

## pH 敏感型热休克笼形蛋白纳米载体的构建及其理化性质评价

王喻<sup>1,2</sup>, 饶跃峰<sup>2</sup>, 杨惠卿<sup>1</sup>, 骆红飞<sup>1</sup>, 赵子明<sup>3\*</sup> (1.浙江中医药大学附属第二医院, 杭州 310005; 2.浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310003; 3.徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221004)

**摘要:** 目的 设计并制备具有靶向肿瘤且 pH 敏感的热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)笼形蛋白纳米递药系统, 并对其理化性质进行表征。方法 采用基因全合成与蛋白质重组表达技术纯化 HSP 为母版, 通过表面官能团功能化制备得到修饰穿膜肽 Tat、聚乙二醇包衣的热休克笼形蛋白纳米载体(PT-HSP)。通过透射电镜、纳米粒度与 Zeta 电位测定仪对其形态、粒径及 Zeta 电位进行表征, 并建立 HPLC 测定其载药量与包封率。考察载紫杉醇(paclitaxel, PTX)的 PT-HSP 在生理 pH 条件(pH 7.4)与肿瘤 pH 条件(pH 6.5)下的体外释药行为。结果 形态学结果表明, PT-HSP 是呈现典型双层结构的均一球体, 平均粒径为(154.4±23.6)nm, Zeta 电位为(-2.6±0.7)mV。HPLC 测得载 PTX 的 PT-HSP 的包封率为(75.3±3.6)%, 载药量为(7.0±0.2)%。体外释药试验结果表明 PT-HSP 在 pH 7.4 条件下的释放速率显著慢于 pH 6.5 条件下的释放速率( $P<0.01$ )。结论 本研究制备得到的 pH 敏感的 HSP 笼形蛋白智能纳米递药系统具有载药量高、稳定性强及智能靶向等优点, 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; 聚乙二醇; Tat 肽; pH 敏感; 纳米载体

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)17-2113-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.17.001

引用本文: 王喻, 饶跃峰, 杨惠卿, 等. pH 敏感型热休克笼形蛋白纳米载体的构建及其理化性质评价[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2113-2118.

### Preparation and Evaluation of Physicochemical Properties of pH Sensitive Nanocarriers Based on Cage-like Heat Shock Proteins

WANG Yu<sup>1,2</sup>, RAO Yuefeng<sup>2</sup>, YANG Huiqing<sup>1</sup>, LUO Hongfei<sup>1</sup>, ZHAO Ziming<sup>3\*</sup> (1. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China; 2. The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 3. Department of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To design and prepare a tumor-targeted pH-sensitive delivery system based on heat shock proteins(HSP) nanocages, and to evaluate its physicochemical properties. **METHODS** Using HSP as the matrix, which were prepared by total gene synthesis and protein recombination expression technology, HSP nanocages modified with cell-penetrating peptides Tat and PEG(PT-HSP) were produced via the functionalization of surface groups. Morphology was examined by TEM, particle size and Zeta potential were determined by nanometer particle size and zeta potential measuring instrument. Encapsulation efficiency and loading capacity were determined by HPLC. The *in vitro* release behavior of paclitaxel-loaded PT-HSP under pH 7.4 and pH 6.5 was investigated. **RESULTS** Morphological results showed that PT-HSP presented uniform spherical with a typical two-layer structure, the average size of PT-HSP was (154.4±23.6)nm, Zeta potential was (-2.6±0.7)mV. Encapsulation efficiency and loading capacity of PT-HSP detected by HPLC were (75.3±3.6)% and (7.0±0.2)%. The results of *in vitro* release test showed that the release rate of PT-HSP at pH 6.5 was faster than pH 7.4( $P<0.01$ ). **CONCLUSION** The pH-sensitive intelligent HSP nanocages drug delivery system constructed in this study, is expected to become a safe, effective and intelligent antitumor drug delivery carriers by its high loading capacity, good stability and intelligent tumor-targeting.

**KEYWORDS:** heat shock proteins(HSP); PEG; Tat; pH-sensitive; nanocarriers

基金项目: 国家自然科学基金项目(81773643, 81872213); 江苏省高校自然科学基金项目(17KJB350014); 浙江省医药卫生科研基金项目(2017KY516)

作者简介: 王喻, 女, 硕士, 药师 Tel: (0571)85267209 E-mail: may\_0531@126.com \*通信作者: 赵子明, 男, 博士, 副教授 Tel: 15162109513 E-mail: zzm\_chn@sina.com

紫杉醇(paclitaxel, PTX)是从红豆杉属植物紫杉的树干和树皮中提取的一种天然抗肿瘤活性成分。其能与细胞中  $\beta$ -微管蛋白结合,抑制微管解聚化,从而抑制细胞有丝分裂,为临床治疗卵巢癌和乳腺癌的一线药物,广泛应用于肺癌、食道癌、膀胱癌、头颈部癌的治疗<sup>[1]</sup>。然而 PTX 的不良反应较多,其中骨髓抑制、神经毒性和心脏毒性较常见<sup>[2]</sup>。因此,开发新型的 PTX 纳米载体,既可以增加其溶解度,实现体内缓慢释放,又能增强 PTX 对肿瘤细胞的杀伤作用,减少对正常细胞的损伤,提高主动靶向性<sup>[3-6]</sup>。小分子热休克蛋白(small molecular heat shock protein, sHSP)是一种由 24 个相同亚基构成的球状笼形空心结构,其内部空腔可以作为药物的载库<sup>[7-8]</sup>。在 pH 5~11、常温和 70 °C 条件下都比较稳定,并且内部和外部表面都有丰富的可修饰位点<sup>[9]</sup>。Flenniken 等<sup>[10]</sup>将一种甲烷球菌的 HSP(Mj-HSP)的外部结合 RGD-4C 后发现可以靶向整合素  $\alpha$ V $\beta$ 3 表达的细胞,将 Mj-HSP 的外部结合抗 CD4 抗体后可以特异性靶向 CD4 阳性细胞,表明 Mj-HSP 可以成为一种细胞特异性靶向的纳米载体。他们还研究发现将 Mj-HSP 内部的一些氨基酸定点突变为含巯基的半胱氨酸后,可以通过一种对酸敏感的键把抗肿瘤药阿霉素共价结合到 Mj-HSP 内部<sup>[11]</sup>。Tat 肽作为一种常用的细胞穿膜肽,已广泛用于药物传递系统的构建。它可以透过生物屏障,向细胞内转运不同分子,甚至粒径为 200 nm 的纳米载体,且不引起显著的细胞毒性<sup>[12-13]</sup>,是一种高效安全的转运载体。相关文献表明<sup>[14-15]</sup>,体内肿瘤部位的 pH 值比正常组织略低,酸度敏感性纳米载体在结构上含有对酸、碱敏感的基团,随着外界环境的改变,基团可以发生化学键的断裂或携带相反的电荷,进而引起性质的改变。目前已有报道的是含有脲键的聚合物<sup>[16]</sup>及磺胺嘧啶制备的纳米胶束<sup>[17-18]</sup>。本研究以 Mj-HSP 为母版,将穿膜肽 Tat 和磺胺嘧啶/聚乙二醇丙烯酸共聚物修饰到蛋白表面,制备得到具有 pH 敏感的 HSP 笼形蛋白纳米载体,对其形态、粒径、结构、载药率、释放及稳定性等重要理化性质进行表征,为 HSP 靶向递药系统的研究提供依据。

## 1 仪器与试剂

DF-2 集热式磁力加热搅拌器(上海浦东物理光学仪器公司); SB-100DT 超声仪(宁波新芝生物

科技公司); RE-2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); AB265-S 电子天平(梅特勒-托利多公司); PB-21 pH 计(德国 Sartorius 公司); MIKRO-200R 高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司); FD-1C-50 冷冻干燥机(北京博医实验仪器公司); F4500 荧光分光光度计(日本日立); Nicomp 380/ZLS 纳米粒度-Zeta 电位测定仪(美国 PSS); SHZ-82 恒温振荡箱(上海比朗仪器公司); UV-2450 紫外-可见分光光度计、LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津); HD-6 凝胶渗透层析仪(上海沪西分析仪器厂)。

重组 MJ 热休克蛋白 HSP(上海生工生物工程有限公司,批号: 207853); 聚乙二醇(PEG) 4000(分析纯,国药集团,批号: T20110211); PEG 6000(分析纯,南京化学试剂公司,批号: 13020420087); Tat 肽(上海生工,批号: 103013); PTX(西安昊轩生物科技公司,批号: 20140319); PEG 2000(分析纯,批号: 1207033)、乙酸钠(分析纯,批号: 1204011)均购自西陇化工公司; 磺胺嘧啶(分析纯,批号: 27960)、氰基硼氢化钠(批号: 20049862)、三氟乙醇(批号: B1425031)均购自上海阿拉丁试剂公司; 葡聚糖凝胶(Sephadex G-50,美国 Pharmacia 公司,批号: 10031); 水为双蒸水; 其他试剂为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 PEG/Tat 共修饰热休克笼形蛋白纳米载体(PEG/Tat-heat shock protein, PT-HSP)的制备

向 pH 9.0 的硼酸盐缓冲液中加入 HSP (1.0 mg)、0.25% 戊二醛溶液 (50  $\mu$ L) 与 Tat 肽 (1.0 mg), 37 °C 搅拌反应 6 h 后, 加入 1% 的氰基硼氢化钠溶液 (20  $\mu$ L), 室温搅拌 1 h。透析分离纯化后将收集的 T-HSP 组分冷冻干燥得 T-HSP, 合成路线见图 1。

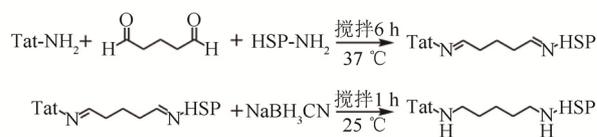


图 1 T-HSP 的合成反应式示意图

Fig. 1 Schematic diagram of T-HSP synthetic reaction

称取 40 mg 磺胺嘧啶, 加入 50 mL 蒸馏水, 在室温搅拌下逐滴加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液, 直至磺胺嘧啶完全溶解。取 20  $\mu$ L 丙烯酰磺胺嘧啶溶于 10 mL THF 中, 加入磺胺嘧啶溶液, 搅拌反应 1 h, 抽滤, 真空干燥后得丙烯酰磺胺嘧啶(acryl sulfadiazine, SDA)。分别称取 PEG 2000, 4000,

6000 各 1, 2, 3 g, 各加入 15 mL 二氯甲烷溶解, 随后加入丙烯酰氯 30  $\mu\text{L}$ , 室温搅拌反应 12 h, 50  $^{\circ}\text{C}$  减压蒸除溶剂后加水溶解, 充分透析, 冷冻干燥得不同相对分子质量的聚乙二醇丙烯酸酯 (PEGA)。

称取 100.0 mg SDA, 用 pH 9.0 的 NaOH 溶液溶解, 加入亚硫酸钠 15.6 mg, 氮气保护下加入过二硫酸钾 15.6 mg, 60  $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应 1 h; 随后投入 480.0 mg PEGA, 继续搅拌反应 1 h。渗透膜透析法纯化反应产物, 冷冻干燥得到 SDA 与 PEGA 共聚物(PSPA)。

将 T-HSP 溶解于 PBS(pH 7.4, 0.15  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 中, 按照摩尔比 1:1, 1:2, 1:3 加入 PSPA, 37  $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应 2 h。凝胶渗透层析纯化收集得到 PT-HSP 的混悬液。

## 2.2 载 PTX 的 T-HSP 与载 PTX 的 PT-HSP 的制备

将 5.0 mg T-HSP 溶解于 5 mL 三氟乙醇中, 将 1.0 mg PTX 溶于 5 mL 乙醇中, 两者混合后超声, 真空旋蒸后形成分散的载体与药物薄膜, 随后加入 10 mL 的 pH 7.4 PBS, 缓慢旋转复溶, 采用探头式超声仪超声 30 min 进行自组装。混合液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 得到载 PTX 的 T-HSP 纳米混悬液。

向载 PTX 的 T-HSP 混悬液中加入一定比例 PSPA, 37  $^{\circ}\text{C}$  搅拌 2 h, 凝胶渗透层析柱分离得到载 PTX 的 PT-HSP 纳米混悬液, 见图 2。

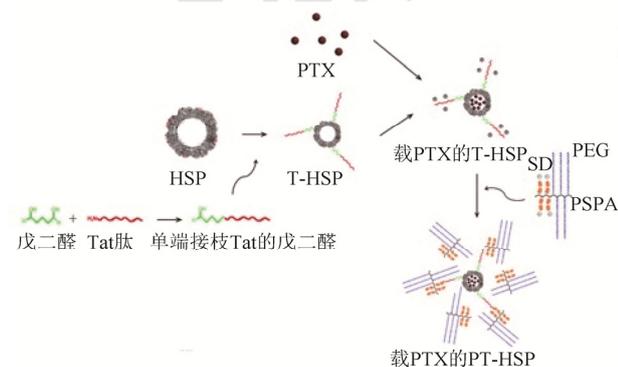


图 2 载 PTX 的 PT-HSP 的制备示意图

Fig. 2 Preparation schematic of PTX-loaded PT-HSP

## 2.3 载药量的测定

精密称定一定量的 PTX, 甲醇溶解制备成标准储备液。取一定量标准储备液用甲醇配制成 30, 20, 10, 5.0, 2.0, 1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 PTX 标准溶液。每个浓度重复进样 3 次, 记录峰面积  $A$ , 以  $A$  为纵坐标, PTX 浓度为横坐标绘制标准曲线。

采用 PEG 6000, HSP 与 PSPA 比例(H:P)为 1:2 制备载 PTX 的 PT-HSP 混悬液, 取 0.4 mL 加入凝胶微柱顶端, 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 继续加去离子水 0.4 mL, 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 2 min, 分离载体与游离药物, 收集 2 次洗脱液, 于 5 mL 量瓶中加甲醇定容, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, HPLC 测定被包裹的 PTX 药物浓度  $C$ ; 另取 0.4 mL 载 PTX 的 PT-HSP 混悬液, 直接用甲醇定容至 5 mL, 超声 10 min, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, HPLC 进样, 测定 PT-HSP 中 PTX 总浓度  $C_0$ 。按下式计算封装率(encapsulation efficiency, EE), 载药量(loading capacity, LC):

$$EE(\%)=C/C_0\times 100\%$$

$$LC(\%)=C\times V/(C\times V+W)\times 100\%$$

$C$ : 被包裹的药物浓度;  $C_0$ : 载 PTX 的 PT-HSP 混悬液中药物总浓度;  $V$ : 载药 PT-HSP 纳米混悬液总体积;  $W$ : 载药 PT-HSP 纳米混悬液中 PT-HSP 的总质量。

## 2.4 PT-HSP 理化性质的考察

**2.4.1 粒径与 Zeta 电位** 将 HSP、T-HSP、PT-HSP 混悬液分别用蒸馏水适当稀释, 用 Nicomp 380/ZLS 型纳米粒度与 Zeta 电位测定仪测定纳米粒的粒径与 Zeta 电位, 并分别考察 PSPA 中 PEG 相对分子质量分别为 2000, 4000, 6000 以及 HSP 亚基与 PSPA 投料比为 1:1, 1:2, 1:3 对 PT-HSP 纳米粒径及电位的影响。此后实验中所采用的 PT-HSP 样品组成均为 PEG 6000, H:P=1:2。

**2.4.2 形态学研究** 将 HSP、T-HSP、PT-HSP 混悬液分别用去离子水适当稀释, 滴于铜网上, 自然晾干后, 拍摄透射电镜照片, 观察形态。

**2.4.3 pH 敏感性** 配制 pH 5.0、pH 6.0 的醋酸盐缓冲液, pH 6.5、pH 7.0、pH 7.4、pH 8.0 的磷酸盐缓冲液、pH 9.0 的硼酸盐缓冲液溶液(离子强度均为 0.15  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 将 T-HSP 和 PT-HSP 样品分别溶解于不同 pH 的缓冲液中, 搅拌 0.5 h 后纳米粒度仪测定粒径大小, 通过 PT-HSP 粒径的变化考察其包衣结构是否具有肿瘤 pH 敏感性。

**2.4.4 体外稳定性实验** 配制 PBS(pH 7.4, 0.15  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 缓冲液与含 4.5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 PBS(pH 7.4, 0.15  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 缓冲液(与血液中白蛋白浓度接近), 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时测定粒径大小, 考察 T-HSP 与 PT-HSP 在缓冲液与模拟体液中的稳

定性。

**2.4.5 载药 PT-HSP 释药特性的研究** 取 6.5 mL 载 PTX 的 PT-HSP 纳米粒混悬液装入透析袋 (MWCO: 1000), 分别置于装有 50 mL PBS(pH 6.5, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>)溶液和 PBS(pH 7.4, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>)溶液的烧杯中, 烧杯中另外添加 10 mL 二氯甲烷, 保鲜膜封口, 各平行 3 份。将 6 个装有透析袋的烧杯置于恒温振荡箱中, 37 °C, 100 r·min<sup>-1</sup>, 考察其释放行为。分别于 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h 吸取 1 mL 二氯甲烷层溶液, 同时补充等体积的二氯甲烷; 45 °C 旋蒸除掉溶剂后用甲醇复溶, 再用甲醇定量至 5 mL, 用紫外分光光度计在 227 nm 下测定吸光度, 计算累积释放百分率, 绘制释放曲线。

### 2.5 统计学分析

所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析, 假设检验水准按  $\alpha=0.05$  判定,  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果与分析

### 3.1 粒径与 Zeta 电位

采用纳米粒度-Zeta 电位测定仪检测 HSP、T-HSP 与 PT-HSP 的粒径分布与 Zeta 电位。结果显示, HSP 表面修饰 Tat 和 PSPA 对纳米粒的粒径和 Zeta 有显著影响, 与 HSP 相比, T-HSP 的表面电荷由负电荷 (-9.3±1.5)mV 转变为正电荷 (9.7±0.8)mV, 这是由于 Tat 本身所携带正电荷造成的; 与 T-HSP 相比, PSPA 的修饰使得 PT-HSP3 (PEG 6000, H : P=1 : 2) 的表面电荷再次由正电荷转为略带负电荷 (-2.6±0.7)mV, 原因有 2 点: ①生理环境下携带负电荷的 PSPA 通过静电作用与 T-HSP 结合, 从而掩盖了 T-HSP 的正电荷; ②由 PT-HSP 表面存在的 PEG 亲水长链所造成的。经 Tat 和 PSPA 修饰的 T-HSP 及 PT-HSP, 粒径分别从 (18.2±2.0)nm 增加至 (71.5±12.7)nm 和 (154.4±23.6)nm。PT-HSP 的粒径随 PSPA 中 PEG 相对分子质量增加而略微增大。HSP 亚基与 PSPA 的投料比对粒径影响不明显。结果见表 1。

### 3.2 形态学研究

通过透射电镜照片可观察到图 3B 中 T-HSP 纳米粒经 Tat 修饰后呈现边界较为模糊的球状颗粒; 图 3C 的 PT-HSP 纳米粒周围呈明显的“形态云”, 推测为吸附在纳米粒表面的 PEG 亲水长链。结果见图 3。

表 1 HSP 及其功能化产物的粒径与 Zeta 电位(n=3)

Tab. 1 Particle size and Zeta potential of HSP and its functionalized products(n=3)

样品	粒径/nm	多分散性指数	Zeta 电位/mV
HSP	18.2±2.0	0.18	-9.3±1.5
T-HSP	71.5±12.7	0.18	9.7±0.8
PT-HSP 1	117.7±16.9	0.14	3.8±1.1
PT-HSP 2	122.9±29.2	0.23	1.6±0.7
PT-HSP 3	154.4±23.6	0.12	-2.6±0.7
PT-HSP 4	149.4±30.3	0.14	3.7±1.0
PT-HSP 5	157.8±36.2	0.19	-2.9±0.8

注: PT-HSP 1[PEG 2000, HSP 与 PSPA 比例(H : P)=1 : 2], PT-HSP 2(PEG 4000, H : P=1 : 2), PT-HSP 3(PEG 6000, H : P=1 : 2), PT-HSP 4(PEG 6000, H : P=1 : 1), PT-HSP 5(PEG 6000, H : P=1 : 3)。

Note: PT-HSP 1[PEG 2000, ratio of HPS to PSPA(H : P)=1 : 2], PT-HSP 2(PEG 4000, H : P=1 : 2), PT-HSP 3(PEG 6000, H : P=1 : 2), PT-HSP 4(PEG 6000, H : P=1 : 1), PT-HSP 5(PEG 6000, H : P=1 : 3)。

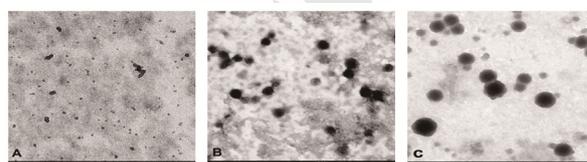


图 3 HSP 及其衍生物纳米载体的透射电镜图

A-HSP; B-T-HSP; C-PT-HSP。

Fig. 3 TEM images of HSP and its derivative nanocarriers

A-HSP; B-T-HSP; C-PT-HSP.

### 3.3 LC 和 EE 的测定

按建立的 LC 及 EE 测定方法, 测定 3 批 PT-HSP 混悬液的载药量及包封率, 结果见表 2。

表 2 载 PTX 的 PT-HSP 的载药量及包封率(n=3)

Tab. 2 Drug loading and encapsulation rate of PTX-loaded PT-HSP(n=3)

样品	载药量/%	平均值/%	包封率/%	平均值/%
1	6.7		71.4	
2	7.0	7.0±0.2	74.4	75.3±3.6
3	7.2		80.1	

### 3.4 pH 敏感性

T-HSP 在 pH 5.0~9.0 内, 粒径基本保持稳定。PT-HSP 在 pH ≥ 7.0 时, 粒径约为 140 nm; 当 pH < 6.5 时, 粒径突然减小至约 69 nm。结果见图 4。

### 3.5 体外稳定性试验

T-HSP 在不含 BSA 的 PBS 缓冲液中, 能在 24 h 内保持稳定, 而在含 4.5% BSA 的 PBS 中, 粒径在短时间内急剧变大乃至最终沉淀。PT-HSP 在普通及含 4.5% BSA 的 PBS 中均保持了较好的稳定性, 24 h 其粒径大小未发生明显改变。结果见图 5~6。

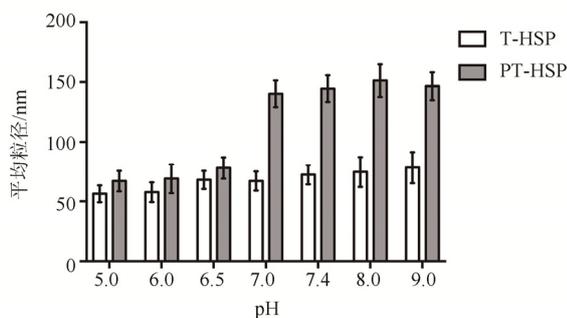


图4 T-HSP与PT-HSP在不同pH值缓冲液中的粒径变化  
Fig. 4 Particle size change of T-HSP and PT-HSP in different pH buffer

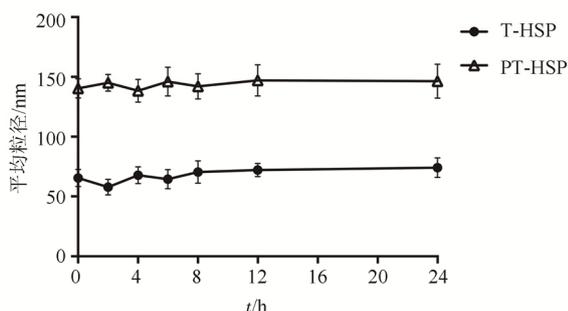


图5 T-HSP与PT-HSP在PBS缓冲液中的稳定性(pH 7.4, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>)  
Fig. 5 Stability of T-HSP and PT-HSP in PBS buffer(pH 7.4, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>)

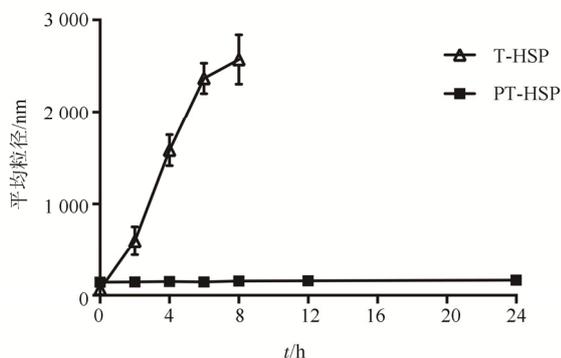


图6 T-HSP与PT-HSP在4.5% BSA溶液中的稳定性(pH 7.4, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>)  
Fig. 6 Stability of T-HSP and PT-HSP in 4.5% BSA(pH 7.4, 0.15 mol·L<sup>-1</sup>)

### 3.6 载药 PT-HSP 释药特性的研究

根据标准曲线,经计算,以时间点为横坐标,PTX的累积释放百分率为纵坐标,绘制释放曲线。结果显示,载PTX的PT-HSP纳米粒在pH 6.5时的释放呈现先快后慢的释药模式,在2, 8, 24 h的累积释放百分率分别为(33.3±3.3)%, (60.0±1.7)%和(80.5±2.0)%。而在pH 7.4时,载PTX的

PT-HSP纳米粒在对应时间点的累积释放百分率分别为(10.4±2.2)%, (28.0±3.3)%和(41.7±5.0)%,显著慢于pH 6.5时的释放速率( $P < 0.01$ )。结果见图7。

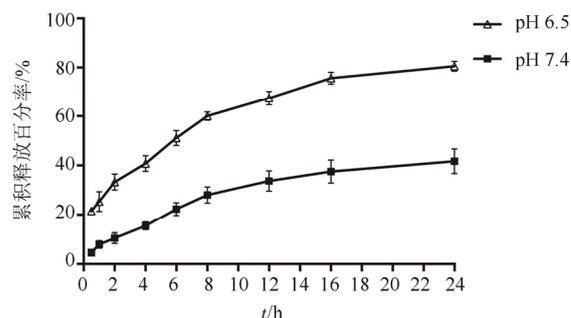


图7 不同pH条件下PT-HSP释放曲线  
Fig. 7 In vitro release of PT-HSP under different pH

## 4 结论

本研究成功构建了对肿瘤pH敏感的PT-HSP智能纳米递药载体,其最外层PSPA通过静电相互作用与T-HSP结合,得到修饰Tat/PSPA的PT-HSP。由于体内肿瘤部位的pH比正常组织略低,PT-HSP在肿瘤弱酸条件下去包衣化,PEG长链脱落暴露出Tat,增强HSP纳米粒在肿瘤组织的渗透能力;在生理pH条件下包衣化,PEG长链掩盖Tat的穿膜作用,使其不易被细胞摄取,实现了对肿瘤的特异性摄取增强,从而减少了PTX在正常组织的不良反应。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。T-HSP的平均粒径为(71.5±12.7)nm,较HSP明显增加,Zeta电位为(9.7±0.8)mV;PT-HSP的平均粒径为(154.4±23.6)nm,Zeta电位为(-2.6±0.7)mV。透射电镜可清晰地观察到PT-HSP呈明显的“形态云”。纳米粒度仪检测PT-HSP在不同pH下的粒径变化,证明其在pH 6.5附近发生包衣-去包衣的转变。PT-HSP在pH 7.4的PBS及含4.5% BSA的PBS中均保持了较好的稳定性,表明PSPA包衣层的保护可以使PT-HSP免受血浆蛋白的吸附。目前上市的PTX白蛋白纳米粒中PTX的包载不使用交联剂,采用简单的物理吸附作用包载药物,因此PTX较易从白蛋白纳米粒表面释放。白蛋白纳米粒的无肿瘤靶向性,主要依靠EPR效应被动进入肿瘤组织,但再难以向肿瘤深处渗透;同时其在多种组织中均有分布,在减少PTX对正常组织的不良反应方面效果不好。本研究采用的HSP蛋白具有

独特的亚基解体-重组特性, 利用此过程包载 PTX, 可以使大部分药物包封在蛋白外壳内, 同时由于包覆于 HSP 蛋白外部的亲水性 PSPA 包衣层的阻碍, PTX 在包衣未脱离时体外释放(模拟血液环境)较为缓慢, 24 h 仅释放 40%左右, 表明其在血液循环时泄漏的比例低。

综上所述, PT-HSP 纳米载体具有良好 pH 敏感性和肿瘤靶向性, 可显著增强了 PTX 的抗肿瘤效果, 减少了不良反应, 是一种前景广阔的抗肿瘤药物递药载体。

## REFERENCE

- [1] YUAN S F, ZHU L J, ZHENG W E, et al. Effect of baicalin combined paclitaxel on proliferation of human lung carcinoma cell [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2013, 30(12): 1306-1310.
- [2] WANG T, ZHAO Y N, WANG X T, et al. Preparation, characterization, and *in vitro* cytotoxicity of docetaxel nanoparticles with a novel codendrimer as stabilizer [J]. *Drug Eval Res(药物评价研究)*, 2016, 39(5): 741-746.
- [3] NEGISHI T, KOIZUMI F, UCHINO H, et al. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitising agent compared to free paclitaxel [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(5): 601-606.
- [4] ALI I, RAHIS-UDDIN, SALIM K, et al. Advances in nano drugs for cancer chemotherapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(2): 135-146.
- [5] YOU J O, AUGUSTE D T. Feedback-regulated paclitaxel delivery based on poly(*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1950-1957.
- [6] ZHENG Y, HUANG H, FU C X. Paclitaxel/MPEG-PCL nanoparticles: preparation, characterization and *in vitro* release [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2014, 31(9): 1093-1097.
- [7] GUAN X, CHANG Y, SUN J, et al. Engineered Hsp Protein Nanocages for siRNA Delivery [J]. *Macromol Biosci*, 2018, 18(5): e1800013.
- [8] KIM R, LAI L H, LEE H H, et al. On the mechanism of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8151-8155.
- [9] FLENNIKEN M L, WILLITS D 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 Lett*, 2003, 3(11): 1573-1576.
- [10] FLENNIKEN M L, WILLITS D A, HARMSSEN A L, et al. Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into a heat shock protein cage architecture [J]. *Chem Biol*, 2006, 13(2): 161-170.
- [11] FLENNIKEN M L, LIEPOLD L O, CROWLEY B E, et al. Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture [J]. *Chem Commun(Camb)*, 2005(4): 447-449.
- [12] HU Y, PATEL S. Thermodynamics of cell-penetrating HIV1 TAT peptide insertion into PC/PS/CHOL model bilayers through transmembrane pores: the roles of cholesterol and anionic lipids [J]. *Soft Matter*, 2016, 12(32): 6716-6727.
- [13] FUTAKI S. Membrane permeable peptide vectors: chemistry and functional design for the therapeutic applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(4/5): 447.
- [14] LI S, WU W, XIU K M, et al. Doxorubicin loaded pH-responsive micelles capable of rapid intracellular drug release for potential tumor therapy [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(8): 1480-1489.
- [15] LIU D, HU H Y, 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(1): 63-71.
- [16] DING Y, SUN D, WANG G L, et al. An efficient PEGylated liposomal nanocarrier containing cell-penetrating peptide and pH-sensitive hydrazone bond for enhancing tumor-targeted drug delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015(10): 6199-6214.
- [17] CHEN W, JIN M J, GAO Z G, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of pH-sensitive TAT peptide conjugated micelles [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46(5): 599-604.
- [18] SETHURAMAN V A, LEE M C. A biodegradable pH-sensitive micelle system for targeting acidic solid tumors [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(3): 657-666.

收稿日期: 2018-11-06

(本文责编: 李艳芳)