

幽门螺杆菌重组蛋白PLGA微球和PLGA-壳聚糖复合微球的制备及其释放性能研究*

陈昱作¹, 刘人捷¹, 杨露¹, 李茂圆^{1,2}, 索朗斯珠³, 李婉宜¹, 王保宁^{1,3△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 病原生物学系(成都 610041); 2. 成都市血液中心(成都 610041); 3. 西藏农牧学院(林芝 860000)

【摘要】 目的 制备载有幽门螺杆菌重组蛋白(BIB蛋白)的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)微球和PLGA-壳聚糖复合微球,优化微球制备参数,并分析两种微球在体外胃、肠液中的释放性能。方法 采用双乳化-溶剂挥发法(W1/O/W2)制备BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-壳聚糖复合微球;通过单因素分析方法,研究水相/油相(W1/O)比例、PLGA质量分数、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)浓度等对微球外观、粒径、分散指数(polydispersity index, PDI)、包封率和载药率的影响,确定最优参数,采用BCA法测定蛋白浓度,计算微球累计释放率。结果 本研究的最佳参数条件为:W1/O为1:2,PLGA质量分数5%,PVA质量分数0.2%。BIB-PLGA微球包封率(78.20±1.73)%,载药率(10.58±0.23)%,粒径(2.11±0.08) μm, PDI(0.35±0.18);BIB-PLGA-壳聚糖复合微球包封率(78.87±1.30)%,载药率(15.50±0.25)%,粒径(2.28±0.52) μm, PDI(0.39±0.54)。BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-壳聚糖复合微球在体外胃、肠液中均能缓慢释放,BIB-PLGA-壳聚糖复合微球的缓释效果更明显。结论 采用双乳化-溶剂挥发法制备的BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-壳聚糖复合微球载药率和包封率都较高,粒径可控,外观分散,对胃肠液有缓释作用。

【关键词】 幽门螺杆菌重组蛋白 聚乳酸-羟基乙酸微球 PLGA-壳聚糖复合微球

Preparation and Release Properties of *Helicobacter pylori* Recombinant Protein PLGA Microspheres and PLGA-Chitosan Microspheres CHEN Yu-zuo¹, LIU Ren-jie¹, YANG Lu¹, LI Mao-yuan^{1,2}, SUOLANGSIZHU³, LI Wan-yi¹, WANG Bao-ning^{1,3△}.

1. Department of Pathogenic Biology, West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Blood Center, Chengdu 610041, China; 3. Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China

△ Corresponding author, E-mail: 345182273@qq.com

【Abstract】 Objective To prepare the poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microspheres and PLGA-chitosan microspheres containing *Helicobacter pylori* recombinant protein, namely the BIB protein, and to explore their optimal preparation parameters and *in vitro* release performance in gastric and intestinal fluids. **Methods** Double emulsions (water-in-oil-in-water, or W1/O/W2) solvent evaporation method was used to prepare the BIB-PLGA microspheres and the BIB-PLGA-chitosan microspheres. Univariate analysis was done to study the impact of the water-to-oil ratio (W1/O), PLGA mass fraction and PVA concentration on the morphology, particle size, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency (EE), and drug loading (DL) so as to identify the optimal parameters. Bicinchoninic acid (BCA) assay was used to determine the protein concentration and the release efficiency of BIB. **Results** The optimal preparation parameters identified in the study were as follows: W1/O at 1:2, PLGA mass fraction at 5%, and PVA mass fraction at 0.2%. The BIB-PLGA microspheres were found to be (2.11±0.08) μm in particle size, 0.35±0.18 in PDI, (78.20±1.73)% in EE and (10.58±0.23)% in DL. The BIB-PLGA-chitosan microspheres were (2.28±0.52) μm in particle size, 0.39±0.54 in PDI, and (78.87±1.30)% and (15.50±0.25)% in EE and DL, respectively. Both BIB-PLGA microspheres and BIB-PLGA-chitosan microspheres showed slow-release property in gastric and intestinal fluids *in vitro*, with BIB-PLGA-chitosan microspheres showing better slow-release performance. **Conclusion** The BIB-PLGA microspheres and BIB-PLGA-chitosan microspheres prepared with the double emulsions solvent evaporation method showed high DL and EE, controllable particle sizes, dispersive appearance, and slow-release property in gastric and intestinal fluids *in vitro*.

【Key words】 *Helicobacter pylori* recombinant protein (BIB protein) Poly lactic-co-glycolic acid microsphere PLGA-chitosan microsphere

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是引起人类慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌及其他消化道肿瘤等消化道疾

病的相关危险因素^[1],世界上超过一半的人口长期被Hp感染。目前治疗Hp感染的方案主要是采用三联、四联抗生素疗法,但Hp的耐药现象日益严重,药物根除Hp感染的难度越来越大^[2]。疫苗接种是应对病原体感染的有效手段,Hp疫苗的研发是当前应对Hp感染的研究热点。但疫苗研发进展缓慢,目前尚未研发出高效、安全的Hp

* 四川省科技厅重点研发项目(No. 21ZDYF1885、No. 2021YFS0054),成都市科技局项目(No. 2019-YF05-00298-SN)和西藏农牧学院柔性引进人才项目(No. RXYJ1905)资助

△ 通信作者, E-mail: 345182273@qq.com

疫苗。

我们前期构建了幽门螺杆菌重组(BIB)蛋白,并证明BIB蛋白具有良好的免疫原性和免疫保护性^[3-5]。我们还证实了BIB蛋白口服疫苗免疫保护率明显高于肌注疫苗,但裸露的BIB蛋白在胃中易被胃蛋白酶分解,口服疫苗需要较大的量才能达到较好的免疫效果^[6]。近年来,以微球(microballoon sphere, MS)、微囊(micro-capsule, MC)等为代表的缓控释给药技术发展迅速,其优点在于能耐受各种复杂的生理性环境,不仅能达到缓释效果,提高药物的利用率,减少给药次数,减少患者痛苦,提高依从性,还可达到靶向给药的目的。目前,采用微球、微囊作为疫苗缓释载体的研究较少。为减少BIB蛋白用量,本研究设计了聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)和PLGA-壳聚糖两种微球包裹BIB蛋白,以克服蛋白质药物稳定性差、易酶解等缺点。探索并优化微球的制备参数条件,分析两种微球在体外胃液和肠液中的释放性能,为制备出有效预防Hp感染的口服微球疫苗提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

幽门螺杆菌悉尼株(Hp, SS1, 四川大学华西基础医学与法医学院微生物教研室); PLGA(75/25, 相对分子质量3万, 大连美伦生物技术有限公司); 壳聚糖[chitosan (CS), 脱乙酰度 $\geq 90.0\%$, 北京索莱宝科技有限公司]; BIB蛋白冻干粉剂(纯度91.8%, 四川万可泰生物科技有限公司); 胃液、肠液(北京雷根生物技术有限公司); BCA蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 二氯甲烷[dichloromethane (DCM), 北京百灵威科技有限公司]; 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)、冰醋酸、氯化钠均购自成都市科隆化学品有限公司。

1.2 BIB-PLGA微球的制备

取BIB蛋白溶液加入到PLGA溶液中, 3 000 r/min搅拌10 min, 使内水相与油相快速混匀形成初乳(W1/O), 将初乳快速转移至10倍油相体积的PVA-5%NaCl溶液中, 加入0.5%吐温-20作为乳化剂, 3 000 r/min搅拌5 min, 使初乳与外水相快速混匀, 形成复乳(W1/O/W2)。将制备好的复乳液转移至摇床上, 以200 r/min挥发4 h, 待有机溶剂挥发完全, 离心、无菌去离子水洗涤, 如此重复3次, 低温冷冻干燥, 制得BIB-PLGA微球。

1.3 制备BIB-PLGA微球的条件优化

1.3.1 不同内水相和油相的体积比(W1/O)对微球的影响 按1.2所述方法制备BIB-PLGA微球, 其中PLGA的

质量分数为2%, PVA的质量分数为1.6%, 检测内水相W1和油相O的体积之比分别为2:1、1:2、1:3、1:4时微球的理化性能, 筛选出制备BIB-PLGA微球最佳内水相和油相的体积比。

1.3.2 不同PLGA的质量分数对微球的影响 按1.2所述方法制备BIB-PLGA微球, 其中PVA的质量分数为1.6%, 固定1.3.1步骤中筛选出的最佳内水相和油相(W1/O)的体积比, 检测PLGA的质量分数分别为2%、3%、4%、5%时微球的理化性能, 筛选出制备BIB-PLGA微球的最佳PLGA质量分数。

1.3.3 不同PVA的质量分数对微球的影响 按1.2所述方法制备BIB-PLGA微球, 固定1.3.1步骤中筛选出的最佳内水相和油相(W1/O)的体积比和1.3.2步骤中筛选出的最佳PLGA质量分数, 检测PVA的质量分数分别为0.2%、0.4%、0.8%、1.6%时微球的理化性能, 筛选出制备BIB-PLGA微球的最佳PVA质量分数。

1.4 BIB-PLGA-壳聚糖复合微球的制备

根据1.3筛选出制备BIB-PLGA微球的内水相和油相(W1/O)的体积比、PLGA质量分数和PVA质量分数后, 将上述过程中制备好的复乳快速加入等体积的1%(W/V)壳聚糖溶液中, 200 r/min挥发固化4 h, 待有机溶剂完全挥发, 离心, 无菌去离子水洗涤, 如此重复3次, 低温冷冻干燥, 制得BIB-PLGA-壳聚糖复合微球。

1.5 微球粒径、PDI和外观的观察

取少量上述制备好的微球冻干粉, 经去离子水溶解后, 将样品滴加到载网上, 吸附5~6 min, 用磷钨酸(pH=6.5)染色3 min, 吹干, 透射电镜观察微球外观, 并用激光粒度仪进行微球粒径大小和分散指数(polydispersity index, PDI)测定。

1.6 微球包封率和载药率的测定

称取10 mg制备好的微球冻干粉, 加入2 mL裂解液, 置于37 °C摇床以200 r/min震荡2 d, 使微球完全裂解, 10 000 r/min离心5 min, 取上清用BCA法进行蛋白浓度测定, 根据公式(1)(2)分别计算包封率(encapsulation efficiency, EE)和载药率(drug loading, DL)^[7]。式中蛋白含量、微球质量的单位均为mg。

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球BIB蛋白含量}}{\text{总投BIB蛋白含量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{载药率} = \frac{\text{微球BIB蛋白含量}}{\text{微球总质量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.7 微球体外胃、肠释放性能的测定

为模拟体内环境, 本实验以胃液、肠液作为体外释放体系^[8]。称取15 mg上述制备好的BIB-PLGA微球和BIB-

PLGA-壳聚糖微球置于透析袋中,扎紧透析袋后,将其分别浸没在4 mL胃液和4 mL肠液中,置于37 °C摇床以200 r/min震荡,分别于0、1、2、3、4、24、48 h从释放体系中取出0.4 mL液体,取上清用BCA法进行BIB蛋白浓度测定。每次取液后均同时补充0.4 mL新鲜的胃、肠液。根据BIB质量分数计算累计释放率,绘制释放曲线。

1.8 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间数据采用单因素方差分析进行比较,两组之间数据采用独立样本 t 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微球制备条件优化

2.1.1 BIB-PLGA微球的制备

2.1.1.1 不同内水相和油相(W1/O)的体积比对微球的影响 PLGA质量分数为2%,PVA质量分数为1.6%时,改变内水相W1和油相O的体积之比,不同条件下微球的理化性能、包封率和载药率见表1。在W1/O比为1:2时,微球包封率达到最大值,为(80.04±0.60)%,与其他各组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),且此时微球的粒径和PDI较小,微球均一性和分散性较好。微球载药率与W1/O呈反比,即随着W1/O逐渐增大,载药率逐渐降低,当W1/O为2:1时,微球载药率最大,为(49.36±1.11)%,与其他各组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),此时微球的粒径和PDI较大,微球均一性和分散性较差。综合以上结果,本研究选择W1/O比1:2作为最佳初乳水油比,包封率高、均一性和分散性好。

表 1 不同内水相和油相(W1/O)体积比BIB-PLGA微球的理化性能
Table 1 Physicochemical properties of BIB-PLGA microspheres prepared under different W1/O volume-by-volume ratios

W1/O(V/V)	Particle size/ μm	PDI	EE/%	DL/%
2:1	2.39±0.32	0.43±0.50	69.42±1.56	49.36±1.11
1:1	2.36±0.41	0.41±0.38	69.20±0.85	31.34±0.39
1:2	2.31±0.37	0.37±0.05	80.04±0.60	22.26±0.17
1:3	1.82±0.15	0.56±0.36	69.93±1.46	13.04±0.27
1:4	0.87±0.04	0.40±0.52	70.33±6.85	10.47±1.02

PDI: Polydispersity index; EE: Encapsulation efficiency; DL: Drug loading. $n=3$.

2.1.1.2 不同PLGA的质量分数对微球的影响 固定内水相和油相(W1/O)的体积比为1:2,PVA质量分数为1.6%时,改变PLGA的质量分数,不同条件下微球的理化性能、包封率和载药率见表2。

当保持W1/O为1:2,PVA质量分数为1.6%不变,随

表 2 不同PLGA的质量分数下BIB-PLGA微球的理化性能

Table 2 Physicochemical properties of microspheres prepared under different PLGA mass fractions

PLGA/%	Particle size/ μm	PDI	EE/%	DL/%
2	2.31±0.37	0.37±0.05	80.04±0.60	22.26±0.17
3	2.07±0.15	0.48±0.45	79.75±2.28	15.89±0.17
4	3.13±0.72	0.60±0.35	82.90±0.70	13.10±0.11
5	2.74±0.38	0.44±0.30	87.50±3.02	11.42±0.39

PLGA: Poly lactic-co-glycolic acid; PDI: Polydispersity index; EE: Encapsulation efficiency; DL: Drug loading. $n=3$.

着PLGA质量分数的升高,包封率总体呈逐渐升高的趋势。当PLGA质量分数为5%时,微球包封率最高,为(87.50±3.02)%,单因素方差分析表明,该组与其他各组包封率相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。微球载药率则随着PLGA质量分数升高而呈下降趋势,2%PLGA的微球载药率最高,为(22.26±0.17)%,与其他各组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,PLGA质量分数为5%时微球的粒径和PDI较小,具有较好的均一性和分散性。综合以上结果,本研究选择油相PLGA5%作为最佳PLGA质量分数。

2.1.1.3 不同PVA的质量分数对微球的影响 表3显示了当固定内水相和油相(W1/O)的体积比为1:2、PLGA质量分数为5%时,改变PVA的质量分数,不同条件下微球的理化性能、包封率和载药率。

表 3 不同质量分数PVA下BIB-PLGA微球的理化性能

Table 3 Physicochemical properties of microspheres prepared under different PVA mass fractions

PVA/%	Particle size/ μm	PDI	EE/%	DL/%
0.2	2.11±0.08	0.35±0.18	78.20±1.73	10.58±0.23
0.4	2.45±0.54	0.52±0.18	82.01±0.98	10.55±0.13
0.8	2.55±0.12	0.50±0.33	86.22±1.36	10.39±0.16
1.6	2.74±0.38	0.44±0.30	87.50±3.02	11.42±0.39

PVA: Polyvinyl alcohol; PDI: Polydispersity index; EE: Encapsulation Efficiency; DL: Drug loading. $n=3$.

PVA质量分数对微球包封率的影响与PLGA相似,随着PVA质量分数的升高,包封率呈逐渐升高的趋势。当PVA质量分数为1.6%时,微球包封率最高,且微球包封率和载药率与其他组各相比,差异均不大。但PVA质量分数为0.2%时,微球粒径和PDI较小,微球的均一性和分散性较好。综合以上结果,本研究选择0.2%PVA作为最佳外水相PVA质量分数。

2.1.2 BIB-PLGA-CS微球的制备 根据以上结果,本研究选定内水相:油相(W1/O)为1:2,PLGA质量分数为5%,PVA质量分数为0.2%作为制备BIB-PLGA微球的

优选条件。在此基础上制备BIB-PLGA-CS微球。制备出的BIB-PLGA-CS微球理化性质如下: 包封率(78.87±1.30)%, 载药率(15.50±0.25)%, 粒径(2.28±0.52) μm, PDI(0.39±0.54), 微球总体性能优良。

2.2 微球的理化性质

2.2.1 微球外观、粒径和PDI的观察 BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-CS微球的透射电镜图如图1, 其中图1A为BIB-PLGA微球, 微球呈类圆形, 表面光滑, 分散性好, 大小相对均匀; 图1B为BIB-PLGA-CS微球, 微球也呈类圆形, 表面光滑, 可以看出, 外壁比BIB-PLGA微球厚。根据两种微球理化性能数据结果(表4)可知, 两种微球粒径大

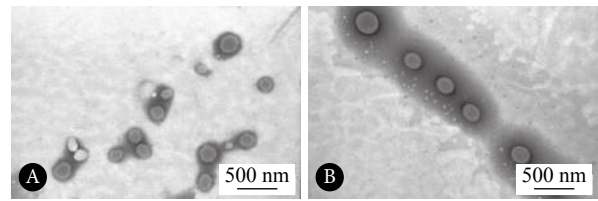


图1 微球透射电镜图

Fig 1 Transmission electron microscope images of microspheres

A: Oil phase was 5% PLGA, external water phase was 0.2% PVA, and W1/O was 1 : 2; B: Oil phase was 5% PLGA, external water phase was 0.2% PVA, W1/O was 1 : 2, and chitosan was 1%.

小、分散情况、包封率相似, 但含壳聚糖微球较BIB-PLGA微球载药率(DL)提高了5%。

表4 BIB-PLGA微球、BIB-PLGA-壳聚糖复合微球的理化性能

Table 4 Physicochemical properties of BIB-PLGA and BIB-PLGA-chitosan microspheres prepared

Microspheres	W1/O	PLGA/%	PVA/%	Chitosan/%	Particle size/μm	PDI	EE/%	DL/%
BIB-PLGA	1 : 2	5	0.2	-	2.11±0.08	0.35±0.18	78.20±1.73	10.58±0.23
BIB-PLGA-CS	1 : 2	5	0.2	1	2.28±0.52	0.39±0.54	78.87±1.30	15.50±0.25

PVA: Polyvinyl alcohol; PLGA: Poly lactic-co-glycolic acid; PDI: Polydispersity index; EE: Encapsulation efficiency; DL: Drug loading. n=3.

2.2.2 微球在体外胃肠液中的释放性能测定 对上述最佳制备条件下得到的BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-CS微球进行体外胃肠液中的释放性能测试, 结果如图2所示。BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-CS复合微球在胃液和肠液中前4 h内的累计释放率均低于20%, 且差异无统计学意义(P>0.05)。胃液中第24小时和第48小时, BIB-PLGA微球的累计释放率高于BIB-PLGA-CS复合微球, 差异有统计学意义(P<0.05); 第48小时BIB-PLGA微球的累计释放

率趋于100%(如图2A)。肠液中第24小时和第48小时, BIB-PLGA微球的累计释放率高于BIB-PLGA-CS复合微球, 差异有统计学意义(P<0.05); 第48小时BIB-PLGA微球的累计释放率趋于100%(如图2B)。说明在体外胃液和肠液中, PLGA和PLGA-CS微球对BIB蛋白均有较好的缓释作用, 其中PLGA-CS的缓释效果更显著。

3 讨论

Hp感染主要导致胃炎、消化道溃疡、胃癌等消化道恶性肿瘤, 严重危害人类健康。目前国际上推荐治疗Hp感染的方案是2~3种抗生素联合质子泵抑制剂和铋剂的疗法。近年来, Hp耐药率不断增高, 抗生素治疗Hp感染的选择性压力也越来越大, 常规治疗很难达到Hp根除率>80%的治愈指标^[9]。

BIB蛋白是由含有Hp尿素酶B亚单位(UreB)、尿素通道蛋白(UreI)及霍乱肠毒素B亚单位基因序列串联而成的多基因新序列工程菌表达的重组蛋白, 相对分子质量为33×10³左右, 等电点(PI)为9.05^[3-4]。本团队此前的研究已证实其BIB蛋白具有较好的免疫原性, 免疫小鼠第7天即产生特异性IgG抗体, 14 d后抗体效价达到1 : 12 800, 21 d后抗体效价高达1 : 16 000, 具有良好的免疫保护性^[3-4]。

口服疫苗是Hp疫苗接种的重要途径之一, 但口服多肽蛋白容易被胃蛋白酶消化降解, 口服BIB疫苗需要较大的口服剂量才能达到较好的免疫效果。微球、微囊可以作为药物缓释载体, 其优点在于能耐受各种复杂的生理

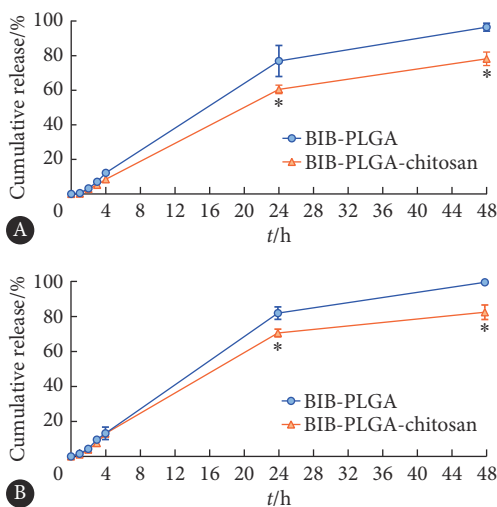


图2 微球在体外胃肠液中的释放曲线

Fig 2 Release curves of microspheres in gastric and intestinal fluids in vitro

A: Release curves of microspheres in gastric fluids in vitro; B: Release curves of microspheres in intestinal fluids in vitro. *P<0.05, vs. BIB-PLGA. n=3.

环境,起到缓释作用,提高药物的利用率。PLGA是由乳酸和羟基乙酸聚合而成的高分子有机化合物,具有良好的生物相容性、成球性和成膜性,且安全易降解,该物质是缓释给药技术中最常用的高分子材料之一,早已通过美国FDA认证,收录进美国国家药典中^[10]。壳聚糖是天然大分子多糖甲壳素脱去乙酰基后的产物,具有稳定、无毒、生物相容性良好的特点,并具有较强的黏膜吸附能力,可增强黏膜免疫^[11],已被广泛用作缓释给药载体。

本研究设计了BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-壳聚糖微球,采用单因素实验对微球制备条件进行优化。结果显示,W1/O为1:2,PLGA质量分数为5%,PVA质量分数为0.2%时,所得产物包封率分别为(78.20±1.73)%和(78.87±1.30)%,载药率分别为(10.58±0.23)%和(15.50±0.25)%,透射电镜微球呈类圆形,表面光滑,分散性好,大小相对均匀。

微球体外胃、肠液释放实验的结果显示,在4 h内,微球在胃、肠液中的释放率均低于20%,且BIB-PLGA-壳聚糖微球在胃肠液中的释放率小于BIB-PLGA微球。提示,PLGA和壳聚糖对BIB蛋白的包裹降低了胃肠消化液对BIB蛋白的消化破坏。此外,本研究增加的壳聚糖的包裹还提升了微球的胃肠粘附能力和载药率,进一步促进了BIB对消化道黏膜的免疫刺激,有利于增强BIB蛋白对机体的免疫保护作用。

本研究证明BIB-PLGA微球和BIB-PLGA-壳聚糖复合微球在胃液中的释放率低于肠液,理论上有利于口服疫苗时避免胃液对重组蛋白的破坏,靶向肠道释放,促进肠道免疫系统吸收,刺激机体肠道免疫产生保护性。但本研究仅在体外验证微球的缓释能力,具有一定的局限性,具体效果还需进行动物实验加以验证。

* * *

致谢 感谢四川大学华西基础医学与法医学院电镜室傅涛研究员对微球形态观察的大力支持!

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Malferttheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 2007, 56(6): 772-781.
- [2] 韩一凡, 于新娟, 王莉莉, 等. 中国幽门螺杆菌耐药情况研究. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2017, 26(6): 664-669.
- [3] 丁娜娜, 杨靖, 潘兴, 等. 幽门螺杆菌多表位重组原核表达工程菌的构建及表达特性研究. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(3): 367-370.
- [4] 潘兴, 肖继红, 杨靖, 等. 幽门螺杆菌BIB原核表达工程菌的构建及微生物学特性分析. *西部医学*, 2013, 25(10): 1451-1454.
- [5] 王保宁, 潘兴, 黄筱钧, 等. 重组幽门螺杆菌多表位疫苗工程菌株的构建及其微生物学特性研究. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(3): 354-358.
- [6] Wang B, Pan X, Wang H, et al. Immunological response of recombinant *H. pylori* multi-epitope vaccine with different vaccination strategies. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6559-6566.
- [7] 罗宇燕, 麦海燕, 黎呐, 等. 复乳法及其改良法制备的干扰素PLGA微球载药释药特性的对比. *中山大学学报(自然科学版)*, 2014, 53(3): 110-114.
- [8] Amoyav B, Benny O. Microfluidic based fabrication and characterization of highly porous polymeric microspheres. *Polymers*, 2019, 11(3): 419.
- [9] He X, Zeng X, Jiang C, et al. Efficacy and safety of antofloxacin-based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication failure in China. *Dig Dis Sci*, 2021[2021-03-30]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-021-06856-z>. doi: 10.1007/s10620-021-06856-z.
- [10] Jain R, Shah N, Malick A, et al. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: Different preparative approaches. *Drug Dev Ind Pharm*, 1998, 24(8): 703-727.
- [11] ILLUM L, JABBAL-GILL I, HINCHCLIFFE M, et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 51(1-3): 81-96.

(2020-10-12收稿, 2021-09-02修回)

编辑 吕熙