

· 论著 ·

巨噬细胞膜杂合脂质体的制备及抗创伤弧菌溶血素 A 的作用研究

代 宇, 郭灵怡, 王宏播, 卞康晴, 俞 媛 (海军军医大学药理学系药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 以巨噬细胞膜和脂质体杂合, 制备仿生纳米载体-巨噬细胞膜杂合脂质体, 用于创伤弧菌溶血素 A(VvhA) 的清除及毒性抑制。**方法** 提取巨噬细胞膜, 通过薄膜挥发-挤出法与脂质体杂合, 构建巨噬细胞膜杂合脂质体并进行表征; 通过溶血实验和细胞毒性实验对杂合载体的体外解毒能力进行评价, 小鼠皮肤感染模型来评价载体的解毒能力。**结果** 体内外抗类毒素研究表明, 巨噬细胞膜杂合脂质体的体外抗溶血率达到 97.03%, 能够有效抑制皮下感染小鼠的皮肤溃烂, 并使腹腔感染小鼠的生存率达到 80%。**结论** 构建的巨噬细胞膜杂合脂质体对创伤弧菌外毒素 VvhA 引起的细胞及皮肤组织毒性具有良好的抑制作用。

[关键词] 创伤弧菌; 溶血素 A; 仿生纳米载体; 细菌感染

[文章编号] 2097-2024(2023)01-0026-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202207001

Preparation and anti-*Vibrio vulnificus* hemolysin A of macrophage membrane hybrid liposome

DAI Yu, GUO Lingyi, WANG Hongbo, BIAN Kangqing, YU Yuan (Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To prepare a biomimetic nano carrier macrophage membrane hybrid liposome by heterozygous macrophage membrane and liposome, which could be used for the clearance and toxicity inhibition of *Vibrio vulnificus* hemolysin A (VvhA). **Methods** Macrophage membrane was extracted and hybridized with liposome by thin-film evaporation combined extrusion method. The hybridized liposome of macrophage membrane was constructed and characterized. The in vitro detoxification ability of the hybridized vector was evaluated by hemolysis test and cytotoxicity test. The detoxification ability of the vector was evaluated by mouse skin infection model. **Results** Anti toxoid studies in vivo and in vitro showed that the anti-hemolysis rate of macrophage membrane heterozygous liposomes in vitro reached 97.03%, which could effectively inhibit the skin ulceration in subcutaneous infected mice and make the survival rate of abdominal infected mice reach 80%. **Conclusion** The constructed macrophage membrane hybrid liposome had high detoxification ability, which could provide a potential solution and research basis for the prevention and treatment of *Vibrio vulnificus* infection.

[Key words] *Vibrio vulnificus*; hemolysin A; biomimetic nanocarrier; bacterial infections

细菌感染是一类高发病率和高致死率疾病, 而细菌耐药给抗细菌感染治疗带来了严峻挑战, 预计到 2050 年, 耐药细菌感染将导致全球上千万人死亡^[1]。抗生素作为首选药物直接杀灭细菌对细菌带来“选择性压力”, 即耐药现象, 它将伴随着抗生素在临床的使用而广泛发生^[2]。因此, 亟需设计和研发新型的给药策略以改善细菌乃至耐药菌感染的预防和治疗效果。

创伤弧菌 (*Vibrio Vulnificus*), 是一种嗜盐性 G⁻菌, 广泛存在于亚热带和热带海域, 在我国浙江、福建和广东沿海海域均有分布。伤口感染后表现为皮肤坏死、筋膜炎和坏疽, 严重感染者需大面积清创甚至截肢。更加严重的会引起原发性败血症, 严重败血症患者的病死率超过了 50%^[3]。全球范围内创伤弧菌对多种抗菌药物存在不同程度的耐药性, 如在中国海域创伤弧菌对链霉素、庆大霉素和头孢唑啉的耐药性分别达 45.45%、93.94% 和 100%^[4]。研发防治创伤弧菌感染新型疗法对于控制感染具有重要意义。创伤弧菌溶血毒素 A(VvhA) 是创伤弧菌向胞外释放的唯一外毒素, 也是成孔毒素 CDC 家族中的一员, 为胆固醇依赖型成孔毒素, 是引发细胞、组织损伤的重要毒力因子。成孔毒素

[基金项目] 国家自然科学基金 (82273487); 全军医学科技青年培育计划 (21QNPPY051)

[作者简介] 代 宇, 硕士研究生, Email: m18368029712_1@163.com

[通信作者] 俞 媛, 博士, 副教授, 研究方向: 仿生纳米药物的靶向策略和疾病治疗, Email: pharmyuu@163.com

在细菌感染的发病机制中发挥了重要作用, VvhA 通过在细胞膜上低聚形成有效直径约为 1 nm 的小孔, 导致胶体渗透使细胞溶解^[5]。目前, 毒力因子靶向疗法已成为抗生素耐药感染的替代疗法。阻断毒素不仅能避免其对机体产生的严重损害并能阻碍细菌在体内的存活。这种抗毒力因子的方式并非直接杀灭细菌, 且不易发生耐药现象^[6]。体外研究已经阐明了 VvhA 对上皮细胞、脐静脉内皮细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等均具有一定的细胞毒性^[7]。Qin 等发现 VvhA 可以触发巨噬细胞 RAW264.7 的炎症反应^[8]。2013 年, Zhang 等提出“纳米海绵”的载体系统, 能有效吸附金黄色葡萄球菌的成孔毒素从而起到解毒作用^[9]。本研究将巨噬细胞膜和人工脂质体杂合, 以 VvhA 为成孔毒素模型, 制备了巨噬细胞脂质体杂合载体并进行表征, 考察巨噬细胞膜杂合脂质体的体内外解毒能力, 为进一步创伤弧菌感染的抗毒素治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验仪器和材料

胎牛血清(澳洲 EallBio 公司); RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司); DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司); 卵磷脂(艾伟拓医药科技有限公司); DSPE-mPEG2000(Laysan Bio 公司); CCK-8 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 脂质体挤出器(美国 Avanti Polar Lipids 公司); Synergy 2 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); 马尔文粒度电位仪(英国 Malvern); R206D 旋转蒸发仪(上海申生公司); H2050R-1 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪公司)。VvhA 毒素蛋白由本实验室合成。小鼠巨噬细胞 Raw 264.7; 人结肠上皮细胞(NCM460)(中科院上海细胞库); BALB/c 小鼠(雌性, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司), 动物实验经过海军军医大学实验委员会的批准, 并按照动物伦理学进行。

1.2 巨噬细胞膜杂合脂质体的制备

1.2.1 Raw 264.7 巨噬细胞培养及细胞膜提取

用 DMEM 高糖培养基, 10% FBS, 5% CO₂, 温度 37 °C 正常培养 Raw 264.7 巨噬细胞。参考文献方法提取巨噬细胞膜^[10]: 细胞刮刀获取细胞, 4 °C 预冷的 TM 缓冲液洗涤细胞 2 次并重悬细胞, 使浓度约为 2.5×10⁷ 细胞/ml。将细胞悬液置于-80 °C, 反复冻融 3 轮, 探头超声破碎细胞(5 min, 功率 44 W)得到细胞匀浆, 加入 1 mol/L 的蔗糖溶液, 4 °C 2 000 g 离心 10 min 去除细胞核和未裂解细胞, 上

清 4 °C 3 000 g 离心 30 min 以收集细胞膜。细胞膜用含有 0.25 mol/L 蔗糖的 TM-buffer 重悬液, 4 °C 3 000 g 离心 1 h 洗涤, 离心收集 PBS 重悬液, -80 °C 保存。

1.2.2 巨噬细胞膜杂合脂质体制备

采用薄膜水化-挤出法制备巨噬细胞膜杂合脂质体(MM-PLs)^[11]。将蛋黄卵磷脂(EPC)、胆固醇(CHO)和 DSPE-mPEG2000 以 4:4:1 的摩尔比用二氯甲烷溶解完全, 加入 100 ml 茄形瓶中, 室温水浴进行旋转蒸发去除二氯甲烷, 使脂质材料在茄形瓶壁中成膜, 完全去除二氯甲烷后加入适量巨噬细胞膜和纯水水化, 水化后冰浴超声 5 min, 脂质体挤出器分别连续挤出通过 400、200、100 nm 聚碳酸酯膜各 20 次以制备 MM-PLs。

对照组巨噬细胞膜囊泡(MMV)和脂质体(PLs)的制备同巨噬细胞膜杂合脂质体。将适量巨噬细胞膜悬液室温水化 1 h, 水浴超声和挤出后得到 MMVs。脂质体的制备为薄膜水化法, 材料方法同上。

1.3 巨噬细胞膜杂合脂质体的表征

马尔文粒径仪测定 MM-PLs、MMVs、PLs 的粒径和 Zeta 电位。将一定浓度的 MM-PLs 滴加到碳支持膜(铜网)上, 待晾干后再滴加醋酸铀水溶液(1%, w/v)进行负染, 透射电镜(TEM)观察形态。

1.4 巨噬细胞膜杂合脂质体体外中和毒素能力评价

1.4.1 体外溶血实验评价巨噬细胞膜杂合脂质体中和 VvhA 能力

BALB/c 小鼠(雌性 16~18 g, 6~8 周龄), 用 3% 异氟烷麻醉 2~3 min 后下颌静脉抗凝取血, 低温离心 5 min(300 g), 弃上清液后加入 PBS 重悬, 得到小鼠红细胞, PBS 稀释成 2.5% 红细胞悬液(V/V), 4 °C 保存备用。

分别取 VvhA(2 mg/ml)5、10、20、40 μg, 各加入相应量的 PBS 定容, 再加入 1 ml 2.5% 红细胞悬液混匀, 置于 37 °C 孵育 1 h, 室温离心 5 min(2 000 g)后取上清液, 1×PBS 1:1 稀释后用酶标仪测定其在 540 nm 处的 A 值(n=3)。取 40 μg VvhA, 分别加入不同 MM-PLs 的量(38、190、380、760 μg), 重复上述溶血实验(n=3), PLs 和 MMVs 作为对照组, 考察 MM-PLs 对毒素吸附的量效关系。TritonX-100 组作为阳性对照(100% 溶血), PBS 组作为阴性对照(0% 溶血)。根据以下公式对各个样品的溶血程度计算溶血率:

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照}})}{(A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}})} \times 100\%$$

1.4.2 细胞毒性实验评价载体的毒素中和效率

文献表明 VvhA 对上皮细胞有一定的细胞毒性^[7]。本实验采用结肠上皮细胞(NCM460)为细胞模型, CCK-8 法测定细胞活力, 以研究 MM-PLs 的细胞水平解毒能力。NCM460 按 5 000 个/孔接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养过夜。将 50 μ l MM-PLs、PLs、MMVs 和生理盐水分别与不同浓度的 VvhA(10、50、100、200 和 400 μ g/ml)室温孵育 3 h。而后加入 96 孔板中, 与 NCM460 在 37 °C 下共孵育 12 h。孵育完毕后每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 继续 37 °C 下孵育 1 h, 酶标仪测量 450 nm 处 OD 值, 计算细胞存活率。

1.5 巨噬细胞膜杂合脂质体动物模型解毒能力评价

1.5.1 皮肤解毒能力

取 BALB/c 小鼠(雌性, 18~20 g, 6~8 周龄) 30 只, 随机分为 5 组(生理盐水组、VvhA 组、PLs 组、MMVs 组和 MM-PLs 组)。小鼠后肢脱毛处理, 生理盐水组为阴性对照, 实验组将 80 μ g VvhA 毒素皮下注射至后肢, 再分别将生理盐水、PLs、MMVs 和 MM-PLs 在同一部位皮下注射, 观察皮肤组织的溃烂愈合情况。72 h 后处死小鼠, 取注射部位的皮肤和肌肉, 用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片后进行 H&E 染色。

1.5.2 小鼠生存率评价

取 BALB/c 小鼠(雌性, 18~20 g, 6~8 周龄) 40 只, 随机分为 4 组(VvhA 组、PLs 组、MMVs 组和 MM-PLs 组)。小鼠腹腔注射致死剂量的 VvhA(10 mg/kg), 5 min 后分别腹腔注射一定剂量的生理盐水、PLs、MMVs 和 MM-PLs。观察各组小鼠精神状态及进食情况, 并记录小鼠生存率。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.2 统计学软件进行统计

分析。统计方法采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞膜杂合脂质体的表征

MMVs 平均粒径为 120.6 nm, PLs 的平均粒径为 93.9 nm, MM-PLs 的平均粒径为 101.1 nm(图 1A), MMVs、PLs 和 MM-PLs 的分布均较窄(图 1B)。在杂合巨噬细胞膜后, MM-PLs Zeta 电位值(-22.9 mV)介于 MMVs(-10.4 mV)与 PLs(-37.7 mV)之间(图 1C)。TEM 结果显示, MM-PLs 呈规则类球形, 大小均一, 粒径约 100 nm(图 1D), 与 PLs 的形态、大小类似, 说明巨噬细胞膜的加入对脂质体的纳米微粒性质无显著影响。

2.2 巨噬细胞膜杂合脂质体体外中和毒素能力评价

2.2.1 溶血实验评价毒素的中和能力

结果显示, 40 μ g 的 VvhA 可以使 1 ml 2.5% 红细胞悬液完全溶血; 380 μ g 的 MM-PLs 几乎可以完全中和 40 μ g 的 VvhA 毒素蛋白, 抗溶血率达到 97.03%, 而 PLs 和 MMVs 组均产生溶血现象, 无中和毒素能力(图 2)。

2.2.2 体外细胞毒性研究

结果显示, 细胞活力与 VvhA 呈剂量依赖性, 与对照组相比 MM-PLs 组显著提高细胞活力, 具有一定的毒性抑制作用, 而 PLs 组和 MMVs 组也具有一定的毒素吸附能力, 但随着毒素浓度的增加, 这种毒素中和能力显著降低(图 3)。

2.3 巨噬细胞膜杂合脂质体评价体内解毒能力

2.3.1 皮肤解毒实验

结果显示(图 4), 阴性对照生理盐水组注射部位皮肤光滑完整, 阳性对照组 VvhA 组注射部位有明显的皮肤组织溃烂, MMVs 组和 PLs 组与阳性

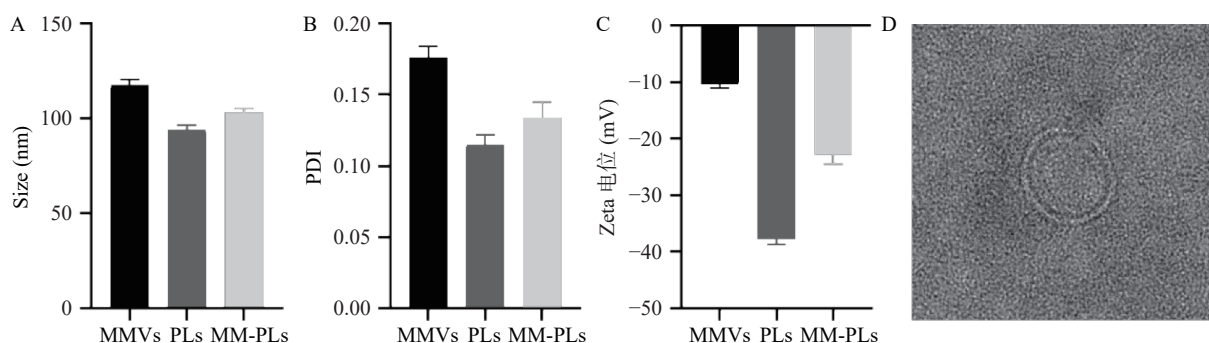


图 1 MM-PLs 的理化性质表征 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$).

A. MMVs、PLs 和 MM-PLs 的粒径; B. MMVs、PLs 和 MM-PLs 的分散系数; C. MMVs、PLs 和 MM-PLs 的电位; D. MM-PLs 的透射电镜图像。

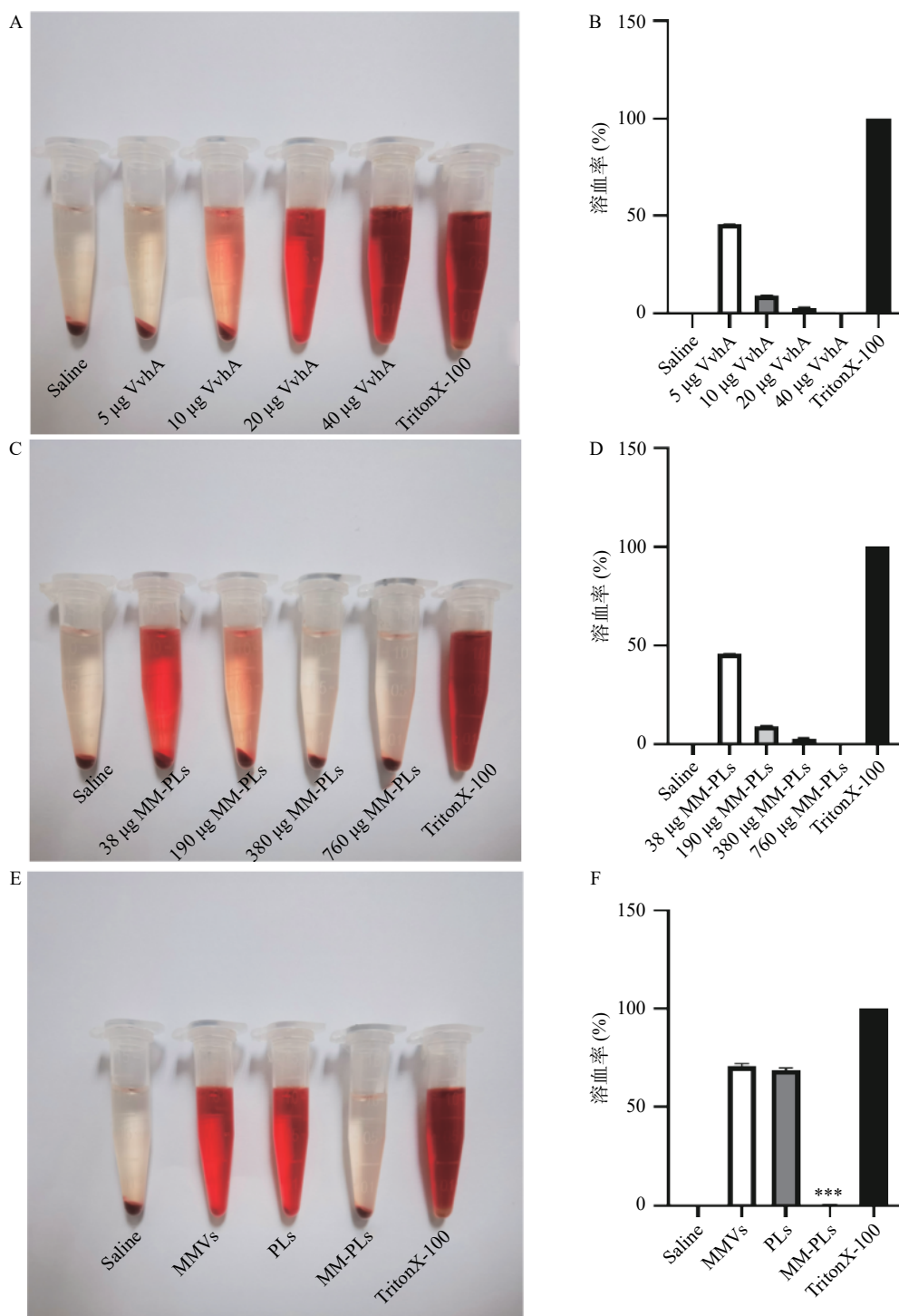


图 2 体外溶血实验 ($n=3$)

A、B: VvhA 的溶血量效关系; C、D: MM-PLs 吸附 VvhA 毒素蛋白的量效关系; E、F: MMVs、PLs 和 MM-PLs 与 VvhA 孵育后对红细胞的溶血百分比;
*** $P<0.001$, 与 MMVs、PLs 组比较。

对照组情况类似,有面积相近的皮肤溃烂;MM-PLs 组皮肤无明显损伤。H&E 染色结果表明,VvhA 组,VvhA+MMVs 组和 VvhA+PLs 组的皮肤和相邻肌肉组织结构有明显炎症细胞浸润及组织细胞坏死凋亡现象,而 VvhA+MM-PLs 组组织结构完整,无炎症浸润及凋亡发生。

2.4 VvhA 沾染小鼠生存率评价

生理盐水组、MMVs 组和 PLs 组小鼠在给予 VvhA 6 h 后陆续出现精神萎靡、被毛竖立、食欲减退、呼吸困难等症状,在注射毒素后 72 h 内陆续死亡,而 MM-PLs 组小鼠在给予毒素后 24 h 内死亡 1 只,48 h 内共死亡 2 只,其余全部存活,存活率为

80%(图 5)。巨噬细胞膜杂合脂质体有较好的中和毒素效果,对模型动物产生保护作用。

3 讨论与小结

细菌感染过程中,释放的毒力因子(如成孔毒素)对机体有较大的毒性作用^[12]。因此,中和细菌毒素能够抑制细菌的存活与繁殖,同时减少其对组织的损伤^[13]。抗毒素治疗针对细菌分泌的毒力因子,不直接对细菌产生杀伤作用,因而不产生耐药现象^[14]。不同的成孔毒素结构不一,但有相似的

细胞膜作用机制,通过与细胞膜表面的特异性受体结合,聚集形成孔道,从而改变细胞的通透性并引发毒性^[15]。本文将巨噬细胞膜与脂质体结合,既充分利用巨噬细胞作为 VvhA 毒素蛋白的天然靶点,其细胞膜具有特有的毒素捕获能结合能力,又发挥了人工脂质体扩大毒素聚集于载体膜的空间优势。PEG 修饰实现纳米载体表面“隐形”修饰,避免 RES 系统的捕获,增加循环的稳定性。所制备的杂合载体能够中和 VvhA,抵抗毒素的溶血作用和细胞毒性作用,我们也发现未经杂合的巨噬细胞膜囊泡和脂质体也有一定的抑制细胞毒性作用(一定的抗溶血性),推测巨噬细胞膜可吸附部分毒素,但无脂质有效扩大毒素的吸附空间,而有研究表明,磷脂双分子层具有蛋白质可插入特性^[16],因此脂质体也可吸附少量毒素,但是将细胞膜与脂质体杂合能有效地提高毒素的结合。文献表明, VvhA 对上皮细胞、肝脏细胞、内皮细胞均具有一定的毒性^[17],细胞毒实验结果表明所构建的杂合载体能够有效吸附并中和毒素的毒性,减少细胞毒性。而小鼠皮肤解毒、小鼠注射毒素后的生存曲线结果均表明经过杂合载体毒素的吸附结合,在体内能够很好的中和 VvhA 毒性,对动物具有抵抗类毒素的保护作用。

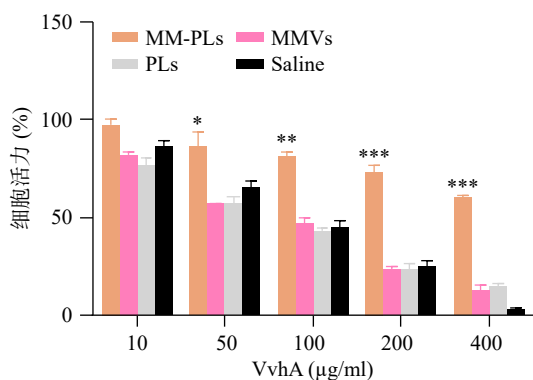


图 3 NCM460 细胞毒性测定结果 (n=3)

Saline: 生理盐水; MMVs: 巨噬细胞膜囊泡; PLs: 脂质体;
MM-PLs: 巨噬细胞膜杂合脂质体。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与 MMVs、PLs、Saline 组比较。

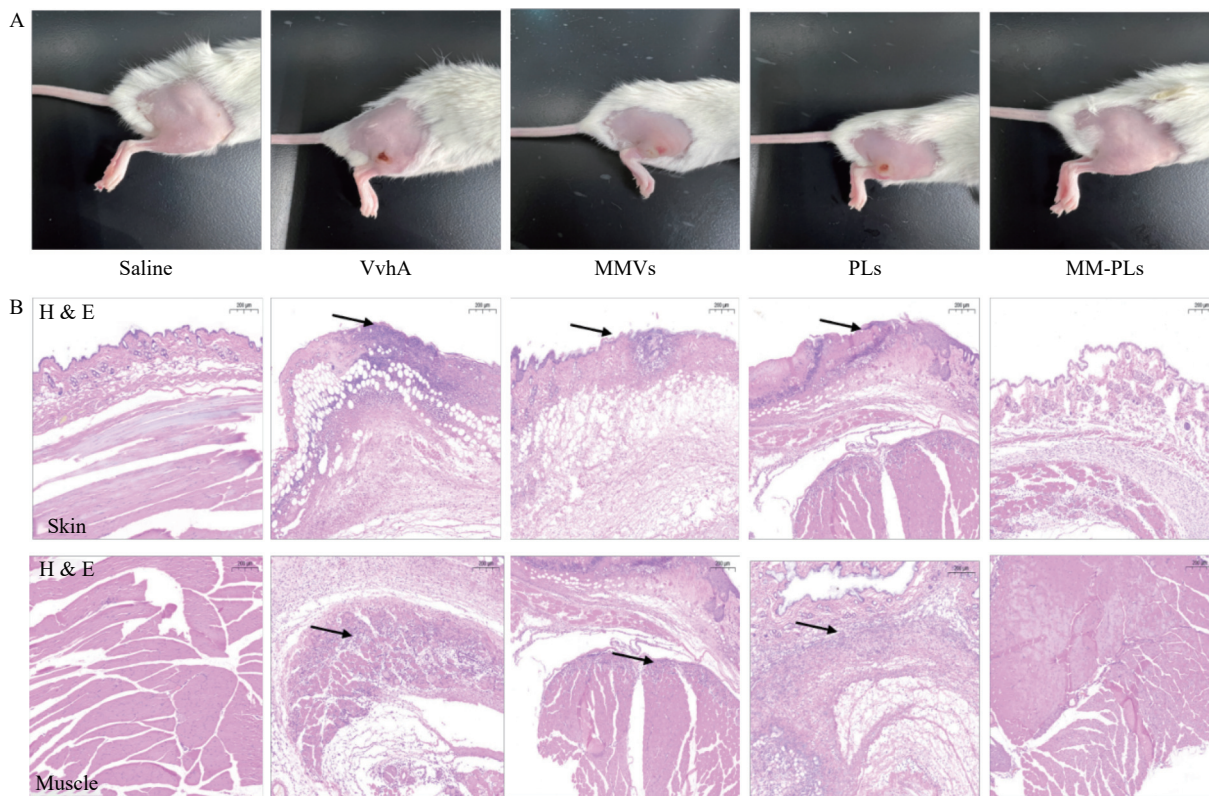


图 4 小鼠皮肤局部保护效果及皮肤和肌肉 H&E 染色切片图 (×200, µm)

(下转第 55 页)

- [14] 田逸君, 郑怡文, 朱玉平, 等. 雷公藤内酯醇的遗传毒性评价[J]. 药与实践杂志, 2016, 34(3): 215-218.
- [15] 侍雯婧, 田逸君, 黄才国, 等. Wentilactone A 的遗传毒性评价[J]. 药与实践杂志, 2020, 38(6): 533-538.
- [16] 侍雯婧, 张吉芊竹, 朱江波, 等. 盐酸苯海拉明咖啡因复方的遗传毒性评价[J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(2): 149-157.
- [17] 朱玉平, 张天宝, 万旭英, 等. 红景天苷注射液遗传毒性的研

究[J]. 药与实践与服务, 2009, 9(4): 279-281.

- [18] HANNAN M A, AL-DAKAN A A, HUSSAIN S S, et al. Mutagenicity of cisplatin and carboplatin used alone and in combination with four other anticancer drugs[J]. *Toxicology*, 1989, 55(1-2): 183-191.

【收稿日期】 2022-06-09 【修回日期】 2022-09-21

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 30 页)

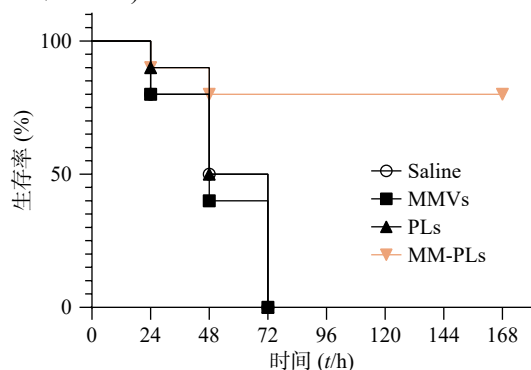


图 5 小鼠时间-生存曲线 (n=10)

Saline: 生理盐水; MMVs: 巨噬细胞膜囊泡; PLs: 脂质体;
MM-PLs: 巨噬细胞膜杂合脂质体。

【参考文献】

- [1] GENOVESE C, LA FAUCI V, D'AMATO S, et al. Molecular epidemiology of antimicrobial resistant microorganisms in the 21th century: a review of the literature[J]. *Acta Biomed*, 2020, 91(2): 256-273.
- [2] LEE CR, CHO IH, JEONG BC, et al. Strategies to minimize antibiotic resistance[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2013, 10(9): 4274-305.
- [3] HORSEMAN M A, SURANI S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe *Sepsis* and skin and soft-tissue infection[J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(3): e157-e166.
- [4] 洪广亮, 卢才教, 赵光举, 等. 创伤弧菌脓毒症诊疗方案 (2018)[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(6): 594-598.
- [5] KIM H R, RHO H W, JEONG M H, et al. Hemolytic mechanism of cytotoxicity produced from *V. vulnificus*[J]. *Life Sci*, 1993, 53(7): 571-577.
- [6] LOS F C, RANDIS T M, AROIAN R V, et al. Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(2): 173-207.
- [7] YUAN Y, FENG Z, WANG J. *Vibrio vulnificus* hemolysin: bio-

logical activity, regulation of *vwhA* expression, and role in pathogenesis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 599439.

- [8] QIN K W, FU K F, LIU J F, et al. *Vibrio vulnificus* cytotoxicity induces inflammatory responses in RAW_{264.7} macrophages through calcium signaling and causes inflammation *in vivo*[J]. *Microb Pathog*, 2019, 137: 103789.
- [9] HU C M J, FANG R H, COPP J, et al. A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins[J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, 8(5): 336-340.
- [10] CAO H Q, DAN Z L, HE X Y, et al. Liposomes coated with isolated macrophage membrane can target lung metastasis of breast cancer[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7738-7748.
- [11] HE Y W, LI R X, LI H C, et al. Erythroliposomes: integrated hybrid nanovesicles composed of erythrocyte membranes and artificial lipid membranes for pore-forming toxin clearance[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 4148-4159.
- [12] DAL PERARO M, VAN DER GOOT F G. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(2): 77-92.
- [13] QIN S G, XIAO W, ZHOU C M, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 199.
- [14] ALLEN R C, POPAT R, DIGGLE S P, et al. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(4): 300-308.
- [15] BISCHOFBERGER M, IACOVACHE I, VAN DER GOOT F G. Pathogenic pore-forming proteins: function and host response[J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(3): 266-275.
- [16] MOLINARO R, CORBO C, MARTINEZ J O, et al. Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues[J]. *Nat Mater*, 2016, 15(9): 1037-1046.
- [17] KIM Y R, KIM B U, KIM S Y, et al. Outer membrane vesicles of *Vibrio vulnificus* deliver cytotoxicity-hemolysin VvhA into epithelial cells to induce cytotoxicity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(4): 607-612.

【收稿日期】 2022-07-01 【修回日期】 2022-10-09

【本文编辑】 李春德