DNA microparticles

2.5 PLGA 浓度对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

将 PLGA 分别配制成浓度为 2%、5%、10% (w/v) 的二氯甲烷溶液制备 PLGA/CTAB 微粒,吸附 DNA 后冻干,加入 PBS,于 37 °C 每隔 1 d 检测所释放的 DNA 量。结果发现 PLGA 浓度分别为 2%、10% 时,PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的爆发性释放分别集中在第 1 周和第 2 周,释放量分别达到 80%、70%,浓度为 5% 时,爆发性释放约持续 2 周(图 4)。

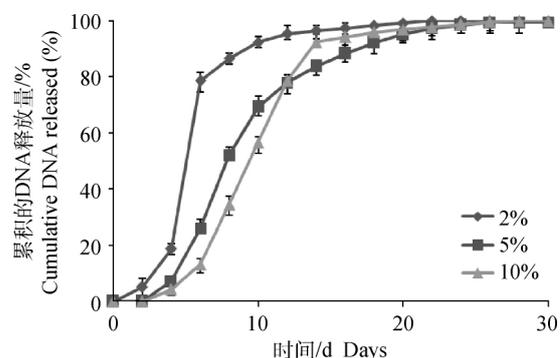


图 4 PLGA 浓度对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

Fig. 4 Effect of PLGA concentration on the release profiles of PLGA/CTAB-DNA microparticles

2.6 内水相体积对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

将 PLGA 溶液分别与 0.5 mL、1 mL、2 mL PBS 超速匀浆制备 PLGA/CTAB 微粒,与 DNA 吸

附后冻干,加入 PBS,于 37 °C 每隔 1 d 检测所释放的 DNA 量。结果发现当内水相 PBS 的体积增加到 2 mL 时于第 2 d 即可检测到 DNA 释放,而分别减少到 1、0.5 mL 时,则在第 4 d 才能检测到 DNA 释放,但后者释放量相对较少。从图 5 可以看出,随着内水相体积不断减少,PLGA/CTAB-DNA 微粒对 DNA 的释放逐渐变缓(图 5)。

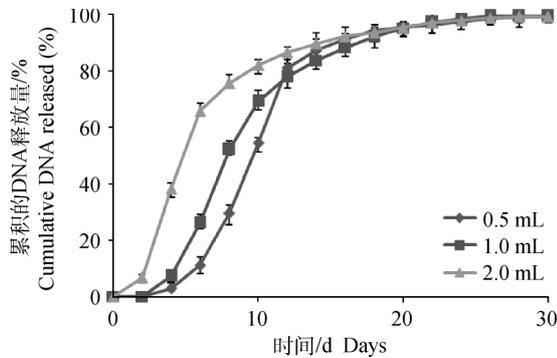


图 5 内水相体积对 PLGA/CTAB-DNA 微粒释放 DNA 的影响

Fig. 5 Effect of internal aqueous phase volume on the release profiles of PLGA/CTAB-DNA microparticles

2.7 PLGA/CTAB-DNA 微粒诱导的 ELISA 抗体

将 PLGA、裸 DNA 疫苗 pCI-ORF5 和吸附到 PLGA/CTAB 微粒上的 DNA 疫苗 pCI-ORF5 分别以不同剂量免疫小鼠,共免疫 2 次,每次间隔 2 周,于首免后第 2、4、6、8 周检测血清中抗 GP5 蛋白的 ELISA 抗体水平。从图 6 可以看出,无论采取低剂量免疫(10 μ g)还是高剂量免疫(100 μ g),PLGA/CTAB-DNA 微粒在首免 4 周后诱导的 GP5 特异性 ELISA 抗体均明显高于相同剂量的裸 DNA 疫苗,差异极显著($P < 0.01$),且以低剂量(10 μ g)免疫时诱导了与高剂量(100 μ g)裸 DNA 疫苗相似水平的 ELISA 抗体。同时 PLGA/CTAB-DNA 微粒诱导的 GP5 特异性 ELISA 抗体在小鼠体内下降得较为缓慢,可长时间维持在较高水平。

2.8 PLGA/CTAB-DNA 微粒诱导的中和抗体

将裸 DNA 疫苗 pCI-ORF5 和吸附 PLGA/CTAB 微粒表面的 DNA 疫苗 pCI-ORF5 分别以不同剂量免疫小鼠,共免疫 2 次,于首免后 8 周检测各试验小鼠的中和抗体水平。从图 7 可以看出,以相同剂量的 DNA 免疫时,在首免后 8 周,PLGA/CTAB-DNA 微粒免疫组的中和抗体均高于裸 DNA 疫苗免疫组,差异显著($P < 0.05$),且以低剂量

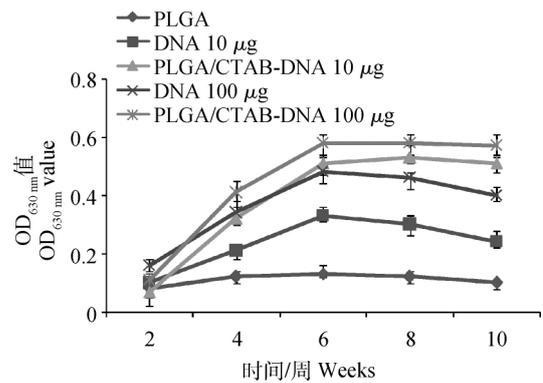


图 6 PLGA/CTAB-DNA 微粒诱导的 ELISA 抗体

Fig. 6 ELISA antibodies induced by PLGA/CTAB-DNA microparticles

(10 μ g)免疫产生的中和抗体滴度甚至超过了高剂量(100 μ g)的裸 DNA 疫苗免疫组。

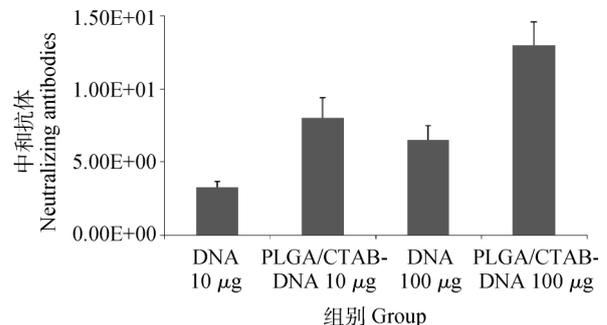


图 7 PLGA/CTAB-DNA 微粒诱导的中和抗体

Fig. 7 Neutralizing antibodies induced by PLGA/CTAB-DNA microparticles

2.9 PLGA/CTAB-DNA 微粒诱导的淋巴细胞增殖反应

将 PLGA、裸 DNA 疫苗 pCI-ORF5 和吸附 PLGA/CTAB 微粒表面的 DNA 疫苗 pCI-ORF5 分别以不同剂量免疫小鼠,共免疫 2 次,于首免后 8 周检测小鼠的脾淋巴细胞特异性增殖。结果显示,以相同剂量的 DNA 免疫时,在首免后 8 周,PLGA/CTAB-DNA 微粒免疫组均获得了更强的淋巴细胞特异性增殖,差异极显著($P < 0.01$),说明吸附 PLGA/CTAB 微粒表面的 DNA 疫苗能够诱发更强的细胞免疫应答(图 8)。

3 讨论

DNA 疫苗是随着现代分子生物学技术发展出现的一种新型疫苗,尽管具有诸多优点,但其难以诱导机体产生较高的免疫应答。为了达到理想的免疫

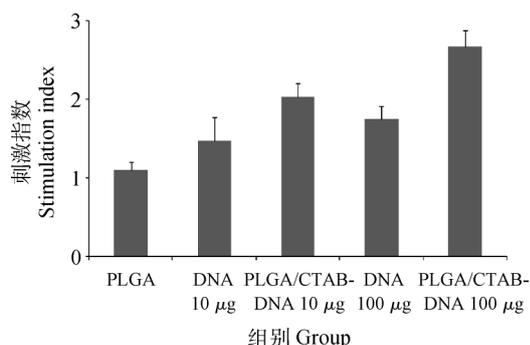


图 8 PLGA/CTAB-DNA 微粒诱导的淋巴细胞增殖反应
Fig. 8 Lymphocyte proliferative responses induced by PLGA/CTAB-DNA microparticles

保护效果,往往需要多次、大剂量的接种。为了克服这些问题,本研究制备了 PLGA/CTAB 微粒并以此为载体来递送 DNA 疫苗。PLGA 本身并不能吸附 DNA,必须首先与 CTAB 结合形成一种表面带正电荷的 PLGA/CTAB 微粒才能吸附 DNA。由于 DNA 是吸附在 PLGA 微粒的表面,并不是包裹到 PLGA 微粒内部,因此可以避免 DNA 发生变性、降解,从而保持 DNA 的完整性^[10]。本研究显示 PLGA/CTAB 微粒在体外 1 h 对 DNA 的吸附量就可以达到 0.5%,6 h 内达到最大,说明这种 DNA 装载方式是高效、快速的。

通过改变 CTAB 含量、PLGA 分子量、PLGA 浓度和内水相体积来制备不同的 PLGA/CTAB 微粒,发现其在体外对 DNA 的吸附量、释放情况均有明显不同。以分子量为 60 ku、PLGA 浓度为 5%、内水相 PBS 体积为 1 mL、无菌水洗涤 2 次制备的 PLGA 微粒对 DNA 吸附量可达 0.9%,在体外 2 周内的爆发性释放量接近 80%,总的释放时间超过 3 周,整个释放过程较长较为平缓,因此被用于免疫小鼠检测其对 PRRSV DNA 疫苗的免疫增强效果。CTAB 含量不同的 PLGA/CTAB 微粒对 DNA 的吸附量不同,主要是由于其表面所带电荷数不同,其直径并没有明显改变(直径均为 1~1.5 µm)^[11]。较高的 DNA 吸附量并不能产生更高的免疫反应,吸附量接近 1%时就足以显著地提高所吸附 DNA 诱导的免疫反应^[7]。

PLGA/CTAB 微粒能显著地增强被吸附 DNA 疫苗所诱导的体液免疫和细胞免疫,一方面是由于其能够控制 DNA 缓慢释放,防止 DNA 被体内的核酸酶所降解;另一方面可能由于其能够更好地将 DNA 疫苗递送到抗原递呈细胞(APC)。树突状细

胞(DC)的体外转染试验显示,PLGA/CTAB 微粒能增强 DC 对 DNA 疫苗的捕获、基因表达和抗原递呈^[12]。而 DC 是免疫系统中最强大的 APC,因此增强 DC 对 DNA 疫苗的抗原递呈,将能够提高 DNA 疫苗的免疫效果。另外,PLGA/CTAB 微粒被 DC 吞噬后,进入内涵体中,其表面的正电荷可以促进内涵体的破裂,进一步增强所吸附 DNA 疫苗在 DC 中的表达,显示 PLGA/CTAB 微粒既具有载体的作用,又可能具有部分佐剂的作用,虽然其佐剂的作用机制目前还不完全清楚。

本试验中 PLGA/CTAB 微粒虽然能够显著增强所吸附 PRRS DNA 疫苗诱导的免疫反应,但仍未达到灭活或弱毒 PRRSV 疫苗的水平,可能由于本试验仅仅以单基因 ORF5 进行免疫,而单独以 ORF5 基因构建的 DNA 疫苗往往难以激发机体产生较高的免疫应答^[13]。在后续的试验中将分别构建表达 ORF5 基因和 ORF6 基因的 DNA 疫苗,然后同时装载 PLGA/CTAB 微粒,进一步提高机体对 PRRSV 的免疫力。目前已研究证实无论吸附一种还是多种质粒 DNA 的 PLGA/CTAB 微粒,都可以诱导比裸 DNA 疫苗更强的免疫反应,为机体提供更为全面的保护^[12],这无疑为 PLGA/CTAB 微粒作为 DNA 疫苗载体的应用提供更为广阔的前景。

参考文献:

- [1] 郑兰艳,罗恩杰.核酸疫苗的研究进展[J].日本医学介绍,2004,25(4):185-187.
- [2] 李学荣.核酸疫苗及其免疫机制研究[J].中国人兽共患病杂志,2006,16(6):82-86.
- [3] 何方,洪艳,陈勇.DNA 疫苗免疫佐剂的研究进展[J].浙江省医学科学院学报,2006,66:37-41.
- [4] 王玉,王东凯,孙念.聚丙烯酯乙交酯共聚物作为大分子药物载体的纳米及微米技术研究进展[J].中国药剂学杂志,2009,7(3):205-211.
- [5] LIU B, DONG Q G, WANG M S, et al. Preparation, characterization, and pharmacodynamics of exenatide-loaded poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres[J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(11): 1474-1479.
- [6] SINGH M, BRIONES M, OTT G, et al. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA system for DNA vaccines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 811-816.
- [7] O'HAGAN D, SINGH M, UGOZZOLI M, et al. Induction of potent immune responses by cationic mi-

- croparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines [J]. *J Virol*, 2001, 75 (19): 9037-9043.
- [8] JADAV S K, REDDY K S, RASHMI B R, et al. Improved immune response by ID-pVAC: a secretory DNA vaccine construct delivered by PLG micro particles against foot and mouth disease in guinea pigs[J]. *Res Vet Sci*, 2011, 91(1): 86-89.
- [9] SINGH M, UGOZZOLI M, BRIONES M, et al. The effect of CTAB concentration in cationic PLG microparticles on DNA adsorption and in vivo performance[J]. *Pharm Res*, 2003, 20(2): 247-251.
- [10] TINSLEY-BOWN A M, FRETWELL R, DOWSETT A B, et al. Formulation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for rapid plasmid DNA delivery[J]. *J Control Release*, 2000, 66(2-3): 229-241.
- [11] INGH M, BRIONES M, UGOZZOLI M, et al. The preparation, characterization, and evaluation of cationic microparticles for DNA vaccine delivery [J]. *Pharm Res*, 2001, 18(5): 709-712.
- [12] DENIS-MIZE K S, DUPUIS M, MACKICHAN M L, et al. Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells[J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 2105-2112.
- [13] OSTROWSKI M, GALEOTA J A, JAR A M. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain [J]. *J Virol*, 2002, 76 (9): 4241-4250.

(编辑 白永平)