

[文章编号] 1007-3949(2019)27-04-0315-08

· 实验研究 ·

壳聚糖和透明质酸纳米聚电解质复合物吸附动脉粥样硬化特异抗体 CD47 的合成及体内外靶向实验

余俊¹, 余兰¹, 贺骏¹, 聂秀¹, 阮秋蓉²

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北省武汉市 430022; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北省武汉市 430022)

[关键词] 壳聚糖; 透明质酸; 聚电解质复合物; CD47 抗体; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究壳聚糖和透明质酸聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒在生理盐水中的稳定浓度和物理化学参数对靶向抗体 CD47 有效吸附的影响以及合成的纳米载体对于血管内皮细胞的体外靶向性。方法 壳聚糖(CS)作为聚阳离子与透明质酸(HA)(作为聚阴离子)发生电荷中和,合成壳聚糖和透明质酸聚电解质复合物纳米粒子。一模型抗体——动脉粥样硬化靶向抗体 CD47 在水或 PBS 溶液中,与纳米颗粒作用 4 h 后,定量吸附在 CS-HA 纳米颗粒表面。将合成的纳米载体体内外与血管内皮细胞及动脉粥样斑块相互作用,研究其靶向吸附作用。结果 结合过程和胶体的物理化学性质受到外部因素的影响,如电荷混合比和聚合物浓度等参数。通过上述原理合成了非化学计量的 CS-HA 纳米胶体,在水或 PBS(pH 7.4)溶液中保持稳定 1 个多月。扫描电镜检测其形貌特征。CS-HA/CD47 抗体纳米颗粒平均粒径在 375~620 nm 之间,Zeta 电位为正。CD47 抗体靶向的纳米载体可在体外有效吸附到血管内皮细胞及动脉粥样斑块的表面。结论 成功合成了 CS-HA/CD47 抗体纳米颗粒,该靶向纳米载体在体外可有效吸附到血管内皮细胞株及动脉粥样斑块的表面,是对动脉粥样硬化靶向给药具有应用前景的有效纳米载体。

[中图分类号] R331

[文献标识码] A

Synthesis and characterization of atherosclerotic target antibody CD47 functionalized by nano-polyelectrolyte complexes between chitosan and hyaluronic acid

YU Jun¹, YU Lan¹, HE Jun¹, NIE Xiu¹, RUAN Qiurong²

(1. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China; 2. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China)

[KEY WORDS] chitosan; hyaluronic acid; polyelectrolyte complexes; antibody CD47; atherosclerosis

[ABSTRACT] Aim To study the effect of stable concentration and physicochemical parameters of chitosan (CS) and hyaluronic acid (HA) polyelectrolyte complex (PEC) nanoparticles in physiological saline on the adsorption of targeting antibody CD47 and the target of synthesized nanocarriers in vitro and in vivo. Methods Chitosan was used as a polycation and hyaluronic acid as a polyanion to charge neutralize, and chitosan and hyaluronic acid polyelectrolyte complex nanoparticles were synthesized. A model antibody, atherosclerosis targeting antibody CD47, was adsorbed on the surface of CS-HA nanoparticles after 4 h of action with nanoparticles in water or PBS. The synthesized nanocarriers interact with vascular endothelial cells and atherosclerotic plaques in vitro and in vivo to study their targeting effects. Results The complexation process and the physicochemical properties of the colloid were affected by external factors such as charge mixing ratio and polymer concentration. Non-stoichiometric CS-HA nanocolloids were synthesized by the above principles and remained stable in water or PBS (pH 7.4) solution for more than one month. Scanning electron microscopy was used to detect the morphology. The average particle size of CS-HA/CD47 antibody nanoparticles was between 375 and 620 nm,

[收稿日期] 2018-03-12

[修回日期] 2018-10-15

[基金项目] 国家自然科学青年基金(81200104); 华中科技大学同济医学院附属协和医院创新基金(02.03.2017-314)

[作者简介] 余俊, 博士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化与细胞学, E-mail 为 89679676@qq.com。通信作者阮秋蓉, 教授, 博士研究生导师, 研究方向动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 ruanqiurong@sina.com。

and the zeta potential was positive. The nanocarriers targeted by the CD47 antibody can be efficiently adsorbed to the surface of vascular endothelial cell lines and atherosclerotic plaques. **Conclusions** CS-HA/CD47 antibody nanoparticles were successfully synthesized in this experiment. The targeted nanocarriers can effectively adsorb to the surface of vascular endothelial cells and atherosclerotic plaques in vitro and in vivo. It is an effective nanocarrier with application prospects for targeted administration of atherosclerosis.

在一项最新的研究中,来自美国斯坦福大学医学院的研究人员发现让肿瘤细胞表面保护它们自己免受免疫系统吞噬的一种信号也在动脉粥样硬化产生过程中发挥着作用。研究发现 CD47 在动脉粥样硬化组织中极其大量地存在,在几种不同的动脉粥样硬化模型小鼠中,利用抗 CD47 抗体阻断 CD47 显著减少动脉斑块堆积^[1]。如何利用 CD47 抗体实现药物的有效传递是未来研究中需要解决的关键问题。

在过去的几年中,通过带相反电荷的聚离子静电相互作用制备聚电解质复合物 (polyelectrolyte complex, PEC),尤其是作为药物载体或基因传递系统^[2-3],受到研究者的广泛关注。PEC 纳米颗粒的制备相对简单,其合成对工艺技术要求及设备要求不高,在不使用有毒有机溶剂和化学交联剂的情况下,可以在温和的条件下进行,便于推广。

影响聚电解质复合物纳米粒子形成和物理性质的因素很多,如 pH 值、温度、电离度、离子强度和相互作用时间。聚电解质复合物稳定性则取决于相对分子质量和电荷混合比^[4]。壳聚糖(chitosan, CS)是甲壳素部分脱乙酰基得到的多糖。壳聚糖有一些特别适合医学应用的特性如:生物相容性^[5],可生物降解,无毒性^[6],相当廉价^[7]。伯胺基(-NH₂)的氨基葡萄糖残基在弱酸性的环境可以质子化;因此,壳聚糖可与各种阴离子形成聚电解质复合物,如硫酸葡聚糖^[8]、硫酸软骨素^[9]、海藻酸钠-羧甲基纤维素^[10-12]、角叉菜胶、聚半乳糖醛酸^[13-14]和 DNA。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种低电荷密度的多元弱酸,具有高润滑力、吸水性和保水性,可影响多种细胞的迁移、黏附和增殖等功能^[15]。透明质酸的生物医学应用包括眼科手术、关节炎治疗、伤口愈合支架、组织工程以及作为植入材料中的一种成分^[16-18]。透明质酸可与其它聚合物如聚赖氨酸^[19-20]和丝素蛋白形成聚电解质复合物在生物医学中应用。最近,研究表明壳聚糖-透明质酸聚电解质复合物(chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex, CS-HA-PEC)纳米粒子可作为载体进行基因传递^[21-23],载体效率高达 60%^[24]。

基于以上研究背景,本研究旨在结合壳聚糖和

透明质酸的优点,研发用于抗体 CD47 吸附固定的聚电解质复合物纳米颗粒,研究胶体聚电解质复合物纳米颗粒是否对抗体 CD47 具有稳定的主动吸附性。并在体内外细胞学实验中,验证合成的 CD47 抗体靶向纳米载体对于血管内皮细胞及动脉粥样斑块靶向吸附性。

1 材料和方法

1.1 材料

济南海得贝海洋生物工程有限公司提供乙酰化率(DA)不同的壳聚糖,乙酰化率分别为 5% 和 48%;摩尔质量为 $(100 \sim 600) \times 10^3$ g/mol。样品纯化如下:在乙酸水溶液中溶解,通过孔隙率降低的 Millipore 膜过滤,用氨沉淀,用去离子水漂洗至中性并冷冻干燥。纯化的高摩尔质量壳聚糖在均匀介质中用乙酸酐乙酰化。壳聚糖在 0.2 mol/L 乙酸/0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液中以 0.5% (W/V) 溶解。向壳聚糖溶液中加入 0.15 mol/L 亚硝酸钠溶液以获得亚硝酸盐/葡糖胺,单位摩尔比为 0.5。根据目标摩尔质量,反应在适度的磁力搅拌下进行各种反应时间(15 ~ 60 min)。用氨沉淀回收壳聚糖,用去离子水洗涤几次直到中性,最后冷冻干燥。

镇江东元生物科技有限公司提供不同摩尔质量的透明质酸 $[(50 \sim 1500) \times 10^3$ g/mol]。抗 CD47 (CD47) 抗体由 Santa Cruz 提供。根据 Pierce (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA) 提供的程序,通过 BCA 测定确认它们的浓度。

1.2 聚电解质溶液的制备

将壳聚糖以 0.1% 质量浓度分散在水或 PBS 介质中。然后,用 0.1 mol/L 氢氧化钠或盐酸将溶液调至 pH=4.0。在使用之前,将所有的壳聚糖溶液在 0.22 μm 孔径的 Millipore 膜上过滤。在磁力搅拌下,在水或 PBS 介质中直接制备 0.1% 浓度的透明质酸溶液。

1.3 聚电解质复合物的形成

在非化学计量条件下($R=N^+/N^- \geq 1$,其中 R 是混合摩尔电荷比),一次加入过量聚合物。通过在室温磁力搅拌下形成胶体聚电解质复合物(750 r/

min)。最终颗粒分散体积为 30 mL, 固体含量为 0.1%。聚电解质混合物在 20 °C 下 7 000 r/min 离心 10 min, 沉淀从溶液中析出来。除去上清液, 将沉淀重新悬浮于去离子水或 PBS 中。

1.4 粒子固体含量测定

固体含量由在 60 °C 下干燥 24 h 后颗粒的质量与溶液的初始质量之间的比率来定义。

1.5 复杂分散体的物理化学表征

利用 Malvern Nanosizer SZ(华中科技大学分析测试中心)进行聚电解质复合物分散体的动态光散射测量, 参数为 $\lambda = 633$ nm(在 173 散射角), 使用 10 mW He/Ne 激光束操作。所有数据测量至少在 25 °C 进行 3 次。多分散性值(PI)由软件提供的算法得出, 定义为 $\mu_2/(\Gamma)^2$, 其中 μ_2 是相关函数的第二累积量, (Γ) 是平均衰减率。每个测量值是 3 次实验共 6 次测量的平均值。Zeta 电位使用 Smoluchowski 方程的电泳迁移率测量。使用 Malvern Nanosizer SZ 在 25 °C 测定颗粒的电泳迁移率(μ E)。将洗涤的分散体悬浮在 10^{-3} mol/L 氯化钠溶液中并进行电泳迁移率相关实验。取 10 次测量的平均值, 相对误差为 5%。Hitachi S-4800 显微镜在 5 kV 下获得扫描电子显微镜(SEM)图像。将 0.01% (V/V) 纳米颗粒分散液滴沉积在样品架上, 在室温下风干 12 h, 并在氩保护气氛下涂覆钯阴极蒸发器(TechnicHummer II, Houston, TX, USA)。在华中科技大学分析测试技术中心进行扫描电子显微镜(SEM)检测。

1.6 CD47 抗体吸附到 CS-HA-PEC 纳米胶体上

将 CS-HA-PEC 纳米胶体(壳聚糖 200×10^3 g/mol 和乙酰化率 48%, 透明质酸 50×10^3 g/mol)和不同浓度抗体溶液(CD47 抗体)混合, 适度搅拌, 使得混合物的最终混合摩尔电荷比为 1.5。混合物在 14 000 g 下离心 10 min 后, 除去上清液; 将沉淀重新悬浮在相同体积缓冲液。CD47 抗体吸附率计算如下: $CD47 \text{ 抗体吸附率} = [(CD47 \text{ 抗体}_{\text{输入}} - CD47 \text{ 抗体}_{\text{残留}}) / CD47 \text{ 抗体}_{\text{输入}}] \times 100\%$ 。其中 $CD47 \text{ 抗体}_{\text{输入}}$ 是每个独立实验的原始对照样品溶液中滴定的 CD47 抗体浓度; $CD47 \text{ 抗体}_{\text{残留}}$ 是指去除上清液中滴定测量的 CD47 抗体浓度。

1.7 合成的 CD47 抗体-CS-HA-PEC 对于血管内皮细胞的体外靶向性实验

将 CD47 抗体纳米载体体外以 FITC 荧光二抗进行标记, 将血管内皮细胞株接种于 24 孔细胞培养板, 与 CD47 抗体纳米佐剂共培养 24 h 后, 用 PBS 进行冲洗, 细胞换液, 除去悬浮未被吸附的纳米载

体的悬液, 同时以 DAPI 复染细胞核; 荧光显微镜下观察绿色荧光吸附的数量和比例。

1.8 合成的 CD47 抗体-CS-HA-PEC 对于动脉粥样斑块的靶向性实验

ApoE 基因敲除小鼠由南京大学实验动物中心提供, 寄养于华中科技大学同济医学院实验动物中心 SPF 级动物房, 进行高脂高胆固醇饮食。小鼠随即分成两组, 8 周后进行动物活体荧光定位实验及后续实验。Cy5.5-CD47 抗体-CS-HA-PEC 对 ApoE 小鼠动脉粥样斑块的活体内靶向分布实验中, 各组小鼠于成像前 6 h 开始禁食, 以降低因胃肠道食物引起的背景干扰。一组尾静脉注射 PBS 溶解 CS-HA-PEC, 每只鼠 0.2 mL, CS-HA-PEC 含量为 10 g/L; 一组注射 0.2 mL PBS 溶解 Cy5.5 标记的 CD47 抗体-CS-HA-PEC, CS-HA-PEC 含量为 10 g/L, 其中 Cy5.5-CD47 抗体的含量为每只小鼠 25 μ g; 对照组实验小鼠从尾静脉注射游离 Cy5.5 染料溶液(1 g/L)0.1 mL。注射后, 于 24 h 后, 用 10% 水合氯醛溶液按 0.35 mL/100 mg 体质量腹腔注射麻醉小鼠, 麻醉后应给小鼠脱毛, 减少毛发产生的背景荧光干扰, 用胶带固定在治疗床上, 采取仰卧体位。小动物活体成像系统(IVIS 200, Ex/Em (nm): 749/776)分别对小鼠全身及胸部荧光扫描。记录动物在体内发射荧光的成像图片, 分析荧光复合物 Cy5.5-CD47 抗体-CS-HA-PEC 的分布情况, 比较不同组小鼠的荧光分布情况。成像结束后获取主动脉并制备切片: 将小鼠四肢固定于解剖盘中, 用 75% 乙醇涂抹小鼠胸腹部直至小鼠皮肤湿润, 用灭菌镊子提起小鼠腹部皮肤, 用手术剪小心剪开一个缺口, 打开胸腹腔、暴露心脏, 依此进行生理盐水、10% 甲醛心脏灌注, 灌注约 40 min。从主动脉根部开始剥离血管及周围结缔组织, 获取腹主动脉标本, 剪下 1~1.5 cm 标本用 10% 甲醛固定, 48 h 后进行石蜡包埋, 从主动脉根部 0.2 cm 起间断均匀切片, 切片厚 5 μ m, 每个血管取 5 张切片进行荧光显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 聚电解质复合物的形成

壳聚糖被离子化的氨基聚糖(NH_3^+)与透明质酸之间的电离羧基(COO^-)相互作用形成 PEC(图 1)。在所有实验中, 调整壳聚糖的初始溶液 $\text{pH} = 4.0$, 以确保其充分质子化。

摩尔质量为 100×10^3 g/mol, DA 率为 5%, 以及摩尔质量为 200×10^3 g/mol, DA 率为 48% 的壳聚糖, 与平均摩尔质量在 1500×10^3 g/mol 至 50×10^3 g/mol 透明质酸进行络合, 络合物的电荷比 (N^+ / N^-) 控制为 1.5。研究中获得的各种胶体分散体, 测量它们的平均尺寸和络合后的粒度分布, 透明质酸摩尔质量的增加导致颗粒尺寸显著增加(图 2, $P < 0.05$)。 1500×10^3 g/mol 的透明质酸样品, 在实验中均没有形成颗粒, 只形成沉淀。这表明如此高分子量的聚合物不能解开形成单个颗粒, 只能形成聚集沉淀, 因此本实验没有对这一摩尔质量的透明质酸进行后续研究。根据图 2 所示的变化趋势表明, 随着透明质酸摩尔质量增加, 形成聚电解质络合物的颗粒直径增加, 分散体的动态光散射多分散指数(PI)也随之增加。因此, 最佳的透明质酸钠摩尔质量, 即颗粒的粒径最小和多分散性指数显示最低, 为 50×10^3 g/mol。

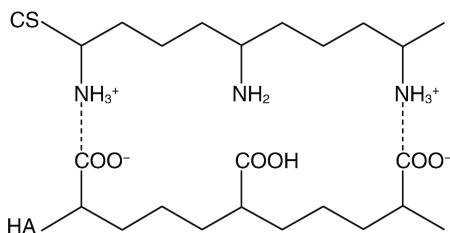


图 1. 壳聚糖与透明质酸之间的聚电解质络合反应示意图^[24]

Figure 1. Schematic diagram of polyelectrolyte complexation reaction between chitosan and hyaluronic acid^[24]

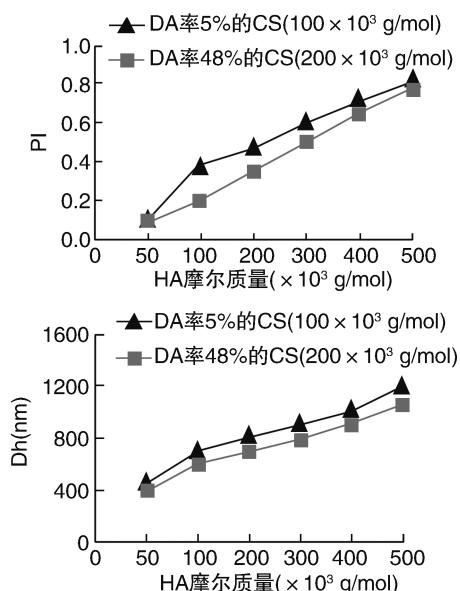


图 2. 不同摩尔质量的透明质酸对多聚络合物的大小及分散指数的影响

Figure 2. The effect of hyaluronic acid with different molar weight on the size and dispersion index (PI) of PEC

如图 3 所示, 无论在哪种乙酰化率的情况下, 增加壳聚糖的摩尔质量都会增加聚电解质复合物的平均粒径, 多分散指数(PI)也在遵循同样的趋势。这些结果提示随着壳聚糖摩尔质量的增加, CS-HA-PEC 纳米颗粒的大小增加(数据取 3 次独立实验的平均值, $P < 0.05$)。结果表明壳聚糖存在临界摩尔质量, 超过这个点, 聚电解质复合物纳米颗粒的直径会急剧增加, 在乙酰化率(DA)为 5% 和 48% 时, 临界的摩尔质量均为 200×10^3 g/mol。当壳聚糖摩尔质量低于临界质量时, 形成的颗粒结构致密均匀。

因此, 为获得小而且相当分散均匀粒子, 需要低中摩尔质量的壳聚糖(约 200×10^3 g/mol 和/或低于此摩尔质量)和 50×10^3 g/mol 透明质酸。同时研究还表明壳聚糖乙酰化率对聚电解质复合物纳米颗粒形成过程影响有限。

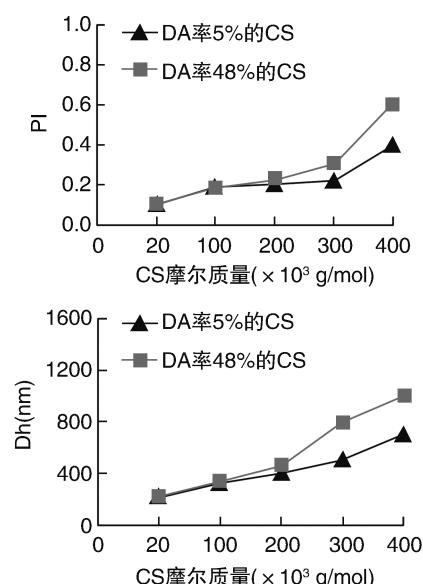


图 3. 壳聚糖摩尔质量对多聚络合物的大小及分散指数的影响

Figure 3. The effect of chitosan with different molar weight on the size and dispersion index (PI) of PEC

2.2 电荷变化对形成的聚电解质复合物物理化学特性的影响

如前所述, 混合溶液中阴离子与阳离子聚电解质形成子聚电解质复合物, 在两种极端的情况下, 得到完全的水溶性复合物或沉淀。为了获得不随时间延长而发生聚集的 PEC 纳米胶体, 本实验着重研究电荷变化对形成的聚电解质复合物稳定性的影响。乙酰化率(DA)为 48%、摩尔质量为 200×10^3 g/mol 壳聚糖与低摩尔质量的透明质酸(50×10^3 g/

mol) 在水中或 PBS 中, 分别以电荷比 (N^+/N^-) 为 0.5、1.5、2.5 和 3.5, 在水和 PBS 中得到聚电解质复合物纳米粒子。

当 $R(N^+/N^-) = 0.5$, 可观察到肉眼的絮凝, 24 h 后重新溶解, 推测其可能是因为初始形成的配合物重排从而观察到再溶解。聚合过程中更多的透明质酸参加反应, 使得中和片段重新分布, 从而形成可溶性络合物。当电荷比接近 1, 由于电荷完全中和, 颗粒的尺寸显著增加。由于中性的非带电环境, 没有静电电荷来抵消范德瓦尔斯相互作用从而

导致颗粒发生沉淀。当电荷比从 1 增加时, 粒径减小, 由于粒子上净电荷量的增加, 从而增强了胶体稳定性。当 $R(N^+/N^-)$ 为 1.5 到 3.5 时, 聚电解质复合物纳米粒子在水中直径分布在 230 ~ 320 nm 之间, 在 PBS 中直径分布为 330 ~ 590 nm。形成聚电解质复合物的 Zeta 电位是正的, 随着掺入胶体中壳聚糖的增加, 电荷比随之增加, Zeta 电位也按预期而随之增加(表 1)。扫描电镜 SEM 检测了 CS-HA 纳米颗粒的球形形貌, 在 $R = 1.5$ 时测定, 粒子显示出明显的粗糙表面(图 4)。

表 1. 不同电荷比下合成 PEC 的物理化学特性

Table 1. Physicochemical characteristics of colloidal PEC after synthesis at different charge ratios

CS-HA	电荷比 (N^+/N^-)	固体含量 (%)	大小 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)	外观
水	0.5		1050	1		沉淀
	1.5	5	320	0.1	25.00±1.63	中等浊度
	2.5	2	260	0.1	31.00±0.23	中等浊度
	3.5	1	230	0.1	43.00±0.17	低浊度
PBS	0.5		1180	1		沉淀
	1.5	4	590	0.1	32.00±0.13	中等浊度
	2.5	3	392	0.1	42.00±0.27	中等浊度
	3.5	1	330	0.1	45.00±0.31	低浊度

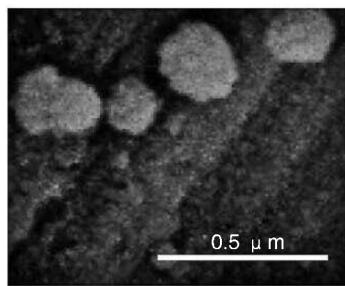


图 4. 电子扫描显微镜显示壳聚糖-透明质酸聚电解质复合物超微结构

Figure 4. Scanning electron microscopy showed the ultra-structure of chitosan hyaluronic acid polyelectric complex

2.3 胶体稳定性

为了研究胶体的稳定性, 将不同含量的纳米颗粒分别在水和 $pH=7.4$ 的 PBS 中制成混合物, 静置 1 个月后用于实验。用弹性光散射测量了微粒的平均粒径。在水溶液中的大多数样品至少稳定 1 个月。当 $R=1.5$, 在被观察的第 30 天, 分散指数(PI) 值明显增加(表 2 和表 3)。

聚电解质复合物的胶体颗粒在水中的粒径比在 PBS 中的粒径要小, 反应了 PEC 复合物的静电稳定模式。由于疏水作用, 壳聚糖内部的链条延伸至亲水的外围区, 从而防止聚合物的聚集。由于 PBS

溶液中存在着盐离子的静电作用, 所以 PEC 聚合物的稳定过程不像在水中那么有效, 因此粒子具有更大的平均直径。如表 3 所示, 对于粒子直径的变化, 我们可以观察到两个显著的特点: 第一随着电荷比的增加, 粒子的直径变小。第二, 无论溶液的类型以及电荷的比值是多少, 粒子的直径都会随着时间的增加而减小。这可能是由于此过程中粒子结构的重组导致的。无论如何, 在室温下存储 1 个月后, 溶液的粒径分布 PI 指数增加, 表明粒子的分散范围扩大。

表 2. 时间、电荷比对水溶液中 CS-HA 纳米粒子胶体稳定性的影响

Table 2. Effect of time and charge ratio on colloidal stability of CS-HA nanoparticle in water solution

CS-HA 在 水中时间 (天)	电荷比 $(N^+/N^-) = 1.5$		电荷比 $(N^+/N^-) = 2.5$		电荷比 $(N^+/N^-) = 3.5$	
	大小 (nm)	PI	大小 (nm)	PI	大小 (nm)	PI
0	320	0.1	280	0.1	260	0.1
7	300	0.1	242	0.1	253	0.1
14	250	0.2	223	0.1	203	0.1
30	152	0.3	201	0.2	121	0.2

表3. 时间、电荷比对 PBS 溶液中 CS-HA 纳米粒子胶体稳定性的影响

Table 3. Effect of time and charge ratio on colloidal stability of CS-HA nanoparticle in PBS solution

CS-HA 在 PBS 中 时间(天)	电荷比 (N ⁺ /N ⁻) = 1.5		电荷比 (N ⁺ /N ⁻) = 2.5		电荷比 (N ⁺ /N ⁻) = 3.5	
	大小 (nm)	PI	大小 (nm)	PI	大小 (nm)	PI
0	603	0.1	404	0.2	398	0.1
7	591	0.1	381	0.2	365	0.1
14	553	0.1	372	0.2	320	0.1
30	306	0.3	225	0.2	216	0.2

2.4 CD47 抗体吸附

在水和 PBS 两种溶液中,抗 CD47 的吸附动力学是相似的。PBS 和水的最大颗粒负载容量分别为 0.5 g/L 和 0.6 g/L(表4)。在本研究的蛋白质浓度范围内,实验没有达到胶体的饱和度。换句话说,初始蛋白质浓度越高,颗粒表面上结合的 CD47 抗体越多。总之,这些结果表明合成的 CS-HA-PEC 纳米胶体颗粒对 CD47 抗体高亲和力。在抗体吸附到 PEC 上之后,通过离心除去未结合的蛋白质并再次分散沉淀,第二次离心过程仅诱导大约 1% 的结合蛋白质解吸附。提示 CD47 抗体强烈地与胶体结构稳定结合。

对于固体含量为 0.1% 的颗粒,在温和搅拌下,当纳米粒子吸附 CD47 抗体后,纳米颗粒大小增加到 415 ~ 650 nm,并在室温下在缓冲液中保持稳定 3 周。掺入 CD47 抗体后 CS-HA 纳米颗粒的 Zeta 电位在水中从 +20 mV 上升到 +25 mV,在 PBS 中从 +12 mV 上升到 +18 mV。粒径增大和 Zeta 电位升高表明抗体部分整合到纳米粒子结构中,通过离子相互作用形成半互穿网络。

2.5 合成的 CD47 抗体-CS-HA-PEC 对血管内皮细胞的体外靶向吸附

将 CD47 抗体纳米载体以 FITC 荧光二抗进行标记,将血管内皮细胞株接种于 24 孔细胞培养板,与 CD47 抗体纳米佐剂共培养 24 h 后,用 PBS 进行冲洗,细胞换液,除去悬浮未被吸附的纳米载体的悬液。同时以 DAPI 复染细胞核,荧光显微镜下观察绿色荧光吸附的数量和比例(图 5)。DAPI 染色显示所有的血管内皮细胞的细胞核,FITC 荧光显微镜下为绿色荧光,显示吸附至血管内皮细胞上的 CD47 抗体靶向纳米颗粒,实验结果发现,CD47 抗体靶向纳米载体可有效吸附至血管内皮细胞的表面,有效吸附率为 90% 左右(有效吸附率 = 绿色荧光阳性细胞数/DAPI 蓝色荧光阳性细胞数 ×100%)。

表4. 水或 PBS 中 PEC 纳米胶体溶液对不同初始浓度 CD47 抗体的吸附率(%)

Table 4. Adsorption rate of CD47 antibody with different initial concentrations by PEC nanocolloidal in water or PBS solution(%)

时间 (h)	PBS 中 CD47 抗体的输入			水中 CD47 抗体的输入		
	0.1 g/L	0.3 g/L	0.5 g/L	0.2 g/L	0.4 g/L	0.6 g/L
2	95	91	90	93	91	85
4	97	98	95	95	93	90
6	100	99	97	99	99	95
16	100	100	100	100	100	100
24	100	100	100	100	100	100

注:测定条件电荷比为 1.5,CS-HA 颗粒中 CS 摩尔质量为 200×10^3 g/mol,DA 为 48%,HA 摩尔质量为 50×10^3 g/mol。

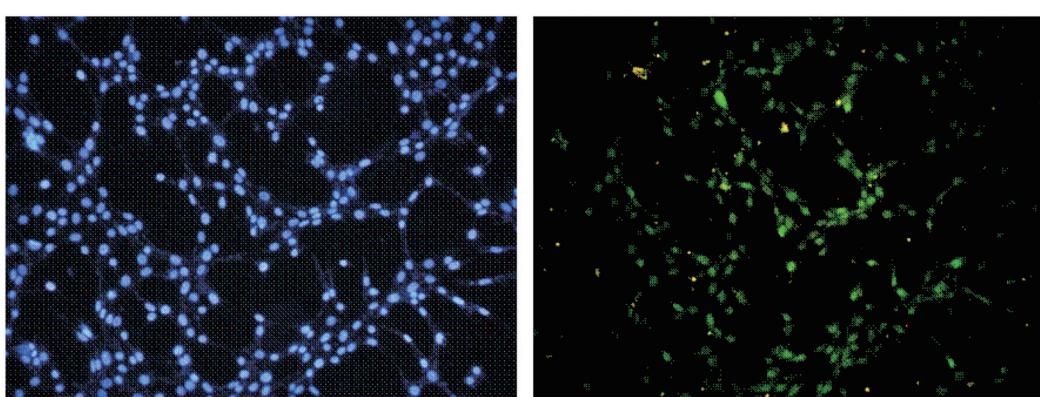


图5. 以 FITC 标记的 CD47 抗体靶向 CS-HA-PEC 与体外培养的血管内皮细胞株相互作用 左为 DAPI 染色显示所有的血管内皮细胞的细胞核,右为 FITC 荧光显微镜下显示吸附至血管内皮细胞上的 CD47 抗体靶向纳米颗粒(绿色荧光)。

Figure 5. The interaction of FITC-labeled CD47 antibody targeting hyaluronic acid-chitosan nanoelectrocoincident with cultured vascular endothelial cell lines in vitro

2.6 合成的 CD47 抗体-CS-HA-PEC 对动脉粥样硬化斑块靶向吸附

ApoE 小鼠进行高脂高胆固醇饮食。小鼠随即分成三组,8 周后进行动物活体荧光定位实验及后续实验。研究结果显示,与对照组相比,荧光标记 CD47 抗体-CS-HA-PEC 在体内动脉粥样斑块周围分布,而无抗体靶向标记的小鼠(CS-HA-PEC)体内

未检测出荧光,单独荧光 Cy5.5 染料溶液标记的对照组的荧光分布则不具有靶向性(图 6)。成像结束后获取主动脉并制备切片,每个血管取 5 张切片 DAPI 复染细胞核后进行荧光显微镜观察,荧光显微镜下证实 CD47 抗体-CS-HA-PEC 在体内对于动脉粥样斑块的靶向性(图 6)。

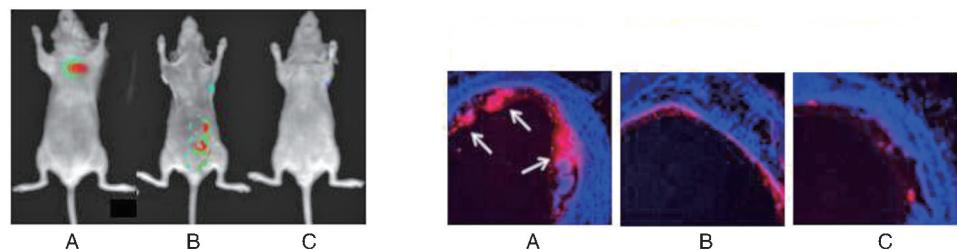


图 6. CD47 抗体-CS-HA-PEC 对动脉粥样硬化斑块靶向吸附

Figure 6. Targeted adsorption of CD47 antibody chitosan-hyaluronic acid nanocomposite on atherosclerotic plaque

3 结 论

在本研究工作中,实验从透明质酸和壳聚糖中获得带正电荷的聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒,使得它们在室温下生理介质中保持其胶体稳定性 30 天。而且,抗体可以在颗粒界面处定量吸附,且不改变胶体稳定性。

参考相关文献及我们的预实验结果,选择参数如下:低和中等摩尔质量壳聚糖(约 200×10^3 g/mol 和更低),摩尔质量约 50×10^3 g/mol 的透明质酸,电荷比(N^+/N^-)保持在 1.5 至 3.5 范围内。实验分别在去离子水或 PBS 中进行,离心和再分散后颗粒固体含量可提高到 5%。所得到的纳米粒子的直径随着电荷比的增加而减小,但是聚合物向胶体的转化降低。研究发现壳聚糖的乙酰化率对颗粒形成过程的影响不大。

抗 CD47 与 CS-HA 纳米颗粒的结合具有快速的动力学特性,并且在水和 PBS 中都具有高负载能力。CD47 抗体负载后,在水和 PBS 中观察到的粒径分别为 375 nm 和 620 nm,Zeta 电位保持为正值。在两种缓冲液中 CS-HA/CD47 抗体聚电纳米颗粒在 3 周内保持稳定。这些结果表明 CS-HA 聚电纳米颗粒对 CD47 抗体具有高的负载能力,并且在生理缓冲液(PBS)中可保持较好的胶体稳定性,更重要的是,将 CD47 抗体纳米载体体外以 FITC 荧光二抗进行标记,将血管内皮细胞株接种于 24 孔细胞培

养板,与 CD47 抗体纳米佐剂共培养 24 h 后,实验结果发现,CD47 抗体靶向纳米载体可有效吸附至血管内皮细胞的表面,有效吸附率为 90% 左右;并且在体内实验中对动脉粥样斑块具有靶向性。因此壳聚糖和透明质酸均是来自生物质的无毒多糖,因此为进一步研究利用 CD47 抗体靶向抗动脉粥样硬化的功能性生物药物递送纳米系统打下基础。

[参考文献]

- [1] Kojima Y, Volkmer JP, McKenna K, et al. CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis [J]. Nature, 2016, 536(7614): 86-90.
- [2] Lankalapalli S, Kolapalli V. Polyelectrolyte complexes: a review of their applicability in drug delivery technology [J]. Indian J Pharm Sci, 2009, 71(5): 481-487.
- [3] Sun W, Mao S, Mei D, et al. Self-assembled polyelectrolyte nano complexes between chitosan derivatives and enoxaparin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 69(2): 417-425.
- [4] 李科, 徐仓宝. 纳米医学在心血管疾病诊疗中的应用研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(8): 757-763.
- [5] Vila A, Sanchez A, Tobio M, et al. Design of biodegradable particles for protein delivery [J]. J Control Rel, 2002, 78(1-3): 15-24.
- [6] Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical application of chitosan [J]. Pharm Sci Technol Today, 1998, 1(6): 246-253.
- [7] Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and to-

cixity of chitosan[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(1): 3-11.

[8] Kima SJ, Yoona SG, Leeb KB, et al. Electrical sensitive behavior of a polyelectrolyte complex composed of chitosan/hyaluronic acid[J]. *Solid State Ionics*, 2003, 164(3-4): 199-204.

[9] Chen WB, Wang LF, Chen JS, et al. Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state[J]. *J Biomed Mater Res Part A*, 2005, 75(1): 128-137.

[10] Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, et al. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan[J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 74(4): 813-821.

[11] Zhao Q, Qian J, An Q, et al. Synthesis and characterization of soluble chitosan/sodium carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complexes and the pervaporation dehydration of their homogeneous membranes[J]. *J Membrane Sci*, 2009, 333(1-2): 68-78.

[12] Hugerth A, Caram-Lelham N, Sundeliir LO. The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan[J]. *Carbohydr Polym*, 1997, 34(3): 149-156.

[13] Arguelles-Monal W, Cabrera G, Peniche C, et al. Conductimetric study of the inter polyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid[J]. *Polym*, 2000, 41(7): 2373-2378.

[14] Liu WG, Sun SJ, Cao ZQ, et al. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2705-2711.

[15] Prestwich GD. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine[J]. *J Control Rel*, 2011, 155(2): 193-199.

[16] Yun YH, Goetz DJ, Yellen P, et al. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(1): 147-157.

[17] Eun JO, Park K, Ki SL, et al. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives[J]. *J Control Rel*, 2010, 141(1): 2-12.

[18] Yamane S, Iwasaki N, Majima T, et al. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(6): 611-619.

[19] Hahna SK, Hoffmann AS. Preparation and characterization of biocompatible polyelectrolyte complex multilayer of hyaluronic acid and poly-l-lysine[J]. *Inter J Biol Macromol*, 2005, 37(5): 227-231.

[20] Malay ö, Yalcin D, Batigün A, et al. Characterization of silk fibroin/hyaluronic acid polyelectrolyte complex (PEC) films[J]. *J Therm Anal Calorim*, 2008, 94(3): 749-755.

[21] Lu H, Zhao H, Wang K, et al. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis[J]. *Int J Pharm*, 2011, 420(2): 358-365.

[22] Duceppe N, Tabrizian M. Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(13): 2625-2631.

[23] Verheul R, Slüter B, Bal SM, et al. Covalently stabilized trimethyl chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for nasal and intradermal vaccination[J]. *J Control Rel*, 2011, 156(1): 46-52.

[24] Chua PH, Neoh KG, Kang ET, et al. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(10): 1412-1421.

(此文编辑 许雪梅)