

巨噬细胞靶向雷帕霉素和利福平自噬纳米笼的构建及其对胞内结核杆菌的杀伤效能

何晓枫¹, 赵祖国¹, 罗仁幸¹, 彭婉晴¹, 吴坤汝¹, 韦燕兰¹, 廖显平¹, 程炜然¹, 王万党^{2*}, 金花^{1*}
(1. 广东医科大学药学院/医学技术学院/基础医学院, 广东东莞 523808; 2. 南方医科大学附属小榄医院检验科, 广东中山 528415)

摘要:目的 构建具有高巨噬细胞(M ϕ)靶向性、自噬增强功能的纳米笼,并探讨其对胞内结核杆菌杀伤效能。方法 制备负载雷帕霉素(Rapa)和利福平(Rif)纳米笼(Rif/Rapa-NCs),再用靶向巨噬细胞的甘露糖修饰(Man@),得到具有高M ϕ 靶向性、自噬增强功能的甘露糖修饰Rapa和Rif纳米笼(Man@Rif/Rapa-NCs),观察其对胞内外结核杆菌杀伤效能。结果 Man@Rapa/Rif-NCs具有良好的生物相容性和高M ϕ 靶向性,显著增强了M ϕ 自噬,并有效抑制结核杆菌生长($P<0.05$ 或 0.01)。结论 成功构建了M ϕ 靶向性、自噬增强功能的甘露糖修饰Rapa和Rif纳米笼,可高效清除胞内结核杆菌。

关键词: 靶向纳米笼; 结核杆菌; 巨噬细胞; 雷帕霉素; 利福平

中图分类号: R 969

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 05-0492-06

Construction and evaluation of targeting macrophage autophagy nanocage and their killing efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*

HE Xiao-feng¹, ZHAO Zu-guo¹, LUO Ren-xing¹, PENG Wan-qing¹, WU Kun-ru¹, WEI Yan-lan¹, LIAO Xian-ping¹, CHENG Wei-ran¹, WANG Wan-dang^{2*}, JIN Hua^{1*} (1. School of Pharmacy, School of Medical Technology, School of Basic Medical Sciences, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Department of Laboratory, Affiliated Xiaolan Hospital, Southern Medical University, Zhongshan 528415, China)

Abstract: Objective To construct a macrophage (M ϕ) targeted and autophagy enhanced nanocage, and then observe its killing effect on intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. Methods The M ϕ targeted and autophagy enhanced nanocages (Man@Rif/Rapa-NCs) were constructed by loading with rapamycin and rifampicin (Rif/Rapa-NCs) and modifying with M ϕ targeted mannose (Man@). The killing effect of Man@Rif/Rapa-NCs on extracellular and intracellular M. tuberculosis was detected. Results Man@Rapa/Rif-NCs had good biocompatibility and M ϕ targeting, which enhanced M ϕ autophagy and killed intracellular M. tuberculosis. Conclusion The Man@Rif/Rapa-NCs are successfully constructed and effectively eliminate intracellular M. tuberculosis.

Key words: targeted nanocage; *Mycobacterium tuberculosis*; macrophage; rapamycin; rifampicin

结核病由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*)感染引起,已成为全世界发病率和致死率最高的传染性疾病。95% 结核病死亡者来自包括我国在内的一系列发展中国家^[1]。目前临床仍使用一些经典的抗痨药物(如异烟肼、利福平Rif等)对

其进行治疗,但这些药物往往具有不良反应大、用药周期长、治疗方案复杂、极易引起耐药等问题^[2-3]。因此,设计、开发高效精准的结核治疗药物和治疗方法对缩短结核化疗周期、减少毒副作用、提高结核患者的生活质量、防治结核病(特别是耐药结核病)具有至关重要

收稿日期: 2021-12-08

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2021A1515011595),广东省医学科研基金(A2021188),广东省创新团队项目(2021B1515130004)

作者简介: 何晓枫(1998-),男,本科,技师, E-mail: HXFLG0225@126.com

共同第一作者: 赵祖国(1978-),男,博士,副教授, E-mail: zhaozuguo@gdmu.edu.cn

共同通信作者: 金花(1981-),女,博士,副教授, E-mail: jinhua0413@gdmu.edu.cn

王万党(1987-),男,硕士,主管技师, E-mail: wangwandang@126.com

的意义。宿主导向治疗(host-directed therapy, HDT)是一种新的、有效的结核病辅助治疗方法,主要通过调节宿主对结核分枝杆菌各种免疫通路达到最大限度杀死细菌和减少炎症所致组织损伤的目的,是遏制结核菌及耐药结核菌的有效途径。巨噬细胞(M ϕ)是*M.tb*在体内主要的宿主细胞及免疫细胞,但是*M.tb*在与宿主长期相互作用过程中,逐渐形成多种逃避杀灭的有效策略,得以在宿主体内存活并增殖。其中,结核菌抑制M ϕ 自噬,从而逃逸机体的免疫杀伤,是结核菌生存的主要方式。因此,促进M ϕ 自噬可作为清除M ϕ 内部的*M.tb*的有效措施^[4-5]。而其他正常细胞也可以摄取一定量的自噬药物,从而引起广泛的机体毒性。本研究拟通过构建具有高M ϕ 靶向性的自噬增强纳米药物,降低机体毒性,并通过提高药物的生物相容性,以期实现高效杀灭胞内*M.tb*的目的。

1 材料和方法

1.1 细胞系

THP-1 人单核细胞购自 ATCC 公司(上海),用含有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 青/链霉素(P/S)的无血清细胞冻存基础培养基(RPMI 培养基)于 37 °C, 5%CO₂ 中常规培养。

1.2 主要材料和试剂

RPMI 培养基购自 HyClone 公司; FBS 及 P/S 购自 Gibco 公司; 聚乳酸- 羟基乙酸共聚物(PLGA-PEG)和 PMA(P1585) 购自 sigma 公司; 二氯甲烷(CAS: 75-09-2) 购自大茂化学试剂厂; 聚乙烯醇(CAS: 9002-89-5)、Rif(CAS: 13292-46-1)及D- 甘露糖(CAS: 3458-28-4) 购自 Macklin 公司; 香豆素 6 (C6, CAS: 38215-36-0) 购自源叶生物; 雷帕霉素(Rapa, CAS: NO.R8140) 购自 Solarbio 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG、LC3I、LC3II、P62 及 GAPDH 抗体购自 Beyotime 公司。

1.3 甘露糖修饰的雷帕霉素和利福平纳米笼(Man@Rapa/Rif-NCs)构建及其表征分析

聚乳酸- 羟基乙酸共聚物(PLGA-PEG)与 Rapa、Rif 共同溶解在二氯甲烷中作为油相, 1% PVA 水溶液(w/v) 作为水相, 利用油包水的乳化作用原理在高强度机械力(100 W, 3 min) 作用下形成乳剂, 超纯水洗涤, 冷冻干燥得到纳米颗粒(Rapa/Rif-NCs)。将一定量的甘露糖(Man) 溶解在醋酸钠溶液(0.1 mol/L, pH=4) 中使其终浓度为 8 μ mol/L, 再加入 PLGA-PEG 纳米颗粒水溶液(0.1 μ mol/L), 在室温下震荡 8 h, 浓缩

获得 Man@Rapa/Rif-NCs。所得到的产品利用原子力显微镜观察其形貌, 并利用纳米激光粒度仪测量产品的粒径和表面 zeta 电位。

1.4 Man@ Rapa/Rif-NCs 纳米笼生物安全性分析

取 1 mL 小鼠全血, 采用 EDTA 抗凝, 3 000 r/min 离心 10 min, 取红细胞沉淀, 用 PBS 重悬后, 加入纯水(阳性溶血组)、PBS(阴性对照组)、不同浓度的纳米载药体(Rapa/Rif、Rapa/Rif-NCs、Man@Rapa/Rif-NCs)。模拟体内环境, 37 °C 水浴 18 h 后观察其溶血情况, 并检测 OD540。

1.5 Man@ Rapa/Rif-NCs 对 M ϕ 靶向作用分析

将 THP-1 细胞接种到六孔板中, 培养至 10 万细胞/孔, 加入 100 mmol/L PMA 刺激细胞^[6], 24 h 后, 加入罗丹明(Rh) 标记的自噬纳米笼 Man@Rh-nanocage(Man@Rh-NCs) 孵育一定时间, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 去除细胞表面的 Man@Rh-NCs 后, 换为磷酸缓冲溶液(PBS), 用倒置荧光显微镜观察 Man@Rh-NCs 被 M ϕ 吸收的情况。

1.6 体内靶向活体成像

在纳米笼构建步骤中, 以 C6 代替 Rapa 和 Rif, 得到含有荧光标记的纳米笼颗粒(C6-NCs)。取正常健康 C57 小鼠, 用磷酸缓冲液(Basal 组)、甘露糖修饰的纳米载体(Man@C6-NCs)滴鼻给药, 采用 IVIS 小动物活体成像仪分析不同修饰的纳米笼在小鼠各个组织器官中的分布。

1.7 构建的自噬纳米笼 Rapa/Rif-NCs 对巨噬细胞自噬的诱导作用

将 THP-1 细胞接种到六孔板中, 加入 100 mmol/L PMA 刺激细胞, 24 h 后加入不同药物作用 72 h 后用 PBS 洗涤细胞 3 次, 采用吖啶橙追踪药物处理后细胞内酸性自噬泡(AVOs)的生成; 提取细胞总蛋白, 采用免疫印迹法检测自噬蛋白 LC3II/I 及 P62 表达水平的变化。

1.8 Man@ Rapa/Rif-NCs 对 *M.tb* 杀伤效果检测

药物对胞外 BCG 菌株的杀伤疗效检测: 细菌经纯培养基(Medium 组)、Rapa/Rif、Rapa/Rif-NCs、Man@Rapa/Rif-NCs、Man@Rapa/Rif-NCs+3-MA 分别作用 72 h 后, 涂板, 37 °C 孵育 3~4 周后计菌落数。实验中原药或纳米笼中负载的 Rif 质量浓度为 10 μ g/L, Rapa 质量浓度为 10 mg/L。自噬抑制剂 3-MA 质量浓度为 10 mg/L。

药物对 M ϕ 内 BCG 菌株的杀伤疗效检测: 将 THP-1 细胞接种到共聚焦培养皿, 培养至 40 万细胞/孔, 加入

100 mmol/L PMA 刺激细胞, 24 h 后用 *M.tb* 菌株 BCG 感染 M ϕ (感染复数 MOI=1), 4 h 后用 PBS 洗涤细胞, 去除细胞表面的细菌后分别加入纯培养基 (Medium 组)、Rapa/Rif、Rapa/Rif-NCs、Man@Rapa/Rif-NCs、Man@Rapa/Rif-NCs+3-MA 作用 72 h, 清洗细胞, 用蒸馏水裂解细胞并涂板, 37 °C 孵育 3~4 周后计菌落数。

2 结果

2.1 Man@ Rapa/Rif-NCs 纳米笼的表征特点

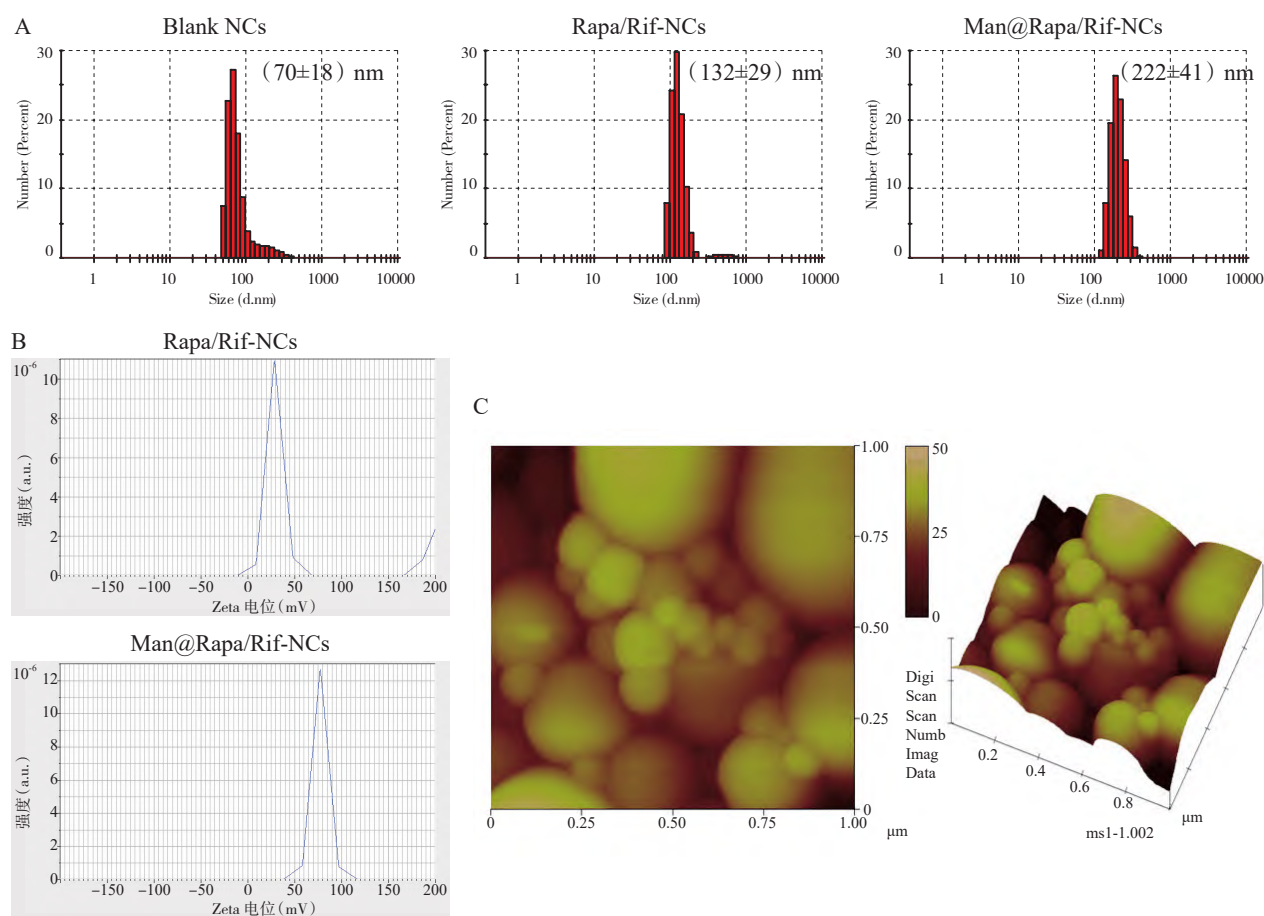
实验结果显示 (图 1A), 所制备的具有 M ϕ 靶向功能的无修饰、无载药的纳米笼 Blank NCs 粒径为 (70 $\pm$ 18) nm, 双载药纳米笼 Rapa/Rif-NCs 粒径约为 (132 $\pm$ 29) nm, 而甘露糖分子修饰的双载药纳米笼 Man@Rapa/Rif-NCs 粒径为 (222 $\pm$ 41) nm。经甘露糖分子修饰的双载药纳米笼的表面 zeta 电位为 +77.4 mV (图 1B), 说明甘露糖分子成功融合在纳米笼的表面, 且相对稳定, 不容易发生聚集。未经修饰的双载药纳米笼的表面 zeta 电位约为 0 mV, 呈规则球形 (图 1C)。

2.2 Rapa/Rif@Man-NCs 纳米笼的生物安全性及 M ϕ 靶向性分析

在药物质量浓度为 10 μ g/L 的条件下, 所制备的药物肉眼所见无明显溶血现象 (图 2A)。以 (实验组 OD540 - 阴性对照 OD540) / 阴性对照 OD540 的值作为纵坐标绘制溶血程度直方图, 以代表药物溶血性的定量表征, 结果显示, 所制备的 Rapa/Rif-NCs 及 Man@Rapa/Rif-NCs 纳米笼不会造成溶血 (图 2B), 说明该纳米药物生物安全性良好。构建的抗结核化疗药物纳米笼可被 M ϕ 摄取 (图 2C、D)。进一步对其表面修饰甘露糖分子后, 发现纳米载体被 M ϕ 的摄取量增加了 3 倍 (图 2E)。

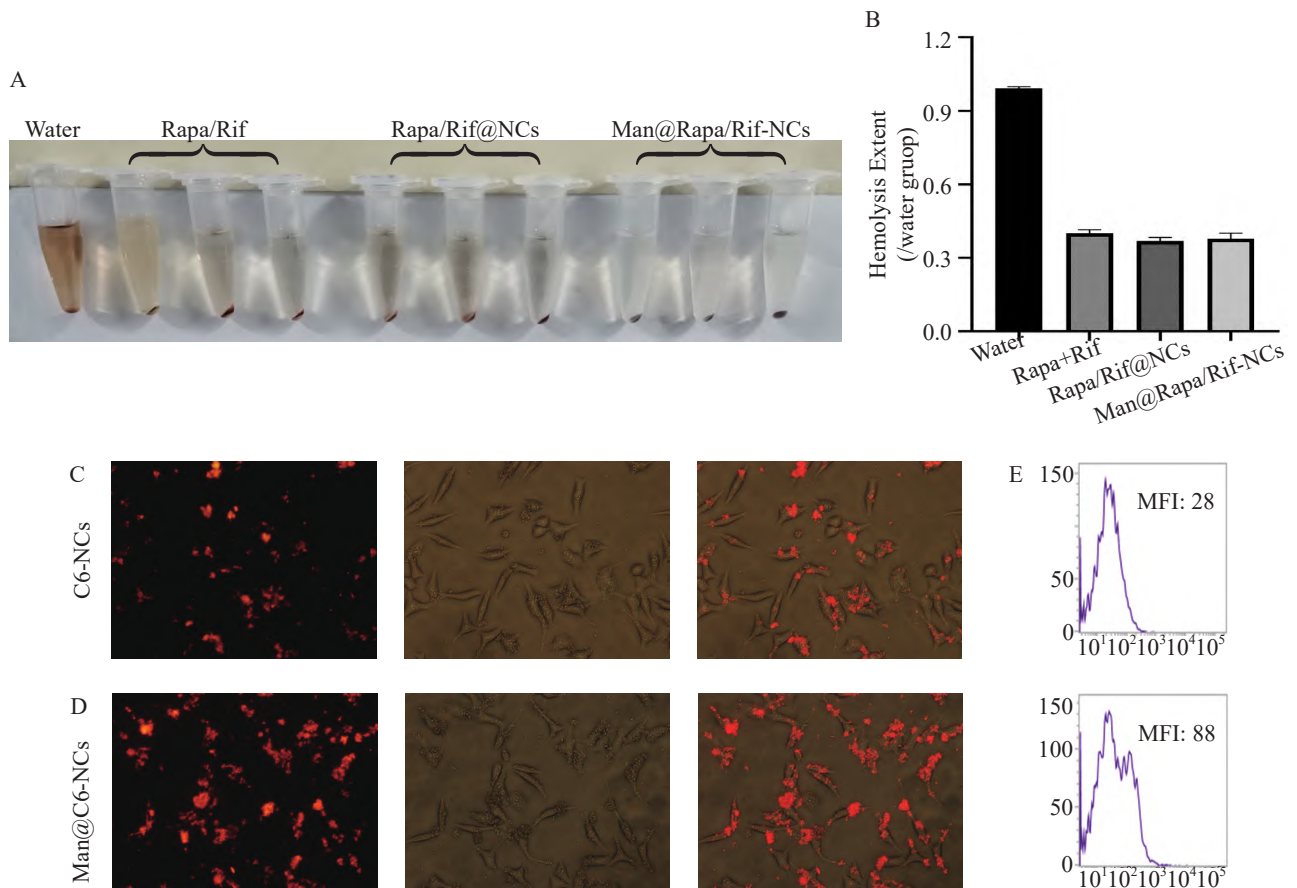
2.3 Man@ Rapa/Rif-NCs 纳米笼在体内靶向性分析

活体成像实验结果见图 3, 构建的纳米载体主要聚集在肝脏和肺脏。其中, 未经 C6-NCs 很快被机体清除, 而经甘露糖修饰后可以在体内滞留时间大于 24 h, 同时纳米载体在肺脏的滞留量也大大增加。



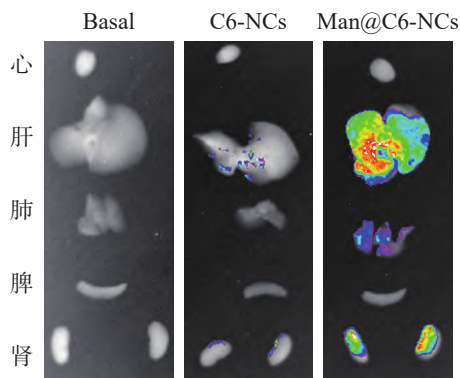
A. Blank NCs、Rapa/Rif-NCs 及 Man@ Rapa/Rif-NPs 粒径; B. Rapa/Rif-NCs 及 Man@ Rapa/Rif-NPs 表面电位的表征; C. 原子力显微镜检测 Man@ Rapa/Rif-NPs 的形貌表征

图 1 构建的纳米笼的粒径、表面电位及形貌表征



A. 药物质量浓度为 $10 \mu\text{g/L}$ 的条件下, Rapa/Rif、Rapa/Rif-NCs、Man@Rapa/Rif-NCs 红细胞的溶血性(纯水组作为阳性对照); B. 图 A 中药物溶血性的定量表征; C、D. THP-1 M ϕ 对甘露糖无修饰(C)及修饰(D)的荧光纳米笼摄取的荧光成像; E. 采用流式细胞术对图 C、D 中荧光纳米笼摄取的荧光强度检测, 其 MFI 值分别为 28 和 88

图 2 Man@Rapa/Rif-NCs 生物安全性、生物相容性及巨噬细胞靶向性



滴鼻给药 24 h 后, 无修饰及甘露糖修饰的纳米笼在不同组织中的分布情况

图 3 构建的自噬纳米笼的体内器官靶向性的表征

2.4 Man@Rapa/Rif-NCs 纳米笼对 M ϕ 自噬诱导及胞内 *M.tb* 抑制作用分析

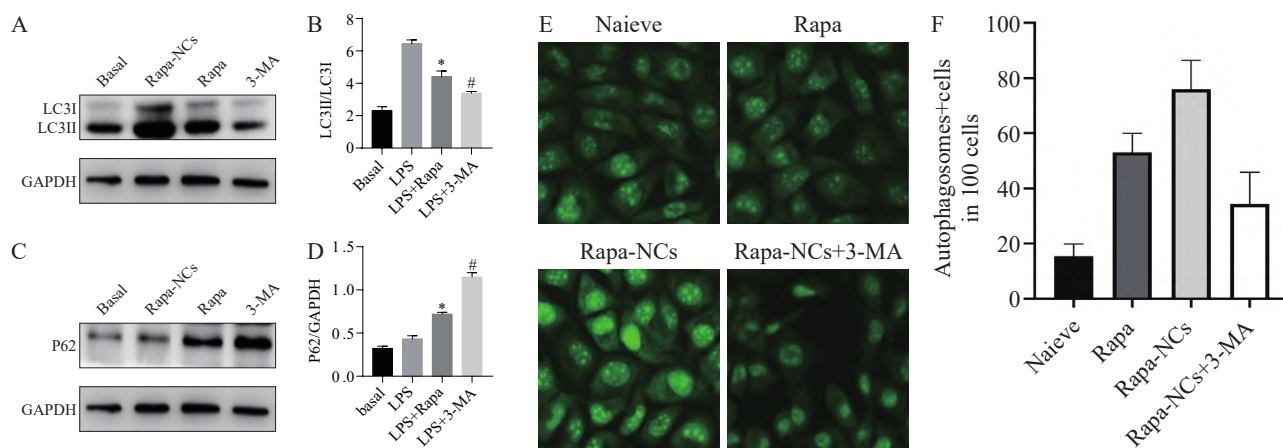
自噬诱导剂 Rapa 能明显诱导 M ϕ 自噬, 而自噬抑制剂 3-MA 明显抑制了 M ϕ 的自噬, “纳米笼”的负载能显著加强 Rapa 的自噬效果, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 Man@Rapa/Rif-NCs 对 *M.tb* 杀伤效果检测结果

通过计算(菌落涂板计数结果/涂板所用液量)得到菌液中 *M.tb* 的含量(CFU/mL)并以此作为纵坐标绘制直方图(图 5)。Rapa/Rif-NCs 组对胞外 BCG 抑制率可达 80% 以上 ($P < 0.01$), 见图 5A。Man@Rapa/Rif-NCs 组在胞外及胞内杀伤均有较好的效果 ($P < 0.01$), 且在胞内杀伤实验中, Man@Rapa/Rif-NCs 组未检出可疑菌落, 说明自噬纳米药物对胞内结核菌的杀伤效果良好。而联合使用自噬抑制剂 3-MA 与诱导自噬双载药物纳米笼 Man@Rapa/Rif-NCs 对胞内菌的杀伤效率有所下降, 见图 5B。

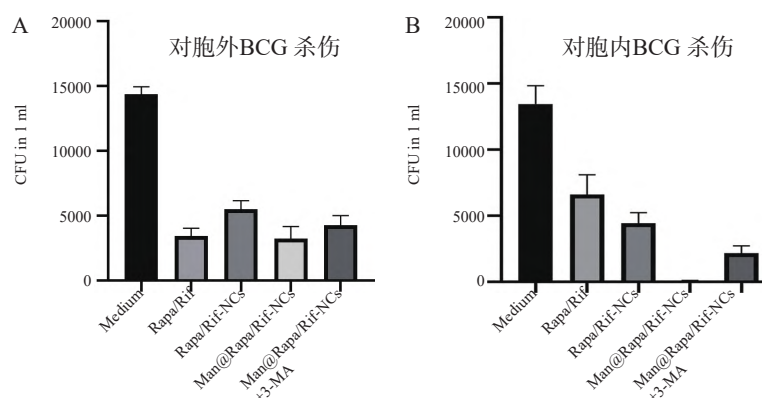
3 讨论

甘露糖受体是先天免疫系统中重要的模式识别受体和内吞受体, 主要表达于 M ϕ 表面, 可高效靶向 M ϕ 并被其摄取^[7-8]。鉴于小分子化疗药物如利福平、雷帕霉素等, 具有良好的生物活性, 二者联用可以在临床抗结核治疗中具有很好的前景。但小分子药物本身又具有毒副作用大、脱靶性、生物相容性和利用度低等一系



A、B. 不同药物对Mφ自噬蛋白(LC3II/I)表达的影响; C、D. 不同药物对Mφ自噬蛋白(P62)表达的影响(Rapa组与Basal组比较: * $P<0.05$, 3-MA组与Basal组比较: # $P<0.05$); E、F. 吖啶橙追踪药物处理后AVOs的生成情况及统计图

图4 构建的自噬纳米笼对巨噬细胞自噬的影响



A. 不同药物处理对胞外BCG菌落CFU生长抑制的影响; B. 不同药物处理对Mφ内BCG菌落CFU生长抑制的影响; 各处理组与Medium组比较均 $P<0.01$, $n=3$

图5 构建的纳米笼对胞内和胞外结核杆菌抑制率的影响

列问题,使其疗效和临床应用都受到很大限制。纳米载药系统可以通过功能化修饰实现靶向递送,将药物、基因或抗体等直接运送到疾病部位的组织或细胞,实现药物的靶向输送以及到达靶点后的定向释放^[4]。

临床化疗药物利福平进入体内后,对Mφ内*M.tb*的杀伤效果差,结核患者病情缓解较慢,需大剂量长期用药(6~12个月以上)。而高剂量的药进入体内后,杀伤Mφ内*M.tb*的同时,由于脱靶性,药物也会大量进入其他正常细胞,从而引起对机体的严重不良反应^[9]。前期研究表明,细胞自噬是破坏胞内感染菌的重要方法^[10]。近年来,研究发现*M.tb*已经进化出多种机制以干扰自噬介导的*M.tb*清除路径,从而使其逃避细胞的免疫攻击,使其在胞内存活和复制^[11]。

本研究中,制备了负载抗结核药物和自噬诱导剂的纳米笼,并通过对其进行甘露糖的表面修饰,增加了其对巨噬细胞的靶向性,表明所制备的纳米笼具有很好的生物安全性,不会引起红细胞溶血;同时,“纳米

笼”具有很好的生物相容性,能快速被Mφ吞噬,从而将负载的药物成功输送到宿主细胞内;体内实验证明,小鼠滴鼻给药后,靶向纳米笼可以富集在肺部。

机体内Mφ与结核菌的相互作用影响结核菌的发展和生存,增强Mφ对胞内*M.tb*的杀灭能力,成为抑制结核病发展的重要策略。而通过诱导Mφ自噬以及自噬溶酶体的成熟在杀灭*M.tb*中起着关键调节作用。图4中,我们利用装载自噬诱导剂Rapa的纳米笼及自噬抑制剂3-MA,对比了自噬对Mφ内结核菌清除的影响,结果显示,自噬可以促进胞内*M.tb*的清除,而抑制自噬则有利于*M.tb*的生长。

综上所述,本研究中我们成功构建了具有高Mφ靶向性、高生物相容性及高安全性的自噬“纳米笼”,并基于该纳米载体构建了具有自噬增强作用的纳米载体系统,用于抗结核药物的装载和Mφ靶向输送,通过结合增强Mφ自噬引发的免疫反应和Mφ内的抗结核药物对*M.tb*直接杀伤,可更高效地杀灭胞内*M.tb*。

参考文献:

- [1] 徐彩虹, 赵雁林. 从《2020 年全球结核病报告》看我国结核病防治工作[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(7): 392-397.
- [2] DICKS K V, STOUT J E. Molecular diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 77-90.
- [3] ISEMAN M D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis [J]. *N Engl J Med*, 1993, 329(11): 784-791.
- [4] KIM J K, LEE H M, PARK K S, et al. MIR144* inhibits antimicrobial responses against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2 [J]. *Autophagy*, 2017, 13(2): 423-441.
- [5] GUPTA A, MISRA A, DERETIC V. Targeted pulmonary delivery of inducers of host macrophage autophagy as a potential host-directed chemotherapy of tuberculosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 102: 10-20.
- [6] 章述军, 雷青松, 李麟, 等. 两种PMA 诱导方案对THP-1 巨噬细胞M1 和M2 亚型相关基因表达的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(6): 765-771.
- [7] 吴惠娟, 韦曲星, 张盛昔, 等. 甘露糖对巨噬细胞炎症反应的双向调节作用 [J]. 中山大学学报(医学版), 2020, 41(4): 549-557.
- [8] FRASER I P, KOZIEL H, EZEKOWITZ R A. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity [J]. *Semin Immunol*, 1998, 10(5): 363-372.
- [9] ZHANG H Q, XI X E, WANG Y L, et al. Side effects of tuberculosis treatment with fixed-dose combinations [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015, 29(2): 379-388.
- [10] BIRMINGHAM C L, CANADIEN V, GOUIN E, et al. *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells [J]. *Autophagy*, 2007, 3(5): 442-551.
- [11] VERGNE I, SINGH S, ROBERTS E, et al. Autophagy in immune defense against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Autophagy*, 2006, 2(3): 175-178.

版权声明

为适应我国信息化建设, 扩大本刊及作者知识信息交流渠道, 本刊编辑部已将《广东医科大学学报》的文献数据在中国知网、万方数据—数字化期刊群、中教数据库等以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播, 其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付(在收取发表费时折扣), 作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我编辑部上述声明。

本刊编辑部