

PLGA 人工抗原提呈细胞载体的制备

邱俊¹ 朱建明¹ 朱彤¹ 郭晓东² 杨美²

(1 南京军区鼓浪屿疗养院 福建 厦门 361002 2 解放军第 302 医院 北京 100039)

摘要 目的: 目前常用的载体材料, 在体内很难降解, 限制了其在体内的应用, 本文通过用 PLGA 微球制备人工抗原提呈细胞 (AAPC) 载体, 对其功能进行验证。希望此方法能弥补传统方法的不足。**方法:** 将软脂酸偶联到亲和素上, 然后按照传统的复乳法来制备 PLGA 微球, 并且通过使用荧光素 (FITC) 标记、生物素化的牛血清蛋白 (BSA) 对其功能进行验证。**结果:** 通过该方法可以得到表面固定生物素的 PLGA 微球, 并且证明软脂酸修饰并未影响到亲和素分子和生物素的结合, 生物素化的 BSA 分子可以有有效的结合到微球的表面。**结论:** PLGA 微球表面很难引进合适的化学基团, 导致其不能像聚苯乙烯微球那样通过化学反应来将亲和素分子固定在微球的表面上, 通过将软脂酸偶联到亲和素分子上, 可改变其表面很难引进合适的化学基团的不足, 用其微球可用于制备 AAPC 载体。人工抗原提呈细胞是免疫学研究领域的新思路, 可在基础免疫研究和临床治疗方面发挥较大的作用, 但作为一门新兴技术, 在制备、效果评价及应用方面需要逐渐完善和成熟, 用 PLGA 微球为载体构建, 弥补了磁珠、聚苯乙烯不能在体内降解的不足, 且安全无毒, 可供参考。

关键词: PLGA; 微球; 人工抗原提呈细胞载体

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2013)13-2460-03

Application of Carrier with PLGA Microspheres

QIU Jun¹, ZHU Jian-ming¹, ZHU Tong¹, GUO Xiao-dong², YANG Mei²

(1 Nanjing Military Region, Gulangyu island sanatorium, Xiamen, Fujian, 361002, China;

2 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

ABSTRACT Objective: It is difficult to degrade and limit the application commonly used in the body that carrier materials at present. In order to verify the function of artificial introduced antigen presenting cells (AAPC) carrier with PLGA microspheres preparation, this paper focused on its functions that verified by PLGA microspheres preparation artificial introduced antigen presenting cells (AAPC) carrier. **Methods:** To verify the functions by the means of fluorescein (FITC) mark, biotinylated bovine serum albumin (BSA), with palmitic acid coupled to the avidin, then according to the traditional methods for the preparation of complex milk PLGA microspheres. **Results:** With this method, we could get the PLGA microspheres of surfaced and fixed biotin and proved that modified palmitic acid did not have the effect on combination of avidin biotin molecules and biotin. Biotinylated BSA molecular can be effectively combined to the surface of the microspheres. **Conclusion:** It is difficult to introduce suitable chemical genes by PLGA microspheres surface, so it is unlike polystyrene microspheres that through the chemical reaction to avidin molecules immobilized on the surface of the microsphere. Through the will palmitic acid coupled to avidin molecular, the microspheres could change its insufficient that is hard to introduce suitable chemical genes. The microspheres can be used in the preparation of AAPC carrier. Artificial introduced antigen presenting cell is the new idea in the field of immunology research. It can play an important role in the basic research and clinical treatment of immune. But as a new method, it takes a long way to perform and apply in the preparation and evaluation. It could make up for the disadvantages that magnetic beads and polystyrene in the body. What's more, PLGA microspheres with construction as the carrier could be safe and non-toxic for further references.

Key words: PLGA; Microspheres; Artificial introduced antigen presenting cell carrier

Chinese Library Classification: R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2013)13-2460-03

前言

人工抗原提呈细胞 (Artificial Antigen Presenting Cell 简称 AAPC) 多采用人工载体或异种动物细胞, 化学交联或基因重组表达 MHC 抗原肽复合物及共刺激分子, 模拟 T 淋巴细胞活化信号在体外或体内活化 T 淋巴细胞^[1-3]并通过人为控制 AAPC

上的 MHC 抗原肽复合物及共刺激分子的种类和数量, 来实现对 T 淋巴细胞活化的调控, 可用于对肿瘤或病毒感染性疾病的过继性细胞治疗、抗原提呈和 T 淋巴细胞活化信号的研究等。传统的人工载体为表面固定了亲和素的微球、磁珠、脂质体等。生物素修饰的 MHC: 抗原肽复合物可以通过亲和素-生物素高度亲和的特点而轻易的固定到载体的表面从而制备出人工抗原提呈细胞。但是目前常用的载体材料是聚苯乙烯, 在体内很难降解, 限制了其在体内的应用。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 由两种单体-乳酸和羟基乙

作者简介: 邱俊 (1973-), 主管药师, 研究方向: 药剂学, E-mail: gxd302@163.com

(收稿日期: 2013-01-11 接受日期: 2013-02-08)

酸随机聚合而成,是一种可降解的功能高分子有机化合物,具有良好的生物相容性、无毒、良好的成囊和成膜的性能,被广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域。在美国 PLGA 通过 FDA 认证,被正式作为药用辅料收录进美国药典^[4-9],Stassen 曾经报道过通过将亲和素偶联上软脂酸而将其固定在 PLGA 微球上的方法^[9-13],本研究中,我们采取类似的方法(图 1),通过将软脂酸偶联到亲和素上,然后按照传统的复乳法来制备 PLGA 微球,并且通过使用荧光素(FITC)标记、生物素化的牛血清蛋白(BSA)对其功能进行验证。

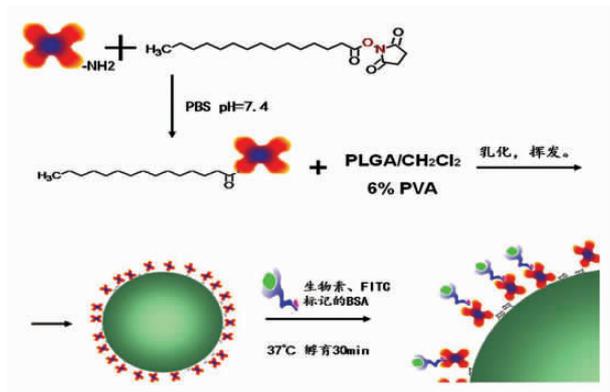


图 1 试验设计流程

Fig.1 Process of the experiment design

1 材料与方法

1.1 主要材料

PLGA 分子量 3000(山东岱罡生物科技);生物素琥珀酰亚胺酯、亲和素、异硫氰酸荧光素酯(上海生工);二氯甲烷(国药);聚乙烯醇 PVA(上海试剂);扫描电子显微镜(北京普瑞赛司仪器有限公司)、FM-30E 型荧光显微镜(合肥密维光学仪器有限公司)。

1.2 软脂酸 NHS 酯的制备

取 1025.6 mg (4 mmol)软脂酸,溶解于 10 mL 的二氯甲烷,加入 1650.6 mg (8 mmol)的二环己基碳二亚胺、460.36 mg (4 mmol)N-羟基琥珀酰亚胺。室温下反应 12 小时,使用玻璃漏斗过滤除掉二环己基脲(DUC),将获得的有机溶剂旋干,得到软脂酸 NHS 酯^[4]。



1.3 软脂酸修饰的亲和素的制备

将亲和素溶解在 0.2 M 的 PBS 中,得到 10 mg/ml 的亲和素水溶液,加入过量一倍的软脂酸 NHS 酯,37°C 条件下反应 12 小时,反应结束后,使用透析袋除掉小分子,得到软脂酸修饰的亲和素^[4]。

1.4 亲和素修饰、FITC 标记的牛血清蛋白的制备

将 100 mg 牛血清蛋白溶解在 10 mL、0.2 M pH 7.4 PBS 后,加入 10 mg 生物素琥珀酰亚胺酯,室温反应 2 小时,于 PBS 中透析,去除反应中的小分子副产物,收集透析袋中的生物素修饰的蛋白溶液,加入 0.2 mL、10 mg/ml 异硫氰酸荧光素的二甲基溶液,4°C 条件下,避光反应 12 小时,透析去掉未连接上

的荧光素,得到生物素和 FITC 修饰的牛血清蛋白^[9]。

1.5 PLGA 微球的制备

1.5.1 空白微球的制备 将 PLGA 溶解在二氯甲烷中,得到 5 mg/mL 的聚合物溶液,取该溶液 2 mL,加入到 40 mL、0.6%的 PVA 水溶液中,使用细胞破碎仪,超声粉碎,得到白色乳液,室温下搅拌过夜,挥发去二氯甲烷。离心,分离纯水清洗 3 次,冻干后,SEM 观察。

1.5.2 亲和素修饰微球的制备 取 0.25 mL 的 10 mg/ml 的软脂酸修饰的 BSA,加入到 2.5 mL、5 mg/ml 的 PLGA 二氯甲烷溶液中,超声混匀后,加入到 50 mL、6%的 PVA 水溶液中,搅拌过夜,挥发掉有机溶剂,离心分离,纯水清洗 3 次,冻干后,得到亲和素修饰的微球^[9]。

1.6 亲和素微球和生物素修饰的牛血清蛋白的结合^[7]

取少量空白微球和亲和素修饰的微球分散在水中,分别加入少量 FITC 标记、生物素修饰的牛血清蛋白。于 37°C 条件下,孵育 30 min,经过离心分离,去掉未结合的牛血清蛋白。采用荧光显微镜观察微球表面结合的荧光标记的牛血清蛋白。

2 结果

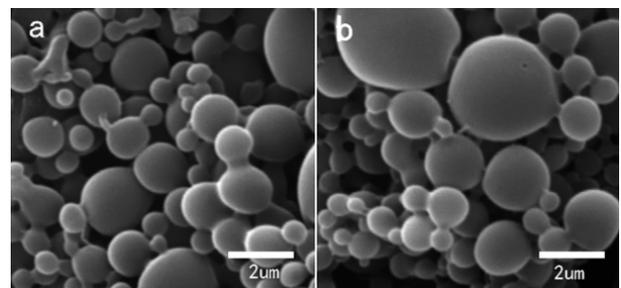


图 2 空白微球(a)和表面亲和素修饰的微球(b)的扫描照片

Fig.2 Pictures of the empty microspheres (a) and surface avidin modified microspheres (b)

2.1 SEM 图片显示,空白微球(a)和表面亲和素修饰的微球(b)在粒径方面没有明显变化,表面亲和素修饰的微球粒径相对来说并不均匀,SEM 显示制备的粒子直径在 0.5 到 4 微米之间。

2.2 在荧光显微镜下,和生物素修饰、FITC 标记的 BSA 孵育后,空白微球表面不带荧光,而亲和素修饰的微球表面带有强烈的荧光,说明在微球表面修饰上亲和素是成功的,并且生物素修饰的蛋白分子可以轻易的结合到微球的表面。

3 讨论

微球的大小与 AAPC 的刺激功能有密切联系。因此,我们应用了细胞大小的微球,有助于更有效地诱导特异性 CTL。

PLGA 的降解产物是乳酸和羟基乙酸,同时也是人代谢途径的副产物,所以当它应用在医药和生物材料中时不会有毒副作用^[13-21]。和传统的聚苯乙烯微球相比,PLGA 微球表面很难引进合适的化学基团,导致其不能像聚苯乙烯微球那样通过化学反应来将亲和素分子固定在微球的表面上,通过将软脂酸偶联到亲和素分子上,来提高亲和素的亲油性,使得其更加容易在油-水界面富集,再通过传统的乳化、挥发法来制备合适粒径的、表面亲和素修饰的 PLGA 微球。在进一步的研究中,我们采

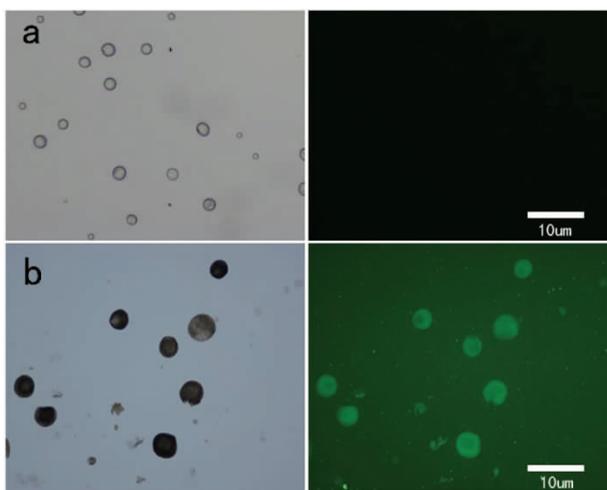


图3 a空白微球和生物素、FITC 标记的 BSA 孵育后的显微照片和荧光照片 ;b 生物素修饰的微球和生物素、FITC 标记的 BSA 孵育后的显微照片和荧光照片

Fig.3 a The micrograph and fluorescence photos of empty microspheres and biotin after incubating by the FITC mark of BSA; b The micrograph and fluorescence photos of biotin-modified microspheres and biotin after incubating by FITC mark of BSA

用 BSA 模拟 MHC 分子，通过将生物素修饰和 FITC 标记的 BSA 分子和微球共同孵育，考察了微球表面的亲和素分子和生物素修饰蛋白的结合。

人工抗原提呈细胞是免疫学研究领域的新思路，可在基础免疫研究和临床治疗方面发挥较大的作用，但作为一门新兴技术，在制备、效果评价及应用方面需要逐渐完善和成熟，用 PLGA 微球为载体构建，弥补了磁珠、聚苯乙烯不能在体内降解的不足，且安全无毒，可供参考。

参考文献(References)

- [1] Gajendiran M, Gopi V, Elangovan V, et al. Isoniazid loaded core shell nanoparticles derived from PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymers: In vitro and in vivo drug release [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012,104C:107-115
- [2] Niu C, Wang Z, Lu G, et al. Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes [J]. *Biomaterials*, 2013,34(9):2307-2317
- [3] Ma FK, Li J, Kong M, et al. Preparation and hydrolytic erosion of differently structured PLGA nanoparticles with chitosan modification [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012,54C:174-179
- [4] Tao HQ, Meng Q, Li MH, et al. HP- β -CD-PLGA nanoparticles improve the penetration and bioavailability of puerarin and enhance the therapeutic effects on brain ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2013,386(1):61-70
- [5] Horst M, Madduri S, Milleret V, et al. A bilayered hybrid microfibrillar PLGA-cellular matrix scaffold for hollow organ tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2013,34(5):1537-1545
- [6] Penk A, Fister Y, Scheidt HA, et al. The pore size of PLGA bone implants determines the de novo formation of bone tissue in tibial head defects in rats [J]. *Magn Reson Med*, 2012,doi: 10.1002/mrm.24541
- [7] Saez V, Ramón JA, Caballero L, et al. Extraction of PLGA-Microencapsulated Proteins Using a Two-Immiscible Liquid Phases System Containing Surfactants [J]. *Pharm Res*, 2013,30(2):606-615
- [8] Li AD, Sun ZZ, Zhou M, et al. Electrospun Chitosan-graft-PLGA nanofibres with significantly enhanced hydrophilicity and improved mechanical property [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013,102:674-681
- [9] Desai KG, Schwendeman SP. Active self-healing encapsulation of vaccine antigens in PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2013,165(1):62-74
- [10] Ford Versypt AN, Pack DW, Braatz RD. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres--a review [J]. *J Control Release*, 2013,165(1):29-37
- [11] East JE, Sun W, Webb TJ. Artificial Antigen Presenting Cell (aAPC) Mediated Activation and Expansion of Natural Killer T Cells [J]. *J Vis Exp*, 2012,(70).doi:p11: 4333
- [12] George PJ, Anuradha R, Kumar NP, et al. Evidence of microbial translocation associated with perturbations in T cell and antigen-presenting cell homeostasis in hookworm infections [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012,6(10):e1830. doi: 10.1371/journal.pntd.0001830
- [13] Sun W, Subrahmanyam PB, East JE, et al. Connecting the dots: artificial antigen presenting cell-mediated modulation of natural killer T cells [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2012,32(11):505-516
- [14] Feyler S, Scott GB, Parrish C, et al. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contact-dependent and antigen-presenting cell-independent [J]. *PLoS One*, 2012,7(5):e35981. doi: 10.1371/journal.pone.0035981
- [15] Martí n-Banderas L, Alvarez-Fuentes J, Durá n-Lobato M, et al. Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012,7:5793-5806
- [16] Zakeri-Milani P, Loveymi BD, Jelvehgari M, et al. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012,103C:174-181
- [17] Richter K, Brocker T, Oxenius A. Antigen amount dictates CD8+ T-cell exhaustion during chronic viral infection irrespective of the type of antigen presenting cell [J]. *Eur J Immunol*, 2012,42(9):2290-2304
- [18] Kwan WH, Hashimoto D, Paz-Artal E, et al. Antigen-presenting cell-derived complement modulates graft-versus-host disease [J]. *J Clin Invest*, 2012,122(6):2234-2238
- [19] Yi H, Zuo D, Yu X, et al. Suppression of antigen-specific CD4+ T cell activation by SRA/CD204 through reducing the immunostimulatory capability of antigen-presenting cell [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012,90(4):413-426
- [20] Konermann A, Deschner J, Allam JP, et al. Antigen-presenting cell marker expression and phagocytotic activity in periodontal ligament cells [J]. *J Oral Pathol Med*, 2012,41(4):340-347
- [21] Steenblock ER, Fadel T, Labowsky M, et al. An artificial antigen-presenting cell with paracrine delivery of IL-2 impacts the magnitude and direction of the T cell response [J]. *J Biol Chem*, 2011,286(40):34883-34892