

# 可生物降解聚合物载体微球口服防龋疫苗免疫效果

刘建伟, 凌均荣

(中山大学光华口腔医学院附属口腔医院牙体牙髓科, 广东 广州 510060)

**摘要:** 【目的】以 PAc 多肽(301~319)作为抗原,PBLG-PEG-PBLG 做载体制备防龋微球疫苗,口服免疫 SD 大鼠,观察其对变链菌在大鼠牙面的黏附及对龋病发生的影响效果。【方法】28 只出生 30 d 的雄性 SD 大鼠随机分成 4 组建立龋模型,对各组大鼠口腔中变链菌的黏附菌落计数,根据 Keyes 评分标准做龋齿记分。【结果】PAc 多肽抗原微球疫苗口服组的变形链球菌数为  $(13.2 \pm 8.16) \times 10^4$  CFU/ml;磨牙龋齿 Keyes 计分为  $31.8 \pm 6.77$ ,均显著低于对照组( $P < 0.01$ )。【结论】口服 PAc 多肽抗原微球防龋疫苗均能减少龋模型大鼠龋齿的发生,以光滑面龋的减少更显著。

关键词: 龋病; 变形链球菌; 多肽; 微球; 疫苗

中图分类号: R781.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0075-04

## Immune Effect of Biodegradable Polymer Microparticle Vaccine Against Dental Caries by Oral Administration

LIU Jian-wei, LING Jun-qi

(Department of Operation and Endodontics, Guanghua School of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】The peptide derived from Pac (301~319) was selected as antigens. PBLG-PEG-PBLG block copolymer was selected as carrier to prepare microparticle vaccine which can hold PAc peptide (301~319). Then we investigated the colonization of Streptococcus mutans on experimental rat tooth surface and the effect of oral administrated vaccine against rat dental caries. 【Methods】Twenty-eight Sprague-Dawley gnotobiotic rat models were randomly divided into 4 groups. The colonization numbers of S. mutans were counted and the presence of caries was quantified by the Keyes scoring system. 【Results】The bacteria numbers of the PAc peptide microparticle group were  $(13.2 \pm 8.16) \times 10^4$  CFU/ml and the Keyes scores were  $31.8 \pm 6.77$ . Both were significantly lower than those of the control group( $P < 0.01$ ). 【Conclusions】The PAc peptide microparticle vaccine by oral administration could reduce the development of experimental rat caries, especially the caries on tooth smooth surface.

Key words: dental caries; Streptococcus mutans; polypeptide; microparticle; vaccine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 75-78; 87]

变形链球菌被公认为与人类龋病的发生密切相关。对变形链球菌早期附着的研究发现,在非蔗糖依赖性黏附过程中,变形链球菌表面的疏水性决定其对唾液获得性膜的黏附力强弱,而 PAc 是决定变形链球菌表面疏水性强弱的分子之一。多肽疫苗由致龋毒力因子蛋白质序列中选择的几个到几百个氨基酸序列而组成,是用单一保护性抗原、甚至单一主要抗原决定簇来代替完整的病原

体疫苗免疫机体,诱导机体产生抵抗相关病原体的免疫反应,能避免因病原微生物与机体组织之间存在共同抗原而引起的免疫病理反应。可生物降解聚合物材料作载体是近年来问世的一种药物控释和缓释新剂型,它们在体内可随机降解成大分子片段,形成单体形式(如乳酸、乙醇酸),这些单体被人体吸收并参与代谢,最终生成水和二氧化碳,不会造成机体损伤。用此材料包裹抗原形成

收稿日期: 2006-08-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30240054)

作者简介: 刘建伟(1969-),男,硕士研究生, E-mail: doctor2004001@hotmail.com; 凌均荣,女,教授,博士生导师,通讯作者。 E-mail: lingjunqi@163.com

微球疫苗在体内水和酶的作用下随机降解,使内部的抗原类物质释放出来,以尽量模仿自然感染状态。同时它还具有免疫佐剂的作用,增强免疫效果<sup>[1-6]</sup>。本研究拟使用 PBLG-PEG-PBLG(聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯)三嵌段共聚物,包裹 PAc 多肽制备成微球疫苗,保护蛋白质抗原,增强免疫效果。通过口服免疫 SD 大鼠,并使用致龋模型了解微球疫苗的防龋效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 抗原材料

多肽 PAc (301-319; ANAANEADYQAKLTA-YQTE, Genemed Synthesis, Inc. 合成)

### 1.2 微球载体材料

PBLG-PEG-PBLG(聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯; 中山大学附属二院口腔颌面外科余东升博士惠赠)。

### 1.3 微球载体疫苗的制备

采用 W/O/W 双乳化溶剂挥发法制备<sup>[7]</sup>,将 100  $\mu$ l 含 1 mg/ml 的抗原,溶解于 1 ml 含 PBLG-PEG-PBLG(5 mg/ml)的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中,超声分散 30 s (100W),加入 4% PVA 溶液 2 ml,再超声 30 s,将此液倒入 8 ml 的同样浓度的 PVA 溶液中,室温下、抽真空、磁力搅拌 1 h,挥发去除有机溶剂,得到微球疫苗胶体溶液。

包封率的测定:将制得的疫苗胶体于 4℃, 32 000 r/min 条件下离心 1 h,取上清液适量,用紫外分光光度计测量抗原蛋白量,由以下公式计算疫苗微球抗原蛋白包裹效率:包裹效率 =  $M_{\text{实测}}/M_{\text{理论}} \times 100\%$

### 1.4 定菌鼠龋模型实验

将 28 只出生 30 d 的雄性 SD 大鼠随机分成 4 组。鼠龄 31 d 时,分别用空微球口服(A组)、PAc 多肽抗原加空微球口服(B组)、PAc 多肽抗原微球疫苗口服(C组),每只大鼠每次口服剂量为 2 ml(按包封率),初次免疫 4 周,每周一次,共 4 次,间隔两周,再次免疫 3 周,每周 1 次共 3 次。PAc 多肽微球疫苗(D组)配合等体积的完全福氏佐剂,在腮腺区皮下注射免疫大鼠,每只大鼠每次免疫剂量为 20  $\mu$ g;鼠龄 45 d,再次免疫,配合不完全福氏佐剂。鼠龄 46 d 时,将饮用水改为应广谱抗生素配制的饮用水 2 d。鼠龄第 48, 49, 50 d 各

组鼠口腔分别接种耐红霉素 *S. mutans* Ingbritt, 菌浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/ml。每天接种两次,每次间隔 30 min,每只鼠接种 200  $\mu$ l 菌液。鼠龄第 48 d,鼠的饮用水改为普通饮用水,饲料改为致龋饲料 2000<sup>#</sup>。

### 1.5 各实验组大鼠唾液、血清中抗 PAc 多肽抗体水平的 ELISA 检测

鼠龄第 56 天时,每只大白鼠称重后,收集唾液标本,唾液标本在台式离心机上 4 000 r/min,离心 10 min,将上清移入另一灭菌的 Eppendorf 管中, -20℃ 保存待测。剪去鼠尾约 3 cm,收集静脉血 1 ml 于 Eppendorf 管中。室温放置 2 h,4℃ 冰箱过夜,次日 4 000 r/min,离心 10 min,去血凝块,收集血清于另一灭菌 Eppendorf 管中, -20℃ 保存待测。鼠龄第 94 天,即第 2 次取血、唾液样本。

利用间接 ELISA 法检测大白鼠血清和唾液标本中抗变形链球菌 PAc 多肽特异性 IgG 和 IgA。

### 1.6 黏附实验

大鼠饮用抗生素水前后,取口腔细菌标本,将样本稀释后接种于 MSB-EM 固体培养基上;大鼠口腔接种 *S. mutans* Ingbritt 后一周,第 3 次取鼠口腔内细菌样本培养;实验结束时,第 4 次取鼠口腔内细菌样本培养,计算变形链球菌的菌落数(CFU/ml)。

### 1.7 定菌鼠龋模型龋齿记分(Keyes 法)

大白鼠处死后,分离上下颌骨,将干燥颌骨用 0.4% 紫脲酸铵染色,用金刚砂片轮沿上下颌磨牙牙合面近远中向矢状切开,置于体视显微镜下观察,依照 Keyes 评分方法对其评估记分<sup>[8,9]</sup>。

### 1.8 统计学处理

各组实验数据利用 SPSS 软件,采用配对样本 t 检验 (Paired-Samples t Test)、单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 黏附实验结果

大鼠饮用抗生素水前后,取口腔细菌标本,将样本稀释后接种于 MSB-EM 固体培养基上,未发现鼠口腔内有变形链球菌定殖。大鼠口腔接种 *S. mutans* Ingbritt 后 1 周,第 3 次取鼠口腔内细菌样本培养,显示各实验组鼠口腔内均有相应的变形链球菌菌株存在。实验结束时,第 4 次取鼠口腔内

细菌样本培养, 计算变形链球菌的菌落数(CFU/ml) 显示各实验组鼠口腔内的变形链球菌菌株的存在(表 1)。

表 1 接种变形链球菌 7 d、44 d 各实验组菌落数(CFU/mL)  
Table 1 Colonization of *S. mutans* in the oral cavities of rats 7 days and 44 days after inoculation(CFU/mL)

	After 7 days( ×10 <sup>4</sup> )	After 44 days( ×10 <sup>4</sup> )
A	7.8 ±3.71	16.8 ±6.27
B	19.7 ±7.61	19.2 ±5.27
C	7.7 ±3.20	13.2 ±8.16
D	8.8 ±5.31	11.5 ±6.53

2.2 包封率的测定

多肽 PAc 微球疫苗胶体溶液的 OD 值为 (0.601 ±0.004), 其包封率为 (23.32 ±0.22)。

2.3 各实验组大鼠血清中抗 PAc 多肽抗体水平的 ELISA 检测

在 IgG 抗体水平上 PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 再次免疫明显高于初次免疫的 IgG 抗体水平 (P=0.000), 在 IgA 抗体水平上口服免疫组 (C 组) 再次免疫与初次免疫的 IgA 抗体水平无显著差异 (P=0.560; 表 2)。

在 IgG 抗体水平上, 按 =0.05 水准, PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 初次免疫与对照组之间无显著性差异 (P=0.302); 再次免疫后的 C 组抗体水平明显高于对照组 (A、B 组) (P =0.000, P=0.000), 注射组 (D 组) 抗体水平明显高于对照组 (A、B 组) (P =0.000, P=0.000)。在 IgA 水平上, 按 =0.05 水准, PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 初次免疫与对照组之间无显著性差异 (P=0.798), PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 再次免疫与对照组之间无显著性差异 (P=0.137)。

表 2 各实验组血清抗 PAc 多肽抗体水平 (OD<sub>492</sub> 值)  
Table 2 The level of antibody to PAc peptide in serum (OD<sub>492</sub>) (x̄ ±s)

	IgG		IgA	
	Primary	Secondary	Primary	Secondary
A	0.315 ±0.0069	0.319 ±0.0081	0.139 ±0.0458	0.138 ±0.0141
B	0.316 ±0.0106	0.318 ±0.0089	0.131 ±0.0150	0.135 ±0.0350
C	0.323 ±0.0076	0.365 ±0.0076 <sup>1)2)</sup>	0.141 ±0.0124	0.148 ±0.0217
D	-	0.607 ±0.0307 <sup>2)</sup>	-	0.168 ±0.0267

1) Compared with primary group, t=9.633, P < 0.01, 2) ANOVA, P < 0.05

2.4 各实验组大鼠唾液中抗 PAc 多肽抗体水平的 ELISA 检测

在 IgG 抗体水平上 PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 再次免疫与初次免疫的 IgG 抗体水平相当 (P=0.267), 在 IgA 水平上口服免疫组 (C 组) 再次免疫与初次免疫的 IgA 抗体水平有显著性差异 (P=0.001)。

在 IgG 抗体水平上, 按 =0.05 水准, PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 初次免疫与对照组 (A、B 组) 之间无显著性差异 (P=0.249), C 组再次免疫后、注射组 (D 组) 抗体水平与对照组 (A、B 组) 之间无显著性差异 (P=0.423)。在 IgA 抗体水平上, 按 =0.05 水准, PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 初次免疫与对照组 (A、B 组) 之间无显著性差异 (P=0.129); PAc 多肽微球疫苗口服组 (C 组) 再次免疫后与对照组 (A、B 组) 有显著性差异 (P=0.000, P=0.000), 微球疫苗注射组 (D 组) 与对照组 (A、B 组) 有显著性差异 (P=0.000, P=0.000)。

表 3 各实验组唾液抗 PAc 多肽抗体水平比较 (OD<sub>492</sub> 值)  
Table 4 The level of antibody to PAc peptide in saliva (OD<sub>492</sub>) (x̄ ±s)

	IgG		IgA	
	Primary	Secondary	Primary	Secondary
A	0.032 ±0.0029	0.033 ±0.0032	0.014 ±0.0014	0.013 ±0.0015
B	0.028 ±0.0090	0.031 ±0.0074	0.015 ±0.0025	0.015 ±0.0027
C	0.033 ±0.0013	0.035 ±0.0035	0.017 ±0.0028	0.031 ±0.0039 <sup>1)2)</sup>
D	-	0.035 ±0.0021	-	0.028 ±0.0021 <sup>2)</sup>

1) Compared with primary group, t=6.296, P < 0.01, 2) ANOVA, P < 0.05

2.5 各实验组大白鼠磨牙龋坏 Keyes 计分

按 Keyes 计分法, 在体视显微镜下对各实验组菌鼠上下颌磨牙颊面、舌面、殆面窝沟及邻面等部位龋坏情况进行观察计分, 观察结果发现, 各实

表 4 各实验组鼠磨牙龋坏 Keyes 计分  
Table 5 The Keyes ' score of rats molars caries (x̄ ±s)

	Sulcal surface		Smooth surface	Total
	E	Ds	E	
A	18.5 ±2.07	14.8 ±2.40	26.3 ±1.21	59.7 ±3.88
B	19.2 ±2.86	13.2 ±2.95	26.2 ±2.17	58.6 ±7.33
C	15.8 ±3.19	5.3 ±2.58	10.7 ±2.34	31.8 ±6.77
D	18.7 ±2.42	8.2 ±1.17	11.7 ±2.16	38.5 ±3.83

One-Way ANOVA, P < 0.05

验组定菌鼠磨牙均有不同程度龋发生(表 5)。

按  $\alpha=0.05$  水准, 总计结果各组间、光滑面龋各组间比较有显著性差异 ( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ), 组间两两比较结果显示微球疫苗组(C组)与对照组(A、B组)有显著性差异 ( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ); 对各组间光滑面龋计数结果比较, 同样微球疫苗组(C组)与对照组(A、B组)有显著性差异 ( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ )。

### 3 讨 论

变形链球菌被公认为是龋病的主要致病菌。由于存在交叉免疫反应等原因, 灭活细菌作为疫苗虽有肯定的防龋效果, 但安全性有争议。在变形链球菌表达蛋白中寻找安全、高效的抗原, 以及选用合适的疫苗输送系统 (Vaccine Delivery System, VDS) 是目前国内外在防龋疫苗中的研究热点。

在非蔗糖依赖性黏附过程中, 变形链球菌表面的疏水性决定其对唾液获得性膜的黏附力强弱, 而 PAc 是决定变形链球菌表面疏水性强弱的分子之一。PAc 是由 1531 个氨基酸组成的大分子蛋白, 分子量约为 190Ka<sup>[10]</sup>。陈罕等采用基因工程构建防龋疫苗, 建立了携带 pac 重组基因的减毒鼠伤寒沙门菌<sup>[11,12]</sup>。

用适宜的可生物降解聚合物材料作载体, 包裹或吸附某种抗原而制成的微球 (Microparticle) 是近年来 VDS 的新工艺、新技术。特别是制备蛋白质和肽类的 VDS 广受关注。本实验使用 PBLG-PEG-PBLG (聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯) 三嵌段共聚物可生物降解聚分物材料作载体, 选择 PAc 多肽作抗原, 减少交叉反应。由 2 个疏水嵌段 PBLG 与 1 个亲水嵌段 PEG 组成的 3 嵌段 A-B-A 共聚物, 在水溶液能够形成球状胶束, 其疏水嵌段构成胶束的芯, 而亲水嵌段构成水合性外壳, 疏水嵌段组成的芯有用来包裹抗原 PAc 多肽, 形成 PAc 多肽微球疫苗。由于水和各种酶不会立即渗入到微球内部, 从而减少消化道中各种酶的作用影响, 使大部分抗原得以保存。随着微球在肠道里逐渐降解, 内部抗原才缓慢释放出来, 甚至可模拟其自然感染状态, 以达到最佳免疫效果。

Smith 等<sup>[13,14]</sup>用 PLGA 可生物降解微球载体, 抗原 GTF 的剂量 20  $\mu\text{g}$ , 初次免疫 4 周, 每周 1 次, 共 4 次, 再次免疫 3 周, 每周 1 次共 3 次, 3 种

给药途径包括鼻黏膜下注射、口服和腮腺区皮下注射均有相应的抗体产生, 其中鼻黏膜下注射最为明显, 效果最佳。预防龋病的生理基础是黏膜免疫系统, SIgA 是黏膜免疫反应中最重要的因素, SIgA 能有效地防止微生物在黏膜表面定居和对宿主细胞的侵袭。血清中 IgG 抗体是通过龈沟液到达口腔, 可抑制细菌黏附和产酸的作用, 并且还能够抑制细菌在牙面定殖和代谢活动。本实验采用 Keyes 计分的方法进行量化分析, 根据包封率使用与 Smith 大约相同剂量的抗原免疫大鼠, 显示微球疫苗组与对照组间有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。对各组间光滑面龋计数结果比较, 微球疫苗组与对照组均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。其中光滑面龋发生率较低, 这可能与牙齿结构有关, 细菌可借窝沟上点隙而存留。

本实验证实用 PBLG-PEG-PBLG 为载体的 PAc 多肽微球疫苗, 通过口服途径能减少实验动物的龋齿发生。提示可生物降解微球载体为口服防龋疫苗提供了一种新途径。

(感谢中山大学孙逸仙医院余东升博士提供的生物材料和实验指导。)

#### 参考文献:

- [1] COOMBES A G, LAVELLE E C, JENKINS P G, et al. Single dose, polymeric, microparticle-based vaccines: the influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen[J]. *Vaccine*, 1996,14(15):1429-1438.
- [2] NAKAOKA R, INOUE Y, TABATA Y, et al. Size effect on the antibody production induced by biodegradable microspheres containing antigen[J]. *Vaccine*, 1996,14(13):1251-1256.
- [3] MALOY K J, DONACHIE A M, O HAGAN D T, et al. Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with ovalbumin entrapped in poly (lactide-co-glycolide) microparticles[J]. *Immunology*, 1994,81(4):661-667.
- [4] O HAGAN DT, MCGEE JP, HOLMGREN J, et al. Biodegradable microparticles for oral immunization [J]. *Vaccine*,1993,11(2):149-154.
- [5] TABATA Y, INOUE Y, IKADA Y. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres [J]. *Vaccine*. 1996,14(17-18):1677-1685.
- [6] CHALLACOMBE S J, RAHMAN D, O HAGAN D T. (下转第 87 页 to page 87)

力。)

参考文献:

- [1] 范钦和,主编.软组织病理学[M].南昌:江西科学技术出版社,2003:222-231.
- [2] 梁碧玲,黄穗乔,陈建宇.软组织肿瘤的 MRI 诊断[J].中山医科大学学报,1995,16(2):60-62.
- [3] 杨名添,李国材.乳腺脂肪肉瘤一例报告并文献复习[J].中山医学院学报,1984,4(5):62-64.
- [4] 石木兰.腹膜后间隙肿瘤的影像诊断[J].中国医学计算机成像杂志,1999,5(4):272-277.
- [5] SUNG M S, KANG H S, SUH J S, et al. Myxoid liposarcoma: appearance at MR imaging with histologic correlation[J]. Radiographics, 2000, 20(4):1007-1019.
- [6] TATEISHI U, HASEGAWA T, BEPPU Y, et al. Primary dedifferentiated liposarcoma of the retroperitoneum. Prognostic significance of computed tomography and magnetic resonance imaging features[J]. J Comput Assist Tomogr, 2003,27(5):799-804.
- [7] KRANSDORF M J, BANCROFT L W, PETERSON J J, et al. Imaging of fatty tumors:distinction of lipoma and well-differentiated liposarcoma [J].Radiology, 2002,224(7):99-104.
- [8] OHGURI T, AOKI T, HISAOKA M, et al. Differentiated diagnosis of benign peripheral lipoma from well-differentiated liposarcoma on MR imaging: Is comparison of margins and internal characteristics useful [J]? AJR, 2003, 180(6): 1689-1694.
- [9] NISHINO M, HAYAKAWA K, MINAMI M, et al. Primary retroperitoneal neoplasms: CT and MR imaging findings with anatomic and pathologic diagnostic clues [J]. Radiographics, 2003, 23(1):45-57.
- (编辑 张恩健)
- 
- (上接第 78 页 from page 78)
- Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles [J]. Vaccine, 1997,15(2):169-175.
- [7] 何勤,张志荣,刘戟,等.载 TK 基因聚丙交酯乙交酯纳米粒的制备及有关性质研究[J].生物医学工程学杂志,2002,19(1):30-33.
- [8] KEYES P H. Dental caries in the molar teeth of rats: Distribution of lesions induced by high-carbohydrate low-fat diet[J]. J Dent Res, 1958,37:1077-1087.
- [9] KEYES P H. Dental caries in the molar teeth of rats: A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously[J]. J Dent Res, 1958,37:1088-1098.
- [10] OKAHASHI N, SASAKAWA C, YOSHIKAWA M, et al. Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c streptococcus mutans, implicated in dental caries[J]. Mol Microbiol, 1989, 3(5): 673-676.
- [11] 陈罕,凌均荣,杨国平.变形链球菌表面蛋白 pac 基因 A 区片断在减毒鼠伤寒沙门氏菌的表达[J].中山医科大学学报,2000,21(4S):68-75.
- [12] 胡晓莉,凌均荣.减毒鼠伤寒沙门菌防龋疫苗的免疫效果[J].中山医科大学学报,2002,23(4):257-259.
- [13] SMITH D J, TRANTOLO D J, KING W F, et al. Induction of secretory immunity with bioadhesive poly(D,L-Lactide-co-glycolide) microparticles containing streptococcus sobrinus glucosyltransferase [J]. Oral Microbiol Immunol, 2000,15(2):124-130.
- [14] SMITH D J, LAM A, BARNES L A, et al. Remote glucosyltransferase microparticle vaccine delivery induces protective immunity in the oral cavity[J]. Oral Microbiol Immunol, 2003,18(4):240-248.
- (编辑 王晓鹰)