

可作为疫苗佐剂的云芝多糖磷酸钙纳米粒的制备与表征

宋志磊,潘玉涛,黄新河,刘新荣*,晏为力*

西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031

摘要:我们设想通过磷酸钙药物载体与多糖的结合制备新型的疫苗佐剂,以提高疫苗传递效率,增强免疫应答。首先对云芝粗多糖进行提纯处理,随后利用高碘酸钠(NaIO_4)氧化云芝多糖(PSK)得到多醛基产物,再以帕米膦酸二钠(PA)修饰,得到PSK-PA,利用红外光谱法对其产物进行鉴定。采用共沉淀法,制备功能化磷酸钙(PSK-CAP)纳米粒,利用动态光散射(DLS)粒度仪对纳米粒性能进行对比分析选取最优结果,并通过扫描电子显微镜(SEM)观察最优条件下纳米粒的形貌。随后利用载有鸡卵清蛋白(OVA)为模型抗原的纳米粒(PSK-CAP-OVA)验证对细胞活性影响,同时观察RAW264.7细胞对其吞噬能力。通过一系列的表征发现,纳米粒平均粒径为100 nm左右,且分散性良好,PSK-CAP-OVA纳米粒毒性较小,并且RAW264.7细胞更倾向于吞噬装载OVA的纳米粒,可以提高胞内OVA的浓度。总之,PSK-CAP纳米粒可为后续研究佐剂类型提供参考。

关键词:云芝多糖;磷酸钙纳米粒;免疫佐剂;OVA;纳米粒表征

中图分类号:R944.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.9.003

Preparation and Characterization of Polysaccharide Krestin Calcium Phosphate (PSK-CAP) Nanoparticle as a Vaccine Adjuvant

SONG Zhi-lei, PAN Yu-tao, HUANG Xin-he, LIU Xin-rong*, YAN Wei-li*

School of life science and engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: We hypothesize that calcium phosphate (CAP) coated polysaccharide as vaccine adjuvant can improve the transmission efficiency as well as enhance immune response. In this study, unpurified polysaccharide krestins (PSK) was treated in traditional craft. PSK was then oxidized by sodium periodate to obtain a multi-aldehyde product. PSK-aldehyde was reacted with pamidronate (PA) to obtain Pa-modified PSK (PSK-PA) and the products were identified by infrared spectrum (IR). PSK-PA was used to synthesize CAP nanoparticles by co-precipitation method. The size and PDI was used to optimize the formulation of the nanoparticle. The morphology of nanoparticles was observed using scanning electron microscope (SEM). Subsequently, ovalbumin (OVA), used as a model antigen, was loaded into the nanoparticles to examine the cytotoxicity on RAW264.7. The uptake of PSK-CAP-OVA-FITC loaded nanoparticle was investigated on RAW264.7 by fluorescent microscopy. The average diameter of the nanoparticles was about 100 nm with a PDI less than 0.3 indicating a homogeneous dispersion. Interestingly, the toxicity of PSK-CAP-OVA nanoparticles was significantly reduced when compared to the free PA. Additionally, we observed that Raw264.7 cell preferentially uptake the PSK-CAP-OVA nanoparticles compared to that of the free OVA. In conclusion, PSK-CAP nanoparticles can provide a reference for future studies on immune adjuvants.

Key words: PSK; calcium phosphate nanoparticles; vaccine adjuvant; OVA; nanoparticle characterization

研发不同佐剂类型,在寻找新疫苗来对抗具有挑战性的病原体以及对传统疫苗免疫应答较弱的易感人群来说,是最先进的疫苗开发途径^[1]。目前FDA批准的用于人体的主要佐剂是铝佐剂,尽管应用广泛,但尚存诸多问题,比如温度限制,稳定性,无

法刺激Th1型免疫反应等^[2]。磷酸钙纳米粒用于药物载体、食品添加剂等^[3]。磷酸钙纳米粒通过钙离子螯合带负电荷的核酸,将其传递到细胞中避免被酶降解^[4]。尽管存在诸多优点,但磷酸钙不可控的晶核快速增长,导致了大量的团聚,稳定性和转染效率大大降低^[5]。将磷酸钙封装于脂质体、透明质酸、壳聚糖^[6]中来缓解沉降^[7]。

云芝,又被称作杂色云芝,彩色云芝等,多孔菌

收稿日期:2016-06-06 接受日期:2016-07-15

基金项目:四川省科技厅项目(2015JY0202);成都市科技惠民项目(2015-HM01-00047-SF)

* 通讯作者 E-mail:yanweili@gmail.com

科,是世界分布的真菌,具有很高的药用价值,从云芝菌丝体经过热水提取分离纯化得到的具有 β -葡聚糖结构的多糖被称为 PSK,分子量大约在 10^5 Da,结构中蛋白含量在 18% ~ 38% 之间,PSK 已经展示对抗各种实验性肿瘤的生物活性,其主要机制是通过非特异性免疫调节来增强身体的自然免疫反应,而不针对任何特定肿瘤抗原,同时也有研究表明能够激活 TLR2 受体,增强 NK 细胞,DC 细胞, $\gamma\delta$ T 等免疫细胞活性^[8]。在日本,PSK 作为一种抗肿瘤制剂,与其他化疗药物联合用于胃肠道癌症和非小细胞肺癌的术后辅助治疗^[9],并且已在日本上市^[10]。目前对云芝多糖活性研究的报道,主要集中在增强免疫刺激^[8]、抗肿瘤^[9,11]、治疗乙肝等方面。

本论文以修饰后的免疫活性多糖—云芝多糖作为稳定剂,避免了表面活性剂作为稳定剂的毒副作用,同时赋予了 PSK-CAP 纳米粒的免疫调节性及靶向作用,有助于磷酸钙作为疫苗佐剂作用的发挥,PSK 具有增强自身免疫应答而非直接对抗任何特异性的抗原,以纳米粒为受体介导的胞吞作用被抗原呈递细胞吞噬,避免了抗原被巨噬细胞的清除,有利于抗原诱导免疫反应。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

粗品云芝多糖(西安瑞芬生物工程有限公司);鸡卵清蛋白(OVA, Sigma-aldrich); 蕈酮(上海科丰实业有限公司); Alpha-D(+)-Glucose(Dr. Ehrenstorfer Germany); OVA-FITC(北京博尔西科技有限公司, OVA 浓度为 5 mg/mL); DMEM 高糖培养基(GBICO, 12460054); 双抗(HyClone, SH40003-12); 胎牛血清(GBICO, 10099-141-FBS); Cell Counting Kit(CCK-8, 上海翊圣生物科技有限公司, 40203); DAPI(北京拜尔迪诊断技术有限公司, 28718-90-3); 邻苯二甲醛(OPA)试剂(Sigma-aldrich, P1166864), 帕米磷酸二钠(PA), 硼氢化钠, 高碘酸钠, 乙二醇、硝酸钙、磷酸氢二铵等试剂均为购于成都科龙化工试剂厂,均为分析纯(AR)。

1.1.2 仪器

傅立叶转换红外光谱仪(Nicolet, IR5700), 磁力搅拌器(Thermo Scientific, EUA), 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂, RE-52A), 冷冻干燥机(Telstar, Lyoquest), 动态光散射(DLS, Malvern ZEN3600), 扫

描电子显微镜(SEM, JEOL JSM-7001F, Japan), 酶标仪(Thermo Scientific, Vavioskan Flash), 倒置荧光显微镜(Olympus Corporation, Th4-200), CO₂ 培养箱(Thermo Scientific, 311)。

1.2 实验方法

1.2.1 粗云芝多糖的纯化提纯

精确称取粗多糖 1 g 溶于 20 mL 水中, 60 °C 搅拌 2 h, 抽滤 3 次, 利用 75%、90% 酒精依次过夜醇沉, 醇沉后蒸发除去乙醇, 待乙醇除尽后将水溶物 20 °C 冷冻后放入冷冻干燥机干燥备用, 并利用蒽酮硫酸法对纯化前后的样品测定多糖含量。

1.2.2 云芝多糖的结构修饰

将 100 mg PSK 溶于 4 °C 去离子水中, 加入 NaIO₄(终浓度为 50 mmol/L), 其中 PSK(按单糖计, 0.56 mmol):NaIO₄ 摩尔比分别为 1:1、2:1, 避光下冰水浴中, 1000 rpm 搅拌反应 2 h, 加入乙二醇终止反应, 在相同条件下继续搅拌 1 h, 以去离子水为介质避光下冰水浴中透析 72 h(截留分子量 3.5 KDa), 冷冻干燥后 -20 °C 保存。

将 PA 溶于去离子水中, 加入氰基硼氢化钠与多醛基 PSK(帕米磷酸二钠:醛:氰基硼氢化钠摩尔比为 4:1:4), 搅拌反应 24 h 后, 加入硼氢化钠, 继续搅拌 24 h 还原未反应的醛基, 以去离子水为介质透析 72 h(截留分子量 3.5 KDa), 冷冻干燥 PSK-PA 后 -20 °C 保存, PSK-PA 结构采用红外光谱进行鉴定。按照氧化比例的不同将 PSK(按单糖计):NaIO₄ 摩尔比为 1:1、2:1 修饰物依次命名为 PSK-PA1、PSK-PA2。

1.2.3 功能化磷酸钙纳米粒的制备

根据 PSK-PA 中 PO₄³⁻ 和溶液中游离 Ca²⁺ 正负电荷的相互作用, 采用共沉淀法制备磷酸钙纳米粒^[12]。首先配制 1 mg/mL PSK-PA 溶液, 取 500 μ L 6.25 mmol/L 硝酸钙溶液加入溶液中, 用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 到 9-10 左右, 搅拌约 40 min; 取 500 μ L 3.74 mmol/L 磷酸氢二铵溶液, 继续搅拌约 40 min, 即得功能化 PSK-CAP 纳米粒; 在保持磷酸钙和磷酸氢二铵加入量不变的前提下, 通过改变 PSK-PA 的浓度(0.2 ~ 0.5 mg/mL) 来探索制备纳米粒的最佳投料比。制备好的功能化 PSK-CAP 纳米粒, 采用 DLS 进行表征, 并利用 SEM 观察其表面形貌。

1.2.4 抗原 OVA 与 PSK-CAP 纳米粒的结合及鉴定

将 1.2.3 中得到的纳米粒, 经冷冻干燥除去

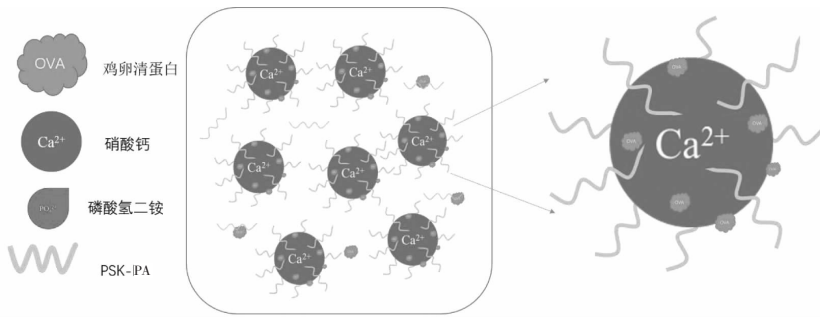


图1 PSK-CAP 纳米粒及 OVA 结合模式图

Fig. 1 The model of PSK-CAP nanoparticles and binding OVA

OH⁻复溶,加入 OVA 混合,利用 OPA 法^[13]鉴定 OVA 与载体结合情况。取 1 mL OPA 试剂与 5 μ L OVA 终浓度均为 0.125、0.25、0.375、0.5、0.625、0.75 mg/mL 的的纳米粒及纯 OVA 溶液进行混合,利用酶标仪在吸收波长为 340 nm,发射波长为 455 nm 进行荧光值检测。

1.2.5 PSK-CAP-OVA 纳米粒细胞毒性实验

RAW264.7 (ATCC) 培养于含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基中,待细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下密度为 85% 左右,将细胞以 1×10^4 /孔接种在 96 孔板上,孵育过夜。将 PSK-CAP-OVA 纳米粒(0.35 mg/mL),另配与原溶液中相同终浓度的 OVA、PA 溶液,之后将 3 组溶液向 96 孔板中分别加入 10、20、30 μ L,共培养 24 h 后,利用 CCK-8 法测定 3 组对细胞毒性,用酶标仪在 450 nm 下检测吸光度值。(注:培养基中 3 组 PSK-CAP-OVA 纳米粒的终浓度分别为 0.032、0.058、0.081 mg/mL;3 组对应所含 PA 的终浓度分别为 0.021、0.039、0.054 mg/mL;3 组对应所含 OVA 的终浓度分别为 0.057、0.104、0.144 mg/mL)。

1.2.6 PSK-CAP-OVA 纳米粒细胞吞噬实验

以云芝多糖为稳定剂的磷酸钙纳米粒,可经 TLR2 介导的胞吞作用进入巨噬细胞,在细胞质溶酶体中被处理成片段后呈递,经受体的内吞作用增加了细胞对抗原的吞噬^[14]。细胞培养及铺板同 1.2.5,随后加入 10 μ L PSK-CAP-OVA 纳米粒和与原液中 OVA 浓度相同的 OVA-FITC(终浓度为 0.2 mg/mL)为对照,共培养 4 h,用 PBS 洗涤 3 次,随后每孔加 100 μ L 4% 多聚甲醛进行 15 min 固定,再用 PBS 洗涤 3 次,最后避光加 DAPI(500 ng/mL)染色 10 min, PBS 清洗 3 次,每孔加 100 μ L 抗荧光淬灭剂于米粒倒置荧光显微镜下观察细胞对纳米粒的吞噬效

果^[15,16]。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件处理本实验所得数据,处理结果以(平均数 \pm 标准差)表示, $P < 0.05$ 表示数据间存在统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 粗云芝多糖的纯化提纯

根据蒽酮-硫酸法,建立 D-葡萄糖标准曲线,得到线性方程为: $Y = 4.906X + 0.04583$, $R^2 = 0.99229$,式中,X 为多糖浓度(mg/mL),Y 为多糖浓度所对应的 OD 值。由方程计算纯化前后 PSK 中多糖浓度分别为 0.035、0.0437 mg/mL;根据公式计算出多糖含量:多糖含量 = 实际多糖浓度/原多糖浓度 $\times 100\%$;可知纯化前后云芝多糖中多糖含量分别为 70%、87%,纯化后多糖含量增加 17%,纯化效果明显。

2.2 PSK-PA 结构的红外光谱鉴定

PSK、PA、PSK-PA1、PSK-PA2 总共 4 种物质分别与溴化钾研磨,充分混匀后进行红外光谱如图 2。经分析,无论是游离还是缔合的 N-H,其峰强都比形成氢键缔合的-OH 峰弱,且峰型稍尖锐,N-H 键的伸缩振动频率大幅度向低频位移,在 3200 ~ 2200 / cm^{-1} 范围内形成宽的谱带。在图 A 中,2000 ~ 2500 / cm^{-1} 没有特征峰,而在图 D 中有两个明显的特征峰。结果表明,PSK-PA2 有-NH-结构,说明 PSK 和 PA 已结合。

2.3 功能化云芝多糖磷酸钙纳米粒的制备

由图 3 可知,PSK-PA1 与 PSK-PA2 在 0.35 ~ 0.5 mg/mL 时,粒径在 200 nm 以内,PDI 均在 0.3 以下,分散性良好。在综合 Size、PDI 以及保留 PSK 活性等因素下,最终选择 PSK-PA2 进行后续研究。

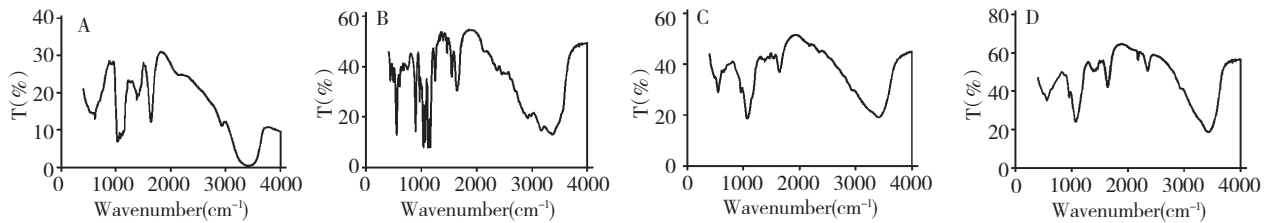


图2 PSK (A)、PA (B)、PSK-PA1 (C)、PSK-PA2 (D) 的红外光谱图

Fig. 2 IR spectra of PSK (A), PA (B), PSK-PA1 (C) and PSK-PA2 (D)

由图 4 (a) 可知, 纳米体系中 PSK-PA2 的终浓度为 0.35 mg/mL 时, 粒径均匀, 分散性较好。在 SEM 图 4 (b) 中可知, 虽然多糖纳米粒在制样过程中有发生

团聚作用, 可能原因是多糖脱水造成的, 但不影响纳米粒形貌观察, 颗粒大小均保持在 100 nm 左右 ($**** P < 0.0001$)。

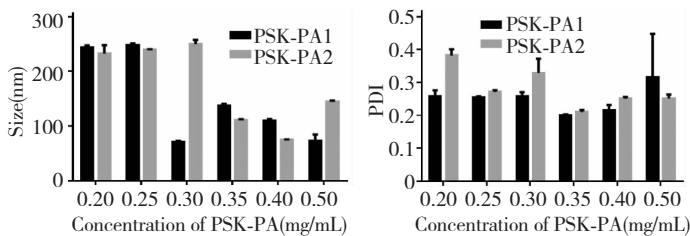


图3 不同终浓度下 PSK-PA1 和 PSK-PA2 形成的纳米粒对比 ($n = 3$)

Fig. 3 Comparison of PSK-PA1 and PSK-PA2 forming nanoparticles under different final concentrations ($n = 3$)

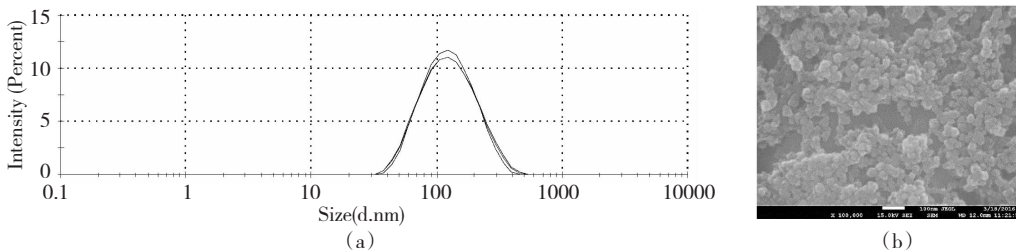


图4 纳米粒形状表征结果

Fig. 4 Characterization of nanoparticles shape

注: (a) PSK-PA2 在终浓度为 0.35 mg/mL 时粒径图; (b) PSK-CAP 纳米粒 SEM 图

Note: (a) PSK-PA2 formed nanoparticles in 0.35 mg/mL; (b) The topography of PSK-CAP nanoparticles

2.4 抗原 OVA 的结合及鉴定

由 5 图可知, 在保持 0.35 mg/mL 纳米粒浓度不变的前提下, 随着 OVA 浓度增加出现饱和现象, 分散性变差, 故未保证纳米粒分散性良好且加入 OVA 量最大化, OVA 终浓度为 0.625 mg/mL 为宜。由图 6 可知, OVA 组为对照组, PSK-CAP-OVA 组为实验组, 结果表明, 实验组中的氨基酸残基明显减少, OVA 已与 PSK-CAP 纳米粒具有明显结合。 ($**** P < 0.0001$)。

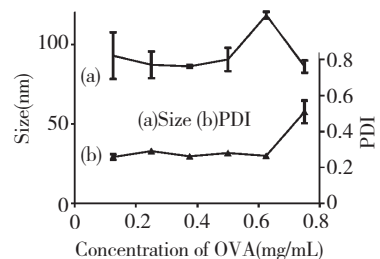


图5 不同 OVA 浓度下 PSK-CAP-OVA 形成的纳米粒情况 ($n = 3$)

Fig. 5 Formation of PSK-CAP-OVA nanoparticle under different concentrations of OVA ($n = 3$)

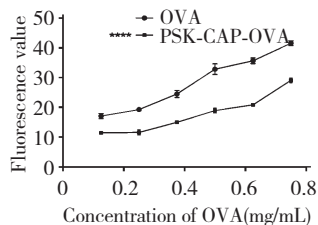


图6 OPA法检测OVA与PSK-CAP纳米粒结合情况($n=3$)

Fig. 6 The binding OVA and PSK-CAP nanoparticle determined by OPA assay ($n=3$)

2.5 PSK-CAP-OVA 纳米粒细胞毒性实验

由图7可知OVA对RAW264.7细胞无毒性, PA在3种浓度下对细胞均有一定杀伤作用,而制备的多糖磷酸钙纳米粒在3种浓度下的细胞毒性较小($n=3$),在较低的PA浓度下(0.021 mg/mL),PCO-1与PA-1有明显差异($P < 0.0001$),说明PA修饰多糖后形成的纳米粒可以降低PA的细胞毒性(注图7中1、2、3代表所加物质体积分别为10、20、30 μ L)。

2.6 PSK-CAP-OVA 纳米粒细胞吞噬实验

由图8可知,在相同的抗原OVA浓度下(0.2 mg/mL),巨噬细胞更倾向于吞噬PSK-CAP-OVA纳米粒,对于游离的OVA吞噬效率差,且OVA经巨噬细胞吞噬后,进入细胞质,此结果说明磷酸钙纳米载体提高巨噬细胞对抗原的摄取率,有利于抗原更好的刺激免疫系统产生应答反应。

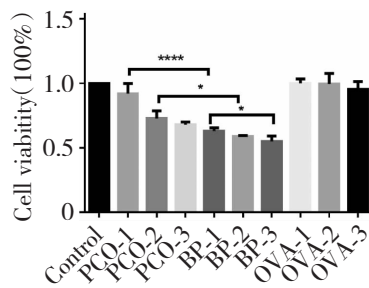


图7 各组物质不同浓度下对RAW264.7细胞稳定性的影响($n=3$)

Fig. 7 Effects of samples with concentrations on cell viability of RAW264.7 ($n=3$)

3 结论

本实验首先对粗多糖进行纯化处理,使多糖纯度提升了17%。随后利用PA成功修饰了带有醛基的PSK,并通过共沉淀法,将钙离子,磷酸根与PSK-PA混合制备了功能化磷酸钙(CAP)纳米粒,并探究了不同PSK-PA浓度下纳米粒特性发现PSK-PA2在0.35 mg/mL浓度下粒径及PDI最优,粒径大小在100 nm左右,PDI在0.3以下,通过SEM观察得知纳米粒具有很好的表面形貌,与DLS分析结果相吻合。细胞毒性实验表明,载有模型抗原OVA的PSK-CAP-OVA纳米粒对RAW264.7的毒性较小,而单一成分PA则毒性较大,说明载体既能通过PA延展臂长形成纳米粒也能降低其毒性,同时显示巨噬细胞对纳米粒的吞噬效果相对于单独OVA明显增强,提高了OVA在细胞内的浓度,增强免疫效果。

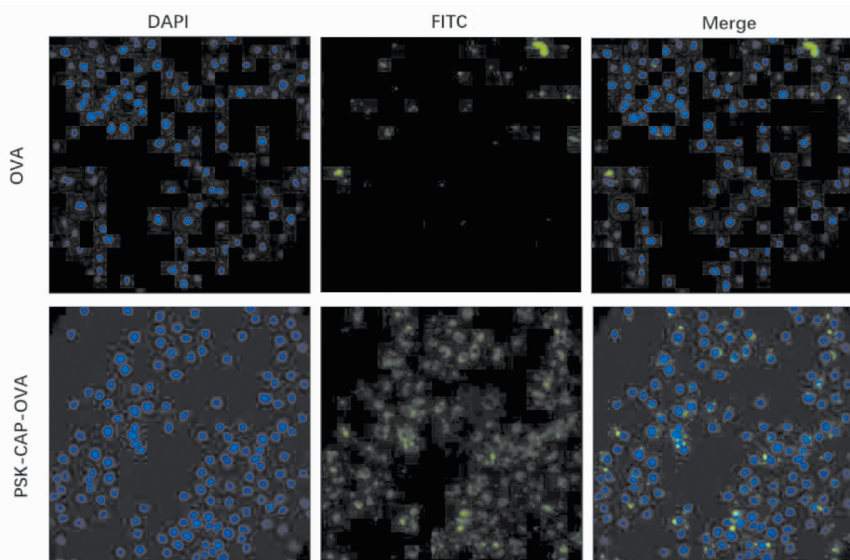


图8 荧光检测细胞对PSK-CAP-OVA纳米粒吞噬情况

Fig. 8 Cell phagocytosis of PSK-CAP-OVA nanoparticles detected by fluorescence

综上所述,通过云芝多糖修饰的磷酸钙纳米粒,增强了OVA免疫刺激能力,提升了免疫制剂的免疫活性,同时也为多糖免疫佐剂的研究提供一种参考。

参考文献

- Pasquale AD, Preiss S, Silva FT, *et al.* Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 2015, 3:320-343.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, *et al.* Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 2008, 453: 1122-1126.
- Kovach I, Kosmella S, Prietzel C, *et al.* Nano-porous calcium phosphate balls. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 132: 246-252.
- Das P, Jana NR. Length-controlled synthesis of calcium phosphate nanorod and nanowire and application in intracellular protein delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 8710-8720.
- Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 596-601.
- Wang C, Fu X, Yang L. Water-soluble chitosan nonpareils as a novel carrier system for protein delivery. *Chin Sci Bull*, 2007, 52:883-889.
- Wang J, Chen B, Zhao D, *et al.* Peptide decorated calcium phosphate/carboxymethyl chitosan hybrid nanoparticles with improved drug delivery efficiency. *Int J Pharm*, 2013;446: 205-210.
- Inatsuka C, Yang Y, Gad E, *et al.* Gamma delta T cells are activated by polysaccharide K (PSK) and contribute to the anti-tumor effect of PSK. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62:1335-1345.
- Hirahara N, Edamatsu T, Fujieda A, *et al.* Protein-bound polysaccharide-AK (PS) induces apoptosis via hypoxanthine-activated protein kinase pathway in Romeo Leukemia HOLY-60 cells. *Anticancer Res*, 2012, 32:2631-2638.
- Maehara Y, Tsujitani S, Saeki H, *et al.* Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN): review of development and future perspectives. *Surg Today*, 2012;42:8-28.
- Fritz H, Kennedy DA, Ishii M, *et al.* Polysaccharide K and *Coriolus versicolor* extracts for lung cancer: a systematic review. *Integr Cancer Ther*, 2015, 14:201-211.
- Li WM, Su CW, Chen YW, *et al.* In situ DOX-calcium phosphate mineralized CPT-amphiphilic gelatin nanoparticle for intracellular controlled sequential release of multiple drugs. *Acta Biomater*, 2015, 15:191-199.
- Fayle SE, Healy JP, Brown PA, *et al.* Novel approaches to the analysis of the Millard reaction products. *Electrophoresis*, 2001, 22:1518-1525.
- Quayle K, Coy C, Standish L, *et al.* The TLR2 agonist in polysaccharide-K is a structurally distinct lipid which acts synergistically with the protein-bound beta-glucan. *J Nat Med*, 2015, 69:198-208.
- Li HS, Singh B, Park TE, *et al.* Mannan-decorated thiolated Eudragit microspheres for targeting antigen presenting cells via nasal vaccination. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 80:16-25.
- Zhan X, Jia L, Niu Y, *et al.* Targeted depletion of tumour-associated macrophages by an alendronate-glucomannan conjugate for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 2014, 35: 10046-10057.
- Yan RL (闫荣玲), Liao Y (廖阳), Chen Y (陈颖), *et al.* Dynamic variation of tea saponin and flavone content in *Camellia oleifera* leaves. *J Henan Agric Sci* (河南农业科学), 2015, 44(1):33-36.
- Chen J (陈坚), Zhou SH (周胜虎), Wu JJ (吴俊俊), *et al.* Research progress on microbial production of flavonoids. *J Food Sci Technol* (食品科学技术学报), 2015, 33(1):1-5.
- Lin YH, Shen XL, Yuan QP, *et al.* Microbial biosynthesis of the anticoagulant precursor 4-hydroxycoumarin. *Nature Commun*, 2013, 4:1-8.
- Wang XM (王星敏), Yin ZY (殷钟意), Zhang YW (张渝文), *et al.* Microbial fermentation for cell disruption in combination with ultrasonic treatment for the extraction of total flavonoids from *Pueraria lobata* Tubers. *Food Sci* (食品科学) 2011, 32(2):28-30.
- Li YB (李艳宾), Zhang Q (张琴), Tao CY (陶呈宇), *et al.* Microbial fermentation promote extracting rate of flavonoids from *Glycyrrhiza* residues. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2010, 31:156-158.

(上接第 1366 页)