

壳聚糖 - 海藻酸钠幽门螺杆菌全菌蛋白微球的制备及表征

王毅超¹, 邹全明^{1*}, 任建敏¹, 刘健², 王晓勤¹

(1. 第三军医大学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; 2. 北华大学附属医院, 吉林 132011)

摘要: 目的 以壳聚糖、海藻酸钠为主要材料包裹幽门螺杆菌 (*HP*) 全菌超声蛋白抗原, 制备新型 *HP* 疫苗制剂。方法 将海藻酸钠、壳聚糖、大豆油以及 *HP* 超声全菌抗原制备成 W/O/W 型微球。通过扫描电镜、粒径分布仪等检测微球粒径大小; 药物溶出度仪、BCA 蛋白试剂盒检测微球的蛋白包封率及药物释放速率。结果 所制备的微球形态规则, 平均粒径 3.33 μm ; 蛋白包封率约为 64.8%; 微球呈显著缓释模式, 缓释时间可达 6 d。结论 壳聚糖 - 海藻酸钠微球包裹全菌蛋白可以作为 *HP* 疫苗的新型缓释制剂。

关键词: 微球; 幽门螺杆菌; 壳聚糖; 海藻酸钠; 表征

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103(2005)05 - 0375 - 03

Preparation and character of microspheres of *Helicobacter pylori* whole cell protein encapsulated by chitosan - alginate

WANG Yi - chao¹, ZOU Quan - ming^{1*}, REN Jian - min¹, LIU Jian², WANG Xiao - qin²

(1. Department of Clinical Microbiology and Immunology, Chongqing Engineering Technology Research Center of Biopharmaceuticals, Chongqing 400038, China; 2. Affiliated Hospital of Beihua Medical University, Jilin 132011, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To prepare microspheres of *Helicobacter pylori* whole cell protein encapsulated by chitosan - alginate and detected the character of it. **METHODS** The microspheres composed of chitosan, alginate and the protein were prepared by emulsification method. Size measurement was carried out by both SEM and light scattering particle size analyzer. UV spectrophotometer and release observer were utilized to detect the loading efficiency and the rate of release. **RESULTS** The morphology and size distribution of the microspheres were good, with average size of 3.33 μm , and the loading efficiency was 64.8%, the microspheres also have a release time of about 6 d. **CONCLUSION**

The chitosan - alginate microspheres encapsulating *Helicobacter pylori* protein could be used as novel drug release preparation to prevent the infection of *H. pylori*.

Key words: Microsphere; *Helicobacter pylori*; Chitosan; Alginate; Character

CLC number: R94

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2005)05 - 0375 - 03

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *HP*) 是导致人类胃溃疡、胃炎乃至胃癌等消化道疾病的主要致病菌。自 1983 年 Warren 教授发现 *HP* 以来, 人们围绕疫苗制剂学开展了大量研究, 并取得了一定的进展^[1,2]。其中, 以微球为代表的缓释制剂在诱导机体提高免疫效力, 及其靶向释药方面均取得较好的效果^[3]。在合成微球的过程中, 高温有机溶剂对蛋白抗原会造成一定程度的影响^[4]。近来的研究表明, 以壳聚糖 - 海藻酸盐为材料制备的微球不仅具有一般微球的特性, 而且适合口服蛋白药物的特殊要求^[5]。壳聚糖 - 海藻酸盐为天然有机高分子物质, 与药物本身不会起化学反应, 且在人体内自然降解, 对人体无害; 在微球制备过程中摒弃对蛋白药物有严重影响的有机溶剂及高温环境, 减少了蛋白药物

的损耗; 合成材料本身具有耐酸不耐碱的特性, 口服过程中胃内溶解速度极慢, 而在碱性环境中释放速度明显加快。壳聚糖 - 海藻酸盐的上述特性对口服蛋白药物的研究起着推动作用。

实验采用超声灭活全菌蛋白为包裹物, 制备出适合于肠道靶向给药的微球制剂, 为研制高效 *HP* 疫苗提供了实验依据。

1 实验部分

1.1 仪器及抗原的制备

LeitzDiaplan - 光学显微镜 (Wild MPS46); AM- RAY 型扫描电子显微镜; 粒径分析仪 (Malvern instrument Ltd, 3000HS_A, 美国科美); 低温高速离心机 (美国 Beckman); T25B 高速乳化制作器 (美国 Beck-

基金项目: 国家“十五”863 课题 (No. 2001AA2151611)

作者简介: 王毅超, 男, 河北省辛集市, 博士, 讲师。E - mail: wangyichao @sohu.com

* 通讯作者 (Correspondent author), E - mail: qnzou @mail.tmmu.com.cn

man);真空冷冻干燥机(美国 Beckman);酶标仪(瑞典)。4,4'-二羧酸-2,2'-二喹啉(Bioinchoinic acid, BCA);蛋白浓度检测试剂盒(碧云天试剂公司,批号:20031215)。

采用 M13 菌株(本室保存,1998 年从胃溃疡患者的组织培养中分离所得,经验证为从菌株),牛心、牛脑液体培养基微需氧环境(37℃、湿度 > 95%)培养 24 h,0.05 mol L⁻¹ PBS (pH 7.4) 洗涤 6 次,5 × 10³ r·min⁻¹、4 离心 10 min,收集细菌,加入 5% 甲醛溶液灭活 24 h。200 W、30 s、10 次超声碎菌,1.5 × 10⁴ g、4 离心 20 min,收集上清液,Lowry 法测定抗原浓度。

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖-海藻酸盐包裹 HP 抗原微球的制备

在 25 ~ 30℃ 下,将一定浓度的 HP 全菌超声抗原与 2% 的海藻酸钠溶液混匀,加入一定量的大豆油,8 × 10³ r·min⁻¹ 乳化 10 min。用 8 号针头的注射器将上述乳液逐滴滴入 CaCl₂ 溶液中,保持搅拌速度 500 r·min⁻¹、15 min,形成 O/W 型乳液,将乳液置于电磁搅拌器上,继续搅拌 1 h,使微球充分固化后双蒸水洗涤 3 次,离心取沉淀物加少量蒸馏水振荡混匀,形成悬液。将悬液加入到 1% 的壳聚糖溶液中,磁力搅拌 2 h,形成 W/O/W 型微球。离心、蒸馏水洗涤 3 次,真空冷冻干燥 24 h 后储存备检。

1.2.2 微球的冷冻干燥 将充分洗涤的微球混悬液缓慢倒入玻璃平皿中,液面高度低于 1 cm。-40℃ 冰箱预冻 12 h 后直接置于已预冷的真空干燥机内干燥,

并缓慢提升温度使水分迅速升华,待气体压力指示计显示无气体生成时取出冻干品待检。

1.2.3 微球干燥前后的形态观察 分别取洗涤离心后的微球、冻干粉以及冻干粉复溶物,微量涂于载玻片上,光镜下观察冻干前后微球的形态变化。

1.2.4 微球的扫描电镜(SEM)观察 取洗涤后的微量球涂于盖玻片上,室温下自然干燥,按程序对本进行处理,扫描电镜观察微球形态。

1.2.5 微球的粒径分布 应用粒径分布仪检测微球的粒径,观察所制微球的粒径范围。

1.2.6 蛋白包封率及蛋白释放速率 取一定量冻干后的微球称重,溶于 PBS (pH 7.2, 0.5 mol L⁻¹) 缓冲液中,振荡器上破碎过夜,低温高速离心去除壳聚糖、海藻酸钠残渣,取上清液采用 BCA 法测定 HP 全菌蛋白含量,计算微球的包封率。

将冻干粉复溶,取一定量悬液置 100 ml 人工胃液中,30 min 后将溶液离心,取上清液。同时向沉淀物中加入 100 ml 人工肠液混匀,隔一定时间取 1 ml 上清液备检,同时用等量人工肠液补足。同样方法分析上清液中蛋白质含量,计算微球的释药速率。

1.3 结果

1.3.1 微球的镜下形态 离心洗涤后的微球大小形态规则。冻干后则呈不规则分布,形态呈现出杆状、梭状以及扁圆状等诸多不规则形状。用等量蒸馏水复溶后,镜下可见微球数量以及形态基本恢复到冻干前的特征(图 1)。

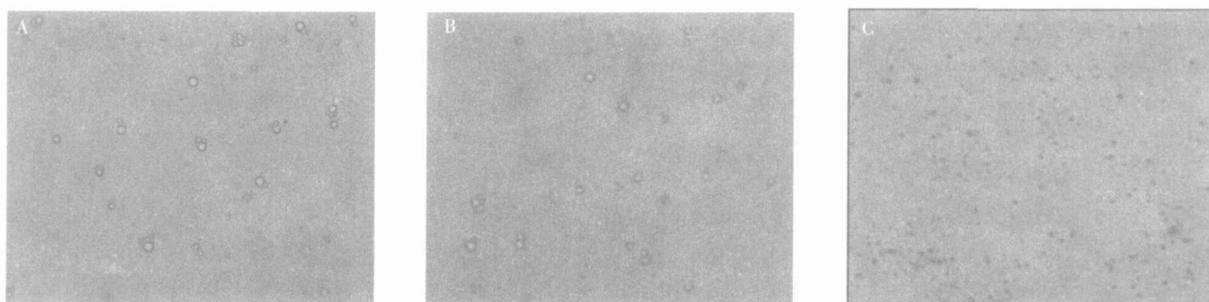


图 1 微球冻干前(A)、后(B)及复溶后(C)的形态 ×640 倍

Fig 1 The forms of microspheres before(A), after(B) lyophilized and after swelling in distilled water(C) ×640

1.3.2 SEM 观察 微球悬液自然干燥后,经固化、

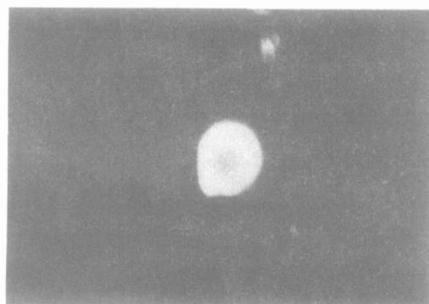


图 2 微球的电镜扫描照片 ×5000

Fig 2 The SEM of microsphere ×5000

脱水等程序处理后,形态基本保持不变。SEM 观察可见微球表面完整、光滑,基本呈球形,符合实验要求(图 2)。

1.3.3 粒径分布 经粒径分布仪检测发现,所得微球粒径均匀,所形成的粒径峰比较狭窄,平均粒径为 3.33 μm(图 3)。

1.3.4 包封率及释放模式 经 BCA 总蛋白测定,可知蛋白包封率为 64.8%。同样,检测不同时段微球所释放的蛋白药物,可知微球在人工胃液中基本上不释药;在人工肠液中前 10 h 释药较剧烈,达到

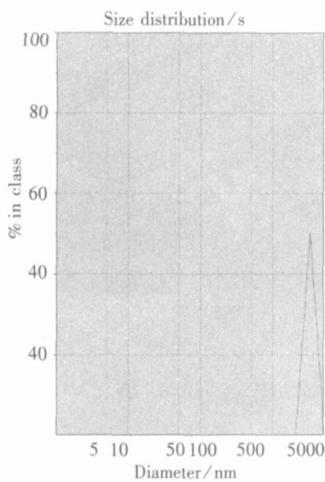


图3 微球粒径分布

Fig 3 The size distribution of microspheres

全部载药量的30%左右,而后100h内释药为总载药量的70%,呈显著缓慢释药模式(图4)。

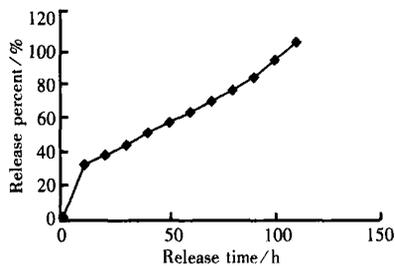


图4 微球释药时间与释药百分率的关系

Fig 4 The relationship between the release time and percentage of drug

2 讨论

应用壳聚糖、海藻酸盐为主要材料制备微球,可以避免原工艺中所用的有机溶剂及高温制备环境,减少了蛋白药物的损失,且所用物质全部为天然高分子物质,在人体内可自然降解,无害残留,微球工艺的改善对于药物尤其是蛋白质药物的投递提供了崭新的思路。

文献报道^[6],在微球的制备中,粒径大小决定了其在体内各器官的分布。当微球粒径10 μm 时,微球易定向于派伊尔结(Peyer's patches, PP结);粒径5 μm 的微球弥散性分布于肠系膜淋巴结、血液循环系统和脾的巨噬细胞内,产生IgG;粒径>5 μm 的微球滞留在富含B细胞的PP结内,受抗原物质致敏的B细胞迁居于各种黏膜组织,从而诱导机体产生全身或局部的黏膜sIgA抗体。人为把握微球

制作工艺,将其粒径控制在一定范围内,有助于最大限度地发挥其免疫效力。可见,以诱发肠道黏膜免疫为主要目的的HP疫苗,所需微球粒径在10 μm 以内。文中所制备微球在镜下观察,粒径均匀,大小均符合要求。

微球的扫描电镜能够较详细地对微球表面进行扫描观察和分析。本文利用自然干燥的微球进行扫描,主要考虑到扫描电镜标本必须为固体粉末,而冻干制剂虽然满足固体标本的要求,但经光镜观察可知其表面形态会有较大程度的改变,对微球物理特征的客观分析会造成一定的误导和干扰。而自然干燥的微球因水分丢失不多,表面不会有较大程度的改变,又基本符合固体制剂的要求,可进行相关电镜扫描观察分析。

实验所用人工胃液及人工肠液的配制参见卫生部《生物制品检定规程》,采集时间参照人体生理参数确定。经检测,所制备的微球对蛋白具有较好的包封率,释药模式达到药物缓释要求,是较成功的疫苗微球制剂。

在微球制备过程中采用了材料多种配成比例,所得结果不尽相同,另文发表。在疫苗释药检测过程中,由于观察时间较长,所以跨度较大,造成结果有一定的偏差。适当缩短时间间隔,会有更加客观的资料对结果进行可靠的分析判断。

参考文献:

- [1] Ruggiero P, Peppoloni S, Rappuoli R, et al. The quest for a vaccine against *Helicobacter pylori*: how to move from mouse to man? [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(8): 749
- [2] Jiang Z, Huang AL, Tao XH, et al. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M(r) 18,000 OMP from *Helicobacter pylori* [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(8): 1756
- [3] Hejazi R, Amiji M. Stomach-specific anti-*H. pylori* therapy. I: Preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2002, 235(1-2): 87
- [4] Lin JH, Weng CN, Liao CW, et al. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hypopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method [J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65(1): 69
- [5] Chan LW, Heng PW. Effects of aldehydes and methods of cross-linking on properties of calcium alginate microspheres prepared by emulsification [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(5): 1319
- [6] Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, et al. Biodegradable microsphere as a vaccine delivery system [J]. *Mol Immunol*, 1991, 28(3): 287

收稿日期:2005-03