DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2024.06.005

张兴莉, 焦晓丹, 于云龙, 等. MB-SF/cRGD 的合成及其化学动力学抗肿瘤研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(6): 51-62.

MB-SF/cRGD 的合成及其化学动力学抗肿瘤研究

张兴莉¹, 焦晓丹¹, 于云龙², 钟莉³, 康跃军¹, 薛鹏¹

1. 西南大学 材料与能源学院,重庆 400715; 2. 陆军军医大学第一附属医院 烧伤研究所,重庆 400038;

3. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044

摘要:化学动力学治疗(CDT)具有一定的抗肿瘤效果,但由于肿瘤微环境(TME)的复杂性,导致药物无法高效 积聚到肿瘤部位,从而无法达到满意的治疗效果.先通过水解与提纯得到丝素蛋白,再通过酰胺化反应在丝素蛋 白表面连接 cRGD,最后加入 Bi(NO₃)·5H₂O和 MnCl₂·4H₂O,搅拌过夜获得 MB-SF/cRGD.设计了一种具有 主动靶向能力的 CDT 治疗体系,旨在通过提高癌症细胞药物摄取率,加强化学动力学治疗效果.丝素蛋白作为 一种具有良好生物相容性和降解性的药物载体,可以有效改善药物递送系统引起的生物相容性差等问题;MnO₂ 利用内源性 H₂O₂ 实现化学动力学治疗、消耗 GSH 以及产生 O₂,发挥抗肿瘤疗效.此外,在药物表面修饰 cRGD 不但可以减少对正常细胞的毒性,还可以提高化学动力学治疗的价值.实验结果表明:利用 MB-SF 本身的 活性能达到一定的抗肿瘤疗效,在此基础上,修饰有主动靶向癌细胞的 cRGD 所获得的 MB-SF/cRGD 能达到更 好的肿瘤治疗效果.

关 键 词:化学动力学治疗,肿瘤微环境, 靶向治疗,活性氧
 中图分类号: R737.9
 文献标志码: A
 文 章 编 号: 1673 - 9868(2024)06 - 0051 - 12



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Synthesis of MB-SF/cRGD for Antitumor Chemodynamic Therapy

ZHANG Xingli¹, JIAO Xiaodan¹, YU Yunlong², ZHONG Li³, KANG Yuejun¹, XUE Peng¹

1. School of Materials and Energy, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Burns Research Institute, The First Affiliated Hospital of the Army Medical University, Chongqing 400038, China;

3. School of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: Chemodynamic therapy (CDT) has shown some therapeutic effects toward tumors, but due to

收稿日期: 2024-03-25

基金项目:重庆市鲁渝科技协作项目(CSTB2023TIAD-LDX0015);国家自然科学基金项目(32071375);重庆市高等教育教学改革研究 项目(223079);国家重点研发计划项目(2023YFF0713900);宜宾市双城协议保障科研经费科技项目(XNDX2022020013).

作者简介:张兴莉,硕士研究生,主要从事纳米药物的结构设计和医学应用研究.

通信作者: 薛鹏, 博士, 副教授.

the complexity of the tumor microenvironment (TME), the drugs do not accumulate efficiently at the tumor site, thus failing to achieve a satisfactory therapeutic effect. In this study, silk fibroin was obtained by hydrolysis and purification. Then, cRGD was attached to the surface of the fibroin protein by amidation reaction. Finally, $Bi(NO_3) \cdot 5H_2O$ and $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ were added and stirred overnight to obtain MB-SF/ cRGD. A hybrid system with active targeting ability was designed to enhance the therapeutic effect of CDT by increasing the cellular uptake rate of nanodrug. As drug carriers with good biocompatibility and degradability, silk fibroin can effectively improve the biocompatibility and other safety issues caused by drug delivery system. MnO_2 utilizes endogenous H_2O_2 for triggering CDT, GSH depletion and O_2 production to promote antitumor efficacy. In addition, the modified cRGD on the drug surface reduces toxicity to normal cells and increases the efficacy of CDT. Experimental results show that MB-SF alone can achieve a certain level of antitumor effect, but an improved tumor treatment effect can be achieved by MB-SF/cRGD, due to the modified cRGD can actively target the cancer cells.

Key words: chemodynamic therapy; tumor microenvironment; targeted therapy; reactive oxygen species

据统计,2018年全球新增1810万癌症病例,但只有亚洲和非洲的癌症死亡率(分别为57.3%和7.3%)高于癌症发病率(分别为48.4%和5.8%),其中乳腺癌是全球第二大致死癌症类型^[1].纳米技术的快速发展带动着纳米生物技术的进步,其中纳米材料的研究领域已扩展到农业、能源、医疗等行业^[2-5].化学动力学治疗(Chemodynamic Therapy, CDT)作为近年来新兴的一种"特洛伊木马"抗肿瘤策略,即铁、铜、锰和钴基利用 Fenton 或类 Fenton 效应产生高效率活性氧,诱导细胞凋亡.MnO₂纳米粒子本身可以利用类 Fenton 效应产生最具毒性的羟基自由基(•OH),但由于肿瘤内部 H₂O₂ 不足等原因,导致 CDT 对肿瘤治疗效果有限.由于 MnO₂ 还能消耗肿瘤细胞中重要的还原性物质谷胱甘肽(GSH),因此大大提高了 CDT 疗效^[6-10],并同时产生 O₂缓解肿瘤乏氧微环境^[4].此外,体系中加入的丝素蛋白作为肿瘤治疗的天然药物递送载体,具有良好的生物相容性、副作用小以及易于降解等优点^[11].

由于纳米材料本身能对肿瘤起到增强的渗透性和滞留性(EPR)效应以及易于功能化、高生物相容性等 原因,纳米药物成为肿瘤治疗的热议话题.但是由于单一的纳米材料无法主动靶向肿瘤,因此药物无法高 效积累到肿瘤部位并发生作用^[12-14].近年来,研究发现通过在纳米材料表面修饰各种特异性抗体、整合素 配体以及肽等,能够实现特异性靶向癌细胞^[15-16].据报道,cRGD能与癌细胞表面过表达的整合素 α_vβ3 特 异性结合^[17].因此,在MB-SF 上修饰 cRGD 可以有效提高药物利用率^[15].基于此,本研究构建的MB-SF/ cRGD 化学动力学治疗体系,在肿瘤治疗领域具有一定应用潜力.

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

仪器:动态光散射粒度仪(Nano ZS90),透射电子显微镜(JEM-2100),紫外可见分光光度计(UV-2550),多功能酶标仪(Tecan Infini Spark-10M),共聚焦激光显微镜(Zeiss LSM 800),流式细胞仪(Novo-Cyte 2060R),倒置荧光显微镜(IX73),X射线光电子能谱仪(ESCALAB 250Xi),傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR Nicolet 6700).

试剂: Bi(NO₃) • 5H₂O(AR), MnCl₂ • 4H₂O(AR), CaCl₂(AR), HNO₃(AR), NaOH(AR), NHS (AR), EDC(AR)以及乙醇、DMSO 等, 直接用于实验.

1.2 MB-SF、MB-SF/cRGD的合成

1.2.1 丝素蛋白的制备

将蚕茧剪成小块,在 0.5%的 Na₂CO₃ 溶液中煮沸 60 min,之后用大量的去离子水冲洗除去丝胶,并

将脱下的脱胶丝素在常温下干燥.在三元体系中(氯化钙/乙醇/水)溶解脱胶丝素(0.8%),各组分的摩尔 比为1:2:8,并将其放在90℃恒温水浴锅中溶解2h.趁热将丝素混合溶液进行抽滤除杂,用分子量为 3.5 kDa的纤维素半透膜透析3天,获得丝素蛋白溶液,取部分冻干定量,放入4℃冰箱储存^[18]. 1.2.2 SF/cRGD的合成

取 50 mg 的丝素蛋白溶液,加入 NHS 和 EDC(比例为 1:6:6)活化 1 h,再加入 0.2 mg cRGD 溶液 (1 mg/mL), 室温避光搅拌 12 h,即获得 SF/cRGD.

1.2.3 MB-SF 和 MB-SF/cRGD 的合成

先提前将 19.4 mg 的 Bi(NO₃) • 5H₂O 溶于 2 mL 的 HNO₃ 溶液中,并将 15.76 mg 的 MnCl₂ • 4H₂O 溶于 2 mL 的去离子水中.随后,将 Bi(NO₃) • 5H₂O 加入到 50 mg 的丝素蛋白溶液或 SF/cRGD 溶液中,并用 NaOH 调节 pH 值到 12,再加入 MnCl₂ • 4H₂O,置于 37 ℃下搅拌 12 h,转移至透析袋中透析 24 h,得到产物 MnO₂/Bi₂S₃-SF 以及 MnO₂/Bi₂S₃-SF/cRGD(分别简写为 MB-SF、MB-SF/cRGD),置于 4 ℃储存^[19].

1.3 材料的表征

用透射电子显微镜观察 MB-SF/cRGD 纳米材料的形貌.通过傅里叶变换红外光谱仪检测各样品的特征峰.通过动态光散射粒度仪测量纳米粒子的流体动力学尺寸以及表面电势.MB-SF/cRGD 的化学元素以及元素价态由 X 射线光电子能谱仪表征.

1.4 体外性能分析

亚甲基蓝(MB)被·OH氧化后在 655 nm 波长处有特征吸收峰,可用于测试过氧化物酶活性.在 25 mmol/L NaHCO₃缓冲体系中,使用 MB(10 μ g/mL)探究 MB-SF/cRGD 在不同体系中产·OH 的性能. 检测 MB-SF/cRGD 分解 H₂O₂ 产生 O₂ 性能的具体步骤如下:将 MB-SF/cRGD 溶解于磷酸盐缓冲溶液,设置一系列浓度梯度后,加入 10 mmol/L H₂O₂,使用溶解氧测定仪检测溶液中的氧浓度,利用 GSH 能与 2-硝基苯甲酸(DTNB)反应生成黄色 GSSG,检测谷胱甘肽过氧化物酶活性;将 DTNB 溶解在 磷酸缓冲溶液(pH=8,EDTA 1 mmol/L)中,终浓度为 4 mg/mL;将 MB-SF/cRGD 分散在 0.2 mg/mL GSH 中,随后加入 200 μ L DTNB,室温孵育 0~4 h,利用紫外可见分光光度计测量.

1.5 生物相容性

使用鼠源成纤维细胞(L929)评估 MB-SF/cRGD 对小鼠正常细胞的生物相容性.实验步骤为:将L929 细胞以 1×10^4 每孔接种到 96 孔板中(37 °C, 12 h);随后使用不同浓度 MB-SF/cRGD 与细胞共培养 24 h, 弃去培养液, PBS 洗涤 3 遍;接着每孔加入 200 μ L MTT(0.5 mg/mL)培养 4 h, 弃去上清液, 加入 200 μ L DMSO, 震荡 15 min 使紫色甲臜完全溶解;最后使用酶标仪检测每孔在 490 和 630 nm 波长处的吸光度 (OD 值).按照式(1)计算每孔细胞存活率:

细胞存活率(%)=(OD₄₉₀ - OD₆₃₀)_{加药处理组细胞} /(OD₄₉₀ - OD₆₃₀)_{未加药处理组细胞} (1)

溶血率实验是先取 BALB/c 雌鼠眼眶血,使用 PBS 离心洗涤 3 遍(3 000 rpm, 5 min). 然后,将红细胞按 4%(v/v)的比例与一系列浓度梯度的 MB-SF/cRGD(PBS 体系)混合.同时,设置阳性对照组,将去离子水与红细胞混合.在 37 ℃条件下反应 6 h 后,10 000 rpm 离心 10 min,取上清液在酶标仪上检测 570 nm 处的吸光度. 然后根据式(2)计算小鼠细胞溶血率:

1.6 体外细胞毒性

使用小鼠乳腺癌肿瘤细胞(4T1)评估 MB-SF/cRGD 对肿瘤细胞的毒性. 将 4T1 癌细胞以 1×10⁴ 个细胞每孔接种到 96 孔板中(37 ℃,12 h),然后用不同浓度 MB-SF/cRGD 与细胞分别共培养 24,48,72 h,后续按照 MTT 法测量细胞活力.

1.7 细胞摄取

为了分析 cRGD 对肿瘤细胞摄取的影响,使用二氢卟吩 e6(Ce6)作为荧光标志物修饰纳米粒子. 具体操作如下:先将 30 mg EDC 和 20 mg NHS 溶解于 MB-SF 或 MB-SF/cRGD 的水溶液体系中 (1 mg/mL),并在搅拌状态下进行 30 min 的羧基自由基活化;使用去离子水离心洗涤 3 遍后,将沉 淀物与 Ce6(1 mg/mL)混合,室温避光搅拌 24 h;最后通过离心洗涤获得与 Ce6 共价连接的 MB-SF 和 MB-SF/cRGD,并使用流式细胞仪检测癌细胞对其的吞噬效果.

将 4T1 细胞接种到 12 孔板(5×10⁴ 个细胞/孔)中,在 37 ℃培养箱培养 12 h. 使用浓度为 100 μ g/mL 的 MB-SF、MB-SF/cRGD 的培养液与不同孔细胞分别共培养 0~6 h. 然后使用含 0.25% EDTA 的胰蛋白 酶消化, PBS 清洗后,重悬于含有 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 中,使用流式细胞仪进行单个细胞荧光强度分析.

1.8 产活性氧能力和 GSH 消耗能力

为了检测 MB-SF/cRGD 在癌细胞中产活性氧性能,将 4T1 癌细胞接种到 12 孔板(1×10⁵ 个细胞/孔) 中培养过夜,加入浓度均为 100 μ g/mL 的 MB-SF、MB-SF/cRGD 材料,共培养 8 h,空白对照组加入等体 积 PBS. 共培养结束后使用 PBS 洗涤 3 遍,与 DCFH-DA(10 μ M)处理 30 min,再用 PBS 洗涤 3 遍,用 DAPI 染色 10 min,进行共聚焦拍照.

为检测细胞水平 MB-SF/cRGD 对谷胱甘肽的消耗能力,将4T1 细胞与 MB-SF、MB/cRGD 在96 孔板 (1×10⁴ 细胞/孔)中共培养 8 h,然后加入 50 µL 提前预冷的 6.5% TCA,在4 ℃条件下裂解细胞 30 min,随后加入 250 µL 的 DTNB(4 mg/mL),避光震荡 5 min,最后使用酶标仪检测 412 nm 波长处的吸光度.

1.9 ICD 生物标志物检测

为进一步研究 MB-SF/cRGD 的抗肿瘤效果,通过免疫荧光评估 ICD 生物标志物 CRT 和 HMGB1. 具体步骤如下:将12 孔板(3×10⁵ 个细胞/孔)中的 4T1 细胞在 37 ℃条件下培养过夜,后续步骤与检测 活性氧的处理步骤相似;然后使用多聚甲醛(4%)固定细胞 15 min,再加入 Triton X-100(0.1%)孵育 15 min,使用 BSA(1%)进行封闭 1 h;随后使用 CRT(2 μ g/mL)或 HMGB1(2 μ g/mL)一抗与处理过的 细胞孵育过夜(4 ℃),然后继续在 4 ℃条件下用携带有 Cy3 或 FITC(2 μ g/mL)的二抗孵育 4 h;经 DAPI 染色 10 min 后,使用共聚焦显微镜分析不同组间荧光差异.

另一方面,通过 ATP 试剂盒检测细胞内 ATP 释放情况,将处理后的悬浮细胞(与 GSH 消耗能力实验 处理相似)使用 ATP 裂解液在冰上裂解 1 h,然后在 4 ℃条件下 12 000 rpm 离心 10 min,取上清,并按照 说明书步骤检测 ATP 含量.

1.10 活/死细胞染色

为了直观观察 MB-SF/cRGD 对癌细胞的杀伤效果,将 4T1 细胞接种到 12 孔板(2×10⁵ 个细胞/孔)中 培养 12 h后,分别加入等体积 PBS、MB-SF、MB-SF/cRGD 共培养.随时观察细胞形态,待细胞变为圆形 且大小均一时,按照 Calcein AM/PI 试剂盒步骤对细胞进行染色.清洗过后使用倒置荧光显微镜拍照.

1.11 建立 4T1 皮下瘤模型

所有动物实验流程均通过西南大学动物保护和使用委员会的批准,并遵循《实验动物 动物实验通用要求》(GB/T 35823-2018).购买 4 周龄小鼠,饲养 1 周后,将对数生长时期的 4T1 细胞注射进入雌性 BALB/c 小鼠右侧后背皮下,等待 1 周左右,肿瘤体积达到 200 mm³ 左右,成功构建实体瘤模型.根据下式计算肿瘤体积:

$$V = 0.5 \times l \times w^2 \tag{3}$$

式中: V 为肿瘤体积; l 为肿瘤最长直径; w 为肿瘤最短直径.

1.12 体内抗肿瘤

在动物水平上研究 MB-SF/cRGD 对小鼠肿瘤生长的抑制作用.将小鼠分为生理盐水、MB-SF、MB-SF/cRGD 3 组,在第 0、5 d 分别静脉注射生理盐水 100 μL, MB-SF、MB-SF/cRGD 组按照浓度为

$$R_{\rm TGI} = (V_{\rm C} - V_{\rm T}) / V_{\rm C} \times 100\%$$
(4)

式中: R_{TGI} 为肿瘤抑制生长程度; V_c 为注射生理盐水组小鼠的肿瘤体积; V_T 为不同药物处理组的肿瘤体积.

2 结果与讨论

2.1 形貌、物相和元素分析

图 1a 是合成 MB-SF/cRGD 纳米粒子透射电子显微镜(TEM)图片,由此可以看出由三步合成的 MB-SF/cRGD 呈现出不规则形状且粒径小于 200 nm.图 1b 是各样品的傅里叶变换红外光谱图,MB-SF/cRGD 具有酰胺 V带(N-H,665 cm⁻¹)、酰胺 III 带(C-H,1 228 cm⁻¹)以及酰胺 I带(C=O,1 640 cm⁻¹),与 丝素蛋白(SF)的特征峰完全符合,证实了 MB-SF/cRGD 中包含有丝素蛋白^[20-21].



a. MB-SF/cRGD纳米粒子的TEM图



b. 各样品的傅里叶变换红外光谱图

图 1 MB-SF/cRGD 的 TEM 图以及各样品的傅里叶变换红外光谱图

图 2a、2b 分别是 MB-SF 与 MB-SF/cRGD 纳米粒子在纯水中的流体动力学粒径图以及电位图, MB-SF 修饰 cRGD 后, MB-SF/cRGD 的流体动力学直径比 MB-SF 增大约 20 nm. 由图 2b 可以看出, MB-SF 修饰 cRGD 后电位从-13.4 mV 变为-5.6 mV. 以上结果均说明了 cRGD 成功共价连接在 MB-SF 表面从 而改变纳米材料粒径大小以及电位.



图 2 MB-SF、MB-SF/cRGD 纳米材料的粒径、电位图

图 3 是 MB-SF/cRGD 的 X 射线光电子能谱图(XPS).图 3a 是 Bi 4f 的核心级 XPS 能谱图, 164.8 eV 和 159.4 eV 结合能分别对应 Bi 4f_{5/2} 和 Bi 4f_{7/2},与其相对应的是 Bi^{3+[22]}.图 3b 是 Mn 2P 的核心级 XPS 能

谱图,641.8 eV 和 653.3 eV 结合能分别对应 Mn 2p_{3/2} 与 Mn 2p_{1/2},与其相对应的是 Mn²⁺/Mn^{3+[23-24]}.全范围的 XPS 能谱图证实了 MB-SF/cRGD 由 Mn、Bi、C、S、O、N 和 O 元素组成(图 3c).上述数据证明了 Bi₂S₃/MnO₂-SF/cRGD 纳米材料成功合成.



2.2 性能分析

根据上述数据表明 MB-SF/cRGD 纳米药物中 MnO₂ 具有+2 和+3 价,因此 MB-SF/cRGD 具有多种 酶活性,包括 CAT、POD. 这对 O₂ 和•OH 的产生、GSH 的消耗至关重要.在富含 HCO₃⁻ 的情况下, Mn²⁺能够发挥类 Fenton 效应,发生 MnO₂+HCO₃⁻+H₂O₂→•OH+H₂O 反应,从而分解内源性 H₂O₂ 产生•OH^[23].因此,在探究 MB-SF/cRGD 产 ROS 的性能实验中采用 25 mmol/L NaHCO₃ 缓冲液体系. 首先,为探究 MB-SF/cRGD 在不同环境中产活性氧的效率,按 Control、H₂O₂、MB-SF/cRGD、MB-SF/ cRGD+GSH、MB-SF/cRGD+GSH+H₂O₂、MB-SF/cRGD+H₂O₂分组,其中 MB-SF/cRGD 质量浓度 为 200 μ g/mL,使用 MB试剂检测•OH 产生情况,可以明显看到 MB-SF/cRGD+H₂O₂ 组活性氧产率 最高,Control、H₂O₂、MB-SF/cRGD、MB-SF/cRGD+GSH 组几乎没有产生活性氧,MB-SF/cRGD+ GSH+H₂O₂ 组由于 GSH 的存在产活性氧效率大大降低(图 4a).然后为探究不同质量浓度 MB-SF/ cRGD 产 O₂ 的效率,配置了 0、50、100、150、200 μ g/mL 的 MB-SF/cRGD 浓度增大而升高.此外,MB-SF/cRGD 在肿瘤微环境中还会发生 2GSH+MnO₂+2H⁺→GSSG+Mn²⁺+2H₂O 反应.因此,使用 DT-NB 试剂检测 MB-SF/cRGD 与还原性谷胱甘肽分别孵育 0.0.5,1,2,4 h 后,在 412 nm 波长处的吸光度. 由图 4c 可以看出,MB-SF/cRGD 随时间增加消耗越来越多的 GSH,证明了 MB-SF/cRGD 具有类谷胱甘 肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,可以消耗内源性 GSH.



c. MB-SF/cRGD不同时间消耗GSH

图 4 MB-SF/cRGD 产活性氧、产 O2 以及消耗 GSH 的性能分析

2.3 细胞水平抗肿瘤性能分析

上述实验结果表明本研究所构建的 MB-SF/cRGD 体系具有良好的活性氧生成能力、产生氧气的能力 以及消耗 GSH 能力. 于是进一步对 MB-SF/cRGD 的生物应用展开研究. 首先,为了确保 MB-SF/cRGD 在生物应用时的安全性,进行了生物相容性实验. 分别将 0,12.5,25,50,100,200 µg/mL 质量浓度的 MB-SF/cRGD 与 L929 细胞共培养 24 h. 当药物浓度达到 200 µg/mL 时,细胞存活率仍然高达 70%以上,根据 此数据可以推出 MB-SF/cRGD 具备良好的生物相容性(图 5a). 相比之下,在相同药物剂量以及时间处理 下,小鼠乳腺癌细胞(4T1)活力大大降低. 当浓度为 200 µg/mL,处理时间为 72 h 时,大量肿瘤细胞被杀 死,存活率仅 24.3%(图 5b). 这种特异性抗肿瘤特性可能是由于 cRGD 介导的主动靶向肿瘤以及 Mn²⁺/ Mn³⁺ 对肿瘤内部高 H₂O₂ 水平引发的 CDT 效应等原因^[25-26].

紧接着分别将连接有 Ce6 的 MB-SF 和 MB-SF/cRGD 与 4T1 细胞按 0,0.5,1,2,4,6 h 共培养后,再使 用流式细胞仪取样分析. 从图 6a、6b 可以看出, MB-SF/cRGD-Ce6 在与细胞共培养 0.5 h 时,几乎所有细 胞都已成功吞噬纳米材料,而 MB-SF-Ce6 还有一部分细胞未吞噬材料. 由此成功证明了 cRGD 主动靶向肿 瘤细胞的特性增强了 4T1 细胞对 MB-SF/cRGD 纳米材料的吞噬效果,并由此推断较强的吞噬效果有利于 提高药物对肿瘤的治疗效果^[27].

为验证这个推论,实验分为 Control、MB-SF、MB-SF/cRGD 3 组进行研究. 从图 7a、7b 可以看出, 修饰了 cRGD 的 MB-SF/cRGD 比 MB-SF 产生更多的 ROS,消耗了细胞内更多 GSH. 证明了 cRGD 增强 了 4T1 细胞对纳米材料的吞噬,从而提高了产活性氧效率以及消耗谷胱甘肽的能力. 因此,在这一研究 基础上,推断 MB-SF/cRGD 与 MB-SF 相比, MB-SF/cRGD 对肿瘤治疗效果有着显著的提升(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).



120

100

80

60

40 20

0

0

12.5

细胞存活率/%



a. 样品与4T1细胞共同培养后的体外细胞存活率

b. 样品与L929细胞共同培养后的体外细胞存活率

浓度/(µg·mL-1)

25

50

100



a. 4T1细胞吞噬MB-Ce6

b. 4T1细胞吞噬MBC-Ce6

图 6 4T1 细胞分别对 MB-SF 和 MB-SF/cRGD 吞噬的流式图





据报道,肿瘤细胞在受到药物刺激时,会引发免疫原性细胞死亡(ICD).在免疫原性细胞死亡过程中,会有一系列损伤相关分子(DAMPs)发生变化.钙网蛋白(CRT)从内质网迁移到细胞表面,释放"eat"信号,被免疫细胞识别进而杀伤肿瘤细胞.高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)从细胞核易位到细胞质,起到促进免疫细胞成熟的功效.三磷酸腺苷(ATP)从细胞中释放出来.图 8a 可以明显看到 MB-SF/cRGD 导致 4T1 细胞中大量 CRT 释放出来.MB-SF/cRGD 组比 MB-SF 组也发生了更显著的 HMGB1 易位(图 8b).图 8c 表明经过 MB-SF/cRGD 药物处理后,细胞内 ATP 含量较少,表明细胞中更多的 ATP

48 h

72.h

200

图 5 样品的细胞毒性与生物相容性

释放出去. 上述数据均表明 4T1 细胞在 MB-SF/cRGD 药物刺激下,激发了比 MB-SF 组更强的免疫原性 细胞死亡(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)^[28].



FITC标记CRT蛋白, DAPI标记细胞核;比例尺: 10µm a. 各样品与4T1细胞共同培养后的CRT图像



Cy3标记HMGB1蛋白, DAPI标记细胞核; 比例尺: 10 µ m b. 各样品与4T1细胞共同培养后的HMGB1图像



c. 各样品与4T1细胞共同培养的胞内ATP含量图

图 8 各样品与 4T1 细胞共同培养后损伤相关分子变化图

为了更直观地观察细胞水平抗肿瘤效果,使用钙黄绿素乙酰甲酯对活细胞进行染色(绿色),使用碘化 丙啶对死细胞进行染色(红色),用荧光显微镜记录并观察样品,结果如图9所示.



用Calcein AM(活细胞,绿色)以及PI(死细胞,红色)染色;比例尺:100 µm

图 9 可以直观地看到, MB-SF/cRGD 药物处理组的红色荧光数量最多,同时绿色荧光也是最少的.表明 MB-SF/cRGD 杀死癌细胞数量最多, MB-SF 效果次之.该实验结果与上述活性氧、胞内谷胱甘肽以及 ICD 生物标志物实验结果一致.以上数据表明所构建的 MB-SF/cRGD 体系因为 cRGD 的存在,在细胞水 平高效发挥化学动力学治疗疗效,提高了细胞水平肿瘤治疗效果.

2.4 动物水平抗癌性能分析

在动物水平探究了 MB-SF/cRGD 对小鼠血液的生物相容性. 将 0、6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL 浓度梯度的 MB-SF/cRGD 与红细胞共培养. 根据比浊法测定的结果显示, MB-SF/cRGD 浓度为 200 μg/mL 时, 溶血率为 1.45%, 远小于 5%, 这表明 MB-SF/cRGD 对小鼠血液也具有良好的生物相容性(图 10).

为进一步验证 MB-SF/cRGD 药物的抗肿瘤性能,在动物水平上作进一步的研究.在2 周的治疗时间里记录小鼠肿瘤体积变化以及治疗结束后离体肿瘤重量.图 11a 可以看出 MB-SF/cRGD 组肿瘤 不仅与生理盐水组形成鲜明对比,与 MB-SF 治疗组也形成显著差异.此外,与生理盐水组和 MB-SF 组相比,在肿瘤体积方面 MB-SF/cRGD 起到了较强的肿瘤治疗效果.根据式(4)计算肿瘤生长抑制率 (TGI),到第 14 d时 MB-SF/cRGD 药物处理组 TGI 指数高达 90.9%(图 11b)(* *p*<0.05, * * *p*<

图 9 各样品与 4T1 细胞共同培养后活细胞和死细胞的荧光染色差异

将小鼠实体瘤用于 H&E、TUNEL、 Ki67、CRT、HMGB1、CD8⁺染色并进行组织 学分析(图 12).在 H&E 切片中,MB-SF/ cRGD 药物处理组切片表现出最严重的组织损 伤,表现为严重的核破裂、核溶解.在TUNEL 以及 Ki67 切片中,MB-SF/cRGD 药物处理组 分别表现出高水平的绿色荧光凋亡信号和阳性 细胞的显著减少,证明了 MB-SF/cRGD 抑制 肿瘤细胞生长和侵袭的能力显著提升.此外, 在动物水平上也激发了强烈的免疫原性细胞死 亡(ICD),CRT 和 HMGB1 切片数据分别表明





MB-SF/cRGD 药物处理组可以引发显著的 CRT 暴露、HMGB1 易位^[29]. CD8⁺细胞作为免疫的主力军,发挥了重要作用.从 CD8⁺免疫荧光切片可以看出,MB-SF/cRGD 药物处理组 CD8⁺免疫细胞表达更多,说明修饰了 cRGD 能有效激发免疫应答,进行高效肿瘤治疗^[30].



a. 第14 d切除肿瘤的重量

b. 2周治疗过程中肿瘤体积的变化趋势



比例尺: 50µm

图 12 各样品的肿瘤切片图

3 结论

本研究构建的 MB-SF/cRGD 纳米材料分别在细胞以及动物水平上进行肿瘤治疗性能研究,并且从多 角度证明 MB-SF/cRGD 与 MB-SF 相比抗肿瘤效果更加显著.由于 MB-SF/cRGD 修饰有 cRGD,因此赋予 了该材料主动靶向癌细胞的功能,实现了高效的 ROS 产率以及 GSH 消耗能力,从而击溃肿瘤细胞的抗氧 化系统.同时消耗内源性 H₂O₂ 产生 O₂,缓解了内部乏氧.当材料浓度仅为 200 µg/mL 时,肿瘤细胞死亡 率高达 75.7%.在动物水平,MB-SF/cRGD 浓度仅为 5 mg/kg 时,肿瘤抑制率达到 90.9%.此外,MB-SF/cRGD 复合体系中还含有 Bi₂S₃,Bi₂S₃ 由于具有 1.33 eV 带隙宽度,成为一种优良的光热剂,可用于抗 肿瘤光热治疗.但在本文中并未对 Bi₂S₃ 功能开展进一步的探究,在未来的研究中会深入探索.总之,本文 报道的 MB-SF/cRGD 体系能够通过主动靶向癌细胞实现高效的化学动力学治疗,在肿瘤治疗领域有巨大 的应用潜力.

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 陶建波,伍浩天,王艺钢,等. 硅肥和纳米土墒材料配施对苦荞倒伏的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版),2023, 45(9):25-35.
- [3] 马雪莹,李明. Ce 掺杂 Ni₂ P 纳米片的电子调控促进高效析氧 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(1): 188-195.
- [4] 陆娟,殷琪峰,胡珊珊,等. Cu_{2-x}Se@MIL-100(Fe)-DOX的合成及多模式抗肿瘤研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2022, 44(1): 108-117.
- [5] 许子艺, 樊莉, 卢光照, 等. 尺寸可调纳米颗粒的抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2023, 58(20): 1814-1822.
- [6] WANG X W, ZHONG X Y, LIU Z, et al. Recent Progress of Chemodynamic Therapy-Induced Combination Cancer Therapy [J]. Nano Today, 2020, 35: 100946.
- [7] ZHAO P R, LI H Y, BU W B. A Forward Vision for Chemodynamic Therapy: Issues and Opportunities [J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2023, 62(7): e202210415.
- [8] YANG G B, XU L G, CHAO Y, et al. Hollow MnO₂ as a Tumor-Microenvironment-Responsive Biodegradable Nano-Platform for Combination Therapy Favoring Antitumor Immune Responses [J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 902.
- [9] LIN L S, SONG J B, SONG L, et al. Simultaneous Fenton-Like Ion Delivery and Glutathione Depletion by MnO₂-Based Nanoagent to Enhance Chemodynamic Therapy [J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2018, 57(18): 4902-4906.
- [10] NIU B Y, LIAO K X, ZHOU Y X, et al. Application of Glutathione Depletion in Cancer Therapy: Enhanced ROS-Based Therapy, Ferroptosis, and Chemotherapy [J]. Biomaterials, 2021, 277: 121110.
- [11] YU B, LI Y L, LIN Y X, et al. Research Progress of Natural Silk Fibroin and the Application for Drug Delivery in Chemotherapies [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 13: 1071868.
- [12] BJÖRNMALM M, THURECHTK J, MICHAEL M, et al. Bridging Bio-Nano Science and Cancer Nanomedicine [J]. ACS Nano, 2017, 11(10): 9594-9613.
- [13] SHI D, ZHUANG J Y, FAN Z X, et al. Self-Targeting Nanotherapy Based on Functionalized Graphene Oxide for Synergistic Thermochemotherapy [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 603: 70-84.
- [14] 王英杰,高平,孙萌,等. 铋基纳米药物系统的抗肿瘤诊疗及生物安全性研究进展 [J]. 药学学报, 2023, 58(4): 852-855.

- [15] 马丽,蔡在龙,王庆蓉,等. 靶向抗肿瘤肽的构建及其生物学活性研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 19-22.
- [16] SONG Z W, LIN Y, ZHANG X, et al. Cyclic RGD Peptide-Modified Liposomal Drug Delivery System for Targeted Oral Apatinib Administration: Enhanced Cellular Uptake and Improved Therapeutic Effects [J]. International Journal of Nanomedicine, 2017, 12: 1941-1958.
- [17] FAN X, YUAN Z T, SHOU C T, et al. CRGD-Conjugated Fe₃O₄ @ PDA-DOX Multifunctional Nanocomposites for MRI and Antitumor Chemo-Photothermal Therapy [J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14: 9631-9645.
- [18] 田娟,杨华,马林,等. 蚕丝不同溶解方法的研究 [J]. 化学世界, 2011, 52(11): 665-668.
- [19] LI T H, SHI S Q, LU X S, et al. A Versatile Bi₂S₃/MnO₂ Based Nano-Theranostic Agent for Triple-Modal Imaging Guided Photothermal/Photodynamic Synergistic Therapy [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2021, 49(11): 19-27.
- [20] 巢梦颖,凌新龙,刘雨鹭,等. 丝素蛋白/海藻酸钠水凝胶的制备及其释药性能 [J]. 纺织高校基础科学学报,2023, 36(6):22-29.
- [21] 应勇,汪芸萱,郭蕾,等. 再生丝素蛋白在 Na⁺溶液中的分子聚集行为及生物学性能研究 [J/OL]. 食品工业科技, (2024-01-31) [2024-03-25]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090155.
- [22] 叶梦颖,于佳汇, 王彤彤, 等. Bi₂S₃/CdS/TiO₂ 纳米复合材料的制备及对 304 不锈钢的光生阴极保护性能研究 [J]. 中国腐蚀与防护学报, 2024, 44(2): 372-380.
- [23] HUANG J S, LI Y C, ZHANG L, et al. A Platinum Nanourchin-Based Multi-Enzymatic Platform to Disrupt Mitochondrial Function Assisted by Modulating the Intracellular H₂O₂ Homeostasis [J]. Biomaterials, 2022, 286: 121572.
- [24] 周国霖,谢水波,胡恋. MnO₂/Ti₃C₂T_x 复合剂对水中 U(VI)的吸附性能与机制 [J/OL]. 复合材料学报,(2024-02-07) [2024-03-25]. https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20240205.004.
- [25] JIAO X D, SUN L H, ZHANG W, et al. Engineering Oxygen-Deficient ZrO_{2-x} Nanoplatform as Therapy-Activated Immunogenic Cell Death (ICD) Inducer to Synergize Photothermal-Augmented Sonodynamic Tumor Elimination in NIR-II Biological Window [J]. Biomaterials, 2021, 272: 120787.
- [26] FU S Y, YANG R H, REN J J, et al. Catalytically Active CoFe₂O₄ Nanoflowers for Augmented Sonodynamic and Chemodynamic Combination Therapy with Elicitation of Robust Immune Response [J]. ACS Nano, 2021, 15(7): 11953-11969.
- [27] CHEN D, LI B W, CAI S H, et al. Dual Targeting Luminescent Gold Nanoclusters for Tumor Imaging and Deep Tissue Therapy [J]. Biomaterials, 2016, 100: 1-16.
- [28] 曾宇祺, 郭丽娟, 杨森. 免疫原性细胞死亡在口腔肿瘤中的初步机制 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2023, 36(4): 340-348.
- [29] YU H L, LI Y C, ZHANG Z Y, et al. Silk Fibroin-Capped Metal-Organic Framework for Tumor-Specific Redox Dyshomeostasis Treatment Synergized by Deoxygenation-Driven Chemotherapy [J]. Acta Biomaterialia, 2022, 138: 545-560.
- [30] 金晶,吴水莲,郭可俊. 结肠癌患者外周血 CD4⁺、CD8⁺细胞 PD-1 表达水平及其临床意义 [J]. 浙江创伤外科, 2024, 29(1): 7-9, 13.

责任编辑 汤振金 柳剑