doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.14.004

基于巨噬细胞的诊疗一体化系统*

朱欣迪 朱茂华 高宇豪 陆 琴 方 超⁴ (上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:建立一种可以同时实现显像诊断与主动靶向到肿瘤部位进行治疗的纳米药物模型。方法:包载了 1,1'- 二十八烷基 -3, 3,3',3'- 四甲基吲哚三碳花青碘(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide, DiR)荧光染料的聚乳酸 - 羟基乙酸 共聚物(Polylactic-co-glycolic acid, PLGA)纳米粒表面被金属离子与酚羟基络合形成的网状结构涂布后可稳定连接在巨噬细胞表 面,DiR 可以在近红外激光下实现荧光成像,并经波长为 808 nm 的近红外激光器以 2 W/cm² 功率照射,产生光热作用。结果:构建 了粒径在 100 nm 左右的包载了 DiR 的 PLGA 纳米粒,表面涂布金属多酚网状结构后,纳米粒连接到巨噬细胞表面,DiR 发挥既 可荧光成像,经 808 nm 激光照射后又可高效升温至 46 ℃以上,使用 CCK8 试剂检测证明此种连接了纳米粒的功能化细胞(Functional Cell)发挥光热作用后可杀死近 70% 的小鼠乳腺癌细胞 4T1。结论:成功建立了一种基于巨噬细胞递送的诊疗一体化系统, 将荧光成像与光热治疗有机结合到一起,达到有效杀伤肿瘤细胞的功效。

关键词:诊疗一体化;活细胞递送;荧光成像;光热治疗

中图分类号: R-33; R730.5; R91 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2020) 14-2618-05

Macrophage-Based Theranostic System*

ZHU Xin-di, ZHU Mao-hua, GAO Yu-hao, LU Qin, FANG Chao^A

(Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To establish a nano drug model that can realize imaging diagnosis and active targeting to tumor site for treatment at the same time. **Methods:** Coating the PLGA (polylactic acid glycolic acid copolymer) nanoparticles loaded with DiR fluorescent dye with metal polyphenols in surface. Then made the nanoparticles connected to the surface of macrophages. Fluorescence imaging was performed under confocal microscope because of DiR, and the photothermal effect was achieved by near-infrared laser with wavelength of 808 nm in 2 W/cm². **Results:** PLGA nanoparticles with the size about 100 nm loaded with DiR were connected to the surface of macrophages by metal polyphenol complex. Under the action of DiR, fluorescence imaging was realized, and the temperature rose up to over 46 °C, CCK8 test showed that the functionalized cells connected with nanoparticles could kill nearly 70% of mouse breast cancer cells 4T1 after photothermal effect. **Conclusion:** A diagnosis and treatment integrated model based on living cell delivery has been successfully established, which combines fluorescence imaging with photothermal therapy to effectively kill tumor cells.

Key words: Theranostics; Macrophage delivery system; Fluorescence imaging; Photothermal therapy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R730.5; R91 Document code: A Article ID: 1673-6273(2020)14-2618-05

前言

诊疗一体化技术在过去二十几年里经过飞速发展,其所涉 及的领域已涵盖了分子荧光探针技术¹¹、以影像指导的分子疗 法¹²、纳米诊疗技术¹³等多个方面。如何在一种药物上同时实现 诊疗一体化,可以通过改造纳米载体,选择大尺寸载体平台使 得多功能纳米材料附着于同一载体表面,活细胞作为纳米载体 不但可以在表面上实现高的配体密度用于靶向目的¹⁴,也可以 携带多种药物和/或显像剂的纳米尺寸材料。肿瘤附近常常伴 有炎症反应,许多肿瘤药物也利用这一特点促使药物靶向炎症 因子的特点¹⁵⁻¹,而这正是免疫细胞的优势。但由于活细胞本身 特性所限,如何解决其吞噬能力强^[89],存活时间短是首先要考虑的问题,有研究表明将金属离子与酚羟基络合形成的网状结构有助于保护纳米粒不被细胞吞噬^[10]。基于以上背景,我们提出一种多模式诊疗一体化的活细胞递送系统模型,可稳定装载包载了 DiR 的 PLGA 纳米粒,并选择广泛应用的鼠源巨噬细胞系 RAW 264.7 作为载体系统^[11],在巨噬细胞的趋化作用下高效靶向到肿瘤部位从而实现荧光成像及光热杀伤肿瘤细胞的疗效。

材料与方法

^{1.1} 实验材料与试剂

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81773274)

作者简介:朱欣迪,女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤靶向递送系统,E-mail: Cindyzh1000@163.com

[△] 通讯作者:方超,男,博士生导师,教授,主要研究方向:肿瘤靶向递送系统,E-mail: fangchao32@sjtu.edu.cn,电话:021-63846590-778013 (收稿日期:2019-12-24 接受日期:2020-01-21)

丹宁酸(Tannic acid, TA,98%)购自上海源叶生物化学试 剂有限公司;氯化铜(CuCl₂),胆酸钠(98%),3- 吗啉丙磺酸 (MOPS,98%)购自上海吴才有限公司;二氯甲烷(CH₂Cl₂)购自 国药化学试剂公司;PLGA(乳酸:羟基乙酸为75:25,MW)购自 德国 EVONIK 公司;DiR 探针购自美国赛默飞公司;CCK-8 试 剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司;4T1 乳腺癌细胞购自 Caliper Life Science 公司 (Hopkinton MA);RAW 264.7 巨噬细 胞购自美国 ATCC。

1.2 实验仪器

Malvern Zetasizer Nano ZS 动态光散射(dynamic light scattering, DLS)激光粒度仪购自英国 Malvern 公司; MS2 型涡旋振 荡器购自德国 IKA 公司; S-450D 组织破碎超声仪购自美国 Branson 公司; 酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司; CM-120 透 射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)购自荷 兰 Philips 公司; LSM5 激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公 司; Sorvall ST16 冷冻离心机购自美国赛默飞公司。

1.3 实验方法

1.3.1 DiR@PLGA 纳米粒的制备 精密称取 30 mg PLGA 溶 于 930 μL CH₂Cl₂, 70 μg DiR 荧光探针溶于 70 μL 的 CH₂Cl₂, 二者涡旋混匀,此为油相;制备 ω=1%胆酸钠水溶液为水相。向 1 mL 油相中加入 3 mL 水相,组织破碎仪超声 25 s(200 W),得 到初乳倒入 40 mL 0.5%胆酸钠水溶液,搅拌分散 40-50 min。待 有机溶剂挥发后超纯水离心水洗两次 (12000× g, 30 min),最 后超纯水复溶成 1 mg/mL 溶液,即为包载了 DiR 的 PLGA (DiR@PLGA)纳米粒水溶液。

1.3.2 金属多酚网络涂布 DiR@PLGA 取上述制得的 DiR@PLGA 水溶液 200 μL,加入 20 μL 丹宁酸(TA)水溶液 (24 mM),涡旋震荡后再加入 20 μL 氯化铜(CuCl₂)水溶液 (24 mM),涡旋摇匀,加入 150 μL pH 8.0 的 3- 吗啉基丙磺酸 (MOPS)缓冲液,震荡孵育 30 min;超纯水离心水洗 2 次(8000× g, 15 min),最后用超纯水复溶得到金属多酚网络涂布 DiR@PL-GA(Metal-Polyphenol Nanoparticles, MPN)。 1.3.3 纳米粒涂布前后粒径表征 用马尔文激光粒径仪检测 金属多酚涂布前后 DiR@PLGA 纳米粒分别在水中的粒径分布 与 Zeta 电位。另将涂布前后的纳米粒分别等量稀释后滴在铜 网上,用 TEM 观察涂布与否对纳米粒尺寸与外观的影响。

1.3.4 **巨噬细胞表面功能化** 取 200 μL 1 mg/mL 涂布后的 DiR@PLGA 纳米粒与 10⁶ 个巨噬细胞混合,迅速加入 20 μL CuCl₂ 水溶液(24 mM),混匀后加 150 μL pH 8.0 的 MOPS 缓冲 液,摇匀孵育 5-10 min,离心弃游离纳米粒(800× g,5 min), PBS 复溶。

1.3.5 DiR 标准曲线绘制 准确称量 12.5,25,50,100,200 µg DiR 染料溶于 1 mL DMSO 中,使用酶标仪定量检测 DiR 在 Ex= 650 nm Em=795 nm 下的荧光值,制得 DiR 荧光标准曲线。 1.3.6 功能化细胞荧光成像及光热疗效 制得的功能化细胞 测定荧光值确定携带 DiR 质量,调整 配制相同浓度的 DiR@PLGA 溶液,在 96 孔板中每组分别加入 200 µL,设立 5 个复孔,经 808 nm 近红外激光以 2 W/cm² 照射 10 min,实时测 定孔板内溶液升温情况;将 4T1(小鼠乳腺癌)细胞以 10⁴ 个 / 孔的密度接种于 96 孔板中,分别取功能化细胞及游离纳米粒 溶液 200 µL 加入到种有肿瘤细胞的孔板内,设立 2 个复孔,同 样条件激光照射 10 min,弃上清,补加 200 µL 基础培养基,37 ℃细胞培养箱内孵育 24 h,将上清液换为含 10% CCK8 试剂的 基础培养基 100 µL,37℃细胞培养箱内孵育 1 h 左右,酶标仪 450 nm 处测吸光度。

1.4 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7 软件处理数据,结果以 Mean± SD 表示,组间比较采用 t 检验, P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DiR@PLGA 表征

制备得到 DiR@PLGA 透射电镜图和粒径分布图如下,纳 米粒粒径在 101.3±0.6 nm 左右,PDI 为 0.064±0.012,Zeta 电 位为 -35.6±1.9 mV。





图 1 DiR@PLGA 透射电镜图(A) 及粒径分布(B) Fig.1 Transmission electron microscope image of DiR@PLGA (A);

Particle size and size distribution (B)

2.2 金属多酚涂布 DiR@PLGA 表征

纳米粒涂布后的透射电镜图和粒径分布图如下,可以看到 纳米粒表面有一层厚度在 7.5 nm 左右的壳状结构,使得纳米 粒粒径增至 116.9± 3.7 nm 左右, PDI 为 0.060± 0.013, Zeta 电 位也变为 -26.9± 0.2 mV 左右。





表 1 DiR@PLGA、MPN 粒径、表面电势分布 Table 1 Size distribution and zeta potential of DiR@PLGA, MPN

Nanoparticles	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
DiR@PLGA	101.3± 0.6	0.064± 0.012	-35.6± 1.9
MPN	116.9± 3.7	0.060± 0.013	-26.9± 0.2

2.3 功能化细胞荧光成像及光热效果

将涂布后的纳米粒与巨噬细胞连接得到功能化细胞,孵育2h后在激光共聚焦显微镜下观察,可看到纳米粒稳定留在细胞表面不被吞噬。此功能化细胞在 808 nm 激光以 2 W/cm² 的

功率照射 10 min,发现其温度可升至 47℃,与等量 DiR@PLGA 纳米粒升温效果(48.1℃)基本相当,有充分的肿瘤杀伤能力^[12,13],而 PBS 组仅升至 28.7℃。



Fig.3 Fluorescence image (A) and temporal temperature evolutions (B) of functional cell

2.4 功能化细胞载药量

经酶标仪检测得到 DiR 荧光标准曲线如图所示,将连接了 DiR@PLGA 的功能化细胞 10%mL 经 DMSO 溶解后测荧光值,带入标准曲线中得出功能化细胞携带 DiR 的量为 10 pg/ 个。

2.5 功能化细胞对肿瘤细胞杀伤效果

CCK8 试验结果显示,普通肿瘤细胞经 808 nm 激光以

2 W/cm² 照射 10 min 后细胞活力基本不受影响,肿瘤细胞与功能化细胞共孵育 2h 后仍保持 92.8%活性,说明功能化细胞本身对肿瘤细胞基本无毒性,但经激光照射 10 min 后,细胞活性降为 32.8%,说明光热杀伤肿瘤细胞,且差异具有统计学意义(P<0.01)。





Fig.5 Cell viability of functional cells against 4T1 tumor cells Note: Data are expressed as mean± SD, n=3. ****P*<0.001, compared with DNP@M without laser.

3 讨论

恶性肿瘤的诊疗一体化应用于临床层面中无论是在个体 化治疗方面、药物实时监控及反馈纳米药物治疗效果等均存在 巨大潜力。目前有许多纳米平台可以结合成像与治疗用于高效 安全的治疗方案中,主要利用光^[4]、磁^[15]、声^[16]等手段用于诊疗。 如何在一种药物上同时实现多模式诊疗一体化,目前传统思路 是经过复杂的修饰方法构建一种纳米载体,使其在纳米级尺寸 上具备多种诊疗功能^[17,18]。这种纳米载体虽然尺寸小,可通过增 强渗透和保留(EPR)效应被动靶向到肿瘤部位^[19,20],但往往构建 方法繁琐复杂,不易重复,更难以投入生产。

克服以上限制的一个思路是改造纳米载体,选择更大尺寸 的载体平台使得多种功能特性的纳米材料均可同时附着于同 一载体表面,选择活细胞作为纳米载体可提高药物靶向性,并 有效减少机体自身免疫反应^[21]。因活细胞尤其是免疫细胞的固 有特性可以高效趋化到肿瘤等炎症部位^[22],实现主动靶向作 用。活细胞作为纳米载体不但可以在表面上实现高的配体密度 用于靶向目的,也可以携带多种药物和/或显像剂的纳米尺寸 材料。纳米载体的家族包括聚合共轭化合物,聚合物纳米颗粒, 树枝状大分子,碳纳米管、四氧化三铁纳米颗粒、纳米壳和纳米 笼^[23]。这些纳米载体的应用十分广泛,已经被研究用于各种用 途,例如药物递送、成像、肿瘤的光热消融、凋亡的检测等。虽然 关于活细胞递送的研究主要集中在将药物吞噬到细胞内部运 送到靶部位,但细胞内环境复杂,装载的药物多数都会被载体 细胞消化分解,极大降低载药率^[24]。故而我们选择将纳米药物 装载到细胞外部,更有利于保护纳米药物运送过程中不被损耗。

关于如何将纳米药物稳定装载在细胞表面,我们通过调研 发现金属离子与具有多酚结构的有机物在弱碱性环境下经过 络合反应可自发形成网状结构附着于两性介质表面^[25],反应快 速高效,经涡旋震荡后仅需几分钟到十几分钟即形成,且反应 原料绿色可降解^[26],金属多酚网络的形成快速稳定,但在酸性 条件或 EDTA 螯合作用下可解离^[27]。这为我们将多种类型的纳 米粒结合于细胞表面提供了一种良好可行的方法。另外所选用 的金属离子也有广泛的可选择性,可以根据需求更改^[28,29]、或增 加^[30]用于锚定的金属离子,丰富了此种模型的适用性。 本文的创新之处在于提供了一种以活细胞为载体携带同 时具有荧光成像及光热疗效的纳米药物的主动靶向药物模型。 同时这种药物模型具有广泛的开发前景,因为其金属多酚网络 对于纳米粒的包裹固定作用是稳定高效,且无选择性的,那么 相应地,也可以将其他类型纳米粒表面涂布金属多酚网络后, 用金属离子将其固定在活细胞表面,发挥多重功效,形成多模 式的诊疗一体化模型,后续计划对多种不同类型的纳米涂布相 同的金属多酚网络后观察其是否可以无选择特异性地连接到 活细胞表面,在细胞主动靶向作用下富集到肿瘤部位,发挥其 特有功效。

参考文献(References)

- Fernandez-Llamazares AI. 66th Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting [J]. Drug Future, 2019, 44(7): 605-612
- [2] Finas D, Baumann K, Sydow L, et al. SPIO Detection and Distribution in Biological Tissue-A Murine MPI-SLNB Breast Cancer Model[J]. Ieee T Magn, 2015, 51(2) DOI:10.1109/TMAG.2014.2358272
- [3] Ou HL, Li J, Chen C, et al. Organic/polymer photothermal nanoagents for photoacoustic imaging and photothermal therapy in vivo [J]. Sci China Mater, 2019, 62(11): 1740-1758
- [4] Stephan MT, Stephan SB, Bak P, et al. Synapse-directed delivery of immunomodulators using T-cell-conjugated nanoparticles[J]. Biomaterials, 2012, 33(23): 5776-5787
- [5] Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours[J]. Nat Rev Mater, 2016, 1(5): 12
- [6] Zhao Q, Chu Z, Zhu L, et al. 2-Deoxy-d-Glucose Treatment Decreases Anti-inflammatory M2 Macrophage Polarization in Mice with Tumor and Allergic Airway Inflammation[J]. Front Immunol, 2017, 8: 637
- [7] Reichel D, Tripathi M, Perez JM. Biological Effects of Nanoparticles on Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment[J]. Nanotheranostics, 2019, 3(1): 66-88
- [8] Bah A, Vergne I. Macrophage Autophagy and Bacterial Infections[J]. Front Immunol, 2017, 8 DOI:10.1038/natrevmats.2016.14
- [9] Mowat AM, Scott CL, Bain CC. Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges[J]. Nat Med, 2017, 23(11): 1258-1270
- [10] Guo JL, Tardy BL, Christofferson AJ, et al. Modular assembly of su-

perstructures from polyphenol-functionalized building blocks [J]. Nat Nanotechnol, 2016, 11(12): 1105-1111

- [11] Zheng HL, Li JQ, Luo X, et al. Murine RAW264.7 cells as cellular drug delivery carriers for tumor therapy: a good idea? [J]. Cancer Chemoth Pharm, 2019, 83(2): 361-374
- [12] Drake P, Cho HJ, Shih PS, et al. Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumour therapy via magnetic field hyperthermia[J]. J Mater Chem, 2007, 17(46): 4914-4918
- [13] Wang DD, Wu HH, Zhou JJ, et al. In Situ One-Pot Synthesis of MOF-Polydopamine Hybrid Nanogels with Enhanced Photothermal Effect for Targeted Cancer Therapy [J]. Adv Sci, 2018, 5 (6) DOI: 10.1002/advs.201800287
- [14] Tao W, Ji XY, Zhu XB, et al. Two-Dimensional Antimonene-Based Photonic Nanomedicine for Cancer Theranostics[J]. Adv Mater, 2018, 30(38)DOI: 10.1002/adma.201802061
- [15] Wu MY, Zhang HX, Tie CJ, et al. MR imaging tracking of inflammation-activatable engineered neutrophils for targeted therapy of surgically treated glioma [J]. Nat Commun, 2018, 9 DOI:10.1038/ s41467-018-07250-6
- [16] Paris JL, Cabanas MV, Manzano M, et al. Polymer-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles as Ultrasound-Responsive Drug Carriers [J]. Acs Nano, 2015, 9(11): 11023-11033
- [17] Lv RC, Yang PP, Hu B, et al. In Situ Growth Strategy to Integrate Up-Conversion Nanoparticles with Ultrasmall CuS for Photothermal Theranostics[J]. Acs Nano, 2017, 11(1): 1064-1072
- [18] Su XJ, Zhao FF, Wang YH, et al. CuS as a gatekeeper of mesoporous upconversion nanoparticles-based drug controlled release system for tumor-targeted multimodal imaging and synergetic chemo-thermotherapy[J]. Nanomed-Nanotechnol, 2017, 13(5): 1761-1772
- [19] Bertrand N, Wu J, Xu XY, et al. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2014, 66: 2-25
- [20] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lower-

ing of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2013, 65(1): 71-79

- [21] Couvreur P, Kante B, Roland M, et al. Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1979, 68(12): 1521
- [22] Geissmann F. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells (vol 327, pg 656, 2010)[J]. Science, 2010, 330(6009):1318-1318
- [23] Kievit FM, Zhang MQ. Cancer Nanotheranostics: Improving Imaging and Therapy by Targeted Delivery Across Biological Barriers[J]. Adv Mater, 2011, 23(36): H217-H247
- [24] Silva AKA, Di Corato R, Pellegrino T, et al. Cell-derived vesicles as a bioplatform for the encapsulation of theranostic nanomaterials[J]. Nanoscale, 2013, 5(23): 11374-11384
- [25] Kim BJ, Han S, Lee KB, et al. Biphasic Supramolecular Self-Assembly of Ferric Ions and Tannic Acid across Interfaces for Nanofilm Formation[J]. Adv Mater, 2017, 29(28) DOI: 10.1002/adma.201700784
- [26] Ejima H, Richardson JJ, Caruso F. Metal-phenolic networks as a versatile platform to engineer nanomaterials and biointerfaces [J]. Nano Today, 2017, 12: 136-148
- [27] Ejima H, Richardson JJ, Liang K, et al. One-Step Assembly of Coordination Complexes for Versatile Film and Particle Engineering[J]. Science, 2013, 341(6142): 154-157
- [28] Liu T, Zhang MK, Liu WL, et al. Metal Ion/Tannic Acid Assembly as a Versatile Photothermal Platform in Engineering Multimodal Nanotheranostics for Advanced Applications [J]. Acs Nano, 2018, 12(4): 3917-3927
- [29] Li K, Xiao G, Richardson JJ, et al. Targeted Therapy against Metastatic Melanoma Based on Self-Assembled Metal-Phenolic Nanocomplexes Comprised of Green Tea Catechin[J]. Adv Sci, 2019, 6(5) DOI: 10.1002/advs.201801688
- [30] Xing RR, Zou QL, Yuan CQ, et al. Self-Assembling Endogenous Biliverdin as a Versatile Near-Infrared Photothermal Nanoagent for Cancer Theranostics [J]. Adv Mater, 2019, 31 (16) DOI: 10.1002/adma.201900822

(上接第2650页)

- [24] 石乐娟, 贾小婷, 罗利云, 等. LncRNA RP11-316M1.12 促进乳腺癌 细胞侵袭转移[J].中国医师杂志, 2018, 20(11): 16-20
- [25] Yu C, Liu Q, Chen C, et al. Landscape perspectives of tumor, EMT, and development[J]. Phys Biol, 2019, 16(5): 051003
- [26] Arps DP, Healy P, Zhao L, et al. Invasive ductal carcinoma withlobular features: a comparison study to invasive ductal and invasivelobular carcinomas of the breast [J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 138(3): 719-726
- [27] Caliari D, Zappulli V, Rasotto R, et al. Triple-negative vimentin-positive heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential compar-

ative model for breast cancer[J]. BMC Vet Res, 2017, 10(13): 185-187

- [28] Maehira H, Miyake T, Iida H, et al. Vimentin Expression in Tumor Microenvironment Predicts Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Heterogeneity in Fibroblast Population [J]. Ann Surg Oncol, 2019, 26(13): 4791-4804
- [29] Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, et al. Vimentin as a poorprognostic factor for triple-negative breast cancer [J]. J CancerRes Clin Oncol, 2017, 139(5): 739-746
- [30] Yu JM, Sun W, Hua F, et al. BCL6 induces EMT by promoting the ZEB1-mediated transcription repression of E-cadherin in breastcancer cells[J]. Cancer Lett, 2016, 365(2): 190-200