

网络出版时间: 2017-7-29 12:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.001.html>

◇基础医学研究◇

穿膜肽修饰的纳米颗粒抗胰腺癌的初步研究

高萌, 丁飞, 杨席席, 任乐, 许朝, 余跃

摘要 目的 探究穿膜肽修饰的纳米颗粒介导的光动力学疗法(PDT)对胰腺癌 SW1990 细胞的杀伤作用。方法 将胰腺癌 SW1990 细胞分成 4 组, 不光照不含光敏剂的细胞作为空白对照组, 与细胞共孵育的游离 Ce6 组, NP/Ce6 组及 TAT-NP/Ce6 组。首先分别制备出纳米颗粒 TAT-NP/Ce6 和 NP/Ce6。利用流式细胞仪(FACS)检测各组被 SW1990 细胞摄取的情况; 荧光显微镜观察各组光照下在细胞内产生活性氧的情况; 最后用 MTT 或活死染色法检测光照下各组对细胞的杀伤效果。结果 FACS 结果显示各组分别被细胞摄取 4 h 后, TAT-NP/Ce6 组胞内荧光显著高于 NP/Ce6 组($P < 0.001$), 同时 NP/Ce6 组明显强于 free Ce6 组($P < 0.001$)。荧光显微镜显示光照下纳米颗粒 TAT-NP/Ce6 组在细胞内产生活性氧明显强于其他各组($P < 0.001$)。MTT 法显示在每一 Ce6 浓度下光照时, TAT-NP/Ce6 组对细胞的杀伤效果明显强于 NP/Ce6($P < 0.01$), Ce6 浓度为 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 时, 活死细胞染色法同样证明了对细胞的这种杀伤效果。结论 TAT 肽修饰的纳米颗粒能有效增加胰腺癌细胞对其摄取, 其介导的 PDT 杀伤胰腺癌细胞效果明显增强。

关键词 穿膜肽; 纳米颗粒; 胰腺癌; 光动力学疗法

中图分类号 R 735.9 R 454.2; Q 516

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1419-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.001

胰腺癌被称为“癌中之王”, 预后差, 其 5 年生存率不足 5%^[1-2]。大多数患者被发现时已经失去了唯一可能治愈的手术机会, 中晚期主要以基于吉西他滨为一线化疗药的化疗方案, 效果不甚理想。光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是近些年在临床上应用越来越广泛的新型疗法。目前临床上 PDT 治疗胰腺癌方面相关研究较少^[3-4]。人免疫缺陷病毒 1(HIV-1)编码的 TAT 蛋白, 作为一种非特异性的细胞穿膜肽, 以其高效、无毒的方式进入

细胞, 可以结合纳米材料、蛋白、脂质体等各种物质作用细胞以达到促进细胞摄取^[5-6], 提高治疗效果。该研究旨在初步设计一种 TAT 肽修饰的纳米颗粒(TAT-NP/Ce6), 探究其携带光敏剂 Ce6 进入细胞的能力, 其介导的光动力学疗法抑制胰腺癌细胞的效果, 为合理设计纳米材料用于临床上 PDT 治疗胰腺癌提供参考基础。

1 材料与方法

1.1 材料 TAT(YGRKKRRQRRRC-NH₂) (杭州中肽生化有限公司); PEG_{77-b}-PCL₂₅ (聚乙二醇-聚己内酯) (合肥工业大学杨显珠教授馈赠); 二氢卟吩 e6 (Ce6, 上海百灵威公司); 人胰腺癌细胞系 SW1990 (美国 ATCC 细胞库); RPMI-1640 (美国 Invitrogen 公司); 活性氧指示剂(DCFH-DA, 上海碧云天公司); 噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 钙黄绿素乙酰甲酯(Calcein, AM) 和溴乙非啶豪莫二聚体(Ethidium homodimer-1) (美国赛默飞世尔公司)。

1.2 方法

1.2.1 纳米颗粒的制备 首先通过马来酰胺化的 PEG 引发己内酯开环聚合得到聚合物 Mal-PEG-PCL, TAT 通过巯基点击反应键合到 Mal-PEG-PCL 形成 TAT-PEG-PCL。在水相中 PCL 疏水端通过疏水间作用力包载光敏剂 Ce6, 最后得到纳米颗粒 TAT-NP/Ce6。NP/Ce6 通过类似的方法得到。

1.2.2 细胞培养 SW1990 细胞系购自中科院上海细胞库, 1640 RPMI 培养液(10% FBS, 1% 双抗) 培养于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中, 细胞生长贴壁面积达 80%~90% 时 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.3 流式细胞仪检测纳米颗粒 TAT-NP/Ce6、NP/Ce6 及游离 Ce6 被细胞的摄取情况 待 SW1990 细胞生长至对数期, 用无菌 PBS 清洗后, 用 0.25% 胰酶消化, 吹打制成单细胞悬液后, 种植在 24 孔板中, 每孔 8×10^4 细胞。温箱中继续培养 24 h 后取出, 弃掉旧的培养液, 用完全 1640 培养液配制纳米颗粒 NP/Ce6、TAT-NP/Ce6 或游离 Ce6 溶液,

2017-05-11 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085SQH224)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

作者简介: 高萌, 男, 硕士研究生;

余跃, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-

mail: yuyuemd@163.com

实验中纳米颗粒和游离 Ce6 浓度同为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将配好的上述溶液加到孔板中,同时设置不含光敏剂及纳米颗粒的细胞孔作为空白对照组。放入温箱中,细胞摄取 4 h 后,每组 3 个复孔。摄取时间结束后吸掉含纳米颗粒或游离 Ce6 的培养液,PBS 润洗 3 遍后 37 $^{\circ}\text{C}$ 胰酶消化 3 min 后取出,1 000 r/min 离心 5 min,再用 PBS 重悬,离心以充分去除纳米颗粒和游离 Ce6。PBS 重悬并上样流式检测不同组细胞摄取的 Ce6 量。

1.2.4 荧光显微镜观察细胞产生活性氧情况 细胞种板同之前的方法,种植于 24 孔板中, 8×10^4 细胞/孔。温箱中培养 24 h 后,吸掉旧的培养液。用完全培养液配制含相同 Ce6 浓度的纳米颗粒和游离光敏剂 Ce6(Ce6 浓度均为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。放入温箱中培养 4 h 后,吸掉含纳米颗粒或游离 Ce6 的培养液,PBS 润洗 3 遍后加入用 1640 培养基配制的活性氧指示剂 DCFH-DA(10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) ,在细胞培养箱中孵育 30 min 后取出。细胞用 1640 培养基润洗 3 遍用于去除背景干扰。选定波长是 660 nm,功率为 0.5 W/cm^2 激发光照射细胞,每孔 20 min。同时非光照组作为对照。照射结束后在荧光显微镜下观察并拍照保存。

1.2.5 MTT 法检测光照下纳米颗粒及游离光敏剂对细胞的杀伤作用 将 SW1990 细胞种植在 96 孔板中,细胞种植密度为 5 000/孔。在温箱中孵育 24 h,弃掉旧的培养液,分别加入用完全培养液配制的含 Ce6 浓度为 0.094、0.187、0.375、0.750、1.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的游离光敏剂 Ce6 或纳米颗粒,另外设置不含光敏剂及纳米颗粒的完全培养液的细胞组作为对照。每组 4 个复孔。放入温箱 4 h 后,取出,吸掉孔板中的培养液。加入新鲜的完全培养液。选定波长为 660 nm 激发光,用 0.5 W/cm^2 平均功率照射细胞 20 min,同时非光照不加药组作为空白对照组。光照结束后,放入温箱中再培养 48 h 后取出加入配好的 MTT(1 mg/ml) ,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h 后加入配好的含 20% SDS 细胞裂解液,温箱中再孵育 8 h 后用酶标仪(检测波长:490 nm)检测各孔的吸光度(optical density,OD)值并如下公式计算细胞存活率(%) = (药物细胞组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (非光照不加药细胞组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。数据用 SPSS 16.0 和软件 GraphPad Prism, v5.0 处理。

1.2.6 活死细胞染色法检测各组 PDT 杀伤细胞情况 同时,用活死染色法直接观察了这种光细胞毒

性种板步骤基本同流式检测的种板方法,待培养 24 h 后取出,用完全培养液配制的含 Ce6 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的游离光敏剂和纳米颗粒分别加入到相对应的孔板中,培养箱中孵育 12 h 后取出用 660 nm 激发光 0.5 W/cm^2 照射细胞 20 min。非光照不加药组作为空白对照组。光照结束后,放入温箱中再培养 48 h 后加入用 PBS 配好的活细胞染色液钙黄绿素乙酰甲酯(Calcein, AM 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 和死细胞染色液溴乙非啶豪莫二聚体(Ethidium homodimer-1 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 每孔 100 μl 。室温下孵育 30 min 后荧光显微镜观察并拍照保存,最后用软件 Image J 统计各张图片中的死细胞及活细胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,每组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本组间变量对比采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FACS 检测纳米颗粒 TAT-NP/Ce6 被胰腺癌细胞的摄取量 在细胞摄取 4 h 后,用 FACS 检测细胞内摄取的 Ce6 量。胰腺癌细胞同纳米颗粒 TAT-NP/Ce6 共孵育时,胞内的 Ce6 平均荧光强度 MFI 约为 NP/Ce6 组的 2 倍(1 615.667 \pm 105.085 *vs* 759.333 \pm 71.723, $t = 8.945$, $P < 0.001$),NP/Ce6 组约为游离 Ce6 组的 2.8 倍(759.333 \pm 71.723 *vs* 272.000 \pm 16.753, $t = 9.357$, $P < 0.001$),各组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 1。

2.2 荧光显微镜观察纳米颗粒 TAT-NP/Ce6 光照后活性氧的产生 颗粒或游离 Ce6 被细胞摄取后,在光照下能够与氧结合产生活性氧,光照下 TAT-NP/Ce6 组单个视野下绿色荧光表达的细胞数明显强于 NP/Ce6 组(861.000 \pm 29.280 *vs* 421.000 \pm 18.771, $t = 21.929$, $P < 0.001$),同时 NP/Ce6 组显著多于 free Ce6 组(421.000 \pm 18.771 *vs* 111.000 \pm 16.523, $t = 21.495$, $P < 0.0001$),空白对照组绿色荧光表达的细胞数极少(8.000 \pm 1.528),各组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2。

2.3 MTT 法检测光照下纳米颗粒 TAT-NP/Ce6 对细胞的杀伤作用 产生的活性氧能够导致细胞坏死或凋亡。光照下 TAT-NP/Ce6 组抑制细胞的生长作用强于 NP/Ce6 组,NP/Ce6 组光细胞毒性明显强于 free Ce6 组。如 Ce6 浓度为 0.313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,TAT-NP/Ce6 组对细胞的抑制率为 78.40%,接近 80%,而 NP/Ce6 或 free Ce6 组抑制率分别只有 39.15% 和 15.74%,均明显低于 TAT-NP/Ce6 组。

见图3、表1。

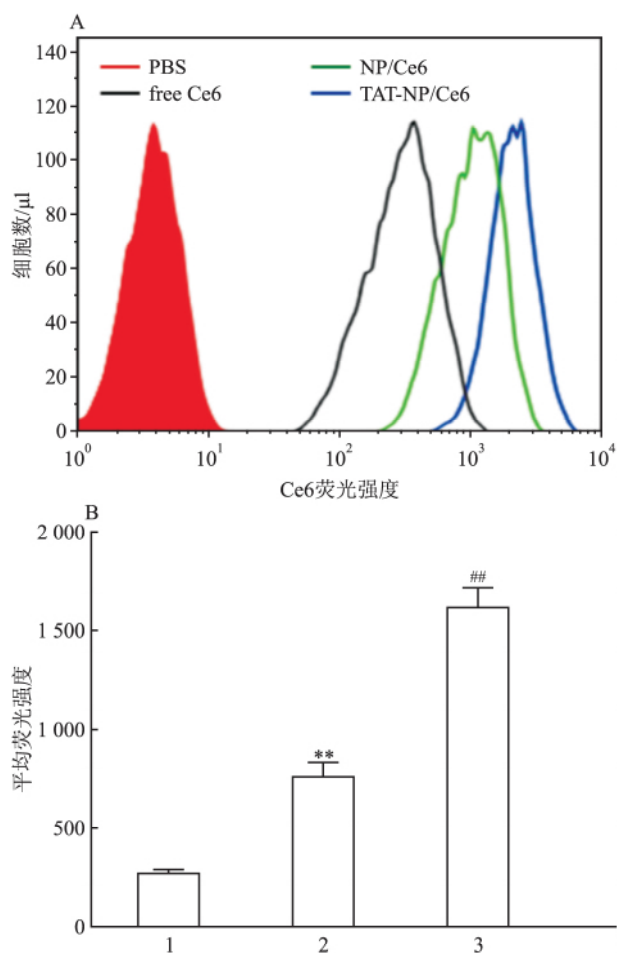


图1 FACS检测 free Ce6、NP/Ce6 及 TAT-NP/Ce6 被细胞摄取情况

A: 流式峰图; B: 柱状图; 1: free Ce6 组; 2: NP/Ce6 组; 3: TAT-NP/Ce6 组; 与 free Ce6 组比较: ** $P < 0.001$; 与 NP/Ce6 组比较: ## $P < 0.001$

表1 光照下各处理组在不同 Ce6 浓度下对 SW1990 细胞生长的抑制率(% $n=3 \bar{x} \pm s$)

浓度($\mu\text{g/ml}$)	free Ce6 组	NP/Ce6 组	TAT-NP/Ce6 组
0.094	7.86 \pm 3.63	30.58 \pm 4.60*	58.43 \pm 5.20#
0.187	15.74 \pm 1.79	39.15 \pm 2.30**	78.40 \pm 3.90##
0.375	26.27 \pm 1.46	64.48 \pm 2.70**	89.18 \pm 2.59##
0.750	68.92 \pm 1.79	83.92 \pm 3.00*	94.35 \pm 1.35#

与 free Ce6 比较: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$; 与 NP/Ce6 比较: # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$

2.4 活死细胞染色法检测光照后各组对细胞的杀伤情况 活死细胞染色法更直观地观察到这种 PDT 抑制细胞生长的效果。绿色代表活细胞,红色代表死细胞。光照下 TAT-NP/Ce6 组单个视野下死细胞所占比例明显高于 NP/Ce6 组(88.87% \pm 3.78% vs 65.03% \pm 4.01% $t = 7.494$, $P < 0.01$),同时 NP/Ce6 组强于游离 Ce6 组,各组间差异有统计学意义

(65.03% \pm 4.01% vs 23.13% \pm 2.06% $t = 16.121$, $P < 0.001$)。见图4。

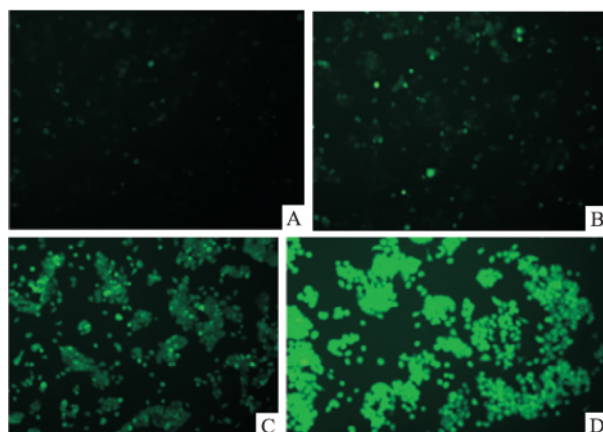


图2 free Ce6、NP/Ce6 及 TAT-NP/Ce6 光照后活性氧的产生情况 SP \times 200

A: 空白对照组; B: free Ce6 组; C: NP/Ce6 组; D: TAT-NP/Ce6 组

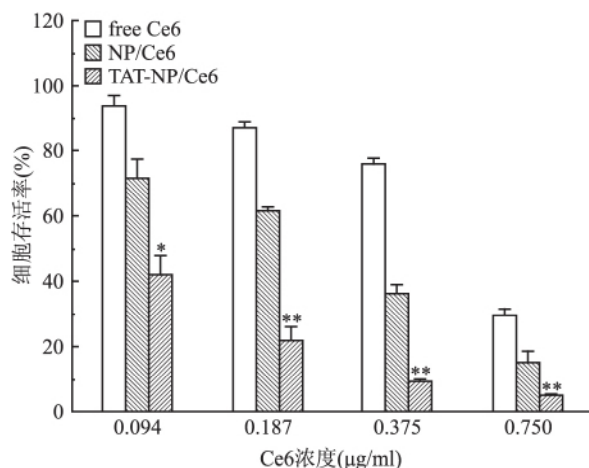


图3 MTT 法检测各组光照后对细胞的杀伤情况与 NP/Ce6 比较: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

3 讨论

PDT 基于光敏剂在一定波长的激发光下,与病变部位的氧结合产生活性氧,进而导致细胞凋亡和组织损伤。该疗法已经被 FDA 批准用于临床上一系列疾病,包括膀胱癌、皮肤癌、肺癌、食管癌等的治疗^[7]。但因游离光敏剂水溶性差和对组织选择性低等缺点极大地阻碍了 PDT 在临床上的治疗应用。为了解决这一困难,有研究^[8]尝试通过将纳米载药体系结合光敏剂用于 PDT 治疗胰腺癌, Ding et al 利用两亲性纳米载药体系聚乙二醇-聚磷酸酯(PEG-*b*-PPE) 包载 Ce6,一定程度上提高了光敏剂 Ce6 的水溶性,提高了光敏剂在肿瘤部位的富集,体

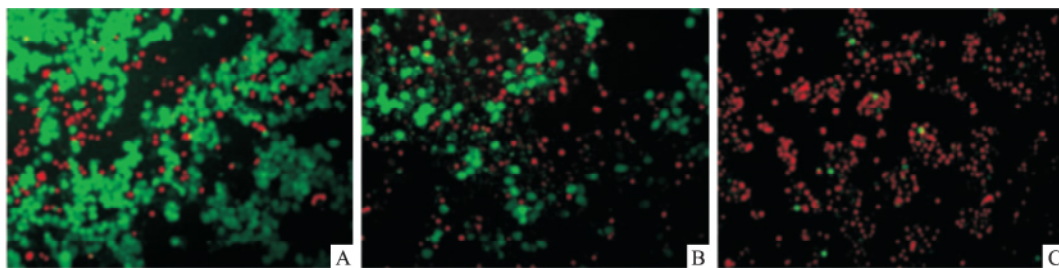


图4 活死染色法检测各组光照后对细胞的杀伤情况 ×200
A: free Ce6 组; B: NP/Ce6 组; C: TAT-NP/Ce6 组

内外均显示出较好的抗胰腺癌效果。

目前多数纳米颗粒依靠细胞内吞作用进入细胞中。首先细胞膜是药物进入细胞发挥药效的一个非常重要的屏障,另外纳米颗粒等在被细胞摄入入细胞后在内涵体或溶酶体中低 pH 值,溶酶体中各种消化酶作用下,最后经过内涵体膜的屏障,使得纳米颗粒携带的药物发挥疗效受限,限制了纳米颗粒的应用及发展。如果药物分子能够有效进入细胞,避免被内涵体降解并从中逃逸出来进入细胞质,疗效将大大提高。目前经常采用的一种方法是将纳米药物通过与细胞穿膜肽(CPPs)连接,CPPs 具有高效穿透细胞膜的特性^[9-11]。研究^[12]表明富含精氨酸(Arginine)的细胞穿膜肽(AR-CPPs)可以通过直接穿透细胞膜或细胞内吞的方式进入细胞中,进一步携带纳米药物、蛋白、脂质体等发生内涵体逃逸。本研究中所用的 TAT(YGRKKRRQRRRC-NH₂),细胞穿膜肽中的一种,其富含精氨酸,可以不通过内吞作用直接渗透进入细胞质膜中,进而发生内涵体逃逸^[13-14]。

本研究中通过 FACS 结果明显显示出纳米颗粒 NP/Ce6 连接上 TAT 肽后被细胞摄取能力增强,CLSM 更直观地观察到被细胞摄取 4 h 后,纳米颗粒 TAT-NP/Ce6 主要集中在细胞膜及细胞质中,证明 TAT 肽结合纳米颗粒有效穿透细胞膜携带光敏剂 Ce6 进入细胞中。

细胞摄取 Ce6 增加,光照后会导致 ROS 的产生量增多。荧光显微镜观察到光照时 TAT-NP/Ce6 组相对于 NP/Ce6 组或 free Ce6 组,产生的活性氧显著提高。MTT 或活死染色法验证了活性氧的光细胞毒性作用,TAT-NP/Ce6 组在 Ce6 浓度只有 0.5 μg/ml 时,光照下细胞存活率显著降低(<5%),促进了细胞凋亡。大量研究^[5,15]表明纳米颗粒结合纳米颗粒结合 TAT 肽后将抗肿瘤药物更多输送到肿瘤细胞中,发挥抗肿瘤效果,如研究^[15]表明 TAT 肽结合

纳米材料介导的 PDT 具有良好抗宫颈癌效果。付寒等^[5]利用 TAT 肽和还原敏感型可断裂 PEG 共修饰脂质体包载抗肿瘤药紫杉醇评价了其在体外细胞摄取,抗黑色素瘤效果上的潜在优势,同样证实了 TAT 肽结合纳米材料携带抗肿瘤药进入细胞并发挥显著地抗肿瘤效果。

综上所述,本研究体外证明了纳米颗粒结合 TAT 肽能更有效地穿透胰腺癌 SW1990 细胞并有效递送光敏剂 Ce6 进入细胞,其介导的 PDT 能抑制胰腺癌细胞增殖,促进其凋亡,表现出显著的抗肿瘤效果。本研究为临床 PDT 治疗胰腺癌提供新的可能途径。尽管细胞穿膜肽具有上述的高转导效率,有效携带大分子物质进入肿瘤细胞中及低毒性等诸多优点,但其可以与血清中蛋白发生非特异性结合导致其很快被网状内皮系统快速清除^[16],如何对穿膜肽表面功能化基因进行修饰,延长其在血液循环中的滞留时间,使其更有效地发挥抗肿瘤效果,还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Bssde P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- [2] 杨尹默,刘子文,赵玉沛,等. 胰腺癌诊治指南(2014) [J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(11): 1011-7.
- [3] Bown S G, Rogowska A Z, Whitelaw D E, et al. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas [J]. Gut, 2002, 50(4): 549-57.
- [4] Pereira S. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract Cancer: the UK experience [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2012, 10 Suppl 2: S48-51.
- [5] 付寒,胡关莲,何勤. 细胞穿膜肽 TAT 和可断裂 PEG 共修饰载紫杉醇脂质体的制备及体外促细胞凋亡作用 [J]. 药学学报, 2014, 49(7): 1054-61.
- [6] Pan L, He Q, Liu J, et al. Nuclear-targeted drug delivery of TAT peptide-conjugated monodisperse mesoporous silica nanoparticles [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(13): 5722-5.
- [7] Ormond A, Freeman H. Dye sensitizers for photodynamic therapy

- [J]. *Materials*, 2013, 6(3): 817–40.
- [8] Ding F, Li H J, Wang J X, et al. Chlorin e6-encapsulated polyphosphoester based nanocarriers with viscous flow core for effective treatment of pancreatic cancer[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(33): 18856–65.
- [9] Torchilin V P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(4–5): 548–58.
- [10] Ziegler A, Nervi P, Dürrenberger M, et al. The cationic cell-penetrating peptide CPPTAT derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(1): 138–48.
- [11] Rudolph C, Plank C, Lausier J, et al. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11411–8.
- [12] Potocky T B, Menon A K, Gellman S H. Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(50): 50188–94.
- [13] Fischer R, Köhler K, Fotin-Mleczek M, et al. [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12625–35.
- [14] Herce H D, Garcia A E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(52): 20805–10.
- [15] Ye S, Kang N, Chen M, et al. Tat/HA2 peptides conjugated AuNR@pNIPAAm as a photosensitizer carrier for near infrared triggered photodynamic therapy[J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(7): 2444–58.
- [16] Shim M S, Kwon Y J. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo*[J]. *FEBS J*, 2010, 277(23): 4814–27.

The primary research on anti-pancreatic cancer of cell penetrating peptide-modified nanoparticle

Gao Meng, Ding Fei, Yang Xixi, et al

(Dept of Gastroenterology Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the cytotoxic effects of cell penetrating peptide modified nanoparticle-mediated photodynamic therapy (PDT) on pancreatic cancer cells SW1990. **Methods** The pancreatic cancer cell line SW1990 were divided into four groups. SW1990 cells without photosensitizer and light-exposing as blank control group, free Ce6 group, NP/Ce6 group or TAT-NP/Ce6 group which incubation with cells, respectively. Cellular uptake of each group was examined by flow cytometry. Moreover, the generation of ROS in cells after laser irradiation was observed by fluorescence microscope. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) or Live/Dead cellular staining were used for the detection of cytotoxic effect caused by nanoparticles or free Ce6 under laser irradiation. **Results** From the results of FACS, the cellular uptake of TAT-NP/Ce6 group significantly higher than NP/Ce6 group after incubation for 4 h ($P < 0.001$), while the NP/Ce6 group was significantly stronger than the free Ce6 group ($P < 0.001$). Fluorescence microscopy showed that the TAT-NP/Ce6 group was significantly stronger in the cells than in the other groups ($P < 0.001$). MTT assay showed that the killing effect of TAT-NP/Ce6 group on cells was stronger than that of NP/Ce6 ($P < 0.01$). At the Ce6 concentration of 0.5 $\mu\text{g/ml}$, the results of Live/Dead cellular staining showed similar cytotoxic effects with that of MTT. **Conclusion** TAT peptide-modified nanoparticles can effectively increase the uptake of pancreatic cancer cells, and the cytotoxic effect of PDT-induced pancreatic cancer cells.

Key words cell penetrating peptide; nanoparticle; pancreatic cancer; photodynamic therapy