# 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1, 王喻1, 骆红飞1, 赵子明2\*

(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)的织胞摄取情况;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。远正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 亚类的掌尔比为 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式大量摄取,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;摄取机制结果表的 PI-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。综工所述,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; oK 每1感; 靶向传递; 细胞摄取

中图分类号: R 9/44.9 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[1-2],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[3-5]。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[6],且内、外表面都有丰富的可修饰位点[7],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[8-9]。

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[10-11],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); 重组嗜热占细菌 (*Methanococcus jannaschii*) 热休克蛋白 (HSP, 上海生工生物工程公司, >85%); 几在肽(上海生工生物工程公司, >85%); 紫杉醇 (PTX, 西安吴轩生物科技公司, 9≥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 (海): 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, 南京凯基生物科技公司, 0.4%); RIPA 裂解液 (南京凯基生物科技公司)。

#### 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 ℃,5% CO₂细胞培养箱中培养。

取对数生长期的 CHL 细胞以 1×10⁵ 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 μg/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 n.g FITC,37 ℃ 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 纳米载学 1. 37 ℃,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的 PSPA 对细胞摄取的影响。

参照上述操作步骤,分别接照摩尔比(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

取对数生长身的 CHL,A549 和 HeLa 细胞以  $1\times10^5$  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  $\mu$ g/mL 的 FITC 标记的 T-HSP 与 FITC 标记的 PT-HSP 纳米载体,37 ℃,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  $1\times10^5$  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  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ g/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  $5\times10^4$  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  $\mu$ g/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  $5\times10^4$  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  $\mu$ g/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 μL 胰酶消化细胞, 待细胞完全悬浮后, 加 200 μL 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 μL 0.04% 合助 富溶液, 小心吹打混匀, 取 10 μL 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  $1\times10^5$  个/孔置于 24 孔板培养 24 h。弃掉原有培养基,更换为 pH 7.4 的大流 与 DMEM 培养基。分别将 HSP、T-HSP 及 PT-HSP 按照 1500, 750, 325, 160, 80, 40  $\mu$ g/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 μg/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,

用 PBS 定容至 2 mL,另取 2 mL PBS 和去离子水,均加入 2 mL 红细胞悬液,充分混匀,其中 PBS 组作为阴性对照组,去离子水组作为阳性对照组。在恒温振荡箱中  $37^{\circ}$ C 孵育 1 h, 3000 r/min 离心 10 min,分别用 T-HSP 与 PT-HSP 混悬液作为空白,在 541 nm 处测上清的 吸光度,计算溶血率(hemolysis ratio,HR),公式如下:

#### 1.2.5 细胞摄取机制研究

取对数生长期的 A549 细胞以  $1\times10^5$  个/孔置于 24 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。分别加入不同的细胞摄取抑制剂盐酸氯丙嗪(CPZ,10  $\mu$ g/mL)、秋水仙碱(50  $\mu$ g/mL)、叠氮钠(1  $\mu$ g/mL)、制霉菌素(6  $\mu$ g/mL)及莫能星钠(2  $\mu$ g/mL),37 °C,100 r/min 共孵育 30 min,再向每孔加入 200  $\mu$ g/mL 的 FITC 标记的 PT-HSP 纳米载体,37 °C,100 r/min 继续孵育 2 h。RIPA 裂解泌裂解结胞 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,以不加抑制剂的单纯载体组为对照,比较各个抑制剂的作用强度,探寻入胞机制。

#### 1.2.6 统计学分析

所有实验数据以 Mean±SD 表示,利用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,假设检验水准 接  $\alpha$ =0.05 判定,P<0.05 认为有显著性差异

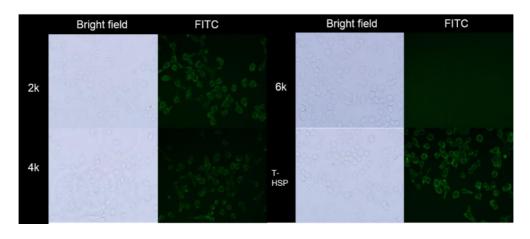
# 2 结果与分析

## 2.1 细胞摄取的影响因素

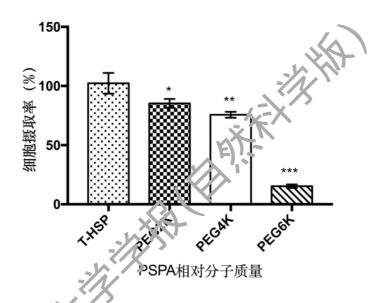
为分析 PSPA 型衣层对细胞摄取的影响,获得最佳细胞靶向性,采用不同相对分子质量的 PSPA 和不同摩尔比(HSP 亚基: PSPA)制备的 PT-HSP 与 CHL 细胞共培养。

#### 2.1.1 不同相对分子质量的 PSPA 对细胞摄取的影响

如图 1 所示, PEG2K 与 PEG4K 组成的 PT-HSP 入胞较好,几乎无法对 PT-HSP 的入胞产生明显的抑制作用。而 PEG6K 组成的 PT-HSP 的胞内分布明显减少,这与 PEG2K、PEG4K 入胞情况有明显统计学意义,表明只有具有长链 PEG 的 PSPA 包衣层才可以显著抑制 CHL 细胞对 PT-HSP 的摄取。



(a) 显微镜观察



\*, \*\*, \*\*\*分】代表各组与 T-HSP 组比较,P<0.05, P<0.01, P<0.001。

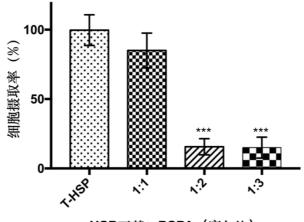
(b) 数据统计分析

图 1 PSPA 相对分子质量对 PT-HSP 入胞的影响

Fig. 1 Effects of PSPA with different molecular weight on PT-HSP enterance into the cells

## 2.1.2 不同投料比对细胞摄取的影响

如图 2 所示,当 HSP 亚基与 PSPA 的摩尔比分别为 1:1,1:2,1:3 时,PT-HSP 进入 CHL 细胞的情况与 T-HSP 相比,投料比为 1:1 时无显著差异,而投料比为 1:2,1:3 时有显著差异,其抑制入胞作用显著强于 1:1,而投料比 1:2 与 1:3 相比无显著差异。



HSP亚基: PSPA (摩尔比)

\*\*\*代表各组与 T-HSP 组比较, P<0.001。

图 2 HSP 亚基与 PSPA 投料比对 PT-HSP 入胞的影

Fig. 2 Effects of the ratio of HSP to PSPA on PT-HSP enterince into the cells

细胞摄取影响因素实验表明,当 HSP 亚基与 PS.P. 的摩尔比超过 1:2 并且其中的 PEG 相对分子质量较大(MW=6K)时,PSPA 包衣可完全掩盖 Tat 肽,对 PT-HSP 进入正常细胞 发挥抑制作用。故此研究后期所用 PT-HS2 为采用 HSP 亚基与 PSPA 的摩尔比 1:2 并且其中的 PEG 相对分子质量为 6K 进行制备。

### 2.2 不同细胞的体外摄取

为了探究正常细胞和肿留细胞对 PT-HSP 的摄取情况,我们设计将 T-HSP 和 PT-HSP 与 CHL、A549 以及 HeLa 细胞共培养。

从图 3 的荧光是微照片可以看出: T-HSP 在正常生理 pH 条件(pH 7.4)培养的 CHL 细胞中有一定的分布,而 PT-HSP 在正常生理 pH 条件培养的 CHL 细胞中基本不入胞。T-HSP 被肿瘤 pH 条件(pH 6.5)培养的 A549 和 HeLa 细胞大量摄取,呈现很强的荧光;而 PT-HSP 在同样条件下,在 A549 和 HeLa 细胞中也呈现很强的荧光,荧光强度未见减弱。可见 PT-HSP 能够被 A549 和 HeLa 两种肿瘤细胞大量摄取,而被正常细胞 CHL 摄取得极少,体现出良好的体外肿瘤细胞靶向性。

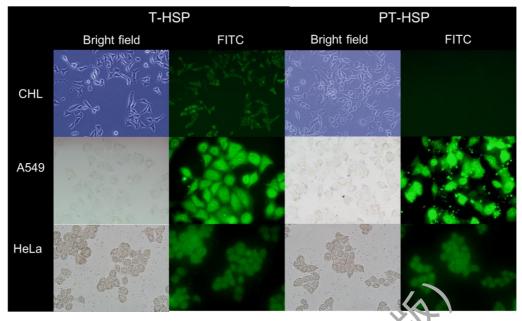


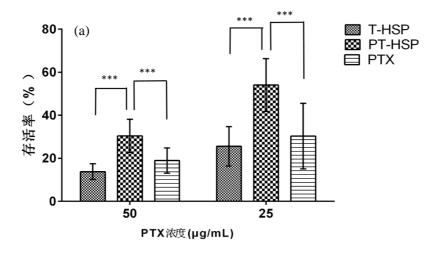
图 3 T-HSP 和 PT-HSP 在肿瘤细胞和正常细胞中的扩取情况

Fig. 3 Tumor and normal cells uptake T-HSP and PT-HSP

## 2.3 细胞杀伤实验

为确认载 PTX 的 PT-HSP 对正常细胞和肿瘤细胞具有高选择性杀伤能力,我们设计采用台盼蓝染色法对其进行验证。由图 % 可 % ,在 CHL 细胞中,载 PTX 的 PT-HSP 组的细胞存活率均大于 PTX 注射液组和载 PTX 的 T-HSP 组。由于 PT-HSP 在肿瘤细胞 pH 条件下去包衣化暴露出 Tat 肽,故只分析 T HSP 在相同 PTX 浓度下的肿瘤细胞杀伤作用。在 A549和 HeLa 细胞中,载 % 了 % 的 T-HSP 细胞存活率均低于 PTX 组(% 0.05)。

由此表明,与PTX组相比,载PTX的 T-HSP不论对肿瘤细胞还是正常细胞均产生较强的杀伤作用;而载 PTX的 PT-HSP对正常细胞伤害较小,对肿瘤细胞具有较强的杀伤力,说明经 PSPA包衣后的 PT-HSP能够更好地选择性杀伤肿瘤细胞而减少对正常细胞的损害。



\*\*\*代表各组与 PT-HSP 组比较,P < 0.001。

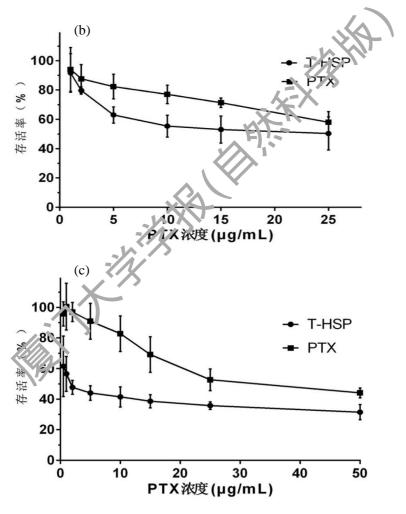


图 4 PTX 与载 PTX 的 T-HSP 对 CHL(a), A549(b) 和 HeLa(c)细胞的杀伤作用

Fig. 4 Cell killing effects of PTX and PTX -loaded T-HSP on CHL (a), A549 (b) and Hela (c) cells

# 2.4 生物安全性评价

为进一步确认本研究中的 PT-HSP 对正常细胞较为安全,我们设计通过树脂天青法分析 其细胞毒性并进行体外溶血试验进行生物安全性分析。

#### 2.4.1 细胞毒性实验

如图 5 所示,在  $40\sim750~\mu g/m L$  的浓度下,不同载体对细胞均无显著影响,仅当 T-HSP 的浓度高达 1.5~m g/m L (远超其使用浓度)时才对 CHL 细胞产生显著影响,而 HSP 与 PT-HSP 在高浓度时仍没有对 CHL 细胞活性产生显著影响,表明这三者在正常使用时对 CHL 细胞不会产生毒性,其中 PT-HSP 的安全性要优于 T-HSP。

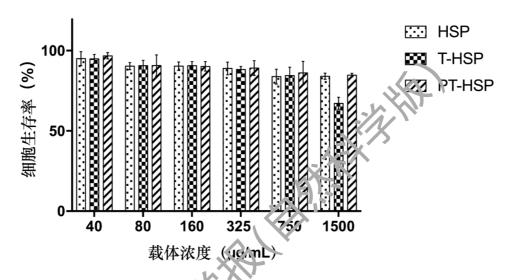
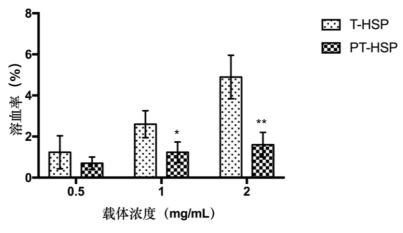


图 5 HSP、T-FLSP、LT-HSP 对 CHL 细胞的毒性

Fig. 5 Cytotoxicity of HSP 、T-HSP、 PT-HSP to CHL cells

#### 2.4.2 溶血试验

如图 6 所示,分别分析高、中、低三种浓度的载体体外溶血率,T-HSP 分别是(4.9±0.8)%, (2.6±0.5)%, (1.2±0.7)%, PT-HSP 分别是(1.6±0.5)%, (1.2±0.4)%, (0.7±0.2)%。结果显示, 静脉注射 PT-HSP 纳米粒具有较好的安全性。



\*\*代表 PT-HSP 组与 T-HSP 组比较 P<0.05。

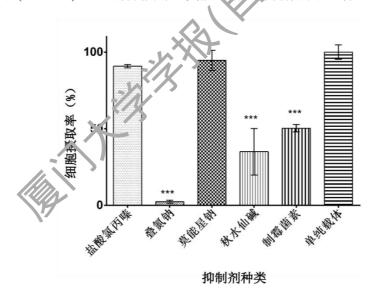
Fig.6 Hemolysis of T-HSP and PT-HSP

生物安全性评价结果表明,对于 CHL 细胞, HSP、T-HSP、PT-HSP 细胞毒性无差异,安全性较好;溶血率低于 5%,表明注射 PT-HSP 不会引起溶血<sup>[13]</sup>,说明 PT-HSP 具有良好的生物安全性。

## 2.5 细胞摄取机制研究

细胞内吞机制主要有网格蛋白介导的内吞,小窝蛋白介导的内吞,巨胞饮以及网格蛋白和小窝蛋白非依赖的内吞这四种机制<sup>[14]</sup>。为探索 PT-HSP 是通过何种内吞方式进入肿瘤细胞,我们选用 5 种抑制剂探究 PT-HSP 的入胞机制,各自功能如下:叠氮钠可以抑制 ATP 酶,CPZ 封闭网格蛋白有被小泡,莫能星钠阻断网格蛋白受体的循环利用、制霉菌素抑制小窝蛋白,秋水仙碱抑制微管蛋白从而阻断细胞的巨胞饮作用。

图 7 显示各抑制剂的加入对 PT-HSP 入胞情况的影响、叠氮钠对 PT-HSP 的入胞具有最显著抑制作用,细胞摄取率为(2.4±0.5)%,其次为长力心碱和制霉菌素,摄取率分别为(35.1±8.7)%和(50.4±1.4)%,盐酸氯丙嗪和莫能星共产,抑制作用不显著。



\*\*\*代表各组与未加抑制剂的单纯载体组比较,P < 0.001。

图 7 细胞摄取抑制剂对 PT-HSP 入胞的影响

Fig. 7 Effects of inhibitors on PT-HSP enterance into the cells

结果表明 PT-HSP 是通过依赖能量的巨胞饮方式以及受体介导的内吞方式进入 A549 细胞,说明 Tat 肽在 PT-HSP 的进胞过程中起了主导作用。

## 3 结 论

本研究基于前期构建的 pH 敏感的 PT-HSP, 进一步对其在肿瘤细胞中的摄取特性、药理学活性和细胞摄取机制进行探究。这种载 PTX 的 PT-HSP 体外肿瘤靶向性能佳,相比 PTX 和载 PTX 的 T-HSP 能够更好地选择性杀伤肿瘤细胞同时减少对正常细胞的伤害,且载体具有良好的生物安全性。综上所述,PT-HSP 作为一种新型肿瘤药物载体,既实现了增强抗肿瘤药的抗肿瘤效应,又减少了其毒副作用,是一种前景广阔的抗肿瘤药物递药载体。

## 参考文献:

- [1] ASHIM K J, VIBHUTI A, ABHIRUP M, et al. Novel Delivery Approaches For Carcer Therapeutics[J]. J Control Release, 2015,219:248-268.
- [2] LIU R W, LI X C, XIAO W W, et al. Tumor-targeting peptides from combinate real libraries[J]. Adv Drug Deliv Rev,2017,110/111:13-37.
- [3] FENG S S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy[J]. Expert Rev Med Devic, 2004, 1:115-125.
- [4] SERVICE R F. Nanotechnology takes aim at cancer[J]. Science 2005, 310:1132-1134.
- [5] BRIGGER I, DUBERNET C, COUVREUR P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54:631-651.
- [6] GUAN X, CHANG Y, SUN J, et al. Eng neered Hsp protein nanocages for siRNA delivery [J]. Macromol Biosci. 2018;18(5):3.
- [7] FLENNIKEN M L, WILLITS O A BRUMFIELD S, et al. The small heat shock protein cage from *Methanococcus jannaschii* is a versatile nanoscale platform for genetic and chemical modification [J]. Nano Letters, 2003, 3:1573-1576.
- [8] ZHANG K M, EZEMADUKA A N, WANG Z, et al. A novel mechanism for small heat shock proteins to function as molecular (\*\*perones[J]. Scientific Reports, 2015, 5:8811.
- [9] SHI J, KOTEICHE H A, MCDONALD E T, et al. Cryoelectron microscopy analysis of small heat shock protein 16.5 (Hsp16.5) complexes with T4 lysozyme reveals the structural basis of multimode binding[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(7): 4819-4830.
- [10] LI S, WU W, XIU K, et al. Doxorubicin loaded pH-responsive micelles capable of rapid intracellular drug release for potential tumor therapy [J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2014, 10(8):1480-1489.
- [11] LIU D, HU H, ZHANG J, et al. Drug pH-sensitive release in vitro and targeting ability of polyamidoamine dendrimer complexes for tumor cells [J]. Chem Pharm Bull, 2011, 59:63-71.
- [12] SHVEDOVA A A, CASTRANOVA V, KISIN E R, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells[J]. Toxicol Environ Health Part A, 2003, 66:1909-1926.
- [13] 医疗器械生物学评价第 1 部分:评价与试验:GB/T16886.122001[S]. 北京:中国标准出版社, 2002.
- [14] HILLAIREAU H, COUVREUR P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery[J]. Cell Mol

Tumor cellular uptake and pharmacological properties of pH-sensitive paclitaxel-loaded heat shock proteins nano-carriers

YANG Huiqing<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, LUO Hongfei<sup>1</sup>, ZHAO Ziming<sup>2</sup>\*

(1. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005,

China; 2. College of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

Abstract: In this paper, we investigated the pharmacological activity, pio-safety of pH-sensitive paclitaxel (PTX)-loaded heat shock proteins nano-carriers. The selfular uptake of PT-HSP was observed through fluorescence microscopy and spectron pormetry was used to explore the relationship among molecular mass, ratio of PSPA and cellular uptake. The lethal specificity to tumor cells was evaluated by trypan blue staining, and cytotoxicity was assessed with resazurin method. We also treated tumor cells with various endocytosis inhibitors to analyze the mechanism of cellular uptake. The results showed that PSPA could inhibit the uptake of normal cells significantly and the uptake amount of PT-HSP by tumor cells was dramatically higher than normal cells when PSPA composed of PEG6K and the molar ratio of HSP to PSPA was 1:2. In addition, PTX-loaded PT-HSP was significantly lethal and better selective to tumor cells. And we speculated that PT-HSP might be taken through the energy-dependent endocytosis and caveolin-mediated endocytosis. Together, these results indicated that PT-HSP was an excellent nano-carrier which enhanced anti-tumor effect with fewer side effects compared with traditional drug delivery system. PT-HSP may be a very potential targeted nano-carrier in the anti-tumor therapy.

**Keywords:** heat shock protein; pH-sensitive; targeting delivery; cellular uptake