

- metric and body fat indices in identifying cardiometabolic disturbances in Chinese men and women[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e70893
- 5 Hyun YJ, Kim OY, Jang Y, *et al.* Evaluation of metabolic syndrome risk in Korean premenopausal women: not waist circumference but visceral fat[J]. *Circ J*, 2008, 72: 1308 – 1315
- 6 陈寒萼. 内脏脂肪与高血压[D]. 上海:上海交通大学, 2009
- 7 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low – density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge[J]. *Clin Chem*, 1972, 18: 499 – 502
- 8 Feng RN, Zhao C, Wang C, *et al.* BMI is strongly associated with hypertension, and waist circumference is strongly associated with type 2 diabetes and dyslipidemia, in northern Chinese adults[J]. *J Epidemiol*, 2012, 22: 317 – 323
- 9 Kobayashi J, Murano S, Kawamura I, *et al.* The relationship of percent body fat by bioelectrical impedance analysis with blood pressure, and glucose and lipid parameters[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2006, 13: 221 – 226
- 10 Wannamethee SG, Shaper AG, Morris RW, *et al.* Measures of adiposity in the identification of metabolic abnormalities in elderly men [J]. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81: 1313 – 1321
- 11 Yamashita K, Kondo T, Osugi S, *et al.* The significance of measuring body fat percentage determined by bioelectrical impedance analysis for detecting subjects with cardiovascular disease risk factors[J]. *Circ J*, 2012, 76: 2435 – 2442
- 12 Amato MC, Giordano C, Galia M, *et al.* Visceral adiposity index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33: 920 – 922
- 13 杨玉平, 刘金宝, 易星, 等. 乌鲁木齐市某社区居民身体脂肪分布与血脂血压的相关分析[J]. *预防医学论坛*, 2004, 10: 641 – 643
- 14 Lee K, Song YM, Sung J. Which obesity indicators are better predictors of metabolic risk?: healthy twin study [J]. *Obesity: Silver Spring*, 2008, 16: 834 – 840
- (收稿日期:2014 – 10 – 13)
(修回日期:2014 – 10 – 21)

通过 CDAP 活化多糖制备 b 型流感嗜血杆菌 荚膜多糖 – D 蛋白疫苗初探

吴雅楠 王明清 朱文勇 代小虎 宋少辉 廖国阳 李卫东

摘 要 目的 用 CDAP 活化 b 型流感嗜血杆菌(Hib)荚膜多糖,制备 b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖及 D 蛋白疫苗。方法 采用 CDAP 法在不同 pH 值条件下活化 Hib 荚膜多糖,再通过乙二酰肼(ADH)与 D 蛋白共价结合,制备 Hib 荚膜多糖与其 D 蛋白结合物原液,并对三批结合物原液的各项指标进行检测。获得的结合物原液免疫 BALB/c 小鼠,应用 ELISA 法检测血清中的 IgG 抗体水平,评价其免疫原性。**结果** 三批结合物原液以上检测指标均符合药典要求,衍生物中 ADH 含量对结合物的免疫原性有重要影响。**结论** 用 CDAP 活化工艺制备的 Hib 荚膜多糖 – D 蛋白结合物适宜制备结合疫苗,为以 D 蛋白为载体的 Hib 结合疫苗的制备及五价联苗的研制奠定实验基础。

关键词 b 型流感嗜血杆菌 荚膜多糖 D 蛋白 结合疫苗

[中图分类号] R511.7 [文献标识码] A

Preparation of Haemophilus Influenzae Type b Capsular Polysaccharide – D Protein Conjugation by Activation of Polysaccharide with CDAP. Wu Yanan, Wang Mingqing, Zhu Wenyong, *et al.* Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infections Diseases, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To prepare haemophilus influenzae type b (Hib) capsular polysaccharide – D protein conjugate vaccine by activation of polysaccharide with 1 – cyano – 4 – dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP). **Methods** CDAP was used to activate the purified Hib capsular polysaccharide antigens under different level of pH. Though oxalyl hydrazine (ADH), Hib capsular polysaccharide binds covalently to D protein. The glycoprotein conjugations of three runs were tested successively on different indexes. The BALB/c mice were immunized with these conjugations. The level of IgG in serum was analyzed by ELISA. **Results** The above indexes of

基金项目:国家高技术研究发展(“863”计划)项目(2012AA02A404);科技部国际合作项目(2010DF32890)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所重大传染病疫苗研发重点实验室

通讯作者:李卫东,电子信箱:lwd@imbcams.com.cn

three glycoprotein conjugations conformed to the requirements of the pharmacopoeia. ADH content in activated polysaccharide had important influence on immunogenicity of glycoprotein conjugations. **Conclusion** Hib capsular polysaccharide was activated, and *t* was bonded with carrier D protein. The polysaccharide derivatives and combination concentrate were measured and their quality according with the requirement of Chinese Pharmacopoeia 2010 edition. D protein works as the carrier protein of the conjugate vaccine preparation, and makes a good basis for five league vaccine in the future.

Key words Haemophilus influenzae type b; Capsular polysaccharide; D protein; Conjugate vaccine

b 型流感嗜血杆菌 (Hib) 是全球范围内引起儿童获得性肺炎及细菌性脑膜炎等侵袭性疾病最常见的病原体之一, 在 5 岁以下婴幼儿尤甚^[1,2]。要预防 18 月龄以下婴幼儿 Hib 疾病, 必须将 Hib 荚膜多糖从 T 细胞非依赖性抗原转化成 T 细胞依赖性抗原, 即用化学的方法, 将具有载体效应的蛋白质分子通过共价结合与 Hib 荚膜多糖连结起来^[3,4]。在制备结合疫苗时, 在多糖与蛋白结合之前, 通常需要先将要多糖活化。国内通常采用 CNBr 作为多糖的活化剂, 即用氰化酯法。虽然该方法被证实是一种非常有效的结合方法, 但 CNBr 具有剧毒性和其高 pH 值才能进行的局限性, 限制了该方法的应用。而 CDAP 水溶性较强, 其氰基的亲电性强于 CNBr 中的氰基, 使多糖的活化在弱碱性条件下进行。所以反应条件温和的 CDAP 活化法可以减少高 pH 值条件的多糖结构破坏、多糖抗原决定簇的丢失及不良反应的发生^[4,5]。

现在国内上市的结合疫苗是以破伤风类毒素为载体, 其具有的局限性如产生的免疫抑制和毒性回复现象, 因此寻找安全有效的新型载体成为结合疫苗研究的新方向。目前, 国内尚没有以 D 蛋白为载体的 Hib 结合疫苗的报道。D 蛋白是流感嗜血杆菌表面的脂蛋白, 葛兰素史克公司以 D 蛋白作为载体的十价肺炎链球菌结合疫苗, 于 2009 年在欧洲上市。对急性中耳炎有预防作用。芬兰的临床研究显示 D 蛋白作为结合疫苗的载体有良好的载体效应, 具有较好的免疫原性和安全性及临床效果。

本研究以 Hib D 蛋白为新型载体, 该蛋白稳定性好, 用 CDAP 氰化酯法将 D 蛋白与 Hib 多糖结合, 初步证明该结合物有较好的免疫效果。为以 D 蛋白为载体的 Hib 结合疫苗制备奠定实验基础^[6]。

材料与方法

1. 实验材料: Hib 荚膜精制多糖、Hib D 蛋白由北京协和医学院医学生物研究所生物制品学五室保存。EDAC、CDAP、ADH、TEA、乙腈 (美国 Sigma 公司), 辣根过氧化物标记的羊抗鼠 IgG1 (Southern Biotech 公司), 连续波长酶标仪 (美国 Thermo 公司), 层析系统 (瑞典 AKTA Purifier 公司), 生物安全柜 (ESCO 公司) 等。

2. 实验动物: BALB/c 小鼠 50 只, 体重 12 ~ 14g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2009 - 004。

3. 方法: ①Hib 荚膜多糖衍生物的制备: 方法参见 Lees 等操作^[7], 衍生时 pH 值分别保持在 8.55 ~ 8.60、8.75 ~ 8.80、8.95 ~ 9.00; ②Hib 荚膜多糖 - D 蛋白结合物的制备: 方法参见 Forsgren 等操作^[8]; ③Hib 荚膜多糖 - D 蛋白结合物的纯化: 结合物反应液经 Sepharose 4 Fast Flow 凝胶柱分离纯化得到结合物; ④化学检测: 蛋白质含量测定用 Lowry 法, 核糖含量测定用 Bial 反应法; 相对分子质量测定用 Sepharose CL - 4B 柱层析法; 高分子测定用乙醇沉淀法; 细菌内毒素检查用凝胶法; ADH 含量测定, EDAC 残留量、无菌实验具体操作按中国药典 2010 版第 3 部进行; ⑤效力实验: 将 BALB/c 小鼠分为 5 组, 每组 10 只, 第 1 组每只小鼠皮下注射含 2.5 μg Hib 多糖, 第 2 ~ 4 组每只小鼠皮下分别注射含 2.5 μg 多糖的 3 批 Hib 结合物原液, 第 5 组皮下注射相同剂量的沃森公司的 Hib 疫苗。分别在第 0、14 天免疫共 2 次, 在第 21 ~ 28 天采血, 分离的血清于 -20℃ 保存。

结 果

1.3 批结合物纯化结果: 以 0.15 mol/L 氯化钠溶液为洗脱液, 将 3 批 Hib - D 结合物分别上样于 Sepharose 4FF 层析柱, 同时在 206 nm、280 nm 下检测, 如图 1 所示。结合物 1 (图 1A)、结合物 2 (图 1B) 中第一个结合峰后有一个很大的糖峰, 说明存在较多的未结合的多糖。结合物 3 (图 1C) 中结合峰占主要部分, 说明未结合的多糖很少。

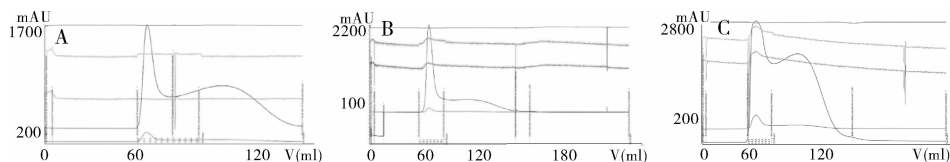


图 1 Hib - D 结合物的 Sepharose 4 Fast Flow 凝胶色谱图

A. 结合物 1; B. 结合物 2; C. 结合物 3

2. 结合物原液中主要组分的含量测定:将纯化后的3批结合物原液进行核糖、蛋白质测量以确定制备过程的有效性。蛋白和核糖水平平均符合WHO规定的要求。多糖和蛋白的比值也满足WHO的要求(表1)。

表1 结合物原液中蛋白含量、核糖含量及其比值的测定结果

结合物	多糖(μg/ml)	蛋白(μg/ml)	糖/蛋白
参考值	>28	>48	0.30~0.59
结合物1	69.8±2.5	215.6±5.4	0.324±0.007
结合物2	60.7±2.5	200.1±8.6	0.303±0.03
结合物3	154.8±2.3	514.9±7.9	0.312±0.005

表2 结合物原液测定结果

结合物	ADH(μg/mg)	回收率(%)	高分子结合物(%)	EDAC(μmol/L)	内毒素(EU/μg)
参考值	16~48	-	80~100	<10	<5
结合物1	41.8±3.4	7.55±5.42	89.85±4.02	5.09±1.08	≤0.25
结合物2	23.2±1.5	11.11±7.60	83.50±3.80	1.33±0	≤0.25
结合物3	24.3±1.7	24.7±8.91	86.61±1.81	1.33±0	≤0.25

表3 Hib结合物原液的分子分散系数(K_D)测定结果

结合物	K _D	回收率(%)
参考值	≤0.2	≥60
结合物1	0.058	71.2
结合物2	0.058	72.8
结合物3	0.058	75.1

5. 无菌检查:实验过程中逐天观察各管情况,阴性对照澄清透明,没有菌体生长。阳性对照培养基出现浑浊,营养琼脂固体培养基有菌落产生。实验组培养基均澄清透明,无菌体生长。

6. 效力实验:3批结合物在第2剂免疫小鼠后,抗体阳转率均显著增加。第1批结合物免疫的小鼠血清抗体阳转率较高,且高于国产沃森结合疫苗。多糖、结合物1、结合物2、结合物3、沃森结合疫苗抗体阳转率分别为0、100%、60%、70%和80%(参考值≥80%)。

讨 论

本研究采用氰化酯法。由于糖组分的不稳定性,结合时所采用的条件必须尽可能的温和。因此,反应参数(如pH值、温度、反应时间和化学试剂等)必须尽可能地避免造成蛋白变性或不必要的糖水解。本研究对多糖衍生pH值做了初步探索,结果显示衍生pH值对结合物中多糖的回收率影响较显著。有报道显示肺炎球菌多糖的CDAP衍生水平主要受活化pH值影响^[9]。本研究加入ADH后pH值分别控制在

3. 衍生物及结合物其他组分检测:衍生结束后3批衍生物均呈黄色,但颜色依次变浅。将透析完成后的3批衍生物溶液进行ADH测定,其结果符合WHO要求。3批结合物原液制备过程中衍生pH值分别为8.55~8.60、8.75~8.80、8.95~9.00,其回收率结果随衍生pH值的延长而增加。

3批结合物原液的高分子结合物含量、EDAC残余含量、内毒素鉴定:均符合药典要求。

4. 结合物分子大小测定:从表3可见,3批结合物原液相对分子质量测定结果显示其分散系数(K_D)≤0.2的回收率均在药典要求范围内。

8.55~8.60、8.75~8.80、8.95~9.00,在该pH值范围影响下,衍生物中ADH含量依次降低,但结合率依次增高(表2)。说明糖分子与蛋白质结合的间隔和密度不同,ADH衍生率受pH值影响,结合率受衍生物中ADH含量的影响。但效力实验结果显示第1批结合物中ADH含量较高时结合率低,其结合物具有较高的阳转率。第2、3批结合率虽然较高,阳转率反而低。原因可能是ADH结合到多糖-CDAP时,因pH值影响,造成ADH结合到糖-CDAP上的量较少,会形成蛋白质氨基与糖链发生链内或链间交联,继而影响多糖蛋白结合率,使结合率较高。但此时大量的蛋白质胺基与一条或多条多糖链发生链内和链间的交联反应,使糖分子与蛋白质结合的间隔和密度不能有效控制,形成过度交联现象,抗原表位被遮蔽,从而影响了其免疫原性^[5]。另外,采用相同种属的多糖与载体蛋白,就可以避免潜在免疫抑制和免疫干扰的问题。而同种属的载体蛋白更可提供对自身的保护性,从而协调作用增强抗多糖免疫的保护性。此外,在感染时同种T细胞也将被加强。

衍生物中ADH的含量影响着糖分子结合到蛋白质上的间隔和密度,进而影响结合物诱导免疫反应的能力。一旦抗原与载体蛋白相结合,对这两部分的比例进行测量可以提供结合物结构的相关信息(比如糖蛋白比及高分子结合物的测量)。本研究对结合物的相对分子质量、高分子结合物、糖、蛋白及糖蛋

白比例进行测定结果满足药典要求,但衍生物中 ADH 含量对结合物回收率和免疫原性的影响有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Pitman M. A Type d strain of hemophilus influenzae previously designated provisionally as type d(2) and tyPe g[J]. Bacteriol, 1947,53(4):499
- 2 Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, *et al.* Burden of disease caused by Haemophilus influenzae type b in children younger than 5 years: global estimates[J]. Lancet, 2009,374(9693):903-911
- 3 Chong CY, Lim WE, Heng JT, *et al.* The changing trend in the Patten of infective etiologies in childhood acute lower respiratory tract infection[J]. Acta Paediatr Jpn, 1997,39(3):317-321
- 4 赵锐,张以浩,李河民. 医学生物制品学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2007:540-560
- 5 Douglas E, Shafera, Richard F, *et al.* Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrauroborate (CDAP) for use inprotein-polysaccharide conjugate vaccines and

- immunologicalreagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated Polysaccharides [J]. Vaccine,2000,18:1273-1281
- 6 中华预防医学会. 吸附无细胞百白破、灭活脊髓灰质炎和 b 型流感嗜血杆菌(结合)联合疫苗(DTaP-IPV/Hib 五联疫苗)应用技术指南[J]. 华南预防医学,2011,37(2):67-71
- 7 Lees A, Nelson BL, Mond JJ. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents[J]. Vaccine,2000,14(3):190-198
- 8 Forsgren A, Riesbeck K, Janson H. Protein D of haemophilus influenza;a protective nontypeable H. influenzae antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines [J]. Clin Infect Dis,2008,46(5):726-731
- 9 Andrew L, Brett LN, James JM. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents[J]. Vaccine, 1996,14(3):190-198

(收稿日期:2014-06-12)

(修回日期:2014-06-14)

葛根黄酮胃肠道黏附漂浮颗粒的制备

宋轶群 张 运

摘 要 目的 制备葛根黄酮胃肠道黏附漂浮颗粒,考察其体外黏附性、漂浮性及其 Caco-2 透膜吸收。**方法** 用挤出滚圆造粒机制备葛根黄酮胃肠道黏附漂浮颗粒,通过组织留存量法和直接观察法分别评价其体外黏附性和漂浮性,以 Caco-2 细胞模型考察其透膜吸收。**结果** 葛根黄酮胃肠道黏附漂浮颗粒收率为 59.60%,黏附性达到 71.43%,立即漂浮,持续漂浮时间为 15min,且与原料药相比,其透膜吸收提高 9.3 倍。**结论** 本研究制备的葛根黄酮胃肠道黏附漂浮颗粒具有良好的黏附性和漂浮性,能够增加药物在 Caco-2 细胞的透膜吸收,为体内吸收研究提供了依据。

关键词 葛根黄酮 挤出滚圆 颗粒 黏附 漂浮 Caco-2

[中图分类号] R944 [文献标识码] A

Preparation of Gastrointestinal Bioadhesive and Floating Pellets for Pueraria Flavonoids. Song Yiqun, Zhang Yun. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract Objective Gastrointestinal bio-adhesive and floating pellets loaded with Pueraria Flavonoids were prepared to investigate the in vitro muco-adhesivity, floatability and membrane permeability across Caco-2 cells. **Methods** Extrusion-spheronization was used to prepare the pellets. The muco-adhesivity and floatability were evaluated by quantifying the remained percentage of pellets in stomach tissue and visual observation. The membrane permeability of the pellets was characterized on the model of Caco-2 cells. **Results** The yield of gastrointestinal bio-adhesive and floating pellets was 59.60%. The remaining percentage of pellets in the stomach tissue was 71.43%. The pellets floated immediately after loading to hydrochloric acid and maintained for 15 min. The membrane permeability of the drug has been improved 9.3 times relative to the raw drug. **Conclusion** The gastrointestinal bioadhesive and floating pellets prepared in this study have been proved to have good bioadhesivity and floatability, the improved permeability across Caco-2 cell membrane provides

基金项目:国家“十二五”“重大新药创制”基金资助项目(2012ZX09301-002-001-030)

作者单位:100193 中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所

通讯作者:宋轶群,电子信箱:yiqunsong@sina.cn