

·论 著·

壳聚糖-海藻酸钠包裹幽门螺杆菌全菌蛋白微球疫苗制备工艺研究*

王毅超¹, 邹全明¹, 任建敏¹, 郭刚¹, 解庆华¹, 刘健²

(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 改变壳聚糖-海藻酸钠包裹幽门螺杆菌全菌蛋白微球制备中的各项参数, 最终确认微球制备工艺。方法 根据形成乳液的溶解性、流动性及黏稠度, 选择微球制备过程中海藻酸钠 (AGS) 浓度及植物油与海藻酸钠的配比, 通过比较形成微球的粒径大小, 最终确定微球制备中 CaCl_2 溶液的滴定程序及搅拌速率、搅拌时间等实验参数。结果 确定了 AGS 乳液浓度为 2%、植物油与 AGS 乳液配比为 2:8、 CaCl_2 溶液反滴定法等 MS 制备工艺, 并确定了搅拌速率 800r/min、药物浓度 2mg/ml、制备温度 25℃、搅拌时间 30min 等参数。结论 依照上述参数可以制备出符合实验要求的微球疫苗。

关键词: 微球; 工艺; 幽门螺杆菌

中图分类号: R979.5; R943

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2007)13-1285-03

Study of the microspheres technology of *Helicobacter pylori* whole cell protein encapsulated by chitosan-alginate

WANG Yi-chao, ZOU Quan-ming, REN Jian-min, et al.

(1. Department of Clinical Microbiology and Immunology, Chongqing Engineering Technology Research Center of Biopharmaceuticals, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Affiliated Hospital of Beihua Medical University, Jilin 132011, China)

Abstract: **Objective** To obtain the technology of *Helicobacter pylori* whole cell protein encapsulated by chitosan-alginate through the change of the technology parameter. **Methods** To choose the concentration of the AGS and the ratio between AGS and vegetable oil on the basis of the dissolvability, flowability and mucosity and to determine the speed and time of the mixture and methods of the titration through studying the size of the microsphere. **Results** Some parameters were defined. The concentration of alginate sodium (AGS) was 2%, the matching of the oil and AGS was 2:8, the procedure was reverse titration. The four factors affecting the MS diameter with iso-project method were analyzed. The defined parameters were as follows: the mix speed of 800rpm, drug concentration of 2mg/ml, environment temperature of 25℃ and mix time of 30min. **Conclusion** The microsphere may be prepared successfully according to the above-mentioned technologic parameters.

Key words: microsphere; technology; helicobacter pylori

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP) 是定植于人胃黏膜并可引起慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等的致病菌^[1,2], 现阶段全球人群的感染率达 50% 以上, 发展中国家更高, 临床上目前使用的常规治疗方案不足以根治 HP 感染^[3], 且费用昂贵、患者依从性差、容易复发, 因此预防接种将成为控制并最终消灭 HP 感染的有效手段。在疫苗接种过程中, 简单、便捷、有效的给药途径是疫苗应用的基本要求。目前研究中的 HP 疫苗主要有注射^[4]、滴鼻^[5]、直肠黏膜直接注入^[6]、胃肠内外联合给药及口服^[7]等免疫方式, 其中口服途径给药以服用方便、患者依从性好等特点成为 HP 疫苗接种的首选方式, 但疫苗容易受到消化道内酸性、酶类物质的破坏。可见新型疫苗剂型研究将成为最终制约其免疫效果的关键问题。近年来, 随着可降解生物高分子材料研究的迅猛发展, 诸如脂质体、微球 (microsphere, MS)、微囊以及纳囊等技术的出现为上述问题的解决提供了新的思路。其中 MS 不仅能有效保护抗原物质在胃肠道内不易被酸、酶类物质破坏, 最大限度地保持抗原活性, 而且还具有其他普通制剂所不能媲美的靶向性、长效缓释作用及佐剂功能^[8-10]。

本研究首次将可降解天然高分子材料——CTS、AGS 运用到 HP 缓释 MS 制备中, 通过系统摸索微球制备过程中材料浓度、材料配比、滴定程序、搅拌时间、搅拌速率等工艺参数, 最

终确定了微球制备流程并制备出符合实验要求的微球疫苗, 为后续试验奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料 HP 菌株: 澳大利亚悉尼株 (Sydney strain, SS1) 菌株, 为鼠高感染适应株, 由澳大利亚 Lee 教授馈赠并由本室保存。

Leitz Diaplan 光学显微镜 (Wild MPS46); AMRAY 型扫描电子显微镜 (AMRAY); 美国科美粒径分析仪 (Malvern instrument Ltd, 3000HSA); 低温高速离心机 (美国 Beckman 公司); 高速乳化制作器 T25B (美国 Beckman 公司); JY92 型超声波细胞破碎机 (宁波新芝科学仪器研究所); L-902 定时磁力搅拌器 (上海浦江分析仪器厂); Delta 320 型 pH 计 (梅特勒仪器公司); 实验室纯水系统 (Milipore USA); HWS-20 恒温水浴箱 (江苏太仓实验设备厂); 5415C 型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (碧云天试剂公司 20031215); CTS (浙江温州化学试剂厂); AGS (浙江温州化学试剂厂); Spar-80 (中国医药集团上海化学试剂公司); Tween-85 (中国医药集团上海化学试剂公司); Lowry 法蛋白检测试剂盒 (本校生物化学教研室); 脑心浸液培养基 (本室制备)。

1.2 方法

* 基金项目: 国家“十五”课题资助项目 (2001AA215161); 国家“863”课题资助项目 (2003AA215020)

1.2.1 AGS 浓度的筛选 准确称量一定量的 AGS 粉末, 加入到双蒸水中, 高速乳化混匀, 分别配制成为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 及 3% (w/v) 等 6 个不同浓度的乳浊液, 根据其溶解性、流动性、黏稠度等因素选择适合浓度。加入预先准备好的 HP 全菌蛋白 (HP whole cell protein, HPWCP), 低温磁力搅拌器搅拌至完全溶解。

1.2.2 植物油与 AGS 乳液比例筛选 将植物油与 AGS 浓度为 2% 的上述乳液分别按体积比 1:9、2:8、3:7、4:6 及 5:5 等不同比例混合, 800r/min 高速乳化成球, 根据混合物的流动性、黏稠度及乳化后的成球情况筛选出合适配比。

1.2.3 表面活性剂 Tween-85 和 Spar-80 比例筛选 在 MS 制备中经常会应用亲水相的 Tween-85 和亲油相 Spar-80 作为表面活性物质, 对于不同的包裹方案其活性系数 HLB 要求是不同的, 其计算公式为:

$$HLB_{混合} = \frac{HLB_T \cdot V_T + HLB_S \cdot V_S}{V_T + V_S}$$

式中 HLB_T 代表 Tween-85 的表面活性系数 = 15; V_T 代表加入到总体系中 Tween-85 的体积数; HLB_S 代表 Spar-80 的表面活性系数 = 1.8; V_S 代表加入到总体系中 Spar-80 的体积数; $HLB_{混合}$ 为二者混合后的表面活性系数。

一般来讲, 对于 W/O 乳化剂而言, 其 HLB 混合要求在 3~8 之间效果比较理想, 所以在本实验中我们选用表面活性剂 Spar-80 与 Tween-85 的体积比为 2:3, 其 $HLB_{混合}$ 值为 6.2, 比较适于制备 W/O 乳剂。

1.2.4 $CaCl_2$ 溶液的滴定程序确认 确定相同的配料比及固定搅拌速率、搅拌时间等可变因素, 选取正滴或反滴的滴定程序进行工艺探索, 根据混合物的成球比例、稳定性、时间等因素筛选出适合的滴定程序, 制备出海藻酸钠包裹的 HP 全菌蛋白微球 (HPWCP-AMS)。

1.2.5 HPWCP-AMS 的再包裹 将上述 MS 乳液 3 000r/min \times 15min 离心后收集沉淀, PBS 洗涤两次后用 1% CTS 溶液混匀, 800r/min \times 30min 搅拌完成再包裹制备出壳聚糖-海藻酸钠包裹的 HP 全菌蛋白微球 (HPWCP-CAMS)。

1.2.6 乳化法制备 HPWCP-CAMS 的工艺筛选 选用均匀设计表, 据文献资料和预实验结果确定影响 BSA-CAMS 粒径和溶出速率常数的主要因素有 4 个: 乳化速率、BSA 浓度、乳化时间及制备温度。本研究中每个变量设有 3 个水平, 为使实验结果更可靠, 采用水平处理为 9 组进行实验研究。根据所得 MS 粒径大小确认最佳工艺参数组合。

1.2.7 HPWCP-CAMS 的粒径测定 将上所述制备的 MS 混匀后直接采样检测, 求取粒径平均值及分布范围。本部分实验由本校寄生虫学教研室协助完成。

2 结 果

2.1 AGS 浓度的筛选 AGS 为可生物降解的天然高分子物质, 性质比较稳定, 溶解度较低, 在高速乳化作用下可形成乳浊液, 其溶解性、流动性以及黏稠度与 AGS 的加入量有直接关系。本实验参考预实验结果, 选择了 6 个浓度进行观察, 根据最终形成乳浊液的溶解性、流动性及黏稠度等指标从中筛选出较满意的 2% 作为工作浓度, 实验结果见表 1。

2.2 植物油与 AGS 乳液比例筛选 植物油为制备工艺中的油相, 与 AGS 乳液的配成比例决定了能否最终形成 MS, 成球后表面稳定性、粘连度、脆性及崩解性等结果。本实验采用已筛选出的 2% AGS 乳液为水相, 植物油与 AGS 乳液按体积比 1:9、2:8、3:7、4:6 及 5:5 等不同比例混合, 800r/min 高速乳化成球, 根据混合物的流动性、黏稠度、均一度及乳化后的

成球状况进行筛选。由表 2 可以看出当二者比例为 2:8 时所得混合液成球后各项指标比较符合实验预设要求。

表 1 不同浓度 AGS 乳液特征比较结果

| 项目 | AGS 浓度 (w/v) | | | | | |
|-----|--------------|------|------|------|------|----|
| | 0.5% | 1.0% | 1.5% | 2.0% | 2.5% | 3% |
| 溶解性 | ++ | ++ | + | + | - | - |
| 流动性 | ++ | ++ | + | + | + | ± |
| 黏稠度 | - | - | - | + | + | ++ |

“++”表示流动性好或溶解性好或黏稠度大; “+”表示流动性较好或溶解性较好或黏稠度较大。“±”表示流动性一般; “-”表示溶解性差或黏稠度低。

表 2 植物油与 AGS 乳液按比例混合结果比较表

| 项目 | 植物油 海藻酸钠乳液 (v/v) | | | | |
|------|------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 1:9 | 2:8 | 3:7 | 4:6 | 5:5 |
| 流动性 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 黏稠度 | - | - | - | - | - |
| 成型状况 | + | ++ | + | - | - |
| 稳定性 | - | + | - | - | - |

“++”表示流动性好或成型状况好; “+”表示成型状况较好或稳定性较好; “-”表示稳定性差或黏稠度低或成型状况差。

2.3 $CaCl_2$ 溶液的滴定程序确认 $CaCl_2$ 溶液在本 MS 制备工艺中的作用是提供 Ca^{2+} 形成交联支架, 从而使 MS 稳定性进一步增强, 以抵御在给药过程中胃酸、酶类物质对 MS 内部所载蛋白抗原的破坏。另外也可以达到药物缓释的作用。本实验中选取正滴及反滴的滴定程序进行工艺探索, 根据混合物的成球比例、成球的稳定性、成球时间等因素筛选出比较适合的滴定程序: (1) 正向滴定法: 将 2% 的 $CaCl_2$ 溶液缓慢滴入前期乳化后形成的 MS 乳液中, 可见随着 $CaCl_2$ 溶液的加入, 早期在混合液较小区域中形成镜下可见的少量固化 MS, 粒径相对较大且相互间有粘连。随着 $CaCl_2$ 溶液的进一步加入, 乳液中随即形成难溶解白色絮状物质, 再加入 $CaCl_2$ 溶液或加大搅拌速率此物质也不会复溶。(2) 反向滴定法: 在保持上述各项参数的前提下, 将前期乳化后形成的 MS 乳液缓慢滴入到过量 (一般为 2 倍体积) 的 2% 的 $CaCl_2$ 溶液中, 可见乳滴在加入瞬间便可以分散开来, 直至加入后混合物中所形成的固化 MS 剂仍比较稳定, 并未出现正向滴定法中所出现的絮状沉淀物, 镜下观察可见所形成的固化 MS 大小均一, 稳定性好。

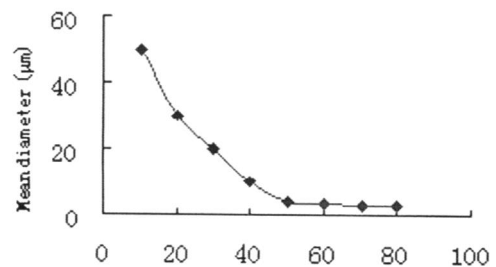


图 1 液面距与 MS 粒径之间的关系

2.4 液面距对 MS 粒径及质量的影响 在前期预实验结果中发现, 注射器针头与液面之间的距离对于乳滴滴入 $CaCl_2$ 溶液中所形成的粒径有较大影响。本实验中固定植物油与 2% 浓度的 AGS 乳液 2:8 比例、搅拌速率 800r/min 不变, 调整注射器针头与 $CaCl_2$ 溶液液面之间的距离, 镜下粗略观察所得 MS 的粒径分布, 结果显示随着液面距的增加所得 MS 的平均粒径

变得越小,当达到 50mm 以上时,MS 粒径变化不明显,见图 1。

2.5 HPWCP-CAMS 制备工艺参数方差分析 选用均匀设计表,对影响 BSA-CAMS 粒径较关键的 4 个因素:药物浓度(A)、搅拌速率(B)、制备温度(C)及搅拌时间(D)进行方差分析,结果显示当速率为 800r/min 时其所形成的 MS 粒径在 3 μ m 左右,速率降低则粒径变大,速率增加则粒径变小,结果见表 3。

表 3 HPWCP-CAMS 制备工艺参数对粒径的影响

| 水平 | 参数 | | | | (μ m) |
|----|----------|----------|------|--------|------------|
| | A(mg/ml) | B(r/min) | C() | D(min) | |
| 1 | 1 | 500 | 25 | 60 | 10.2 |
| 2 | 1 | 800 | 37 | 30 | 3.4 |
| 3 | 1 | 800 | 4 | 10 | 3.7 |
| 4 | 1.5 | 1 000 | 4 | 10 | 2.0 |
| 5 | 1.5 | 500 | 25 | 60 | 14.3 |
| 6 | 1.5 | 500 | 4 | 30 | 18.7 |
| 7 | 2 | 800 | 4 | 30 | 3.5 |
| 8 | 2 | 1 000 | 25 | 10 | 1.8 |
| 9 | 2 | 1 000 | 37 | 60 | 1.6 |

方差分析看出,影响 HPWCP-CAMS 粒径大小的因素中,其主次顺序为搅拌速度 > 药物浓度 > 搅拌时间 > 制备温度。将上表中数据利用 SPSS 软件进行多元回归分析并对回归方程作方差分析, $F = 0.021$, 回归方程有统计学意义,回归方程为:

$$Y() = 27.034 + 4.209A - 0.0329B + 0.0183C - 0.0566D$$

4 个因素中搅拌速度(B)对 MS 粒径大小影响显著 ($P < 0.05$)。

根据以上结果,本实验筛选出一组较适合的数据作为 HPWCP-CAMS 制备工艺参数:药物浓度 2mg/ml、搅拌速率 800r/min、制备温度 25、搅拌时间 30min。

2.6 微球粒径测定 根据以上方差和多元回归分析确定实验参数,制备 HPWCP-CAMS,通过光学显微镜及电子显微镜观察其表面饱满、大小均一,平均粒径为 3.33 μ m,符合预设实验要求。

3 讨 论

目前基因工程肽、蛋白类药物在临床应用中的优势日益突出,但其疗效却因稳定性差、半衰期短而大受限制。虽然 MS 能在体内起到有效防止胃酸、蛋白酶类物质对抗原的降解和破坏作用,最大限度地携载蛋白类药物到达靶器官后缓慢释放,但能够实现上述目的的前提条件是 MS 必须能够有效地携带蛋白类药物,由于多肽和蛋白质对温度、pH 值、有机溶剂、搅拌剪切力等条件十分敏感,如果在 MS 的制备过程中没有注意或未能有效克服上述不利因素,则 MS 本身也就失去了其携载药物进而发挥作用的意義。因此,MS 的制备不仅需要生物相容性好的材料,还要求温和的制备条件。目前 MS 制备的方法主要有溶媒挥发法^[11]、喷雾干燥法^[12]、化学交联法和复凝聚法,以上方法在 MS 制备过程中对蛋白类药物都有不同程度的破坏。

本研究采用乳化、复凝聚法相结合,制备过程未加入对蛋白有较大破坏作用的有机溶剂,代之以植物油作为油相,将其与 A GS 乳液相结合制备出一级乳。在对滴定程序进行选择时发现,正滴方法出现大量难溶的白色絮状沉淀,而反滴则未出现上述现象。其原因可能是因为在正向滴定时由于乳液中的

高分子密度较大,相互之间作用力较强,当加入 Ca^{2+} 时能迅速形成交联,并进一步使 MS 之间相互粘连而形成难溶性的沉淀;而在反向滴定中当乳滴迅速进入到 $CaCl_2$ 溶液时,由于剪切力及搅拌作用,其可被溶液中存在的大量水分子迅速隔离并充分扩散开,使 MS 相互之间不能形成粘连,从而形不成沉淀物。在对一级乳进行再次包裹时,由于考虑到主要应用 A GS 与 CTS 之间的静电引力使 CTS 在其外围再次包裹形成复乳,所以实验中未对液体的搅拌速率、制备温度及作用时间进行分析,而是直接采用文献报道比较多的 1%CTS 浓度直接与其作用,结果显示 MS 粒径并未有明显变化,说明此方法是可行的。

参考文献:

- [1] Sutton P, O'Rourke J, Wilson J, et al. Immunisation against *Helicobacter felis* infection protects against the development of gastric MALT lymphoma [J]. *Vaccine*, 2004, 22(20):2541.
- [2] Godshall CJ. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in patients with peptic ulcer disease [J]. *Am J Surg*, 2002, 183(1):2.
- [3] Chang CC, Pan S, Chen SH, et al. Development of multifocal duodenal erosions after anti-*Helicobacter pylori* triple therapy [J]. *J Formos Med Assoc*, 2003, 102(12):840.
- [4] Miyashita M, Joh T, Watanabe K, et al. Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori* catalase [J]. *Vaccine*, 2002, 20(17-18):2336.
- [5] Keenan J, Neal S, Allardyce R, et al. Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection [J]. *Vaccine*, 2002, 20(23-24):2981.
- [6] Quiding Arbrink M, Ahlstedt I, Lindholm C, et al. Homing commitment of lymphocytes activated in the human gastric and intestinal mucosa [J]. *Gut*, 2001, 49(4):519.
- [7] Jiang Z, Tao XH, Huang AL, et al. A study of recombinant protective *H. pylori* antigens [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(2):308.
- [8] 张纲,谭颖徽,卢来春,等. bFGF-PLA 缓释纳米微球的制备及体外释药的研究 [J]. *重庆医学*, 2006, 35(11):1002.
- [9] 雷山川. 自身疣体疫苗与卡介菌多糖核酸微球复乳治疗尖锐湿疣分析 [J]. *重庆医学*, 2004, 33(5):751.
- [10] 童一平,王凯,蔡玉瑾. 脂微球载体前列腺 E_1 治疗 40 例老年心力衰竭 [J]. *重庆医学*, 2002, 31(7):628.
- [11] Li X, Deng X, Huang Z, et al. In vitro protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases [J]. *Pharm Res*, 2001, 18(1):117.
- [12] Giunchedi P, Conti B, Genta I, et al. Emulsion spray-drying for the preparation of albumin-loaded PLGA microspheres [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2001, 27(7):745.

(收稿日期:2006-12-30)