

纳米药物免疫毒性研究进展

林 曼¹, 洪 敏¹, 王庆利², 马 璟¹

(1. 上海医药工业研究院 国家上海新药安全评价与研究中心, 上海 201203;

2. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

摘要: 纳米药物由于粒径小等特性, 极易进入体内, 并透过多种生理屏障与免疫细胞或细胞表面蛋白相互作用, 发生特异性反应, 诱发免疫应答, 增强或降低机体的免疫功能。此外, 免疫系统自身的复杂性和纳米药物类型多样性增加了研究纳米药物免疫毒性的难度。纳米药物对机体可能具有免疫抑制或免疫刺激包括抗原性、佐剂特性和炎症反应等免疫学特性, 不同的纳米药物也已发现可以诱导机体产生不同程度的免疫反应。本文就纳米药物的免疫学特性、免疫系统与纳米药物的相互作用以及不同纳米药物免疫毒性研究方法进行综述。

关键词: 纳米药物; 免疫; 毒性; 安全性评价

中图分类号: R99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2013)02-0299-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.030

纳米药物, 目前尚无其准确定义, 可以理解为三维结构空间中至少有一维处于纳米尺度, 即 1 ~ 100 nm 的药物。因此, 纳米药物的固有属性为其具有介观尺度, 表面积大, 这使得它具有一些特殊效应, 如相对于具有较大尺度的物质, 纳米颗粒更容易进入生物体并相互作用。一旦进入生物体内, 粒径大小又将影响纳米药物在生物体内停留的部位和方式, 进而决定吞噬细胞清除外源物质的途径。

纳米药物通过呼吸道经肺进入机体后, 不可避免地被肺组织中免疫细胞吞噬, 引发免疫应答, 释放细胞因子, 引发上皮细胞炎症^[1], 未被吞噬清除的纳米物质可能逃过免疫系统的监视积累在细胞质或细胞核中^[2]。进入生物体后, 纳米颗粒可渗透细胞膜, 穿透组织和淋巴结等, 逃脱机体免疫系统的监视^[3]。通过胃肠道吸收入血或直接进入血液的纳米药物, 首先与血液中的蛋白质结合, 而后由多种细胞摄取并作用, 导致免疫抑制或免疫增强等^[4]。受颗粒性质的影响, 纳米药物可通过与特定的免疫细胞结合, 或一定的摄取途径, 产生免疫刺激作用。传统的低毒、无毒物质在纳米级别可能导致免疫毒性, 如纳米晶型石英和纤维可引发免疫毒性^[5-6]。纳米药物特有的理化性质也可使得纳米颗粒与机体免疫系统之间存在特殊的相互作用, 并参加催化、氧化、降解和裂解过程^[7]。本文将从纳米药物的免疫学特性、不同类型纳米药物的免疫毒性及其研究方法 3 个方面进行综述。

1 纳米药物的免疫学特性

纳米药物对免疫系统产生增强或抑制的不同效应, 有可能导致不同的免疫毒性, 如不良的免疫刺激、免疫抑制、超敏反应和自身免疫性疾病等。

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX09505-001-003)

作者简介: 林 曼(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事免疫毒理学研究, Tel: 18801906370, E-mail: lm20061113@126.com; 马 璟(1963-), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事毒理学研究。

通讯作者: 马 璟, E-mail: jma@ncdser.com, Tel: (021) 50500333-101

1.1 免疫刺激

Gubbins 等^[8]就纳米药物对主要组织器官的免疫细胞的影响进行了系统的总结, 包括上皮细胞、树突状细胞(dendritic cells, DC)和巨噬细胞。研究显示, 纳米药物被上述细胞摄取后, 可激发不同的免疫通路, 刺激炎症物质和细胞因子的产生和释放。如 γ -谷氨酸纳米颗粒被 DC 摄取后, 激活髓样分化因子 88 介导的 NK- κ B 信号通路, 产生白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)p40 和 IL-6, 活化抗原特异性的细胞毒 T 淋巴细胞, 在脾细胞诱导产生抗原特异性的干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ), 增加血清中抗原特异性 IgG₁ 和 IgG₂ 的含量等^[9]。此外, 吸收入血的纳米药物可能通过刺激血液补体系统、红细胞和血小板, 激活中性粒细胞, 影响巨噬细胞的吞噬活性等^[10], 从不同的免疫刺激方面引发免疫毒性。

1.1.1 抗原性

抗原性即刺激免疫系统产生抗体的能力。碳 60 富勒烯纳米粒是一种由碳原子组成的结构, 曾尝试应用于该类药物治疗。研究发现, 碳 60 富勒烯纳米粒可刺激多种实验动物产生特异性抗体, 这些特异性抗体由不同的 IgG 组成; 后续研究表明, 碳 60 富勒烯纳米粒等可以通过特定机制影响其靶定位置, 产生特异性抗体。碳 70 纳米粒也可以产生类似抗体^[11-12]。

1.1.2 佐剂特性

有些纳米药物可刺激免疫系统产生更强、更快和更持久的免疫应答。正在研究中的 HIV₂ 疫苗使用聚甲基丙烯酸甲酯纳米颗粒替代传统氢氧化铝作为佐剂, 发现聚甲基丙烯酸甲酯纳米颗粒组小鼠产生的抗体比氢氧化铝组和对照组高 10 ~ 100 倍, 如 IgG 和 IgM, 高浓度抗体维持时间由 10 周延长至 20 周^[13]。佐剂特性可能增强免疫刺激副作用, 产生致命性过敏等, 这也是非临床研究中评价纳米药物免疫安全性的重要方面之一。

1.1.3 炎症反应

炎症反应是一个复杂的过程, 纳米药物可通过多种通路影响炎症反应。Lutsiak 等^[14]报道, 乙交酯-丙交酯共聚物(poly-D, L-lactic-co-glycolic acid, PLGA) 纳米颗粒可以改

变小鼠对缩氨酸的免疫应答。小鼠给予经 PLGA 纳米颗粒包裹的乙肝疫苗,对于缩氨酸和弗氏完全佐剂主要产生辅助性 T 细胞 1(helper T cell 1, Th1) 型免疫反应;直接给予药物后主要为 Th2 型免疫反应。此外,纳米药物可以加快 DC 的成熟,增加细胞 CD80/CD86 表达,刺激免疫系统,改变 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞比例,影响炎症反应,引发不同程度的免疫毒性。

1.2 免疫抑制

免疫抑制表现在 T 和 B 细胞增殖减少及免疫器官功能降低等。第 3.5 代聚合物聚酰胺-胺型树枝状高分子属于固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN),可以抑制 Toll 样受体 4,抑制 DC 和巨噬细胞合成的促炎性趋化因子和细胞因子,增加 CD25, CD80, CD83 和 CD86 的表达,可应用于抑制瘢痕形成,益于术后恢复,将手术的长期成功率从 30% 增加到 80%^[15]。

2 纳米药物及其对免疫系统的影响

2.1 纳米脂质体

纳米脂质体是指在纳米级别的、由一层或多层的双层两性磷脂分子包裹一种或多种水溶性物质的脂质体^[16]。纳米脂质体颗粒表面电荷可影响对免疫系统的作用。Nakanishi 等^[17]发现,在包裹相同浓度抗原的条件下,与呈中性和阴性纳米脂质体相比,带阳性电荷的纳米脂质体能更有效地诱导抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞反应和迟发性超敏反应;阳性纳米脂质体药物可以更有效的进入巨噬细胞和抗原递呈细胞,产生 I 型 MHC 细胞,诱导细胞介导的免疫应答。

2.2 多聚纳米粒

多聚纳米粒是由可降解的高分子物质、聚合物和胶团组成。在疫苗组分中,通常采用可降解的高分子物质包裹抗原,刺激机体产生特异性抗体。以 PLGA 为例,其生物降解的给药系统有很多优势,如持续释放药物,在苛刻的环境中保护包裹的抗原,防止酶类的降解,使给药具有靶向性且可以与配体结合,有佐剂效应,提高生物利用度等。多聚纳米粒普朗尼克是聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物,Reddy 等^[18]在研究纳米药物疫苗时发现,小分子普朗尼克(≈25 nm)可以稳定、高效地进入毛细血管或淋巴管,在 DC 中作用而后蓄积;而稍大颗粒的普朗尼克(≈100 nm)作用效率则只有小分子的 10%,提示纳米药物对小鼠体液免疫和细胞免疫的影响可能与粒径大小有相关性。

2.3 纳米乳剂

纳米乳剂为纳米级乳滴。纳米乳剂可用于疫苗,如乙肝疫苗 nano-HBsAg 是带有重组肝炎病毒表面抗原的 400 nm 油包水型纳米乳剂,可诱导 Th1 型免疫反应,产生细胞因子和趋化因子,刺激细胞产生 IgG 和黏膜 IgA 抗体,且免疫应答反应强烈;与传统氢氧化铝疫苗相比,其抗体产生量更多,刺激产生抗体的时间更长,更稳定。制成纳米乳剂后可透过鼻黏膜给药,半衰期更长,热稳定性好,克服了乳化剂本身对温度不稳定的缺陷,优化了储存条件和给药方式^[19]。此药物在美国已进入 I 期临床试验。

2.4 固体脂质纳米粒

SLN 是以固态的天然脂质或合成的类脂等为载体包裹药物制成的纳米载药系统。Feliu 等^[22]分析了多种 SLN 的

纳米药物毒性,用人巨噬细胞和粒细胞及啮齿类巨噬细胞等 4 种以上的细胞进行体外实验,从细胞毒性、细胞对纳米药物摄取以及细胞因子释放等方面对纳米药物毒性进行了研究。研究表明,巨噬细胞对 SLN 的摄取减慢,导致其在血液循环时间延长,进而降低毒性,增加耐受性;不同的脂质载体和不同的浓度可产生不同的免疫效应,SLN 载体山嵛酸甘油酯纳米颗粒的实验结果表明,高剂量组 BALB/c 小鼠脾出现组织病理改变,停药 6 周后恢复,分析可能与纳米药物在小鼠体内沉积、生物分布广及代谢较慢有关。

通过研究设计不同类型的纳米药物以得到所需的免疫效应,可用于疫苗和抗肿瘤免疫增强作用,避免其副作用或不期望的免疫效应。如 Pan 等^[21]在研究抗肿瘤药物时发现,纳米脂质体包裹的抗肿瘤药物 G3139,可增加药物本身导致的 IL-6 和 IFN- γ 等细胞因子的释放,促进 NK 细胞和 DC 增殖,提高抗肿瘤效应。

3 纳米药物免疫毒性的研究方法

已知纳米药物的毒性与其特有的理化性质相关,但尚无明确的以结构相关为基础的毒理学研究^[22]。纳米药物的毒性研究仍然着重 case-by-case 原则。加之免疫系统是由多个免疫器官、免疫细胞和免疫分子构成的复杂系统,因此,体内实验需要从不同免疫器官和细胞因子着手,关注动物整体的血液学、生物化学和免疫器官组织病理学等变化。

3.1 细胞实验

通过对不同免疫细胞的细胞毒性测试,可检测纳米药物对细胞半数致死浓度、免疫细胞增殖和分化等方面的影响。

Shaw 等^[23]采用不同的实验方法、细胞类型和浓度系统地评价了 50 多种纳米材料,旨在提供广泛的纳米药物作用机制,如细胞因子和趋化因子的产生释放及特异性抗体的产生等,为预测纳米材料毒性并进行毒性分级提供实验数据。此外,体外三维实验方法可模拟体内细胞的反应,如 Huh 等^[24]建立了“芯片中的肺(lung-on-a-chip)”的方法,重建人类肺泡复杂完整的微环境;并应用于研究纳米硅颗粒经上皮细胞和内皮细胞摄取、循环及发生炎症的机制。实验发现,在 lung-on-a-chip 的实验中,纳米硅颗粒可诱发人肺泡上皮细胞炎症因子表达增加,中性粒细胞停留在上皮细胞并累积,产生免疫应答,导致免疫毒性等。

3.2 细胞因子

细胞因子如白细胞介素和肿瘤坏死因子的合成释放与正常相比的增加或减少均可用于评价免疫毒性。如 Luca-relli 等^[2]在比较研究纳米颗粒免疫毒性时发现, SiO₂, TiO₂ 和 ZrO₂ 纳米颗粒可导致 IL-1 β , 肿瘤坏死因子 α 和 IL-1 α 表达增加或减少,产生不同的免疫毒性。细胞因子含量可以通过 ELISA 测定。

3.3 毒理组学研究

除了常规的体内外实验,组学技术为研究纳米药物免疫毒性研究提供了新的技术和方法。纳米碳管是由碳原子组成的立体结构的纳米材料,和纳米富勒烯碳一样,曾用于研究纳米药物载体并开发用于癌症治疗,但研究中发现对不同动物不同器官有细胞毒性,产生特异性抗体,导致免疫反应。Ding 等^[25]将人成纤维细胞暴露于纳米碳管后,进行全基因组学研究,发现暴露多壁纳米碳管的细胞均有不同基因和基

因表达量的改变,在表达谱中表达增多的主要是与抗病毒免疫应答有关的人类黏病毒流感抗性基因 1 和 2 小鼠及与自身免疫改变有关的干扰素诱导蛋白 1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats, IFIT1), IFIT2 和 IFIT3,表明纳米药物可以从基因水平影响动物免疫系统。Haniu 等^[26]通过蛋白质组学方法辨别多壁纳米碳管暴露下多种蛋白质合成,包括热激蛋白、中性 α 糖苷酶和 DNA 错配修复蛋白 Msh2 等,这些蛋白质都可能影响免疫系统在内的生物系统,表明蛋白质组学技术在纳米药物的免疫毒性评价中有重要的应用价值。

3.4 其他

免疫表型分析、T 细胞依赖性抗体反应、NK 细胞活性分析、巨噬细胞/中性粒细胞功能和细胞免疫分析法等都是测试特定细胞的数目、表型、活性和功能用以评价纳米药物免疫毒性的方法^[26]。迟发型超敏反应应用淋巴结增殖实验评价,纳米药物经皮下注射后,可以通过淋巴结进入淋巴系统,第 7 天注射 [³H](胸腺嘧啶核)苷,通过淋巴结细胞增殖判断是否诱发迟发型超敏反应。皮下注射的纳米药物可以进入不同淋巴结,由 DC 摄取递呈后,产生共刺激分子和 II 型主要组织相容性复合体 (MHC),进而产生迟发型超敏反应。

CH50 补体激活实验测定补体激活功能,补体激活导致血清中补体成分减少,降低裂解红细胞的能力,从而测得补体激活能力的大小,测得纳米药物的免疫毒性。补体激活的免疫系统可以激活其他免疫细胞产生免疫应答,产生潜在的免疫毒性^[17]。

不同物种对纳米药物的免疫毒性反应不同,如补体激活实验采用灵长类动物恒河猴或斑马鱼胚胎模型研究纳米药物的免疫毒性更加方便。无论体内体外实验,纳米药物免疫毒性研究仍需要以组织病理学检查为“黄金标准”,在组织病理学验证的基础上,通过检测免疫系统的不同器官、组织和细胞等可以全方位的评价纳米药物的免疫毒性。

4 展望

纳米技术作为新型药物递送系统,可能会实现靶向给药,改善吸收,延缓药物释放,延长药物作用时间,减少药物在胃肠道代谢,提高生物利用度,并降低不良反应。目前该类制剂多处于体外及动物体内实验阶段,虽然部分药物已进入临床试验,但上市品种很少,可能源于纳米制剂给药后仍有一些非预期的生物机体反应。纳米药物开发需重视立题,考虑临床需求,同时对其药代动力学、安全性和有效性等进行全面评估,纳米药物的非临床评价需要结合药理学工艺和质控来考虑,其中免疫毒性是其中重要内容之一。

参考文献:

- [1] Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, *et al.* The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2006, **3**:11.
- [2] Lucarelli M, Gatti AM, Savarino G, Quattroni P, Martinelli L, Monari E, *et al.* Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2004, **15**(4):339-346.
- [3] Gowlan BT, McIntosh AD, Davies IM, Moffat CF, Webster L. Implications from a field study regarding the relationship between poly-
- cyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels[J]. *Mar Environ Res*, 2002, **54**(3-5):231-235.
- [4] Göppert TM, Müller RH. Polysorbate – stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns[J]. *J Drug Target*, 2005, **13**(3):179-187.
- [5] Donaldson K, Brown GM, Brown DM, Robertson MD, Slight J, Cowie H, *et al.* Contrasting bronchoalveolar leukocyte responses in rats inhaling coal mine dust, quartz, or titanium dioxide: effects of coal rank, airborne mass concentration, and cessation of exposure [J]. *Environ Res*, 1990, **52**(1):62-76.
- [6] Hart GA, Hesterberg TW. *In vitro* toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide [J]. *J Occup Environ Med*, 1998, **40**(1):29-42.
- [7] Powers KW, Palazuelos M, Moudgil BM, Roberts SKP. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies[J]. *Nanotoxicology*, 2007, **1**(1):42-51.
- [8] Gubbins EJ. Immunotoxicological mechanisms of engineered nanoparticles [D/OL][2012-06-20]. <http://ligitur-rqchive.library.uu.nl/student-theses/2009-0319-201704/UUindex.html>.
- [9] Uto T, Wang X, Sato K, Haraguchi M, Akagi T, Akashi M, *et al.* Targeting of antigen to dendritic cells with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity[J]. *J Immunol*, 2007, **178**(5):2979-2986.
- [10] Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials[J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(8):469-478.
- [11] Chen BX, Wilson SR, Das M, Coughlin DJ, Erlanger BF. Antigenicity of fullerenes; antibodies specific for fullerenes and their characteristics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(18):10809-10813.
- [12] Braden BC, Goldbaum FA, Chen BX, Kirschner AN, Wilson SR, Erlanger BF. X-ray crystal structure of an anti-buckminsterfullerene antibody fab fragment: biomolecular recognition of C(60)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(22):12193-12197.
- [13] Stieneker F, Kreuter J, Löwer J. High antibody titres in mice with polymethylmethacrylate nanoparticles as adjuvant for HIV vaccines [J]. *AIDS*, 1991, **5**(4):431-435.
- [14] Lutsiak ME, Kwon GS, Samuel J. Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2 – biased peptide for induction of Th1 immune responses[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, **58**(6):739-747.
- [15] Lutsiak ME, Kwon GS, Samuel J. Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2-biased peptide for induction of Th1 immune responses[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, **58**(6):739-747.
- [16] U. S Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry Liposome Drug Products[S/OL][2012-06-20]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance-ComplianceRegulatoryInformation/Guidance/ucm070570.pdf>
- [17] Nakanishi T, Kunisawa J, Hayashi A, Tsutsumi Y, Kubo K, Nakagawa S, *et al.* Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins[J]. *J Control Release*, 1999, **61**(1-2):233-240.
- [18] Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, *et al.* Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(10):1159-1164.
- [19] Makidon PE, Bielinska AU, Nigavekar SS, Janczak KW, Knowlton J, Scott AJ, *et al.* Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine[J]. *PLoS One*, 2008, **3**(8):e2954.
- [20] Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of

- actives[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, **71**(2):161-172.
- [21] Pan X, Chen L, Liu S, Yang X, Gao JX, Lee RJ. Antitumor activity of G3139 lipid nanoparticles (LNPs) [J]. *Mol Pharm*, 2009, **6**(1):211-220.
- [22] Feliu N, Fadeel B. Nanotoxicology: no small matter[J]. *Nanoscale*, 2010, **2**(12):2514-2520.
- [23] Shaw SY, Westly EC, Pittet MJ, Subramanian A, Schreiber SL, Weissleder R. Perturbational profiling of nanomaterial biologic activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(21):7387-7392.
- [24] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip[J]. *Science*, 2010, **328**(5986):1662-1668.
- [25] Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multi-wall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast [J]. *Nano Lett*, 2005, **5**(12):2448-2464.
- [26] Haniu H, Matsuda Y, Takeuchi K, Kim YA, Hayashi T, Endo M. Proteomics-based safety evaluation of multi-walled carbon nanotubes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, **242**(3):256-262.

Progress in immunotoxicity of nanodrugs

LIN Man¹, HONG Min¹, WANG Qing-li², MA Jing¹

(1. National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 2. Center for Drug Evaluation, SFDA, Beijing 100038, China)

Abstract: Special properties, such as size, make nanodrugs different from traditional drugs. They can enter organisms, blood stream, and then interact with immune cells or proteins in cells, resulting in immunotoxicity of lymphocytes and specific reaction and inducing immune system responses or immune function decline. Furthermore, the complexity of the immune system and the diversity of nanodrugs make difficult evaluation of their immunotoxicity. Nanodrugs can affect organisms via immune suppression or immune stimulation, including antigen and adjuvant properties. Different nanoparticle drugs have been found to have varied impact on the body. The interaction of nanodrugs with the immune system, immunologic characters, current research on the immunotoxicity of different nanodrugs and methodology were reviewed.

Key words: nanodrug; immunity; toxicity; safety evaluation

Foundation item: The project supported by National Mega-project of Science Research of China (2012ZX09505-001-003)

Corresponding author: MA Jing, E-mail: jma@ncdser.com, Tel: (021)50500333-101

(收稿日期: 2012-07-21 接受日期: 2012-11-23)

(本文编辑: 齐春会)