

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.22.005

蛙凝素修饰聚谷氨酸纳米粒的制备、表征及 Calu-3 细胞摄取研究*

卢丽娜¹ 吴红兵¹ 苏靖¹ 杨国汉² 邹海森¹ 张君睿¹ 邱明丰^{1Δ}

(1 上海交通大学药学院 上海 200240; 2 重庆市第三军医大学附属大坪医院中医科 重庆 400021)

摘要 目的:考察蛙凝素(Odorranalectin, OL)修饰对聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇纳米粒(PBLG-PEG-NPs)材料的 Calu-3 细胞(人肺腺癌细胞)毒性和细胞摄取作用的影响。**方法:**碘氧化法制备蛙凝素修饰聚合物材料;以姜黄素(curcumin, Cur)为模型药物,采用乳化溶媒蒸发法制备聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇纳米粒(PBLG-PEG-NPs)和蛙凝素修饰聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇纳米粒(OL-PBLG-PEG-NPs);MTT 法考察三种纳米粒对 Calu-3 的细胞毒性;采用激光共聚焦显微镜对两种纳米粒的 Calu-3 细胞摄取作用进行定性观察。**结果:**给予高浓度($2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)纳米粒培养 Calu-3 细胞时,细胞存活率大于 75%。蛙凝素修饰纳米粒后其被细胞摄取的量从 62.7%增加到了 81.2%。**结论:**OL 可用于黏膜给药载体的修饰,OL-PBLG-PEG-NPs 细胞毒性低、生物相容性好,有望成为一种鼻腔粘膜给药优良载体。

关键词:蛙凝素;聚谷氨酸;纳米粒;细胞毒性;细胞摄取

中图分类号:R285.5;R944 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)22-4219-04

Preparation, Characterization and Calu-3 Cellular Uptake Research on Odorranalectin-conjugated PBLG Nanoparticles*

LU Li-na¹, WU Hong-bing¹, SU Jing¹, YANG Guo-han², ZOU Hai-miao¹, ZHANG Jun-rui¹, QIU Ming-feng^{1Δ}

(1 School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China;

2 Dept. of Traditional Chinese Medicine, Daping Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing, 400021, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the cytotoxicity and cellular uptake efficiency of OL modified PBLG-PEG-NPs (PL-PBLG-PEG-NPs) compared with the non-modified one. **Methods:** OL-PEG-PLGA was synthesized using iodine oxidation method. MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of Poly (γ -benzyl-L-glutamate) block-poly (ethylene glycol) nanoparticles (PBLG-PEG-NPs) to Calu-3 cells. The cellular uptake of nanoparticles was visualized by confocal laserscanning microscope. **Results:** The cytotoxicity results indicated that cell viability had reached 75 % while Calu-3 cells were incubated at high concentration of $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. After PBLG nanoparticles were odorranalectin-conjugated, the cellular uptake ratio raised from 62.7 % to 81.2 %. **Conclusion** OL-PBLG-PEG-NPs had low cell cytotoxicity and good biocompatibility. It might be used for nasal mucosa drug delivery.

Key words: Odorranalectin; PBLG; Nanoparticle; Cytotoxicity; Cellular uptake

Chinese Library Classification: R-944 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)22-4219-04

前言

姜黄素是从姜科姜黄属植物根茎中分离出的酚类物质,可保护正常细胞免受各种不良因素的损伤,有抗炎、抗氧化、调节免疫、降血脂等多种作用^[1],对阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)等脑部疾病具有良好的治疗作用^[2]。然而由于血脑屏障(brain blood barrier, BBB)和体内代谢降解作用的存在,使常规注射和口服给药不能实现姜黄素入脑的有效递送^[3]。纳米粒的包载能提高姜黄素的稳定性^[4],同时鼻腔给药能避免首过效应,使药物绕过血脑屏障直接入脑^[5]。因此,纳米粒经鼻给药被认为是一种有效的姜黄素治疗 AD 的给药方式。

氨基酸类聚合物(Poly (amino acid), PAA)不但与活体组织

和释放药物具有良好的生物相容性和化学结构匹配性,而且可以通过生物降解为天然氨基酸组分来调节药物释放^[6],其通过体内酶的作用参与新陈代谢,营养物质被人体吸收^[7],是一类理想的纳米粒材料。但普通纳米粒如聚赖氨酸纳米粒和聚乙二醇-聚赖氨酸酯共聚物纳米粒仍存在透粘膜能力不强、易被鼻纤毛快速清除、滞留时间短的问题^[8,9]。鉴于普通纳米粒存在的不足,一些表面修饰的纳米粒载药系统被提出,其中采用麦胚凝集素(WGA)、荆豆凝集素(UEA)修饰的 PLGA-NP 已显示出明显增加药物鼻粘膜的吸收^[10-12]。蛙凝素是从臭蛙皮肤分泌物中分离提取到的一种仅含 17 个氨基酸的多肽,也是当今国际上已发现的最小凝集素^[13]。体外糖基抑制凝集试验发现 OL 可与 L-岩藻糖的糖基发生特异结合^[14],而 L-岩藻糖糖基在嗅黏膜

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81001407)

Δ 通讯作者:邱明丰, Tel:86-021-34204052, E-mail: mfqiu@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2014-02-23 接受日期:2014-03-20)

上有特异表达,故 OL 可用于黏膜给药载体的修饰,用于经鼻入脑递药系统的构建,并消除或减少目前一些大分子凝集素存在的毒性和免疫原性问题。

本实验中,通过研究 PBLG-PEG-NPs 和 OL-PBLG-PEG-NPs 材料的 Calu-3 细胞毒性和细胞摄取作用,进行了蛙凝素修饰 PBLG-PEG-NPs 后细胞摄取纳米粒能力改变的考察,为研究姜黄素纳米粒经鼻给药治疗 AD 提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姜黄素 (curcumin, Adamas Reagent Co.Ltd, 纯度>95%); PEG2000-PBLG (中国科学院化学研究所合成, Mw=50000); Mal-PEG-PLGA (电子科技大学微电子与固体电子学院, Mw=23987), 蛙凝素(OL, odorranalectin, 杭州中肽生化有限公司合成);胆酸钠(梯希爱化成工业发展有限公司, 纯度>98%);人肺癌细胞 Calu-3 (中国科学院上海生科院细胞生物学研究所);DMEM/F-12 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Gibco 公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, 上海碧云天生物技术有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

JY92-IIDN 超声波细胞破碎仪 (宁波新芝有限公司);96 孔细胞培养板、24 孔细胞培养板(Nunc 公司);细胞爬片(上海卧宏生物科技有限公司);Zetasizer nano-zs90 激光粒度仪 (英国 Malvern 公司);Janonavi E-Sweep 原子力显微镜 (日本 SEIKO 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);Agilent 1200 series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);细胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.3 实验方法和步骤

1.3.1 蛙凝素修饰聚合物材料的合成 取 Mal-PEG-PLGA 聚合物材料,精确称量为 6.6 mg,溶于 0.6 mL DMF 中,取 OL,精确称量为 1 mg,溶于 0.8 mL TCEP 中,混合,补充 pH 7.0 PBS 至 2 mL,避光充氮气,室温搅拌 6 h 后停止反应,透析除去 DMF,加入两倍量碘,反应搅拌 2 h 后透析除去多余的碘,冻干,即得蛙凝素修饰的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(OL-PEG-PLGA)。

1.3.2 纳米粒制备 取 PBLG-PEG 聚合物材料,精确称量为 21 mg,溶于 1.4 mL 二氯甲烷中,加入 1%胆酸钠 2.8 mL,冰浴下探头超声 2 min。在磁力搅拌下将所得混悬液加入 30 mL 0.5%胆酸钠中,搅拌 5 min,常温减压旋转蒸发至无气泡产生。称取适量姜黄素溶于二氯甲烷中,向 1.4 mL 此溶液加入

PBLG-PEG 21 mg 充分溶解后再加入 1%胆酸钠 2.8 mL,冰浴下探头超声,其余步骤同上,可制备姜黄素聚谷氨酸苄酯聚乙二醇纳米粒(Cur-PBLG-PEG-NP)。按 9:1 比例混合 PBLG-PEG 与 OL-PEG-PLGA,其余步骤同上,可制备蛙凝素修饰姜黄素聚谷氨酸纳米粒。使用粒度及表面电位测定仪测量纳米粒的粒径及 Zeta 电位,生物透射电镜观察纳米粒形态,HPLC 测定载药量和包封率。

1.3.3 细胞毒性测定 试验采用 MTT 法^[5],将 Calu-3 细胞以细胞数 1×10^5 个/孔接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞贴壁生长后,弃培养液,加入 PBLG-PEG-NP 和 OL-PBLG-PEG-NP (用培养基分别稀释为 0.125、0.25、0.5、1、2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)200 μL ,以未处理的空白细胞为对照,每个浓度设 3 个平行组。继续培养 24 h 后,每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL ,继续培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入 DMSO 100 μL 。培养板 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 10 min,用酶联检测仪在 570 nm 处测定吸光度(A),计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%。$$

1.3.4 定性观察细胞摄取 在 24 孔板中放置细胞爬片,将 Calu-3 细胞以 10^6 个/ cm^2 密度接种于 24 孔细胞培养板中,培养 24 h 后弃去培养液。用 PBS 洗细胞 3 次,取姜黄素浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Cur-PBLG-PEG-NP、Cur-OL-PBLG-NP 和姜黄素溶液各 1 mL 分别加入到实验孔中孵育,平行三组。4 h 后弃培养液,加入冰冷的 PBS 停止孵育。PBS 洗细胞 5 次后加入 4%多聚甲醛固定细胞 20 min,再用 PBS 洗细胞 3 次,DAPI 染色 10 min。吸去 DAPI 染色液,用 PBS 洗细胞 3 次后向孔中滴加抗荧光淬灭剂。将细胞爬片取出,倒置于盖玻片上,于激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 纳米粒粒径、Zeta 电位及包封率、载药量

用乳化溶媒蒸发法制备的 PBLG-PEG-NP 混悬液为带蓝色乳光、半透明的均匀分散体系。透射电镜观察到 PBLG-PEG-NP 和 OL-PBLG-PEG-NP 呈球形或椭圆形,分散良好,大小均一(图 1)。激光粒度仪测得的 PBLG-PEG-NP 和 OL-PBLG-PEG-NP 水合粒径均在 80~100 nm 之间,Zeta 电位 -20 mV 左右,PDI 小于 0.2,粒径分布集中(表 1)。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 1 个月未见沉淀,体系较稳定,此粒径将利于纳米粒透膜。结果表明:PBLG-PEG-NPs 和 OL-PBLG-PEG-NPs 的载药量和包封率没有明显差异。

表 1 PBLG-PEG-NPs, OL-PBLG-PEG-NPs 和 Cur-PBLG-PEG-NPs, Cur-OL-PBLG-PEG-NPs 的表征

Table 1 Characteristics of PBLG-PEG-NPs, OL-PBLG-PEG-NPs and Cur-PBLG-PEG-NPs, Cur-OL-PBLG-PEG-NPs.(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Type of nanoparticles	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV	Loading capacity/%	Encapsulation efficiency/%
PBLG-PEG-NPs	102.2 $\pm$ 2	0.132	-22.4 $\pm$ 2		
Cur-PBLG-PEG-NPs	101.3 $\pm$ 3	0.152	-24.2 $\pm$ 3	1.54%	64.20%
OL-PBLG-PEG-NPs	96.99 $\pm$ 3	0.194	-23.9 $\pm$ 4		
Cur-OL-PBLG-PEG-NPs	92.73 $\pm$ 2	0.185	-22.1 $\pm$ 3	1.62%	67.30%

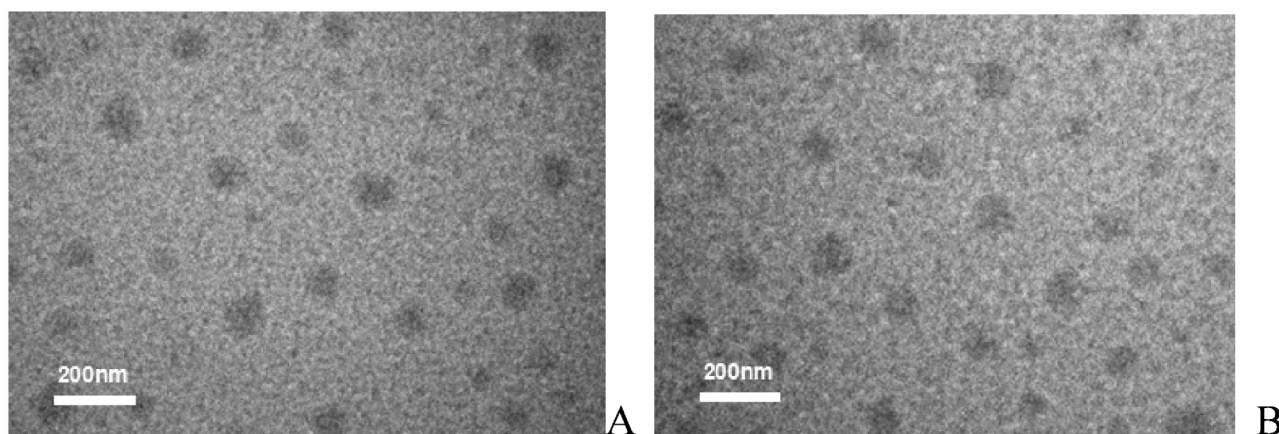


图 1 PBLG-PEG-NPs(A)和 OL-PBLG-PEG-NPs(B)在生物透射电镜下的纳米粒形态

Fig.1 Morphological characterization of PBLG-NPs using biological transmission electron microscopy. PBLG-PEG-NP(A), OL-PBLG-PEG-NP(B).

2.2 细胞毒性

PBLG-PEG-NPs 和 OL-PBLG-PEG-NPs 对 Calu-3 细胞存活率的影响见图 2, 低浓度(0.125、0.25、0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)下纳米粒与细胞作用后细胞存活率都在 100 % 左右, 即使在较高浓度(2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 下纳米粒与细胞作用后细胞存活率也能大于 75 %。表明 PBLG-PEG-NPs 和 OL-PBLG-PEG-NPs 对 Calu-3 细胞存活率的影响无显著差异, 即 PBLG-PEG-NPs 和 OL-PBLG-PEG-NPs 对 Calu-3 细胞具有较低毒性。

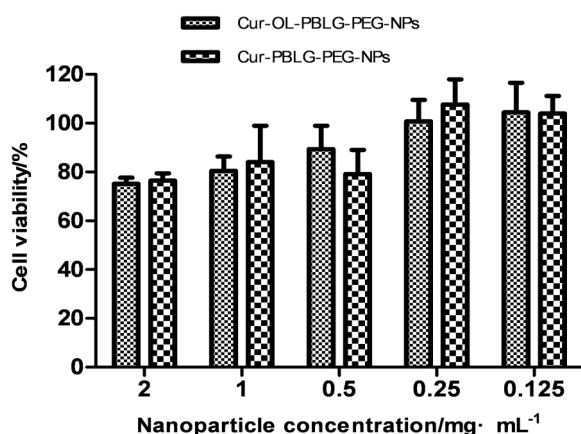


图 2 浓度为 0.125、0.25、0.5、1、2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PBLG-PEG-NPs 和 OL-PBLG-PEG-NPs 对 Calu-3 细胞的细胞毒性实验 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 In vitro cytotoxicity of PBLG-PEG-NPs and OL-PBLG-PEG-NPs at concentrations range from 0.125 to 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ on Calu-3 cells ($n=5, \bar{x} \pm s$)

2.3 激光共聚焦显微镜观察载姜黄素纳米粒的细胞摄取

DAPI 作为能够与 DNA 强力结合的荧光染料, 其与细胞结合后能在激光共聚焦显微镜下观察到蓝色荧光, 同时我们可以在激光共聚焦显微镜下观察到 Cur-PBLG-PEG-NP 和 Cur-OL-PBLG-PEG-NP 作用于 Calu-3 细胞后(图 3)均可见绿色荧光, 表明 Cur-PBLG-PEG-NP 和 Cur-OL-PBLG-PEG-NP 均可被 Calu-3 细胞摄取。绿色荧光与蓝色荧光几乎可以达到完全重叠, 表明 Cur-PBLG-PEG-NP 和 Cur-OL-PBLG-PEG-NP 不是简单吸附在细胞膜表面而是摄取进入细胞内部。同时可以观察到在同样孵育条件下, Cur-OL-PBLG-PEG-NPs 作用于细胞后所发射的荧光强度高于 Cur-PBLG-PEG-NPs, 细胞摄取百分

率由增加了 29.5 %, 表明蛙凝素的修饰能增加纳米粒与细胞的接触, 从而使细胞能摄取更多的姜黄素。

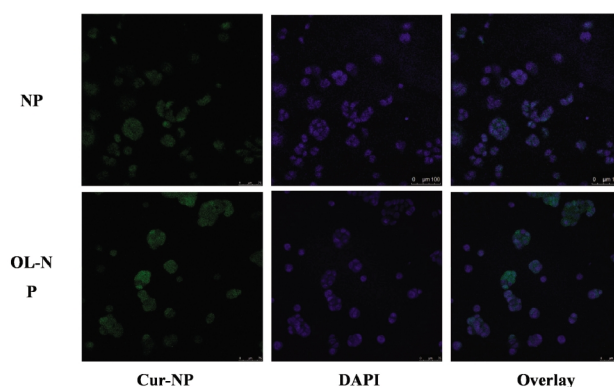


图 3 (A)Calu-3 细胞摄取 Cur-PBLG-PEG-NP 和

Cur-OL-PBLG-PEG-NP 的荧光照片。Calu-3 细胞与

10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cur-PBLG-PEG-NP 和 Cur-OL-PBLG-PEG-NP 孵育 24 小时

Fig. 3 (A)The fluorescent image of cellular uptake of Cur-PBLG-PEG-NP

and Cur-OL-PBLG-PEG-NP against Calu-3 cells. Calu-3 cells were

incubated with 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cur-PBLG-PEG-NP and

Cur-OL-PBLG-PEG-NP for 4 hours

表 2 Cur-PBLG-PEG-NP 和 Cur-OL-PBLG-PEG-NP 的细胞摄取百分率

Table 2 Cell uptake ratio of Cur-PBLG-PEG-NP and Cur-OL-PBLG-PEG-NP

	Cur-NP	Cur-OL-NP
Cell uptake ratio/%	62.7 $\pm$ 7.3	81.2 $\pm$ 6.7
Cell uptake increased ratio/%	29.5	

3 讨论

研究表明纳米粒的粒径、zeta 电位可能会影响细胞对纳米粒的摄取效果^[16,17]。本实验以 PBLG 为载体材料, 使用乳化溶媒蒸发法制成可生物降解纳米给药系统 PBLG-NPs 和 OL-PBLG-NPs。通过调整处方工艺使所得的纳米粒粒径在 90~110 nm 之间, zeta 电位在 -20 mV 左右, 分散均匀, 稳定性良好, 两者载药量和包封率无明显差异。本实验通过测量纳米粒与细胞孵育 24 h 对细胞活力的影响初步评价纳米粒的鼻粘

膜毒性,结果显示两种聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇纳米粒基本无细胞毒性。利用姜黄素的荧光特性将其包载与纳米粒中,用于示踪纳米粒^[18]。

Calu-3 细胞来源于人呼吸道上皮细胞,具有极性单层膜,在结构上形成紧密连接和微纤毛,膜上能表达 P-糖蛋白以及一定量的水解酶、转移酶和细胞色素,具有黏液分泌功能^[19,20],与鼻粘膜性质相似。本试验中姜黄素不仅作为模型药物模拟小分子脂溶性药物,同时作为示踪分子,以定性观察细胞对纳米粒的摄取。姜黄素的摄取实验表明聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇纳米粒可被 Calu-3 细胞摄取,同时细胞对蛙凝素修饰的纳米粒有更强的吸收,表明蛙凝素的修饰能有效促进细胞对纳米粒的摄取。在 PBLG-PEG-NP 上连接靶向基团使纳米粒特异性作用于呼吸上皮,有望使其成为呼吸道粘膜给药的优良载体。

致谢:本研究材料合成部分得到上海交通大学药学院刘黎老师以及袁伟恩老师的悉心指导与帮助,在此表示衷心感谢!

参考文献(References)

- [1] Youssef K.M, MA El-Sherbeny. Synthesis and antitumor activity of some curcumin analogs [J]. Archiv der Pharmazie, 2005, 338 (4): 181-189
- [2] TP Ng, PC Chiam, T Lee, et al. Curry consumption and cognitive function in the elderly [J]. American journal of epidemiology, 2006, 164(9): 898-906
- [3] Begum AN, Jones MR, Lim GP, et al. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, 326(1): 196-208
- [4] Mohanty C, S K Sahoo. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation[J]. Biomaterials, 2010, 31(25): 6597-6611
- [5] Patel HK, R M Suthar, S Patal. Nasal drug delivery system for targeting to brain[J]. Int J Pharm Innovat, 2011, 1: 1-11
- [6] Koo AN, Lee HJ, Kim SE, et al. Disulfide-cross-linked PEG-poly (amino acid)s copolymer micelles for glutathione-mediated intracellular drug delivery[J]. Chemical Communications, 2008, (48): 6570-6572
- [7] J Saien, H Delavari, AR Solymani. Sono-assisted photocatalytic degradation of styrene-acrylic acid copolymer in aqueous media with nano titania particles and kinetic studies [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 177(1): 1031-1038
- [8] Noemi C, Marcos G, Maria J. Nanoparticles for nasal vaccination[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61(2): 140-157
- [9] Allemann, ER Gurny, E Doelker. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1993, 39(5): 173-191
- [10] A Weissenböck, M Wirth, F Gabor. WGA-grafted PLGA-nanospheres: preparation and association with Caco-2 single cells [J]. Journal of controlled release, 2004, 99(3): 383-392
- [11] Wang C, Ho PC, Lim LY. Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells [J]. International journal of pharmaceutics, 2010, 400(1): 201-210
- [12] Gao X, Tao W, Lu W, et al. Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration [J]. Biomaterials, 2006, 27(18):3482-3490
- [13] Li J, Xu X, Xu C., et al. Anti-infection peptidomics of amphibian skin[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2007, 6(5):882-894
- [14] Li JX, Wu HB, Hong J, et al. Odorranalectin Is a Small Peptide Lectin with Potential for Drug Delivery and Targeting [J]. PLoS One, 2008, 3(6): 2381
- [15] Johan M, Gertjan K, Jacqueline C. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay[J]. Cancer Cell Culture, 2011, 731: 237-245
- [16] Carl D, Jonathan B, Hongbo G, et al. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake [J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134 (4): 2139-2147
- [17] Chunbai H, Yiping H, Lichen Y, et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles[J]. Biomaterials, 2010, 31(13): 3657-3666
- [18] Yehong S, Jie C, Qingfeng L, et al. Effect of wheat germ agglutinin density on cellular uptake and toxicity of wheat germ agglutinin conjugated PEG-PLA nanoparticles in Calu-3 cells [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 413(1): 184-193
- [19] Yan Z, Aaron C, Thomas H. Cultured Human Airway Epithelial Cells (Calu-3): A Model of Human Respiratory Function, Structure, and Inflammatory Responses[J]. Critical Care Research and Practice, 2010, (2010): 1-8
- [20] Bielska D, Karewicz A, Kamiński K, et al. Self-organized thermo-responsive hydroxypropyl cellulose nanoparticles for curcumin delivery[J]. European Polymer Journal, 2013, 49(9):2485-2494