

载乳腺癌裂解蛋白纳米粒子的制备及其体外免疫效应的初步评估

马金¹, 段金虹¹, 章启军², 赵勇³, 王琛⁴, 杨先达^{1,4}

(1.北京协和医学院中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100730; 2.中国科学院理化技术研究所, 北京 100190; 3.中国科学院化学研究所, 北京 100190; 4.国家纳米科学中心, 北京 100190)

摘要: [目的] 使用聚乳酸聚乙醇酸共聚物(PLGA)制备纳米颗粒, 用来包载 MCF7 乳腺癌细胞的裂解蛋白, 并初步评估其在乳腺癌免疫治疗中的作用。[方法] 用二次乳化法制备载 MCF7 裂解蛋白的纳米粒子, 对其包封效率、粒径、形态和 Zeta 电位进行测定, 优化制备参数以提高包封效率; 用该纳米粒子刺激人外周血单个核细胞, 检测纳米粒子的体外抗肿瘤免疫效应。[结果] 制备的载 MCF7 裂解蛋白纳米颗粒呈球形, 尺寸较均匀, 平均粒径 75nm, 表面带负电荷, 对 MCF7 裂解蛋白的包裹率可达 85%, 并能显著提高人淋巴细胞对乳腺癌细胞的体外杀伤能力, 约是对照组的 3 倍 ($P < 0.05$)。[结论] 该制备方法所得载 MCF7 裂解蛋白纳米颗粒理化性质优良, 包裹率高, 在体外实验中可提高 MCF7 裂解蛋白的免疫原性, 在提升抗肿瘤免疫效应方面具有应用潜能。

关键词: 肿瘤裂解蛋白; 纳米颗粒; 乳腺癌; 免疫疗法

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2010)06-0400-05

Preparation of Breast Cancer Cell Lysates-loaded Nanoparticle and Preliminary Evaluation of Its Immunity in vitro

MA Jin¹, DUAN Jin-hong¹, ZHANG Qi-jun², et al.

(1. Institute of Basic Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China; 2. Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China)

Abstract: [Purpose] To prepare nanoparticle for encapsulating MCF7 breast cancer cell lysate protein (MCF7p) with poly (D, L-lactide co-glycolide) copolymer (PLGA), and to evaluate its role in immunotherapy for breast cancer. [Methods] The double emulsion method was employed for preparation of nanoparticles (NP) encapsulating the MCF7 breast cancer cell lysate protein. The morphology, size, zeta potential, and encapsulation efficiency of the NP were assayed and optimized. The NP was utilized to simulate the peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and the anti-tumor immune reaction of NP was detected in vitro. [Results] The obtained NPs were negatively charged, spherical in shape, relatively uniform in size, with a mean diameter of 75nm and a protein encapsulation rate of 85%. The NP-stimulated PMBC generated a significantly higher anti-cancer cytotoxicity in vitro, with 3 times compared to the control group ($P < 0.05$). [Conclusion] The NPs prepared are of good physicochemical properties and can encapsulate protein antigen with high efficiency. Moreover, the NPs significantly enhance the immunogenicity of the MCF7 tumor lysate protein, suggesting that nanotechnology may have potential applications in immunotherapy against cancer.

Key words: tumor lysate protein; nanoparticles; breast cancer; immunotherapy

抗肿瘤免疫疗法因为毒副作用较小, 能诱发出持久的针对肿

收稿日期: 2010-01-21; 修回日期: 2010-03-05
基金项目: 科技部重大科技项目(2006CB933204, 90306004, 90406024)及 China Medical Board 资助
通讯作者: 杨先达
E-mail: ayangmd@gmail.com

瘤细胞的免疫反应, 因而有助于清除术后体内残存的肿瘤细胞并改善预后^[1], 从而成为肿瘤治疗的重要辅助手段。然而, 由于肿瘤的免疫逃逸机制和肿瘤相关抗原的

匮乏等因素, 抗肿瘤免疫治疗的临床应用目前仍面临诸多障碍^[2], 其中缺乏有效肿瘤抗原的问题尤为突出。肿瘤裂解蛋白虽然较易获得, 且含有肿瘤抗原, 但由于其

抗原组分分散,单独使用往往不能诱发出满意的抗肿瘤免疫反应^[3]。近年来纳米技术的发展为抗肿瘤免疫治疗提供了新的技术路径。有文献显示,将抗原置于纳米载体内有可能显著增强其免疫原性^[4]。聚乳酸聚乙醇酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)是一种具有良好的生物相容性及降解性的材料,目前已被美国FDA认定为对人体安全的药用辅料,并被广泛用于药物缓控释系统和纳米粒的制备。本课题尝试以PLGA共聚物来制备纳米载体,用以包载MCF7乳腺癌细胞的肿瘤裂解蛋白,并在体外初步评估了其抗肿瘤免疫效应,以期在纳米技术在乳腺癌免疫治疗中的应用打下一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

蛋白酶抑制剂混合物(protease inhibitor cocktail,哺乳动物细胞和组织专用, Sigma公司);聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA 50:50,分子量16 000g/mol,济南岱罡生物科技有限公司);泊洛沙姆188(药用级,武汉康隆世纪科技有限公司);乙酸乙酯(分析纯,北京化工厂);Bradford蛋白测定试剂盒、BCA蛋白测定试剂盒(北京康润诚业生物科技有限公司);MTS(四唑盐化合物)法(又称内盐法)细胞增殖定量检测试剂盒(Promega公司);RPMI-1640细胞培养基(北京钮因应用技术有限公司);胎牛血清(FBS, HyClone公司);淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液研究所科

技公司);扫描电镜;动态光散射粒度分析仪;酶标仪。

1.2 实验方法

1.2.1 MCF7细胞裂解蛋白的提取
当MCF7细胞生长汇合达80%时,以0.25%胰蛋白酶(含0.01%EDTA)消化,加入RPMI-1640培养基终止胰酶的反应,离心,用D-hanks溶液洗涤一遍,收集细胞沉淀,轻弹使沉淀散开,加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂cocktail(细胞裂解液和蛋白酶抑制剂cocktail的体积比为100:1),将其置于4℃,冰浴2h。然后于4℃,12 000r/min离心15min,取上清,分装后测蛋白浓度,-80℃保存。

1.2.2 纳米颗粒及载蛋白的纳米颗粒的制备

纳米颗粒(nanoparticles, NP)的制备采用改良的双乳化(W1/O/W2)的方法^[5]。将一定量的MCF7细胞裂解蛋白溶液(含1.25%的泊洛沙姆188,即水芯),与含一定量PLGA的乙酸乙酯有机相混合,冰浴下超声乳化,即得初乳液体。然后加入5%的泊洛沙姆溶液到初乳中,混匀,冰浴下再次超声乳化,即得复乳液体。将复乳液置于通风橱内过夜,使有机溶剂完全挥发干净,收集所得悬液,超速离心30min,弃上清,沉淀用蒸馏水洗涤后重悬,即得包裹MCF7蛋白的NP。对照组NP的做法与上述过程类似,只是将初始的蛋白溶液换成去离子水。

在载蛋白纳米颗粒的制备过程中,我们发现初乳时水芯和有机相的体积比以及超声条件是影响包封效率的主要因素。因此,本实验设计了初乳时水芯与有机相

的体积比梯度1:2、1:4、1:8,并且对超声的条件进行了调整,以优化包封效率。

1.2.3 NP对蛋白包封效率测定方法的建立

将NP制备过程中离心所得的上清液收集起来测其蛋白浓度,通过以下公式计算包封率:包封率(%)=(投放的蛋白总量-上清中的蛋白量)/投放的蛋白总量×100%。或用1mol/L的NaOH溶液将离心所得NP沉淀溶解^[6],使蛋白释放出来,再测其蛋白浓度,通过以下公式计算包封率:包封率(%)=NP中的蛋白含量/投放的蛋白总量×100%。

通过多次实验验证了上述两种方法的可行性和准确性。并且通过两种方法所计算的包封率结果一致,故接下来实验中采取向上清液的方法来计算包封率。

1.2.4 包载MCF7裂解蛋白NPs的表征

取1ml纳米粒子悬液,25℃下采用动态光散射的方法测定纳米粒子的粒径大小、分布和Zeta电位。取1~2滴纳米粒子胶体分散体系,将其滴入扫描电镜的样品台上,待其自然干燥后,粒子溅射镀金膜,然后在扫描电镜下观察其表面形貌和形状。

1.2.5 MTS法细胞毒实验评估载MCF7裂解蛋白NPs的体外免疫效应

本实验在圆底96孔板中进行。将新鲜的人全血标本用淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞(PBMC),计数后平均分为4组,分别为:未经刺激的淋巴细胞(对照组);经未包裹蛋白的NP刺激的淋巴细胞(T cells+NP

组);游离 MCF7 裂解蛋白刺激的淋巴细胞 (T cells+MCF7 组);以及载 MCF7 裂解蛋白纳米粒子 (MCF-NP) 刺激的淋巴细胞 (T cells+MCF7-NP 组)。每组均刺激 72h,且每组所加入 MCF7 裂解蛋白的浓度相同,均为 0.1 μ g/ml。于 96 孔板中培养 MCF7 细胞,使每孔加入的细胞数相同,置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中培育 4h 或过夜。然后将各组的淋巴细胞按一定的 E:T(效应细胞:靶细胞数,即淋巴细胞:MCF7 细胞数)比加入到 MCF7 细胞的对应孔中,让淋巴细胞去杀伤肿瘤细胞,并按 MTS 试剂盒说明书设置生长对照组 (不加淋巴细胞)和背景组 (不加细胞,只有培养基)。待生长对照组的 MCF7 细胞长满时,将各孔的上清去掉,用 D-hanks 溶液洗涤 3 遍,洗净淋巴细胞,然后各孔分别加 100 μ l 的 RPMI-1640 和 20 μ l 的 MTS 液,置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中反应约 1h,待反应液由黄色变为棕色时,测 A490 的吸光度,按如下公式计算杀伤效率:肿瘤杀伤率 (%)=1-(A490 实验组-A490 背景)/(A490 对照组-A490 背景) \times 100%。

1.3 数据统计学分析

数据处理采用 SPSS 13.0 统计软件,组间均数比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 纳米粒制备过程中包封效率的优化

使用双乳化法 (W1/O/W2) 来制备微米颗粒的技术目前已经比

较成熟,但使用该技术来制备批次间稳定性较好和包载效率较高的纳米颗粒,一般还需要根据纳米载体所要包裹的具体物质做出制备参数上的调整。为此,我们首先研究了水芯与有机相的体积比对 MCF7 裂解蛋白包封率的影响,发现当水芯与有机相的体积比在 1:4 到 1:8 时,可获得较高的包裹效率(表 1)。随后我们又比较了不同的超声条件对包封率的影响:条件 1 为超声时间较长 (180s 以上),条件 2 为超声时间较短 (120s 以下);水芯与有机相的体积比均为 1:5。超声条件 1 下制备该纳米粒的包封率为 21.67%,而条件 2 下的包封率为 83.27%。这一结果说明适当延长超声时间(条件 2)有可能使裂解蛋白的包封率得到较大的提高。因此在接下来的实验中,我们选择的制备参数为水芯与有机相的体积比为 1:5 和第二种超声条件,以制备出裂解蛋白包裹率较高(约 80%)的纳米粒子。

2.2 载 MCF7 肿瘤裂解蛋白纳米粒子的表征

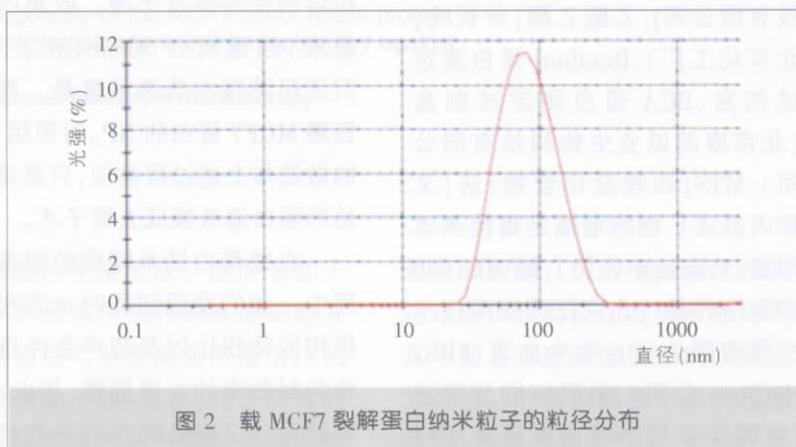
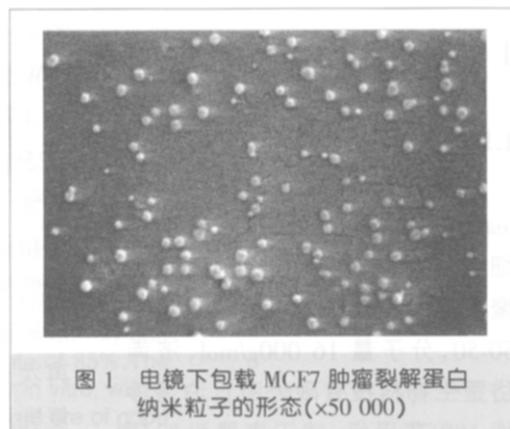
本实验所得 MCF7

肿瘤裂解蛋白纳米粒子的扫描电镜照片显示,该纳米粒子为规则球形,表面光滑,大小较均匀,并且纳米颗粒之间无粘连(图 1)。动态激光光散射法测定表明,该纳米粒子粒径分布呈较窄的单峰,多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.202<0.5,分散性良好,平均粒径约为 75nm (图 2),Zeta 电位为 -22.7mV (图 3),稳定性较好,易于与免疫系统相互作用。

表 1 水芯与有机相的体积比对包封率的影响

水芯与有机相的体积比	包封率 (%)
1:8	27.08
1:4	20.50
1:2	10.71

注:PLGA 的投入量=10mg;在超声条件 1 下制备。



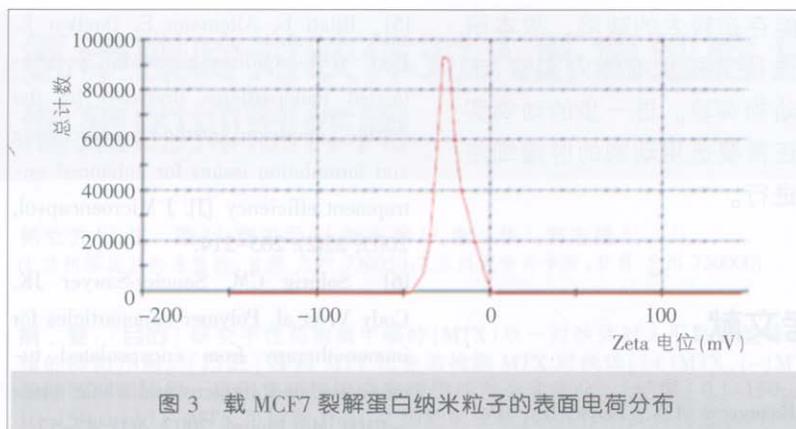


图3 载 MCF7 裂解蛋白纳米粒子的表面电荷分布

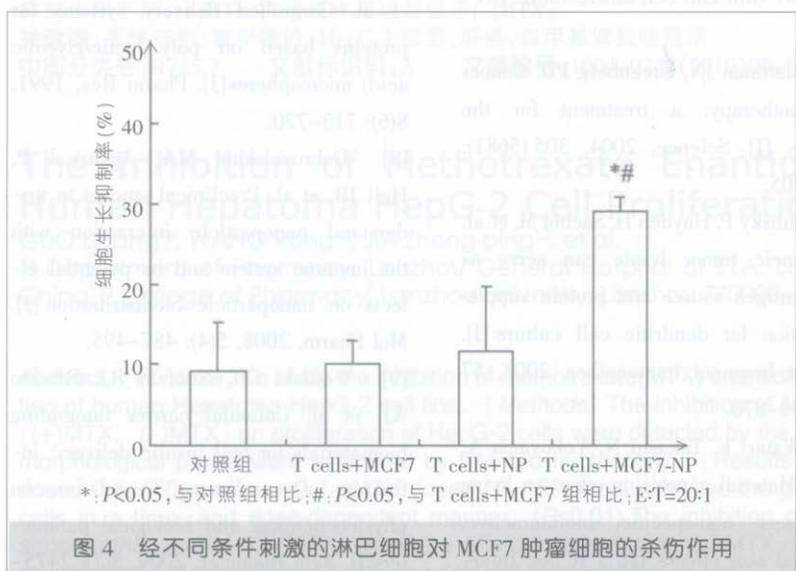


图4 经不同条件刺激的淋巴细胞对 MCF7 肿瘤细胞的杀伤作用

2.3 载 MCF7 裂解蛋白纳米粒子体外免疫效应的初步评估

为评价载 MCF7 裂解蛋白纳米粒子的生物学效应,我们用该纳米粒子于体外刺激人外周血淋巴细胞,以观察其能否影响淋巴细胞对 MCF7 乳腺癌细胞的杀伤能力。MTS 细胞毒实验表明,经载 MCF7 裂解蛋白刺激过的人外周血单个核细胞 (PBMC),其对 MCF7 乳腺癌细胞的杀伤效率约达 30%,而对照组 (未经任何刺激的 PBMC) 和经游离 MCF7 裂解蛋白刺激的 PBMC 对 MCF7 细胞的杀伤效率仅在 10% 左右,有

显著性差异 ($P < 0.05$),见图 4。

2.4 单纯 PLGA 纳米粒子对细胞的毒副作用评估

本实验设计了单纯 NP 组即 T cells+NP 组,进行与实验组一样的实验操作,用以刺激 PBMC,然后检测其对肿瘤细胞的杀伤效率。我们发现,单纯 NP 并不影响淋巴细胞的生长和增殖,也不能活化淋巴细胞使之杀伤肿瘤细胞的能力增强,如图 4 所示, T cells+NP 组,对肿瘤的杀伤效率为 $11.74\% \pm 7.98\%$,与对照组 (杀伤效率为 $9.36\% \pm 5.92\%$) 相比无显著差异,提示单纯 PLGA 纳米

粒对细胞无明显毒副作用。

3 讨论

抗肿瘤免疫治疗的临床应用目前仍面临重重障碍。大多数已有研究集中在寻找更加高效的肿瘤抗原上,而忽视了现有抗原的潜在应用价值。肿瘤裂解蛋白来源于肿瘤细胞全细胞裂解物,是一种易于获得且含有肿瘤相关抗原的免疫原。由于肿瘤裂解蛋白的抗原分散性等因素,单纯的肿瘤裂解蛋白往往不能有效地刺激免疫系统产生有效的抗肿瘤效应。因此,寻找并建立一种方法,以有效地提高肿瘤裂解蛋白的免疫原性,便成为一个重要的研究课题。

纳米技术为我们提供了一种提高肿瘤裂解蛋白免疫原性的全新技术路径。纳米载体对肿瘤具有靶向作用,可向肿瘤部位富集,且具有更好的穿透力和被机体细胞吸收的能力。本课题将纳米载体技术应用于肿瘤免疫治疗领域,将肿瘤裂解蛋白纳米载体化,为提高其免疫效应做初步的尝试。在此,我们采用 PLGA 这种已经被美国 FDA 批准可在人体内使用且具有良好的生物相容性及降解性的生物材料^[7],用改良后的双乳化法,制备了包载乳腺癌 MCF7 裂解蛋白的纳米粒子。纳米颗粒和免疫系统的相互作用近年来随着纳米技术的兴起而受到关注。有研究表明,纳米颗粒的粒径大小在 30nm~200nm 之间时,对于引发特异性的细胞免疫反应最有利^[4]。表面带有适量电荷的纳米粒子相较于中性的纳米粒子可

能更易于被免疫细胞吞噬并引发免疫反应^[8]。此外,纳米颗粒的表面电荷情况即 Zeta 电位也是衡量纳米粒子稳定性的重要标准。一般认为 Zeta 电位的绝对值大于 30mV 时,纳米粒子在悬液中的稳定性最好^[9]。但是 Zeta 电位太正或太负,也不利于纳米粒子与免疫系统的相互作用。

本实验所得纳米粒呈球形,表面光滑,大小均匀,粒径尺寸理想(平均粒径 75nm),分散性好,且表面带有适量的电荷,故易于被免疫细胞所吞噬。经多次实验验证,该方法制备的纳米颗粒的重复性和批次间稳定性俱佳,对蛋白的包裹效率较高,有利于以较高的效率向免疫细胞递呈肿瘤裂解蛋白。此外,在体外所进行的细胞毒免疫实验也显示,所制备的纳米载体化的肿瘤裂解蛋白能提升人淋巴细胞在体外对人乳腺癌肿瘤细胞的杀伤能力。由于本研究选择的实验对象为人的乳腺癌细胞系,只能在裸鼠中建立肿瘤动物模型,而裸鼠的 T 细胞免

疫功能存在较大的缺陷,故本研究只进行了初步的体内实验,未进行动物实验。进一步的动物实验,还需要选用动物的肿瘤细胞系来进行。

参考文献:

[1] Baxevanis CN, Perez SA, Pampichail M. Cancer immunotherapy [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2009, 46(4): 167-189.

[2] Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses [J]. Science, 2004, 305 (5681): 200-205.

[3] Dubsky P, Hayden H, Sachet M, et al. Allogeneic tumor lysate can serve as both antigen source and protein supplementation for dendritic cell culture [J]. Cancer Immunol Immunother, 2008, 57 (6): 859-870.

[4] Watari F, Takashi N, Yokoyama A, et al. Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects [J]. J R Soc Interface, 2009, 6(Suppl 3): S371-388.

[5] Bilati U, Allemann E, Doelker E. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method --processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency [J]. J Microencapsul, 2005, 22(2): 205-214.

[6] Solbrig CM, Saucier-Sawyer JK, Cody V, et al. Polymer nanoparticles for immunotherapy from encapsulated tumor-associated antigens and whole tumor cells[J]. Mol Pharm, 2007, 4(1): 47-57.

[7] Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, et al. Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres[J]. Pharm Res, 1991, 8(6): 713-720.

[8] Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution [J]. Mol Pharm, 2008, 5(4): 487-495.

[9] Woitiski CB, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, et al. Colloidal carrier integrating biomaterials for oral insulin delivery: influence of component formulation on physicochemical and biological parameters[J]. Acta Biomater, 2009, 5(7): 2475-2484.