

网络出版时间: 2024-07-03 17:36:30 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1449.016>

运载双层抗原蛋白的 CS-PLGA 制剂制备及其表征鉴定

郑蕊^{1,2} 杨晓岚² 王慧^{1,2} 罗德炎^{1,2}

摘要 目的 制备运载双层抗原的 CS-PLGA 微球制剂,并对其进行相关表征鉴定。方法 通过复乳法结合溶剂挥发法制备得到多孔微球后,在 4℃ 水浴条件下装载抗原,利用抗原浓度梯度介导的物理扩散促进抗原进入微球内部,并通过静电作用结合在微球外表面,形成内外双层抗原运载。根据聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)材料玻璃转化温度这一特性,促进多孔微球表面孔道在 48℃ 条件下发生愈合,使其形成闭合的微球制剂,再将得到的微球制剂与壳聚糖溶液混悬镀层,进行阳离子修饰,逆转微球表面负性电位。通过扫描电子显微镜、动态光散射粒度仪等检测微球形态、粒径分布和电位变化,采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定抗原是否装载至微球制剂中,采用荧光标记的 BSA 和荧光标记的 PLGA 材料进行激光共聚焦显微镜观察抗原装载后的分布情况,通过 BCA 法检测微球制剂的包封率和载药率。结果 扫描电镜和光学显微镜结果显示多孔微球成孔良好,粒径大小为 (73.94 ± 0.81) nm,多分散性指数为 0.038 ± 0.004 。Zeta 电位由负转正说明壳聚糖已被成功镀层至微球表面。经过 SDS-PAGE、激光共聚焦显微镜等证实 BSA 已被成功运载。经 micro BCA 试剂盒检测后多孔微球包封率为 $(3.01 \pm 0.04)\%$,载药率为 $(1.50 \pm 0.02)\%$ 。结论 成功制备得到运载双层抗原的 CS-PLGA 制剂,为后续缓控释制剂研究提供新思路。

关键词 聚乳酸-羟基乙酸共聚物;壳聚糖;多孔微球;抗原装载;自愈合

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1213-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.016

为了抵抗当前各种传染性疾病的感染及流行,疫苗接种成为了阻止疾病传播和恶化、降低住院率及病死率的重要手段^[1]。但是当前疫苗剂数多为 2~3 针,疫苗接种次数的增加和接种流程的延长降

低了疫苗接种的覆盖率^[2]。减少疫苗接种次数不仅能提高人们对疫苗接种的依从性,提高疫苗接种率,还可以减轻疫苗接种对医疗资源的占用和挤兑^[3]。因此单一针剂的疫苗研发需求非常迫切。聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]是人工合成的高分子聚合物材料,由乳酸和羟基乙酸通过开环聚合而成^[4]。PLGA 具有良好的缓释特性,为实现减少疫苗接种次数甚至单针剂疫苗提供了可能。该研究设计并制备得到运载双层抗原的 PLGA 制剂,为后续缓控释制剂研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 PLGA(75% 乳酸和 25% 羟基乙酸组成)购自山东省生物医药科学院有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白(fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin, FITC-BSA)、尼罗红(nile red, NR)和壳聚糖(chitosan, CS)购自北京索莱宝生物科技有限公司;BCA 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;NaHCO₃、二氯甲烷(dichloromethane, DCM)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白标准品购自北京全式金生物技术有限公司;QuickBlue 快速染胶液购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

1.1.2 仪器 手持式均质机(型号: F6/10, 上海净信实业发展有限公司)、磁力搅拌器(型号: GL-6250-48, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、精密电子天平(型号: ME104, 瑞士梅特勒托利多科技有限公司)、扫描电子显微镜(型号: GeminiSEM 300, 德国 Carl Zeiss 公司)、振荡培养箱(型号: MQD-S3R, 上海旻泉仪器有限公司)、高速离心机(型号: Avanti JXN-30, 美国 Beckman Coulter 公司)、荧光显微镜(型号: IX73, 日本 Olympus 公司)、激光共聚焦扫描显微镜(型号: LSM 880, 德国 Carl Zeiss 公司)、纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(型号: Zetasizer Nano ZS90, 英国马尔文仪器有限公司)、真空离心浓缩仪(型

2024-03-28 接收

基金项目: 病原微生物生物安全国家重点实验室自主研究课题(编号: SKLPBS2220)

作者单位: ¹ 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

² 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

作者简介: 郑蕊, 女, 硕士研究生;

罗德炎, 女, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ldy612@126.com

号: CV200, 北京吉艾姆科技有限公司), 蛋白电泳仪 (型号: PowerPac HC, 伯乐生命医学产品有限公司), 全自动凝胶成像分析系统 (型号: ChampGel 7000, 北京赛智创业科技有限公司), 全自动酶联免疫检测仪 (型号: Synergy H1, 美国 Bio Tek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 微球的制备 PLGA 多孔微球制剂采用复乳法结合溶剂挥发法制备。将 400 mg PLGA 溶解于 8 ml DCM 中, 向其中加入 2 ml 含 0.5% (w/v) 的 NaHCO_3 溶液, 用均质机均质 10 min 后, 将溶液转移至 2% (w/v) PVA 溶液, 再次均质 5 min, 后在室温下以 600 r/min 低速搅拌挥发有机溶剂以使微球固化。用蒸馏水进行多次离心洗涤采用真空离心浓缩仪干燥制剂, 然后转移至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

NR 标记的 PLGA 多孔微球制备过程中取适量 NR 混于 PLGA 和 DCM 中, 其他步骤相同。

1.2.2 微球装载蛋白 精密称取 10 mg 空白冻干微球粉末, 用 BSA 溶液重悬。置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水平振荡箱孵育 24 h 后, 转至 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水平振荡箱孵育 48 h, 14 000 r/min 离心 15 min 收集样本, 用蒸馏水洗涤 2 次后进行冻干。

精密称取 10 mg NR-PLGA 与 FITC-BSA 溶液混合, 其他步骤相同, 荧光标记制剂用于激光共聚焦显微镜观察。

1.2.3 CS 镀层修饰微球 将适量微球冻干粉末与 CS 溶液混悬, 混悬 48 h 后 14 000 r/min 离心 15 min 收集样本, 蒸馏水洗涤 2 次后冻干处理。

1.2.4 微球形貌观察 光学显微镜: 将 PLGA 微球溶液稀释到合适浓度, 吸取少量微球悬液滴加到载玻片上, 将载有微球的载玻片置于显微镜物镜下, 观察微球多孔形貌。

扫描电子显微镜: 用导电胶粘取 PLGA 空白微球冻干粉末, 贴在样品台上, 喷金后采用扫描电子显微镜对样品进行形貌观察。

1.2.5 微球粒径与电势测定 取 PLGA 和 CS-PLGA 冻干微球样本, 将样品溶于去离子水后超声制

备得到微球悬液, 吸取适量待测样本置于检测池中进行粒径和电位的检测。

1.2.6 BSA 在微球内的分布情况 精密称取 10 mg NR-PLGA 与 FITC-BSA 溶液混合重悬, 用于激光共聚焦显微镜观察。置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水平振荡箱孵育 24 h 后, 转至 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水平振荡箱孵育 48 h, 14 000 r/min 离心 15 min 收集样本, 用蒸馏水洗涤 2 次后进行冻干。冻干完成后进行激光共聚焦显微镜观察。

1.2.7 BSA 装载鉴定 精密称取 20 mg 冻干后的微球粉末, 加入 2 ml 裂解液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床以 200 r/min 振荡 2 d, 使微球裂解完全, 14 000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 采用真空离心浓缩仪对溶液进行浓缩处理后进行 SDS-PAGE 实验。采用 120 V, 100 min 条件进行电泳, 经考马斯亮蓝染色液进行过夜染色后用清水漂洗数次, 通过全自动凝胶成像分析系统中的 SageCapture 软件进行拍摄。

1.2.8 包封率及载药率检测 取 20 mg 冻干后的微球粉末, 加入 2 ml 裂解液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床以 200 r/min 振荡 2 d, 使微球裂解完全, 离心取上清液采用 BCA 法进行蛋白浓度检测。根据公式分别计算包封率和载药率。包封率 = 微球蛋白含量 / 蛋白总投入量 $\times 100\%$, 载药率 = 微球蛋白含量 / 微球总质量 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异分析采用非配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微球制剂制备思路及形貌特征 本研究制剂制备思路见图 1。选择 NaHCO_3 作为制孔剂制备得到多孔微球。 NaHCO_3 在 PLGA 微球制备过程中受到高剪切力、热、压强等作用下分解为 H_2O 和 CO_2 逸出, 形成多孔微球。再将制剂与抗原溶液混合, 使抗原通过浓度梯度自行扩散进入微球内部, 并通过静电作用吸附在制剂的表面, 形成双层抗原。随

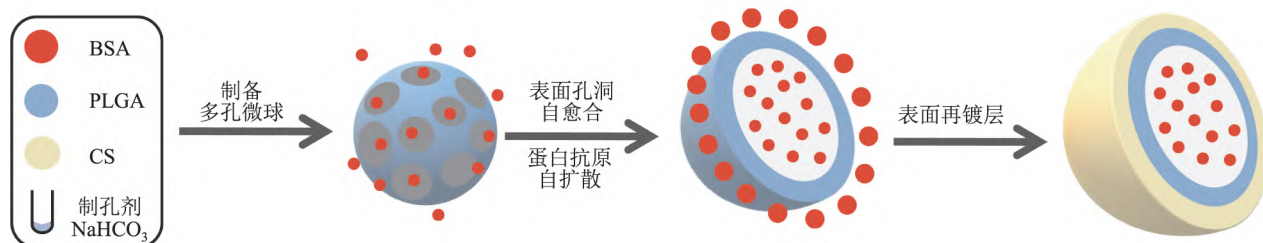


图1 制剂制备思路

后调整水浴温度达到 PLGA 材料的玻璃转化温度, 聚合物分子由玻璃态转变为高弹态, 多孔结构自行愈合, 形成封闭的微球制剂, 避免抗原装载进入微球内部后又自行溢出以及降低突释现象的发生, 完成抗原运载。最后对制剂表面电势进行阳离子修饰, 将微球制剂与 CS 溶液混悬使其修饰至微球表面。

微球制剂在普通光学显微镜下呈规整的圆形, 另外还可以看到微球内部存在多孔结构, 说明制剂成孔良好, 见图 2A。扫描电镜检测结果显示微球呈规整均匀的球形结构, 表面光滑, 微球表面存在适宜大小的孔洞且结构坚实, 见图 2B、C。

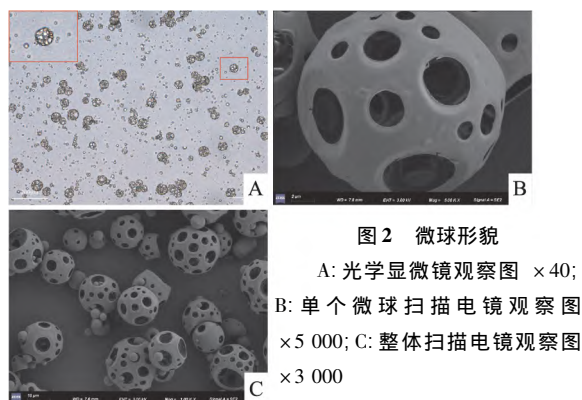


图2 微球形貌

A: 光学显微镜观察图 $\times 40$;

B: 单个微球扫描电镜观察图 $\times 5\,000$; C: 整体扫描电镜观察图 $\times 3\,000$

2.2 微球平均粒径 采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪对微球粒径进行检测得到微球平均粒径为 (73.94 ± 0.81) nm, 多分散性指数为 0.038 ± 0.004 , 粒径分布相对较集中。见图 3。

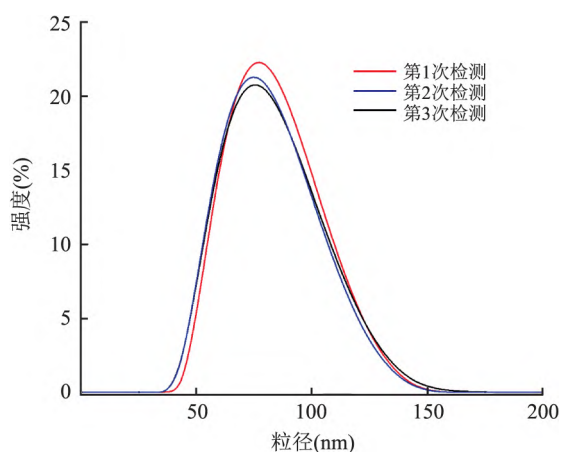


图3 微球粒径分布

2.3 BSA 在制剂中的分布情况 以 FITC 标记 BSA, 以 NR 标记 PLGA 后通过激光共聚焦显微镜观察 BSA 在 PLGA 微球中的分布情况。图 4A - C 为 200 倍镜下的观察结果, 图 4C 的 Merge 图可以看出各个微球制剂成功运载上了 BSA。图 4D - F 为

1 000 倍镜下的观察结果, 图 4D 显示制剂成孔良好, 内部存在多个空腔结构, 图 4E 可以看到微球内部空腔存在绿色荧光, 表明 FITC-BSA 成功通过浓度差扩散进入多孔微球内部。在微球外表面也存在部分 FITC-BSA 通过静电作用吸附于多孔微球外部。由激光共聚焦显微镜观察结果可以看出制剂呈现出内外双层抗原运载。

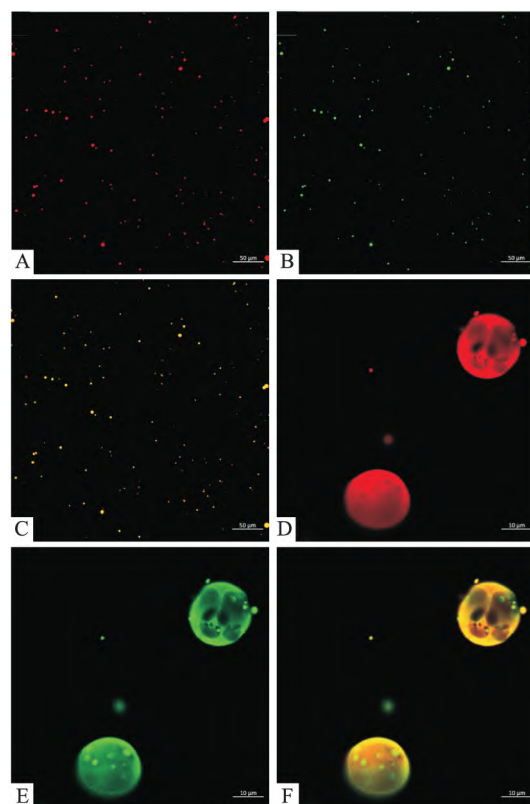


图4 多孔微球装载抗原后的激光共聚焦显微镜观察结果

A - C: NR-PLGA 运载 FITC-BSA $\times 200$; D - F: NR-PLGA 运载 FITC-BSA $\times 1\,000$

2.4 SDS-PAGE 鉴定 BSA 装载情况 将运载蛋白微球制剂经过裂解液充分裂解后, 收集微球裂解液经 12.5% SDS-PAGE 分析鉴定运载蛋白。实验中使用的 BSA 分子量大小为 68 ku, SDS-PAGE 结果显示, 在相对分子量约 70 ku 左右处出现相近分子量大小的条带, 参考阳性对照中目标条带的位置, 确定 BSA 已成功运载至微球制剂中, 见图 5。

2.5 CS 镀层前后微球表面电势变化 微球修饰前的 Zeta 电位为 (-13.93 ± 0.30) mV, CS 修饰后微球 Zeta 电位为 (1.25 ± 0.10) mV。经 CS 修饰后的微球表面电势由原来的负性电位转变为正性电位说明 CS 已成功镀层至微球表面。CS 修饰前后两种制剂表面电位差异有统计学意义 ($t = 48.52$, $P <$

0.000 1)。见图 6。

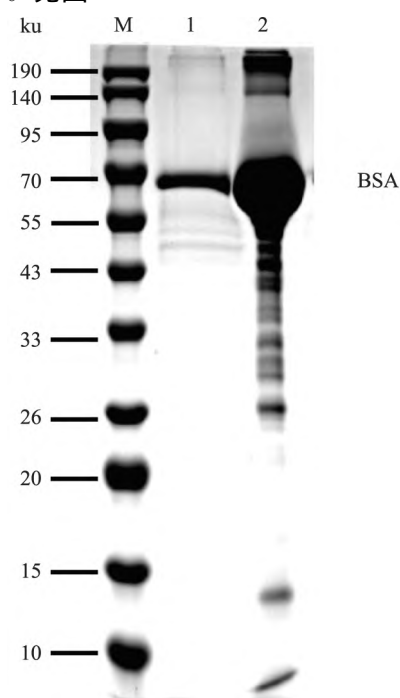


图5 SDS-PAGE 鉴定结果

M: marker; 1: 微球裂解液; 2: 阳性对照(3 mg/ml BSA 溶液)

2.6 微球包封率及载药率 采用物理扩散的方式, 通过抗原浓度差促进抗原自行进入多孔微球内部, 并通过静电作用吸附在微球表面, 得到的微球制剂包封率为 $(3.01 \pm 0.04) \%$, 载药率为 $(1.50 \pm 0.02) \%$ 。

3 讨论

PLGA 作为一种新型材料问世至今虽然仅短短几十年, 但其作为递送系统的安全性和可调控性有目共睹。PLGA 在人体内可通过三羧酸循环代谢生成 H_2O 和 CO_2 排出体外, 被美国食品药品监督管理局批准用于医疗制品超 30 年^[5-6]。因其缓释特性、毒性低、生物相容性优被广泛应用于组织修复、药物递送和疫苗制剂等领域^[7]。当前疫苗领域正在加紧研究单一针剂的抗原递送系统, 其中 PLGA 作为安全性极高的缓释材料再次引起人们的注意^[8]。

本研究通过复乳法结合溶剂挥发法制备得到 PLGA 制剂。光学显微镜和扫描电镜观察结果显示采用 $NaHCO_3$ 制孔剂成功制备得到多孔微球。得到的制剂平均粒径为纳米级别, 纳米级制剂在体内的循环时间更长, 不易在组织器官中滞留^[9]。CS 是由几丁质去乙酰化得到的一种天然阳离子聚合物材料^[10]。制剂表面电位经 CS 镀层修饰后逆转为正电位。Kheirollahpour et al^[11] 认为阳离子微球制剂相

比于阴离子微球制剂更能与细胞发生相互作用, 促

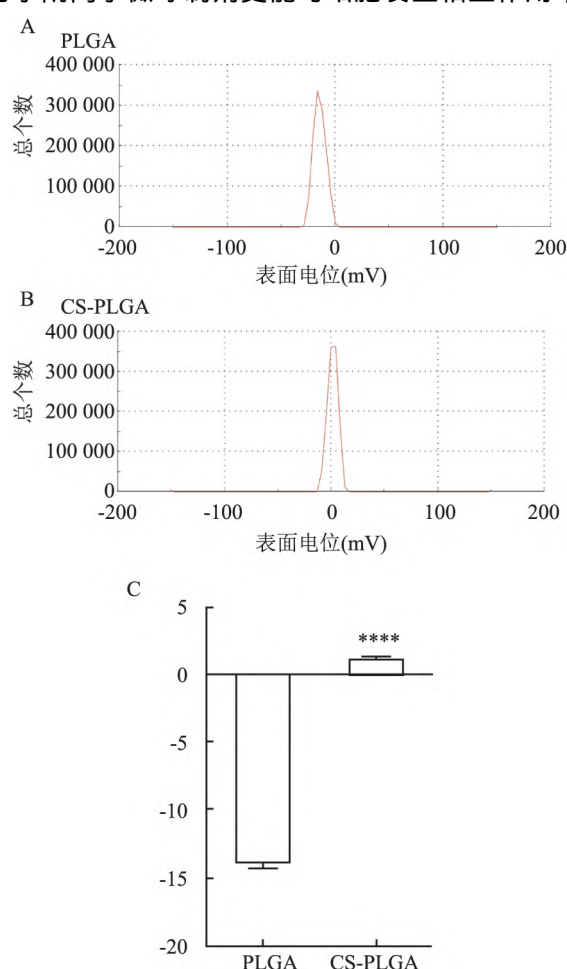


图6 多孔微球 CS 镀层前后 Zeta 电位变化

A: 未修饰的多孔微球电位检测结果图; B: CS 修饰后的多孔微球电位检测结果图; C: 未修饰与修饰后的微球电位结果统计学分析; 与 PLGA 比较: **** $P < 0.0001$

进免疫细胞的摄取和呈递, 对后续免疫反应有加强作用。

一般传统的实心 PLGA 制剂制备时需要将运载物加入有机溶剂中, 在均质机高速剪切力的作用下与 PLGA 材料均质成复乳液。制备过程中产生的高剪切力、高温以及与有机溶剂易对抗原活性造成损害, 使抗原失活而免疫原性丧失, 甚至会对机体产生毒副作用^[12]。本研究运载抗原蛋白采用的 $4^\circ C$ 条件下使其自行发生物理扩散, 在抗原浓度梯度差的介导下其自行进入微球内部和通过静电作用吸附在制剂表面, 这样的运载方式相对温和, 有助于保护抗原蛋白的空间结构。

通过 SDS-PAGE 确认制剂中的蛋白分子量处在目的分子量处, 另外通过激光共聚焦显微镜观察发现抗原蛋白 BSA 在制剂中存在双层分布, 因此可以

认为制剂已运载双层抗原。

本研究中的 CS-PLGA 制剂包封率和载药率较低,经分析认为原因有两个:一是运载方式不同。相较于传统的实心微球制剂而言,本研究采用的抗原浓度梯度介导的物理扩散这一运载方式相对被动,而传统实心微球制剂在制备过程中将运载物直接投入油相中,运载物直接参与微球制剂的制备,运载效率相对较高。二是本研究制备的微球制剂表面多孔结构直径较大。多孔微球表面较大的孔道虽然便于抗原进入微球内部,但也导致抗原不易驻留。伴随着水平振荡仪的持续振荡原本被多孔微球捕获的抗原可能又会漏出。Bailey et al^[13] 使用抗原吸附剂 CaHPO_4 促进抗原的装载,从而提高包封率和载药率。后续课题组也将参考该思路,选取适宜的抗原吸附剂、调整抗原蛋白浓度和投入量,提高抗原运载量,减少其在制备过程中的损耗,并调整制孔剂的浓度和投入量,制备表面孔径更小、更能高效捕获抗原的微球制剂。

综上所述,本实验探究摸索实现了一种新型运载双层抗原的 CS-PLGA 制剂模型,为后续缓控释疫苗制剂研究提供新思路。

参考文献

- [1] Liu X, Min Q, Song H, et al. Potentiating humoral and cellular immunity using a novel hybrid polymer-lipid nanoparticle adjuvant for HBsAg-VLP vaccine [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 441.
- [2] Beugeling M, Grasmeijer N, Born P A, et al. The mechanism behind the biphasic pulsatile drug release from physically mixed poly (dl-lactic(-co-glycolic acid)-based compacts [J]. *Int J Pharm*, 2018, 551(1/2): 195–202.
- [3] Zhou X, Wang H, Luo Y, et al. Single-injection COVID-19 subunit vaccine elicits potent immune responses [J]. *Acta Biomater* 2022, 151: 491–500.
- [4] Jin S, Xia X, Huang J, et al. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration [J]. *Acta biomater*, 2021, 127: 56–79.
- [5] Cappellano G, Abreu H, Casale C, et al. Nano-microparticle platforms in developing next-generation vaccines [J]. *Vaccines (Basel)* 2021, 9(6): 606.
- [6] Han S, Ma W, Jiang D, et al. Intracellular signaling pathway in dendritic cells and antigen transport pathway *in vivo* mediated by an OVA@DDAB/PLGA nano-vaccine [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 394.
- [7] Mostafa M M, Amin M M, Zakaria M Y, et al. Chitosan surface-modified PLGA nanoparticles loaded with cranberry powder extract as a potential oral delivery platform for targeting colon cancer cells [J]. *Pharmaceutics* 2023, 15(2): 606.
- [8] Yang M, Yang T, Jia J, et al. Fabrication and characterization of DDAB/PLA-alginate composite microcapsules as single-shot vaccine [J]. *RSC Adv* 2018, 8(24): 13612–24.
- [9] Zhao Z, Ukidve A, Krishnan V, et al. Effect of physicochemical and surface properties on *in vivo* fate of drug nanocarriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev* 2019, 143: 3–21.
- [10] 陆依凡, 邹多宏, 丁如愿, 等. 壳聚糖- β -磷酸三钙复合层状支架的制备与研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(7): 1122–7.
- [11] Kheirollahpour M, Mehrabi M, Dounighi N M, et al. Nanoparticles and vaccine development [J]. *Pharm Nanotechnol* 2020, 8(1): 6–21.
- [12] Chen X, Liu Y, Wang L, et al. Enhanced humoral and cell-mediated immune responses generated by cationic polymer-coated PLA microspheres with adsorbed HBsAg [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(6): 1772–84.
- [13] Bailey B A, Desai K H, Ochyl L J, et al. Self-encapsulating poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for intranasal vaccine delivery [J]. *Mol Pharm* 2017, 14(9): 3228–37.

The preparation and characterization of CS-PLGA preparation carrying bilayer antigen protein

Zheng Rui^{1,2}, Yang Xiaolan², Wang Hui^{1,2}, Luo Deyan^{1,2}

(¹ School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032;

² State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Academy of Military Science, Beijing 100071)

Abstract Objective To prepare and identify CS-PLGA microspheres carrying bilayer antigen protein. **Methods** Porous microspheres were prepared by emulsion polymerization combined with solvent evaporation. The antigen was loaded in a water bath at 4 °C, and the antigen was promoted to enter the microspheres by physical diffusion mediated by antigen concentration gradient and combined with the outer surface of the microspheres by electrostatic action, forming an inner and outer double-layer antigen carrier. Then, according to the glass transition temperature of PLGA material, the pores on the surface of porous microspheres were promoted to heal at 48 °C to form a closed microsphere preparation, and then the obtained microsphere preparation was suspended with chitosan solution for

网络出版时间: 2024-07-03 17:38:31 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1450.017>

逍遥丸对代谢相关脂肪性肝炎 CYP2E1 及 FasL/TNF- α 信号通路的影响

张馨月¹, 张玉伟¹, 李梦琪¹, 孟雅楠¹, 李若瑜², 苗宇船¹

摘要 目的 研究逍遥丸治疗代谢相关脂肪性肝炎 (MASH) 大鼠的机制。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组 (CON 组 $n=8$) 和模型组 ($n=16$)。模型组给予高脂饮食 + 四氯化碳背部皮下注射 + 饥饱失常 + 夹尾联合刺激 4 周建立 MASH 模型, 再随机分为 MOD 组和逍遥丸组 (XYW 组), 每组各 8 只。XYW 组大鼠给予逍遥丸灌胃, 其他两组给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃。给药 4 周后, 对不同组别大鼠的血清生化及氧化应激指标进行检测。HE 染色和油红 O 染色对大鼠肝组织进行病理切片观察。Western blot 对大鼠肝脏中细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)、凋亡相关因子配

体 (FasL)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 的表达进行检测。RT-qPCR 检测肝组织 CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 mRNA 相对含量。结果 XYW 组大鼠的一般情况较 MOD 组有显著改善, 肝指数较 MOD 组下降 ($P<0.01$), 体质量指数较 MOD 组上升 ($P<0.01$); XYW 组血清中三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、丙二醛、单核细胞趋化蛋白-1、TNF- α 、白细胞介素 (IL)-18 水平较 MOD 组降低 (均 $P<0.05$), 高密度脂蛋白胆固醇、超氧化物歧化酶、IL-10 水平较 MOD 组升高 (均 $P<0.05$); 光镜下可观察到 XYW 组肝细胞内脂滴含量较 MOD 组明显减少; XYW 组肝组织 CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 的蛋白水平较 MOD 组降低 (均 $P<0.05$), CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 mRNA 相对含量较 MOD 组降低 (均 $P<0.05$)。结论 逍遥丸通过调节 CYP2E1、FasL、TNF- α 、TGF- β 1 在 MASH 大鼠肝组织中的转录表达, 减少肝脏脂肪蓄积, 从而达到治疗 MASH 的目的。
关键词 逍遥丸; 代谢相关脂肪性肝炎; 细胞色素 P450 2E1; 凋亡相关因子配体; 肿瘤坏死因子- α ; 转化生长因子- β 1
中图分类号 R 575.5; R 589.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1218-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.017

代谢相关脂肪性肝炎 (metabolic associated

2024-02-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81470190); 山西省卫生健康委项目 (编号: 2019089); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础研究专项”项目 (编号: 2021PY-JC-04); 山西中医药大学风湿免疫性疾病中西医结合基础学科建设项目 (编号: 2023XKJS-03)

作者单位: ¹山西中医药大学病理教研室, 晋中 030619²山西中医药大学附属医院脑病科, 太原 030000

作者简介: 张馨月, 女, 硕士研究生;

苗宇船, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mych65@163.com;

李若瑜, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: liroyu19874056571@163.com

cationic modification to reverse the negative potential on the surface of microspheres. In this study, the morphology, particle size distribution and potential changes of microspheres were detected by scanning electron microscope and dynamic light scattering particle size analyzer. In addition, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to identify whether the antigen was loaded into the microsphere preparation. The fluorescent labeled BSA and fluorescent labeled PLGA materials were used to observe the distribution of the antigen after loading by laser confocal microscope. The encapsulation efficiency and drug loading rate of the microsphere preparation were detected by BCA method. **Results** The results of scanning electron microscope and optical microscope showed that the porous microspheres had good pore formation, the particle size was (73.94 ± 0.81) nm and the Polydispersity index was 0.038 ± 0.004 . Zeta potential changed from negative to positive, which indicated that chitosan had been successfully coated on the surface of microspheres. SDS-PAGE, laser confocal microscope and other detection methods confirmed that BSA had been successfully carried. The encapsulation rate of porous microspheres was $(3.01 \pm 0.04)\%$ and the drug loading rate was $(1.50 \pm 0.02)\%$ after detection by micro BCA kit. **Conclusion** CS-PLGA preparation carrying bilayer antigen was successfully prepared, which provided a new idea for the subsequent study of sustained and controlled release preparations.

Key words poly(lactic-co-glycolic acid); chitosan; porous microspheres; antigen loading; self-healing