

葡萄糖氧化酶与替拉扎明纳米胶囊 用于肿瘤乏氧治疗

王美伊¹, 李响¹, 石皓天¹, 骆昱超^{1,2}, 徐斌¹, 田文晶¹

(1. 吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012;
2. 吉林大学机械与航空航天工程学院, 长春 130022)

摘要 利用原位自由基聚合反应设计合成了葡萄糖氧化酶纳米胶囊(nGOx)和负载替拉扎明(TPZ)的介孔二氧化硅纳米胶囊(nMSNs-TPZ), 具有交联结构的聚合物壳层赋予GOx与MSNs-TPZ更高的稳定性与更长的瘤内滞留时间. nGOx持续增强的肿瘤乏氧微环境能够促使TPZ转化为具有细胞毒性的自由基, 二者协同作用增强了肿瘤治疗的效果. 研究表明, nGOx与nMSNs-TPZ均具有尺寸均一的球形结构. nGOx在胰蛋白酶、特定温度以及不同pH溶液中的稳定性均有显著提升, 并展现出良好的催化活性. nMSNs-TPZ在谷胱甘肽(GSH)存在下能够有效降解, 实现TPZ的可控释放. 体外细胞实验和体内动物实验均证实, nGOx产生的局部乏氧环境更有利于TPZ发挥作用, 两者的协同治疗展现出更优越的抑瘤效果.

关键词 肿瘤乏氧微环境; 葡萄糖氧化酶; 替拉扎明; 纳米胶囊; 介孔二氧化硅

中图分类号 O632

文献标志码 A

doi: 10.7503/cju20240239

Glucose Oxidase and Tirapazamine Nanocapsules for Tumor Hypoxia Therapy

WANG Meiyiming¹, LI Xiang¹, SHI Haotian¹, LUO Yuchao^{1,2*},
XU Bin^{1*}, TIAN Wenjing¹

(1. State Key Laboratory for Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012, China;
2. School of Mechanical and Aerospace Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract In this study, glucose oxidase nanocapsules (nGOx) and mesoporous silica nanocapsules loaded with tirapazamide (nMSNs-TPZ) were designed and synthesized using *in situ* radical polymerization reactions. The crosslinked polymer shell structure provided GOx and MSNs-TPZ with higher stability and longer tumor retention time. The sustained enhancement of the tumor hypoxic microenvironment by nGOx promoted the conversion of TPZ into cytotoxic free radicals, enhancing the therapeutic efficacy of tumor treatment through synergistic effects. Both nGOx and nMSNs-TPZ were found to have spherical structures with uniform sizes. nGOx exhibited significantly improved stability and good catalytic activity in trypsin, specific temperatures, and different pH solutions. On the other hand, nMSNs-TPZ could be efficiently degraded in the presence of GSH, allowing for the controlled release of TPZ. *In vitro* cellular experiments and *in vivo* animal studies confirmed that the local hypoxic environment generated

收稿日期: 2024-05-17. 网络首发日期: 2024-06-24.

联系人简介: 骆昱超, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事功能性纳米材料方面的研究. E-mail: luoyuchao@jlu.edu.cn

徐斌, 男, 博士, 教授, 主要从事智能纳米生物材料方面的研究. E-mail: xubin@jlu.edu.cn

基金项目: 吉林省自然科学基金(批准号: 20240101003JJ)、国家自然科学基金(批准号: 52073116)、吉林省教育厅科学技术研究项目(批准号: JJKH20241257KJ)和中央高校基本科研业务费专项资金资助.

Supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province, China(No.20240101003JJ), the National Natural Science Foundation of China(No. 52073116), the Science and Technology Project of Jilin Provincial Department of Education, China(No.JJKH20241257KJ) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China.

by nGOx was more favorable for TPZ to exert its effects. The synergistic treatment of the two nanocapsules shows superior tumor suppression effects. Therefore, this therapeutic strategy holds promise as another potential method for tumor treatment.

Keywords Tumor hypoxic microenvironment; Glucose oxidase; Tirapazamine; Nanocapsule; Mesoporous silica

恶性肿瘤已成为威胁全球人类健康的重大公共卫生问题,其发病率和致死率呈现逐年上升的趋势,预计未来将面临更加严峻的挑战^[1,2]. 肿瘤生长和增殖速度过快,许多肿瘤细胞处于超出最近毛细血管氧扩散距离的区域,并且由于血管网络混乱、扩张、曲折以及结构异常等因素,导致乏氧成为大多数实体瘤的主要特征之一^[3-9]. 近年来,研究人员开发的乏氧激活类药物[如替拉扎明(TPZ)和盐酸巴诺葱醌(AQ4N)等]已展现出对乏氧肿瘤细胞的高选择性和高细胞毒性. 其中,TPZ作为一种代表性的靶向乏氧肿瘤细胞药物,其对乏氧细胞的细胞毒性是常氧细胞的35~450倍,并且在乏氧细胞中的有效药物浓度仅为常氧细胞中的1%~2%^[10],TPZ在乏氧细胞内经单电子还原反应,形成具有细胞毒性的自由基. 这些自由基能够扩散至乏氧区域,并引发细胞的氧化损伤,导致DNA链断裂和染色体畸变. 此外,通过下调DNA损伤修复蛋白F组着色性干皮病偶联因子(XPF)重组蛋白的表达,TPZ还能抑制DNA的修复过程,从而实现对乏氧肿瘤细胞的特异性杀伤. 而在氧气充足的环境中,TPZ的自由基会转变为低毒性的形式,减少对正常细胞的毒性影响^[11-13].

增强肿瘤细胞内的乏氧程度可以有效提高TPZ的治疗效果. 葡萄糖氧化酶(GOx)通过催化葡萄糖和氧气生成葡萄糖酸和过氧化氢,在肿瘤部位原位消耗氧气以增强肿瘤部位的乏氧程度^[14-25]. Chen等^[26]将顺铂前药、GOx与TPZ共同负载在脂质体中,这种联合给药策略在不同类型的临床相关模型中均显示出了有效的肿瘤生长抑制效果. Zhao等^[27]将TPZ负载在介孔二氧化硅孔道中,在表面涂覆一层金属有机框架材料(MOF)并将GOx吸附在其表面,协同给药组细胞活性降低至30%,在体内模型中也表现出了较好的治疗效果. 因此,将GOx与TPZ协同给药是一种十分有前景的肿瘤治疗方法,但是增强药物稳定性、提高瘤内滞留时间仍然是实现其治疗潜力的重大挑战.

基于此,本文采用原位自由基聚合的方法,使用不同单体及交联剂,以过硫酸铵及*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺为引发体系制备nGOx及nMSNs-TPZ. 这种方法可以使GOx仍保持较高的活性,并精准调控纳米胶囊表面基团与性质,小分子底物(如葡萄糖)可通过壳层的网络结构自由进出^[28-33]. 聚合物壳层不仅提高了GOx的稳定性,使其能够在复杂的生理环境中保持活性,还延长了GOx在肿瘤内的滞留时间,从而提高了治疗效率. 介孔二氧化硅(MSNs)具有明确且可调节的物理化学特性且表面易于修饰,被广泛应用于药物递送领域,将TPZ负载在MSNs中,在载药后的MSNs表面进行再聚合,nMSNs-TPZ的壳层与肿瘤细胞高表达的GSH特异性结合并反应降解,释放内部药物TPZ. 这种响应性释放的机制增强了小分子药物的靶向治疗性能,提高了药物的治疗效果. 将二者协同给药后,nGOx降低肿瘤组织的氧气水平,创造乏氧微环境,释放的TPZ在乏氧微环境中转变为具有细胞毒性的自由基形式,从而更有效地抑制了肿瘤生长. 这种将GOx和MSNs-TPZ包裹在纳米胶囊中并联合给药的治疗策略提高了药物的稳定性、增强了瘤内滞留时间,为未来的肿瘤治疗提供了新思路.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

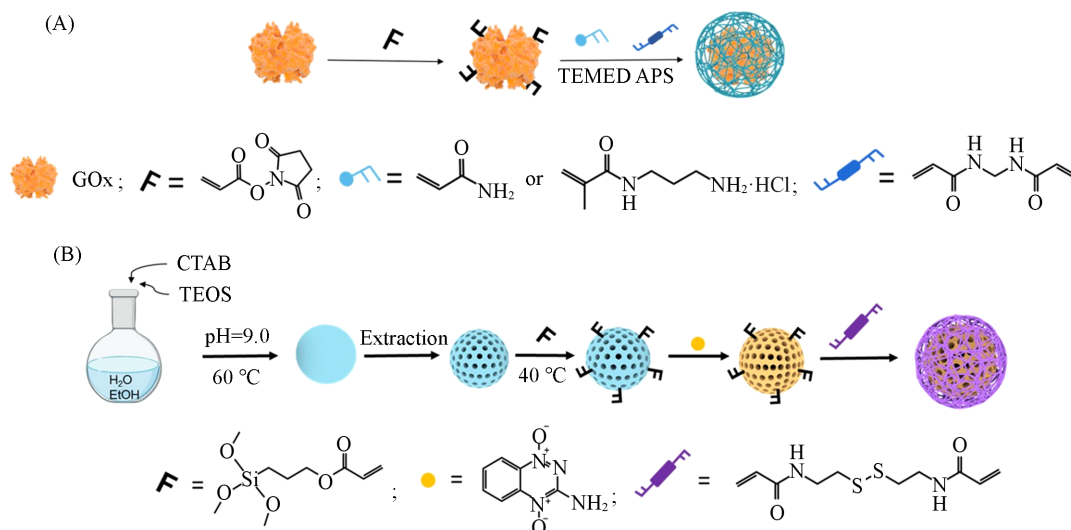
葡萄糖氧化酶(GOx, 271 U/mg)和牛血清白蛋白(BSA, 纯度98%),上海源叶生物科技有限公司;替拉扎明(TPZ, 纯度98%)和还原型谷胱甘肽(GSH, 纯度98%),上海麦克林生化科技公司; *N*-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS, 纯度98%)、二甲基亚砜(DMSO, 色谱级)、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(BIS, 纯度99%)和*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺(TEMED, 纯度99%),安耐吉化学有限公司; 丙烯酰胺(AAM, 纯度99%)、*N*-(3-氨基丙基甲基丙烯酰胺)盐酸盐(APM, 纯度98%)、过硫酸铵(APS, 纯度98%)、异硫氰酸荧光素(FITC, 纯度98%)、硅酸四乙酯(TEOS, 纯度99%)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 纯度99%)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 纯度99%)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4 , 纯度99%)、3-(甲氧基甲硅基)丙烯酸丙酯

(纯度93%)、*N,N*-双(丙烯酰胺)脒胺(BAC, 纯度98%)、溴化钾(光谱级)和Cy5.5 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯(Cy5.5-NHS, 纯度95%), 阿拉丁试剂(上海)公司; 磷酸盐(PBS)缓冲溶液、苯基-琼脂糖凝胶CL-4B、葡萄糖氧化酶活性检测试剂盒、抗荧光衰减封片剂(含DAPI)和末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记技术(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; BCA蛋白定量试剂盒、4%(质量分数)多聚甲醛和细胞活死染色试剂盒, 上海碧云天生物技术公司; 细胞培养基(DMEM)、细胞培养基(DMEM不含葡萄糖)、胎牛血清(FBS, 分析纯)和青霉素链霉素双抗(分析纯), 美国Gibco公司; CCK-8细胞毒性试剂盒, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 胰蛋白酶(1500 U/mg)、苏木精(色谱级)和伊红(纯度99.5%), 美国Sigma aldrich公司; 细胞乏氧检测试剂盒, 上海贝博生物科技有限公司; 异氟烷(纯度99.9%), 深圳瑞沃德生命科技有限公司; 浓盐酸和甲苯, 分析纯, 北京化工厂.

TECAN Spark型酶标仪(瑞士帝肯公司); Zetasizer Pro型纳米粒度及Zeta电位分析仪(DLS, 英国马尔文帕纳科有限公司); Analytik Jena Specord®210 plus型紫外-可见分光光度计(UV-Vis, 德国耶拿公司); JEM-2100F型场发射透射电子显微镜(TEM, 日本电子株式会社); AR8406型溶解氧分析仪(香港希玛仪表集团有限公司); BK-FL4型荧光显微镜(重庆奥特光学显微镜有限公司); Leica TCS SP8型激光扫描共聚焦显微镜(德国徕卡生物系统有限公司); VERTEX 80V型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR, 德国布鲁克公司); Regulus8100型扫描电子显微镜(SEM, 日本日立公司); NOVA4200e型比表面和孔隙度分析仪(美国康塔仪器公司); VARIO MICRO CUBE型元素分析仪(美国AGILENT公司); Nano Drop One型紫外-可见分光光度计(UV-Vis, 美国赛默飞世尔科技公司); ABS型小鼠呼吸麻醉机(上海普辛仪器科技有限公司); IVIS lumina II型小动物活体三维成像定量影像系统(美国冷泉港生物科技有限公司); Tissue-Tek VIP 5Jr型组织脱水机(日本樱花医疗集团); RM 2135型石蜡切片机、EG 1160型包埋机和ST5010型染色机(德国徕卡生物系统有限公司); YD-AB型组织摊烤片机(浙江益迪电子科技有限公司).

1.2 实验过程

1.2.1 nGOx的制备 nGOx的制备过程如Scheme 1(A)所示. 将GOx溶解后置于pH=7.4的1×PBS中透析纯化, 纯化后测试其在278 nm下的吸光度并计算浓度. 将GOx和NAS按摩尔比1:30在GOx表面接枝双键后与AAM, APM及BIS以摩尔比1:11000:1100:2000进行混合, 用pH=7.4的1×PBS定容至1 mL, 通过TEMED和APS引发原位自由基聚合, 于4 °C下反应4 h得到未纯化的nGOx. 将未纯化的nGOx置于截留分子量为30000的透析袋中在pH=7.4的1×PBS溶液中反复透析, 除去未参与反应的单体、交联剂以及引发剂. 再将溶液加入苯基-琼脂糖CL-4B亲疏水蛋白柱中, 用低浓度盐溶液洗脱包裹成功的纳米胶囊, 使用超滤离心管浓缩, 即得到纯化后的nGOx.



Scheme 1 Schematic illustration of the synthesis process of nGOx(A) and nMSNs-TPZ(B)

采用上述相同方法制备了牛血清白蛋白纳米胶囊(nBSA)。

1.2.2 nMSNs-TPZ的制备 将250 mg CTAB溶于乙醇和水(体积比为1:12)的混合溶液中,溶解后加入0.5 mL Na_2HPO_4 (168 mmol/L)和 NaH_2PO_4 (32 mmol/L)的混合溶液调节体系的pH,在1000 r/min转速,60 °C下缓慢滴加0.7 mL TEOS,继续反应2 h,用水和乙醇各清洗3次,采用酸醇萃取法除去表面活性剂CTAB,记为介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNs)。将500 mg MSNs加入50 mL经分子筛干燥后的无水甲苯溶液中,于40 °C下缓慢滴加0.17 mL 3-(甲氧基甲硅基)丙烯酸丙酯,继续回流12 h,离心,用无水乙醇洗涤3次,记为MSNs-接枝双键。配制不同浓度的TPZ溶液,加入等量MSNs-接枝双键,避光搅拌24 h,离心洗涤,并通过紫外-可见分光光度计在461 nm处测试上清液的吸光度,计算载药量{载药量=[(TPZ初始加入量-上清液中TPZ的含量)/TPZ初始加入量]×100%}。称取10 mg负载TPZ的MSNs-接枝双键,加入3 mL水,50 μL BAC,搅拌均匀后加入4 μL TEMED及16 μL 100 mg/mL的APS引发自由基聚合,于40 °C下反应2.5 h,离心弃去上清液中未参与反应的试剂,用去离子水洗涤3次后,放于真空烘箱中于30 °C下烘干,即为负载TPZ的介孔二氧化硅纳米胶囊,记为nMSNs-TPZ,制备过程见Scheme 1(B)。

1.2.3 nGOx的催化活性及稳定性测试 配制10 mmol/L β -D葡萄糖溶液,分别加入1 mg/mL的GOx和nGOx,搅拌均匀后放入37 °C水浴锅内模拟体内环境,在瓶内通氮气5 min以排除氧气,使用溶解氧仪测试溶液中氧气含量随时间的变化,使用pH计测试溶液pH随时间的变化。配制pH=4.4, 5.4, 6.4, 7.4, 8.4及9.4的溶液,将1 mg/mL的GOx与nGOx分别加入到不同pH的溶液中,于37 °C下孵育30 min后,使用GOx活性检测试剂盒测试GOx活性,以样品的初始活性作为参照,计算测量结果对应的相对活性值,绘制趋势变化图。将胰蛋白酶加入1 mg/mL GOx和nGOx中,胰蛋白酶的最终浓度为0.1 mg/mL,于37 °C水浴条件下与GOx及nGOx共同孵育,在指定时间点取样并测试GOx的活性。将1 mg/mL GOx和nGOx于60 °C下孵育,在指定时间点取样并测试GOx的活性。将nGOx在4 °C冰箱中静置,每隔24 h使用DLS测试粒径及多分散系数(PDI)的变化。

1.2.4 nMSNs-TPZ的药物量释放测试 配制10 mg/mL nMSNs-TPZ,加入或不加入5 mmol/L还原型GSH,分别使用微量透析管透析,用紫外-可见分光光度计测试不同时间透析液在461 nm处的吸光度,带入标准曲线中计算释放出的TPZ的量。

1.2.5 细胞毒性的检测 使用小鼠乳腺癌细胞系(4T1)进行细胞实验,CCK-8试剂盒检测不同药物的细胞毒性,将4T1细胞以8000个/孔接种到96孔板中,放入细胞培养箱中培养24 h,使其再次贴壁。将0.10~0.34 $\mu\text{g/mL}$ nBSA、nGOx(无糖培养基)、nGOx与4T1细胞在常氧培养箱中分别孵育12 h,将0.79~5.49 $\mu\text{g/mL}$ (TPZ实际浓度为0.02~0.14 $\mu\text{g/mL}$)的nMSNs-TPZ、0.1 $\mu\text{g/mL}$ nGOx+0.79~5.49 $\mu\text{g/mL}$ 的nMSNs-TPZ、0.14 $\mu\text{g/mL}$ nGOx+0.79~5.49 $\mu\text{g/mL}$ nMSNs-TPZ于无糖培养基及乏氧培养箱、含糖培养基及常氧培养箱、含糖培养基及乏氧培养箱中分别孵育12 h,其中,nMSNs-TPZ均经过GSH预处理。弃去上层清液加入培养基稀释的CCK-8试剂,在细胞培养箱中孵育2 h,使用酶标仪测试每个孔在450 nm处的光密度值(OD)并计算细胞存活率[细胞存活率=(实验组OD值-空白对照组OD值)/(对照组OD值-空白对照组OD值)×100%,其中,对照组为未加药细胞的OD值,空白对照组OD值为细胞培养液的OD值]。

1.2.6 细胞活死染色的观测 使用活死染色工作液进行细胞活死荧光成像,活死染色工作液包括钙黄绿素(Calcein-AM)对活细胞进行荧光标记,最大激发和发射波长分别为488和520 nm;碘化丙啶(Propidium iodide, PI)对死细胞进行荧光标记,激发波长和发射波长分别为543和580 nm。将4T1细胞以 1.25×10^6 个/孔接种到6孔板中,放入细胞培养箱中培养24 h,使其再次贴壁,加入不同溶液后在细胞培养箱中孵育12 h,弃去上层清液后加入活死染色工作液,避光染色15 min后使用激光扫描共聚焦显微镜观察。

1.2.7 细胞摄入的观测 将4T1细胞以 1.2×10^5 个/皿接种到共聚焦皿中,培养24 h后加入0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的nGOx-FITC培养6 h后,弃去培养基,用无菌1×PBS清洗后加入4%多聚甲醛固定液固定10 min,加入抗荧光猝灭封片剂(含DAPI)避光孵育10 min,使用激光共聚焦扫描显微镜观察nGOx细胞摄入情况。

1.2.8 nGOx 诱导细胞乏氧测试 将4T1细胞以每 1.25×10^6 个/皿接种到共聚焦皿中,加入2 mL培养基置于细胞培养箱中孵育24 h,使其全部贴壁,根据nGOx的细胞毒性实验所得结果,选取0.10和0.14 $\mu\text{g/mL}$ 两个细胞存活率均在80%以上的浓度进行nGOx诱导4T1细胞乏氧实验.将nGOx分别加入共聚焦皿中与4T1细胞共同孵育12 h,弃去上层清液使用无菌 $1 \times \text{PBS}$ 清洗后,加入细胞乏氧检测试剂盒中染色工作液,避光孵育,使用激光扫描共聚焦显微镜进行观察.

1.2.9 nGOx的瘤内滞留时间测试 所用雌性小鼠品种为Balb/c,每只小鼠体重约为18 g,生长周期为42 d左右,小鼠所处环境具有标准化的温度及湿度,安全舒适且食物充足.小鼠适应环境7 d后,对小鼠背部进行脱毛处理,皮下注射一百万个的4T1细胞,7 d后,肿瘤体积生长至约 100 mm^3 后随机将小鼠分为2组,每组5只,瘤内注射标记Cy5.5荧光的GOx和nGOx后立即进行小动物活体成像,以初次成像的荧光强度为初始值,随后分别在24 h,48 h,96 h,6 d,8 d,10 d进行活体成像,肿瘤区域的荧光强度通过Living Image软件半定量[(每次成像的荧光强度/初始的荧光强度) $\times 100\%$ 即为药物在体内的保留率].

1.2.10 nGOx与nMSNs-TPZ协同的体内抗肿瘤测试 待肿瘤体积生长至约 100 mm^3 后,随机将小鼠分为5组,每组5只,记录小鼠初始体重及肿瘤体积(肿瘤体积=长径 \times 宽径 \times 宽径/2).分组情况为:(1) PBS, (2) GOx, (3) nGOx, (4) nMSNs-TPZ, (5) nGOx+nMSNs-TPZ,给药方式为瘤内注射,GOx及nGOx给药量为0.56 mg/kg, nMSNs-TPZ给药量为21 mg/kg.给药后每隔2 d测试一次小鼠体重及肿瘤体积,从第一次给药算起,在第十天对小鼠进行安乐死,取出肿瘤并进行TUNEL和苏木精&伊红染色法(H&E)染色.解剖小鼠后取出心、肝、脾、肺、肾,使用无菌 $1 \times \text{PBS}$ 清洗干净,加入4%多聚甲醛固定液浸泡48 h,石蜡包埋制成切片并进行H&E染色,使用荧光显微镜观察各个器官的病理结构并采集图像.

2 结果与讨论

2.1 材料的表征

对nGOx与nMSNs的尺寸、形貌和表面电势进行了表征.由nGOx的TEM照片可见,nGOx呈现为粒径约20 nm的球形结构[图1(A)],与GOx相比,nGOx的粒径显著增大,这表明GOx表面已形成聚合物壳层.图1(B)和(D)分别为制备的MSNs的TEM和SEM照片,可见,MSNs为粒径约50 nm的球形纳米粒子,粒径分布均匀,并且可以观察到其表面的介孔结构.图1(C)和(E)分别为nMSNs的TEM和SEM照片,与MSNs相比,nMSNs的粒径增大至约90 nm,这证明了纳米胶囊的成功制备.

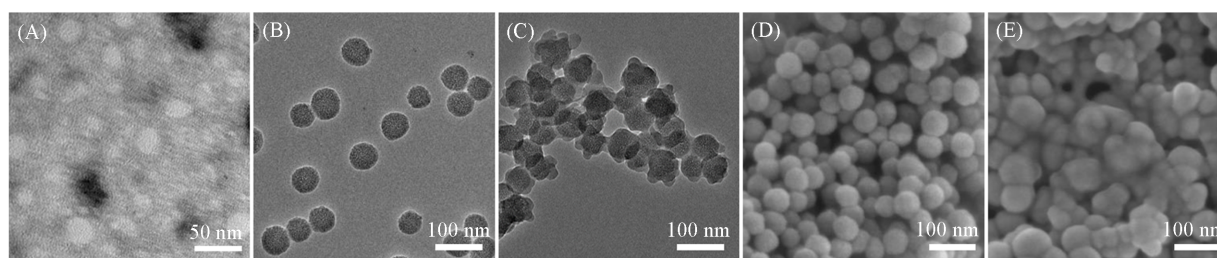


Fig. 1 TEM images of nGOx(A), MSNs(B) and nMSNs(C), SEM images of MSNs(D) and nMSNs(E)

通过水平凝胶电泳进一步验证了nGOx的成功制备.将GOx-FITC与nGOx-FITC加入琼脂糖凝胶并施加电压,在电场中带负电的GOx-FITC向正极移动,而带正电的nGOx-FITC向负极移动[图2(A)].这是因为当体系 $\text{pH}=7.4$ 时,大于蛋白的等电点,蛋白表现为负电性.而使用AAM作为主要单体,APM作为次要单体包裹GOx时,nGOx表现为正电性,因此其运动方向与GOx相反.

利用DLS对GOx, nGOx, MSNs及nMSNs在 $1 \times \text{PBS}$ 溶液中的粒径及电势进行了表征.由[图2(B)和(C)]可见,包裹前的GOx粒径为8 nm,而包裹后的nGOx粒径增大至17 nm; MSNs的粒径为61 nm,而nMSNs的粒径则增大至90 nm.表明GOx和MSNs均已被成功包裹,粒径的增大主要是由于表面形成的聚合物壳层,与TEM表征的形貌特征一致.由图2(D)可见,GOx在 $\text{pH}=7.4$ 的缓冲溶液中

的表面电位为-8.1 mV, 而包裹后的表面电位变化为4.8 mV; MSNs的表面电位为-35 mV, 包裹后的表面电位变为-1.99 mV. 这一变化是因为在pH=7.4条件下, pH值大于GOx的等电点, 因此蛋白表现为负电性; MSNs表面含有丰富的羟基, 同样表现为负电性. 而当GOx和MSNs表面被一层聚合物壳包裹后, 壳层遮蔽了GOx和MSNs表面的基团, 导致表面电性变为聚合物壳层的电性.

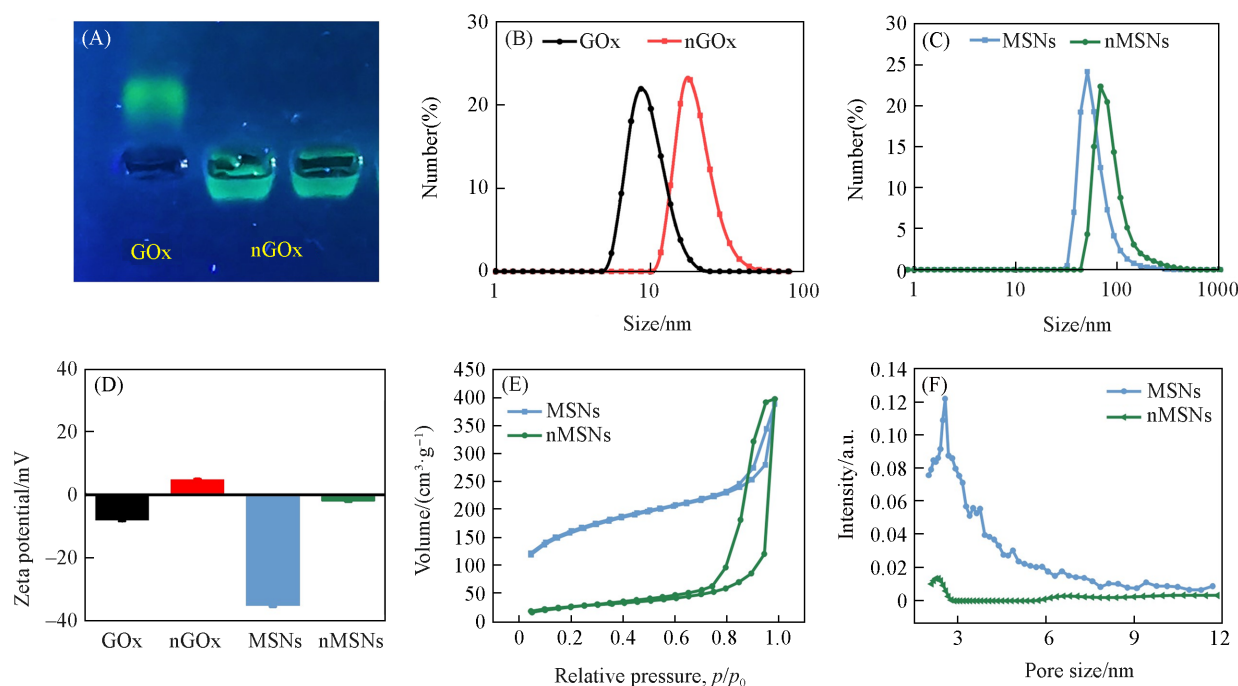


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of GOx and nGOx(A), hydrodynamic size distribution of GOx and nGOx(B), hydrodynamic size distribution of MSNs and nMSN(C), zeta potentials of the native GOx, n(GOx), MSNs and nMSNs(D), N_2 adsorption/desorption isotherms of MSNs and nMSN(E), pore size distribution of the MSNs and nMSN(F)

此外, FTIR 光谱图显示, 在 2924 和 2856 cm^{-1} 处的表面活性剂 C—H 伸缩振动峰几乎完全消失, 这表明酸醇萃取方法可以去除表面活性剂, 并暴露出孔结构; 1630 cm^{-1} 处的一OH 弯曲振动峰更加明显, 说明在去除表面活性剂的同时, 介孔二氧化硅表面的大量硅羟基也被暴露出来. 接枝双键后, 1704 cm^{-1} 处出现了对应羰基的伸缩振动峰, 证明了双键的成功接枝(图 S1, 见本文支持信息). 使用元素分析仪测试了 MSNs, MSNs 接枝双键及 nMSNs 的元素含量. 在接枝双键后, 碳元素含量略有上升, 这归因于 3-(三甲氧基甲硅基)丙烯酸丙酯中的碳原子. 在交联聚合物壳层后, 由于引入 *N,N*-双(丙烯酰胺)脒胺作为交联剂, 因此, 氮、碳、氢及硫元素含量均显著升高(表 S1, 见本文支持信息). 图 2(E)和(F)分别为 MSNs 和 nMSNs 的 N_2 吸附-脱附等温曲线和孔径分布曲线, 可见, MSNs 表现出典型的 IV 型等温线并有明显的滞后环, 这表明 MSNs 具有良好介孔结构. MSNs 的比表面积为 528 m^2/g , 具有 0.457 cm^3/g 的孔容和 2.6 nm 的孔径. 而 nMSNs 的比表面积下降到 96 m^2/g , 孔容为 0.329 cm^3/g , 孔径为 2.4 nm. 由于聚合物壳层的形成遮蔽了原有的孔结构, 导致其比表面积显著下降, 这也说明 nMSNs 的成功制备.

2.2 nGOx 的催化活性及稳定性

为了验证 nGOx 对 β -D-葡萄糖的催化活性, 进行了葡萄糖催化降解后的 pH 测试和溶解氧测试. GOx 在含有 β -D-葡萄糖的溶液中消耗氧气产生葡萄糖酸, 导致体系内氧气浓度和 pH 发生变化. 通过 pH 计测试了包裹前后 GOx 在含有葡萄糖的 PBS 缓冲溶液中孵育不同时间后体系的 pH 变化[图 3(A)]. 结果显示, 包裹前后体系 pH 值随时间增加均有显著下降, 包裹后的 nGOx 溶液的 pH 能够降至大约 4.5. 使用溶解氧仪测试体系中氧气浓度, 发现 GOx 和 nGOx 均能有效消耗氧气, 使溶液中的含氧量降低至 1.5 mg/L, 这也表明包裹后的 nGOx 仍具有良好的催化活性[图 3(B)].

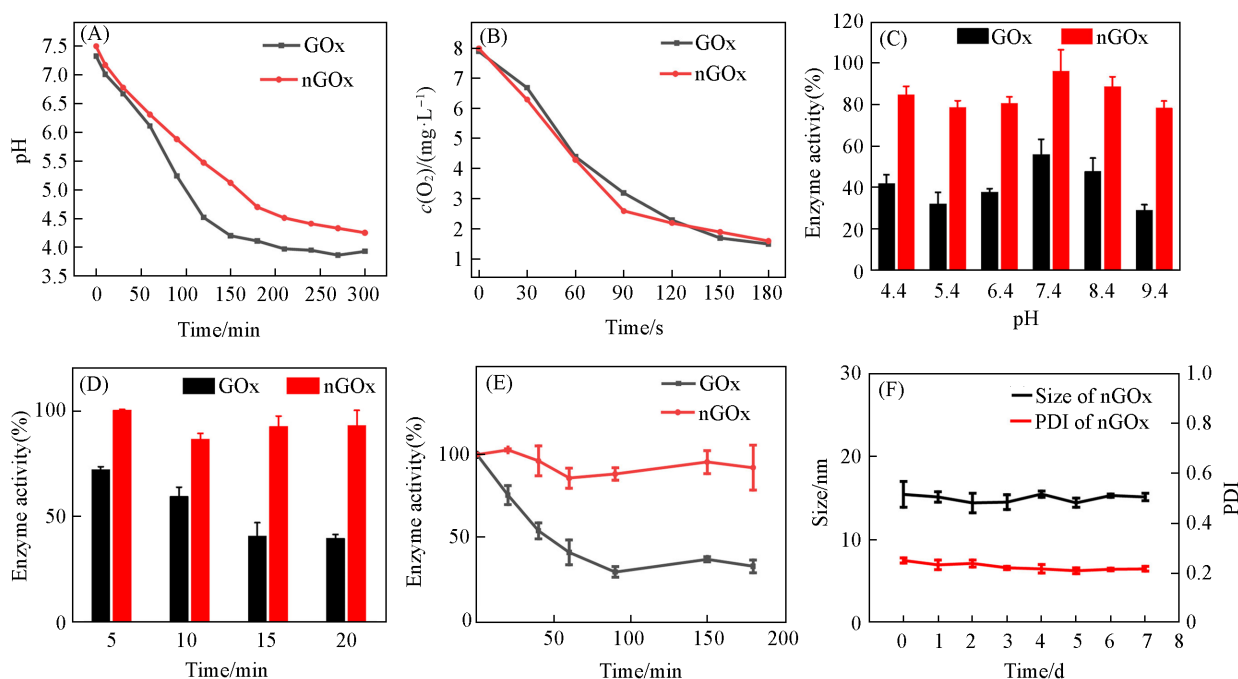


Fig. 3 Changes of pH of the system after incubation of GOx and nGOx with β -D-glucose(A), oxygen concentration in the system after GOx and nGOx incubated with glucose(B), enhanced stability of n(GOx), residual activities of the native GOx and nGOx after incubation at different pH after 30 min of incubation at 37 °C(C), after incubation with trypsin at 37 °C(D) and after incubation at 60 °C(E), hydrodynamic size distribution and PDI of nGOx at 4 °C(F)

pH变化、蛋白酶降解、温度变化等因素均可能导致蛋白质失活,破坏蛋白结构.为了表征GOx在包裹前后的稳定性,首先,将GOx与nGOx分别在室温下加入到pH=4.4~9.4的溶液中孵育30 min,使用试剂盒测定酶活.由图3(C)可见,天然GOx的酶活在过高或过低pH下均丧失了40%以上,而nGOx在孵育后,酶的活性能够保持在初始值的80%以上.在GOx和nGOx中加入胰蛋白酶,在37 °C下孵育30 min.由图3(D)可见,未被包裹的GOx在胰蛋白酶的作用下活性下降了50%,而nGOx在相同条件下仍然可以保持近90%的活性.将GOx和nGOx在60 °C下孵育,由图3(E)可见,180 min后nGOx的活性保持完好,而天然GOx在孵育60 min后,酶的活性下降到了50%以下,由图3(F)可见,7 d之内纳米胶囊的粒径和PDI基本保持不变,说明nGOx具有良好的稳定性.

以上结果证实了nGOx在不同条件下的稳定性具有显著提升.产生上述现象的原因可能是:由于nGOx表面的聚合物壳层为蛋白质提供了有效的空间支撑,阻止了蛋白质在面对体系中pH以及温度的改变所发生的异构化;同时,聚合物外壳可以有效限制胰蛋白酶对GOx的降解作用,从而使nGOx相比于GOx具有更好的稳定性.

2.3 nMSNs-TPZ的药物负载及药物释放

在不同浓度的TPZ水溶液中加入等量的MSNs,室温下搅拌24 h,TPZ通过物理吸附进入介孔结构中.由图4(A)可见,随着TPZ浓度的增加,载药量逐渐增加,最大载药量为4.79%.这是因为MSNs周围的TPZ分子数量增加,使其更容易进入到孔道中.聚合所用的交联剂为GSH响应型交联剂.为了验证壳层是否能够降解从而释放内部药物,将nMSNs-TPZ与5 mmol/L GSH溶液在37 °C下孵育,并每隔1 h测试其表面电势.由图4(B)可见,Zeta电势随与GSH孵育时间的延长逐渐下降,这可能是随着壳层逐步降解,MSNs表面暴露出更多羟基.在270 min时,电势下降到-30 mV后不再下降,说明其壳层已经完全降解.此时测试的粒径为66 nm,与聚合前粒径相似,进一步印证了壳层的可降解性(图S2,见本文支持信息).接下来研究了GSH对nMSNs释放TPZ的影响.如图4(C)所示,将nMSNs-TPZ分别放入含有和不含有GSH的溶液中,在相同的条件下透析并测试释放出的TPZ的量.加入GSH

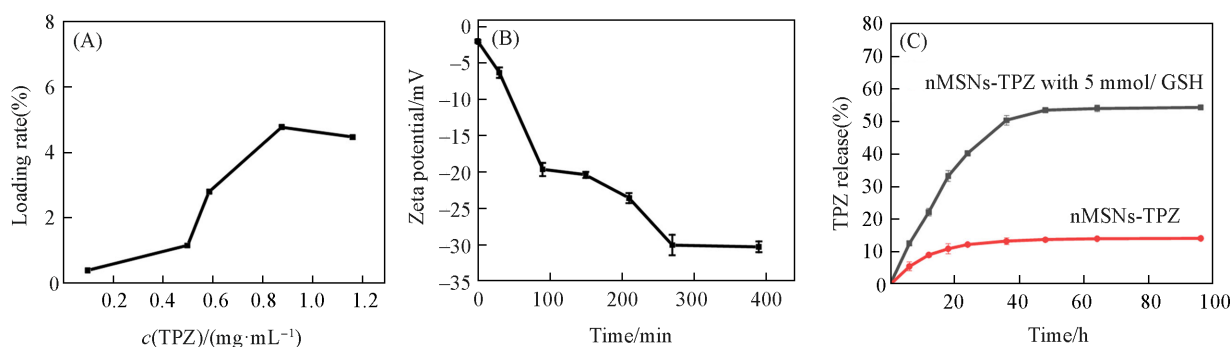


Fig. 4 Drug loading of TPZ with different concentration in MSNs(A), zeta potentials of nMSNs after GSH treatment(B), TPZ release profile of nMSNs-TPZ(C)

组随壳层的逐步降解, 在 36 h 内药物释放速率较快, 随着时间延长, 药物释放速率逐渐趋于稳定, TPZ 的累积释放量为 53.3%, 而不加入 GSH 组的释放量只有 12.5%, 说明壳层能够减少药物的泄露, 并证实了 nMSNs-TPZ 具有良好的 GSH 响应性释放的能力.

2.4 细胞毒性实验

为了证明所制备的聚合物壳层没有细胞毒性, 选用了在生化领域广泛使用的无细胞毒性的 BSA 作为模型蛋白. 如图 5(A) 所示, 将 nBSA 与 4T1 细胞共同培养 12 h, 当 nBSA 浓度在 0.10~0.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时, 4T1 细胞的存活率均能保持在 90% 以上, 这说明所制备的纳米胶囊壳层对 4T1 细胞没有明显的细胞毒性, 具有良好的生物安全性. 如图 5(B) 所示, 将 nGOx 与 4T1 细胞在无糖培养基中共同培养 12 h. 随着 nGOx 浓度的增加, 细胞存活率没有明显变化, 均能保持在 85% 以上, 这表明在没有葡萄糖作为底物的情况下, GOx 不会发挥作用. 如图 5(C) 所示, 将 nGOx 与 4T1 细胞在含糖培养基中共同培养 12 h, 随着 nGOx 浓度的逐渐增加, 细胞活性逐渐下降, 这说明在含糖培养基中 nGOx 对 4T1 细胞具有杀伤作用. 推测这是因为: nGOx 一方面消耗了细胞的能源物质, 另一方面增加了氧化应激水平, 二者共同降低了细胞存活率. 细胞摄入实验使用 DAPI 染色细胞核成蓝色荧光, FITC 标记的 nGOx 成绿色荧光, 合并不同颜色的荧光通道后得到 Merge 图(图 S3, 见本文支持信息). 由于 nGOx-FITC 表面带有少量正电荷, 与带负电的细胞膜存在静电吸引, 因此有着较强的荧光摄入, 说明其能够进入细胞.

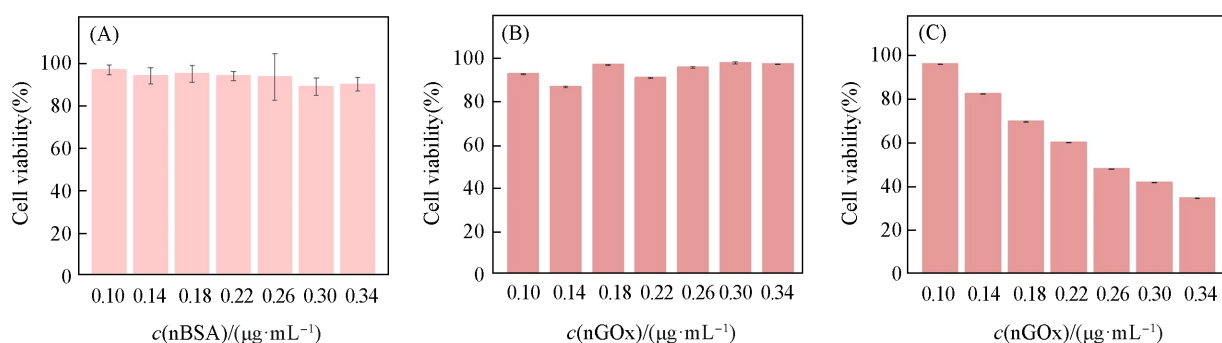


Fig. 5 Cell viability of 4T1 cells after treatment with different concentrations of nBSA in glucose medium(A), normoxic incubators after treatment with different concentrations of nGOx in glucose-free medium(B) and glucose medium(C)

为了验证 nGOx 与 nMSNs-TPZ 协同给药的治疗效果, 设置了不同浓度的 nMSNs-TPZ (实际 TPZ 浓度为 0.02~0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、nGOx (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 nMSNs-TPZ (0.79~5.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的组合, 以及 nGOx (0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 nMSNs-TPZ (0.79~5.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的组合, 与 4T1 细胞在无糖培养基及常氧培养箱中、含糖培养基及常氧培养箱、含糖培养基及乏氧培养箱中共同孵育 12 h, 并测试细胞存活率. 由图 6(A) 可见, 在

无糖培养基中,无论是单独给药组还是协同给药组,细胞存活率均能够保持在80%以上.这是因为底物中不含可以被GOx催化的葡萄糖,nGOx并未给TPZ提供乏氧环境.由图6(B)可见,nMSNs-TPZ组细胞存活率保持在90%以上,说明TPZ在常氧条件下不会产生细胞毒性.随着nGOx的加入,细胞存活率显著下降,由于选择的nGOx浓度均不会造成明显细胞毒性,因此可以排除nGOx的饥饿治疗的影响,细胞死亡仅与TPZ有关.实验结果充分说明,nGOx对4T1细胞造成的局部乏氧激活了TPZ转化为有细胞毒性的TPZ自由基,从而对细胞造成伤害.此外,由于nGOx的给药浓度一定,造成的细胞乏氧程度一定,因此细胞存活率不随TPZ浓度的增加而变化.由图6(C)可见,在氧气含量1%的乏氧培养箱中进行与图6(B)相同的细胞毒性实验.在乏氧培养箱创造的整体乏氧环境中,单独给药nMSNs-TPZ组的细胞存活率略微下降,加入nGOx后细胞存活率也能维持在70%以上.这可能是因为整体乏氧后,nGOx失去底物氧气无法发挥催化作用,未造成细胞局部乏氧,且整体乏氧的环境并未激活足够的TPZ造成细胞死亡.以上实验说明nGOx造成的局部乏氧程度远大于在乏氧培养箱中的整体乏氧程度,nGOx持续不断地给肿瘤细胞造成并维持乏氧状态是激活TPZ杀伤肿瘤细胞的关键因素.活死染色得到了与CCK-8法测试细胞毒性相同的结果,证实nGOx与nMSNs-TPZ联用具有最优的杀伤肿瘤细胞的效果(图7, Scheme 2).

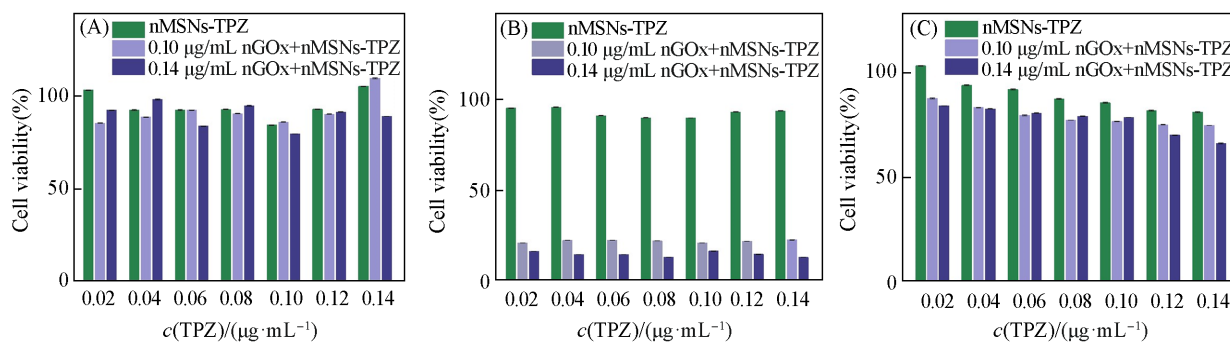


Fig. 6 Cell viability of 4T1 cells after treatment with different concentrations of nMSNs-TPZ, nGOx+nMSNs-TPZ, nGOx+nMSNs-TPZ in glucose-free medium(A), normoxic incubator(B) and low-oxygen incubators(C) in glucose medium

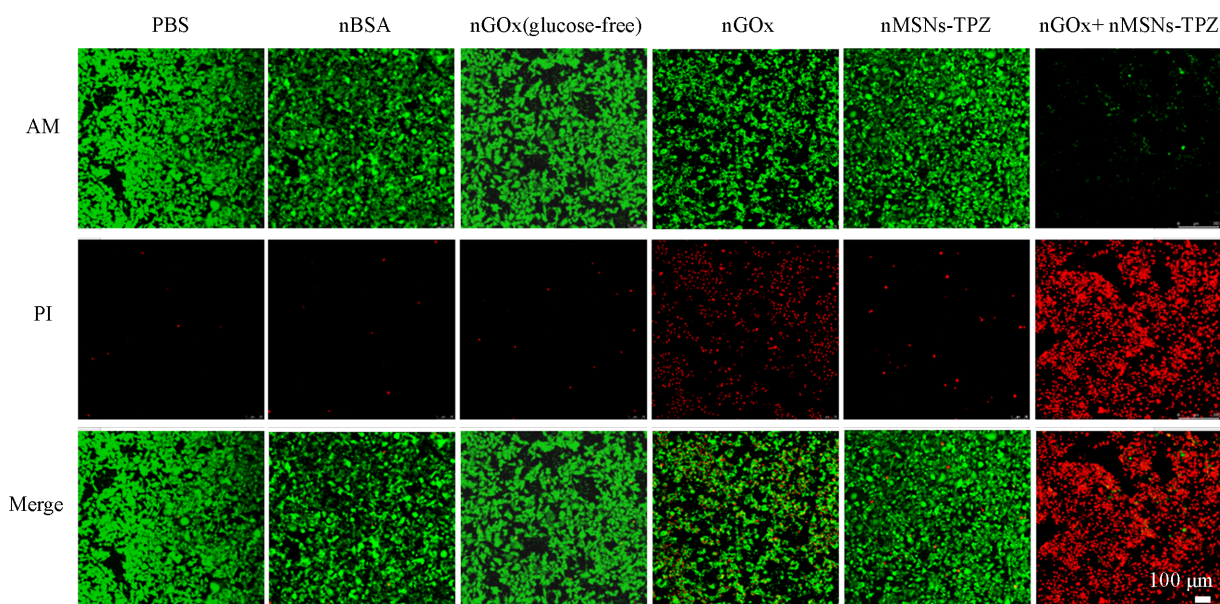
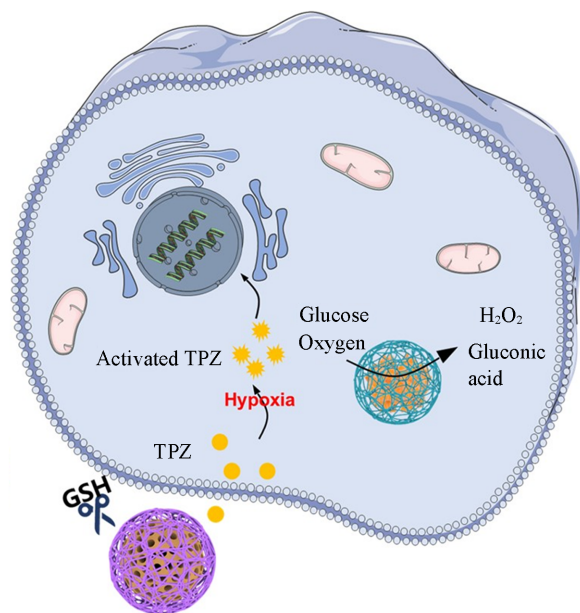


Fig. 7 Fluorescence images of calcein AM/PI-stained 4T1 cells incubated with PBS, nBSA, nGOx in glucose-free medium, nGOx, nMSNs-TPZ, nGOx+nMSNs-TPZ



Scheme 2 Mechanism of synergistic action of nGOx and nMSNs-TPZ

2.5 nGOx 诱导肿瘤细胞缺氧及瘤内滞留效果

实验采用缺氧检测试剂盒, 该试剂盒的探针能够标记缺氧细胞, 呈现红色荧光. 同时, DAPI 用于标记细胞核, 使其呈现蓝色荧光. 如图 8 所示, 在 0.10 和 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 这两个能够保持细胞活性 80% 以上的低浓度 nGOx 处理下, 细胞均产生了红色荧光, 这表明低浓度的 nGOx 就能够有效诱导肿瘤细胞进入缺氧状态, 为激活缺氧激活药物 TPZ 提供了先决条件.

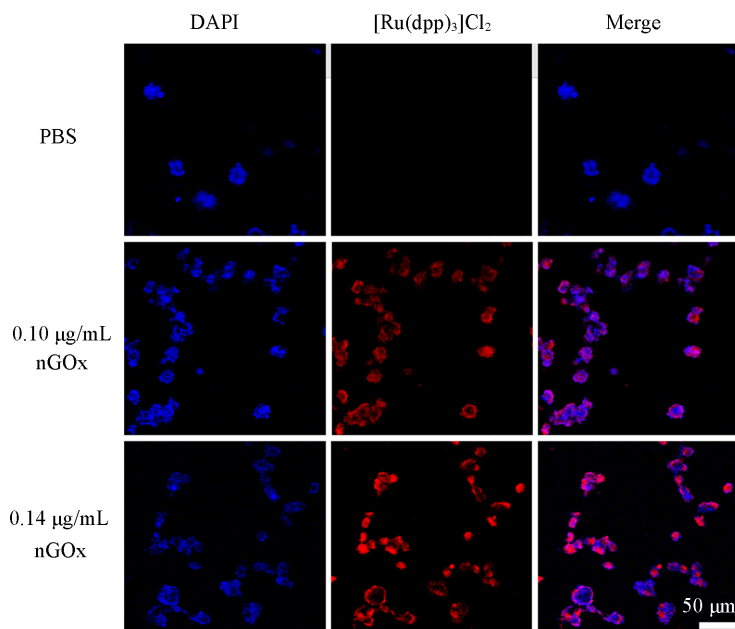


Fig. 8 Fluorescence images of DAPI/[Ru(dpp)₃]Cl₂-stained 4T1 cells incubated with PBS, 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nGOx and 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nGOx

从小动物荧光成像照片可以看出, 在瘤内注射 nGOx 后, 随着其在瘤内留存时间的增加, 荧光强度逐渐降低[图 9(A)]. 此外, GOx 的降解速率比 nGOx 快. 随后, 使用 Living Image 软件对荧光强度进行了定量分析[图 9(B)]. 在瘤内注射 24 h 后, GOx 降解了 50%, 而 nGOx 仍保持在 98% 左右. 在第二天至第十天, GOx 和 nGOx 均有不同程度的降解. 第十天时, nGOx 的瘤内保留率为 64%, 而 GOx 仅剩 33%.

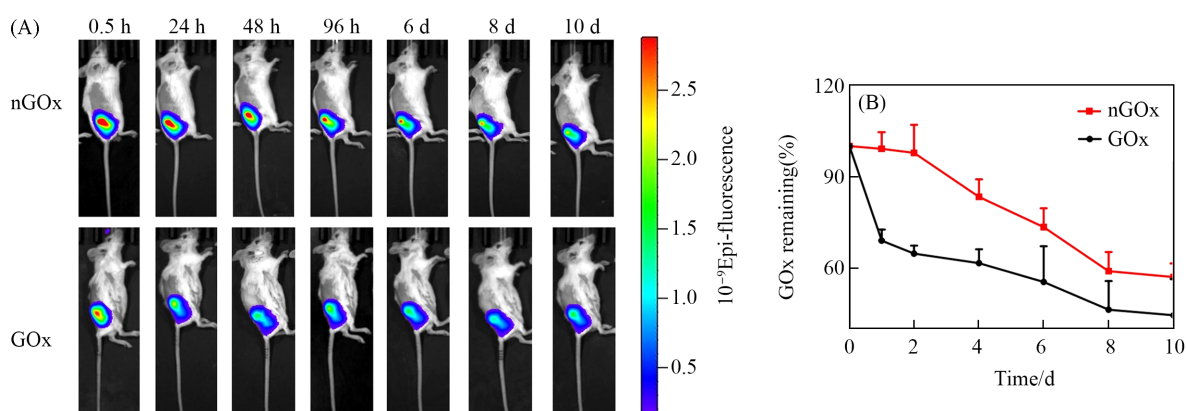


Fig. 9 Live small animal fluorescent images of GOx and nGOx(A), remaining amount of GOx and nGOx in the mouse tumor(B)

这个结果证明了纳米胶囊的聚合物壳层能够提高GOx的稳定性, 保护其不被蛋白酶等因素降解, 提高药物在肿瘤部位的蓄积, 延长瘤内保留时间, 使肿瘤组织持续维持乏氧状态, 为后续TPZ发挥作用奠定了良好的基础.

2.6 体内抗肿瘤效果

为了探究了纳米药物的体内抗肿瘤效果, 首先, 将接种4T1肿瘤细胞的Balb/c小鼠随机分成5组. 接种4T1细胞7 d后, 肿瘤体积约在 100 mm^3 . 瘤内注射PBS, GOx, nGOx, nMSNs-TPZ与nGOx+nMSNs-TPZ, 每隔2 d测量小鼠的肿瘤体积, 并对小鼠进行称重. 当小鼠给药10 d后进行安乐死, 收集器官和肿瘤. 如图10(A)所示, PBS, GOx, nGOx, nMSNs-TPZ组的肿瘤体积均呈上升趋势, 说明肿瘤正在快速且持续地生长. 这可能是因为GOx和nGOx给药量较低, 仅发挥使肿瘤部位乏氧的作用. nMSNs-TPZ组由于肿瘤组织乏氧程度不够且乏氧细胞分布不均匀, 因此, 肿瘤组织仍然快速增长. 而nGOx+nMSNs-TPZ组的肿瘤几乎没有生长, 与其它4组相比, 协同治疗组具有更加优秀的抑瘤效果. 这可能是因为nGOx能够长时间蓄积在肿瘤组织中, 使肿瘤部位长时间保持乏氧状态. 随着nMSNs-TPZ的GSH响应型纳米胶囊壳层的逐步降解, 持续释放的TPZ在乏氧环境中转变成为有毒的TPZ自由基, 从而达到抑制肿瘤生长的效果. 在治疗结束后, 小鼠的肿瘤体积无明显增长, 小鼠体重在治疗期间无明显下降[图10(B)]. 离体肿瘤的图片也可说明, nGOx+nMSNs-TPZ组的肿瘤体积比其它4组小, 说明协同治疗具有更加有效的抑瘤效果[图10(C)].

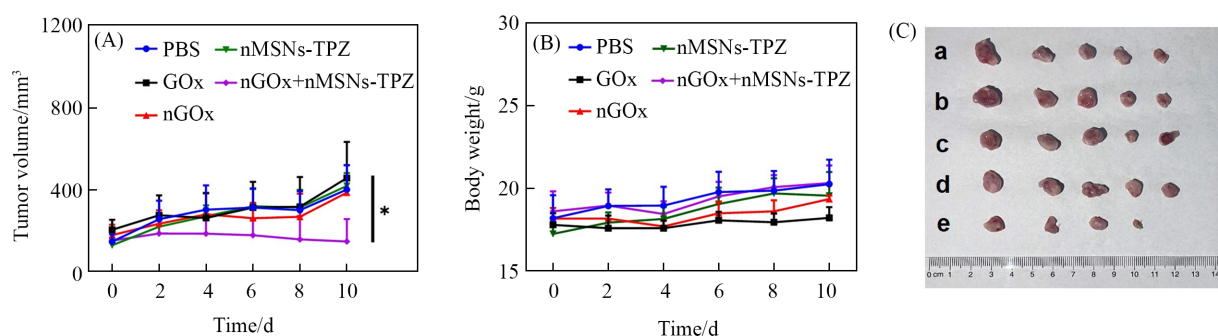


Fig. 10 Tumor growth curves(A) and body weight change(B) of the 4T1-tumor-bearing mice injected with PBS, GOx, nGOx, nMSNs-TPZ and nGOx+nMSNs-TPZ, photograph of tumors after treatment on day 10(C)

(C) a. PBS, b. GOx, c. nGOx, d. nMSNs-TPZ, e. nGOx+nMSNs-TPZ.

进一步对肿瘤组织进行了TUNEL染色, PBS组几乎观察不到绿色荧光, GOx, nGOx, nMSNs-TPZ组仅能够观察到少量的绿色荧光信号[图11(A)]. 而nGOx与nMSNs-TPZ的协同治疗组细胞凋亡现象最为明显. 这可能是因为nGOx在肿瘤部位造成了一个持续乏氧的环境, 激活TPZ形成氧化自由基并

扩散到乏氧区域引起氧化损伤, 导致DNA链的断裂和染色体畸变, 从而发挥抗肿瘤效果. 图11(B)为肿瘤组织的H&E染色结果. PBS组、GOx组及nGOx组的肿瘤细胞具有规则且结构完整的细胞核结构, 说明没有造成细胞损伤. nMSNs-TPZ组有部分损伤细胞, 而nGOx与nMSNs-TPZ共递送组细胞排列紊乱、细胞质稀疏且细胞核皱缩, 这证明nGOx与nMSNs-TPZ共同诱导了肿瘤细胞损伤和凋亡, 具有更好的治疗效果. 接下来, 对给药后的小鼠的主要器官组织进行了H&E切片染色(图S4, 见本文支持信息). 5组小鼠器官的细胞核均保持完整且细胞排列紧密, 未观察到主要脏器的炎症损伤和病变. 这表明瘤内注射的给药方式避免了药物滞留在非病变部位, 同时证实了纳米药物具有较好的生物安全性.

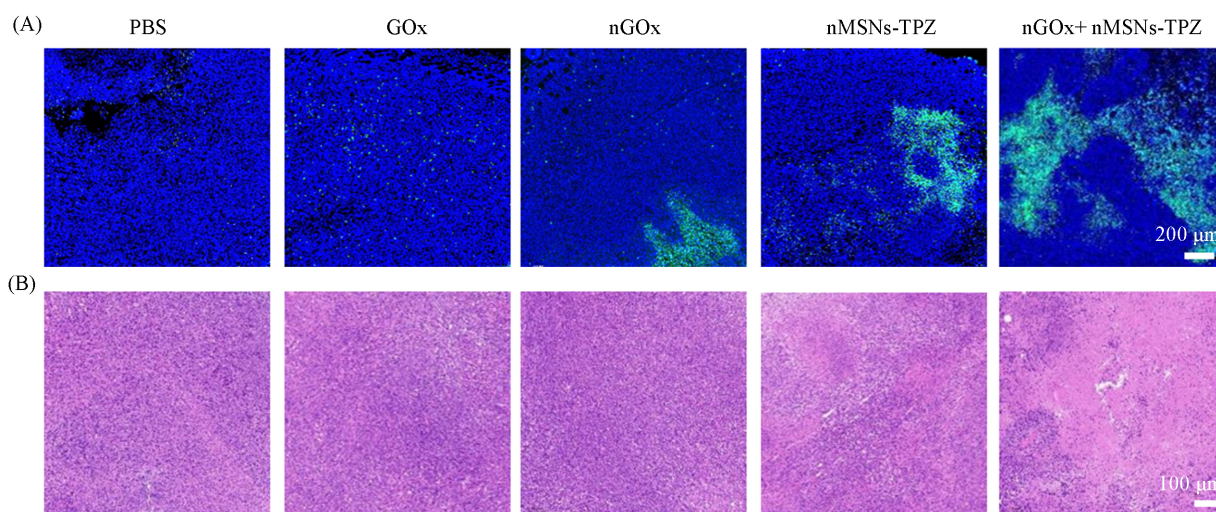


Fig. 11 H&E(A) and TUNEL(B) stained tumor slices taken at the end of treatment

3 结 论

通过原位自由基聚合的方法制备了nGOx和nMSNs-TPZ, 旨在提升GOx与nMSNs-TPZ的稳定性并增强肿瘤部位的乏氧程度, 激活乏氧激活类药物以杀死肿瘤细胞. 制备的nGOx保持了与GOx相似的催化活性, 并且在热稳定性、pH稳定性和耐胰蛋白酶降解性方面均显著优于GOx. nMSNs-TPZ的聚合物壳层有效遮蔽了MSNs表面的羟基, 提高了生物相容性, 并具备刺激响应型药物释放能力. nGOx的优良催化活性和稳定性有利于其在肿瘤组织中长期滞留并持续发挥催化作用, 从而使肿瘤区域长时间保持乏氧状态. 肿瘤细胞高表达的GSH将nMSNs-TPZ的响应型壳层降解, 缓慢释放TPZ, 在乏氧微环境中转化为具有细胞毒性的自由基, 进而杀死肿瘤细胞. 体外细胞实验和体内抑瘤实验均证实了nGOx与nMSNs-TPZ联用具有良好的抑瘤作用, 这种方法有望成为肿瘤治疗的又一潜在疗法.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/cjcu20240239>.

参 考 文 献

- [1] Han B., Zheng R., Zeng H., Wang S., Sun K., Chen R., Li L., Wei W., He J., *J. Nat. Cancer Cent.*, **2024**, 4(1), 47—53
- [2] Siegel R. L., Jemal A., Wender R. C., Gansler T., Ma J., Brawley O. W., *CA Cancer J. Clin.*, **2018**, 68(5), 329—339
- [3] Zheng J., Pan Y., Chen Y., Li J., Li W., *Mater. Chem. Front.*, **2023**, 7(17), 3576—3594
- [4] Liao C., Liu X., Zhang C., Zhang Q., *Semin. Cancer Biol.*, **2023**, 88, 172—186
- [5] Wang M. M., Luan T. J., Yang M. Y., Lyu J. J., Gao J., Li H. Y., Wei G., Yuan Z. L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2021**, 42(10), 3071—3081(王萌萌, 栾天骄, 杨铭焱, 吕佳佳, 高杰, 李洪玉, 卫钢, 袁泽利. 高等学校化学学报, **2021**, 42(10), 3071—3081)
- [6] Xiao Y., Yu D. H., *Pharmacol. Therapeut.*, **2021**, 221, 107753
- [7] Harhaji-Trajkovic L., Vilimanovich U., Kravic-Stevovic T., Bumbasirevic V., Trajkovic V., *J. Cell. Mol. Med.*, **2009**, 13(9B), 3644—3654
- [8] Feng L., Betzer O., Tao D., Sadan T., Popovtzer R., Liu Z., *CCS Chemistry*, **2019**, 1(3), 239—250
- [9] Xu X., Li Z., Zhao J., Liu Y., Xu Y., Jia Y., Li J., *CCS Chemistry*, **2023**, 5(12), 2877—2887

- [10] Vilaplana-Lopera N., Besh M., Moon E. J., *Biomolecules*, **2021**, *11*(11), 1604
- [11] Zeng Y., Ma J., Zhan Y., Xu X., Zeng Q., Liang J., Chen X., *Int. J. Nanomedicine*, **2018**, *13*, 6551—6574
- [12] Ma Z., Zhang Y., Dai X., Zhang W., Foda M. F., Zhang J., Han H., *Adv. Mater.*, **2021**, *33*(41), 2104504
- [13] Meng L. T., Yang J. P., Gao Y., Cao Q. Y., Jiang S. J., Xiao Y. Y., Wang H. R., Liu W. Z., Yuan A., Li Y. N., Huang H., *ACS Nano*, **2024**, *18*(5), 4360—4375
- [14] Guise C. P., Abbattista M. R., Anderson R. F., Li D., Taghipouran R., Tsai A., Lee S. J., Smaill J. B., Denny W. A., Hay M. P., Wilson W. R., *Molecules*, **2020**, *25*(21), 4888
- [15] Ghatage P., Sabagh H., *Expert. Opin. Drug. Met.*, **2012**, *8*(12), 1589—1597
- [16] Wilson W. R., Hay M. P., *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, *11*(6), 393—410
- [17] Heiden M. G. V., Cantley L. C., *Science*, **2009**, *324*(5930), 1029—1033
- [18] Fu L. H., Qi C., Hu Y. R., Lin J., Huang P., *Adv. Mater.*, **2020**, *32*(28), 2003130
- [19] Bankar S. B., Bule M. V., Singhal R. S., Ananthanarayan L., *Biotechnol. Adv.*, **2009**, *27*(4), 489—501
- [20] Lu Z. J., Gao J. Y., Fang C., Zhou Y., Li X., Han G., *Adv. Sci.*, **2020**, *7*(17), 2001223
- [21] Qing Z. H., Bai A. L., Chen L. F., Xing S. H., Zou Z., Lei Y. L., Li J. B., Liu J. L., Yang R. H., *CCS Chemistry*, **2021**, *3*(5), 1217—1230
- [22] Wu J., Zhang Y., Jiang K., Wang X., Blum N. T., Zhang J., Jiang S., Lin J., Huang P., *Adv. Mater.*, **2022**, *34*(18), 2200062
- [23] Xu Y., Lv J., Kong C., Liu Y., Wang K., Tang Z., Chen X., *Natl. Sci. Rev.*, **2024**, *11*(4), nwae038
- [24] Li Q., Liu Y., Guo X., Zhang L., Li L., Zhao D., Zhang X., Hong W., Zheng C., Liang B., *Biomed. Pharmacother.*, **2022**, *151*, 113123
- [25] Zhang L. U., Wang Z., Zhang Y., Cao F., Dong K., Ren J., Qu X., *ACS Nano*, **2018**, *12*(10), 10201—10211
- [26] Chen J., Wang X., Yuan Y., Chen H., Zhang L., Xiao H. H., Chen J., Zhao Y. X., Chang J., Guo W., Liang X. J., *Sci. Adv.*, **2021**, *7*(13), eabc5267
- [27] Zhao G. Q., Jin Y., Gao S. T., Xiao T. S., Fan M., Liu D. D., Zhang J. C., Li Z. H., Zhou X. H., Liu H. F., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2022**, *8*(4), 1604—1612
- [28] Yan M., Du J., Gu Z., Liang M., Hu Y., Zhang W., Priceman S., Wu L., Zhou Z. H., Liu Z., Segura T., *Nat. Nanotechnol.*, **2010**, *5*(1), 48—53
- [29] Zhao M., Xu D., Wu D., Whittaker J. W., Terkeltaub R., Lu Y., *Nano Res.*, **2018**, *11*(5), 2682—2688
- [30] Zhang X. P., Zhu X. Y., Lu Y. F., *ACS Appl. Polym. Mater.*, **2022**, *4*(4), 2757—2766
- [31] Li S. D., Chen L. Y., Huang K., Chen N., Zhan Q., Yi K. K., Qi H. Z., Liu C., Tan Y., Hou X., Lu Y., *Adv. Funct. Mater.*, **2019**, *29*(43), 1903296
- [32] Liu S. W., Zhang M. S., Jin H., Wang Z., Liu Y., Zhang S. L., Zhang H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *145*(1), 160—170
- [33] Han L., Liu C. Y., Qi H. Z., Zhou J., Wen J., Wu D., Xu D., Qin M., Ren J., Wang Q., Long L., *Adv. Mater.*, **2019**, *31*, 1805697

(Ed.: Y, K, S)