

pH 和靶头密度对 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束在 Caco-2 细胞上摄取与外排的影响

宋晓宁¹, 李 瑞¹, 张 华¹, 代文兵¹, 何 冰¹, 郑 颖², 张 强¹, 王学清^{1*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100191; 2. 澳门大学中华医药研究院, 中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078)

摘要: 利用小肠上皮细胞顶膜侧和基底侧 pH 的差异以及新生儿 Fc 受体 (neonatal Fc receptor, FcRn) 与其配体结合的 pH 依赖特性可能增加配体修饰的纳米载体从小肠上皮细胞顶膜侧向基底侧的转运, 从而促进药物的吸收。本课题制备了靶向于 FcRn 的短肽 FcBP (IgG Fc 段结合肽, IgG Fc domain-binding peptides) 修饰的聚乙二醇-聚 ϵ -己内酯 [poly(ethyl ethylene phosphate)-co-poly(ϵ -caprolactone), PEG-PCL] 胶束并在人克隆结肠腺癌细胞 (human colon adenocarcinoma cell lines, Caco-2) 上考察了 pH 和靶头密度对胶束摄取与外排过程的影响。采用薄膜水化法制备不同靶头修饰密度的包载香豆素 6 (coumarin 6, C6) 的 PEG-PCL 主动胶束和被动胶束, 并用激光粒度测定仪测定其粒径, 透射电镜观察其形态, 流式细胞术测定各主、被动胶束在不同 pH 值下的摄取和外排以及 FcRn 在胶束摄取中的作用。结果表明, PEG-PCL 胶束的粒径约为 30 nm, FcBP 的修饰不影响胶束的粒径。pH 和靶头密度都对 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束的摄取有影响。主动胶束在 pH 6.0 的摄取量显著高于在 pH 7.4 的摄取量, 并且在两种 pH 下主动胶束的摄取量都表现出随靶头密度的增大先增大后减少的趋势。进一步研究胶束的外排表明, 胶束在 pH 6.0 下摄取后可以在 pH 7.4 环境中外排, 外排量与靶头密度有关, 其中靶头密度 10% 的主动胶束外排量最大, 显示出较强的跨膜转运递送的潜力。同时, 竞争性抑制实验验证了胶束的摄取与配体和受体的作用有关。本研究为应用 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束进行跨膜转运药物打下一定的基础, 为纳米载体的设计提供了一定的参考。

关键词: 胶束; 摄取与外排; 新生儿 Fc 受体; IgG Fc 段结合肽; pH; 靶头密度

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 08-1331-06

The effect of pH and ligand density on the endocytosis and exocytosis process of FcBP decorated PEG-PCL micelles on Caco-2 cells

SONG Xiao-ning¹, LI Rui¹, ZHANG Hua¹, DAI Wen-bing¹, HE Bing¹, ZHENG Ying²,
ZHANG Qiang¹, WANG Xue-qing^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macau 999078, China)

Abstract: The difference in pH between apical and basolateral side of intestinal epithelial and pH dependence character of the combination of FcRn (neonatal Fc receptor) and ligand might improve the delivery of hydrophobic drugs by facilitating the transcytosis of nanocarriers. Here we designed FcBP (IgG Fc domain-binding peptides) decorated coumarin 6 (C6) loaded poly(ethyl ethylene phosphate)-co-poly(ϵ -caprolactone) (PEG-PCL) micelles with different ligand densities to study the effect of pH and ligand density on the endocytosis and exocytosis

收稿日期: 2017-04-13; 修回日期: 2017-05-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473159); 国家自然科学基金-海外及港澳学者合作研究基金资助项目 (81528021).

*通讯作者 Tel/Fax: 86-10-82805935, E-mail: wangxq@bjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0358

process of micelles on human colon adenocarcinoma cell lines (Caco-2). Active micelles with different ligand densities and passive micelles were prepared using the thin-film hydration method. The size of the micelles was characterized by dynamic light scattering analysis and the morphology was observed by transmission electron microscope. The endocytosis and exocytosis of the micelles at pH 7.4 and pH 6.0, as well as the effect of FcRn on the endocytosis, were investigated by flow cytometry. The results showed that the size of micelles was about 30 nm, which was not affected by FcBP decoration. We found that pH and ligand density could both influence the endocytosis. The uptake of active micelles was higher at pH 6.0 than at pH 7.4, and an optimal ligand density of endocytosis was appeared in both pH environment. Then we proved that FcBP decorated micelles could be endocytosed at pH 6.0 and exocytosed at pH 7.4, and the exocytosis process was also related to ligand density. Micelles with 10% ligand density had the largest exocytosis, showing the potentiality to deliver drugs through the intestinal epithelial. In addition, the competitive inhibition experiments illustrated that the interaction between FcRn and FcBP were essential to endocytosis. The results will enhance the understanding on the FcBP decorated PEG-PCL micelles for transmembrane drug delivery.

Key words: micelle; endocytosis and exocytosis; neonatal Fc receptor; IgG Fc domain-binding peptide; pH; ligand density

纳米给药系统作为一种新型药物递送系统, 因其能增加难溶性药物的生物利用度已经得到了广泛关注。常见的纳米给药系统主要包括纳米乳、纳米粒、胶束、脂质体和碳纳米管等^[1]。为了进一步优化纳米给药系统的性质, 研究者们经常对纳米载体进行各种修饰, 其中主动靶向修饰是研究热点之一。主动靶向修饰是指用特定的配体修饰纳米载体, 通过配体和受体的特异性结合, 使载体可以靶向特定部位达到提高治疗效果的目的。

新生儿 Fc 受体 (neonatal Fc receptor, FcRn) 是一种肠道上高表达的受体, 主要功能是介导自然被动免疫使新生儿从母乳中获得抗体^[2]。免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 在 pH 7.4 时与 FcRn 结合能力差, 而在 pH 6 左右时和 FcRn 结合较强。与 FcRn 结合的 IgG 可以跟随 FcRn 受体转运进入循环途径或跨膜转运, 逃离溶酶体的降解, 而未与 FcRn 结合的 IgG 则会进入溶酶体降解途径^[3, 4]。这一特点极大地延长了 IgG 的血浆半衰期^[5], 为药物的长循环提供了一种新的思路。

利用小肠两侧 pH 的差异和 FcRn 与 IgG 结合的特性, 可以增加物质从小肠上皮顶侧向基底侧的转运, 促进物质的口服吸收。在十二指肠和空肠等肠段, 肠腔中 pH 呈弱酸性, 靶向 FcRn 的纳米载体可以与 FcRn 结合, 引发受体介导的内吞^[6], 在胞内的酸性转运囊泡中, 配体与 FcRn 保持结合, 进入穿细胞途径, 在小肠上皮的基底侧外排出胞, 在 pH 中性的固有层, 配体与 FcRn 解离^[7], 纳米载体可以进入体循环, 完成递送。Pridgen 等^[8]曾构建了一种靶向 FcRn 的纳米粒来促进胰岛素的口服递送, 其跨膜效率是被动纳

米粒的 10 倍。

由于 IgG 蛋白结构复杂, 分子质量太大, 作者选用短肽 FcBP 来代替 IgG。FcBP 是根据噬菌体展示技术发现的 IgG 与 FcRn 的关键结合位点的氨基酸序列筛选出来的短肽^[9]。本研究中选用的短肽是一个 13 个氨基酸组成的环肽, 编号为 SYN1327, 是 Syntonix Pharmaceuticals 公司由噬菌体筛选肽 SYN722 优化而来。FcBP 都含有一个包含高度相似的七肽序列 Gly-His-Phe-Gly-Gly-X-Tyr (X 代表一个疏水的氨基酸) 的十一元环, 由不同位置的半胱氨酸上的巯基形成二硫键成环^[10]。该序列与 IgG 的 Fc 段并无同源性, 但在 pH 6.0 下可以与 IgG 产生竞争抑制。通过对 SYN722 的优化, 在 pH 6.0 下 SYN1327 与 FcRn 的结合常数为 $31 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与 IgG 的 Fc 段相似, 而在 pH 7.4 下结合较少, 结合常数为 $170 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

由于 FcBP 和 FcRn 在不同的 pH 条件下结合不同, 并且靶头密度也是载体靶向修饰效率的一个重要影响因素^[11, 12]。为了进一步优化载体, 在本研究中, 以香豆素 6 (C6) 为疏水性药物模型, 构建了 FcBP 修饰的不同靶头密度的 PEG-PCL 主动胶束和被动胶束, 以 Caco-2 细胞模拟肠道细胞, 考察胶束在 pH 7.4 和 pH 6.0 条件下的摄取和外排的区别, 初步考察 FcRn 在胶束摄取中的作用, 为纳米载体的设计提供了一定的参考。

材料与方法

药品与试剂 mPEG₃₀₀₀-PCL₂₅₀₀ (PEG-PCL, M_w 5 500), HOOC-PEG₄₀₀₀-b-PCL₂₅₀₀ (HOOC-PEG-PCL,

M_w 6500, 加拿大 Advanced Polymer Materials 公司); *N*-羟基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、无水 DMF、无水 CH_2Cl_2 、*N,N*-二环己基碳二亚胺 (*N,N*-dicyclohexycarbodiimide, DCC) (北京百灵威科技有限公司); 香豆素-6 (coumarin-6, C6, M_w 350.43, 美国 Sigma-aldrich 公司); FcBP (序列为 RF-Pen-TGHFG-Sar-NMeLeu-YPG, M_w 1510.76, 上海强耀生物科技有限公司); *N*-甲基吗啉 (美国 Fluka 公司); 无水乙腈 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 透析袋 (MWCO 3500, 上海捷瑞生物工程有限公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 美国 Gibco 公司); Minimum essential medium (MEM, pH 7.4) 无血清培养液、细胞培养瓶、12 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司)、非必需氨基酸、 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠、0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA (北京迈晨生物科技有限公司); Hoechst 33258 (美国 Molecular Probes 公司); HCl (北京市通广精细化工公司)。

主要仪器 Nano ZS 激光粒度测定仪 (英国 Malvern Instruments 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); F-7000 荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司); JEM-200CX 型透射电子显微镜 (日本电子株式会社)。

细胞株 Caco-2 细胞购于中国典型培养物保藏中心。将 Caco-2 细胞培养于 25 cm^2 的培养瓶中。培养液为含 10% FBS、1% 非必需氨基酸、1% 青霉素和链霉素的 MEM 培养液。培养环境为 95% 相对湿度、5% CO_2 的 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱。隔天更换细胞培养液。培养细胞至细胞汇合度达 80%~90% 时用 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化传代。

FcBP-PEG-PCL 的合成 将 $\text{HOOC-PEG}_{4000}\text{-}b\text{-PCL}_{2500}$ 、NHS 和 DCC 以物质的量 1 : 1.5 : 1.5 的比例溶解于无水 CH_2Cl_2 中, 在冰浴, N_2 保护条件下搅拌 12 h 后过滤, 滤液蒸干, 产物重新溶解于 DMF 中。将与脂材物质的量相同的 FcBP 溶解于 DMF 中缓慢滴加到反应液中, *N*-甲基吗啉调节 pH 值至 8~9, 室温, N_2 保护下搅拌反应约 36 h^[13]。反应进程通过高效液相色谱法监测 FcBP 的量进行, 并计算连接率。反应产物经 50% 乙醇透析 24 h、纯水透析 24 h, 冷冻干燥。

不同靶头密度的胶束的制备 本研究以香豆素 6

(C6) 为疏水性模型药物, 采用薄膜水化法制备胶束。按表 1 标识的量, 分别取 PEG-PCL 和 FcBP-PEG-PCL 储备液 ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 于 25 mL 茄形瓶中, 加入乙腈 4 mL 完全溶解后, 加入 C6 储备液 ($100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL , 避光, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压旋转蒸发至溶剂挥尽, 得到均匀的 C6 与聚合物的混合薄膜。迅速加入预热的 PBS 2 mL, 剧烈涡旋 5 min, 使薄膜完全水化, 再超声分散至溶液澄清。 $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 除去未包载的 C6, 上层溶液即为不同靶头修饰密度的载 C6 胶束^[14]。分别标示为 0%-M、0.5%-M、1%-M、1.5%-M、2%-M、2.5%-M、5%-M、10%-M 和 15%-M。

胶束的粒径测定与形态观察 用动态光散射法测定各种胶束的粒径及粒度分布。设定粒度测定仪的激光波长为 633 nm, 入射光与散射光束的夹角为 90° , 测定温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。采用醋酸双氧铀负染法, 用透射电子显微镜观察胶束的形态, 加速电压为 160 kV。

pH 对细胞活性及胶束稳定性的影响 pH 对细胞活性的影响采用磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 方法测定。pH 对胶束稳定性的影响采用 HPLC 测定^[13]。将包载香豆素 6 的被动胶束 0%-M 和最大靶头密度修饰的主动胶束 15%-M 分别用 pH 7.4 和 pH 6.0 的 MEM 稀释后置于截留分子质量 12 000~14 000 的透析袋中, 分别置于 pH 7.4 和 pH 6.0 的释放介质中, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 在摇床中振摇, 在 0.5、1、2 和 4 h 取样并用 HPLC 法测定释放介质中的香豆素含量, 计算香豆素释放的比例。

pH 对不同靶头密度修饰的胶束摄取的影响 将 Caco-2 细胞接种于 12 孔板, 待细胞汇合度达 80% 左右, 吸尽培养液, 用 PBS 洗 3 次。加入用无血清 MEM (pH 7.4) 稀释的胶束溶液 (C6 的终质量浓度均为 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。然后用冰冷 PBS 清洗终止摄取, 细胞消化后离心洗去黏附在细胞上的胶束。用流式细胞仪检测细胞内摄取 C6 的荧光强度。空白培养液作为空白对照。在 pH 6.0 组中, 预先用 HCl 将稀释胶束的无血清 MEM 调节 pH 至 6.0, C6 的终质量浓度也为 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。其余操作步骤同 pH 7.4。

胶束的外排 设摄取组、外排组和对照组。将 Caco-2 细胞接种于 12 孔板中, 待细胞汇合度达 80% 左右, 吸尽培养液, 用 PBS 洗 3 次。摄取组各孔加

Table 1 The amount of PEG-PCL and FcBP-PEG-PCL in micelles with different FcBP content. FcBP: IgG Fc domain-binding peptide

Micelle	0%-M	0.5%-M	1%-M	1.5%-M	2%-M	2.5%-M	5%-M	10%-M	15%-M
PEG-PCL/mg	4	3.97	3.94	3.91	3.89	3.86	3.71	3.43	3.14
FcBP-PEG-PCL/ μL	0	30	60	90	110	140	290	570	860

入 pH 6.0 的胶束溶液 (C6 的终质量浓度均为 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37°C 孵育 1 h。用冰冷 PBS 清洗终止摄取, 用流式细胞术进行检测, 步骤同上。外排组在 37°C 下与胶束 (pH 6.0, C6 的终质量浓度均为 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 孵育 1 h 后, 再加入完全培养液 (pH 7.4), 37°C 孵育 1 h。之后弃去培养液, 用 PBS 洗 3 次, 用流式细胞术进行检测。对照组仅加无血清 MEM 培养液。外排组测得的荧光值为胞内剩余量 (remain), 摄取组测得的荧光值减去外排组测得的荧光值得到外排量 (exocytosis)。各组以 0%-M 为参照, 归一化后得到相对胞内剩余量和相对外排量。

FcRn 在胶束摄取中的作用 将 Caco-2 细胞接种于 12 孔板中, 待细胞汇合度达 80% 左右, 吸尽培养液, 用 PBS 洗 3 次。共设 4 组: 空白对照组、0%-M 组、10%-M 组和 FcRn 预饱和的 10%-M 组。0%-M 组和 10%-M 组分别直接加入 0%-M 或 10%-M 溶液 (pH 7.4, C6 的终质量浓度均为 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 于 37°C 下孵育 0.5 h。FcRn 受体预饱和组先与 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FcBP 溶液 (大于胶束中含有 FcBP 浓度的 500 倍) 37°C 下预孵育 0.5 h, 吸出后加入含有相同浓度 FcBP 的 10%-M 溶液 (pH 7.4, C6 的终质量浓度均为 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 再孵育 0.5 h。空白对照组仅加无血清 MEM。孵育完成后弃去培养液, 用 PBS 洗 3 次, 用流式细胞术进行检测。

统计学分析 应用 GraphPad Prism 6.0 软件包进行统计学处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数间比较采用单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差别有统计学意义。

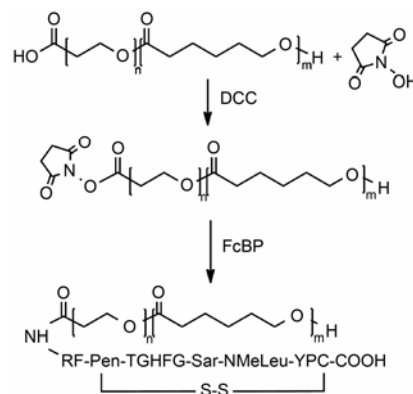
结果与讨论

1 FcBP-PEG-PCL 的合成

FcBP-PEG-PCL 合成见合成路线 1 所示, 反应进程用高效液相色谱法进行监测。36 h 时反应结束。通过计算 FcBP 连接率为 70.1%。未参与反应的 NHS-PEG-PCL 在后续透析过程中, 可以被水解形成 PEG-PCL 而参与胶束的自组装, 所以产物无需进一步纯化。

2 胶束的粒径与形态

按照表 1 的处方量制备不同靶头密度 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束, 其粒径及粒径分布结果见图 1。结果显示胶束的粒径均在 $30\sim 40 \text{ nm}$ 左右, PDI 均小于 0.25, 粒径分布均匀, 即 FcBP 的修饰不影响粒径分布, 主动胶束组和被动胶束组对照良好。选择 0%-M 和 10%-M 进行透射电镜拍摄, 如图 2 所示, 主、被动胶束均呈圆形, 粒径大小与动态光散射测定结果相符。



Scheme 1 Synthetic route for FcBP-PEG-PCL. One-letter code is used for the amino acids except for Pen (*L*-penicillamine), NmeLeu (*L*-*N*-methylleucine), Sar (sarcosine). Pen and Cys are connected by a disulfide bridge

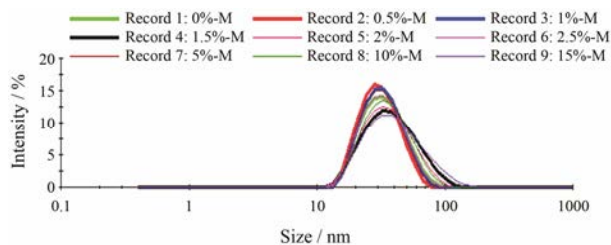


Figure 1 Particle size distribution of micelles measured by dynamic light scattering (DLS)

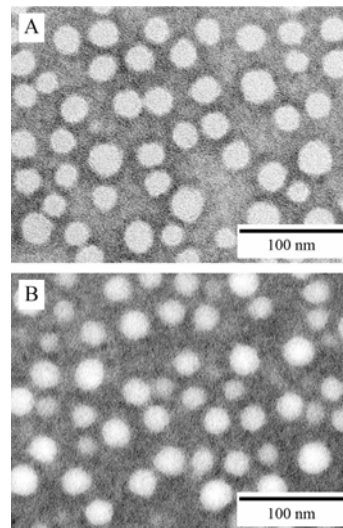


Figure 2 Transmission electron microscopy (TEM) image of 0%-M (A) and 10%-M (B) stained with 1% uranyl acetate and examined by electron microscopy

3 pH 对细胞活性和胶束稳定性的影响

首先考察了 pH 对细胞活性以及胶束稳定性的影响。结果表明, 在 pH 6.0 条件下孵育 4 h, 细胞的活性与 pH 7.4 条件下无明显改变 (文中未显示), 说明在不同 pH 条件下摄取的差异不是由细胞状态的不同引起的, 即实验的可比性良好。主被动胶束在不同 pH

条件下的稳定性如图 3 所示, 胶束在 4 h 内释放量小于 0.4%, 在 2 h 内释放量小于 0.1%, 可见胶束在两个 pH 条件下都稳定, 并且荧光染料的包载情况较好, 荧光染料的强度可以代表细胞中胶束的量。

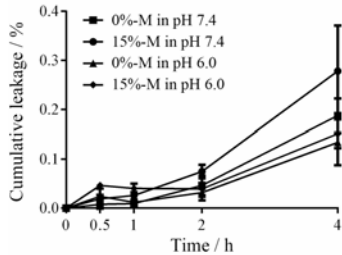


Figure 3 Cumulative leakage of 0%-M and 15%-M in pH 7.4 and pH 6.0. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

4 pH 对不同靶头密度修饰的胶束摄取的影响

在 pH 7.4 环境中胶束摄取的结果如图 4A 所示。结果表明, 各主动组的摄取量较被动组均有提升, 且摄取量随着 FcBP 修饰密度的增大呈现先增大后减小的趋势, 其中 5%-M 组相对摄取量最大, 为被动组的 171%。

由文献^[10]报道可知, FcRn 介导的内吞与 pH 相关, 当 pH 为 6.0~6.5 时, 受体与配体的亲和力增强, 当 $\text{pH} \geq 7$ 时, 受体与配体容易发生解离。本研究进一步考察了在 pH 6.0 条件下的主、被动胶束的摄取差异。pH 7.4 时的摄取结果可知, 在 FcBP 修饰密度达到 5% 前摄取量与修饰密度的关系呈正相关。为了简化实验, 在 pH 6.0 条件下实验低于 5% 的 FcBP 修饰密度的胶束仅选择了 2%, 即 pH 6.0 条件下的摄取实验仅选用了 0%-M、2%-M、5%-M、10%-M 和 15%-M。

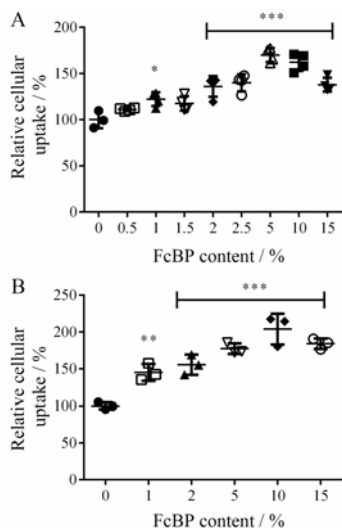


Figure 4 Flow cytometry result of micelles uptaken by Caco-2 cells at pH 7.4 (A) and pH 6.0 (B). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0%-M group

胶束在 pH 6.0 环境中的摄取结果如图 4B 所示。与 pH 7.4 条件下结果相同, 各主动组的摄取量均有提升, 且摄取量随着 FcBP 修饰密度变化的趋势为先增大后减小。类似的结果在其他研究中也有报道, 如 Yu 等^[15]发现转铁蛋白修饰的金纳米粒的入脑量也有着随着靶头密度的增大先增大后减少的现象。结合文献^[12]报道推测可能是过多的 FcBP 修饰, 造成空间位阻, 影响了胶束上的配体与受体的结合, 或产生多个配体同时竞争 1 个受体的情况。

在 pH 6.0 条件下胶束的摄取与 pH 7.4 条件下的摄取也有不同: ① 前者相对摄取量最大的为 10%-M, 而后者为 5%-M。推测 FcBP 在不同 pH 条件下与 FcRn 的亲和力不同是引起胶束最佳靶头密度不同的主要原因^[16]; ② pH 6.0 下的主动摄取量提升幅度更大, 推测这可能与 FcRn 的作用机制有关。在 pH 6.0 环境下, FcBP 与 FcRn 结合力强, 可能会引起更多的内吞, 而在胶束通过循环途径出胞时, FcBP 在胞外不能像在 pH 7.4 条件下一样与 FcRn 解离使胶束外排, 可能会引起更高的胞内滞留。

5 胶束的外排

采用流式细胞术对主、被动胶束经 Caco-2 细胞摄取后的外排情况进行分析。在本实验中, Caco-2 细胞是 pH 6.0 条件下摄取胶束, 在 pH 7.4 条件下外排。图 5A 为外排结束后胞内胶束剩余量, 图 5B 为计算得到的外排量。结果显示, 在 pH 7.4 条件下外排 1 h 后细胞内的滞留量有明显下降。说明胶束可以在 pH 6.0 环境下被摄取后, 在 pH 7.4 下被释放。这符合胃肠道的转运规律, 胶束可以在胃肠道一侧被摄取 (pH 6.0)^[17,18]并在血液中释放 (pH 7.4), 可见 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束有口服药物递送的潜力。

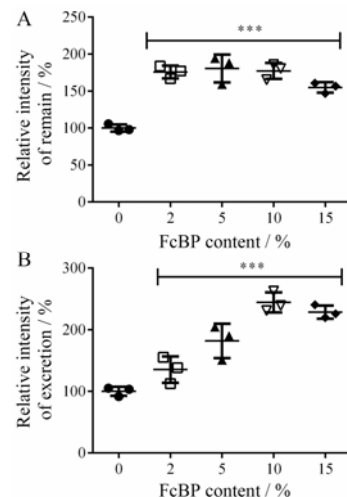


Figure 5 Relative intensity of remain (A) and excretion (B) in excretion experiment. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs 0%-M group

但是胶束在 pH 6.0 下摄取最多的靶头密度为 10%，而经过外排后 2%-M、5%-M 和 10%-M 的滞留量没有差异，可见不同靶头密度修饰的胶束之间的外排也有一定的差异。其中 10%-M 的外排量是最大的，最有利于跨膜递送。

6 FcRn 在胶束摄取中的作用

上述结果已经表明 Caco-2 细胞对主动胶束的摄取是 pH 依赖型的，符合 FcRn 介导的摄取的特点，也提示该摄取过程是 FcRn 依赖性的。进一步采用竞争性抑制实验验证 FcBP 与受体的作用是否是 FcBP 修饰的胶束摄取量提升的原因。结果如图 6 所示，经 FcBP 预孵育的 10%-M 荧光强度较未经孵育的降低了 23.4%。验证了 FcBP 修饰的主动靶向胶束在 Caco-2 细胞上摄取的提升主要与配体和 FcRn 的作用有关。

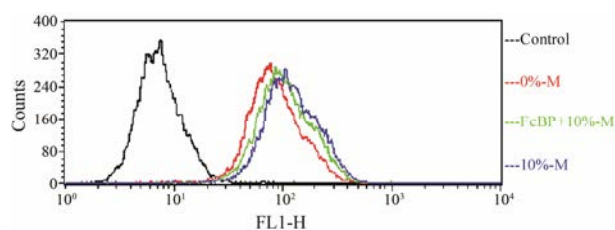


Figure 6 Competition experiment conducted using flow cytometry. Prior to uptake experiment, the competitive group (green line) was incubated with FcBP for 0.5 h. Then cells were incubated with 0%-M (red line) or 10%-M (green line and blue line) for 1 h

结论

本研究构建了 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束，通过物理包载 C6，用流式细胞术研究了 pH 和靶头密度对各胶束的摄取与外排的影响。结果表明 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束的摄取量与 pH 和靶头密度都有关。摄取量随靶头密度的增大先增加后减少，最优靶头密度与 pH 有关。同时胶束可以高效率地在 pH 6.0 进行摄取并在 pH 7.4 环境中外排，表现出跨膜转运递送的潜力。竞争性抑制研究也表明 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束的摄取与胶束和受体的结合有关。本研究为应用 FcBP 修饰的 PEG-PCL 胶束进行跨膜转运药物打下了一定的基础，跨膜部分的机制还需进一步研究。

References

[1] Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review [J]. *Nanomedicine*, 2005, 1: 193–212.
 [2] Brambell FWR. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins [J]. *Lancet*,

1966, 288: 1087–1093.

[3] Martins JP, Kennedy PJ, Santos HA, et al. A comprehensive review of the neonatal Fc receptor and its application in drug delivery [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 161: 22–39.
 [4] Sockolosky JT, Szoka FC. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 91: 109–124.
 [5] Kontermann RE. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22: 868–876.
 [6] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 715–725.
 [7] Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, et al. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC Class I-related receptor, FcRn [J]. *J Immunol*, 2004, 172: 2021–2029.
 [8] Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, et al. Transepithelial transport of Fc-targeted nanoparticles by the neonatal Fc receptor for oral delivery [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 213ra167.
 [9] Mezo AR, McDonnell KA, Castro A, et al. Structure-activity relationships of a peptide inhibitor of the human FcRn: human IgG interaction [J]. *Bioorganic Med Chem*, 2008, 16: 6394–6405.
 [10] Mezo AR, McDonnell KA, Hehir CA, et al. Reduction of IgG in nonhuman primates by a peptide antagonist of the neonatal Fc receptor FcRn [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 2337–2342.
 [11] Saul JM, Annapragada A, Natarajan JV, et al. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor *in vitro* [J]. *J Control Release*, 2003, 92: 49–67.
 [12] Elias DR, Poloukhine A, Popik V, et al. Effect of ligand density, receptor density, and nanoparticle size on cell targeting [J]. *Nanomedicine*, 2013, 9: 194–201.
 [13] Du W, Fan Y, Zheng N, et al. Transferrin receptor specific nanocarriers conjugated with functional 7 peptide for oral drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 794–806.
 [14] Li R, Song XN, Zhang H, et al. The integrity study on PEG-PCL micelles transcellular transported across MDCK epithelial cell monolayer using FRET technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1316–1324.
 [15] Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, et al. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 84ra44.
 [16] Bien-Ly N, Yu YJ, Bumbaca D, et al. Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants [J]. *J Exp Med*, 2014, 211: 233–244.
 [17] Lalezari D. Gastrointestinal pH profile in subjects with irritable bowel syndrome [J]. *Ann Gastroenterol*, 2012, 25: 333–337.
 [18] Abuhelwa AY, Foster DJR, Upton RN. A quantitative review and meta-models of the variability and factors affecting oral drug absorption-Part II: gastrointestinal transit time [J]. *AAPS J*, 2016, 18: 1322–1333.