

甘露糖修饰壳聚糖对巨噬细胞摄取纳米粒的影响

周琳, 朱丽, 陈莉, 曹青日, 崔京浩

(苏州大学医学部药学院 药剂学教研室, 江苏苏州 215123)

摘要: 目的 制备和评价甘露糖修饰壳聚糖包衣乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米粒, 考察其对巨噬细胞毒性和对巨噬摄取功能的影响。方法 采用复乳法制备负载卵清蛋白(OVA)的PLGA纳米粒, 并经甘露糖修饰壳聚糖包衣处理后用激光粒度测定仪测定该纳米粒的大小与 ζ 电位, 透射电镜观察纳米粒的外观形态, BCA法测定OVA含量后计算载药量与释放度。负载异硫氰酸荧光素(FITC)标记的OVA纳米粒与巨噬细胞(RAW 264.7)共孵育, MTT法测定细胞存活率, 荧光显微镜考察摄取程度。结果 OVA-PLGA纳米粒的大小和 ζ 电位均随壳聚糖包衣液浓度的增加而变大($P < 0.05$), OVA载药量范围为7.2%~8.4%。壳聚糖与甘露糖修饰壳聚糖包衣FITC-OVA-PLGA纳米粒与RAW 264.7共孵育后, 对细胞存活率的影响不大($P > 0.05$), 但可明显促进FITC-OVA-PLGA纳米粒的巨噬细胞摄取($P < 0.05$)。结论 初步建立了负载模型抗原的甘露糖修饰阳离子型纳米粒系统, 这为体内抗原递呈细胞靶向性研究提供了依据。

关键词: 甘露糖受体; 壳聚糖; 乳酸-羟基乙酸共聚物; 巨噬细胞

中图分类号: R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1673-0399(2011)04-0613-05

Effects of Mannose Modified Chitosan on the Macrophage Uptake of Nanoparticles

ZHOU Lin, ZHU Li, CHEN Li, CAO Qing-ri, CUI Jing-Hao

(Dept of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Science, Medical College, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

Abstract: Objective To prepare and evaluate mannose modified chitosan (Man-CS) coated poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles (NPs), observe its cytotoxicity and effects on the uptake of macrophages. **Method** Ovalbumin (OVA) loaded PLGA NPs were prepared by double emulsion method and coated with CS or Man-CS. The size and zeta potential of NPs were detected by a laser particle size analyzer, BCA method was used to measure OVA concentration and calculate the drug loading and release rate. The cytotoxicity and phagocytosis of FITC-OVA loaded NPs were investigated by MTT method and fluorescence microscope after incubating with macrophage cells (RAW 264.7). **Results** Both of the particle sizes and zeta potentials of the OVA-PLGA nanoparticles increased with increasing the concentration of CS, and the loading amount of OVA was in the range of 7.2%~8.4%. No significant cytotoxicity was observed after incubating CS or Man-CS coating FITC-OVA-PLGA nanoparticles with RAW 264.7 ($P > 0.05$) but noticeable phagocytosis effects were obtained ($P < 0.05$). **Conclusions** The model antigen loaded cationic nanoparticles modified with mannose-chitosan are prepared and it will provide evidences for the research of antigen presentation cell targeting delivery systems.

Key words: mannose receptor; chitosan; poly lactic-co-glycolic acid; macrophage

巨噬细胞和树突状细胞是体内的专职抗原递呈细胞(antigen presentation cells, APCs),在天然和获得性免疫、炎症与肿瘤的预防及治疗中发挥着重要作用^[1-3]。通过提高疫苗对APCs的靶向性和摄取率,可达到促进机体免疫应答和减轻毒副作用的目的^[4,5]。巨噬细胞具有吞噬外来微粒物质的特性,如果采用受体介导纳米载体给药等主动靶向的策略,则可进一步提高抗原的定向输送。据报道,巨噬细胞表面有大量C-型凝集素家族跨膜蛋白-甘露糖受体的表达,以识别细胞或病原体表面多糖分子和可溶性糖蛋白,并通过配体-受体结合作用,经内吞或吞噬过程消除病原体及体内多余糖蛋白^[6]。Yeeprae等^[7]通过制备甘露糖修饰O/W乳剂,提示了配体密度对细胞识别与吞噬作用的影响。Zhou等^[8]将甘露糖修饰壳聚糖微球应用于提高乙肝病毒DNA的免疫应答,表明甘露糖修饰使壳聚糖微球的释放和膜通透性均得到改善。本研究以卵清蛋白(ovalbumin, OVA)为模型抗原,采取复乳法制备生物可降解乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)纳米粒,利用自制甘露糖修饰壳聚糖进行包衣处理后考察其对巨噬细胞摄取功能的影响,以便为新型疫苗制剂的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

异硫氰酸荧光素(FITC)-OVA和甘露糖修饰壳聚糖(Man-CS)由本实验室自制;乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA 50:50,分子量为20 000)购自济南岱罡生物技术有限公司;壳聚糖(CS,分子量为8 000~10 000)购自南通兴成生物制品厂;2,2'-联喹啉,4,4'-二甲酸二钠(BCA,纯度:BR)购自苏州工业园区亚科化学试剂有限公司;DMEM高糖培养基购自Gibco公司;新生牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司;胰酶、谷氨酰胺(纯度:BR)购自国药集团化学试剂有限公司;Hepes和DAPI染色液购自海门市碧云天生物技术研究;巨噬细胞(RAW 264.7)购自中科院上海细胞库。

1.2 Man-CS包衣PLGA纳米粒的制备

OVA-PLGA纳米粒的制备参考文献^[9]:将250 μl含有10 mg OVA的聚乙烯醇(PVA)溶液(质量浓度为3%)加至PLGA乙酸乙酯溶液中,冰浴超声10 s(200W,工作1 s/间隔1 s),制得初乳(W₁/O)。然后

将初乳加至PVA溶液(质量浓度为3%),冰浴中匀速搅拌(15 000 r/min × 5 min),超声乳化(400W,工作1 s/间隔1 s),形成水包油包水型复乳(W₁/O/W₂)。最后将复乳转移至PVA溶液中(20 ml,质量浓度为0.5%),室温下磁力搅拌至完全挥发有机溶剂,离心(3 000 r/min × 10 min),弃去沉淀。取上清液离心(19 000 r/min × 20 min),收集沉淀,去离子水洗涤3次。预冻(-70℃)、冷冻干燥,即得PLGA纳米粒。

CS或Man-CS包衣:将上述复乳直接加至含一定浓度CS或Man-CS的PVA醋酸溶液(质量浓度为0.5%),室温下挥发有机溶剂,离心,水洗3次,冷冻干燥即得。

1.3 纳米粒的制剂学评价

1.3.1 纳米粒大小与ζ电位测定 取纳米粒胶体溶液或者分散于蒸馏水的冻干纳米粒,用激光粒度分析仪测定纳米粒大小与ζ电位。

1.3.2 纳米粒形态观察 取纳米粒溶液稀释到适当的浓度,滴加2%磷钨酸染色,滴至铜网上,透射电子显微镜下观察粒子形态。

1.3.3 包封率和载药量测定 精密称取冻干纳米粒20 mg,加至1 ml 5%十二烷基硫酸钠/0.1 mol/L NaOH溶液中,25℃下恒温振荡4 h,离心(10 000 r/min)10 min。BCA法测定上清液中的OVA含量,并按照下述公式计算载药量(loading amount, LA)和包封率(entrapment efficiency, EE):

$$LA = \frac{\text{纳米粒中蛋白质的量}}{\text{纳米粒的质量}} \times 100\%$$

$$EE = \frac{\text{纳米粒中蛋白质的量}}{\text{加入的蛋白质的总量}} \times 100\%$$

1.3.4 纳米粒体外释放 精密称取冻干纳米粒50 mg分散于1.5 ml的EP管中,加入1 ml泊洛沙姆188溶液(质量浓度为0.02%,PBS, pH=7.4),37℃下恒温振荡,在预定的时间精密取出0.5 ml,离心(19 000 r/min)15 min。取上清液,BCA法测定蛋白质浓度,计算释放度,并补加相同体积的释放介质。

1.4 Man-CS-OVA-PLGA纳米粒的细胞毒性实验

37℃下迅速解冻冻存的巨噬细胞(RAW 264.7),加入DMEM高糖培养液7 ml,1 000 r/min离心洗涤两次。加入含有10%小牛血清的DMEM高糖培养液(含有100 U/ml青霉素与链霉素)37℃、5% CO₂孵箱中培养,第2天更换培养液,细胞铺满70%~80%时,用0.25%的胰酶消化传代。

以 5×10^3 /孔将细胞接种于 96 孔板,培养至细胞贴壁后,实验组加入游离的 FITC-OVA、含有 FITC-OVA 的 PLGA 纳米粒、壳聚糖包衣的 PLGA (CS-PLGA) 纳米粒以及甘露糖修饰的 CS 包衣的 PLGA (Man-CS-PLGA) 纳米粒。另设细胞空白对照孔,每孔设 6 个复孔。培养箱中培养一定时间后取出 96 孔板,每孔吸出 10 μ l 培养基,加入四甲基偶氮唑盐 (MTT) 10 μ l,继续培养 4 h。吸弃全部上清液,每孔加入 100 μ l 的 SDS-HCl 过夜后,用酶标仪于 570 nm 处测其吸光度 (A) 值,以培养基空白孔调零,计算细胞活力。

1.5 巨噬细胞摄取实验

将经胰酶消化的对数生长期巨噬细胞接种于 6 孔板内 (5×10^5 /ml),每孔 2 ml,培养过夜。再分别加入 PBS、游离的 FITC-OVA、FITC-OVA-PLGA 纳米粒、CS-PLGA 纳米粒和 Man-CS-PLGA 纳米粒,共孵育 8 h。弃去上清液,用 PBS 洗 3 次后置荧光显微

镜下观察。上述试验中, FITC-OVA 的浓度均为 20 μ g/ml。

1.6 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Man-CS 包衣对 OVA-PLGA 纳米粒制剂学特征的影响

CS 或 Man-CS 包衣对 PLGA 纳米粒大小、 ζ 电位和载药量的影响结果见表 1。由表 1 可见,壳聚糖包衣使 PLGA 纳米粒的粒径增加,且随着壳聚糖浓度的增加而趋势明显 ($P < 0.05$)。PLGA 纳米粒的 ζ 电位为负值,经壳聚糖包衣后转变为正值,并受壳聚糖浓度的影响 ($P < 0.05$)。但是,壳聚糖包衣浓度对 OVA 的载药量影响不大 ($P > 0.05$)。

表 1 CS 或 Man-CS 包衣对纳米粒制剂学特征的影响

| CS (%) | 大小 (nm) | 多分散指数 | ζ 电位 (mV) | 载药量 (%) |
|--------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 0 | 246 \pm 10 | 0.105 \pm 0.038 | -10.18 \pm 0.23 | 8.2 \pm 0.2 |
| 0.5 | 256 \pm 30 | 0.135 \pm 0.048 | 2.40 \pm 0.15 | 8.4 \pm 0.6 |
| 1.0 | 288 \pm 13 | 0.158 \pm 0.018 | 13.06 \pm 0.85 | 7.2 \pm 1.5 |
| 2.0 | 382 \pm 31 | 0.175 \pm 0.061 | 44.67 \pm 0.91 | 8.1 \pm 0.9 |
| 1.0* | 305 \pm 16 | 0.103 \pm 0.045 | 8.13 \pm 0.89 | 7.8 \pm 0.6 |

* 1% Man-CS 包衣液

2.2 Man-CS 包衣 OVA-PLGA 纳米粒的形态学观察

PLGA 纳米粒及不同包衣处理纳米粒的扫描电镜照片显示: PLGA 纳米粒形状圆整,大小较均匀;

CS 包衣 PLGA 纳米粒大小略有增加,并有部分粘连现象; Man-CS 包衣 PLGA 纳米粒大小变化不大,偶见形态不规整的微粒(图 1)。

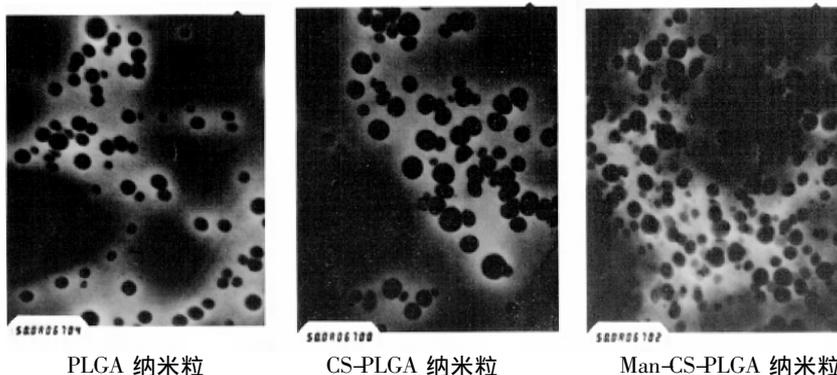
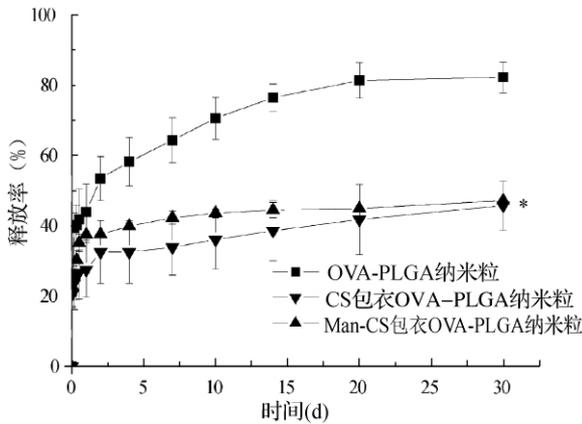


图 1 纳米粒的扫描电镜图 ($\times 50\ 000$)

2.3 Man-CS 包衣对 OVA-PLGA 纳米粒释放的影响

OVA-PLGA 纳米粒的释放呈明显的突释与缓释特征, OVA 的 1 h 释放百分率超过 30%, 随后显示接近零级速度的释放, 30 d 释放百分率达到 80%; OVA-PLGA 经 CS 和 Man-CS 包衣后, OVA 突释现象降低, 但是 OVA 总释放百分率也明显下降(均 $P < 0.05$) (图 2)。

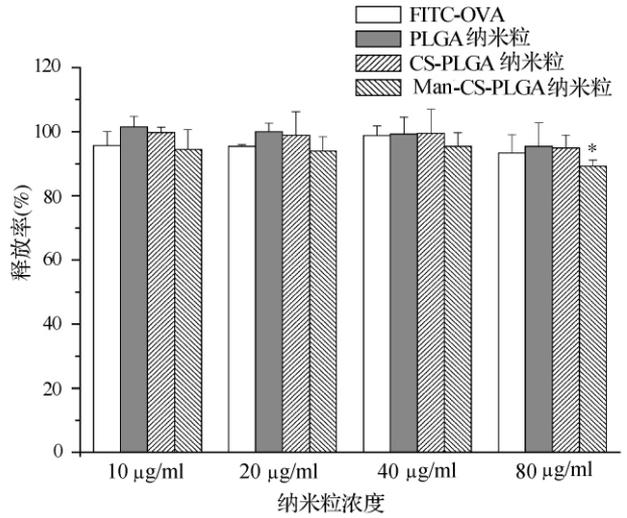


与 OVA-PLGA 纳米粒相比, $P < 0.05$ ($n = 6$)

图 2 甘露糖/壳聚糖修饰对 OVA 的 PLGA 释放的影响

2.4 纳米载体的细胞毒性实验

将巨噬细胞分别与游离的 FITC-OVA、FITC-OVA-PLGA 纳米粒、CS-包衣 PLGA (CS-PLGA) 纳米粒和甘露糖修饰壳聚糖包衣 PLGA (Man-CS-PLGA) 纳米粒孵育 8 h, 用 MTT 法测定细胞的活力结果如图 3 所示。由图 3 可见, 浓度为 10 ~ 80 $\mu\text{g/ml}$ 的游离 FITC-OVA、FITC-OVA-PLGA 纳米粒、CS-PLGA 纳米粒和 Man-CS 包衣 PLGA 纳米粒与巨噬细胞共孵育后, 除 80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度 Man-CS-PLGA 纳米粒以外, 细胞存活率均高于 90%, 方差分析显示, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



与其他 3 组相比, $* P < 0.05$ ($n = 6$)

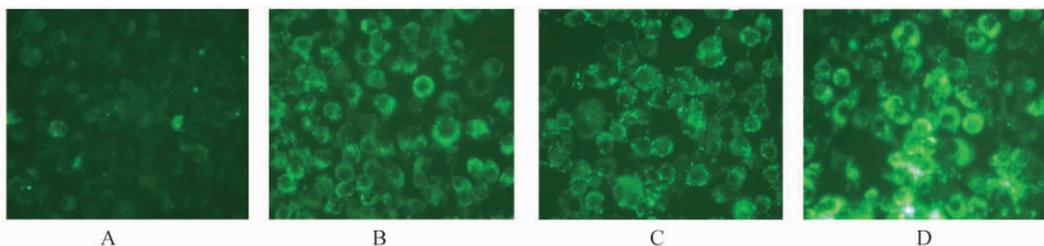
图 3 纳米粒对巨噬细胞毒性的影响

2.5 巨噬细胞摄取实验

Man-CS 包衣对巨噬细胞 FITC-OVA-PLGA 纳米粒摄取功能的影响如图 4 所示。由图 4 可见, 巨噬细胞与游离的 FITC-OVA 溶液共孵育后, 荧光强度较弱。但是, 巨噬细胞与 FITC-OVA-PLGA 纳米粒共孵育后, 荧光强度明显增强; 与 Man-CS 包衣 FITC-OVA-PLGA 纳米粒共孵育后的巨噬细胞显示最强的荧光, 其次为 CS 包衣 FITC-OVA-PLGA 纳米粒。

3 讨论

本研究制备了 CS 和 Man-CS 包衣的含 FITC-OVA 的 PLGA 纳米粒, 并对其制剂学性质进行了评价。制得纳米粒粒径为 $(256 \pm 30) \sim (305 \pm 16) \text{ nm}$, 载药量为 $(7.2 \pm 1.5) \% \sim (8.4 \pm 0.6) \%$ 。经包衣处理后, PLGA 纳米粒大小呈增加的趋势, 微粒表面电荷也由负电荷转变为正电荷, 且受 CS 浓度的影响。包衣处理降低了 OVA 的突释效应, 但也阻碍后续的释放过程, 表明其处方与制备工艺还有待于优化。



A: FITC-OVA 溶液; B: FITC-OVA-PLGA 纳米粒; C: CS-FITC-OVA-PLGA 纳米粒; D: Man-CS-FITC-OVA-PLGA 纳米粒

图 4 荧光显微镜下 Man-CS 包衣对巨噬细胞的摄取功能的影响 ($\times 400$)

巨噬细胞与不同纳米载体共孵育后的 MTT 试验结果表明,细胞存活率均在 90% 以上,没有明显的细胞毒性。巨噬细胞的 FITC-OVA 摄取率从低至高顺序依次为 FITC-OVA 溶液 < FITC-OVA-PLGA 纳米粒 < CS-FITC-OVA-PLGA 纳米粒 < Man-CS-FITC-OVA-PLGA 纳米粒。纳米粒的巨噬细胞摄取高于溶液,这与液态和纳米粒的摄取机制不同有关^[10]。另外,由于细胞膜表面一般荷负电,CS 包衣使 FITC-OVA-PLGA 纳米粒表面荷正电荷,再经巨噬细胞表面表达受体相关甘露糖配体修饰,可明显促进细胞的摄取。

参考文献:

- [1] Alizadeh D, Zhang LY, Hwang JY, *et al.* Tumor-associated macrophages are predominant carriers of cyclodextrin-based nanoparticles into gliomas [J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2010, 6(2): 382-390.
- [2] Jhunjhunwala S, Raimondi G, Thomson AW, *et al.* Delivery of rapamycin to dendritic cells using degradable microparticles [J]. *Journal of Controlled Release*, 2009, 133(3): 191-197.
- [3] 石艳, 张惠斌, 宗莉. 靶向甘露糖受体的载体甘露糖化壳聚糖的全合成及其细胞毒性评价 [J]. *药物生物技术*, 2009, 16(3): 207-211.
- [4] Soma CE, Dubernet C, Barratt G, *et al.* Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells in

vitro [J]. *Journal of Controlled Release*, 2000, 68(2): 283-289.

- [5] Waeckerle-Men Y, Groettrup M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(3): 475-482.
- [6] Jiang Hu-Lin, Kang Mi-Lan, Quan Ji-Shan, *et al.* The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1931-1939.
- [7] Yeeprae W, Kawakami S, Yamashita F, *et al.* Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylated O/W emulsions by macrophages [J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 114(2): 193-201.
- [8] Zhou Xianfeng, Liu Bin, Yu Xianghui, *et al.* Controlled release of PEI/DNA complexes from mannose-bearing chitosan microspheres as a potent delivery system to enhance immune response to HBV DNA vaccine [J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 121(3): 200-207.
- [9] McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Colonic antigen administration induces significantly higher humoral levels of colonic and vaginal IgA, and serum IgG compared to oral administration [J]. *Vaccine*, 2008, 26(5): 639-646.
- [10] Sharma G, Valenta DT, Altman Y, *et al.* Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages [J]. *Journal of Controlled Release* 2010, 147(3): 408-412.

[责任编辑:倪青]

(上接第 553 页)

- [11] Ding Jie, Cheng Yan, Gao Shan, *et al.* Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats [J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(2): 222-230.
- [12] Marco Fiore, Viviana Triaca, Tiziana Amendola, *et al.* Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice [J]. *Physiology & Behavior*, 2002, 77(6): 437-443.
- [13] Sarnowska A, Braun H, Sauerzweig S, *et al.* The neuro-

protective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue [J]. *Exp Neurol*, 2009, 215(2): 317-327.

- [14] Yang Haijie, Xia Yinyan, Lu Songqing, *et al.* Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/ERK, and transcription factor AP-1 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9): 5287-5295.
- [15] Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, *et al.* Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor [J]. *Science*, 1993, 261(5119): 345-348.

[责任编辑:陈林华]