

靶向人晶状体上皮细胞免疫毫微球的制备

刘晓燕¹, 常 津^{1*}, 郭艳霜¹, 原续波¹, 刘新玲², 李筱荣²

(1 天津大学材料学院纳米生物技术研究, 天津 300072;

2 天津医科大学眼科中心, 天津 300070)

摘要:采用偶联法使抗人晶状体上皮细胞单克隆抗体与聚乳酸载 5-氟尿嘧啶毫微球偶联, 制备出靶向人晶状体上皮细胞的免疫毫微球。采用扫描电镜和透射电镜观察微球形貌和结构, 用动态光散射粒径分析仪测载药毫微球粒径。ELISA 法检测偶联后的抗体活性, 间接免疫荧光法检测该免疫毫微球与晶状体上皮细胞的特异性结合能力。结果显示载药毫微球表面光滑, 平均粒径为 $191.0 \pm 0.202 \text{ nm}$, 其载药率为 8.2%。免疫载药毫微球中的单克隆抗体 H1E6 保留达到原免疫活性 84%。该免疫载药毫微球能与晶状体上皮细胞特异性结合。该实验为特异性抑制晶状体上皮细胞增殖, 预防白内障术后并发症-后囊混浊提供了重要的科学依据。

关键词:免疫毫微球; 聚乳酸毫微球; 抗人晶状体上皮细胞单克隆抗体; 晶状体上皮细胞; 5-氟尿嘧啶

前言

目前研究表明残留晶状体上皮细胞的增殖、移行和纤维化是引起白内障术后并发症-后囊混浊的主要原因。因此抑制术后残留晶状体上皮细胞的增殖是研究的关键。目前利用抗代谢类药物如 5-氟尿嘧啶等抑制晶状体上皮细胞增殖是预防白内障术后并发症-后囊混浊发生的主要研究手段之一。而低分子药物由于其新陈代谢快、半衰期短、体内浓度很快降低而影响疗效, 故需要大剂量给药, 而过高的药物浓度又会增强药物的副作用。单克隆抗体和毫微球是目前靶向治疗研究的热点^[1,2]。载化疗药物微球具有载药量大, 生物相容性好, 药物缓释性良好等优点^[3~5]。将细胞特异性抗体与载药微球偶联构建抗体导向微球即免疫微球不仅具备微球特性, 更重要的是能选择结合, 杀伤细胞, 从而达到提高疗效, 降低不良反应的目的^[6,7]。作者使用抗人晶状体上皮细胞单克隆抗体(H1E6)与载 5-氟尿嘧啶(5-Fu)的聚乳酸毫微球[PLA(5-Fu)-NP]偶联, 制备抗人晶状体上皮细胞免疫毫微球[H1E6-PLA(5-Fu)-NP], 检测该免疫毫微球的活性及对晶状体上皮细胞的特异性, 并观察该免疫毫微球细胞内化的过程。

1 结果与讨论

1.1 PLA(5-Fu)-NP 的表面分析、载药率、粒径测定和形态观察

载化疗药物微球具有载药量大, 生物相容性好, 药物缓释性良好等优点^[5], 在微球制剂的各种

基金项目:天津市自然科学基金(No.013616611, No.003702711); 国家重大基础研究(973)预研基金 2001CCC01400); 国家自然科学基金(503730333); 天津市科委重点科技攻关项目(023111711);

作者简介:刘晓燕, 24 岁, 女, 硕士研究生, 从事毫微球靶向载体系统研究。

* 联系人, 电话: 022-27401821, 电子邮箱: jinchang@tju.edu.cn

制备方法中,一般采用复乳法制备毫微球负载如 5-Fu 这类水溶性药物^[8],作者使用牛血清白蛋白做乳化剂使毫微球表面带有氨基,进而使毫微球可与单克隆抗体发生偶联反应制备成免疫毫微球。图 1 显示的是不载药的聚乳酸毫微球的 XPS 分析,由图可知毫微球表面含有氮元素而制备材料中只有牛血清白蛋白含有氮元素,因此说明毫微球表面含有牛血清白蛋白。作者通过复乳法制备的 PLA(5-Fu)-NP 其载药率为 8.2%,运用动态光散射粒径分析仪测得载药毫微球的粒径及其粒径分布。图 2 的粒径分布曲线反映了该方法制备的毫微球的平均粒径和分散指数分别为 191.0nm 和 0.202。通过扫描电镜和透射电镜可观察到载药毫微球大部分成规则的球形,表面光滑,大小均匀,毫微球之间无粘连(见图 3,4)。

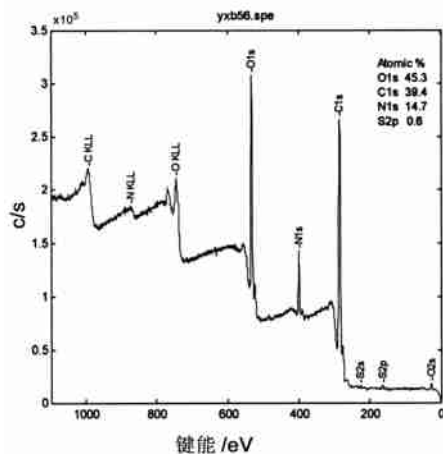


图 1 未载药毫微球的 XPS 分析

Figure 1 XPS of PLA-NPs

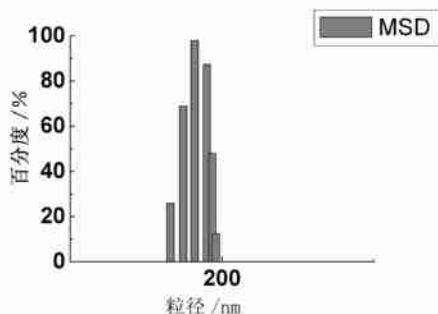


图 2 载药毫微球的粒径及其分布,有效粒径: 191.0nm;分散系数:0.202;样品质量:10.0

Figure 2 MSD(distribution of the microsphere size) of the particle size determined by Particle Size Analyzer · Effective Diameter:191.0nm; Polydispersity:0.202; Sample Quality:10.0

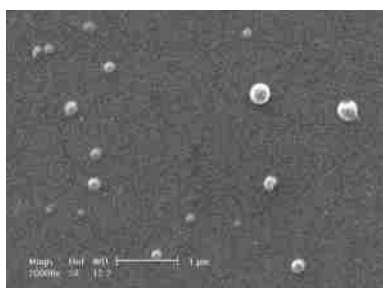


图 3 载药毫微球扫描电镜照片

Figure 3 SEM of the 5-Fu loaded nanoparticles

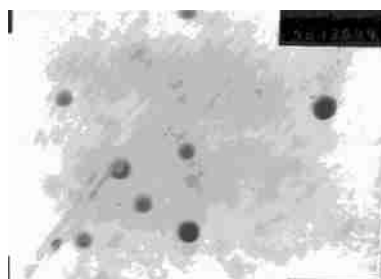


图 4 载药毫微球透射电镜照片(×48000)

Figure 4 TEM of the 5-Fu loaded nanoparticles(×48000)

1.2 ELISA 免疫活性测定

作者对载药毫微球进行表面修饰使毫微球表面包裹牛血清白蛋白,再利用碳二亚胺法偶联 HILE6 制备成 HILE6-PLA(5-Fu)-NP,增加了毫微球与抗体的结合,也提高了抗体携带的药物量,然而偶联后载药毫微球上抗体活性的保持对于实现载药毫微球的靶向来说是至关重要的。如图 4 所示 ELISA 法检测抗体的活性保存率,按公式计算偶联后抗体活性的保存率(抗体活性保存率= $OD_{HILE6-5Fu} / OD_{HILE6} \pm 100\%$),HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的抗体活性保存率可达到 84%,说明 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 基本保留原抗体的活性。

1.3 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的特异性表征

作者制备了人晶状体上皮细胞涂片、兔晶状体上皮细胞涂片、兔角膜成纤维细胞涂片、外周血红细胞涂片利用荧光显微镜观察 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的特异性,由图 5 所示,(a)和(b)分别是 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 与人、兔晶状体上皮细胞涂片反应的结果,呈绿色荧光为阳性结果,说明单抗毫微球与人晶状体上皮细胞和兔晶状体上皮细胞结合;(c)和(d)分别是 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 与兔角膜成纤维细胞涂片、外周血红细胞涂片反应的结果,细胞涂片未见绿色荧光为阴性结果,说明单抗毫微球未与这两种细胞结合。由此我们可以看到偶联在毫微球上的 HILE6 抗体仍保留了对晶状体上皮细胞的特异性识别能力,为抗代谢药物杀伤细胞提供主动靶向作用。

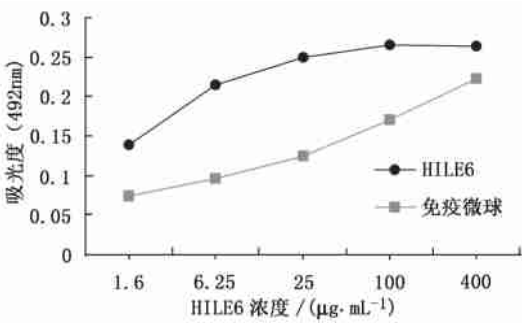


图 5 ELISA 法检测 HILE6 和 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的抗体活性

Figure 5 The immunological activity of antibody evaluated by ELISA method

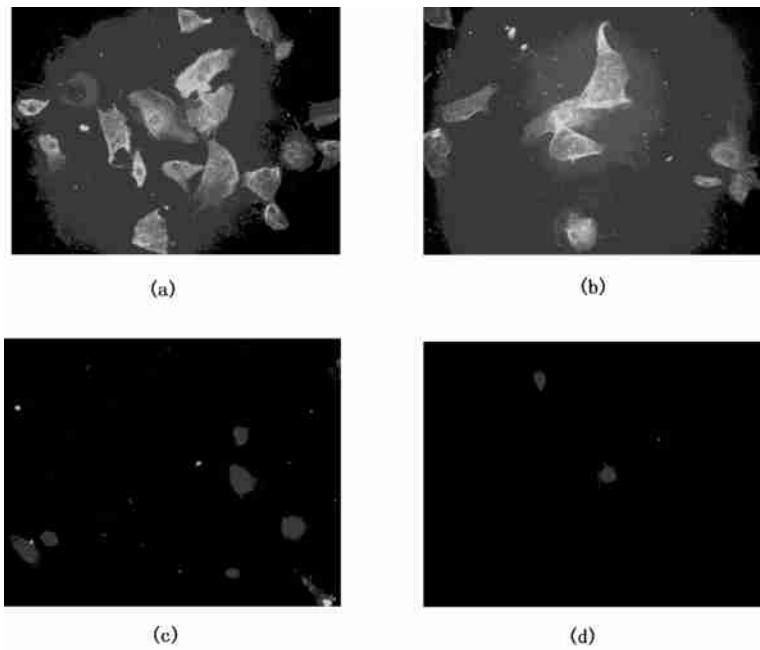


图 6 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的特异性识别晶状体上皮细胞

a. 人晶状体上皮细胞涂片;b. 兔晶状体上皮细胞涂片;c. 兔角膜成纤维细胞涂片;d. 外周血红细胞涂片

Figure 6 The selectivity of HILE6-PLA(5-Fu)-NP to LECs by the indirect immunofluorescence method

(a) Human LECs smears; (b) Rabbit LECs smears; (c) Peripheral blood red cells smears; (d) Rabbit cornea fibroblast cells smears

2 实验部分

2.1 实验原料

聚乳酸(PLA):山东医疗器械研究所生产;5-氟尿嘧啶:天津人民制药厂生产;牛血清白蛋白(BSA):天津血液研究所提供;水溶性碳二亚胺(EDC):Sigma 公司生产;HILE6:天津医科大学眼科中

心制备;HRP 标记兔抗鼠 IgG;华美生物工程公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS);自制。

2.2 复乳法制备 PLA(5-Fu)-NP

将 5% 的 5-Fu 水溶液 2.5mL 在超声条件下滴加到 5mL 5% 的聚乳酸二氯甲烷溶液中,形成乳白色 W/O 初乳。再将 50mL 牛血清白蛋白溶液在超声条件下加入 W/O 体系中,形成 W/O/W 复合体系。将 W/O/W 在电磁搅拌下(6000r/min)使其中的有机溶剂缓慢挥发 4h 以上,使溶剂挥发至完全,将所得乳液离心分离,超声分散后用蒸馏水洗涤三遍,冷冻干燥,所得白色粉状固体即为 5-氟尿嘧啶聚乳酸毫微球。

2.3 PLA(5-Fu)-NP 的表面分析、载药率、粒径测定和形态观察

测定毫微球的载药率:精密称取冷冻干燥的 5-FU 载药微球粉末 5 mg,加二氯甲烷 5mL 溶解,振荡摇匀后用 HCl(0.1M)溶液萃取(2.5mL×3),每次萃取后均用低速离心机离心,再取上部溶液。最后得到的 5-Fu/盐酸溶液用紫外分光光度计测在 265nm 处的吸光度,与浓度-吸光度标准曲线对照,可得到相应的 5-Fu 的浓度,实际载药率=(5-Fu 浓度×萃取液体积)/微球质量×100%,测定同时用未载药的毫微球做对比实验。用 XPS 对未载药的聚乳酸毫微球进行表面分析,用动态光散射粒径分布仪测定毫微球粒径,用扫描电子显微镜(SEM)观察毫微球的表面形态,用透射电子显微镜(TEM)观察毫微球的结构。

2.4 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的制备

称取 6mg 的微球与 1mg 单抗混合于 PBS 溶液(pH=6.8)中,在搅拌状态下加入 2mg 碳二亚胺,4℃下搅拌 10h,将所得溶液离心分离,超声分散后用蒸馏水洗涤三遍,冷冻干燥,所得白色粉状固体即为抗体/载药微球。

2.5 ELISA 免疫活性测定

将原代培养的兔晶状体上皮细胞按 2×10^4 /mL 接种于 96 孔灭菌酶标板中,100μL/孔 5%CO₂, 37℃培养 24h。经过固定、封闭后加入不同稀释度的 HILE6 和 HILE6-PLA(5-Fu)-NP,每孔加入 100μL,每组设 6 个平行孔,PBS 作阴性对照。分别加入酶标二抗,TMB 显色,终止后,测 OD₄₉₂,并计算免疫活性。

2.6 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的特异性研究

取白内障摘出术中环形撕囊的晶状体前囊膜,将晶状体上皮细胞涂于处理过的载玻片上,制成人晶状体上皮细胞涂片,同时制备兔晶状体上皮涂片、兔角膜成纤维细胞涂片、外周血红细胞涂片。将 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 与各细胞涂片反应,随后用缓冲液 PBS(pH=7.4)洗去未与细胞结合的 HILE6-PLA(5-Fu)-NP,再用异硫氰荧光素(FITC)标记兔抗鼠 Ig 抗体即第二抗体与结合在细胞上的 HILE6 抗体结合,随后用缓冲液 PBS(pH=7.4)洗去未反应的第二抗体,形成抗原-抗体-荧光抗体的复合物。利用荧光显微镜观察涂片,荧光素受激发光的照射而发出明亮的荧光,即可说明 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 与细胞结合,若无荧光,说明 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 未与细胞结合,可以证明 HILE6-PLA(5-Fu)-NP 的特异性。

参考文献:

[1] Rader C. Drug Discovery Today, 2001, 6(1): 36~43.

[2] 吴银侠,杨华元. 武汉科技大学学报(自然科学版), 2002, 25(2): 202~205.

[3] Rolland A, Bourel D, Genetet B. Inter J Pharm. 1987, 39(3): 173~181.

[4] 廖工铁. 靶向给药制剂, 成都: 四川科学技术出版社, 1997.

- [5] Kim I S, Kim S H. *Inter J Pharm*, 2002, 245, 67~73.
- [6] Hans M L, Lowman A M. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2002, 6, 319~327.
- [7] Tiefenauer L X, Tschirky A, Kühne G, Andres R Y. *Magnetic Resonance Imaging*, 1996, 14(4), 391~402.
- [8] Rouzes C, Leonard M, Durand A, Dellacherie E. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 32, 125~135.

Preparation of the Immunonanoparticles Targeting to Lens Epithelial Cells

LIU Xiao-yan¹, CHANG Jin^{1*}, GUO Yan-shuang¹, YUAN Xu-bo¹, LIU Chun-ling², LI Xiao-rong²

(¹ *Institute of Nanobiotechnology, School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;*

² *Center of Phothology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China*)

Abstract: The immunonanoparticle [HILE⁶-PLA(5-Fu)-NP] was prepared by “EDC” method cross-linking the monoclonal antibody HILE⁶ with PLA nanoparticles containing 5-Fu [PLA(5-Fu)-NP]. The particles were characterized for morphology and structure by scanning electronic microscopy (SEM) and transmission electronic microscopy (TEM). The particle size was determined by Particle Size Analyzer. 5-Fu drug content was also examined. ELISA method was used to evaluate the immunoreactivity. The indirect immunofluorescence method was used for evaluation of the selectivity of the INPs. We found NPs have smooth external morphology and the particle size was $191.0 \pm 0.202 \text{ nm}$, the drug loading was 8.2%. In the immunonanoparticles, the immunological activity of antibody can reach 84% of the original HILE⁶. HILE⁶-PLA(5-Fu)-NP could bind the lens epithelia specifically. The result is very beneficial for selectively and longtime killed Lens epithelia cells for preventing posterior capsular opacification.

Key words: Immunonanoparticle; PLA nanopartilce; HILE⁶; Lens epithelia cells; 5-Fluorouracil

(上接 41 页)

Biodegradable Polymers and its Applications in Drug-Delivery

LIU Feng-xing, CHENG Wei-zhuang

(*College of Materials Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China*)

Abstract: The present situation and the drug-delivery applications of biodegradable polymers are reviewed in this paper. Polylactide and poly(ϵ -caprolactone) are emphasized.

Key words: Biodegradable polymer; Drug-delivery; Polylactide; Poly(ϵ -caprolactone)