

## 疫苗口服接种及其微粒传输系统

李凤前, 费轶博, 苏 华, 胡晋红\*

(第二军医大学 长海医院 药学部, 上海 200433)

**摘要:** 为说明疫苗口服接种产生黏膜免疫的生理学基础, 突出微粒作为口服疫苗载体的研究意义, 本文分析了肠系淋巴组织的抗原呈递及黏膜免疫反应特点, 并结合肠道吸收屏障, 进一步讨论微粒载体经肠道的摄取和转运, 阐述疫苗微粒口服接种的研究概况。参与免疫调节的 M 细胞和派伊尔集合淋巴结是口服疫苗产生免疫应答的重要部位, 采用微粒作为疫苗转运载体, 可克服肠道屏障的影响, 赋予了口服疫苗以新的内涵, 特别是凝集素化微粒在提高疫苗转运及免疫接种效率方面的作用。可见经肠黏膜免疫系统进行的疫苗口服接种, 通过微粒载体介导, 将实现定位触发和效应放大, 具有潜在的研究和应用价值。

**关键词:** 疫苗口服传输; 微粒; 纳米粒; 黏膜免疫; 派伊尔集合淋巴结; 外源凝集素

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)03 - 0245 - 07

## Oral vaccination and vaccine-entrapped microparticle delivery system

LI Feng-qian, FEI Yi-bo, SU Hua, HU Jin-hong\*

(Department of Pharmaceutical Sciences, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** In order to elucidate the physiological basis for mucosal immunity of oral vaccination and to present the essential carrier of microparticles or nanoparticles used to investigate the orally delivered vaccine, the features of antigen presentation and mucosal immune reaction in gut-associated lymphoid tissues were analyzed. Considered the morphological and physiological barriers of the gastrointestinal tract, absorption and transport of particulates were further discussed. And the studies about particulate dosage forms for oral vaccine delivery were also summarized in this review. Peyer's patches and M-cells, involved in immunoregulation, are significant areas performing the critical role in oral vaccine. The applied vesicle of microparticles could overcome the barriers of gastrointestinal tract. Oral vaccination was endowed with new connotation, especially the enhanced transport and immunization efficiencies promoted by the lectin anchored particles. In conclusion, oral vaccination mediated by particulate carrier via mucosal immune system, would contribute to the site-specific triggering and signal magnification. For vaccines, the prospects for the application of these promising carrier systems might have potential attraction for scientific research and commercial development.

**Key words:** oral vaccine delivery; microparticle; nanoparticle; mucosal immunity; Peyer's patch; lectin

近 20 多年来, 飞速发展的生物技术药物已日益受世人瞩目, 常以注射方式使用的多肽和蛋白类药物

存在制作费用高、患者不易接受、耐受性差和需专业技术人员给药等问题。从依从性和市场份额来看, 口服途径给药倍受青睐, 是给药系统研究的热点。但由于受胃肠道因素的影响, 多数蛋白类药物易失活且吸收差, 致使生物利用度低, 其口服给药系统研究仍面临挑战<sup>[1,2]</sup>。疫苗在流行病防治方面发挥重要作用, 可用于乙型肝炎、艾滋病、类风湿性关

收稿日期: 2006-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500639); 上海市科委纳米专项课题 (0552nm040).

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 21 - 25070668,  
E-mail: hujh@smmu.edu.cn

节炎、癌症及其他感染性疾病。人和动物的许多疾病是通过病原微生物与消化道、呼吸道和生殖道的表面黏膜接触而引起的,口服疫苗给药系统 (orally administered vaccine delivery system, OAVDS)使用方便且直接刺激易感染部位(胃肠道黏膜)产生抗体,在人体抵御病菌入侵,尤其是对最初在黏膜部位的病原体感染发挥重要作用,同时对儿童免疫、地区疾病的防治亦表现出特别的优势。OAVDS在减少接种次数、降低接种脱漏率、提高疫苗贮运管理效率及简化接种方式等方面具有重要意义,以胃肠道黏膜为输送部位的 OAVDS,是目前疫苗传输研究最活跃的领域之一。

就口服接种的疫苗而言,情况完全不同于其他蛋白类药物,因为抗原常以单个冲击剂量诱发机体的免疫反应,勿需多次频繁给药,且用量少,一般不受胃肠道对大分子物质的摄入限度制约。利用转基因植物生产口服疫苗越来越受到重视,美国 Roswell Park 癌症研究所和 Cornell 大学 Boyce Thompson 研究所合作,利用转基因土豆研制新型生物工程口服疫苗,并以 I 期临床试验评价了该口服疫苗的免疫原性和安全性。我国已有冻干口服福氏、宋内氏痢疾双价活疫苗、口服重组 B 亚单位、菌体霍乱菌苗等上市。最近还发现,口服接种可望控制淋病双球菌、脑膜炎球菌、幽门螺旋菌等有机体的生长和发育。

采用微粒载体可有效避免胃肠道环境对疫苗的降解作用,在实现整体式摄取后,于免疫效应部位引发高效的应答反应,可实现疫苗的单剂量接种<sup>[3]</sup>。目前,已有流感、乙肝和百日咳杆菌、支原体肺炎、破伤风等多种疫苗采用微粒形式作为口服接种的载体,源于肠毒性大肠杆菌的移生因子抗原微球的口服免疫也已进入临床前试验。

本文就疫苗口服接种的胃肠道免疫基础、吸收和转运屏障、肠道黏膜免疫的效应位点进行简要介绍,进一步分析并阐述以微粒形式进行疫苗口服接种的研究现状和新进展,包括微粒载体类型、载体材料、微粒表征及定向修饰、经细胞的摄入模式及体内效应分布等,为疫苗口服接种的研究和开发提供参考。

### 1 疫苗口服吸收和免疫反应的生理基础

为抵御疾病,肠、呼吸及生殖泌尿道的黏膜表面受“预置”防卫体系——黏膜免疫系统 (mucosal immune system) 保护,黏膜免疫的标志物分泌型 IgA (secretory IgA, sIgA) 能预防感染,使抗原穿越黏膜

屏障, IgE 反应也与黏膜屏障有关。另外,黏膜上皮中驻留的淋巴细胞可形成抵御感染的第一道防线 (first line of defense)。

胃肠道的主要功能为提供外环境和系统循环间的选择性屏障,消化并吸收营养物质、水分和电解质。哺乳动物肠系淋巴组织 (gut associated lymphoid tissue, GALT) 中的微皱褶细胞 (microfold cells, M-cells) 为抗原的进入提供了特殊通道<sup>[4]</sup>,许多生活环境中的病原体,在进入消化道后,常经胃肠道黏膜 GALT 进入体内。如图 1 所示, M 细胞能选择性地黏附和吞噬抗原,并携带完整的抗原分子穿越上皮,转运给凹腔内的免疫细胞,从而触发黏膜免疫应答。口服抗原还能诱导特异性外周免疫耐受,称为口服免疫耐受 (oral tolerance),从而防止由食物或肠道菌群引发的免疫和炎症反应,这在治疗自身免疫和炎症性疾病方面尚有巨大潜力。

图 2 反映了肠道黏膜免疫反应的基本情况<sup>[4]</sup>,具有过滤和选择性转运功能的 M 细胞,是黏膜屏障的一部分,被称为肠黏膜免疫的前哨细胞。GALT

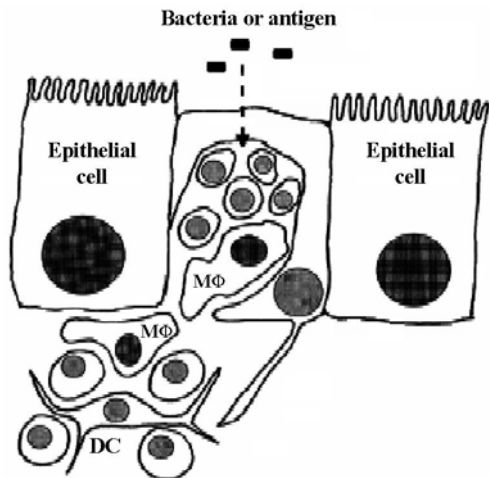


Figure 1 Schematics of M-cells overlying Peyer's patches, DC (dendritic cells)

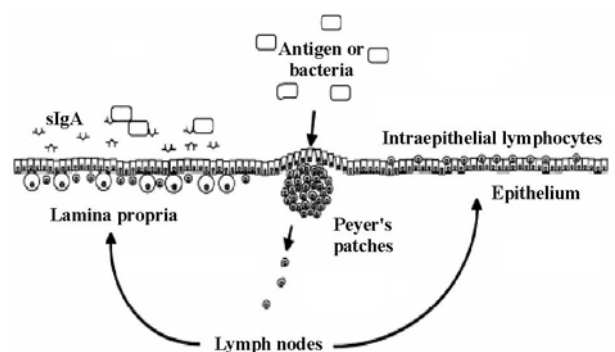


Figure 2 Overview of intestinal immune responses

中富含的派伊尔集合淋巴结 (Peyer's patches, PP) 内有许多淋巴细胞及少数巨噬细胞,对抗原的摄取具有特异性<sup>[5]</sup>,疫苗由 M 细胞吸收,转运并滞留于深层富含 B 细胞的 PP 内,受抗原致敏的 B 细胞迁居于各种黏膜组织,从而诱导局部和全身散在的黏膜 sIgA 抗体免疫反应。局部产生的 sIgA 是重要的保护性体液免疫因子,含有黏膜组织产生的 80% 抗体,不仅能在病原体进入部位的黏膜,在远端黏膜也能产生防护水平的 IgA,同时产生细胞和体液免疫,保护宿主抵抗各种病原体的侵袭。可见,参与免疫调节作用的 PP,是口服疫苗产生免疫应答的重要部位<sup>[6]</sup>。

几乎所有的病毒、细菌和寄生虫均通过感染黏膜表面而导致疾病,局部黏膜免疫与全身诱导和调节是相互独立的,但体内信号系统可使黏膜免疫应答在较远的黏膜表面也有很强的效应,这对于免疫方案和抗原传递系统的设计具有指导意义。

## 2 疫苗经胃肠道吸收产生免疫反应的形态学和生理学屏障

在过去的 20 多年里,大量的蛋白被证实,经口服给药能有效引发黏膜和系统免疫反应。这些蛋白分子可作为“载体”,协同半抗原、蛋白和微粒载体经胃肠道上皮细胞转运<sup>[7]</sup>。但口服接种往往不能实现有效的黏膜或系统免疫反应,究其原因,主要是因为经由胃肠道所引起的降解和肠壁直接穿越障碍。

经胃肠道上皮细胞的摄入依赖于同上皮细胞的特异性结合,胃肠道为蛋白和肽类药物的吸收“设置”了一系列的形态学屏障 (morphological barriers) 和生理学屏障 (physiological barriers),形态学屏障包括上皮细胞和黏膜组织,生理学屏障由胃肠道酶系、pH 及运载体等组成。口服疫苗将直接受到胃肠道中 pH 环境及各种酶系的影响,活性疫苗容易失活,另外,抗原经肠道上皮细胞的转运(由 M 细胞至 PP)途中也易被降解,其吸收效率和生物利用度通常均较低,在目标接种部位的抗原量少,一般难以引发有效的免疫应答反应。因此,进行 OAVDS 的设计时,需充分考虑胃肠道屏障对吸收和转运的影响<sup>[8]</sup>。

采用微粒包载的形式进行疫苗转运,可以克服以上屏障对疫苗的活性影响和吸收限制。胃肠道 M 细胞以特殊的机制摄入,正是由于该摄入容量的限制,赋予微囊化疫苗 (microencapsulated vaccine) 以特别的转运意义。采用物理或生物学方式(如:

电荷、粒径、疏水性、表面配体)对微粒进行修饰和优化,可抵御胃肠道因素的影响而将其有效靶向于特定的 M 细胞,使疫苗的生物信号在 GALT 中放大。近来的研究表明,上皮细胞可转化为 M 细胞而暴露于 PP 的淋巴细胞。将来若能设计并研究使上皮细胞瞬时转化为 M 细胞的识别因子,将有助于开辟促进口服疫苗递传的新模式。

## 3 微粒载体的黏膜摄取及微囊化疫苗的肠道转运

经黏膜给药后,疫苗本身难以被充分吸收,需要与促透剂、佐剂联合给药,或将其包封入微粒,进入体内产生局部抗体。微球或纳米粒可包封大多数抗原,如卵白蛋白、白喉类毒素和破伤风类毒素等,有研究表明壳聚糖载卵白蛋白微球可被 GALT 中 PP 吸收<sup>[9]</sup>。微囊化疫苗经胃肠道黏膜接种不仅增加人群适应性,而且促进抗原吸收,产生显著的黏膜免疫反应,有望成为疫苗口服接种的有效模式。

### 3.1 抗原微粒载体的体外转运细胞模型

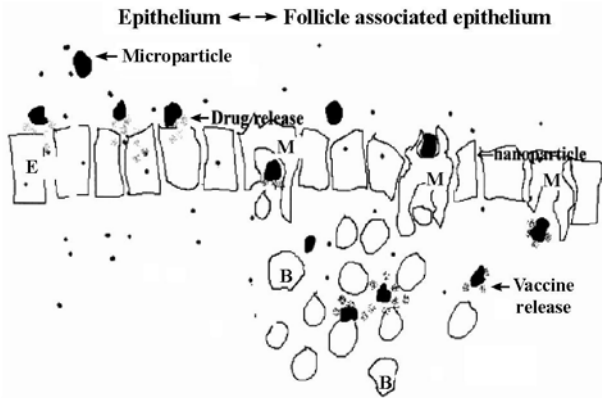
微粒抗原载体系统经由 GALT 中 M 细胞的吸收,始终是口服接种后诱导有效免疫应答反应的限速阶段。尽管已广泛在体外采用 Caco-2 细胞模型研究了可溶性药物跨肠道上皮屏障的转运,但由于缺乏相应的细胞系,在很长时期内仍不能实现对微粒 M 细胞转运的深入研究。有研究将 Caco-2 细胞和人 B 淋巴细胞共培养,可产生在形态和功能上与 M 细胞相似的细胞系,通过上皮跨膜电阻测定、<sup>14</sup>C 甘露醇转运试验和扫描电镜的形态学观察,证明了 M 细胞模型的完整性,并以流式细胞技术测量其对壳聚糖微粒和荧光标记微球的摄取情况<sup>[10]</sup>。与单独培养的 Caco-2 细胞模型相比,人 M 细胞对荧光标记微球 (0.2 μm) 和壳聚糖微粒 (1.7 μm) 口服疫苗的转运显著增高。

可见,以人 M 细胞模型可预测肠道上皮细胞对口服疫苗微粒的吸收情况,进一步检测具有 PP 定位作用的微粒,有助于筛选和优化口服疫苗微粒系统。

### 3.2 以微球为载体的口服疫苗传输

采用可生物降解材料将疫苗载入微粒系统中,可有效避开胃肠道因素对疫苗的降解,并能促进由 M 细胞的吸收<sup>[11]</sup>,从而将高浓度抗原有效递入 PP 内<sup>[12]</sup>,随着聚合物的降解而缓慢释放抗原,可以有效减少接种次数。因此,微囊化技术 (microencapsulation technique) 在保护疫苗和促进吸收方面能起到较好的协同作用。微粒系统可“克服”胃肠道屏障,由胃肠道 M 细胞以跨膜转运或细胞旁路的方式摄入(图

3)<sup>[5,9]</sup>,虽然吸收程度有限,但从疫苗引发免疫反应的特点来看,聚合物微粒可通过促进抗原呈递细胞对抗原识别的加工处理来增强免疫反应<sup>[13,14]</sup>,促进 GALT 中的“应答信号”放大。



**Figure 3** Microparticle ( nanoparticle ) transport through the follicle associated epithelium. E: Epithelial cells; M: M-cell; B: B-lymphocytes

尽管口服接种与胃肠外注射相比有许多优点,但肠道内疫苗的降解及吸收限制仍然增加了口服疫苗开发的难度。有人以壳聚糖为材料,制备了卵白蛋白的壳聚糖微粒,抗原微粒平均粒径为  $(4.3 \pm 0.7) \mu\text{m}$ ,带正电荷  $(20 \pm 1) \text{mV}$ 。进一步采用激光共聚焦扫描显微镜研究了壳聚糖微粒在鼠体内 PP 的摄取过程<sup>[15]</sup>,发现壳聚糖微粒内部包封卵白蛋白抗原的同时,在微粒外表面也有吸附或结合的抗原。场致发射显微镜结果确证所制备的壳聚糖微粒具有多孔结构,有利于对卵白蛋白的包封和吸附,对抗原的包封率可达 40%。前 4 h 释放的少量抗原(约 10%)源于微粒的表面吸附,微球内部的卵白蛋白主要在 PP 内被消化后,随材料的降解而继续释放。体内初步研究表明:荧光标记的壳聚糖微粒可被鼠 PP 上皮吸收。这也说明,由 PP 吸收是口服疫苗摄入的重要步骤,多孔壳聚糖微粒有望成为疫苗接种的有效传递载体。

**3.3 以纳米粒为载体的口服疫苗传递** 与微粒系统类似,纳米粒亦可作为疫苗的有效传递载体。有研究采用聚酯材料磺基丁酸酯-聚乙烯醇-聚丙烯酸乙酯共聚物制备破伤风毒素纳米粒,对 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠进行灌服、经鼻腔和腹腔注射接种,评价纳米粒在小鼠体内引发的免疫反应<sup>[16]</sup>。接种后 4~6 周收集血样,用 ELISA 法分析血清 IgG 和 IgA 抗体滴度,结果显示,口服及鼻腔给予纳米粒后的血清抗体效价明显增加。

在十二烷基硫酸钠和聚乙烯醇存在下,有人采用胶束聚合技术制备定居因子抗原 ( colonization factor antigen, CFA ) 的聚异丁基氰基丙烯酸酯 ( polyisobutylcyanoacrylate, PIBCA ) 纳米粒,并评价其作为抗肠毒性大肠杆菌的口服疫苗传递系统的潜力<sup>[17]</sup>。CFA 吸附入 PIBCA 纳米粒为渗透饱和过程,处方中的稳定剂十二烷基硫酸钠和聚乙烯醇能增加纳米粒对抗原 CFA 的吸附率。通过检测家兔口服纳米粒后体内 IgG 和 IgA 水平,可考察 CFA 纳米粒的免疫原性,与 CFA 的磷酸盐缓冲液相比,吸载抗原的纳米粒能产生更好的 IgG 和 IgA 反应。这表明 PIBCA 纳米粒能保护 CFA,使其免受降解,并可有效传递抗原,供宿主免疫系统处置。可见,包载抗原的纳米粒是极有希望的黏膜免疫抗原传递系统。

在纳米粒的转运和摄入过程中,与胃肠道上皮细胞的作用可反映纳米粒的吸收机制。有人研究纳米粒(疏水性聚苯乙烯、生物黏附壳聚糖、隐形聚乳酸-聚乙二醇纳米粒)与两种人肠细胞系(肠上皮细胞 Caco-2 和黏液分泌细胞 MTX-E12)的相互作用,并比较纳米粒在大鼠体内的吸收情况<sup>[18]</sup>。通过激光共聚焦扫描显微镜和细胞组合分析,考察不同纳米粒与 Caco-2, MTX-E12 细胞的结合程度及机制。将纳米粒的体外试验结果与大鼠十二指肠注射后的胃肠分布情况进行比较,发现纳米粒与 Caco-2 单层细胞的组合作用呈如下次序:聚苯乙烯 > 壳聚糖 > 聚乳酸-聚乙二醇,黏液显著降低 MTX-E12 细胞对疏水性聚苯乙烯纳米粒的组合,与 PLA-PEG 纳米粒无结合,同时显著增强对壳聚糖纳米粒的吸附,大鼠十二指肠内给予壳聚糖纳米粒也得出类似结果,在上皮细胞和 PP 中都能检测到壳聚糖纳米粒。壳聚糖纳米粒的进一步内化具有饱和特性及能量-温度依赖性,能被过量鱼精蛋白抑制和被肠顶膜阴离子位点消除,而聚苯乙烯纳米粒的吸收只有温度依赖性。同时也说明黏液是疏水性聚苯乙烯纳米粒吸收(非吸附胞吞转运方式介导)的主要屏障,壳聚糖纳米粒的体外细胞摄取和体内大鼠上皮细胞转运有相关性,且可通过吸附胞吞转运方式被吸收和转运。

**4 DNA 疫苗微粒的肠道转录和表达**

近年来对于 DNA 疫苗的研究已成为病毒学、免疫学及医药领域的新热点。DNA 疫苗可直接刺激抗原呈递细胞,具有制备简便、贮存条件要求低、特异性细胞及体液免疫应答持久、可兼作预防和治疗

性疫苗等优点,在病毒性疾病和肿瘤等的防治中有广阔的应用前景。

在用遗传重组技术构建了猪透明带(zona pellucida, ZP)-3 $\alpha$ 真核生物表达载体 pVAX1-pZP3 $\alpha$ 基础上,有人将该重组质粒包封入壳聚糖纳米粒,将所制备的质粒 DNA 纳米粒,通过胃幼虫(gastric larvae)给小鼠喂养,用 RT-PCR 技术和间接免疫荧光法检测,发现 5 天后在肠绒毛膜上有 DNA 疫苗转录和表达<sup>[19]</sup>,说明表达型载体 pVAX1-pZP3 $\alpha$  的构建正确,表达 ZP 的壳聚糖-DNA 纳米粒的设计和制备成功。该 DNA 疫苗可诱导输卵管局部黏膜产生抗 ZP 免疫反应,从而阻断受精作用而不发生卵巢功能障碍,这为研发更有效、更简便的口服避孕疫苗提供了新的思路和方法。

Chew 等<sup>[20]</sup>用具有房尘螨变应原编码的全长 Der p1 cDNA 进行肌内免疫接种,可诱导对变应原 Der p1 左侧(约 1~116 位氨基酸)的明显体液反应,而对右侧(约 117~222 位氨基酸)则不产生体液反应。进一步采用壳聚糖-DNA 纳米粒对小鼠进行口服免疫,以同时诱发对 Der p1 的左、右双侧免疫反应。将 pDer p1(1~222)和 pDer p1(114~222)构建的 DNA 质粒与壳聚糖复合成纳米粒疫苗,然后进行口服免疫,13 周后再肌注 pDer p1(1~222)1 次,以产生抗 Der p1 的双侧免疫反应,这一策略能被进一步优化,得到更有效的全长 Der p1 基因疫苗。

## 5 微粒经胃肠道黏膜的定位摄取及外源凝集素的靶向导入作用

微粒系统可经胃肠道整体式吸收<sup>[21]</sup>,转运到集合淋巴结等肠系淋巴组织。在包载抗原的微粒或纳米粒表面结合能识别 M 细胞和 PP 的特异性基团或配体,可使疫苗的递送具有一定的导向性,有利于高效疫苗传输系统的设计。

肠 PP 中 M 细胞上的顶膜局部受体,已被证实为病原体结合位点,这为传递重组疫苗抗原和亚单位提供了潜在靶点。与 M 样人肠细胞培养和 PP 等模型的输出信号相关,一些未知功能的新受体将为不断增长的病原体家族保留有效结合位点<sup>[22]</sup>。筛选能模拟特定病原体侵入肠道的配体,有助于促进口服疫苗向 M 细胞传递。因此,合成特异性靶向于 M 细胞的有效配体,最终将是制备靶向性抗原纳米粒及稳定的配体-抗原复合物的前提和基础。

5.1 凝集素对胃肠道摄入的定位作用 Stillmark 于 19 世纪发现外源凝集素(不同相对分子质量的

蛋白质)可黏合人或动物的红细胞,参与调控细胞行为,如:生长、分化、迁移及细菌或病毒等病原体对细胞的识别和黏附。外源凝集素对宿主细胞的黏附是由特异性受体介导的,可以识别宿主细胞表面的特定结构(通常是寡糖序列),并为之发生特异性黏附<sup>[23]</sup>。外源凝集素与细胞表面的结合力较强,具有多个结合位点,可以通过两个或更多的外源凝集素与碳水化合物作用而结合在细胞表面,并以胞饮过程、非特异性噬菌作用或扩散等形式穿透细胞膜,使载有抗原的微粒被摄入细胞内。

外源性凝集素能与碳水化合物(包括:生物降解高分子材料)键合,以其对微粒载体表面进行修饰,便可制成新型生物黏附药物或生物侵入性药物载体<sup>[24,25]</sup>。“锚定”于纳米粒材料上凝集素,使包载疫苗的纳米粒能有效定位于肠道黏膜免疫的效能触发器(PP),可改善其摄入程度,使口服免疫达到最适滴度。荆豆等外源性凝集素可特异性地识别 M 细胞膜表面的岩藻糖,并为之结合<sup>[26]</sup>,这为口服疫苗定位微粒传输系统的研究开启了设计思路。国外在疫苗及其微球经口服于 PP 处诱发免疫反应方面已有研究,但涉及到采用凝集素修饰纳米粒载体提高疫苗的 PP 定位性及吸收程度的报道较少。进一步研究并阐明凝集素修饰的疫苗纳米粒肠吸收和 PP 定位特性,考察体内免疫应答反应和剂量关系,可为疫苗口服给药系统的研究和开发提供新的理论依据和技术支持,也将为安全、高效的疫苗口服接种展示广泛的应用前景。

5.2 凝集素修饰的纳米粒 将对生物膜表面具有亲和性的配体(如凝集素)与纳米粒相结合,可提高所包载药物的生物利用度和疗效。为考察荆豆凝集素-麦胶蛋白纳米粒(ulex europaeus lectin-gliadin nanoparticle, UE-GNP)的体外生物黏附性质,Ezpeleta 等<sup>[27]</sup>进一步用牛颌下腺黏蛋白(bovine submaxillary gland mucin, BSM)检测偶联物活性,结果显示该黏蛋白与 UE-GNP 的结合程度大大高于同未凝集素化麦胶蛋白纳米粒的结合。岩藻糖可与荆豆凝集素特异性结合,抑制荆豆素复合物的活性,研究发现 50 mmol 的岩藻糖可使 UE-GNP 同 BSM 的结合减少 70%,从而清楚表明:荆豆凝集素的特异性和活性,在其共价偶联到可生物降解载体后,仍能有效保持。

关于乙肝疫苗,有皮下注射的 HBcAg 纳米粒<sup>[28]</sup>、经皮给药的 HBsAg 柔性脂质体<sup>[29]</sup>的研究报道。最近,印度学者 Gupta 等<sup>[30]</sup>制备了凝集素修饰

的 HBsAg 口服纳米粒, 并进行了初步的体外研究。采用疫苗微粒进行口服诱发免疫反应, 应注重所采用载体材料的性质、微粒载体的表征及吸收程度的影响等方面, 考虑到壳聚糖所带正电荷对肠上皮细胞紧密结合点的开放机制<sup>[31]</sup>、能促进肠道上皮细胞对大分子物质的摄入<sup>[32]</sup>、具有对小分子蛋白的有利结合位点(活性氨基)等情况, 本课题组依据微粒携带抗原整体式吸收的“特洛伊木马原则”(Trojan horse' principle)<sup>[15]</sup>, 采用壳聚糖作为材料, 也在开展关于乙肝疫苗的口服纳米粒给药系统的研究。

**5.3 凝集素修饰的脂质体** 经疏水性端基修饰的凝集素能掺入脂质双分子层内, 以荆豆凝集素(UEA I)和麦胚凝集素(WGA)修饰的脂质体, 可作为靶向 PP 的口服载体<sup>[33]</sup>。凝集素化脂质体在鼠体内的传递效率测定结果表明: UEA I 化脂质体(10.5%)和 WGA 化脂质体(5.8%)的胃肠道吸收, 显著高于无凝集素修饰脂质体的吸收情况(3.2%), UEA I 修饰的脂质体对 PP 的靶向性最好, 这与其高传递效率直接相关。可见, 凝集素的修饰能促进脂质体与 PP 结合, 从而提高口服疫苗靶向传递至 PP 的效率。

**5.4 口服疫苗靶向传输的凝集素类似物** 凝集素可与肠细胞上的低聚糖特异性结合, UEA I 可作为特异性配体, 将口服疫苗靶向传递到抗原呈递细胞。Lambkin 等<sup>[34]</sup>从基于混合物位移扫描的合成组合文库中, 筛选并合成出具有仿 UEA I 功能的化合物, 并通过研究说明了这些物质的靶向传递特性。发现 3 nmol 4 没食子酸可抑制 UEA I 结合到 Caco-2 细胞膜, 比 UEA I 的天然底物  $\alpha$ -L 岩藻糖的作用强 650 ~ 5 000 倍。以荧光激活细胞分选术研究, 也证实凝集素修饰的该化合物衍生物对活细胞有相当的结合活性。进一步以原位小鼠肠袢模型, 表明先导化合物 4 没食子酰基 D 赖氨酸(由 4 个没食子酸构成)可将载染料的聚苯乙烯微粒传递至 M 细胞。临床前试验也确证该衍生物可介导包载蛋白链菌素微粒向 M 细胞的特异性传递。

可见, 聚酚类化合物(由多个没食子酰基构成的 D 赖氨酸支架)能模仿 UEA I 的功能活性, 其相对分子质量低、稳定性好、易于合成及成本低等优良特性, 显示了该类化合物用于口服疫苗靶向传递系统的潜力。

## 6 展望

“胃肠道可摄取一定量的微粒”作为一种生理学现象已被广泛接受, 这也是载药微粒可以口服的

一个重要原因, 但它的机制和摄取途径仍有待进一步研究。采用微粒载体进行肽类和蛋白药物的递送, 转运微粒的肠上皮细胞主要是 PP 中的 M 细胞, 依据识别 M 细胞表面的特异性受体, 可以设计出效率更高的靶向疫苗传输系统。一般来说, 同 M 细胞相结合的病毒或细菌表面分子可介导微粒系统的靶向传输, 但活微生物减毒株微粒仍能产生腹泻等副作用<sup>[35]</sup>, 若能阐明决定 M 细胞分型的因素, 将有助于促进微粒的摄取, 从而使疫苗的胃肠道转运更有效。

口服疫苗将带来免疫接种程序的革命, 微粒载体对混合抗原、联合抗原、抗原及佐剂、细胞因子混合体和基因重组疫苗的灵活传递, 使得这一系统在未来疫苗设计中有广阔的发展前景。目前关于疫苗微粒的口服接种尚有相当的制约<sup>[36]</sup>, 疫苗微粒经胃肠道摄取的数量和程度, 及其所诱导的免疫强度不尽如人意, 该方面的研究尚有许多基础研究工作需深入开展, 但它的确能诱导产生全身性和分泌性的抗体, 且效应持久, 这使得开展口服疫苗微粒的研究具有特殊的优势, 它所展示出的美好前景更激励着人们不断对该领域的研究进行发展和完善。相信随着对疫苗经肠黏膜的摄入效率、接种剂量、微囊化疫苗制备工艺及其对体内免疫反应调控等内容的逐步阐明, 口服疫苗微粒接种必将发挥其潜在优势而得到广泛应用。

## References

- [1] Smith PL, Wall DA, Gochoco C, et al. Oral absorption of peptides and proteins [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1992, 8: 253 - 290.
- [2] Wang XQ, Huang J, Dai JD, et al. Long-term studies on the stability and oral bioavailability of cyclosporine A nanoparticle colloid [J]. *Int J Pharm*, 2006, 322: 146 - 153.
- [3] Chen H, Langer R. Oral particulate delivery: status and future trends [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 34: 339 - 350.
- [4] Simecka JW. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 34: 235 - 259.
- [5] Owen RI, Jones AL. Epithelial specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles [J]. *Gastroenterology*, 1974, 66: 189 - 203.
- [6] John HE, Charlotte J, Hammond JA, et al. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches [J]. *J Control Release*, 1990, 11: 205 - 214.

- [ 7 ] Russell-Jones GJ. Oral vaccine delivery [ J ]. J Control Release, 2000, 65: 49 - 54.
- [ 8 ] Yeh PY, Ellens H, Smith PL. Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery [ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 34: 123 - 133.
- [ 9 ] van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, et al. Chitosan for mucosal vaccination [ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 52: 139 - 144.
- [ 10 ] van der Lubben IM, van Oudorp FA, Hengeveld MR, et al. Transport of chitosan microparticles for mucosal vaccine delivery in a human intestinal M-cell model [ J ]. J Drug Target, 2002, 10: 449 - 456.
- [ 11 ] Smith MW, Thomas NW, Jenkins NW, et al. Selective transport of microparticles across Peyer's patches follicle associated M-cells from mice and rats [ J ]. Exp Phys, 1995, 80: 735 - 743.
- [ 12 ] Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. Nanosphere and microsphere uptake via Peyer's patches: observation of the rate of uptake after a single oral dose [ J ]. Int J Pharm, 1992, 86: 239 - 246.
- [ 13 ] Eldridge JH, Stass JK, Meulbroek JA, et al. Biodegradable microspheres as a vaccine system [ J ]. Mol Immunol, 1991, 28: 287 - 295.
- [ 14 ] O'Hagan DT. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines [ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 34: 305 - 320.
- [ 15 ] van der Lubben IM, Verhoef JC, van Aelst AC, et al. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary *in vivo* uptake studies in murine Peyer's patches [ J ]. Biomaterials, 2001, 22: 687 - 694.
- [ 16 ] Jung T, Kamm W, Breitenbach A, et al. Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly ( vinyl alcohol )-graft-poly ( lactide-co-glycolide ): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice [ J ]. Pharm Res, 2001, 18: 352 - 360.
- [ 17 ] Al-Kassas RS, Rezk NJ. Enterotoxigenic E. Coli colonization factor antigen ( CFA/II )-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles for oral immunization [ J ]. STP Pharm Sci, 2003, 13: 93 - 98.
- [ 18 ] Behrens I, Pena AI, Alonso MJ, et al. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport [ J ]. Pharm Res, 2002, 19: 1185 - 1193.
- [ 19 ] Sun CJ, Pan SP, Xie QX, et al. Preparation of chitosan-plasmid DNA nanoparticles encoding zona pellucida glycoprotein-3 alpha and its expression in mouse [ J ]. Mol Reprod Dev, 2004, 68: 182 - 188.
- [ 20 ] Chew JL, Wolfowicz CB, Mao HQ, et al. Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen, Der p 1 for oral vaccination in mice [ J ]. Vaccine, 2003, 21: 2720 - 2729.
- [ 21 ] Li FQ, Lu B. Overview of researches about the microparticulate drug delivery system absorbed through gastrointestinal tract [ J ]. World Pharm ( 世界临床药物 ), 2000, 21: 307 - 310.
- [ 22 ] Brayden DJ, Baird AW. Apical membrane receptors on intestinal M cells: potential targets for vaccine delivery [ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56: 721 - 726.
- [ 23 ] Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, et al. Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M cell [ J ]. J Histochem Cytochem, 1993, 41: 1679 - 1687.
- [ 24 ] Zhang N, Ping Q, Huang G, et al. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin [ J ]. Int J Pharm, 2006, 327: 153 - 159.
- [ 25 ] Lehr CM. Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives [ J ]. J Control Release, 2000, 65: 19 - 29.
- [ 26 ] Chen J, Gao JY, Chang X, et al. Employing the ultrathin cryosectioning and immunolabeling technique to study intestinal microfold cells [ J ]. Shanghai J Immunol ( 上海免疫学杂志 ), 2003, 23: 10 - 12.
- [ 27 ] Ezpeleta I, Arango MA, Irache JM, et al. Preparation of Ulex europaeus lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus [ J ]. Int J Pharm, 1999, 191: 25 - 32.
- [ 28 ] Chong CSW, Cao M, Wong WW, et al. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery [ J ]. J Control Release, 2005, 102: 85 - 99.
- [ 29 ] Mishra D, Dubey V, Asthana A, et al. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B [ J ]. Vaccine, 2006, 24: 4847 - 4855.
- [ 30 ] Gupta PN, Mahor S, Rawat A, et al. Lectin anchored stabilized biodegradable nanoparticles for oral immunization: 1. Development and *in vitro* evaluation [ J ]. Int J Pharm, 2006, 318: 163 - 173.
- [ 31 ] Artursson P, Lindmark T, Davis SS, et al. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells ( Caco-2 ) [ J ]. Pharm Res, 1994, 11: 1358 - 1361.
- [ 32 ] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers [ J ]. J Appl Polym Sci, 1997, 16: 125 - 132.
- [ 33 ] Chen H, Torchilin V, Langer R. Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers [ J ]. Pharm Res, 1996, 13: 1378 - 1383.
- [ 34 ] Lambkin I, Pinilla C, Hamashin C, et al. Toward targeted oral vaccine delivery system: selection of lectin mimetics from combinatorial libraries [ J ]. Pharm Res, 2003, 20: 1258 - 1266.
- [ 35 ] Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization [ J ]. Cell, 1996, 86: 345 - 348.
- [ 36 ] Foster N, Hirst BH. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates [ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57: 431 - 450.