

# 载紫杉醇的 pH 敏感型热休克蛋白纳米载体的肿瘤细胞摄取特性及药理学评估

杨惠卿<sup>1</sup>, 王喻<sup>1</sup>, 骆红飞<sup>1</sup>, 赵子明<sup>2\*</sup>

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005; 2. 徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221004)

**摘要:** 为探究载紫杉醇 (PTX) 的 pH 敏感型热休克蛋白 (HSP) 纳米载体的肿瘤细胞摄取特性及药理学活性, 采用荧光分光光度法分析不同相对分子质量和投料比聚乙二醇丙烯酸共聚物 (PSPA) 制备的 pH 敏感型热休克蛋白纳米载体 (PT-HSP) 的细胞摄取情况; 采用台盼蓝染色法分析载紫杉醇的 PT-HSP 对肿瘤细胞的选择性杀伤能力; 通过树脂天青法分析其细胞毒性并进行溶血试验; 并对 PT-HSP 被肿瘤细胞摄取的机制进行探讨。结果显示, 当 PT-HSP 中的 PSPA 相对分子质量达到 6 K 且与 HSP 亚基的摩尔比为 2:1 时, 可以显著抑制正常细胞对 PT-HSP 的摄取, 而不影响肿瘤细胞对其大量摄取, 说明其良好的体外肿瘤靶向性; 同时, 相比 PTX, 载 PTX 的 PT-HSP 对正常细胞伤害小, 对肿瘤细胞杀伤力强, 并具有良好的生物安全性; 摄取机制结果表明 PT-HSP 可能通过依赖能量的巨胞饮方式以及小窝介导的内吞方式进入肿瘤细胞。综上所述, PT-HSP 能选择性进入肿瘤细胞并释放 PTX 发挥抗肿瘤药效, 有望成为一种安全、有效、智能的抗肿瘤药物载体。

**关键词:** 热休克蛋白; pH 敏感; 靶向传递; 细胞摄取

**中图分类号:** R 944.9 **文献标志码:** A

药物治疗是恶性肿瘤治疗的重要方法之一。传统的抗肿瘤化疗药物靶向性差, 毒副作用大, 患者耐受性差, 很大程度上制约了化疗药物在临床中的应用<sup>[1-2]</sup>, 而纳米粒给药系统由于其独特的尺寸性质和分子结构, 可以将抗肿瘤药物靶向性的输送到指定肿瘤部位, 提高肿瘤部位的药物浓度, 增强杀伤能力, 因而在肿瘤治疗领域中具有较多优势, 已成为国内外研究者最关注的热点之一<sup>[3-5]</sup>。小分子热休克蛋白 (sHSP) 是一种由十几个到二十几个亚基构成的球状笼形空心结构, 其内部空腔可作为药物的载库<sup>[6]</sup>, 且内、外表面都有丰富的可修饰位点<sup>[7]</sup>, 可通过基因工程或化学手段进行改造, 使其具有理想的性能与更多的功能<sup>[8-9]</sup>。

**收稿日期:** 2018-11-29 **录用日期:** 2019-03-02

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81773643); 江苏省高校自然科学基金 (17KJB350014); 浙江省医药卫生科研基金 (2017KY516)

**\*通信作者:** zzm\_chn@sina.com

通过前期的研究和自行设计,已成功构建出对 pH 敏感的 PT-HSP 智能纳米递药载体,载体以笼形蛋白 HSP 作为载药内核,穿膜肽 Tat 通过戊二醛接枝到 HSP 表面得到 T-HSP,最外层为 pH 敏感的聚磺胺嘧啶/聚乙二醇丙烯酸共聚物(PSPA),通过静电相互作用与 T-HSP 结合,制备得到修饰 Tat/PSPA 的 PT-HSP。利用体内肿瘤部位的 pH 比正常组织略低<sup>[10-11]</sup>,PT-HSP 在生理 pH 条件下包衣化,在肿瘤 pH 条件下去包衣化。通过这种 pH 敏感的包衣-去包衣转变,使 Tat 肽在正常组织被掩盖而在肿瘤组织被暴露,实现“智能”的肿瘤靶向性。为进一步地阐明 PT-HSP 智能纳米递药载体进入肿瘤细胞的过程和作用,本研究将 PT-HSP 与人肺癌细胞(A549)以及人宫颈癌细胞(HeLa)共孵育,观察药物入胞情况,探究其影响因素及入胞机制,综合评价载紫杉醇的 PT-HSP 的细胞杀伤能力,分析 PT-HSP 纳米载体的生物相容性,为靶向肿瘤的纳米给药系统提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品及试剂

聚乙二醇 2000 (西陇化工公司);聚乙二醇 4000 (国药集团化学试剂公司);聚乙二醇 6000 (南京化学试剂公司);重组嗜热古细菌(*Methanococcus jannaschii*)热休克蛋白(HSP,上海生工生物工程公司,>85%);Tat 肽(上海生工生物工程公司,>85%);紫杉醇(PTX,西安昊轩生物科技有限公司,93.5%);异硫氰基荧光素(FITC,上海阿拉丁试剂公司);树脂天青(上海阿拉丁试剂公司,≥90%);秋水仙碱(日本东京化成工业株式会社);制霉菌素(美国 BIOSHARP 公司);盐酸氯丙嗪(CPZ,日本东京化成工业株式会社);莫能星钠(上海源叶生物科技有限公司);叠氮钠(国药集团化学试剂有限公司);台盼蓝(K940,南京凯基生物科技有限公司,0.4%);RIPA 裂解液(南京凯基生物科技有限公司)。

#### 1.1.2 仪器

荧光分光光度计(F4500);紫外-可见分光光度计(UV-2450,日本日立公司);冷冻干燥机(FD-1C-50,日本岛津公司);低速离心机(5702,北京博医实验仪器公司);显微镜(CKX31,德国 Eppendorf 公司);倒置荧光显微镜(U-REL-T,TH4-200,TX2-ILL100,日本奥林巴斯公司)。

#### 1.1.3 细胞株和动物

仓鼠肺成纤维细胞(CHL,中国科学院上海细胞库);人肺癌细胞(A549,中国科学院

上海细胞库); 人宫颈癌细胞 (HeLa, 中国科学院上海细胞库); 普通级兔 (徐州医科大学实验动物中心)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞摄取影响因素实验

A549、HeLa 和 CHL 细胞均采用含 10%胎牛血清, 1%双抗的 DMEM 培养基, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

取对数生长期的 CHL 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔置于 24 孔板培养 24 h。弃掉原有培养基, 更换为 pH 7.4 的无血清 DMEM 培养基。分别选择相对分子质量为 2 K、4 K、6 K 的 PSPA 制备的 PT-HSP, 然后向每孔中加入 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 FITC 标记的 T-HSP 与 FITC 标记的 PT-HSP 纳米载体 (称取 4.0 mg Tat 溶于 5 mL DMSO 中, 按照摩尔比 1:2 加入 1.6 mg FITC, 37 °C 搅拌反应 12 h, 将混合液装入透析袋置于水中透析, 4 h 更换透析液一次, 透析 24 h。透析液经凝胶渗透层析柱 (Sephadex G50) 分离游离的 FITC, 收集 FITC 标记的 Tat 即 FITC-Tat, 进一步制备得到 FITC 标记的 T-HSP 与 PT-HSP 纳米载体), 37 °C, 100 r/min 共孵育 4 h。倒置荧光显微镜拍摄其入胞情况。RIPA 裂解液裂解细胞 20 min, 将裂解液 3000 r/min 离心 10 min, 取上清用荧光分光光度计检测 FITC 的荧光强度 (激发波长: 450 nm, 发射波长: 520 nm, 狭缝宽度: 5 nm), 以 T-HSP 组为对照, 分析不同相对分子质量 PSPA 对细胞摄取的影响。

参照上述操作步骤, 分别按照摩尔比 (HSP 亚基: PSPA) 1:1, 1:2, 1:3 制备 PT-HSP, 以 T-HSP 组为对照, 分析不同投料比对细胞摄取的影响。

### 1.2.2 体外细胞摄取研究

取对数生长期的 CHL, A549 和 HeLa 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔置于 24 孔板培养 24 h, 弃掉原有培养基, CHL 细胞更换为无血清 DMEM 培养基, A549 和 HeLa 细胞更换为 pH 6.5 的无血清 1640 培养基。然后向每孔中加入 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 FITC 标记的 T-HSP 与 FITC 标记的 PT-HSP 纳米载体, 37 °C, 100 r/min 共孵育 4 h。倒置荧光显微镜拍摄其入胞情况。

### 1.2.3 细胞杀伤实验

取对数生长期的 CHL 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔置于 24 孔板培养 24 h。弃掉原有培养基, 更换为无血清 DMEM 培养基。分别将 PTX DMSO 溶液、载 PTX 的 T-HSP 及载 PTX 的 PT-HSP 按照 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度 (实际含 PTX 浓度) 加入到培养孔中, 每个浓度平行 3 孔, 加完药的 24 孔板继续放回细胞培养箱内培养 24 h。

取对数生长期的 HeLa 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔置于 96 孔板培养 24 h。弃掉原有培养基，更换为 pH 6.5 的无血清 DMEM 培养基。分别将 PTX DMSO 溶液、载 PTX 的 T-HSP 按照 0.5, 1.0, 2.0, 10, 15, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度（实际含 PTX 浓度）加入到培养孔中，每个浓度平行 3 孔，加完药的 96 孔板继续放回细胞培养箱内培养 24 h。

取对数生长期的 A549 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔置于 96 孔板培养 24 h。弃掉原有培养基，更换为 pH 6.5 的无血清 1640 培养基。分别将 PTX DMSO 溶液、载 PTX 的 T-HSP 按照 1.0, 2.0, 5.0, 10, 15, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度（实际含 PTX 浓度）加入到培养孔中，每个浓度平行 3 孔，加完药的 96 孔板继续放回细胞培养箱内培养 24 h。

24 孔板内 CHL 细胞弃去培养基，用 PBS 冲洗细胞三遍，各孔加入 200  $\mu\text{L}$  胰酶消化细胞，待细胞完全悬浮后，加 200  $\mu\text{L}$  完全培养基终止消化，吸取各孔液体，置于 1.5 mL 离心管中 1500 r/min 离心 3 min，弃去上清液，依次加入 400  $\mu\text{L}$  0.04% 台盼蓝溶液，小心吹打混匀，取 10  $\mu\text{L}$  用计数板在显微镜下计数。

96 孔板内 HeLa、A549 细胞弃去培养基，用 PBS 冲洗细胞三遍，各孔加入 100  $\mu\text{L}$  胰酶消化细胞，待细胞完全悬浮后，加 100  $\mu\text{L}$  培养基终止消化，吸取各孔液体，置于 1.5 mL 离心管中 1500 r/min 离心 3 min，弃去上清液，依次加入 200  $\mu\text{L}$  0.04% 台盼蓝溶液，小心吹打混匀，取 10  $\mu\text{L}$  用计数板在显微镜下计数。

以不给药的细胞数量为对照，计算各给药组对 CHL、HeLa 及 A549 细胞活性的影响。

#### 1.2.4 生物安全性评价

##### 1) CHL 细胞毒性

取对数生长期的 CHL 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔置于 24 孔板培养 24 h。弃掉原有培养基，更换为 pH 7.4 的无血清 DMEM 培养基。分别将 HSP、T-HSP 及 PT-HSP 按照 1500, 750, 325, 160, 80, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度加入到培养孔中，每个浓度平行 3 孔。加完药的 24 孔板继续放回细胞培养箱内培养 24 h。

CHL 细胞弃去培养基，用 PBS 冲洗细胞 3 遍后，按照 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加入树脂天青溶液<sup>[12]</sup>，继续放回细胞培养箱内培养 2 h，将培养液稀释 100 倍后用荧光分光光度计测定荧光强度，以不加载体组的荧光强度为对照，计算各浓度对 CHL 细胞活性的影响。

##### 2) 溶血试验

抽取普通级兔新鲜血液 15 mL，加入适量肝素，1500 r/min 离心 5 min，得到红细胞。用 PBS (0.15 mol/L, pH 7.4) 清洗三遍后，弃去上清，配制成 2.5% (体积分数) 的红细胞 PBS 悬液。分别配制 20 mg/mL 的 T-HSP 与 PT-HSP 纳米混悬液，各取 0.1, 0.2, 0.4 mL，



















