

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00505

纳米化杀手肽的制备表征及抗新生隐球菌感染的实验研究

车付彬¹, 吴雁², 徐楠¹, 徐红¹, 陈江汉^{1*}

1. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003
2. 中国科学院国家纳米科学中心, 北京 100086

[摘要] **目的:**以聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)作为杀手肽(killer peptide, KP)的有效载体, 制备出对隐球菌感染疗效更佳的载药纳米粒。**方法:**采用复乳法制备杀手肽 PLGA 纳米粒, 并使用透射电镜、扫描电镜、动态光散射、测定包封率、考察体外释放等手段对其表征; 采用平板计数法验证杀手肽和杀手肽 PLGA 纳米粒对新生隐球菌 ATCC32609 的体外杀灭作用; 构建小鼠隐球菌系统感染模型, 通过生存期和重要脏器染菌量的变化比较纳米制剂同游离杀手肽的疗效变化。**结果:**成功制备出杀手肽 PLGA 纳米粒。人工合成杀手肽和杀手肽 PLGA 纳米粒均具有较强体外抗新生隐球菌 ATCC32609 作用, 与生理盐水组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 但杀手肽 PLGA 纳米粒与游离杀手肽之间比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。动物实验中, 同游离杀手肽比较, 纳米制剂使隐球菌系统感染小鼠生存期明显延长 ($P < 0.05$), 重要脏器染菌量显著下降; 纳米化杀手肽 3 mg/kg 和 5 mg/kg 剂量组同等剂量游离杀手肽组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但空白 PLGA 纳米粒同生理盐水组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:**纳米材料包裹可显著增强抗系统性隐球菌感染疗效。

[关键词] 杀手肽; 纳米技术; 新生隐球菌; 胞内感染

[中图分类号] R 978.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0505-04

Killer peptide-loaded nanoparticles: characterization and evaluation of anticryptococcal efficacy

CHE Fu-bin¹, WU Yan², XU Nan¹, XU Hong¹, CHEN Jiang-han^{1*}

1. Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. National Center for Nanoscience and Technology, Chinese Academy of Science, Beijing 100086

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare killer peptide-loaded PLGA nanoparticles which have better effect in treating systemic cryptococcosis. **Methods:** We adopted a modified double-emulsion method to prepare the killer peptide-loaded PLGA nanoparticles, and the nanoparticles were characterized by using TEM, SEM, Dynamic Laser Scattering, drug loading analysis, encapsulation efficacy assessment and *in vitro* release test. We also evaluated the antifungal activities of killer peptide and killer peptide-loaded PLGA nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* ATCC32609 by plate count method. In the *in vivo* study, the anticryptococcal efficacies of killer peptide and killer peptide-loaded PLGA nanoparticles were compared by observing the survival and colony-forming in vital organs in a systemic murine cryptococcosis model. **Results:** We successfully synthesized killer peptide-loaded PLGA nanoparticles. *In vitro* anticryptococcal test showed that the killer peptide and killer peptide-loaded PLGA nanoparticles had significantly stronger anticryptococcal effect compared with the normal saline group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the efficacies between free killer peptide and killer peptide-loaded PLGA nanoparticles ($P > 0.05$). *In vivo* test demonstrated that mice treated with killer peptide-loaded PLGA nanoparticles (3 mg/kg or 5 mg/kg) had longer survival period and less fungal burden in vital organs than mice treated with free killer peptide ($P < 0.05$); there was no significant difference in fungal burden and survival period between empty PLGA nanoparticle treated group and normal saline group ($P > 0.05$). **Conclusion:** The killer peptide-loaded PLGA nanoparticles are more effective in treating systemic murine cryptococcosis.

[KEY WORDS] killer peptide; nanotechnology; *Cryptococcus neoformans*; intracellular infection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5):505-508]

随着广谱抗菌素的大量使用, 器官移植和艾滋病患者的增多, 真菌感染的发病率逐年增加^[1], 其中

[收稿日期] 2008-08-18 **[接受日期]** 2008-12-09

[基金项目] 上海市科委纳米专项基金(05nm50010). Supported by the Nanotechnology Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(05nm50010).

[作者简介] 车付彬, 硕士. E-mail: chefubin@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885492, E-mail: chenjianghan@126.com

隐球菌引发的感染占全部真菌病的第三位,是人类健康的极大威胁。隐球菌是一种胞内兼性寄生菌,不仅可逃避巨噬细胞吞噬,即使被吞噬后也可存活于巨噬细胞内,当机体抵抗力低下时即可伺机致病,故隐球菌所致感染顽固难治且易于复发^[2-3]。

传统治疗隐球菌感染药物包括氟康唑、伊曲康唑、5-氟胞嘧啶和两性霉素 B,前三者耐药现象日趋严重,而两性霉素 B 因为毒性较大,临床应用受限。两性霉素 B 脂质体制剂虽毒性较低,但近年来也有耐药菌株的报道^[4],因此有必要加速研发新型的抗真菌药物。

杀手肽(killer peptide, KP)是近期人工合成的十肽,其序列为 AKVTMTCSAS,是一种水溶性多肽,对耐氟康唑白念珠菌、孢子菌、巴西芽生菌和新生隐球菌均具有较强杀灭作用,初步研究表明其作用靶点主要为真菌细胞壁 β 1,3-葡聚糖^[5-7]。

多肽类抗生素由于其结构及作用机制不同于传统抗真菌药物,目前耐药发生率较低,且靶点位于真菌细胞壁,因此对哺乳动物不良反应小,但多肽类药物易受到体内各种酶降解,对其包裹可能会改善疗效^[8],因此我们采用聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)作为杀手肽载体,希望制备出疗效更佳的纳米制剂。

1 材料和方法

1.1 试剂 KP(上海吉尔生化有限公司合成);Resomer RG502H PLGA(Boehringer Ingelheim 公司);聚乙烯醇(PVA)及二氯甲烷(DCM);BCA 及 Micro-BCA 试剂盒(Pierce 公司);改良沙堡培养基(自制);RMPI 1640 培养液(Sigma 公司)。

1.2 菌株及动物 新生隐球菌 ATCC32609 菌株取自长征医院皮肤科。雌性 BALB/c 小鼠体质量(20±5)g,6~8 周龄,购于中国科学院上海实验动物中心。

1.3 主要仪器 GL20 型全自动超速冷冻离心机(Hitachi 公司);Allegra X22 台式冷冻高速离心机(Beckman 公司);RVC2-25 离心浓缩仪(Christ 公司);动态光散射粒度分析仪(Brookhaven 公司);Zetasizer Nano ZS(Malvern 公司);JEM-2011 透射电子显微镜(JEOL 公司);S4800 扫描电子显微镜(Hitachi);生物安全柜(新加坡 ESCO 公司)。

1.4 杀手肽 PLGA 纳米粒的制备 采用复乳法。取 10 mg/ml KP 水溶液 0.25 ml 注入 2.5 ml PLGA DCM 溶液,用内切式匀浆机冰浴下 5 000 r/min 连续乳化 30 s 后,得到 W/O 初乳。将初乳加入到 5 ml PVA(5%质量浓度)中,10 000 r/min 乳化 45 s,得到 W/O/W 复乳。将所得复乳置于 50 ml 含有 0.3% PVA 水溶液中,于旋转蒸发器中室温减压蒸

发,除去 DCM,即得杀手肽 PLGA 纳米粒悬液。随后将纳米粒悬液于 4℃下,20 000×g 离心 45 min,上清收集另用,沉淀用蒸馏水洗 2 次(洗液收集备用)除去未包裹的游离杀手肽,纳米粒沉淀冻干后即得杀手肽 PLGA 纳米粒。

1.5 纳米粒子粒径和分散系数测定 室温条件下取纳米粒子适量,加注射用水使分散均匀,置动态光散射仪中测定载药纳米粒的粒径分布及分散系数。

1.6 纳米粒的形态观察 滴 1~2 滴纳米粒胶态混悬液于铜网上,2%磷钨酸溶液负染色,室温晾干,于透射电镜下观察纳米粒的形态并拍照;同样滴 1~2 滴纳米粒胶态混悬液于硅板上,室温晾干,置于扫描电镜下观察纳米粒形态并拍照。

1.7 包封率和载药量的测定

1.7.1 标准曲线的绘制 采用 BCA 蛋白浓度测定法^[8],先制备标准曲线:将 A 液、B 液以 1:50 混合均匀配置 BCA 工作液,按照说明书将标准 KP 溶液同 BCA 工作液混合,得到浓度为 10、20、30、40、50、0 μg/ml 的 KP 溶液。以空白溶液为对照,在 562 nm 处测定光密度 D 值。

1.7.2 回收率考察 精密配制 KP 溶液 10、30、50 mg/ml,按 1.7.1 项下条件操作,计算平均回收率。

1.7.3 精密度试验 取精密配制的 KP 溶液 10、30、50 mg/ml,按 1.7.1 项下条件操作,同一天内测定 5 次,同批连续测定 5 d。

1.7.4 包封率和载药量的计算 将纳米粒悬液置于 4℃下,20 000×g 离心 45 min,沉淀蒸馏水洗涤 2 次,收集离心上清及洗液,之后精密吸取一定量液体,采用 BCA 法测定上清中未被包裹 KP 的含量,按公式计算包封率和载药量。

1.8 杀手肽 PLGA 纳米粒的体外释放试验 选择 pH 7.4 的 PBS 为释放介质,取一定量杀手肽 PLGA 纳米粒均匀分散于 PBS 中,置于摇床,37℃下以 110 次/min,持续震摇。定时取样 1 ml,超速离心后采用 Micro-BCA 法测定浓度,并以等量 PBS 补充。

1.9 杀手肽及纳米化杀手肽体外抗隐球菌活性测定 采用平板计数法,先将 ATCC32609 菌株室温复苏,转种 2 次后用 RMPI 1640 培养液稀释至 10⁴ cfu/ml;同时配置 50 μg/ml KP 和 50 μg/ml(以纳米粒包含的杀手肽含量计)PLGA-KP 溶液备用;以生理盐水作为阴性对照,两性霉素 B 0.5 μg/ml 溶液作为阳性对照(药液、菌液均在 2 h 内使用)。取 1 ml 菌液同 1 ml 药液混合均匀,37℃孵育 24 h;吸取 0.2 ml 混合液平铺于平板,37℃孵育 48 h 后计数。

1.10 杀手肽 PLGA 纳米粒抗隐球菌感染的动物实

验 BALB/c 小鼠经腹腔注射环磷酰胺注射用水溶液 (150 mg/kg), 24 h 后尾静脉注射新生隐球菌悬液 (5×10^6 cfu, 20 g)。将新生隐球菌感染小鼠随机分为 6 组, 每组 20 只。(1) 空白对照组: 尾静脉注射生理盐水; (2) 空白 PLGA 纳米粒治疗组 (5 mg/kg); (3) 未包裹杀手肽 (3 mg/kg) 治疗组; (4) 未包裹杀手肽 (5 mg/kg) 治疗组; (5) 3 mg/kg (以纳米粒包含的杀手肽含量计) 杀手肽 PLGA 纳米粒治疗组; (6) 5 mg/kg (以纳米粒包含的杀手肽含量计) 杀手肽 PLGA 纳米粒治疗组。各组小鼠分别于感染后 1、24 和 48 h 共 3 次给药, 记录生存期。

各组于治疗第 10 天随机挑出 3 只小鼠处死, 将脑、肺、肝脏、脾、肾、心脏取出, 分别置于高压消毒好的研磨器中, 注入 0.5 ml 生理盐水, 充分研磨, 逐级稀释, 各取 0.1 ml 匀浆平铺于沙氏培养皿上, 轻轻摇动使分散均匀, 封口膜密封, 编号, 37°C 温箱中培养, 定时观察菌落生长情况并计数。

1.11 统计学处理 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 生存期分析采用 Kaplan-Meier 曲线, 全部资料的统计学分析均采用 SPSS 13.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 杀手肽 PLGA 纳米粒子电镜图 可见纳米粒表面光滑, 无残留物质黏附, 团聚颗粒较少, 颗粒均匀分布 (图 1A、1B)。

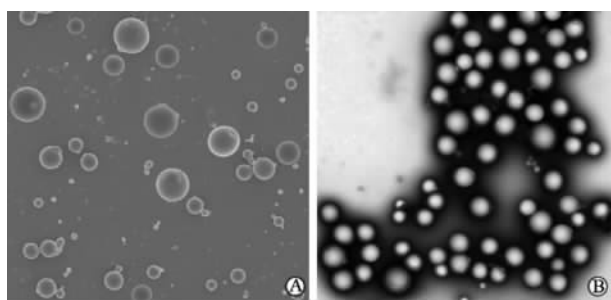


图 1 杀手肽 PLGA 纳米粒的扫描电镜图 (A) 和透射电镜图 (B)
Fig 1 SEM (A) and TEM (B) of KP nanoparticles
Original magnification: $\times 10\ 000$ (A); $\times 12\ 000$ (B)

2.2 包封率和载药量测定和释放 3 种浓度 10、30、50 mg/ml 回收率分别为 106.92%、95.68%、92.51%, 日内、日间 RSD 分别为 3.9%、1.6%、1.0% 及 7.9%、5.2%、1.9%。制得粒子包封率 53.3%, 载药量 4.3%, 粒径为 (352 ± 4) nm, 分散系数 0.135。释放曲线见图 2。由释放曲线可以看出, 释放分为 2 个时相, 第 1 天之前为突释相, 第 1 天之后为缓释相, 符合纳米药物释药特点。

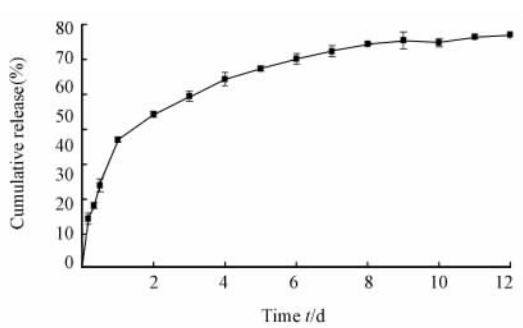


图 2 杀手肽 PLGA 纳米粒子在 37°C, pH 7.4, 110 r/min 条件下释放曲线

Fig 2 KP release from PLGA nanoparticles at 37°C for 12 d under mechanical shaking (110 r/min)
 $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 杀手肽及杀手肽纳米粒体外抗菌试验结果 杀手肽组和杀手肽 PLGA 纳米粒组平板菌落计数均显著少于生理盐水组 (*P* 值分别为 0.043 和 0.007 9), 说明其在体外均具有抗 ATCC 32609 新生隐球菌作用; 但杀手肽组和杀手肽 PLGA 纳米粒组平板菌落计数均同两性霉素 B (0.5 μg/ml) 比较差异不明显 (*P* > 0.05), 说明其在体外抗新生隐球菌 ATCC 32609 效果同两性霉素 B (0.5 μg/ml) 相当; 杀手肽组和杀手肽纳米粒组平板菌落计数差异不明显 (*P* = 0.11), 说明纳米材料包裹对杀手肽体外抗菌作用影响不大。

2.4 隐球菌系统感染动物实验结果 空白 PLGA 纳米粒组生存期带菌量同生理盐水组相比无明显差异; 同生理盐水组比较, 杀手肽和杀手肽 PLGA 纳米粒给药组带菌量明显减少 (*P* < 0.01); 同未包裹杀手肽组比较, 等量杀手肽 PLGA 纳米粒组的生存期明显延长 (*P* < 0.05), 带菌量明显减少 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见图 3、4。

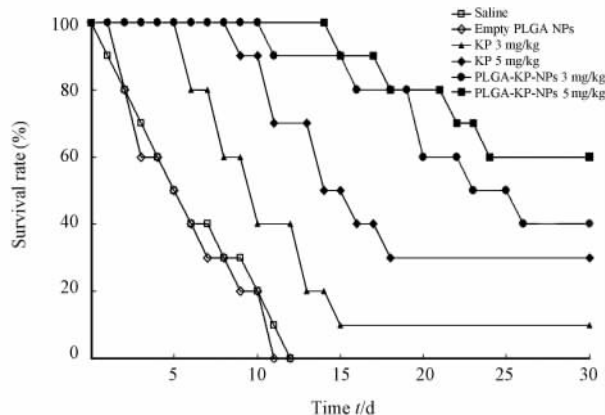


图 3 不同治疗组生存率比较

Fig 3 Survival rates of *C. neoformans* infected BALB/c mice following different treatments

Free KP vs PLGA-KP-NPs at 3 mg/kg doses (*P* = 0.031 7), free KP vs PLGA-KP-NPs at doses of 5 mg/kg (*P* = 0.001 6) and empty PLGA NPs vs saline (*P* = 0.132)

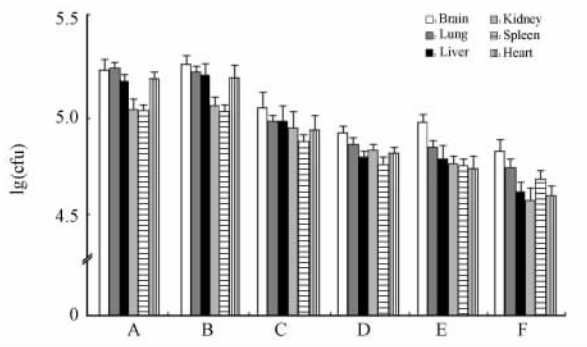


图 4 不同治疗组带菌量比较

Fig 4 Fungal burden of vital organs derived from *C. neoformans* infected BALB/c mice following different treatment

A: Saline; B: Empty PLGA NPs; C: 3 mg/kg KP; D: 5 mg/kg KP; E: PLGA-KP-NPs (3 mg/kg); F: PLGA-KP-NPs (5 mg/kg). Group C, D, E, F vs group A ($P < 0.01$); Group E vs group C ($P < 0.01$); Group F vs group D ($P < 0.05$). $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

杀手肽是一种人工合成十肽,我们采用复乳法制备杀手肽 PLGA 纳米粒,经过电镜观察、包封率、载药量测定和释放特征考察证明其理化性质符合制剂要求。将游离多肽和纳米化多肽与新生隐球菌 ATCC32609 共孵育,采用平板计数法证实两者均具有体外抗菌活性,在载药量相同情况下抗菌能力无统计学差异。说明复乳法包裹对杀手肽抗菌效应无明显影响,适合包裹多肽类药物^[10]。

体内试验中,当给予相同含量的杀手肽时,纳米剂型的疗效强于普通剂型,这可能与纳米制剂单核巨噬系统被动靶向性有关。新生隐球菌是一种兼性胞内寄生菌,即使在被吞噬后仍可存活,传统抗真菌药物难以到达细胞内部,曾有学者^[11]用 pH 值敏感脂质体包裹制霉菌素治疗系统性隐球菌感染,结果疗效显著提升,并认为脂质体的单核巨噬系统被动靶向性是疗效提升的主要原因。同脂质体制剂一样,纳米制剂也具有被动靶向性,因此可能对胞内感染的治疗更有利。

有报道称某些纳米粒子在体外可活化巨噬细胞,可能对治疗胞内感染有利;Prior 等^[12]研究发现具有 uncapped end group 的 PLGA RG502H 制成的纳米粒子对单核巨噬细胞活化作用最强, Lecaroz 等^[13]使用 PLGA RG502H 包裹庆大霉素治疗布氏杆菌所致胞内感染取得良好疗效,并通过体外实验证实 PLGA RG502H 包裹不仅能使药物进入受感染细胞内部,同时也可激活受感染单核巨噬细胞。由于新生隐球菌可以抑制免疫细胞正常功能,所以

我们采用 RG502H PLGA 来制备纳米粒子,希望能够活化受抑制的免疫细胞并进一步改善疗效,但结果显示在系统性感染小鼠模型中, RG502H PLGA 空白纳米粒组同生理盐水组比较,其疗效指标比较无统计学意义。因此在以带菌量和生存率为考察指标的情况下, RG502H PLGA 对隐球菌的胞内感染的疗效并不显著,其机制有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Mitchell T G, Perfect J R. Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans* [J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8: 515-548.
- [2] Chrétien F, Lortholary O, Kansau I, Neuville S, Gray F, Dromer F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia [J]. J Infect Dis, 2002, 186: 522-530.
- [3] Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection [J]. Infect Immun, 2000, 68: 4225-4237.
- [4] Manfredi R, Fulguro C, Sabbatani S, Legnani G, Fasulo G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoencephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS [J]. AIDS Patient Care STDS, 2006, 20: 227-232.
- [5] Fiori P L, Mattana A, Dessì D, Conti S, Magliani W, Polonelli L. *In vitro* acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57: 891-898.
- [6] Travassos L R, Silva L S, Rodrigues E G, Conti S, Salati A, Magliani W, et al. Therapeutic activity of a killer peptide against experimental paracoccidioidomycosis [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54: 956-958.
- [7] Polonelli L, Magliani W, Conti S, Bracci L, Lozzi L, Neri P, et al. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer anti-idiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis [J]. Infect Immun, 2003, 71: 6205-6212.
- [8] Pinto-Alphandary H, Andremont A, Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications [J]. Int J Antimicrob Agents, 2000, 13: 155-168.
- [9] Shihabi Z K, Dyer R D. Protein analysis with bichinchoninic acid [J]. Ann Clin Lab Sci, 1988, 18: 235-239.
- [10] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. *In vitro* drug release behavior of *D, L*-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method [J]. J Pharm Sci, 1994, 83: 727-732.
- [11] Nasti T H, Khan M A, Owais M. Enhanced efficacy of pH-sensitive nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in murine model [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57: 349-352.
- [12] Prior S, Gander B, Blarer N, Merkle H P, Subira M L, Irache J M, et al. *In vitro* phagocytosis and monocyte-macrophage activation by poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres [J]. Eur J Pharm Sci, 2002, 15: 197-207.
- [13] Lecaroz M C, Blanco-Prieto M J, Campanero M A, Salman H, Gamazo C. Poly (*D, L*-lactide-co-glycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in *Brucella melitensis*-infected mice [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51: 1185-1190.