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<sup>1</sup> 吴红兵<sup>1</sup> 苏 靖<sup>1</sup> 杨国汉<sup>2</sup> 邹海森<sup>1</sup> 张君睿<sup>1</sup> 邱明丰<sup>1</sup> (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 mg·mL<sup>-1</sup>)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-na', WU Hong-bing', SU Jing', YANG Guo-han<sup>2</sup>, ZOU Hai-miao', ZHANG Jun-rui', QIU Ming-feng<sup>1/2</sup>

(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 ( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) block-ploy (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 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. 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<sup>[1]</sup>,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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。纳米粒的包载能提高姜黄素的稳定性<sup>[4]</sup>,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<sup>[5]</sup>。因此,纳米粒经鼻给药可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<sup>10</sup>,其通过 体内酶的作用参与新陈代谢,营养物质被人体吸收<sup>17</sup>,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<sup>189</sup>。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<sup>10-12]</sup>。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<sup>113</sup>。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<sup>114</sup>,而 L- 岩藻糖糖基在嗅黏膜

 <sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学青年基金项目(81001407)
△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。

# 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 腺癌细胞 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,可制备蛙凝素修饰载姜黄素 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<sup>[15]</sup>,将 Calu-3 细胞以细胞数 1×10<sup>5</sup> 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 mg·mL<sup>-1</sup>)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 mg·mL<sup>-1</sup>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 ℃ 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。

细胞存活率(%)=A<sub>实验组</sub>/A<sub>对照组</sub>×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<sup>6</sup> 个 /cm<sup>2</sup> 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 μg·mL<sup>-1</sup> 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 呈球形或椭球形,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℃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, x± s)

	Type of nanoparticles	Size/nm	PDI	Zeta potential/mV	Loading capacity/%	Encapsulation efficiency/%
	PBLG-PEG-NPs	102.2± 2	0.132	-22.4± 2		
	Cur-PBLG-PEG-NPs	101.3± 3	0.152	-24.2± 3	1.54%	64.20%
	OL-PBLG-PEG-NPs	96.99± 3	0.194	-23.9± 4		
С	Cur-OL-PBLG-PEG-NPs	92.73± 2	0.185	-22.1± 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 mg·mL<sup>-1</sup>)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 mg·mL<sup>-1</sup>)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、2mg·mL<sup>-1</sup> 的 PBLG-PEG-NPs 和 OL-PBLG-PEG-NPs 对 Calu-3 细胞的细胞毒性实验 (n=5,x ± s) Fig. 2 In vitro cytotoxicity of PBLG-PEG-NPs and OL-PBLG-PEG-NPs at concentrations range from 0.125 to 2 mg·mL<sup>-1</sup> onCalu-3 cells (n=5, x± 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 10µg•mL<sup>-1</sup>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 µg•mL<sup>-1</sup> 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± 7.3	81.2± 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<sup>IIG,I7]</sup>。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制得的纳米粒粒径在 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<sup>[18]</sup>。

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<sup>[1930]</sup>, 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)

- 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 neuroin flammation and Alzheimer's disease [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, 326(1): 196-208
- [4] Mohanty C, S K Sahoo. Thein vitrostability and vivopharmac okinetics 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 thermoresponsive hydroxypropyl cellulose nanoparticles for curcumin delivery[J]. European Polymer Journal, 2013, 49(9):2485-2494