

用于药物筛选的微流控细胞阵列芯片

郑允焕^{1,2}, 吴建璋^{1,2}, 邵建波^{1,2}, 金庆辉¹, 赵建龙¹

1 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 细胞区域分布培养以及如何有效地对微流体进行操控是微流控阵列芯片在细胞药物研究中的关键技术。本研究介绍了一种利用 SU-8 负性光刻胶模具和 PDMS 制作双层结构的微流控细胞阵列芯片的方法, 该芯片通过 C 型的坝结构将进样细胞拦截在芯片的细胞培养的固定区域, 键合双层 PDMS 构成阀控制层, 阀网络的开关作用成功实现了芯片通道内微流体的操控, 同时芯片设计了药物浓度梯度网络, 产生 6 个不同浓度的药物刺激细胞。通过对芯片 3 种共培养细胞活性的检测和药物伊立替康(CTP-11)对肝癌细胞的浓度梯度刺激等实验结果验证该芯片在细胞研究和药物筛选等方面的可行性。

关键词: 微流控芯片, 药物筛选, C 型坝结构, 微阀, 药物浓度梯度, 细胞共培养

Microfluidic cell culture array chip for drug screening assays

Yunhuan Zheng^{1,2}, Jianzhang Wu^{1,2}, Jianbo Shao^{1,2}, Qinghui Jin¹, and Jianlong Zhao¹

1 Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: We developed a novel microfluidic cell chip, which enabled drug delivery, fluid control and cell co-culture. The device consisted of an array of 6×6 cell culture chambers, a drug gradient generator and fluidic control valves. Micro-dam structures of the chambers were able to trap cells while loading and drug gradient network generated drug gradient of 6 different concentrations. Also we applied hydraulic valves to control the microfluid and simulate the microenvironment of cells. We had investigated the viability of co-culturing cells in the chip and the ability for drug screening. This microfluidic cell chip has the potential in cell-based research of high throughput drug screening.

Keywords: microfluidic chip, drug screening, C-shaped dam, micro-valves, drug gradient generator, cell co-culture

对大量化合物进行快速、高通量筛选、低试剂消耗和低成本是药物筛选发展过程的研究目标。近几年来出现快速、高效的高通量筛选 (High throughput screening, HTS) 被广泛发展和应用, 成为

药物筛选的主要技术手段之一, 但其自身存在一些局限, 如多孔板(通常为 96 孔板)消耗的试剂量大、样品的分配和操作难度较大、设备昂贵等^[1]。而基于微加工技术的微流控芯片技术具有分析速度快、

Received: December 9, 2008; **Accepted:** March 24, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30771115), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA042106), Major State Basic Research and Development Program of China (973 Program) (Nos. 2007CB714502, 2007CB936000), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Nos. 0752nm021, 0852nm00400, 08110700200, 08540705800).

Corresponding author: Qinghui Jin. Tel: +86-21-62511070-8708; Fax: +86-21-62511070-8714; E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn

国家自然科学基金(No. 30771115), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA042106), 国家重点基础研究发展规划项目(973 项目)(Nos. 2007CB714502, 2007CB936000), 上海市科委项目(Nos. 0752nm021, 0852nm00400, 08110700200, 08540705800)资助。

试剂消耗少、易于集成和高通量分析等诸多优点,可以克服高通量药物筛选的限制,为基于细胞的药物筛选、组织工程和生物传感器提供新的研究平台^[2,3]。

利用微流控技术,开发微流控阵列细胞芯片应用于高通量药物筛选具有很多独特的优势。微流控芯片这个微小平台可以集成 256 个或更多的细胞培养腔微阵列^[5],改变常规细胞培养方法,实现细胞药物筛选的高通量化,而且芯片微纳升级体积大大减少了试剂消耗量,减低药物筛选成本;微流控芯片设计二维或者三维的微结构区域可产生低剪切力,使多种化合物进入、混合,形成浓度梯度,观察细胞对不同浓度药物的反应,从而进行药物对细胞的毒性分析^[5,6];微流控芯片的集成化优势非常明显,在芯片内可以集成微阀、微泵和电极等器件^[7-9],将药物的合成分离富集、实验细胞培养、药物效果检测等多个步骤集成到一块芯片,实现药物筛选的自动化分析。将微流控技术与细胞培养技术相结合,构建药物筛选的细胞微系统平台是目前的研究热点。

细胞在芯片的区域分布以及如何实现微流体的操控以及对细胞进行药物作用是微流控技术在细胞高通量药物筛选的研究应用的关键和难点。因此本研究介绍一种用于药物筛选的微流控细胞阵列芯片。采用微加工技术设计和制作该芯片,在芯片上制作独特的培养腔阵列及其微通道,进行细胞的固定分布和共培养,并在芯片上设计药物浓度梯度网络,当药物注入芯片时,得到不同浓度的药物成分作用细胞。微流体的控制通过微阀网络来实现,从而保证了培养腔不同细胞培养的相对独立,保持药物浓度梯度的稳定性。同时本研究进行了抗肿瘤药物伊立替康(CTP-11)对肝癌细胞的药物筛选实验,通过实验室自制的加热平台上实现对该芯片细胞活性和药物作用的实时观察和检测。

1 实验部分

1.1 芯片的设计

本实验设计的微流控细胞阵列芯片如图 1a 所示,它有 3 层结构,上面一层是阀控制通道层,中间一层是流体通道层,下面一层是适合细胞贴壁的玻璃层(图 1b 所示)。流体层包括药物浓度梯度网络、6×6 细胞培养腔阵列以及进出样管道。细胞培养腔阵列在纵横二维是连通的,纵向通道可以同时进样

培养 3 种不同细胞,横向通道可以进样培养液和药物。流体层的通道高为 50 μm,宽为 100 μm,每个培养腔为 600 μm×600 μm,中间有一个半径为 200 μm 的 C 型坝结构,坝高 45 μm,宽 50 μm,该结构可以将细胞拦截在坝内,保证细胞在固定的区域生长,而培养基和药物等液体可以自由流动;药物梯度网络包含 2 个进样孔和 5 级浓度梯度通道,可产生 6 个不同浓度的药物溶液。阀控制通道层有 2 组控制阀:横向阀和纵向阀,通过阀的开关作用实现对下一层的细胞培养阵列横向通道和纵向通道的液流控制。

1.2 具有坝结构的三层微流控芯片的制作

该微流控芯片采用多次软光刻技术以及模塑法制作,具体工艺流程如图 2 所示。芯片制作的关键工艺是通过制作双层的 SU-8 负性光刻胶的流体层模具形成坝结构以及热键合法制作双层的 PDMS(聚二甲基硅氧烷)芯片。首先是利用“多次曝光、一次显影”工艺制作 SU-8 胶双层的芯片模具^[10]。在清洗干净的硅片基底上甩涂稀释的 SU8-2025 (MicroChem Corp, MA, USA, 用 SU8-2025 与环戊酮按体积比 100:53 稀释而成),厚约 5 μm,放在热板上 65°C 烘 1 min,然后升温至 95°C 保持 2 min,缓慢降温至室温,在光刻机上第 1 次曝光后,将硅片放到热板上进行 PEB(Post exposed bake),即 65°C 加热烘 1 min,然后升温到 95°C 保持 2 min,之后缓慢降至室温,这样第一层的图形就转移到 SU-8 光刻胶上。再将 SU8-2050 甩涂到基片上,完成前烘,将第二层掩模板与第一层光刻图形对准,第二次曝光和后烘最后超声辅助显影就形成双层图形结构的 SU-8 模具。同理,完成单层的阀控制层 SU-8 模具的制作。

为制作双层的 PDMS 芯片,先将 PDMS(Dow Corning, Michigan, USA)单体与固化剂按重量比 20:1 均匀混合,抽真空进行脱气处理后,倒入流体层 SU-8 模具,在甩胶台上转速 800 r/min 甩涂 30 s,然后放置在热板上 70°C 加热 10 min,形成 150 μm 厚的 PDMS 薄层;接着调配单体与固化剂比为 10:1 的 PDMS,真空脱气处理后,浇注在阀控制层的 SU-8 模具中,厚为 5 mm,在热板 70°C 加热 20 min,冷却后从硅片剥离,将剥离的阀控制 PDMS 层在显微镜下与流体层的 PDMS 薄层对准贴合,然后移至热板上 90°C 加热 1 h,完成双层 PDMS 的热化学键

合反应, 最后将双层 PDMS 从硅片上剥离, 打好孔并切割合适大小, 与清洗干净的玻璃片进行氧等离子键合, 形成芯片通道的封闭, 完成微流控双层 PDMS 细胞阵列芯片的制作。

1.3 微流控芯片流体的操控

在芯片集成微阀以实现芯片通道微流体的控制。微阀的结构是由上层阀控制层 PDMS 与下层流体层的 PDMS 薄膜构成。由于 PDMS 具有透气性, 不适合采用空气阀, 因此本实验芯片采用液压阀, 即在阀通道内注入水或其他液体, 通过注射器对阀通道的液体施加压力(图 3b, $P>0$), 下层的 PDMS 因杨氏模量小且厚度薄, 易发生形变, 阻挡下层的 PDMS 通道液体的流动, 从而实现阀对通道的封闭效果; 当压力移除后(图 3a, $P=0$), PDMS 薄膜恢复形变, 恢复流体层通道的液体的流通。芯片的阀控制层有两组阀: 横向阀和纵向阀。当多种细胞进样时, 横向阀打开, 纵向阀关闭, 不同的细胞分别进入纵向的细胞培养腔, 由于纵向阀阻隔了横向通道的液体流动, 各个纵向的细胞不会进入别的纵向细胞培养腔, 从而实现多种细胞共培养(图 3 c); 当进行药物实验时, 横向阀关闭, 纵向阀打开, 药物溶液可以保持稳定的浓度作用于横向的不同细胞的培养腔(图 3 d)。因此芯片两组阀的操控可以进行对芯片通道内的微流体的控制, 实现了芯片多种细胞的共培养和不同浓度的药物分别对不同的细胞进行刺激的功能。

1.4 微芯片细胞的培养

微流控细胞阵列芯片培养的细胞采用人肝癌细胞 SMMC-7721、人肝正常细胞 HL-7702(上海中科院上海细胞生物研究所)和人脐静脉内皮细胞 HUVEC-2C(美国 ATCC 公司)。细胞培养液为 RPMI1640(Gibco), 添加 10%的胎牛血清(杭州四季青)和 1%的链青双抗(杭州吉诺生物医药技术有限公司), 细胞消化液为 0.25%的胰酶和 0.02%的 EDTA(杭州吉诺生物医药技术有限公司)。

用聚合物管将制作好的芯片与带有开关阀的注射器连接, 接口处用粘接剂 ELASTOSIL E43(wacker chemie)密封。连接好的芯片通入 75%乙醇, 用紫外线照射 1 h, 进行消毒处理。先用注射泵(PHD2000, Harvard Apparatus)在芯片内通入细胞培养液 2 h, 以排除芯片内残余的乙醇和气泡, 有利于细胞在培养

腔内贴壁生长。芯片移到实验室自制的 ITO 玻璃加热平台^[12], 用连接开关阀的注射器对芯片的纵向阀加压, 然后将生长状态良好的细胞从常规细胞培养皿中消化, 吹打均匀, 通过注射泵导入芯片的各纵列细胞培养腔, 进行细胞培养。每 24 h 通过注射泵更换一次细胞培养液, 注射泵流速为 0.2 $\mu\text{L/s}$, 进样 10 min, 以保证细胞培养时的营养更新和代谢物的排除。

1.5 微芯片细胞的药物作用与检测

芯片细胞培养 72 h 后, 关闭芯片的细胞进样口和纵向阀, 横向阀加压, 芯片药物梯度浓度网络的一个进样口注入含药物 CTP-11(浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$)的培养液, 另一个进样口注入无药物的培养液, 2 个进样口的进样速率为 0.2 $\mu\text{L/s}$, 进样 10 min。药物作用细胞 24 h 后, 用 PBS 除去药物溶液。

芯片内各个培养腔的细胞活性和药物对细胞的作用是通过 LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit 荧光试剂盒(Molecular probes)进行检测。对芯片待检测的细胞, 先通入 PBS 清洗, 再通入含 2 $\mu\text{mol/L}$ Calcein AM 和 4 $\mu\text{mol/L}$ ethidium homodier-1 (EthD-1)的荧光染料混合液在室温下孵育 30 min, 然后在荧光显微镜(Olympus, IX51)下观察并拍照, 拍照的图片用图像分析软件(Image ProPlus 6.0, media cybernetics)进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 芯片的制作

通过微加工技术制作微流控芯片的模具可以由硅片、玻璃和 SU-8 负光刻胶等材料制作。SU-8 负光刻胶可以制作高深宽比的厚膜图形, 以及它良好的力学性能和抗化学腐蚀性, 而且它可以通过多次光刻形成台阶形多层结构复杂的图形, 这是硅片和玻璃等材料不能与之媲美的, 因此基于 SU-8 负光刻胶加工模具的技术在微尺寸的微流控领域得到了广泛应用。本实验的芯片模具采用“两次曝光, 一次显影”的方法制作双层结构的 SU-8 模具, 该方法简便易行、经济耐用。

本实验中通过双层 PDMS 与玻璃键合制作微流控细胞阵列芯片。PDMS 是目前微流控技术中被广泛采用的一种材料, 由于其具有很好的透气性, 因此在 PDMS 芯片细胞生长时所需要的氧气完全可以通过 PDMS 的通透性获得, 而不需要在培养液中溶

解氧气,且PDMS具有良好的透光性和生物相容性,有利于芯片内细胞培养和实时观察。此外通过热化学反应,两层未完全固化的PDMS之间的界面发生交联,完成两层PDMS的键合,这种方法的粘合牢固,可以承受 6×10^5 帕以上的压力。双层PDMS构成控制阀,实现了对微流控芯片的流体的控制,增加了实验芯片的功能和操控性。最终制成的微流控细胞阵列芯片如图4所示,芯片只有一片普通载玻片的大小,芯片内通道的总体积约为 $5 \mu\text{L}$,在细胞药物实验中所需的培养液和药物的消耗为微升数量级,这大大降低了药物筛选的实验成本。

2.2 药物浓度梯度的表征

微流控芯片的药物浓度梯度的形成机制是基于微通道的层流的扩散混合效应^[11]。细胞阵列芯片的药物浓度梯度网络具有5级浓度梯度通道,细胞培养液和含一定药物浓度的细胞培养混合液通过注射泵和连接管以相同的流速分别从2个进样口注入,液流先分为2支相同浓度的分流,其中相邻的2支分流在通道中间混合、扩散,组合成新的浓度的液流进入下一级,在第二级通道网络构成3种不同浓度的液流分支。这样不同浓度的液流不断地分流、混合、扩散,形成新的浓度的液流,芯片最终产生6个浓度梯度的细胞培养混合液。浓度梯度通道采用半径为 $50 \mu\text{m}$ 的半圆波浪型通道,这样的结构可以加强微流控通道的层流效应,可以使药物浓度产生更好的混合效果。

实验采用与药物伊立替康分子量(677.19)相近的荧光染料罗丹明B(479.0175, Acros Organics公司)代替药物进行芯片的药物浓度梯度的表征实验。将含有 1 mmol/L 罗丹明B的细胞培养液和纯细胞培养液通过注射泵以 $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$ 的相同流速从进样口同时进入芯片浓度梯度网络,2 h后,浓度梯度网络形成稳定的梯度浓度罗丹明B溶液,用荧光显微镜拍照6个管道的荧光图片(图5),用图像分析软件Image ProPlus 6.0分析每个通道的相对荧光值(虚线上通道平均荧光值减去背景平均荧光值),从而得到6个通道的罗丹明B浓度(0、0.212、0.523、0.668、0.769和 1.0 mmol/L)。从实验数据分析可知,芯片的药物浓度梯度网络可以产生6个具有一定线性的不同浓度药物溶液同时进入细胞培养腔,刺激细胞。

2.3 芯片细胞的进样与培养

细胞进样时在芯片内的分布是通过芯片培养腔的C型坝结构的物理拦截来实现的^[11,12]。坝顶部与玻璃层之间构成一个高度为 $5 \mu\text{m}$ 的狭缝,而细胞的直径一般为 $10\sim 20 \mu\text{m}$,因此,细胞进入培养腔,由于狭缝的拦截作用和微流体的流动,细胞只分布在培养腔的中心区域,即C型坝内,而其他区域的细胞会随着流体流走,这样细胞阵列芯片可以有效地控制进样细胞的分布区域,以便观察和分析。图7a为细胞进样时在培养腔的分布,进样的细胞都被捕获在坝的缝隙了,当坝的缝隙布满了细胞后,细胞不再进入坝内,流向下一行的培养腔,这样每一行的细胞进样数目基本相同,这样有利于提高细胞分析的可比性和准确性。因此芯片的坝结构对细胞具有很好的拦截作用,而且可以很好地模拟组织细胞培养生长的微环境。

三种细胞(癌细胞SMMC7721、正常肝细胞HL-7702和人脐静脉内皮细胞HUVEC-2C)在芯片阀控制层的作用下分别进入不同列的细胞培养腔,待细胞贴壁后,除去阀作用,实现细胞的共培养。3种不同的细胞可以在物理上保持独立性,同时可以通过液体流动保持彼此的联系和相互作用,这样的细胞共培养可以简单实现一个生理组织(如肝癌组织)的体外模拟培养。图7通过对芯片各个培养腔细胞的荧光照片进行分析,在芯片内3种细胞的活性都可在95%以上,表明了该芯片内的细胞的生长状态良好,适宜进行相关的细胞研究。

2.4 CTP-11对肝癌细胞的药物筛选

从芯片药物浓度梯度的表征实验可知,当通入浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的CTP-11溶液,芯片可形成6个一定梯度的药物浓度作用芯片培养的肝癌细胞(0、21.2、52.3、66.8、76.9和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$),细胞的活性分别为91.6%、84%、75.3%、66.1%、55.3%和37.4%(图6)。因此不同浓度CTP-11作用细胞后,细胞生长活性受到不同程度的抑制,抑制作用随药物浓度的升高而增强。通过对荧光照片的分析,在不同药物浓度作用下,可以发现凋亡过程中细胞的形态变化,如细胞体积缩小、细胞突起以及凋亡小体(图7c、7d)。可见本实验的微流控芯片通过一定的梯度浓度药物刺激细胞,分析细胞对不同浓度药物的毒性反应,研究药物作用的机理,实现细胞药物的筛选。

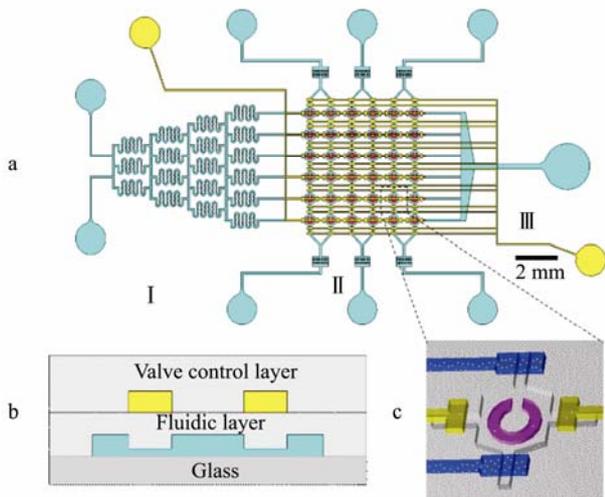


图 1 微流控细胞阵列芯片设计示意图

Fig. 1 Schematic illustration of microfluidic chip. (a) Schematic illustration of microfluidic chip. (b) Three layers of the microfluidic chip. (c) 3-D structure of a chamber containing row valves(yellow), column valves(blue) and C-shaped dam(red).

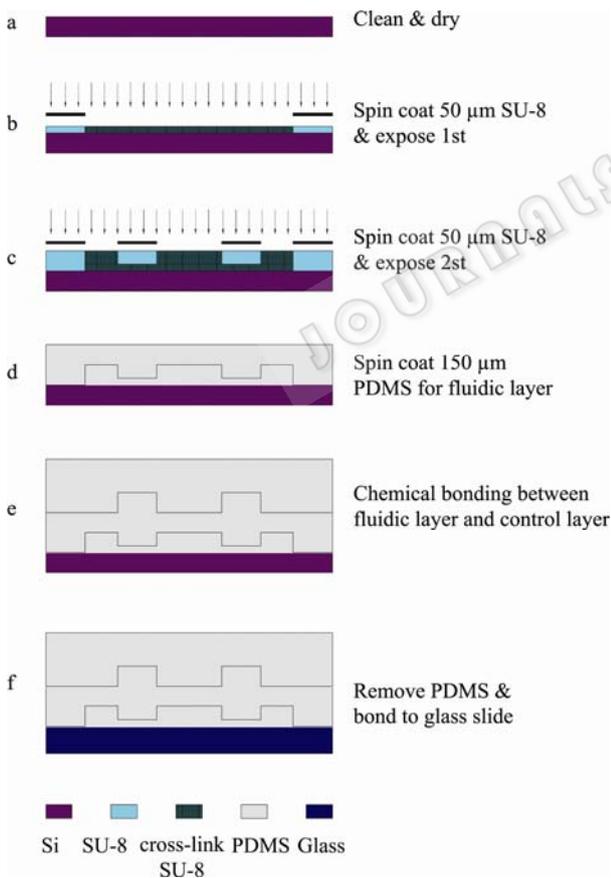


图 2 微流控芯片的制作工艺流程

Fig. 2 Fabrication process for microfluidic chip.

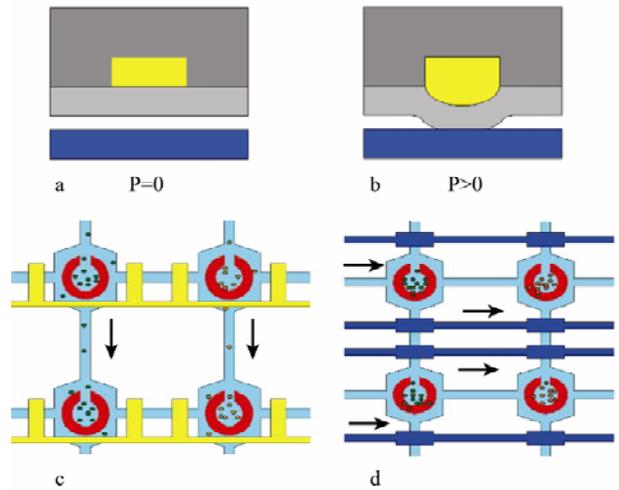


图 3 微阀的结构图和工作原理图

Fig. 3 Structure and work mechanism of the microvalve.

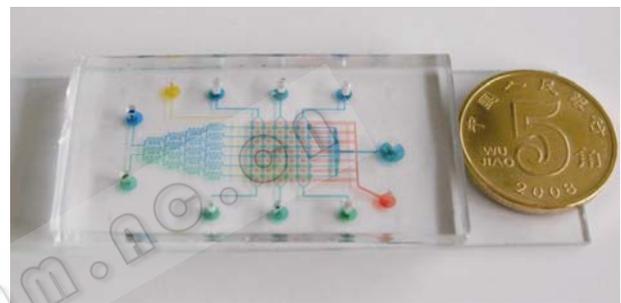


图 4 微流控细胞阵列芯片的实物图

Fig. 4 Photograph of the final microfluidic cell culture array chip.

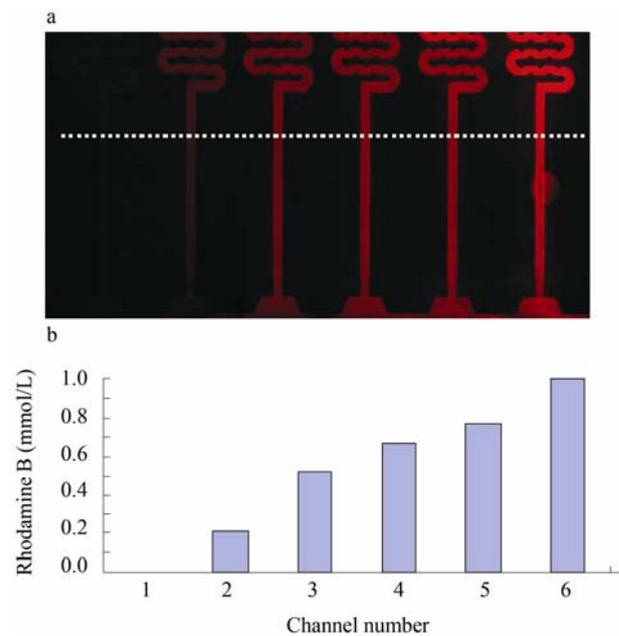


图 5 芯片的罗丹明 B 药物浓度梯度的表征

Fig. 5 Fluorescence micrograph showing six gradient concentrations of Rhodamine B.

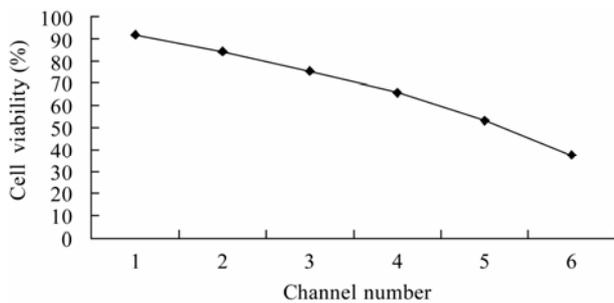


图6 不同浓度的CTP-11对肝癌细胞的活性检测
Fig. 6 Viability of SMMC-7721 against six gradient concentrations of CTP-11 in the chip.

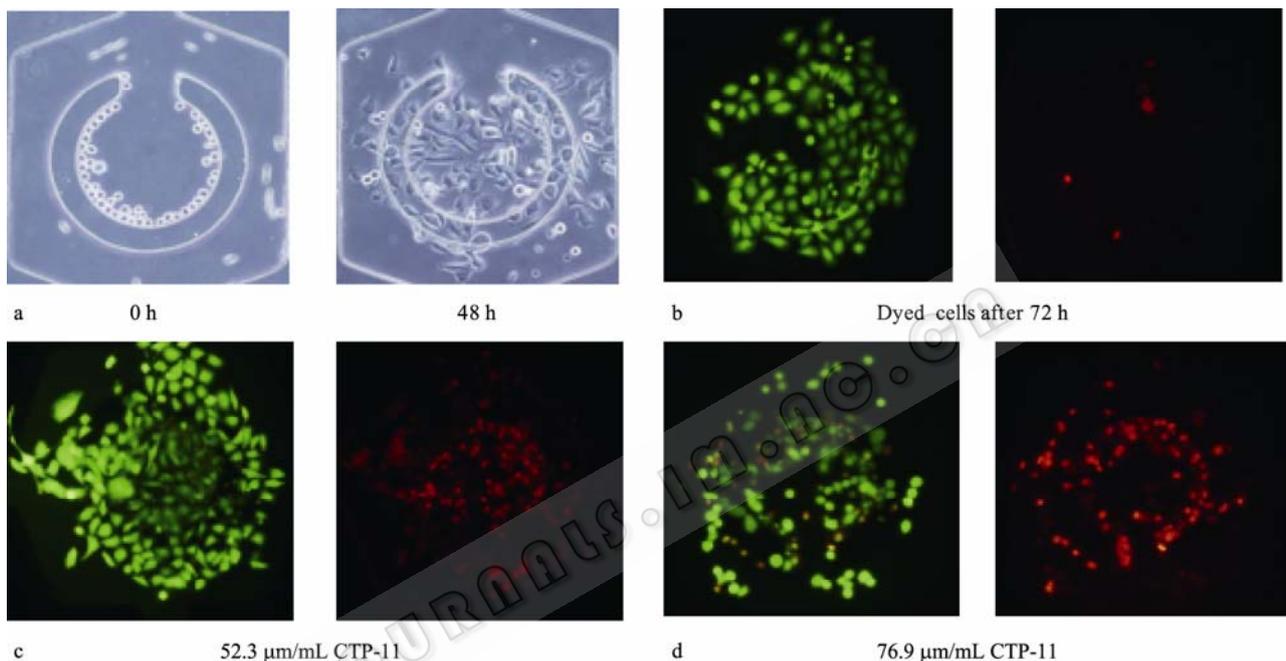


图7 细胞在芯片培养腔的培养、药物作用与检测
Fig. 7 Culturing, drug screening and detection of cells in the chip. (a) Cells growth in the chip after 0 h and 48 h. (b, c, d) Live and dead cells cells stained with Calcein AM and EthD-1 with 24 h treatment of 0, 52.3, 76.9 $\mu\text{m}/\text{mL}$ CTP-11.

决了微流控芯片在基于细胞研究方面的一些关键问题。芯片还设计了药物浓度梯度网络, 形成稳定的梯度药物浓度, 以便研究不同浓度药物对细胞的毒性作用。这些实验验证了微流控细胞阵列芯片在实现细胞药物筛选的高通量、低消耗低成本和快速高效等功能的可行性。因此, 将微流控技术和细胞培养技术有机结合, 可以实现多种细胞的固定培养和不同浓度药物对不同细胞进行并行刺激, 为了药物筛选和细胞组织工程研究提供了一个理想的研究方法和平台。

REFERENCES

- [1] Kang L, Chung BG, Langer R, *et al.* Microfluidics for drug

3 结论

本研究通过对“多次曝光, 一次显影”SU-8工艺以及多层PDMS键合工艺的研究, 设计并制作了具有高深宽比的双层结构的SU-8光刻胶模具, 制作了C型坝三维结构的细胞培养腔阵列, 能够很好地控制细胞在芯片内的生长分布, 有效地解决阵列芯片细胞分布无序的难题。通过双层PDMS键合将微阀器件集成到芯片上, 通过对阀控制网络的操控实现阵列芯片流体的控制。这些工艺的研究有效地解

discovery and development: From target selection to product lifecycle management. *Drug Discovery Today*, 2008, **12**(1/2): 1–13.

- [2] Fang ZL. *Microfluidic Chip*. Beijing: Science Press, 2003. 方肇伦. 微流控分析芯片. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] Dittrich PS, Manz A. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**: 210–218.
- [4] King KR, Wang S, Irimia D, *et al.* A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. *Lab Chip*, 2007, **7**: 77–85.
- [5] Lee PJ, Hung PJ, Rao VM, *et al.* Nanoliter scale microreactor array for quantitative cell biology. *Biotech Bioeng*, 2006, **94**(1): 5–14.
- [6] Ye N, Qin JH, Shi WW, *et al.* Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. *Lab Chip*, 2007, **7**: 1696–1704.

- [7] Thorsen T, Maerkl SJ, Quake SR. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, **298**(5593): 580–584.
- [8] Wu MH, Huang SB, Cui Z, *et al.* Development of perfusion-based micro 3-D cell culture platform and its application for high throughput drug testing. *Sens Actuat B*, 2008, **129**(1): 231–240.
- [9] Huang C, Lee G. A microfluidic system for automatic cell culture. *J Micromech Microeng*, 2007, **17**(7): 1266–1274.
- [10] Shao JB, Wu L, Jin QH, *et al.* Fabrication and application of a novel cell culture microchip. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1253–1257.
- 邵建波, 吴蕾, 金庆辉, 等. 一种细胞培养微芯片的制作及应用. *生物工程学报*, 2008, **24**(7): 1253–1257.
- [11] Jeon NL, Dertinger SKW, Chiu DT, *et al.* Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, 2000, **16**(22): 8311–8316.
- [12] Yang CB, Zhao JL. Chip temperature control system based on 812. *Control & Automation*, 2007, **23**(9-1): 43–45.
- 杨才表, 赵建龙. 基于 AD μ C812 的芯片温度控制系统的研究. *微计算机信息*, 2007, **23**(9-1): 43–45.

中国研制出新型人用 H5N1 禽流感活疫苗

中国国家禽流感参考实验室日前宣布研制出一种新型人用禽流感冷适应致弱活疫苗, 有望对人类感染 H5N1 亚型禽流感病毒实现完全保护。与此前已有的人用禽流感灭活疫苗比较, 新型活疫苗在免疫效果、生产工艺、使用方法等多方面有着革命性进步, 在国际相关领域居最前沿水平。这项研究成果发表在 2009 年 5 月 1 日出版的国际权威学术杂志《公共科学图书馆·病原体》(PloS Pathogens) 上。

科学家们利用非人类灵长类动物猕猴进行了新疫苗免疫保护试验。结果表明, 该疫苗免疫后可完全阻止 H5N1 亚型禽流感病毒在猴体内的复制, 免疫猴在实验观察期内表现完全健康。而攻击病毒在未经免疫的对照猴肺脏内大量复制, 引起急性病毒性肺炎、发热、食欲废绝等与人感染禽流感病毒极为相似的症状。

主持这项研究的国家禽流感参考实验室主任陈化兰博士接受新华社记者采访时说: “我们对该疫苗预防人 H5N1 禽流感的应用前景充满信心。”

据世界卫生组织统计, 目前全球每年有 25 万至 50 万人死于季节性流感。眼下正在墨西哥和美国暴发的新型 H1N1 亚型流感病毒, 因其较强的人与人之间水平传播能力, 引起了新的公共卫生恐慌和对相关防控手段的关注。

世界动物卫生组织证实, 此次北美流感病毒集中了猪流感病毒、人流感病毒和禽流感病毒的特征, 是一种混合流感病毒。陈化兰表示, 在 H5N1 活疫苗研究的基础上, 由国际相关领域专家共同建立的平台, 有能力针对其他新出现的流感疫情快速研发出新的疫苗。

H5N1 亚型禽流感病毒是国际公认的最具危害性的禽流感病毒, 目前已经在全球 60 多个国家的家禽或野禽中流行。该病毒能够从禽类传播到人类, 2003 年以来已在 15 个国家感染 421 人, 导致死亡 257 人, 死亡率高达 61%。

专家指出, 尽管目前已确诊的 H5N1 人禽流感病例均为单发特征, 但并不排除该病毒将来在人与人之间通过呼吸道水平传播, 从而导致大面积灾难性流行的可能性。而防控人禽流感大流行的有效手段亦即唯一手段, 是对人进行疫苗免疫。

目前, 国际上已经有人用 H5N1 禽流感灭活疫苗获准生产并少量储备。但是现有的灭活疫苗具有免疫原性弱、生产工艺复杂的缺陷, 而且需要配合使用有可能对人体健康带来负面作用的佐剂方能实现免疫效果。世界卫生组织估算, 即便启动目前世界上各个国家所有的生产能力, 大概也需要 4 年时间才可以生产出足够的灭活疫苗防止人 H5N1 禽流感流行。生产能力和原材料的制约, 大大降低了使用灭活疫苗应对人禽流感流行的现实可行性。

中国国家禽流感参考实验室与日本东京大学等专家合作研制成功的新型活疫苗与原有灭活疫苗比较, 不仅免疫效果更加可靠, 而且使用方法简单, 从鼻腔喷入即可。活疫苗制剂由鸡胚繁殖后直接冻干产生, 免去了灭活疫苗生产过程中浓缩、灭活和纯化等漫长而复杂的工艺, 大大缩短了生产时间。尤为值得乐观的是, 由于新型活疫苗抗原含量极少, 生产所需鸡胚原料仅有灭活疫苗的百分之一乃至千分之一, 因而具备了规模化生产和大量储备的条件。

陈化兰透露, 国家禽流感参考实验室正在积极争取上级相关部门的支持, 推进新型疫苗的临床评估研究, 以期尽快投入生产和储备。

来源: 新华网
2009-5-1