

重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位鼻腔免疫凝胶剂的研制

高志刚¹, 邹全明², 刘凤英³, 曹向光¹ (1. 白求恩国际和平医院 256 临床部, 石家庄 050800; 2. 第三军医大学临床微生物及免疫学教研室, 重庆 400038; 3. 河北医科大学第四医院, 石家庄 050011)

摘要:目的 研制重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位疫苗凝胶剂, 考察其特性及免疫效果。方法 以卡泊波为基质, 脱氧胆酸钠为黏膜吸收促进剂, 制备凝胶剂, 以落球法测定凝胶的黏度, SDS-PAGE 电泳分析脱氧胆酸钠对蛋白纯度的影响, 以免疫印迹检测疫苗蛋白的完整性, 以留样观察法及离心法考察凝胶的稳定性, 以含抗原凝胶剂鼻腔免疫 BALB/c 小鼠, 并与溶液剂相比较, 考察凝胶剂的免疫效果。结果 制备的凝胶剂稳定性好, 凝胶的黏度为 8050 mPa·s, 脱氧胆酸钠不影响蛋白的纯度, 抗原蛋白的完整性良好。小鼠鼻腔免疫凝胶剂后产生了较强的特异性血清 IgG 及胃肠 sIgA 反应, 优于液体免疫。结论 重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位凝胶剂性质稳定, 具有生物黏附性, 可提高免疫效果, 是较好的鼻腔免疫剂型。

关键词: 重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位; 卡泊波凝胶剂; 鼻腔免疫

中图分类号: R944.15; R915.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)06-0479-04

Preparation of Intranasal Immunization Gel Containing Recombinant Helicobacter Pylori Urease B

GAO Zhigang¹, ZOU Quanming², LIU Fengying³, CAO Xiangguang¹ (1. 256 Clinical Department, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050800, China; 2. Department of Clinical Microbiology and Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. The fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare Gel vaccine Containing recombine Helicobacter pylori UreB (rUreB) and study its physical properties and immune efficiency by nasal route. **METHODS** The gel was prepared by carbopol. Sodium deoxycholate was applied to

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2001 AA215161)

作者简介: 高志刚, 男, 硕士

Tel: (0311) 81567091

E-mail: zgga068@sohu.com

help the absorption of drug through mucosa. The Viscid coefficient and stability of gel were studied. The antigenic integrity was evaluated by western blotting. The immune efficiency was evaluated by intranasal immunization in BALB/c mice. **RESULTS** A stable gel was prepared with Viscid coefficient of 8050 mPa·s. The results of western blotting showed that rUreB contained in gel was stable. The rUreB gel can induced a stronger antibody response (IgA and IgG) than that of rUreB solution. **CONCLUSION** Stable rUreB gel is a good preparation to enhance immune efficiency by intranasal immunization.

KEY WORDS: Helicobacter pylori Urease B; carbopol gel; intranasal immunization

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是定植于人体胃黏膜的重要致病菌, 与慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生、发展密切相关^[1]。1994 年世界卫生组织 (WHO) 将幽门螺杆菌定为 I 类致癌因子。药物治疗 Hp 存在多种局限性 (药物的不良反应、费用昂贵、患者依从性差及耐药菌株不断增多等), 而疫苗接种可使人群获得强而持久的免疫力, 是消除 Hp 的有效措施之一^[2]。Doidge 等^[3]研究证明, 重组尿素酶 B 亚单位 (rUreB) 及适当佐剂免疫动物后不仅能产生抗 Hp 感染的免疫保护作用, 而且可清除已感染动物体内的 Hp。

目前, 国内外对幽门螺杆菌疫苗的研究仅局限在口服免疫, 根据黏膜共同免疫系统 (common mucosal immunity system, CMIS)^[4]理论, 在一黏膜部位接种可在其他远距离黏膜部位产生免疫应答, 因此, 鼻腔也可作为黏膜接种途径。笔者研制了适合鼻腔免疫的凝胶剂, 并研究了凝胶剂的免疫效果, 为重组幽门螺杆菌疫苗的进一步研究打下了基础。

1 材料

1.1 仪器

L-902 型定时恒温磁力搅拌器, 上海浦江分析仪器厂; 电泳仪 PAC-300, BIO-RAD; 凝胶图象扫描分析仪 UVP7500, USA GDS; 酶标仪 A-5082, 奥地利 TECAN; 低温高速离心机 J2-Mc, 美国 Beckman 公司。

1.2 主要试剂

脱氧胆酸钠 (进口分装), 中国医药集团上海化学试剂公司; 卡波波-934 (Carbopol), 美国 BFGOODRICH 惠赠; 重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位, 第三军医大学临床微生物及免疫学教研室制备。

1.3 动物

健康雌性无特定致病菌 (SPF 级) BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 由第三军医大学实验动物中心提供 (合格证号为 310101014)。

2 方法

2.1 凝胶剂的制备

2.1.1 凝胶剂的制备 将 2 g 卡波波-934 散于 100 mL 蒸馏水中, 静置过夜, 搅拌均匀制成 2% 的卡波波。采用无菌操作, 抗原溶液 (含抗原 200 mg) 中加入 2% 的卡波波液 100 mL 及脱氧胆酸钠 (SDT) 2 g, 混匀后, 边搅拌边用 10% NaOH 调节 pH 7~8, 补加蒸馏水至 200 mL, 搅拌均匀, 3000 r·min⁻¹, 离心 15 min, 除去凝胶中空气, 得 1% 中性卡波姆凝胶, 分装, 抗原含量为 1 mg·mL⁻¹。

2.1.2 凝胶的黏度测定^[5] 由于凝胶的黏度较高且透明度

好, 故采用落球法测定黏度系数

$$\text{公式为: } \eta = \frac{ga^2(\rho - \rho_0)}{18\eta(1 + 2.4a/b)(1 + 3.3a/h)}$$

公式中 g 为重力加速度 (N·kg⁻¹), a 为小球的半径 (m), b 为圆筒的半径 (m), ρ 为小球的密度 (kg·m⁻³), ρ₀ 为液体的密度 (kg·m⁻³), η 为小球的终速度 (m·s⁻¹), h 为圆筒的高度 (m), η 为黏度 10³ mPa·s。

2.1.3 脱氧胆酸钠 (SDT) 对 rUreB 的影响 抗原溶液中分别加入 1% 的脱氧胆酸钠, 在 4℃ 放置 1 d、10 d 及 30 d, 分别取样进行 SDS-PAGE 电泳, UVP 凝胶扫描蛋白分析系统分析蛋白的纯度。

2.2 凝胶剂的质量控制

2.2.1 性状 本凝胶剂应为透明糊状。

2.2.2 凝胶剂 pH 值测定 凝胶 2 g 加水 20 mL, 溶解均匀后 pH 计测定 pH 值。

2.2.3 稳定性试验 取凝胶 10 g, 装入带刻度的离心管内, 3000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 观察凝胶的分层情况。另取凝胶 10 瓶 (每瓶 10 g) 在 4℃ 冰箱内放置 6 个月, 观察凝胶外观、pH 值及抗原浓度的变化。

2.2.4 抗原含量测定 标准曲线的制备: 按 Lowry 法测定蛋白浓度, 以浓度和吸光度作线性回归, 浓度和吸光度具有良好的线性。精密量取抗原凝胶 2.0 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 过滤, 弃除初滤液, 精密移取续滤液 2.0 mL, 按标准曲线法测定含量, 计算百分含量。

2.2.5 疫苗凝胶的回收率测定 按处方比例, 精密量取抗原和基质溶液, 共置于 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 过滤, 弃除初滤液, 精密移取续滤液 2.0 mL, 稀释至 50 mL, 并精密称定同量该基质, 同法稀释。以基质为空白, 按标准曲线方法操作, 在分光光度计上测定吸光度, 代入标准曲线计算含量, 并与投入量相比, 求得回收率。

2.2.6 抗原的完整性检查 将所制凝胶用蒸馏水适当稀释, 过滤, 滤液进行 SDS-PAGE 电泳, 然后进行 Western blotting 分析。

2.3 rUreB 凝胶剂的免疫效率

2.3.1 实验分组 每组 10 只 BALB/c 小鼠。免疫剂量: 10 μg/只/次。A 组: 磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照组; B 组: rUreB 溶液剂; C 组: 未加脱氧胆酸钠的 rUreB 凝胶剂; D 组: rUreB 凝胶剂。

2.3.2 动物免疫 乙醚轻度麻醉小鼠, 以自制的聚乙烯微量滴管鼻腔接种疫苗 (10 μL/只)。

2.3.3 血清、胃黏液、肠黏液样品的采集及免疫后小鼠特异

性抗体的检测^[6-7]。

3 结果

3.1 凝胶剂的制备

3.1.1 凝胶的黏度测定 凝胶的黏度系数为 8050 mPa·s。

3.1.2 脱氧胆酸钠对疫苗抗原的影响 SDS - PAGE电泳结果见图 1,抗原与脱氧胆酸钠混合放置 1 个月,未发生明显的降解,表明抗原不受脱氧胆酸钠的影响。

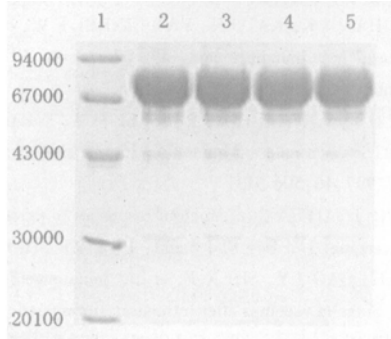


图 1 SDS - PAGE检测脱氧胆酸钠对 rU的影响
第 1 列:蛋白标记;第 2 列: rUreB;第 3 列: rUreB加入 SDT后 4 °C 放置 1 d;第 4 列: rUreB加入 SDT后 4 °C 放置 10 d;第 5 列: rUreB加入 SDT后 4 °C 放置 30 d

Fig 1 Effect of SDT on rUreB by SDS - PAGE
Lane 1: protein marker; Lane 2: rUreB; Lane 3: rUreB plus SDT store at 4 °C for 1 d; Lane 4: rUreB plus SDT store at 4 °C for 10 d; Lane 5: rUreB plus SDT store at 4 °C for 30 d

3.2 凝胶剂的质量控制

3.2.1 凝胶剂 pH 测定 疫苗凝胶的 pH 值为 7.5 ± 0.5 (n = 3)。

3.2.2 稳定性试验 经离心后凝胶未出现分层现象;4 °C 观察 6 个月,凝胶没有分层、霉败,外观、pH 及抗原浓度均无明显变化,见表 1。

表 1 凝胶剂 4 °C 放置 6 个月稳定性观察

Tab 1 Investigation of stability on gel during storage at 4 °C for 6 months

时间	凝胶剂外观	pH 值	抗原浓度 /mg·mL ⁻¹
第 0 个月	无色透明黏稠体	7.5	1.02
第 1 个月	无色透明黏稠体	7.5	1.01
第 2 个月	无色透明黏稠体	7.4	1.02
第 3 个月	无色透明黏稠体	7.4	1.03
第 4 个月	无色透明黏稠体	7.3	1.02
第 5 个月	无色透明黏稠体	7.3	1.01
第 6 个月	无色透明黏稠体	7.3	1.00

3.2.3 抗原含量测定 抗原百分含量平均值为 102.3%, RSD 为 1.86% (n = 3)。

3.2.4 凝胶的回收率 凝胶的回收率平均值为 99.4%, RSD 为 0.26% (n = 3)。

3.2.5 抗原的完整性检查 免疫印迹结果见图 2,可以看出,抗原制备成凝胶后,仍具有较强的免疫反应性。

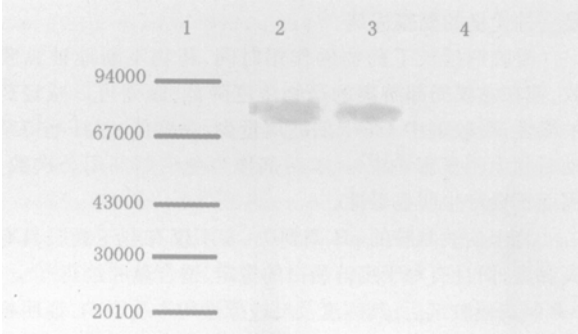


图 2 rUreB凝胶免疫印迹结果
第 1 列:蛋白标记;第 2 列: rUreB 溶液;第 3 列: rUreB 凝胶;第 4 列: PB 凝胶;注:以抗 rUreB 兔血清作为首选抗体

Fig 2 Western blotting test of rUreB gel
Lane 1: protein marker; Lane 2: rUreB solution; Lane 3: rUreB gel; Lane 4: PB gel; Note: Rabbit anti-UreB serum as the first antibody

3.3 凝胶剂鼻腔接种的免疫效果

与对照组相比, rUreB 凝胶剂及溶液剂鼻腔免疫小鼠后均产生了较强的特异性抗体反应 (P < 0.01),凝胶剂产生的特异性抗体水平明显高于溶液剂组 (P < 0.01),未加脱氧胆酸钠 (SDT) 的凝胶组与溶液组相比胃肠特异性 sIgA 显著增高 (P < 0.05),但血清 IgG 未见增高,而凝胶中加入 SDT 后血清及胃肠特异性抗体水平平均显著增高 (P < 0.01)。见图 3。



图 3 不同剂型 rUreB 鼻腔免疫小鼠后特异性抗体水平的变化
Fig 3 Changes of specific antibody levels of mice immunized with different preparation of rUreB by nasal route

4 讨论

鼻腔免疫与口服相比更具有优越性,首先,鼻腔含有的蛋白水解酶较少,相同的小剂量抗原能被更有效地传送,刺激黏膜免疫系统;其次,鼻黏膜接种能诱导与肠相关淋巴组织 (gut associated lymphoid tissue, GALT) 形式上相似的黏膜免疫反应,并在远距离黏膜部位产生免疫应答^[8-9],徐辉等^[10]通过对痢疾杆菌不同途径免疫的研究认为,在相同剂量的抗原刺激下,鼻腔免疫比胃肠道、阴道途径免疫更早、更强地诱发几乎所有黏膜部位的 sIgA 反应,可以更有效地保护机体免遭病原体侵袭;鼻腔接种操作简单,易于被更广泛的人群接受^[11],因而,鼻腔免疫是很有潜力的疫苗接种途径。然而,鼻腔为管腔通道,传统的液体药物作用时间短。卡泊波为水溶性凝胶基质,释药快,对黏膜无刺激性,生物黏附性强,可与黏膜表面的黏液 (黏膜蛋白) 相互作用,从而延长药物在黏膜停留的时间,减少纤毛的清除,提高药物的生物利用度,增加抗原提呈细胞对抗原的摄取,所以,卡泊波也

是一种优良的黏膜佐剂^[12]。

凝胶剂延长了药物的作用时间,药物不断地被黏膜吸收,使在黏膜局部游离的药物浓度降低,因而可以减轻药物的毒性;凝胶剂中1%卡波波用量少、黏度低,对纤毛持续运动时间无明显影响^[11]。本制剂作为免疫制剂用药次数少,因而不会产生明显毒性。

将卡波波凝胶的pH调到7~8不仅有利于凝胶具有较高黏度,而且有利于疫苗蛋白的稳定,适合鼻腔给药^[12]。rU-reB制成凝胶剂后,其纯度及反应原性均未受影响,证明疫苗凝胶剂是可行的。

鼻黏膜用药方便,易于被患者接受,但大分子多肽类、蛋白类药物鼻黏膜很难吸收,本研究在凝胶剂处方中加入了脱氧胆酸钠作为黏膜吸收促进剂,可以通过使黏膜磷脂层产生混乱降低黏膜层黏度,从而提高黏膜通透性,抑制药物作用部位蛋白水解酶的作用,增加细胞间和细胞内的通透性^[13],使药物容易通过,从而提高黏膜对抗原的摄取,提高免疫效率。

凝胶剂制作简单、性质稳定、生物黏附性强,疫苗作用时间长,适合鼻腔免疫,是很有发展潜力的黏膜免疫剂型。

REFERENCES

- [1] BLANCHARD T G, CZINN S J, NEDRUD J G, *et al.* Host response and vaccine development to *Helicobacter pylori* infection [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 241(1): 181-213.
- [2] MICHETTI P. Oral immunization against *Helicobacter pylori*: a future concept [J]. *J Gastroenterol*, 1998, 33(1): 66.
- [3] DOIDGE C, GUST I, LEE A, *et al.* Therapeutic immunization against *Helicobacter* infection [J]. *Lancet*, 1994, 343(4): 914-915.
- [4] XU H, GAO J Y, SHU C L, *et al.* The experiment study of two bivalent *Shigella* vaccines immunized mice in different mucosal route [J]. *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志), 2001, 21(5): 523-526.
- [5] LIU Z C. University basic physical experiment(大学基础物理实验) [M]. Tianjin: Nankai University Press, 1996: 187.
- [6] GAO Z G, ZOU Q M, GUO G, *et al.* Immunopotency of the recombinant urease B subunit vaccine of *Helicobacter pylori* after intranasal administration to mice [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*(细胞与分子免疫学杂志), 2003, 19(1): 68-70.
- [7] FUJIIHASHI K, KATO H, VAN GINKEL F W, *et al.* A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance [J]. *Acta Odontol Scand*, 2001, 59(5): 301-308.
- [8] WU H Y, NGUYEN H H, RUSSELL M W. Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site [J]. *Scand J Immunol*, 1997, 46: 506-513.
- [9] KANL D, OYRA P L. Mucosal responses to parenteral and mucosal vaccine [J]. *Dev Biol Stand*, 1998, 95: 141-146.
- [10] XU H, GAO J Y, SHI X F, *et al.* Immunogenicity of two bivalent *Shigella* vaccines after intranasal, intragastric or intestinal administration in mice [J]. *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志), 2001, 21(5): 527-530.
- [11] ZHAO Q, DENG S H, GUO X, *et al.* Ciliotoxicity of atenolol gel for intranasal administration [J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2003, 23(5): 266-267.
- [12] ILGERS L A, GHENNE L, NICOLAS I, *et al.* Alkyl-polyacrylate esters are strong mucosal adjuvants [J]. *Vaccine*, 2000, 18(28): 3319-3325.
- [13] MAO S R, YANG H T, BI D Z. Ways of improving nasal drug absorption [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 1998, 33(11): 641-644.

收稿日期: 2006-11-07