

CD11c 免疫脂质体的制备及其体外树突状细胞靶向性

万 展^{1,2△}, 周 剑^{1,2△}, 殷 萌², 马志强², 韩美娜², 杨 峰^{2*}

1. 河北北方学院基础医学院, 张家口 075000

2. 第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的 制备 CD11c 单抗修饰的免疫脂质体并进行表征, 验证其体外对树突状细胞(dendritic cells, DCs)的特异靶向性。方法 采用薄膜分散法制备脂质体, 通过化学交联法将 CD11c 单抗连接于脂质体上, 利用高效液相色谱测定 CD11c 与脂质体的连接率, 透射电镜观察脂质体形态, 激光粒度测定仪测定粒径和 Zeta 电势, 流式细胞仪检测脂质体上连接 CD11c 的活性和对 DCs 的靶向效果, 激光共聚焦显微镜观察该免疫脂质体特异性靶向特点。结果 成功制备了 CD11c 免疫脂质体, 测得单抗连接率为 $(77.6 \pm 3.2)\%$, 平均粒径为 (151.2 ± 1.6) nm, Zeta 电位为 (-32.0 ± 1.8) mV。电镜下脂质体粒径均匀, 表面光滑, 多为圆形, 少许椭圆形, 无粘连。CD11c 单抗连接于脂质体仍保持了良好的活性, 体外表现出显著的 DCs 特异靶向性。结论 制备的 CD11c 免疫脂质体对 DCs 细胞具有特异靶向性。

[关键词] CD11c 抗原; 脂质体; 树突状细胞; 靶向

[中图分类号] R 943.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0628-05

Preparation of CD11c modified immunoliposome and validation of its targeting to dendritic cells

WAN Zhan^{1,2△}, ZHOU Jian^{1,2△}, YIN Meng², MA Zhi-qiang², HAN Mei-na², YANG Feng^{2*}

1. School of Basic Medical Sciences, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

2. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To prepare and characterize liposome with mAb(CD11c-impliposomes) and to validate its targeting to dendritic cells (DCs) *in vitro*. **Methods** Liposomes were prepared by film dispersion method, and CD11c mAb was collected to the surface of liposome by chemical cross-linking method. The conjugation efficiency of CD11c mAb to the liposome was determined by HPLC; the morphology of CD11c-impliposomes was observed under transmission electron microscope; the particle size and Zeta potential were determined by dynamic light-scattering; the activity of CD11c mAb was examined by flow cytometry; and its specific targeting to DCs was visualized by laser scanning confocal microscopy. **Results** The CD11c-impliposomes were successfully prepared and the conjugation efficiency was $(77.6 \pm 3.2)\%$, with the particle size being (151.2 ± 1.6) nm and the Zeta potential being (-32.0 ± 1.8) mV. Under microscope, the CD11c-impliposomes were mostly round in shape or elliptical, with smooth surface and with no adhesion. The activity of CD11c-impliposomes was still satisfactory and demonstrated great targeting to DCs *in vitro*. **Conclusion** The CD11c-impliposomes prepared by us has targeting ability to DCs *in vitro*.

[Key words] CD11c antigens; liposomes; dendritic cells; target

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6):628-632]

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是体内功能最强的专职抗原提呈细胞, 在免疫系统对抗原的捕获、处理及提呈过程中居于中心地位^[1], 它能同时激发初始性和获得性免疫应答, 由于在机体的抗感染免疫及

抗肿瘤免疫应答中的作用极其重要而成为近年来免疫学研究的热点^[2-3]。CD11c 是相对分子质量为 150 000 的 $\beta 2$ 整合素家族成员, 是确定的 DCs 特异性表面标记物之一^[4-5], 在小鼠骨髓系和淋巴系 DCs, 包

[收稿日期] 2013-01-06

[接受日期] 2013-03-29

[基金项目] 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(egd09014), 第二军医大学专项基金(12Js07)。Supported by Special Funds of Shanghai for Cultivation and Selection of Excellent Young Teachers for Higher Education (egd09014) and Special Fund of Second Military Medical University (12Js07)。

[作者简介] 万 展, 硕士生。E-mail: 345110356@qq.com; 周 剑, 硕士生。E-mail: ernest_zhou2008@163.com

△ 共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871220, E-mail: yangfeng1008@126.com

括 DCs 前体、未成熟 DCs(iDCs)和成熟的 DCs(mDCs)均有较高的表达^[6]。已有研究表明,CD11c 作为 DCs 表面的免疫靶标,通过其靶向性药物递送系统可以提高 DCs 对抗原的内吞和有效提呈,促进抗原特异性的体液和细胞免疫应答的产生^[7-10]。

脂质体(liposomes)是由磷脂双分子层构成,结构与细胞膜相似,它具有携带量大、保护被封装药物免遭降解,易与生物膜融合、缓释、减少用药剂量等特点,已作为一种新型的药物载体得到广泛应用。脂质体同时存在转染效率低、靶向性差等问题^[11-12]。因此,采用化学交联技术将单克隆抗体与脂质体表面结合,利用单克隆抗体的特异靶向性将脂质体及其包裹的药物或抗原特异靶向靶细胞,是提高脂质体靶向性和转染效率的有效方法。利用针对 DCs 表面 CD11c 分子的单克隆抗体制备的免疫脂质体,有望通过膜融合和内吞等作用机制,提高脂质体递送效率,进而激发更有效的免疫应答,为后期脂质体载药靶向于 DCs 细胞提供了新方法。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄,上海斯莱克实验动物有限公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、小鼠重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(mGM-CSF)、小鼠白介素 4(IL-4,购自 Gibco 公司);红细胞裂解液(Tris-NH₄Cl,自行配制);荧光标记的抗小鼠单克隆抗体 APC-CD11c、FITC-CD19(eBioscience 公司);2-亚氨基硫烷盐酸盐(2-IT)、胆固醇(CHO)、脂多糖(LPS,购自 Sigma 公司);氢化蛋黄卵磷脂(EPC-3)、甲氧基聚乙二醇 2000-二硬脂酰甘油磷脂酰乙醇胺(mPEG₂₀₀₀-DSPE,购自 Lipoid 公司);马来酰亚胺-甲氧基聚乙二醇 2000-二硬脂酰甘油磷脂酰乙醇胺(Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE,购自 Creative 公司);200、100 nm 聚碳酸酯膜,LF-1 薄膜挤出器(Avestin 公司)。Leica TCS SP2 共聚焦显微镜(Leica 公司);流式细胞仪(BD 公司);HITACHI-7000 型透射电镜(Hitachi 公司);Zeta Sizer Nano ZS 激光粒度分析仪(Malvern 公司);SephacoreCL-4B,AKTA prime plus 蛋白纯化仪(GE 公司);L-2000 高效液相色谱仪(Hitachi 公司);超速离心机(Hitachi 公司)。

1.2 DCs 的体外培养和成熟 脱颈处死 C57BL/6 小鼠,无菌取股骨和胫骨,用 RPMI 1640 培养基冲洗骨髓腔,收集细胞悬液离心,离心后用红细胞裂解液裂解再次离心,加入含 mGM-CSF(10 ng/mL)、

mIL-4(1 ng/mL)、10% FBS 的 RPMI 1640 培养液,铺种于 6 孔板中,置于 37℃、5%CO₂ 孵育箱中孵育,第 3 天吸弃培养液及悬浮细胞,重新加入新鲜培养液及 mGM-CSF、mIL-4,第 5 天半量换液,于第 7 天收集悬浮细胞待用。

1.3 空白脂质体的制备 精密称量脂质体膜材料 EPC-3、CHO、mPEG₂₀₀₀-DSPE、Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE 按摩尔比为 2:1:0.008:0.002 溶于无水氯仿,倒入梨形烧瓶中减压旋转蒸发去除氯仿,加入 PBS 水化 45 min,再以薄膜挤出器分别过 200 nm、100 nm 聚碳酸酯膜控制脂质体粒径,即得空白脂质体。

1.4 CD11c 免疫脂质体制备及纯化 巯基化试剂 2-IT 与 CD11c 单抗摩尔比 100:1 混悬 0.5 h,再加入空白脂质体混悬 1 h 即可(图 1)。以 PBS(pH=7.4)缓冲液为洗脱液,将所得的混合液体经 Sepharose CL-4B 柱分离,收集流分的第一个峰即为 CD11c 免疫脂质体,同法也可制得 CD19 免疫脂质体(CD19-impliposomes)作为对照组^[13]。

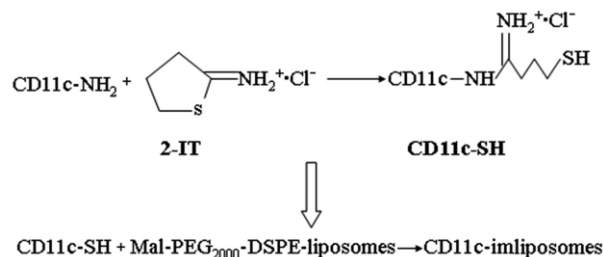


图 1 CD11c 免疫脂质体制备的示意图

Fig 1 Preparation diagram of the CD11c-impliposomes

1.5 CD11c 单克隆抗体与脂质体连接率的测定 用 APC 标记的 CD11c 单抗标准品配制成 3.125、6.25、12.5、25、50、100 μg/μL,用 HPLC 荧光检测器测量激发波长 650 nm、吸收波长 660 nm 的数值,绘制出 CD11c 的标准曲线。将 CD11c 免疫脂质体不上柱纯化,直接高速离心 $8 \times 10^4 \times g$, 4℃、20 min,吸取上清液检测荧光强度,计算出其中游离的 CD11c 的量。连接率(%)=(总 CD11c 量-游离 CD11c 量)/总 CD11c 量 $\times 100\%$ 。

1.6 空白脂质体和 CD11c 免疫脂质体粒径和电位测定 取制备的空白脂质体和 CD11c 免疫脂质体,用 Zeta Sizer Nano ZS 激光粒度分析仪进行测量。

1.7 CD11c 免疫脂质体形态观察 取上述 CD11c 免疫脂质体一滴点于反应瓷板的凹槽内,将喷炭铜网膜面朝下放于样品上,2 min 后取出铜网,用滤纸

吸干铜网边缘多余液体,按上述方法再将铜网放于染液滴(2%磷钨酸)30 s,滤纸吸干多余液体后再干燥,置于透射电镜下观察。

1.8 免疫脂质体表面连接的 CD11c 单克隆抗体活性及体外靶向效率测定 收集 DCs 铺于 6 孔板(10^5 /孔)中,分别加入 APC 染色的 CD11c 单克隆抗体、CD11c 免疫脂质体、CD19 免疫脂质体,共同孵育 4 h 后收集细胞离心,用流式细胞仪检测细胞表面荧光强度和细胞表面染色阳性百分率。检测体外靶向效率时用 CT-26 细胞(10^5 /孔)加入 CD11c 免疫脂质体作为对照。

1.9 CD11c 免疫脂质体体外靶向性的激光共聚焦显微镜观察 将 DCs 和对照组 CT-26 细胞调整密度至每孔 10^5 个,再分别加入 CD11c 免疫脂质体、CD19 免疫脂质体,于 37°C 、5% CO_2 孵育 4 h 后,收集细胞加入多聚甲醛固定 15 min,离心后 PBS 冲洗再离心,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)

染料转移至共聚焦显微镜专用培养皿中 10 min,吸水纸吸除多余染料,PBS 清洗 1 次,置于共聚焦显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 CD11c 单克隆抗体荧光强度的标准曲线及与脂质体的连接率测定 以 CD11c 单克隆抗体浓度为 x ,荧光强度为 y ,测得 APC 标记的 CD11c 单抗标准曲线方程为 $y = 42\,901x - 41\,297$ ($R^2 = 0.999\,7$),表明 CD11c 单抗在 $3.125 \sim 100\, \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度范围内与荧光数值线性关系良好,CD11c 单抗与脂质体的连接率为 $(77.6 \pm 3.2)\%$ 。

2.2 空白脂质体和 CD11c 免疫脂质体粒径和电位测定 测得空白脂质体平均粒径为 $(134.5 \pm 2.7)\text{ nm}$,Zeta 电位为 $(-37.9 \pm 1.3)\text{ mV}$ (图 2A、2B),而 CD11c 免疫脂质体平均粒径为 $(151.2 \pm 1.6)\text{ nm}$,Zeta 电位为 $(-32.0 \pm 1.8)\text{ mV}$ (图 2C、2D)。

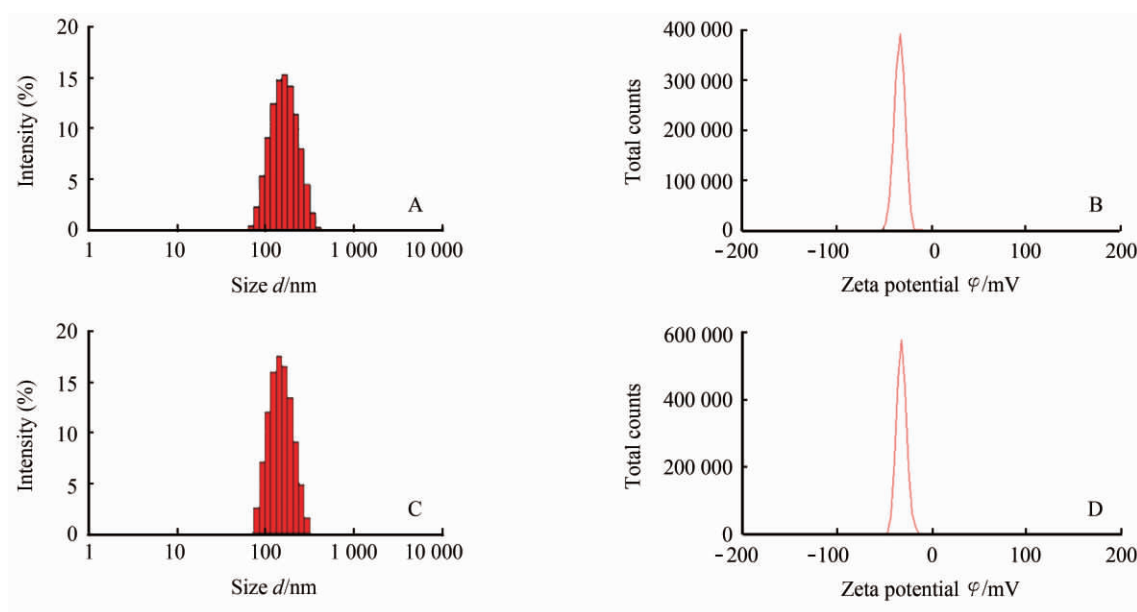


图 2 空白脂质体和 CD11c 免疫脂质体的平均粒径与 Zeta 电位

Fig 2 Particle size and Zeta potential of liposomes and CD11c-impliposomes

A,B: Liposomes; C,D: CD11c-impliposomes

2.3 透射电镜观察 CD11c 免疫脂质体形态 CD11c 免疫脂质体在肉眼观察下为淡蓝色混悬液。透射电镜观察可见粒径均匀,表面光滑,多为圆形,少许椭圆形,无粘连现象(图 3)。

2.4 免疫脂质体表面连接的 CD11c 单克隆抗体活性及体外靶向效率测定 根据流式细胞图测定结果可以看到,CD11c 单克隆抗体连接到脂质体表面后,

具有与未进行连接的 CD11c 单克隆抗体近似的结合 DCs 能力,仍然保持了特异靶向 CD11c 的活性(图 4)。根据 CD11c 免疫脂质体与 CD11c 阳性的 DCs 细胞结合后荧光染色细胞比例,可以计算出 CD11c 免疫脂质体与 CD11c 阳性的 DCs 细胞结合率为 81.4%,而作为对照的 CD19 免疫脂质体与 DCs 细胞靶向结合率仅为 1.7%,CD11c 免疫脂质

体与不表达 CD11c 分子的 CT-26 细胞的结合率仅为 2.4%, 该 CD11c 免疫脂质体表现出了特异的 DCs 靶向性(图 5)。

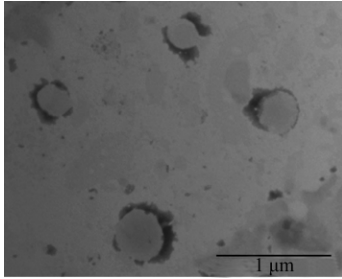


图 3 CD11c 单抗修饰的脂质体扫描电镜图
Fig 3 Transmission electron micrograph of CD11c-impliposomes

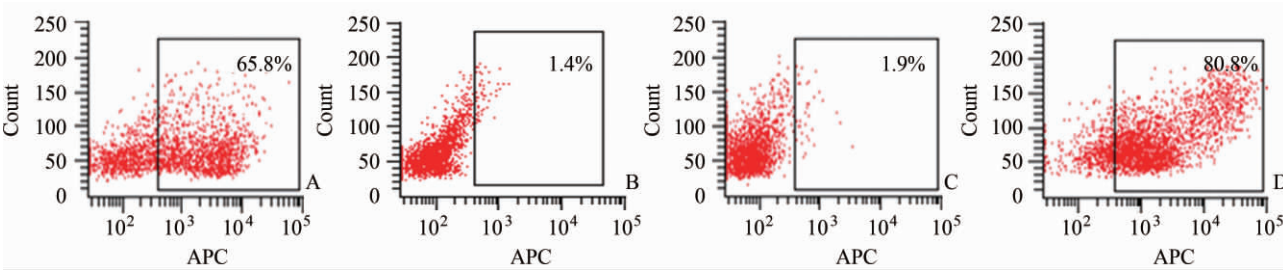


图 5 CD11c 免疫脂质体体外靶向效率

Fig 5 Targeting efficiency of CD11c-impliposomes *in vitro*

A: DCs were incubated with CD11c-impliposomes; B: DCs were incubated with CD19-impliposomes; C: CT-26 cells were incubated with CD11c-impliposomes; D: DCs were marked by CD11c mAb

2.5 CD11c 免疫脂质体体外 DCs 靶向性的激光共聚焦显微镜观察 从图 6 激光共聚焦图片我们可以观察到, DCs 细胞与 CT-26 细胞的形态差异, 在 APC 标记的 CD11c 免疫脂质体与 DCs 孵育组, DCs 细胞表面可观察到明显的红色荧光(图 6A), 而 CT-26 细胞与 APC 标记的 CD11c 免疫脂质体孵育组细胞表面无红色荧光出现(图 6C); FITC 标记的 CD19 免疫脂质体组, DCs 细胞未检测到对应荧光(图 6B)。该激光共聚焦显微镜观察结果进一步确证了 CD11c 免疫脂质体的体外 DCs 特异靶向性。

3 讨 论

脂质体在体内易被清除^[14], 在空白脂质体中加入 mPEG₂₀₀₀-DSPE, 能够增加脂质体的亲水性, 减少脂质体之间相互聚集, 维持脂质体稳定, 屏蔽内皮网状细胞吞噬系统(RES)对脂质体的识别, 延长在血循环中的时间^[15]。

目前将抗体连接到脂质体表面主要有通过氨基酸和巯基两种方法, 本研究采用先将 CD11c 抗体疏

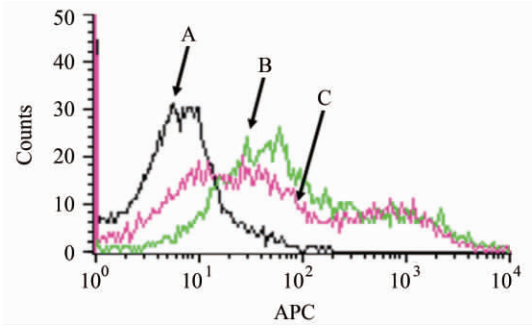


图 4 CD11c 免疫脂质体表面 CD11c 单克隆抗体活性检测

Fig 4 Activity of CD11c mAb on the surface of CD11c-impliposomes

A: Control; B: DCs were marked by CD11c mAb; C: DCs were incubated with CD11c-impliposomes

基化再与马来酰亚胺基团发生化学交联^[16], 将单抗连接到脂质体的表面。从粒径变化来看, CD11c 免疫脂质体比空白脂质体略有增大(135 nm→151 nm), Zeta 电位减小(-38 mV→-32 mV), 可能与 CD11c 单抗在 PBS 溶液中带电情况有关, 脂质体稳定性下降不明显, 符合体内实验要求。

流式细胞术检测结果证明连接在脂质体表面的 CD11c 抗体仍然拥有良好的活性, 制备出的 CD11c 免疫脂质体对 DCs 能特异性的结合, 定量的测得靶向效率为 81.4%, 而几乎不与 CT-26 细胞结合, 后者结合率仅为 2.4%, 对照组 CD19 免疫脂质体对 DCs 则没有明显结合(结合率为 1.7%), 这一结果说明 CD11c 免疫脂质体对 DCs 具有明显的特异靶向识别作用。激光共聚焦实验则定性的证实上述结果, 本实验中我们可以观察到 CD11c 免疫脂质体结合到 DCs 细胞表面的红色荧光, 而对 CT-26 细胞则看不到红色荧光出现, 作为对照组的 CD19 免疫脂质体与 DCs 共孵育未检测到绿色荧光, 说明该 CD11c 免疫脂质体与 DCs 的结合是表面修饰的

CD11c 单克隆抗体引起的,进一步证明了 CD11c 免疫脂质体对 DCs 的靶向作用具有特异性。

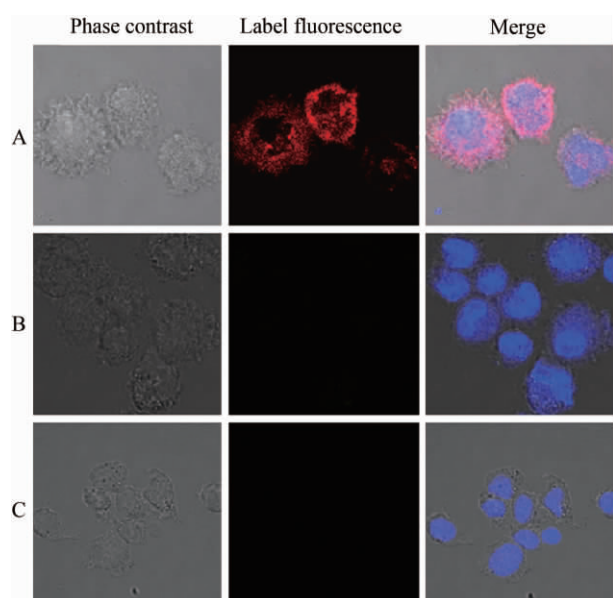


图 6 CD11c 免疫脂质体对 DCs 细胞
靶向激光共聚焦显微镜观察

Fig 6 Targeting analysis of CD11c-impliposomes to DCs
by confocal laser-scanning microscopy

A: DCs were incubated with CD11c-impliposomes; B: DCs were incubated with CD19-impliposomes; C: CT-26 cells were incubated with CD11c-impliposomes

本研究成功制备了 CD11c 单克隆抗体修饰的免疫脂质体,对其进行了表征,并通过流式细胞术和激光共聚焦显微镜观察验证了其体外对树突状细胞的靶向性,为进一步脂质体载药进行体内实验奠定了基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Gatti E, Pierre P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15: 468-473.
- [2] Steinman R M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 1-22.
- [3] Geissmann F, Manz M G, Jung S, Michael H S, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells[J]. *Science*, 2010, 327(5966): 656-661.
- [4] Steinman R M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs[J]. *Immunol Rev*, 1997, 156: 25-37.

- [5] Leenen P J, Radosevic K, Voerman J S, Salomon B, van Rooijen N, Kiatzmann D, et al. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: *in vivo* phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 2166-2173.
- [6] Harvey J E, Jones D B. Distribution of LCA protein subspecies and the cellular adhesion molecules LFA-1, ICAM-1 and p150, 95 within human foetal thymus[J]. *J Immunol*, 1990, 70: 203-209.
- [7] Faham A, Altin J G. Ag-bearing liposomes engrafted with peptides that interact with CD11c/CD18 induce potent Ag-specific and antitumor immunity[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129: 1391-1403.
- [8] Castro F V, Glennie M J. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 2263-2273.
- [9] Kurts C. CD11c: not merely a murine DC marker, but also a useful vaccination target[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 2072-2075.
- [10] van Broekhoven C L, Altin J G. Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 4357-4365.
- [11] Chang H I, Yeh M K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 49-60.
- [12] Zhang Y, Li H, Sun J, Gao J, Liu W, Li B, et al. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: a comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery[J]. *Int J Pharm*, 2010, 390: 198-207.
- [13] 汤永明, 张晶樱. CD19 单克隆抗体免疫脂质体的制备及用途: 中国, 200910100763. 2[P]. [2009-12-30].
- [14] Allen T M, Cullis P R. Drug delivery systems: entering the mainstream[J]. *Science*, 2004, 303(5665): 1818-1822.
- [15] Moghimi S M, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties[J]. *Prog Lipid Res*, 2003, 42: 463-478.
- [16] Smith B, Lyakhov I, Loomis K, Needle D, Baxa U, Yavlovich A, et al. Hyperthermia-triggered intracellular delivery of anticancer agent to HER2(+) cells by HER2-specific affibody (ZHER2-GS-Cys)-conjugated thermosensitive liposomes (HER2(+) affibodies)[J]. *J Contr Rel*, 2011, 153: 187-194.

[本文编辑] 尹 茶