DOI:10.16016/j.1000-5404.201408198

论著

男性避孕纳米粒的制备与体外实验研究

徐萍萍[1],杨利华[1,3],魏桂芝[1],张建祥[2],东亚君[1],梁志清[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院妇产科[1],药学院药剂教研室[2];063000 河北 唐山,唐山市工人医院妇产科[3])

[摘要] **目的** 构建聚乳酸-羟乙酸共聚物(polylactic acid-glycolic acid,PLGA)包载促卵泡生成素受体表位肽($FSHR_{32-44}$)的纳米粒,探讨PLGA材料作为避孕疫苗载体的可行性。**方法** 使用PLGA为载体,制备出包载促卵泡生成素受体的B细胞表位($FSHR_{32-44}$)的纳米粒,透射电镜(TEM)观察表观形态,粒径仪检测粒径分布范围和Zeta电位,体外释放试验检测其理化特性。激光共聚焦显微镜观察小鼠骨髓来源树突状细胞(DCs)吞噬FSHR可溶性多肽和FSHR/PLGA NP的能力,流式细胞仪检测FSHR、PLGA NP和FSHR/PLGA NP促骨髓来源DCs成熟能力。**结果** 单乳-溶剂挥发法制备的FSHR/PLGA NP大小粒径分布均匀、表面规整,粒径(296.3±3.5)nm,Zeta电位(-16.1±0.4)mV,FSHR包封率(62.71±2.83)%,并具有缓慢释放抗原的能力;体外细胞水平实验结果显示FSHR表位肽纳米粒易于被DCs摄取,有剂量和时间依赖性,能显著上调DCs表面CD40、CD86、CD83和MHC-Ⅱ功能分子的表达。**结论** PLGA包载FSHR多肽有良好的包封率,易被DCs吞噬,并有强的促进DCs成熟作用,可以作为$FSHR_{32-44}$避孕疫苗的载体。

[关键词] FSHR;PLGA;纳米疫苗;避孕
[中图法分类号] R943;R965;R979.21 [文献标志码] A

Preparation and *in vitro* effect of $FSHR_{32-44}$/PLGA nanoparticles as male contraceptive

Xu Pingping[1], Yang Lihua[1,3], Wei Guizhi[1], Zhang Jianxiang[2], Dong Yajun[1], Liang Zhiqing[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Obstetrics and Gynecology, Tangshan Workers' Hospital, Hebei Province, 063000, China)

[**Abstract**] **Objective** To synthesize nanoparticles (NP) with follicle-stimulating hormone receptor peptide ($FSHR_{32-44}$) encapsulated by poly(lactic acid-glycolic acid) (PLGA), which is biodegradable polymer material approved by Food and Drug Administration, and explore whether PLGA carrier is suitable for contraceptive vaccine. **Methods** Emulsification process was used for preparation of $FSHR_{32-44}$-encapsulated PLGA NP ($FSHR_{32-44}$/PLGA NP), and the morphology was observed with a transmission electron microscope. The particle size distribution and Zeta potential were detected with a laser potential particle size instrument, and the in vitro releasing characteristic of the NP was studied. A laser scanning confocal microscope was employed to observe the uptake capacity of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) to soluble $FSHR_{32-44}$ and $FSHR_{32-44}$/PLGA NP, and a flow cytometer was used to detect the phenotypic changes of BMDCs co-cultured with $FSHR_{32-44}$, PLGA NP and $FSHR_{32-44}$/PLGA NP, respectively. **Results** $FSHR_{32-44}$/PLGA NP had uniform particle size distribution and regular surface, and could slowly release antigens, with average particle size of 296.3±3.5 nm, Zeta potential of -16.1±0.4 mV, $FSHR_{32-44}$ encapsulation efficiency of 62.71%±2.83%, and total release rate of 98.3%. The *in vitro* cell test showed that $FSHR_{32-44}$ was easily up-taken by BMDCs in a dose- and time-dependent manner, and the expressions of

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270731)
[通信作者] 梁志清,E-mail: zhiq.lzliang@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1530.082.html(2014-12-02)

CD40, CD86, CD83 and MHC-Ⅱ on the surface of BMDCs were up-regulated. **Conclusion** The $FSHR_{32-44}$/PLGA NP have good encapsulation efficiency, and can be easily up-taken by BMDCs to promote maturation of BMDCs. PLGA can be used as the carrier of $FSHR_{32-44}$ contraceptive vaccine.

[**Key words**] FSHR; PLGA; nanoparticle vaccine; contraception

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270731). Corresponding author: Liang Zhiqing, E-mail: zhiq.lzliang@gmail.com

在现有的避孕措施中,可供男性选择的避孕方法有限;但最新调查显示男性承担家庭生育计划的意愿越来越强烈,这种意愿在发展中国家更加明显[1]。免疫性避孕疫苗具有经济、高效、可逆的特点,显示出诱人的发展前景,但目前研发的男性避孕疫苗均存在一定的缺陷。本课题组前期工作中,杨利华等[2]利用生物蛋白质组学技术,从促卵泡生成素受体表位肽(FSHR)的胞外段蛋白中筛选出B-细胞肽4段,经啮齿类动物体内实验验证$FSHR_{32-44}$有一定的避孕作用,并且对生殖系统无明显的病理损害。但由于多肽类疫苗都存在免疫原性差的缺陷,尚不能达到满意的临床应用避孕效果。本研究拟利用纳米载体系统的平台,使用经美国食品与药品监督管理局(food and drug administration,FDA)批准的PLGA材料,制备包载$FSHR_{32-44}$的纳米粒,观察其大小、形态、粒径分布、Zeta电位以及包封率和体外释放特点,并在体外验证其被树突状细胞DCs吞噬和诱导DCs成熟的能力,为开发新型的避孕疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

纯化的和罗丹明标记的$FHSR_{32-44}$(IELRFVLTK-LRVI)多肽(纯度>95%),均采用固相合成技术合成(上海强耀多肽合成有限公司)。PLGA(50∶50;美国PolySciTech公司);聚乙二醇(polyvinyl alcohol, PVA;美国Acro Organics公司);流式抗体Anti-Mouse CD11c-APC、Anti-Mouse CD40-PE、Anti-Mouse CD83-FITC、Anti-Mouse CD86-PE、Anti-Mouse MHC-Ⅱ-FITC均购自eBioscience公司;FITC标记的鬼笔环肽(美国Sigma公司);流式细胞仪(BD FACS CanTo Ⅱ,美国);激光电位纳米粒径仪(ZEN 3690,英国Malvern公司);透射电镜(TECNAI-10,荷兰PHILIPS公司);激光共聚焦显微镜(S-3400N Ⅱ,德国蔡司公司)。

1.2 FSHR/PLGA NP的制备

精确称取50 mg PLGA材料溶于600 μL二氯甲烷中,超声至其完全溶解。将FSHR多肽2 mg用少许DMSO溶解后,转移至有含PLGA材料的二氯甲烷溶液中,并加入2% PVA溶液6 mL,探头超声于冰浴中超声20 s。形成的乳液快速倒入含0.3% PVA溶液20 mL的烧杯中,室温中磁力搅拌器搅拌以挥发有机溶剂。所得NP以16 000 r/min(离心半径为8.5 cm)离心收集,双蒸水洗3遍以去除多余PVA,-20 ℃冻干保存。

1.3 FSHR/PLGA NP的表征检测

取新鲜制备的NP悬液少许,稀释后用Zeta电位激光纳米粒径仪检测NP的平均粒径、粒径分布和Zeta电位。另取少许NP悬液滴于铜网上,待其干燥后透射电镜下观察其表面形态。

1.4 包封率的计算和FSHR/PLGA NP体外释放试验

制备FSHR/PLGA NP时所用的FSHR总投药量和根据标准曲线用紫外分光光度计测量所得洗涤过程中离心上清液中FSHR的含量,分别标记为A、B。

包封率=(A-B)/A×100%

取1 mg FSHR多肽和含相同剂量FSHR多肽的FSHR/PLGA NP用5 mL PBS重悬后,至于37 ℃恒温震荡箱中,定期离心后取上清液1 mL,用紫外分光光度计测量释放的FSHR量,同时重新加入等量新鲜溶液,共观察30 d,观察其体外释放特征。

1.5 实验动物和骨髓来源DCs的培养

C57/BL6J近交系小鼠6~8周龄,购自第三军医大学大坪野战外科研究所实验动物中心。小鼠脱颈处死,酒精消毒后分离出胫骨和股骨,小心剪断两端吹出骨髓,红细胞裂解液裂解红细胞,所得剩余细胞用含10%胎牛血清、20 ng/mL IL-4、20 ng/mL GM-CSF和100 U的青链霉素的RPMI1640培养基,37 ℃、5% CO_2培养。隔天半量换液,第5天全量换液后待用。

1.6 DCs吞噬FSHR/PLGA NP的观察

培养至第5天的DCs全量换液后,按1×10^6/孔接种于圆形玻片上,然后分别加入相同剂量罗丹明标记的FSHR多肽和FSHR NP,共孵育12 h,随后洗涤去除多余抗原,4%多聚甲醛固定后FITC-鬼笔环肽染细色,DAPI标记胞核,封片后于共聚焦下观察DCs对不同剂型抗原的吞噬情况。

培养至第5天的DCs 1×10^6/mL,铺于24孔板中,按空白对照组、FSHR/PLGA NP 5、10、20、40 μg/mL(所有NP的剂量以所含FSHR多肽量计算,且多肽用罗丹明染料标记),分别与DCs共培养12 h。另一组细胞按照1、4、8、12、24 h与同等剂量的FSHR/PLGA

NP共孵育。随后洗涤去除多余NP，每管加入APC-CD11c抗体4 ℃孵育30 min，洗去多余抗体后流式细胞仪检测DCs吞噬不同剂量抗原和不同时间吞噬同等剂量抗原情况。结果用FlowJo7.6.2软件分析。

1.7 DCs表型的检测

培养至第5天的DCs 1×10^6/mL，按PBS组、可溶性多肽组（FSHR 20 μg/mL）、PLGA NP（剂量同FSHR/PLGA NP组）、FSHR/PLGA NP组（含FSHR 20 μg/mL）与DCs共培养48 h后，收集细胞PBS洗涤3遍，单克隆流式抗体CD11c、CD40、CD83、CD86、MHC-Ⅱ分别按说明加入各实验组后，震荡混匀，4 ℃共孵育30 min，PBS洗去多余抗体后流式细胞仪检测DCs表型变化。结果用FlowJo7.6.2软件分析。

1.8 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间差异采用 t 检验。

2 结果

2.1 FSHR/PLGA NP的表征检测

单乳法制备的FSHR/PLGA NP悬液为乳光色明显的溶液，马尔文电位、激光粒径仪测得NP的Zeta电位（-16.1 ± 0.4）mV，粒径（296.3±3.5）nm。透射电镜下观察其形态为规整的圆球形，且大小均匀。

2.2 包封率和体外释放试验

经单乳-溶剂挥发法制备的FSHR/PLGA NP包封率为（62.71±2.83）%。在体外释放试验中，FSHR/PLGA NP的FSHR释放存在2个释放平台，即突释和缓释，总的释放量达98.3%（图1）。与单纯FSHR多肽相比，FSHR/PLGA NP的释放呈现典型的缓释特征。

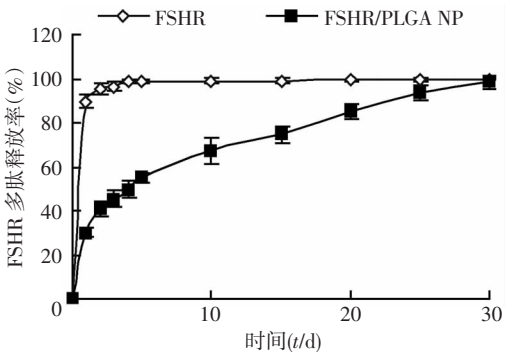
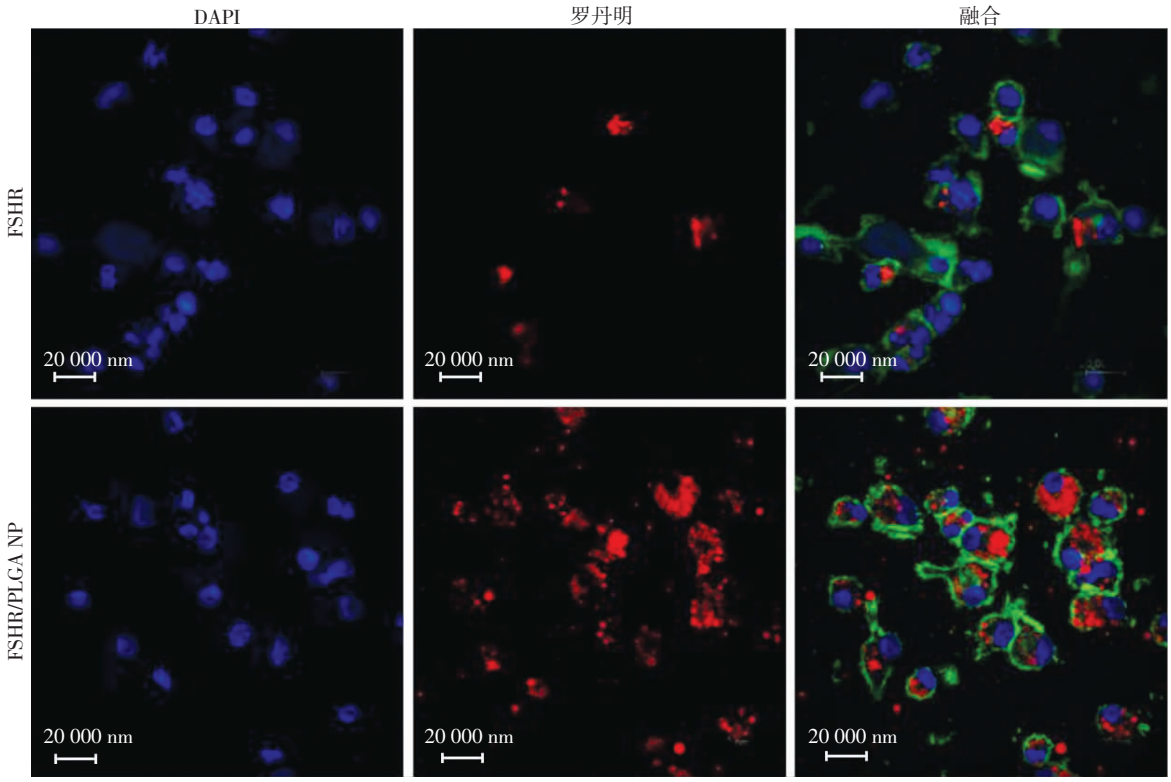


图1 FSHR多肽和FSHR/PLGA NP在PBS中的释放曲线

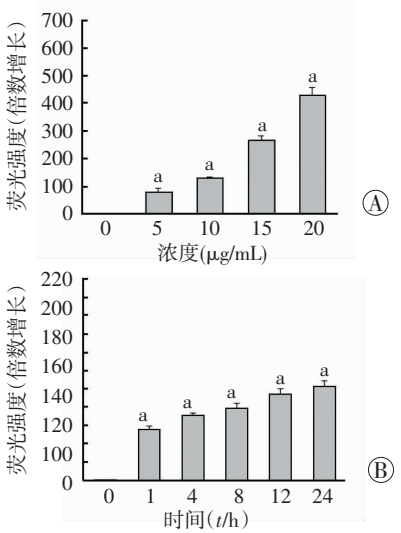
2.3 DCs的吞噬作用

与单纯FSHR多肽比较，FSHR/PLGA NP更易于被吞噬（图2）。从图3可见，其吞噬作用具有典型的剂量和时间依赖特征，与对照组（0 μg/mL、0 h）相比，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。随着纳米粒剂量的增加和共培养时间的延长，DCs吞噬的纳米粒呈逐渐增加的趋势。



蓝色为DAPI标记的细胞核；红色为罗丹明标记的FSHR多肽；绿色为鬼笔环肽标记的细胞骨架；相较于单纯的多肽，NP组细胞内的红色区域大量增加，提示有更多的NP进入细胞内

图2 激光共聚焦观察DCs吞噬同等剂量FSHR多肽和FSHR/PLGA NP比较



A:不同浓度 FSHR/PLGA NP 处理的细胞荧光强度 a:$P<0.05$,与 0 μg/mL 比较;B:不同培养时间细胞的荧光强度 a:$P<0.05$,与 0 h 比较

图3 DCs 吞噬纳米粒的剂量和时间依赖特征

2.4 DCs 的活化

与可溶性多肽相比,FSHR/PLGA NP 具有强大的促进 DCs 成熟的能力,显著上调表达 CD40、CD86、CD83 和 MHC-Ⅱ功能分子(图4)。FSHR/PLGA NP 组与 PBS 对照组和 FSHR 可溶性多肽组相比差异具有显著统计学意义($P<0.05$)。

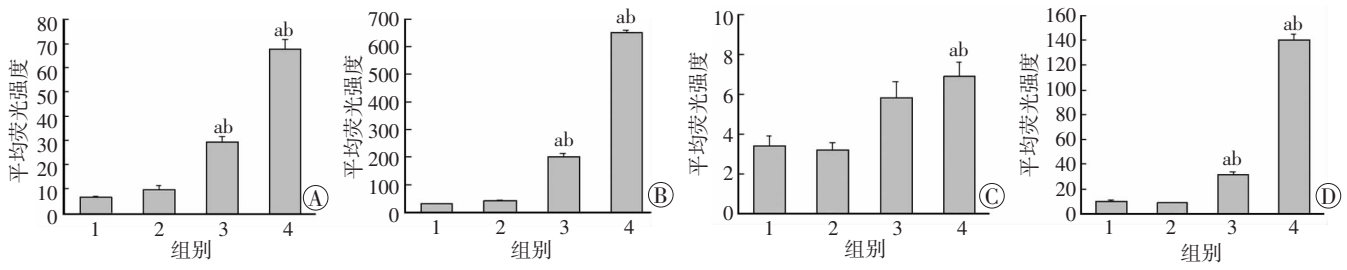
3 讨论

人口爆炸性增长和意外妊娠造成的重大健康隐患,依然是世界范围内卫生组织面临的重要问题,避孕疫苗具有满足理想避孕措施的绝大部分要求的特点[3]。免疫避孕疫苗被认为是最具前景的避孕方法。研究表明,FSHR 具有特异性表达于生殖系统和调节生殖功能的两大特点,是避孕疫苗的潜在靶点。FSHR 是仅表达于睾丸支持细胞上的卵泡刺激素(FSH)受体,属糖蛋白类家族,FSH 与其结合后发挥作用,在青春发育期促进睾丸的发育,决定睾丸容量大小;在成年男性中则是维持精子发生的关键因素[4]。阎萍等[4]利用 FSHR 胞外段蛋白 FSHR140 免疫小鼠,验证了其避孕作用,但同时生殖系统也受到严重损害。虽然 FSH/FSHR 调控精子生成的作用机制尚不明确,但已知支持细胞可以分泌雄激素结合蛋白与睾酮结合,接收睾酮的调控,合成和分泌各种信号物质维持生精细胞分化的合适环境[5]。另外睾丸支持细胞是组成血睾屏障的重要组成部分,防止精子作为自身和外来性抗原进入血管,避免发生自身免疫性睾丸炎。

杨利华等[6]从 FSHR 胞外区蛋白上筛选出的 B-细胞表位肽 $FSHR_{32-44}$,明显减少了生殖系统的病理损害,维持了血睾屏障的完整,并可诱导低滴度的血清抗 FSHR 抗体的,但由于表位疫苗自身存在免疫原性差的特点,且传统的弗氏佐剂不能用于人体。因此我们在此基础上尝试利用纳米递送系统,直接将抗原直接靶向抗原呈递细胞,以提高免疫效应。

$FSHR_{32-44}$ 为疏水性的多肽难以在水中溶解、分散,易以团聚状态存在的特点使其难以被抗原呈递细胞摄取。本实验表明单乳-有机溶剂挥发法能有效制备出理想粒径的 FSHR/PLGA NP,并克服了包裹多肽和蛋白类药物包封率的困难,取得了(62.71±2.83)%的包封率。高效的包封率是纳米疫苗制备成功的标志,但其稳定的理化特性则是能否成功诱导免疫反应的关键因素。体外释放试验显示,FSHR/PLGA NP 存在两个释放平台,即突释和缓释;24 h 内存在明显的突释特点,可能与部分抗原吸附于 PLGA 纳米粒子表面有关;但其在随后的观察过程中显示出典型的缓释特征,30 d 内均有 FSHR 多肽的小剂量缓慢释放,30 d 总的释放量可达达到98.3%。缓释是 FSHR/PLGA 纳米疫苗的一个优势,突释有类似于初次免疫的作用,而缓释则可以持续释放抗原,长期低剂量抗原的持续刺激更适合诱导高滴定度抗体的产生。

激光共聚焦观察的吞噬实验证明将 FSHR 多肽包裹进 PLGA 材料中,形成大小、粒径均匀的纳米粒,相较于可溶性抗原更易于被 DCs 细胞摄取。有研究表明,粒子的形态、大小、几何形状均可影响 DCs 的吞噬



A~D:分别为 CD40、CD86、CD83、MHC-Ⅱ表达的平均荧光强度 1:PBS 组;2:FSHR 多肽组;3:PLGA NP 组;4:FSHR/PLGA NP 组;a:$P<0.05$,与 PBS 组比较;b:$P<0.05$,与 FSHR 多肽组比较

图4 不同抗原刺激后的 DCs 表型变化 ($n=3$)

能力,直径100~300 nm、形态规整、大小均匀的纳米粒最易于被DCs吞噬[7]。而且DCs吞噬NP具有典型的时间和剂量依赖的特征,各实验组与对照组相比较有显著的统计学差异。这与其他研究者在兔结膜上皮细胞系[8]和肿瘤细胞细胞系[9]中的研究结果相符。纳米化抗原被吞噬后往往直接进入内吞小体途径,生物材料的保护既可以避免抗原被细胞内的各种活性酶降解,PLGA材料本身也具有免疫佐剂的作用[10-12]。而多肽类抗原进入DCs后常常在蛋白酶的作用下继续分解为更小的寡肽片段或者氨基酸进入细胞再循环,从而丧失诱导免疫能力。

将抗原直接靶向抗原呈递细胞为纳米递送系统的研究提供了新的思路,也已经在肿瘤研究领域取得了令人兴奋的结果。直接将肿瘤抗原靶向DCs可以促进DCs的活化,提高黏附分子、共刺激分子,以及MHC-Ⅱ分子的表达,进而诱导产生大量CTL细胞和炎症因子,提高细胞免疫和体液免疫应答杀死肿瘤[13-14]。同时,也有研究表明纳米疫苗也可以明显提高抗体应答[15],PLGA NP进入抗原呈递细胞后,在溶酶体内缓慢降解释放出抗原,直接与MHC-Ⅱ分子结合转运至细胞表面,与天然淋巴细胞结合后诱导其向Th2方向分化,从而辅助B淋巴细胞产生高的抗体滴度。我们随后的研究结果显示,FSHR/PLGA NP被DCs吞噬48 h后明显上调细胞表面黏附分子和共刺激分子表达,以及MHC-Ⅱ分子等功能性分子的表达,与对照组和单纯性多肽组相比有明显的统计学差异。FSHR多肽为线性表位肽,氨基酸序列少,缺乏空间结构,免疫原性弱;本实验从细胞水平验证了这点,与之前杨利华等[2]体内实验结果相吻合。单独的FSHR多肽无诱导DCs成熟的能力,作用与PBS组相仿;而PLGA包载的FSHR NP具有强大的诱导DCs成熟能力,也明显强于单独PLGA NP组。我们推测这可能与多肽抗原和材料相结合后,形成了类似于完全抗原复合物的结构,显著增强了其诱导免疫的能力。而且PLGA材料是高分子有机化合物,其降解后产物为弱酸性,可以进一步刺激细胞释放炎症因子,并使得抗原呈递细胞易于将其作为外来危险信号进行识别和应答。

总之,PLGA材料包裹FSHR多肽具有高效的包封率,能促进DCs对抗原的吞噬,有较强诱导DCs成熟的能力,是作为包载FSHR多肽可选高分子材料。本实验也存在一定的局限性:体外实验条件单纯,影响因素较小等。本实验初步分析了PLGA材料作为避孕载体的可行性,具体对DCs功能的影响以及避孕疫苗的作用还需要进一步在体内进行验证。

参考文献:

[1] Naz R K, Rowan S. Update on male Contraception[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2009, 21(3): 265-269.
[2] Yang L H, Li J T, Yan P, *et al*. Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR)-derived peptide vaccine induced infertility in mice without pathological effect on reproductive organs[J]. Reprod Fertil Dev, 2011, 23(4): 544-550.
[3] Naz R K. Recent progress toward development of vaccines against conception [J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 13(1): 145-154.
[4] 阎萍, 申子刚, 何畏, 等. FSHR胞外区基因片段的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(4): 374-377, 381.
[5] Pfitzner E, Kliem S, Baus D, *et al*. The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases[J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(23): 2839-2850.
[6] 杨利华,李晋涛,梁志清,等. 卵泡刺激素受体($FSHR_{32-44}$)肽疫苗对雄性小鼠生殖器官影响[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(9): 779-782.
[7] Sahay G, Alakhova D Y, Kabanov A V. Endocytosis of nanomedicines[J]. J Control Release, 2010, 145(3): 182-195.
[8] Qaddoumi M G, Ueda H, Yang J, *et al*. The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers[J]. Pharm Res, 2004, 21(4): 641-648.
[9] Witten K G, Ruff J, Mohr A, *et al*. Cellular uptake of fluorophore-labeled glyco-DNA-gold nanoparticles [J]. J Nanopart Res, 2013, 15(10): 1992.
[10] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(3): 329-347.
[11] Oyewumi M O, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses [J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(9): 1095-1107.
[12] Hamdy S, Haddadi A, Hung R W, *et al*. Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(10/11): 943-955.
[13] Joshi M D, Unger W J, Storm G, *et al*. Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers[J]. J Control Release, 2012, 161(1): 25-37.
[14] Unger W W, Van-Beelen A J, Bruijns S C, *et al*. Glycan-modified liposomes boost $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell responses by targeting DC-SIGN on dendritic cells[J]. J Control Release, 2012, 160(1): 88-95.
[15] Caminschi I, Shortman K. Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells[J]. Trends Immunol, 2012, 33(2): 71-77.

(**收稿**:2014-08-27;**修回**:2014-10-14)
(编辑 吴培红)