

# TNF- $\alpha$ 小分子抑制剂C87的纳米药物制备及其体内外活性研究

孔鑫焱 熊青青 马莉 姜珊 吕梦楠 马润芝 张诗悦 孙露 王彤 许元富\*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)实验血液学国家重点实验室, 国家血液病临床医学研究中心, 天津 300020)

**摘要** 该研究首先制备并表征包载TNF- $\alpha$ 小分子抑制剂C87的纳米粒子, 进而评价其在L929细胞和小鼠自身免疫性肝损伤模型中抑制TNF- $\alpha$ 细胞毒性的作用。采用纳米沉淀法制备载C87的纳米粒子(C87 NP), 并对其理化性质及体外释放行为进行表征; 在L929细胞中用MTT法分析C87 NP拮抗TNF- $\alpha$ 细胞毒作用的效果; 经尾静脉注射刀豆蛋白A(ConA)诱导小鼠发生自身免疫性肝损伤, 采用C87 NP预给药方式, 防治小鼠自身免疫性肝损伤; 使用LEGENDplex™分析小鼠血清中13种细胞因子的表达水平; 流式细胞术分析肝和脾中T细胞及亚群、NK细胞等的分布、比例和数量。制备出的C87 NP具有较高(34.4%)的载药量, 且稳定性好, 其包封率为48.1%, C87 NP平均粒径为82.57 nm, 多分散系数为0.115, 呈电中性, 透射电镜结果显示其为球形结构; 该纳米粒子可在体外持续缓慢释放C87, 持续时间不少于8 h; C87 NP可以在体外抑制TNF- $\alpha$ 对L929细胞的杀伤能力( $IC_{50}=9.13 \mu\text{mol/L}$ ), 并呈浓度依赖性; 动物实验结果显示, C87 NP治疗组小鼠的存活率为66.7%, 进一步的生化和病理分析结果表明, ConA小鼠尾静脉给药12 h后, C87 NP预防性给药能显著降低血清中ALT、AST与部分细胞因子的水平( $P<0.01$ ), 减轻肝损伤, 减少CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK细胞等对肝脾的浸润( $P<0.01$ ), 提高脾脏Treg细胞比例( $P<0.05$ )。该研究成功制备出纳米药物C87 NP, 且C87 NP在体内外具有良好的抑制TNF- $\alpha$ 细胞毒性的作用, 这为小分子药物C87今后在临床上的应用奠定了基础。

**关键词** TNF- $\alpha$ ; 纳米药物; 自身免疫性肝炎

## The Preparation and Analysis of Nanoparticle-Encapsulated Small-Molecule TNF- $\alpha$ Inhibitor C87 Using *In Vitro* and *In Vivo* Models

KONG Xinyao, XIONG Qingqing, MA Li, JIANG Shan, LÜ Mengnan, MA Runzhi, ZHANG Shiyue, SUN Lu, WANG Tong, XU Yuanfu\*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

**Abstract** In this study, nanoparticles loaded with C87, a small-molecule inhibitor of TNF- $\alpha$ , were prepared and characterized. The effects of the inhibition of TNF- $\alpha$  cytotoxicity were assessed in L929 cells using a mouse model of autoimmune hepatitis. Specifically, C87 NPs were prepared by using the nanoprecipitation method and

收稿日期: 2021-03-28 接受日期: 2021-04-29

中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2016-12M-1-003)、国家自然科学基金(批准号: 81970107、81600083)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2018RC31002、2018PT32034)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

Received: March 28, 2021 Accepted: April 29, 2021

This work was supported by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2016-12M-1-003), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970107, 81600083), and the Non-Profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2018RC31002, 2018PT32034)

\*Corresponding author. Tel: +86-13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

examined their physicochemical properties and the drug release profile *in vitro*. For mouse studies, LEGENDplex™ was utilized to determine the levels of 13 cytokines in the mouse serum and flow cytometry was used to analyze the distribution, proportion and number of T cells (including subsets of T cells) and NK cells in the liver and spleen. The C87 NPs exhibited a high loading capacity (34.4%) and stability, with an encapsulation rate of 48.1%, an average particle size of 82.57 nm, and a polydispersity coefficient of 0.115. The C87 NPs were electrically neutral and displayed spherical structures as revealed by transmission electron microscopy. The NPs released C87 in a sustained manner with a duration of no less than 8 h. The C87 NPs inhibited the killing effect of TNF- $\alpha$  on L929 cells *in vitro* in a concentration-dependent manner ( $IC_{50}=9.13 \mu\text{mol/L}$ ). Moreover, the results from the mouse studies showed that the C87 NPs increased the survival rate of the mice from 0% to 66.7%. while subsequent biochemical and pathological analyses demonstrated that the tail vein administration of C87 NPs in ConA-treated mice significantly reduced the serum levels of ALT, AST and several cytokines ( $P<0.01$ ), the liver injury, and the infiltration of CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T and NK cells into the liver and spleen ( $P<0.01$ ) after 12 h, while increasing the proportion of Treg cells in the mouse spleen ( $P<0.05$ ). Together, this study has successfully established C87 NPs that exert a strong inhibitory effect on the cytotoxicity of TNF- $\alpha$  both *in vitro* and *in vivo*. It lays a foundation for future clinical applications of the small-molecule inhibitor C87.

**Keywords** tumor necrosis factor- $\alpha$ ; nano-drug; autoimmune hepatitis

肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是机体内一种重要的炎症因子,其作用非常复杂。通常,低浓度TNF- $\alpha$ 表现为免疫调节作用;而高浓度TNF- $\alpha$ 的主导作用是细胞毒作用,且往往会引起组织损伤,并与类风湿关节炎、僵直性脊椎炎及炎性肠病等自身免疫性疾病的发生和发展高度相关,阻断TNF- $\alpha$ 的作用能显著地改善这些疾病的症状<sup>[1-2]</sup>。

前期我们联合利用计算机辅助药物设计、计算机虚拟筛选和细胞活性筛选技术等方式,筛选获得了一个在体外和小鼠体内均能较好抑制TNF- $\alpha$ 细胞毒活性的小分子化合物C87<sup>[3-4]</sup>。然而,由于C87小分子水溶性较差,进行小鼠体内实验时只能采用腹腔给药方式,药物利用率较低,这严重影响了后续相关疾病动物模型上治疗实验的开展。因此,进一步优化TNF- $\alpha$ 小分子抑制剂C87的剂型及给药方式,以及探索新的载药方式势在必行。近些年来纳米载体在开发合适药物制剂方面展现其优势<sup>[5-6]</sup>,与普通药物相比,纳米载体不仅增加了不溶性药物的生物利用度,延长了药物在体内的循环时间,而且提高了药物功效并减少了副作用<sup>[7-8]</sup>。目前常见的纳米载体主要包括:胶束、聚合物纳米粒子、脂质体、蛋白纳米粒子、无机纳米粒子等。PLGA[poly(lactic-co-glycolic acid)]是一种可降解的有机聚合物<sup>[9]</sup>,具有良好的生物相容性,且被美国FDA认证批准为药用辅料,广泛应用于制药领域。因此,本

研究以PLGA为载体材料,DSPE-PEG为辅料,封装C87化合物分子,制备表面PEG(polyethylene glycol)修饰的纳米粒子C87 NP。在此基础上,我们在体外和小鼠自身免疫性肝炎模型上评价C87 NP抑制TNF- $\alpha$ 细胞毒活性的能力,并进一步推进该药物临床前研究的进程。

## 1 材料

### 1.1 动物和细胞

雌性C57/BL6J小鼠[8周, (20 $\pm$ 2) g],购自北京华阜康实验动物技术有限公司。饲养于中国医学科学院血液学研究所无特定病原体(SPF)动物房,室温保持在(24 $\pm$ 2) °C。自由进食和饮水,标准动物饲料喂养。所有涉及小鼠的实验均得到中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所动物管理中心及伦理委员会的批准。L929细胞购自ATCC,培养在含有10%胎牛血清(Sigma)的RPMI 1640中。

### 1.2 主要试剂

C87购自上海陶速生物科技有限公司; PLGA(mol 30000-60000)购自Sigma-Aldrich公司; DSPE-PEG3k购自Avanti公司; 重组人TNF- $\alpha$ 购自PeproTech公司; 谷丙转氨酶(ALT/GPT)及谷草转氨酶(AST/GOT)测定试剂盒购自南京建成科技有限公司; LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) with V-bottom Plate购自Biolegend公司。

## 2 方法

### 2.1 C87 NP的制备、表征及药物分子释放分析

将C87(10 mg/mL)、PLGA和DSPE-PEG3k(5 mg/mL)按一定投料比(C87:PLGA:DSPE-PEG3k)混合,在转速为1 000 r/min搅拌下,逐滴加入蒸馏水中,组装形成载C87的纳米粒子(C87 NP)。将溶液转移到一个超滤管(MWCO 100 kDa)中,用去离子水洗涤两次,将纳米粒子溶液重悬分散于蒸馏水中(图1A)。采用上述相同方法,混合液体体系中不加C87,制备空白纳米粒子(Blank NP)作为对照。

采用酶标仪测定其在408 nm处的吸光度( $D$ )值,计算药物包封率和载药量;采用粒度-Zeta电位分析仪测定其在蒸馏水中的粒径、粒径分布及表面电位;将C87 NP溶液样品滴加于含有碳涂层的铜网上,5 min后,采用2%的磷钨酸负染30 s,在透射电子显微镜下观察C87 NP的形态并拍照。

采用透析法考察C87从C87 NP中释放的动力学行为。根据吸光度( $D_{408}$ )值计算透析管中未释放C87的量。按照下列公式计算累积释放率,并绘制释放率-时间变化曲线。

$$\text{释放率 (C87r release\%)} = 1 - \frac{\text{透析管中 C87 量}}{\text{初始投入 C87 NP 溶液中 C87 量}} \times 100\%$$

### 2.2 MTT法检测L929细胞存活率

配制含有1  $\mu\text{g/mL}$  ActD和1 ng/mL TNF- $\alpha$ 的培养液,并用上述培养液将C87或C87 NP溶液稀释成不同浓度,置于培养箱中预孵8 h;然后将其加入L929细胞中继续孵育20 h。通过MTT法检测,按照以下公式计算细胞存活率:

$$\text{Survival\%} = \frac{D_{\text{ActD+TNF-}\alpha\text{+Compound}} - D_{\text{blank}}}{D_{\text{ActD}} - D_{\text{blank}}} \times 100\%$$

### 2.3 小鼠自身免疫性肝炎模型构建以及实验分组和治疗方案

小鼠尾静脉注射ConA(20 mg/kg)诱导小鼠自身免疫性肝炎模型。分组和治疗方案如下: C87组和Enbrel组分别在ConA注射造模前1 h(-1 h)、8 h(-8 h)、16 h(-16 h)向小鼠腹腔内注射C87(12.5 mg/kg)或Enbrel(5 mg/kg); C87(1)、Enbrel(1)和C87 NP组分别在造模前8 h经腹腔注射C87(12.5 mg/kg)、Enbrel(5 mg/kg),或经小鼠尾静脉注射C87 NP(12.5 mg/kg) 1次(ConA注射时间点记为0 h)。每组5只小鼠。

### 2.4 小鼠血清分析

使用LEGENDplex™评估血清中13种细胞因子

的表达水平。上述因子包括白介素-23(interleukin-23, IL-23)、白介素-1 $\alpha$ (interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-12P70(interleukin-12p70, IL12P70)、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-10(interleukin-10, IL-10)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-27(interleukin-27, IL-27)、白介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)。使用谷丙转氨酶(ALT/GPT)及谷草转氨酶(AST/GOT)测定试剂盒测定血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的含量。

### 2.5 肝脏和脾脏细胞悬液制备及分析

采用二氧化碳吸入法处死小鼠后,取出肝脏及脾脏组织,剪碎研磨、制成细胞悬液,500  $\times\text{g}$ 离心10 min,弃去上清,将沉淀重悬于10 mL、37.5% Percoll中,500  $\times\text{g}$ 离心10 min,重悬并用红细胞裂解液裂解红细胞,500  $\times\text{g}$ 离心10 min,并用FACS缓冲液重悬沉淀。加入荧光抗体各1  $\mu\text{L}$ (利用PE-CD3、APC/cy7-CD4、APC-CD8和FITC-NK1.1抗体标记T细胞及NK细胞,利用FITC-CD11b、APC-F4/80抗体标记巨噬细胞,利用FITC-CD11b、APC-Ly6G抗体标记中性粒细胞,利用APC/cy7-CD4、APC-CD25、PE-Foxp3抗体标记Treg细胞),吹打均匀,4  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,500  $\times\text{g}$ 离心10 min后,弃上清,重悬沉淀,流式细胞仪检测分析。

### 2.6 统计学方法

数据采用Graphad Prism 8版本进行统计学分析,用未配对Student  $t$ 检验进行统计学差异分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

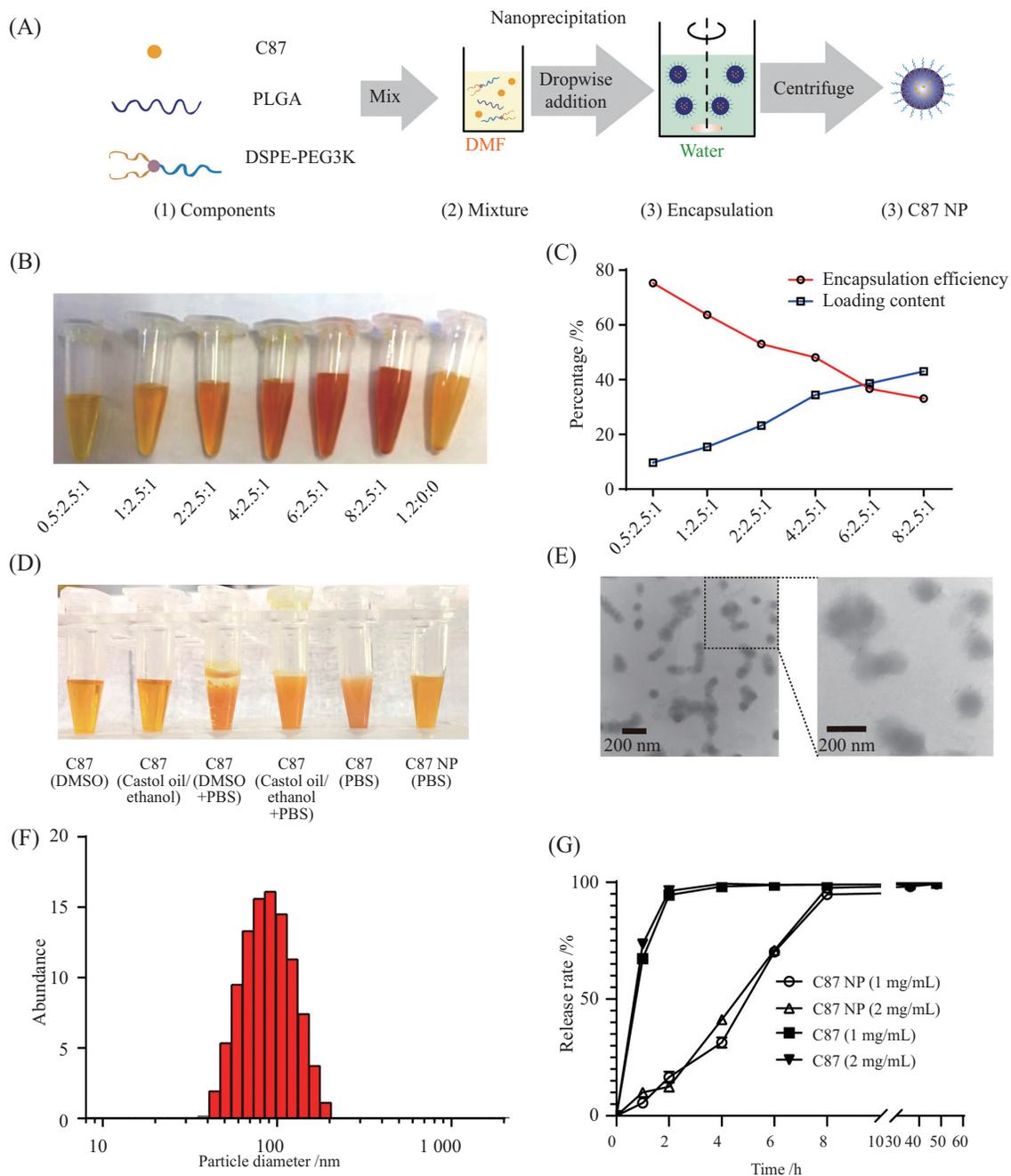
## 3 结果

### 3.1 C87纳米粒子的制备、表征及药物释放分析

采用纳米沉淀法制备C87 NP(图1A)。观察不同投料比(C87:PLGA:DSPE-PEG3k)制备的C87 NP溶液外观(图1B),可见随着C87投料比的增加,C87 NP溶液颜色逐渐加深;在C87投料比较低时( $\leq 4:2.5:1$ ),C87 NP呈现均匀溶液状态,稳定性较好,但在C87投料比较高时(8:2.5:1),可见溶液中有少量沉淀析出;

在不加载体材料时(投料比为1.2:0:0), 获得的C87溶液呈现浑浊状态, 且管底有沉淀析出。对不同投料比制备的纳米粒子进行表征, 其包封率和载药量结果显示, C87 NP的包封率随着C87投料比的增加

呈现下降趋势, 而载药量呈现增加趋势(图1C)。由上述结果可知, 在投料比为4:2.5:1时, 制备出的C87 NP具有较好的综合指标(载药量为34.4%, 包封率为48.1%), 且稳定性良好。对比C87 NP与游离C87在



A: C87 NP的制备过程示意图; B: 不同投料比制备的C87 NP外观; C: 不同投料比制备的C87 NP的包封率(encapsulation efficiency, EE)和载药量/loading content, LC); D: 比较C87及C87 NP在PBS中的溶解状态; E: C87 NP的透射电子显微镜照片; F: C87 NP的粒径分布分析; G: C87 NP的药物释放速率分析。

A: schematic diagram of the preparation process of C87 NP; B: appearance of C87 NP prepared with different amounts of feed ratios; C: encapsulation efficiency (EE) and loading content (LC) of C87 NP prepared with different amounts of feed ratios; D: comparison of the solubility of C87 and C87 NP in PBS; E: transmission electron microscope images of C87 NP; F: analysis of the particle size distribution of C87 NP; G: analysis of the drug release rate of C87 NP.

图1 C87 NP的制备、表征及药物释放分析

Fig.1 Preparation, characterization and drug release analysis of C87 NP

PBS中的分散情况,发现将C87包裹于纳米体系中改善了其溶解度,并能在PBS中均匀分散(图1D)。

药物的包封率和载药量是评价纳米粒子制备工艺的重要表征。对上述C87 NP其他表征的分析结果显示,该纳米粒子动态光散射测得的平均粒径为82.57 nm,多分散系数为0.115(图1F);此外,其表面电位为-0.581 mV,基本呈电中性。透射电子显微镜观察C87 NP,可见该纳米药物分子呈较为均匀的球形结构(图1E)。

之后,我们考察了C87 NP体外释放动力学过程,并以C87作为对照。结果显示,在C87组中,透析管中的C87在较短时间内即能透膜渗透释放至介质中,2 h时,1 mg/mL和2 mg/mL C87的药物累积释放率分别达到94.6%和96.3%;与C87组相比,C87 NP呈现明显的缓慢释放药物趋势,2 h时,1 mg/mL和2 mg/mL C87 NP的药物累积释放率仅分别为12.4%和16.5%;8 h时,药物累积释放率分别达到94.8%和97.6%(图1G)。以上结果说明,将C87包载于纳米体系中可实现药物的持续缓慢释放。

### 3.2 C87 NP能抑制TNF- $\alpha$ 介导的L929细胞死亡

我们选择L929细胞作为检测TNF- $\alpha$ 的细胞毒性作用的靶细胞<sup>[10]</sup>,相差显微镜观察结果显示,L929细胞经不同分组处理24 h后,空白对照组(Blank组,未加任何药物)细胞生长状态良好,细胞多为梭形且边缘清晰且折光度较好;实验对照组(Ctrl组,1 ng/mL hTNF- $\alpha$ )大多数细胞已经死亡,可见大量细胞残骸和碎片;C87组(1 ng/mL hTNF- $\alpha$ +25  $\mu$ mol/L C87)、C87 NP组(1 ng/mL hTNF- $\alpha$ +25  $\mu$ mol/L C87 NP)和Enbrel组(1 ng/mL hTNF- $\alpha$ +1  $\mu$ g/mL Enbrel)死亡细胞较少,梭形细胞比例与实验对照组相比显著提高(图2A)。用MTT的方法检测C87 NP对TNF- $\alpha$ 细胞毒性的抑制,实验中设置了5个C87 NP浓度梯度(0.4、1.6、6.4、25、100  $\mu$ mol/L),结果显示:C87 NP对TNF- $\alpha$  (1  $\mu$ g/L)的细胞毒作用的抑制呈剂量依赖性(图2B),半数抑制浓度(half-maximum inhibition concentration, IC<sub>50</sub>)为9.13  $\mu$ mol/L。为了进一步明确C87 NP对TNF- $\alpha$ 下游细胞凋亡信号通路的抑制作用,我们检测了经不同分组处理12 h后的L929细胞中凋亡相关蛋白的表达情况,结果表明,C87 NP可以阻断TNF- $\alpha$ 介导的细胞凋亡相关的Caspase 8、Caspase 3和I $\kappa$ B $\alpha$ 的活化(图2C和图2D)。

### 3.3 C87 NP减轻了自身免疫性肝炎小鼠的组织损伤及其机制分析

TNF- $\alpha$ 被认为是与人自身免疫性肝炎发病高度

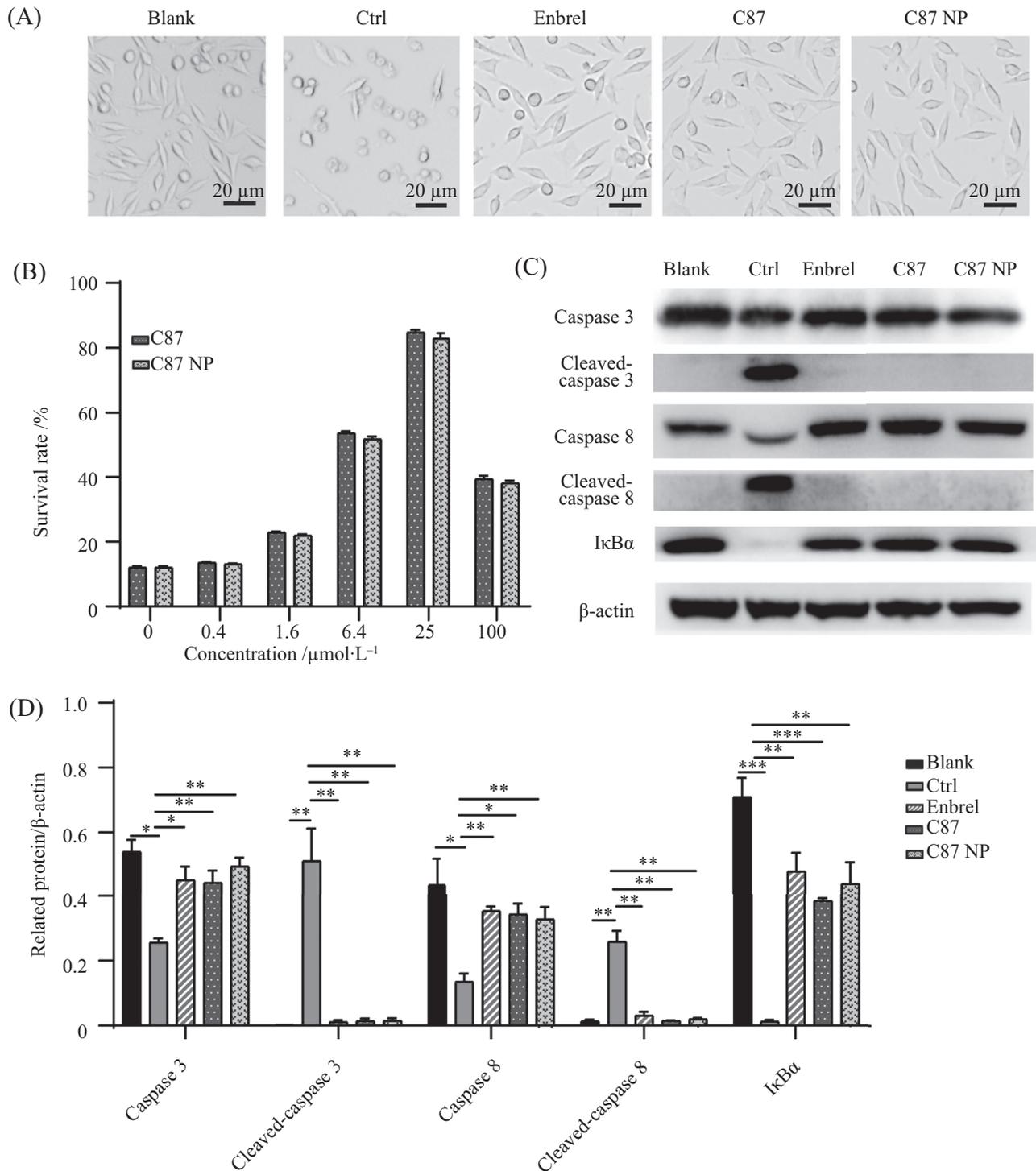
相关的一种炎症因子<sup>[11]</sup>,文献报道,ConA诱导的小鼠自身免疫性肝炎模型的发病机制和表征与人自身免疫性肝炎相似,如炎症因子升高和肝损伤等。因此,我们采用上述动物模型开展了C87 NP在自身免疫性肝炎模型中的实验研究。

我们通过尾静脉注射ConA(20 mg/kg)建立自身免疫性肝炎小鼠模型<sup>[12]</sup>(图3A),之后治疗并观察各实验组小鼠生存率( $N=9$ ),结果发现,与Ctrl组(生存率为0%)相比,Enbrel(Etanercept, 恩利)(5 mg/kg,腹腔,给药3次)、C87(腹腔,12.5 mg/kg,给药3次)和C87 NP(静脉,12.5 mg/kg,给药1次)三个治疗组生存率明显升高,分别为88.9%、77.8%和66.7%,均具有显著统计学差异( $P<0.05$ );Enbrel(1) (5 mg/kg,腹腔,给药1次)、C87(1) (12.5 mg/kg,腹腔,给药1次)两个治疗组生存率分别为25.0%和12.5%,与Ctrl组相比无显著统计学差异(图3B)。

实验病理结果显示:ConA注射12 h后,Ctrl组小鼠肝脏明显呈深黑色,并伴有肝细胞大量坏死及大量炎性细胞浸润,而三个治疗组小鼠肝脏虽然也存在炎性细胞浸润及坏死情况,但与Ctrl组相比,损伤程度明显减轻(图3C和3D)。

各实验组小鼠血清分析结果表明:ConA注射后12 h,对照组中AST、ALT水平显著升高(1081.2 U/L,  $P<0.01$ ; 2819.7 U/L,  $P<0.01$ ),三个给药组C87组、C87 NP组、Enbrel组中血清AST、ALT水平显著低于Ctrl组( $P<0.05$ )。C87 NP治疗组小鼠血清中转氨酶水平显著降低,提示该治疗组小鼠肝损伤明显减轻(图3F)。

此外,我们还通过ELISA检测小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 水平,结果显示,对照组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 水平显著升高(356.6 pg/mL,  $P<0.001$ ; 506.7 pg/mL,  $P<0.01$ ),而三个治疗组的TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 水平显著低于Ctrl组( $P<0.05$ ),结果提示,C87 NP预给药治疗可降低模型小鼠体内TNF- $\alpha$ 与TNF- $\beta$ 的表达水平,进而减轻小鼠肝损伤(图3G)。为了更全面地了解治疗前后模型鼠中炎症因子水平及变化,我们又采用LEGENDplex™来测定小鼠血清中炎症因子的表达水平,结果显示:ConA诱导后12 h,对照组小鼠血清中13种炎症相关因子(IL-23、IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL12P70、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-6、IL-27、IL-17A、MCP-1、GM-CSF)的表达水平显著上升( $P<0.05$ ),而经过C87 NP预给药治疗的小鼠

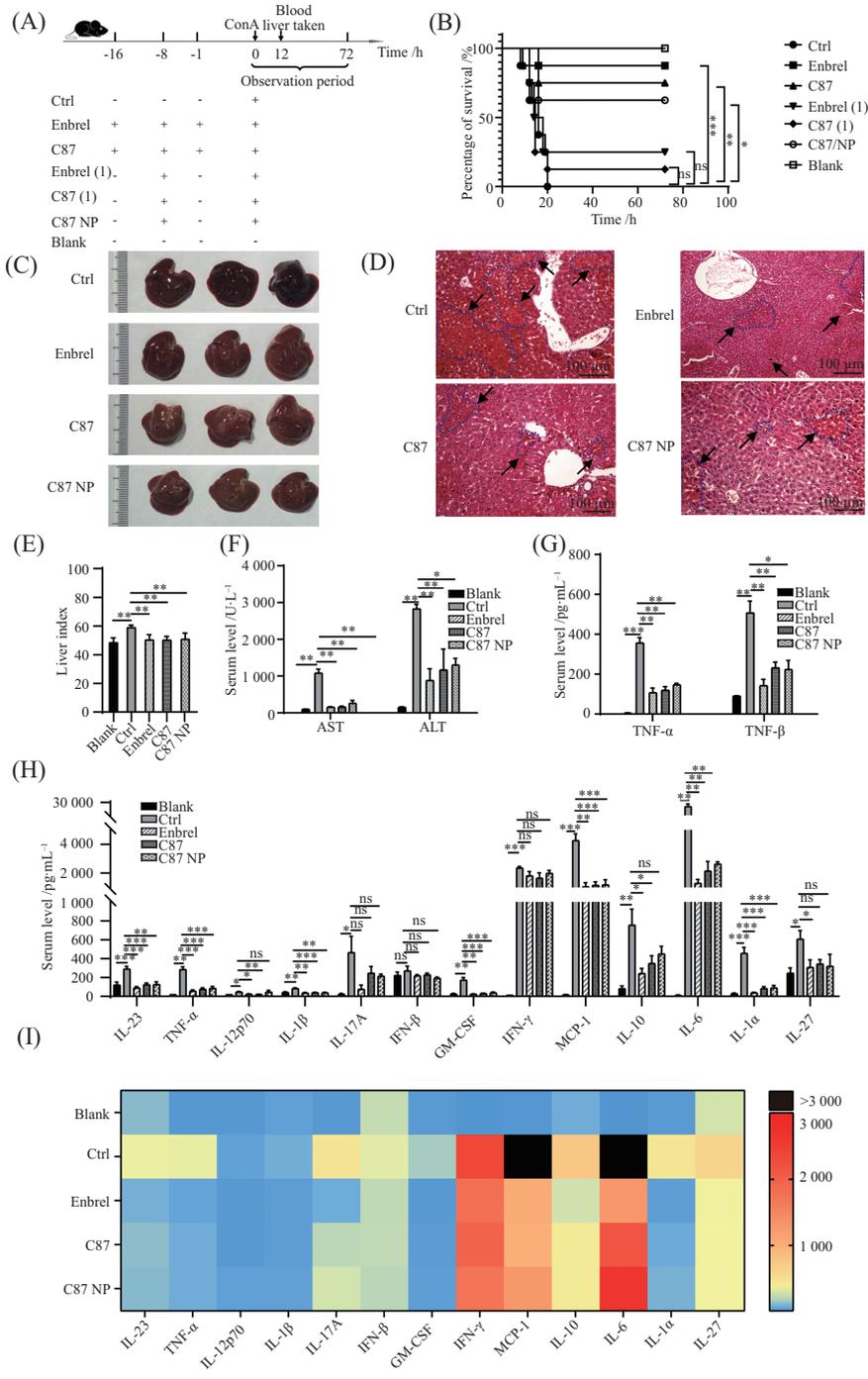


A: 经hTNF- $\alpha$ (Ctrl组)、hTNF- $\alpha$ +Enbrel(Enbrel组)、hTNF- $\alpha$ +C87(C87组)或hTNF- $\alpha$ +C87 NP(C87 NP组)处理L929细胞后,光镜下观察各实验分组中L929细胞的形态; B: C87和C87 NP实验组中L929细胞的存活率; C: 蛋白印迹法分析各实验组凋亡相关蛋白的表达情况; D: 蛋白印迹结果的灰度值分析。Blank组: 未加任何药物; Ctrl组: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ ; C87组: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ +25  $\mu\text{mol/L}$  C87; C87 NP组: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ +25  $\mu\text{mol/L}$  C87 NP; Enbrel组: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ +1  $\mu\text{g/mL}$  Enbrel。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。

A: morphology of L929 cells after treated with hTNF- $\alpha$  alone (Ctrl group), hTNF- $\alpha$  and Enbrel (Enbrel group), hTNF- $\alpha$  and C87 (C87 group) or hTNF- $\alpha$  and C87 NP (C87 NP group); B: survival rate of L929 cells in C87 and C87 NP groups; C: representative Western blot of apoptosis-related proteins expression in the mentioned-above groups; D: gray value analysis of apoptosis-related protein bands. Blank group: no drugs; Ctrl group: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ ; C87 group: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ +25  $\mu\text{mol/L}$  C87; C87 NP group: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ +25  $\mu\text{mol/L}$  C87 NP; Enbrel group: 1 ng/mL TNF- $\alpha$ +1  $\mu\text{g/mL}$  Enbrel。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。

图2 C87 NP抑制了TNF- $\alpha$ 对L929细胞的细胞毒性作用

Fig.2 C87 NP inhibits the cytotoxic effect of TNF- $\alpha$  on L929 cells



A: 小鼠自身免疫性肝炎的分组治疗及分析模式图。采用预防给药方式, Enbrel组(5 mg/kg)和C87(12.5 mg/kg)组于-16 h、-8 h、-1 h分别给药3次, Enbrel(1)组、C87(1)组、C87 NP(12.5 mg/kg)组于-8 h给药1次(单次剂量同上), 观察小鼠72 h; B: 各实验组小鼠生存率曲线; C: 小鼠肝脏外观; D: 小鼠肝脏病理切片H&E染色, 箭头指示代表性的损伤部位(凋亡或坏死); E: 小鼠肝脏指数; F、G: 分析小鼠血清中ALT、AST、TNF-α、TNF-β水平; H: 流式细胞术分析各组小鼠血清中13种炎症相关因子的表达水平; I: 小鼠血清中13种炎症相关因子的表达水平的热图分析。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, ns: 无统计学意义。

A: a diagram of establishment and treatment of autoimmune hepatitis mouse model. Pre-administration were performed at each indicated time point. Enbrel (5 mg/kg) or C87 (12.5 mg/kg) were intraperitoneally administered 3 times at -16 h, -8 h, -1 h in Enbrel group and C87 Group, While, Enbrel(5 mg/kg), C87(12.5 mg/kg), C87 NP (12.5 mg/kg) was administered once at -8 h in Enbrel(1) group, C87(1) group and C87 NP group. The experiments were observed for 72 h; B: the survival rate of each group was recorded; C: morphology of mouse liver collected from each group; D: H&E staining of sections from mentioned-above mouse liver. Arrows indicate representative areas of injury (apoptosis and necrosis); E: liver index of mice; F,G: analysis of ALT, AST, TNF-α and TNF-β content in mouse serum; H: FACS analysis of the expression levels of 13 inflammation-related factors in mentioned-above mouse serum; I: heat map analysis of the expression levels of 13 inflammation-related factors in mouse serum. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, ns: no statistically significant.

图3 C87 NP减轻了ConA诱导的自身免疫性肝炎小鼠的肝损伤

Fig.3 C87 NP attenuates liver damage in mice with ConA-induced autoimmune hepatitis

血清中7种炎症相关因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-23、IL-1 $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、GM-CSF)表达水平明显降低( $P<0.05$ )(图3H和图3I)。以上结果表明: C87 NP预给药治疗不仅可以降低模型鼠体内TNF- $\alpha$ 与TNF- $\beta$ 的表达水平, 还可以降低其他相关联的炎症因子表达水平, 从而降低炎症反应, 减轻模型小鼠的肝损伤。

### 3.4 C87 NP治疗对自身免疫性肝炎小鼠肝脏中免疫细胞浸润的影响

在ConA诱导的自身免疫性肝炎小鼠模型中, 我们发现小鼠肝脏有大量炎性细胞浸润, 经流式分析, 这些细胞主要是T细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞等, 这些细胞及其产生的炎症因子通常被认为与自身免疫性肝炎发生和发展的有着重要联系<sup>[12]</sup>。因此, 为了进一步分析C87 NP治疗对模型小鼠中肝脏细胞浸润的影响, 我们对各实验组ConA诱导12 h后的小鼠的肝脏细胞进行分析, 各组流式示意图如图4A所示, 结果显示: 与空白对照组相比, 实验对照组小鼠肝脏中CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、NK细胞、巨噬细胞和中性粒细胞明显升高( $P<0.05$ )(图4B和图4C), 而C87、C87 NP、Enbrel组治疗后肝脏中CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、NK细胞、巨噬细胞明显降低( $P<0.05$ )。

文献报道, 脾切除术可以改善自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)和肝硬化患者的肝功能和生存率<sup>[13]</sup>, 因此, 我们又对比分析了自身免疫性肝炎小鼠治疗前后脾脏细胞种类、数量和比例的变化, 各组流式示意图如图4D, 结果显示, ConA诱导小鼠12 h后, 对照组T细胞、NK细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数明显上升( $P<0.05$ ); 经预防性治疗后, 各治疗组(C87、C87 NP、Enbrel组) CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK、巨噬细胞数明显低于对照组( $P<0.01$ )(图4E和图4G); 对脾脏Treg细胞比例分析结果显示: 与空白对照组相比, 实验对照组中Treg细胞比例显著下降( $P<0.01$ ), C87 NP和Enbrel治疗组中Treg细胞比例显著上升( $P<0.05$ )(图4F)。

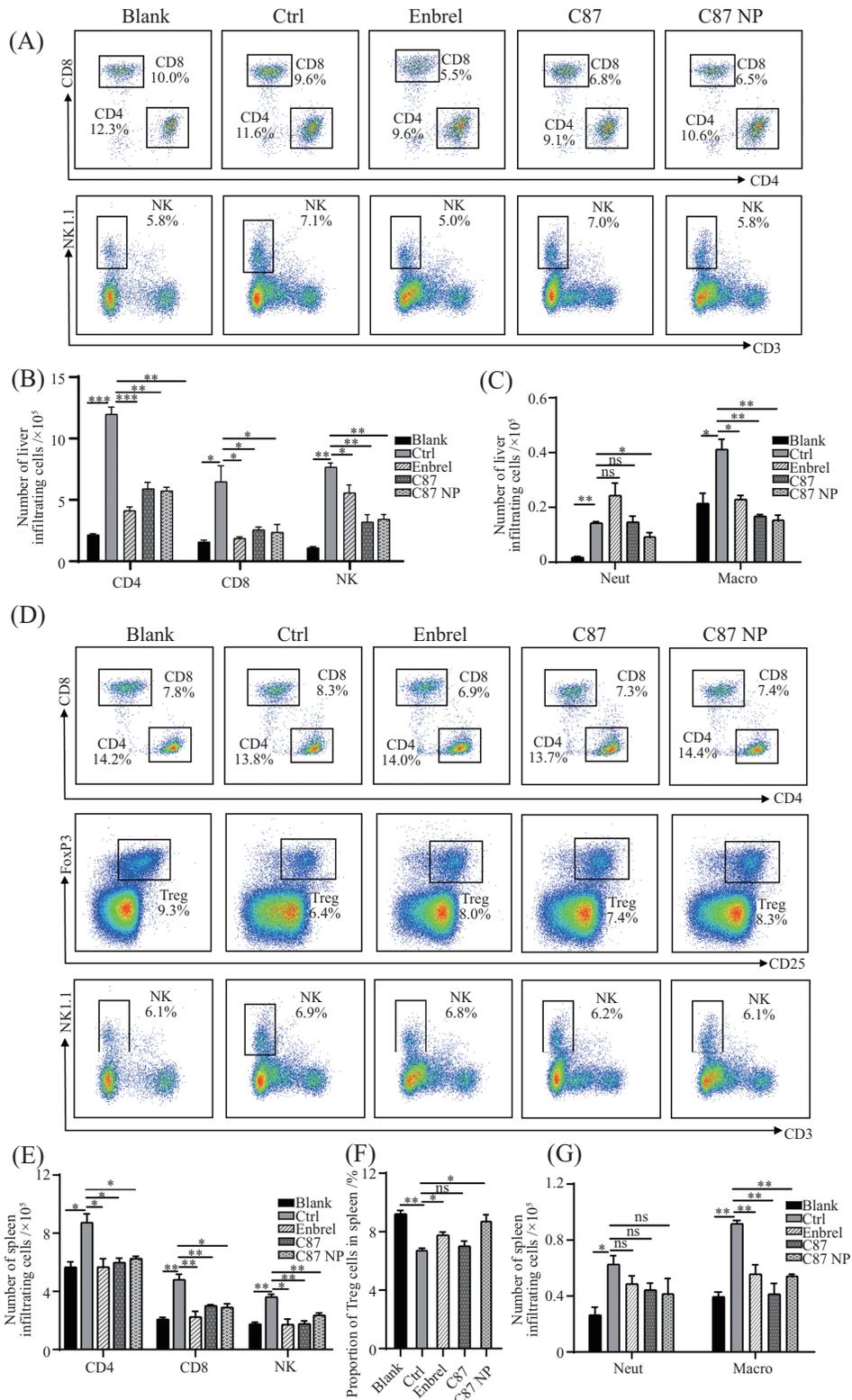
## 4 讨论

血清TNF- $\alpha$ 水平升高通常与感染和炎症、组织损伤、自身免疫性疾病以及一些肿瘤的发生发展相关, 最近也有文献报道其与新冠肺炎的发展和重症化高度相关<sup>[14-15]</sup>, 因此, 阻断TNF- $\alpha$ 能显著的改善这些疾病的症状, 并已成为治疗上述疾病的重要策略<sup>[16]</sup>。目前, 国际上用于靶向抗TNF- $\alpha$ 的药物主要有英夫利

息单抗、依那西普、阿达木单抗和西妥珠单抗聚乙二醇等, 并在临床治疗中取得了安全有效的结果<sup>[11]</sup>, 已成为治疗风湿性关节炎等炎症疾病的首选药物。众所周知, 上述药物均是生物大分子药物, 它们一方面具有特异性好、结合能力强的特点, 但另一方面存在免疫原性<sup>[17]</sup>、供应链复杂性以及健康经济学等诸多不利因素, 限制了其应用推广范围。因此, 研制靶向TNF- $\alpha$ 的小分子抑制剂, 克服上述大分子药物的缺点, 就成为近年来国内外相关研究的热点之一。遗憾的是, 至今未见TNF- $\alpha$ 的小分子抑制剂被批准用于临床应用, 而文献报道的大多数小分子药物因为特异性、亲和性或细胞毒性等原因停留在临床前阶段。在前期的研究中, 我们基于计算机辅助药物设计和虚拟筛选以及细胞活性筛选技术, 也筛选到一个在体外和小鼠体内均能较好抑制TNF- $\alpha$ 细胞毒活性的小分子化合物C87<sup>[3-4]</sup>, 且该化合物与TNF- $\alpha$ 具有较高的亲和性( $K_d=0.11 \mu\text{mol/L}$ )。但由于C87水溶性较差, 动物体内实验时只能采用腹腔给药方式, 药物利用率较低, 严重影响了其在后续相关疾病动物模型上的治疗实验的开展。因此, 优化C87的剂型及给药方式是推动该小分子化合物临床前研究的关键。

近些年来纳米载体在开发缓释和控释等新型药物制剂方面展现其优势<sup>[5-6]</sup>, 表现为增加了不溶性药物的生物利用度, 提高了药物功效<sup>[7-8]</sup>。目前常见的纳米载体主要包括: 胶束、聚合物纳米粒子、脂质体、蛋白纳米粒子、无机纳米粒子等。脂质体因其与细胞膜类似的结构, 具有良好的生物相容性, 长期以来被认为是理想的药物递送材料<sup>[18]</sup>。目前, 临床获批的纳米药物大多属于此类, 如用于肿瘤治疗的脂质体阿霉素, 其不仅提高了药物抗肿瘤疗效, 而且极大地降低了药物的心脏毒性<sup>[19]</sup>。聚合物纳米粒子是近期在纳米制剂领域受到广泛关注的一类纳米载体<sup>[20]</sup>, 它比脂质体具有更高的结构稳定性, 且易于修饰和实现药物控释。脂质-聚合物杂化纳米粒子可结合两者的优点<sup>[21]</sup>, 具有较好的稳定性和生物相容性, 可以有效负载药物, 通过外层脂质-PEG的修饰有效避免纳米药物进入体内后内皮网状系统对其的吞噬清除, 延长纳米药物的体内循环时间<sup>[22]</sup>。

在本研究中, 我们采用工艺简单且重复性好的纳米沉淀法来制备脂质-聚合物杂化纳米粒子, 最终制备出的纳米药物C87 NP具有以下结构特点和



A: 流式细胞术分析各组小鼠肝脏中浸润细胞种类和比例; B: 小鼠肝脏中浸润的CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK细胞数; C: 小鼠肝脏中浸润的中性粒细胞、巨噬细胞数; D: 流式细胞术分析各组小鼠脾脏中浸润细胞种类和比例; E: 小鼠脾脏中浸润的CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK细胞数; F: 小鼠脾脏中的Treg细胞百分比; G: 小鼠脾脏中浸润的性粒细胞、巨噬细胞数。\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, ns: 无统计学意义。

A: FACS analysis of the type and proportion of infiltrating cells in the mouse liver of each group; B: the number of infiltrating CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, and NK cells isolated from the mouse liver of each group; C: the number of infiltrating neutrophils and macrophages isolated from the mouse liver of each group; D: FACS analysis of the type and proportion of infiltrating cells in the mouse spleen of each group; E: the number of infiltrating CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, NK cells isolated from the mouse spleen of each group; F: the percentage of Treg cells in the mouse spleen of each group; G: the number of infiltrating neutrophils and macrophages isolated from the mouse spleen of each group. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, ns: no statistically significant.

图4 C87 NP对自身免疫性肝炎模型小鼠肝脏和脾脏中细胞浸润的影响

Fig.4 Effect of C87 NP on cell infiltration in mice liver and spleen of autoimmune hepatitis model

参数: (1) 可降解的两亲性聚合物PLGA包载C87小分子构成脂质-聚合物杂化纳米粒子的内核(包封率为48.1%), 改善了药物的溶解度并获得较高的药物负载率(载药量为34.4%), 且颗粒大小适中(平均粒径为82.57 nm)、均匀性(多分散系数为0.115)和稳定性好; (2) DSPE-PEG3k插入纳米粒子能使之在体内长时间循环, 提高药物的生物利用度。此外, 我们在体外C87 NP释放动力学实验结果中还证明了该纳米粒子能缓慢释放C87, 且持续时间不少于8 h。综上所述, 我们通过制备载有C87的纳米药物, 解决了该小分子药物制剂难的瓶颈问题, 同时该纳米药物具有缓慢释放的特点。

随后开展的体外实验结果显示: C87 NP在体外能抑制TNF- $\alpha$ 对L929细胞的细胞毒性作用( $IC_{50}=9.13 \mu\text{mol/L}$ ), 并呈现浓度依赖性, 其中的分子机制研究证明, C87 NP阻断了TNF- $\alpha$ 介导的细胞凋亡相关通路。由于TNF- $\alpha$ 是与自身免疫性肝炎发病高度相关的一种炎症因子<sup>[1]</sup>, 因此, 我们又开展了C87 NP防治小鼠自身免疫性肝炎的体内实验研究。研究中我们采用了经典的ConA诱导小鼠自身免疫性肝炎的方法来建立动物疾病模型, 该模型动物的病理特征为血清转氨酶和一些炎症因子(包括TNF- $\alpha$ )水平显著升高, 并伴随着严重的肝区炎症甚至坏死<sup>[23-25]</sup>, 这些特征与人的自身免疫性肝炎的病理特征较为相似。实验中我们采用Etanercept(Enbrel, 恩利)作为阳性对照, 它是可溶性TNF- $\alpha$ 受体p75与IgG1 Fc段偶联的融合蛋白, 可竞争性地结合TNF- $\alpha$ , 阻止其与靶细胞结合。实验结果显示, C87 NP静脉预给药1次(12.5 mg/kg)时, 模型鼠的生存率为66.7%, 远高于腹腔预给药一次的C87(1) (12.5 mg/kg)治疗组生存率(12.5%), 这表明C87 NP取得了比C87更好的体内治疗效果; 从病理结果来看, C87 NP治疗组小鼠肝脏虽存在炎性细胞浸润及坏死情况, 但与Ctrl组相比, 血清中转氨酶水平显著降低, 组织损伤程度明显减轻。此外, 通过分析治疗前后模型鼠中炎症因子水平和浸润细胞种类等免疫相关指标, 我们发现, 与Ctrl组相比, C87 NP预给药治疗一方面可显著降低模型鼠体内TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-23、IL-1 $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、GM-CSF等8种细胞因子的表达水平, 另一方面减少了CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、NK、巨噬细胞等对肝脏和脾脏的浸润, 从而降低了炎症反应, 减轻了模型小鼠的肝

损伤。此外, 与Ctrl组相比, C87 NP和Enbrel治疗组脾脏中Treg细胞比例显著上升( $P<0.05$ ), 这表明治疗组小鼠的免疫抑制细胞可能被激活, 负调控体内的免疫应答, 至于TNF- $\alpha$ 抑制剂是通过怎样的作用机制来影响Treg细胞比例的, 这有待今后相关研究的开展。

总之, C87 NP的成功制备增加了C87药物的静脉给药途径, 在不影响药物体内外活性的基础上, 延长了药物在体内的循环时间, 而且提高了不溶性药物的生物利用度和药物功效。接下来, 我们将进一步优化C87 NP的纳米包载体系, 放大制备工艺, 为加快推动TNF- $\alpha$ 小分子抑制剂C87临床前相关研究的开展奠定实验基础。

### 参考文献 (References)

- [1] BRENNER D, BLASER H, MAK T W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(6): 362-74.
- [2] PRIETO-PENA D, DASGUPTA B. Biologic agents and small-molecule inhibitors in systemic autoimmune conditions: an update [J]. *Pol Arch Intern Med*, 2021, 131(2): 171-81.
- [3] MA L, GONG H, ZHU H, et al. A novel small-molecule tumor necrosis factor alpha inhibitor attenuates inflammation in a hepatitis mouse model [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(18): 12457-66.
- [4] MA L, SHE C, SHI Q, et al. TNFalpha inhibitor C87 sensitizes EGFRvIII transfected glioblastoma cells to gefitinib by a concurrent blockade of TNF alpha signaling [J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(3): 606-17.
- [5] PATRA J K, DAS G, FRACETO L F, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects [J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 71.
- [6] FARJADIAN F, GHASEMI A, GOHARI O, et al. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2019, 14(1): 93-126.
- [7] SHI J, KANTOFF P W, WOOSTER R, et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(1): 20-37.
- [8] BEIK J, KHADEMI S, ATTARAN N, et al. A nanotechnology-based strategy to increase the efficiency of cancer diagnosis and therapy: folate-conjugated gold nanoparticles [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(39): 4399-416.
- [9] KAPOOR D N, BHATIA A, KAUR R, et al. PLGA: a unique polymer for drug delivery [J]. *Ther Deliv*, 2015, 6(1): 41-58.
- [10] WANG H J, LI M Q, LIU W, et al. Gelatin promotes murine fibrosarcoma L929 cell detachment and protects the cells from TNF alpha-induced cytotoxicity [J]. *Connect Tissue Res*, 2016, 57(4): 262-9.
- [11] WILLRICH M A, MURRAY D L, SNYDER M R. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases [J]. *Transl Res*, 2015, 165(2): 270-82.

- [12] HEYMAN F, HAMESCH K, WEISKIRCHEN R, et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice [J]. *Lab Anim*, 2015, 49(1 Suppl): 12-20.
- [13] WANG Y, GUO X, JIAO G, et al. Splenectomy promotes macrophage polarization in a mouse model of concanavalin A-(ConA-) induced liver fibrosis [J]. *Biomed Res Int*, 2019, doi: 10.1155/2019/5756189.
- [14] KEMPURAJ D, SELVAKUMAR G P, AHMED M E, et al. COVID-19, mast cells, cytokine storm, psychological stress, and neuroinflammation [J]. *Neuroscientist*, 2020, 26(5/6): 402-14.
- [15] RIZK J G, KALANTAR-ZADEH K, MEHRA M R, et al. Pharmac-immunomodulatory therapy in COVID-19 [J]. *Drugs*, 2020, 80(13): 1267-92.
- [16] VARFOLOMEEV E, VUCIC D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease [J]. *Cytokine*, 2018, doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.035.
- [17] MEHTA P, MANSON J J. What is the clinical relevance of TNF inhibitor immunogenicity in the management of patients with rheumatoid arthritis [J]? *Front Immunol*, 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.00589.
- [18] GHANDEHARI H, CHAN H K, HARASHIMA H, et al. Advanced drug delivery 2020-Parts 1,2 and 3 [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, doi:10.1016/j.addr.2020.11.003.
- [19] BARENHOLZ Y. Doxil(R)—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned [J]. *J Control Release*, 2012, 160(2): 117-34.
- [20] EL-SAY K M, EL-SAWY H S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2017, 528(1/2): 675-91.
- [21] MUKHERJEE A, WATERS A K, KALYAN P, et al. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, doi:10.2147/IJN.S198353.
- [22] DOS SANTOS N, ALLEN C, DOPPEN A M, et al. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(6): 1367-77.
- [23] SHINOHARA Y, TSUKIMOTO M. Adenine nucleotides attenuate murine T cell activation induced by concanavalin A or T cell receptor stimulation [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi:10.3389/fphar.2017.00986.
- [24] ZHENG W, DU S, TIAN M, et al. *Lepidium meyenii* walp exhibits anti-inflammatory activity against ConA-induced acute hepatitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, doi:10.1155/2018/8982756.
- [25] JI Y R, KIM H J, BAE K B, et al. Hepatic serum amyloid A1 aggravates T cell-mediated hepatitis by inducing chemokines via Toll-like receptor 2 in mice [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(20): 12804-11.