

# 核糖核酸酶 A 表面原位聚合构建 抗肿瘤纳米胶囊研究

赵启轩<sup>1</sup>, 马 骏<sup>1</sup>, 刘爱江<sup>1</sup>, 梁 晓<sup>1</sup>, 李全顺<sup>1,2</sup>

(1. 吉林大学生命科学学院, 分子酶学工程教育部重点实验室,  
2. 超分子化学生物学研究中心, 长春 130012)

**摘要** 通过原位聚合策略, 在核糖核酸酶 A(RNase A)表面构建聚合物外壳, 制备了纳米胶囊 n(RNase A)。表征结果表明, n(RNase A)呈现均一的球形结构, 流体学直径和 zeta 电位分别为(118.9±14.1) nm 和(7.3±1.5) mV。通过荧光显微镜和流式细胞术对纳米胶囊 n(RNase A)的肿瘤摄取能力进行表征, 发现该体系能够被非小细胞肺癌细胞系 A549 高效摄取。以此为基础, 纳米胶囊 n(RNase A)能够切割细胞质中的 RNA 分子, 诱导肿瘤细胞凋亡, 显著抑制肿瘤细胞增殖。本研究利用表面原位聚合技术构建了能够实现 RNase A 胞内递送的纳米制剂, 为其它医用酶分子纳米胶囊的构建与评价提供了借鉴思路。

**关键词** 核糖核酸酶 A; 原位聚合; 纳米胶囊; 抗肿瘤制剂

中图分类号 O631.5 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240262

## *In situ* Polymerization Initiated on RNase A Surface to Construct Nanocapsules for the Treatment of Lung Cancer

ZHAO Qixuan<sup>1</sup>, MA Jun<sup>1</sup>, LIU Aijiang<sup>1</sup>, LIANG Xiao<sup>1\*</sup>, LI Quanshun<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences,  
2. Center for Supramolecular Chemical Biology, Jilin University, Changchun 130012, China)

**Abstract** The *in situ* polymerization strategy was applied to construct a polymeric shell on the surface of ribonuclease A (RNase A) to obtain n(RNase A) nanocapsules. The characterization showed that n(RNase A) exhibited a homogeneously spherical structure with hydrodynamic diameter and zeta potential values of (118.9±14.1) nm and (7.3±1.5) mV, respectively. Using fluorescence microscopic and flow cytometric analysis, n(RNase A) nanocapsules were identified to be efficiently internalized by A549 non-small cell lung cancer cells. After the internalization, n(RNase A) could further cleave RNA molecules in the cytosol, thereby inducing the cell apoptosis and inhibiting the cell proliferation. In conclusion, the present research successfully prepared a nanoformulation to facilitate the intracellular delivery of RNase A using surface-initiated *in situ* polymerization, and thus provided a useful idea for the construction and evaluation of other medicinal enzymes-based nanocapsules.

**Keywords** Ribonuclease A; *In situ* polymerization; Nanocapsules; Anti-tumor formulation

肺癌是世界上最常见的癌症之一, 其发病率和死亡率居高不下, 严重威胁着人类的生命健康, 给

收稿日期: 2024-05-31. 网络首发日期: 2024-11-06.

联系人简介: 李全顺, 男, 博士, 教授, 主要从事酶分子设计与重要疾病基因治疗方面的研究. E-mail: quanshun@jlu.edu.cn

梁 晓, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事酶分子改造与组装方面的研究. E-mail: liang\_xiao@jlu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 32271319, 32071267, 32301051)、吉林省自然科学基金(批准号: YDZJ202301ZYTS537, 20240101285JC)和中国博士后科学基金面上项目(批准号: 2023M741346)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos.32271319, 32071267, 32301051), the Natural Science Foundation of Jilin Province, China(Nos.YDZJ202301ZYTS537, 20240101285JC) and the China Postdoctoral Science Foundation(No.2023M741346).

社会经济发展带来了沉重的负担<sup>[1]</sup>。据国家癌症中心与国际肿瘤研究机构联合测算,2022年我国新增肺癌病例高达106.06万例,占全国癌症新增病例数的21.98%<sup>[2]</sup>。根据癌细胞的组织学特征,肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌两种类型<sup>[3,4]</sup>。非小细胞肺癌是最常见的肺癌亚型,约占所有肺癌病例的85%~90%<sup>[5]</sup>。I期和II期非小细胞肺癌通常采用手术切除并进行辅助治疗,当病情发展到III期和IV期时,主要依靠化学药物治疗和放射治疗<sup>[6,7]</sup>。然而,几乎所有的传统疗法都会产生相同的毒副作用,同时化疗药物通常伴随生物利用度低及多药耐药现象<sup>[8,9]</sup>。由此可见,研发新型肺癌治疗手段是摆脱传统疗法局限性的有效策略。

近年来,酶制剂作为多种疾病的治疗性药物备受关注,已成为生物医药领域的研究热点<sup>[10]</sup>。酶分子具有催化活性高、特异性强和生物安全性良好等优势,已成为极具开发价值的治疗药物。目前,多种酶分子从非酶类药物中脱颖而出,展示出良好的抗肿瘤应用前景,如核糖核酸酶A(Ribonuclease A, RNase A)、颗粒酶B(Granzyme B)和犬尿氨酸酶(Kynurenase)等<sup>[11,12]</sup>。当抗肿瘤酶分子进入细胞后,通过调控基因复制、转录和翻译来影响肿瘤细胞的新陈代谢,甚至诱导细胞凋亡。其中,RNase A是一种研究最为广泛的抗肿瘤酶分子,由124个氨基酸组成,能特异性水解RNA链中胞嘧啶(C)或尿嘧啶(U)残基的3'端磷酸二酯键,在RNA调控、转录和蛋白质翻译等生理过程中发挥着重要作用<sup>[13,14]</sup>。然而,RNase A自身分子量大及亲水性特征,使其难以穿过细胞膜,同时内吞后需要避免溶酶体降解并快速释放到细胞质中才能发挥抗肿瘤活性<sup>[15,16]</sup>。因此,实现RNase A的稳定负载及高效胞内递送,对于推进RNase A作为抗肿瘤酶制剂发挥其治疗功效至关重要。

超分子纳米药物技术的出现有望克服以上壁垒,其结合了纳米技术和超分子化学的优点<sup>[17,18]</sup>。研究表明,超分子纳米制剂在实现酶分子有效负载的同时,能够有效维持酶催化活性、实现酶分子靶向递送及高效内吞,为解决酶类药物在生物医学领域的应用提供了新的策略<sup>[19-21]</sup>。近年来,在酶分子表面引发原位聚合形成超分子纳米胶囊的方式,已成为酶类药物递送系统设计的研究热点<sup>[22]</sup>。原位聚合是指通过自发或引发的方式在酶分子表面发生聚合反应,合成产物具有粒径可控、生物相容性好等优势,同时对酶类药物的活性影响甚微<sup>[23-25]</sup>。Lu等<sup>[26]</sup>利用原位聚合技术,以含有胆碱和乙酰胆碱类似物的2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC)为单体,以多肽分子为交联剂,制备了包封尼妥珠单抗的超分子纳米胶囊,该纳米胶囊在胆碱转运体和乙酰胆碱转运蛋白的作用下有效穿透血脑屏障,进入中枢神经系统,发挥其抗肿瘤功效。

本文首先将*N*-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(*N*-Acryloxysuccinimide, NAS)与RNase A表面赖氨酸残基侧链的氨基发生温和的乙烯基化反应,在RNase A表面修饰丙烯酰胺官能团,然后单体MPC、*N*-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐[*N*-(3-Aminopropyl) methacrylamide hydrochloride, APM]和交联剂*N,N'*-甲基双丙烯酰胺(*N,N'*-Methylenebisacrylamide, BIS)通过非共价相互作用富集在RNase A分子周围,在过硫酸铵(Ammonium persulfate, APS)和四甲基乙二胺(*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine, TEMED)的作用下引发原位聚合反应,在RNase A表面构建一层聚合物外壳,制备了纳米胶囊n(RNase A)。通过透射电子显微镜(TEM)和纳米粒度电位分析仪检测n(RNase A)纳米胶囊的表面形貌、流体力学直径和Zeta电位。以人非小细胞肺癌细胞系A549为模型,通过荧光显微镜和流式细胞术探究了n(RNase A)纳米胶囊的细胞摄取情况,通过噻唑蓝(MTT)实验、Live/dead细胞染色技术、TUNEL染色技术和Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡实验对n(RNase A)纳米胶囊的肿瘤细胞增殖抑制作用进行了系统评价。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

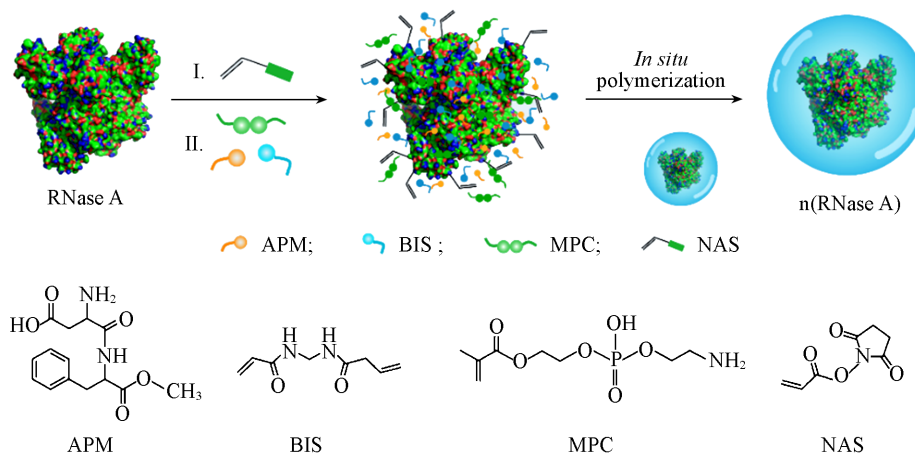
RNase A( $\geq 2500$  U/mg),生工生物工程(上海)股份有限公司;牛血清白蛋白(BSA,纯度 $\geq 98\%$ ),安徽康源生物技术有限公司;*N*-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS,纯度97%),美国Sigma-Aldrich公司;2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC,纯度96%),美国Sigma-Aldrich公司;*N*-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺盐

酸盐(APM, 纯度98%), 美国Sigma-Aldrich公司; *N,N'*-甲基双丙烯酰胺(BIS, 纯度99%), 上海源叶生物科技有限公司; 过硫酸铵(APS, 纯度 $\geq 98\%$ ), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 四甲基乙二胺(TEMED, 纯度 $\geq 98\%$ ), 美国Sigma-Aldrich公司; 苯基琼脂糖凝胶柱CL-4B和4%组织细胞固定液, 北京索莱宝科技有限公司; RNase A活性检测试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细胞培养基(DMEM), 美国Gibco公司; 胎牛血清(FBS), 美国Gibco公司; 100 $\times$ 青霉素-链霉素溶液, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 噻唑蓝(MTT)和异硫氰酸荧光素(FITC), 北京金泰宏达生物科技有限公司; Live/dead细胞染色试剂盒, 上海贝博生物科技有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; DAPI染色液, 美国Amersco公司; 一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光), 上海碧云天生物技术有限公司; 定量PCR专用快速反转录试剂和TB Green染料法定量试剂盒, 日本TaKaRa公司.

HITACHI-H800型透射电子显微镜(TEM), 日本Hitachi公司; ZS90型纳米粒度电位仪, 英国马尔文仪器有限公司; PAGE型凝胶电泳仪, 美国Bio-Rad公司; 全自动凝胶成像系统, 北京君意东方电泳设备有限公司; MCO-15AC型二氧化碳培养箱, 日本Sanyo公司; IX71型倒置荧光显微镜, 日本奥林巴斯株式会社; CytoFLEX型流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特有限公司; Synergy Lx型酶标仪, 美国BioTek仪器有限公司; ABI 7500型荧光定量PCR仪, 美国Applied Biosystems公司.

## 1.2 实验过程

1.2.1 *n*(RNase A)纳米胶囊的制备 将10 mg RNase A和0.25 mg NAS溶解于5 mL磷酸盐缓冲溶液(PBS, 50 mmol/L, pH=7.4)中, 在4 $^{\circ}$ C下反应2 h, 使RNase A表面修饰上可反应的乙烯基基团. 反应完成后, 以PBS为透析液, 于4 $^{\circ}$ C下透析24 h. 接下来, 将240 mg MPC、16 mg APM和14 mg BIS加入到上述溶液中, 并加入10 mg APS和24  $\mu$ L TEMED引发原位聚合反应. 于4 $^{\circ}$ C下反应2 h后, 以PBS为透析液, 透析3 d. 使用苯基琼脂糖凝胶柱CL-4B进行纯化, 洗脱得到*n*(RNase A)纳米胶囊, 制备过程见Scheme 1.



Scheme 1 Schematic diagram of the preparation of *n*(RNase A) nanocapsules through *in situ* polymerization

采用相同的方法制备 *n*(BSA)和 *n*(FITC-RNase A). FITC-RNase A的合成步骤如下: 将10 mg RNase A溶于5 mL PBS溶液, 加入FITC(RNase A/FITC摩尔比为1:4), 于4 $^{\circ}$ C避光反应24 h. 反应完成后, 以PBS为透析液, 透析去除未反应的FITC, 最后将样品冷冻干燥, 于-20 $^{\circ}$ C避光保存.

1.2.2 *n*(RNase A)纳米胶囊的表征 将1 mg/mL *n*(RNase A)纳米胶囊分别加入到四通石英比色杯和电位样品皿中, 通过纳米粒度电位仪测定纳米胶囊的流体力学直径和Zeta电位. 将*n*(RNase A)纳米胶囊滴在铜网上过夜晾干, 然后在500 kV的电压下, 通过TEM观察其形貌及尺寸. 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对RNase A和*n*(RNase A)的分子量进行表征, 具体过程如下: 将样品与5 $\times$ 上样缓冲液混合, 在100 $^{\circ}$ C下加热10 min, 每孔上样10  $\mu$ L样品, 在120 V电压下电泳80 min, 经考马斯亮蓝染色液染色、脱色液脱色后, 使用全自动凝胶成像系统观察并拍照.

1.2.3 n(RNase A) 纳米胶囊酶学性质表征 通过 RNase A 活性检测试剂盒测定 RNase A 活性. 配制浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mg/mL 的 RNase A 和 n(RNase A) 纳米胶囊溶液, 备用. 取 1  $\mu$ L RNase A 探针工作液、2.5  $\mu$ L 10 $\times$ 反应缓冲液、1  $\mu$ L RNase A 或 n(RNase A) 纳米胶囊溶液和 20.5  $\mu$ L RNase-free 水, 加入到 96 孔酶标板中充分混匀, 在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 30 min, 使用 Synergy Lx 酶标仪对每组样品的荧光强度进行定量分析. 此外, 将 RNase A 和 n(RNase A) 纳米胶囊溶液在 37  $^{\circ}$ C 下持续孵育, 在预定时间点取样, 通过测定样品的残余酶活性来分析样品的温度稳定性.

1.2.4 细胞培养 人非小细胞肺癌细胞系 A549 通过含有 10% FBS 和 10% 抗生素 (100 U/mL 青霉素; 100 U/mL 链霉素) 的 DMEM 培养基培养, 置于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的湿润条件下生长.

1.2.5 n(BSA) 纳米胶囊细胞毒性分析 将 A549 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种到 96 孔板中, 培养过夜. 然后, 弃去上层清液, 加入含有不同浓度 n(BSA) 的无血清 DMEM 培养基 (0, 20, 40, 60, 80  $\mu$ g/mL), 培养 6 h 后, 更换为含有 10% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 24 h. 通过 MTT 实验检测细胞存活率, 具体过程如下: 每孔加入 15  $\mu$ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 孵育 4 h 后, 弃去上清培养基, 每孔加入 200  $\mu$ L DMSO 溶解生成的甲臜颗粒, 通过酶标仪检测各孔在 492 nm 处的吸光度值 (OD<sub>492</sub>). 每组实验设置 6 个复孔, 细胞存活率 = (实验组吸光度值 / 未处理组吸光度值)  $\times$  100%.

1.2.6 n(RNase A) 纳米胶囊内吞能力分析 将 A549 细胞以  $2.5 \times 10^5$  个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中, 培养过夜. 弃去培养基上层清液, 每孔加入 2 mL 含有不同浓度的 FITC-RNase A 或 n(FITC-RNase A) 的 DMEM 培养基, 孵育 6 h. 用 PBS 清洗细胞后, 胰酶进行消化, 离心收集细胞 (3000 r/min, 5 min), 通过流式细胞仪对内吞效率进行定量分析. 此外, 纳米胶囊处理细胞后, 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 20 min, DAPI 染液对细胞核染色 (1  $\mu$ g/mL, 7 min). PBS 反复清洗后, 荧光显微镜观察纳米胶囊内吞情况并拍照, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 520 nm.

1.2.7 n(RNase A) 纳米胶囊细胞增殖抑制能力评价 细胞接种和培养与 1.2.5 节一致, 每孔加入 200  $\mu$ L 含有不同浓度 n(RNase A) 的无血清 DMEM 培养基 (2, 4, 6, 8  $\mu$ g/mL), 6 h 后更换为含有 10% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 24 h, 通过 MTT 法检测细胞存活率.

1.2.8 Live/dead 细胞染色实验 使用 Live/dead 细胞染色试剂盒 [钙黄绿素乙酰氧基甲酯 (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 双染] 对 n(RNase A) 纳米胶囊处理后的 A549 细胞活力进行检测. 细胞接种、培养和纳米胶囊处理条件与 1.2.7 节一致. 之后, 用 PBS 反复清洗细胞, 加入 100  $\mu$ L Calcein-AM 染液和 100  $\mu$ L PI 染液, 室温下避光染色 30 min, 通过荧光显微镜进行观察, 使用 488 nm 波长激发, Calcein-AM 和 PI 最大发射波长分别为 515 和 617 nm.

1.2.9 细胞凋亡分析 使用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒对纳米胶囊处理后的细胞凋亡情况进行分析. 细胞接种、培养和纳米胶囊处理条件与 1.2.7 节一致. 处理完成后, 胰酶消化并收集细胞, 用 400  $\mu$ L 结合液重悬细胞, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 染色液和 5  $\mu$ L PI 染色液, 于 4  $^{\circ}$ C 下避光染色 20 min, 通过流式细胞仪对细胞凋亡情况进行分析.

1.2.10 TUNEL 染色分析 使用一步法 TUNEL 凋亡检测试剂盒对细胞早期凋亡情况进行检测. 细胞接种、培养和纳米胶囊处理条件与 1.2.7 节一致. 处理后的细胞通过 4% 多聚甲醛固定 20 min, DAPI 染液标记 7 min, 免疫染色通透液处理 5 min. 根据试剂盒建议的比例, 配置 TUNEL 检测液, TdT 酶和荧光标记液的体积比为 1:9. 每孔加入 50  $\mu$ L TUNEL 检测液, 于 37  $^{\circ}$ C 下避光染色 1 h, 荧光显微镜观察并拍照记录, 使用 488 nm 波长激发, 最大发射波长为 520 nm.

1.2.11 GAPDH 基因 mRNA 水平分析 细胞接种、培养和纳米胶囊处理条件与 1.2.7 节一致. 使用 TRNzol universal 试剂提取纳米胶囊处理后细胞的总 RNA, 使用定量 PCR 专用快速反转录试剂将 RNA 反转录成 cDNA, 使用 TB Green 染料法定量试剂盒配制检测体系, 在荧光定量 PCR 仪上进行 35 个循环 (95  $^{\circ}$ C, 5 s; 60  $^{\circ}$ C, 34 s). GAPDH 的引物序列如下: GAPDH Forward: 5'-CAAGGTCATCCAT-GACAACCTTTG-3'; GAPDH Reverse: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'.

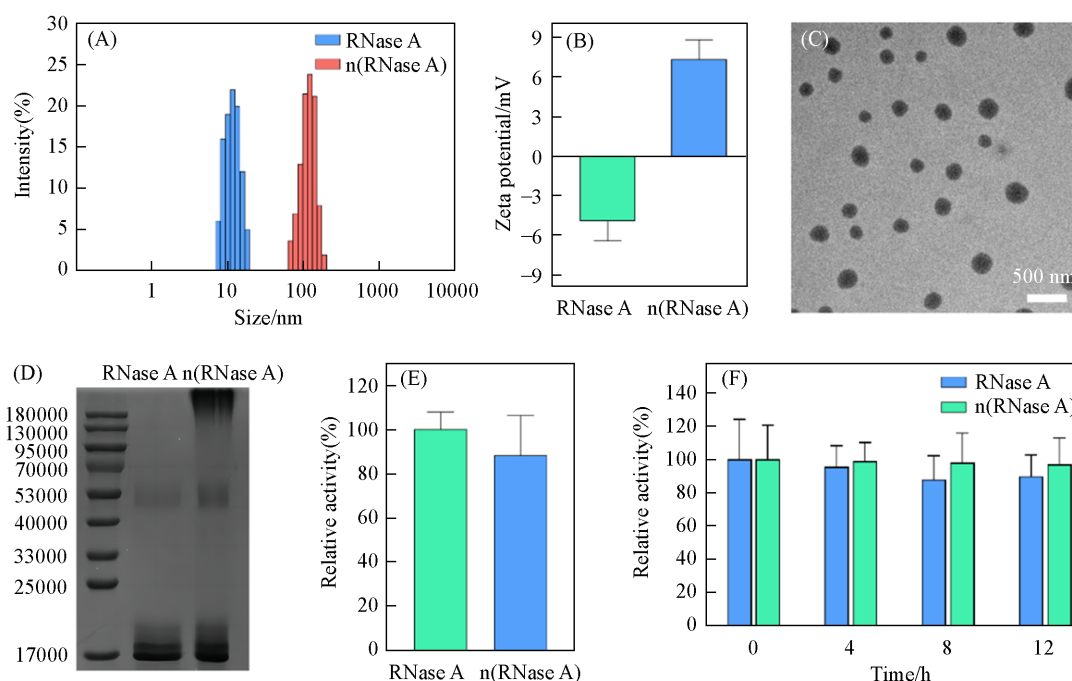
1.2.12 统计学分析 所有数据均以平均值  $\pm$  标准差来表示. 通过 GraphPad Prism 8 对各组数据之间的

统计学意义进行单因素方差分析(one-way ANOVA), \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2 结果与讨论

### 2.1 n(RNase A)纳米胶囊的制备和表征

根据 Scheme 1 中的合成步骤,通过表面引发原位聚合反应,将抗肿瘤酶分子 RNase A 封装在聚合物壳内,制备 n(RNase A) 纳米胶囊.首先,通过动态光散射技术检测 n(RNase A) 纳米胶囊的流体力学直径和 Zeta 电位,结果如图 1(A)和(B)所示. n(RNase A) 的流体力学直径和 Zeta 电位分别为  $(118.9 \pm 14.1)$  nm 和  $(7.3 \pm 1.5)$  mV,而天然 RNase A 的流体力学直径和 Zeta 电位分别为  $(10.9 \pm 1.2)$  nm 和  $(-5.0 \pm 1.5)$  mV.流体力学直径的增加以及 Zeta 电位从负转正可归因于聚合物外壳的引入,证明了 n(RNase A) 纳米胶囊的成功制备.同时, n(RNase A) 纳米胶囊具有适合的纳米级流体力学直径并且表面带有正电荷,有利于其突破细胞膜的自然屏障,进而被内吞后发挥其抗肿瘤活性<sup>[27,28]</sup>.



**Fig. 1** Hydrodynamic size(A) and zeta potential(B) of RNase A and n(RNase A) nanocapsules, TEM image of n(RNase A)(C), SDS-PAGE analysis of RNase A and n(RNase A)(D), relative activity of n(RNase A) in comparison to native RNase A(E), residual activities of RNase A and n(RNase A) at predetermined time points after the incubation with PBS(50 mmol/L, pH=7.4) at 37°C within 12 h(F)

Data were presented as mean $\pm$ SD of triplicate experiments.

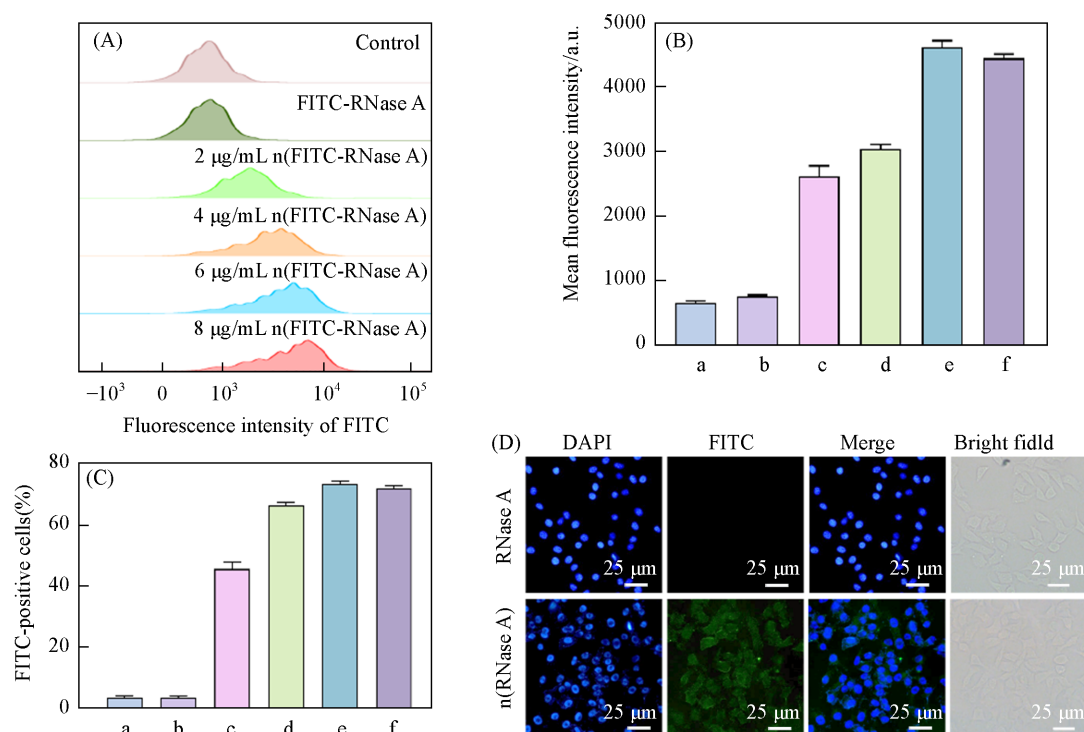
通过 TEM 对 n(RNase A) 纳米胶囊的表面形貌和粒径进行了观察,结果如图 1(C)所示. n(RNase A) 纳米胶囊呈现出均匀分散的球形结构,直径在 100 nm 左右,与动态光散射分析的结果是一致的.通过 SDS-PAGE 实验对 n(RNase A) 纳米胶囊进行表征,结果显示,天然 RNase A 显示出明显的单一条带,其分子量约为 15000,与理论分子量相符[图 1(D)].相比之下, n(RNase A) 纳米胶囊组观察到明显的拖尾条带,同样证明了酶分子表面聚合反应的进行及 n(RNase A) 纳米胶囊的成功构建.

为了探究在酶分子表面引发聚合反应对 RNase A 催化活性的影响,通过 RNase A 活性定量检测试剂盒对天然 RNase A 和 n(RNase A) 纳米胶囊的活性进行测定,结果如图 1(E)所示.天然 RNase A 和 n(RNase A) 纳米胶囊的催化活性几乎一致,表明聚合反应的成功进行未对 RNase A 的水解活性造成明显影响,这是因为聚合反应是在相对温和的条件下进行.进一步对天然 RNase A 和 n(RNase A) 纳米胶囊的热稳定性进行评价,结果显示,在 37 °C 下孵育 12 h 内, RNase A 的活性持续下降,到 12 h 时其相

对活性为 89.6%; 而 n(RNase A) 纳米胶囊的催化活性几乎没有下降, 孵育 12 h 后, 其催化活性为 96.9% [图 1(F)]. 以上结果表明, 聚合物外壳的引入对 RNase A 的催化活性没有显著影响, 同时通过与 RNase A 分子之间的多重共价结合提升了 RNase A 分子的稳定性, 可有效避免 RNase A 分子存储中的结构破坏与活力损失.

## 2.2 n(RNase A) 纳米胶囊的内吞能力

高效的细胞摄取是 RNase A 成功发挥其抗肿瘤活性的前提<sup>[29]</sup>. 因此, 以 A549 细胞系为模型, 通过流式细胞术和荧光显微镜对 FITC-RNase A 和 n(FITC-RNase A) 纳米胶囊的内吞效率进行评价, 结果如图 2(A)~(C) 所示. 与对照组相比, FITC-RNase A 处理细胞后, 其荧光吸收峰几乎没有偏移, 表明天然 RNase A 不能穿过细胞膜屏障, 无法被细胞内吞 [图 2(A)]. 相比之下, 随着 n(FITC-RNase A) 浓度的升高, 其内吞效率逐渐升高, 且细胞内荧光强度的增加与 n(FITC-RNase A) 浓度呈现出明显的剂量依赖性 [图 2(B)]. 在 n(FITC-RNase A) 的浓度为 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 其细胞摄取率最高, 达到 72.8% [图 2(C)]. 上述结果归因于 n(RNase A) 纳米胶囊具有纳米级粒径, 并且表面带有正电荷, 均有利于其与带负电荷的细胞膜相互作用, 促进 n(RNase A) 纳米胶囊的细胞摄取. 与流式细胞术结果分析一致, 荧光显微镜结果同样证明, FITC-RNase A 组几乎观察不到胞内的绿色荧光信号, 而 n(FITC-RNase A) 处理后的细胞中能够检测到明显的绿色荧光 [图 2(D)]. 以上结果表明, n(RNase A) 纳米胶囊能够实现抗肿瘤酶分子 RNase A 的高效内吞, 为后续 RNase A 抗肿瘤作用效果的发挥奠定了基础.



**Fig. 2 Cellular uptake analysis of n(FITC-RNase A) with different concentrations of FITC-RNase A in A549 cells through flow cytometry(A), quantitative analysis of cellular uptake of n(FITC-RNase A) nanocapsules based on mean fluorescence intensity and FITC-positive cells(B, C), the cellular uptake analysis of 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FITC-RNase A and n(FITC-RNase A) using fluorescence microscope(D)**

Data were presented as mean $\pm$ SD of triplicate experiments. a. Control; b. FITC-RNase A; c. 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n(FITC-RNase A); d. 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n(FITC-RNase A); e. 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n(FITC-RNase A); f. 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n(FITC-RNase A).

## 2.3 n(RNase A) 纳米胶囊抑制 A549 细胞增殖的能力

为了探究 n(RNase A) 纳米胶囊被肿瘤细胞摄取后能否切割细胞质中的 RNA 分子, 通过荧光定量 PCR 技术检测了纳米胶囊处理 A549 细胞后 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, 内参基因) mRNA 分子的表

达水平<sup>[30]</sup>. 以牛血清白蛋白(BSA)为模型, 制备了n(BSA)纳米胶囊, 以此作为阴性对照来评估n(RNase A)纳米胶囊降解胞内 mRNA 分子的能力. 结果如图 3 所示, 与未处理组相比, n(BSA)纳米胶囊和游离 RNase A 处理后, 均未能降低胞内 GAPDH mRNA 的含量, 这是因为游离 RNase A 不能穿过细胞膜的天然屏障而无法发挥其催化活性, 而 n(BSA)尽管能有效内吞, 但其自身不具备 RNA 降解能力. 相比之下, n(RNase A)纳米胶囊处理后的 RNA 样品需要更多的 PCR 循环数才能达到荧光阈值, 该结果表明 n(RNase A)纳米胶囊被细胞摄取后, 成功切割细胞质中的 RNA 分子, 导致 GAPDH mRNA 的水平明显降低, 其对胞内 RNA 分子的切割成为其后续发挥抗肿瘤活性的基础.

在确定 n(RNase A)纳米胶囊能有效切割细胞质中的 RNA 分子后, 通过 MTT 实验和 Live/dead 细胞染色实验评估了 n(RNase A)纳米胶囊对 A549 细胞的增殖抑制能力. 首先, 以 n(BSA)纳米胶囊为模型, 评价了纳米胶囊聚合物外壳的细胞毒性, 结果如图 4(A)所示. 随着 n(BSA)纳米胶囊浓度的升高, 细胞存活率逐渐下降, 在 n(BSA)纳米胶囊浓度达到 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞存活率依然维持在 75% 以上, 表明聚合物外壳未对细胞造成明显损伤, 具有良好的生物相容性. 随着 n(RNase A)纳米胶囊浓度的升高, 细胞存活率呈现出逐渐下降的趋势, 表明 n(RNase A)纳米胶囊以剂量依赖性的方式抑制肿瘤细胞增殖, 其半抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$  值) 为 6.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [图 4(B)]. 进一步地, Live/dead 细胞染色结果显示, 游离 RNase A 和 n(BSA)纳米胶囊处理细胞后, 未观察到红色荧光信号, 表明游离 RNase A 和 n(BSA)纳米胶囊处理后未对肿瘤细胞造成杀伤 [图 4(C)]. 相比之下, n(RNase A)组观察到强烈的红色荧光信号, 表

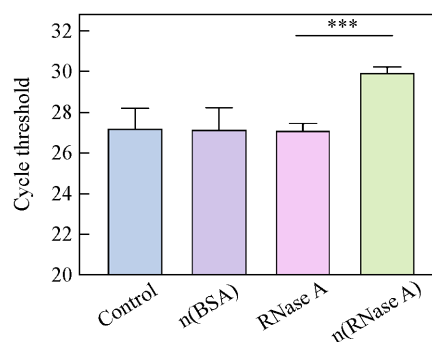


Fig. 3 Cycle threshold values of TB green fluorescence analysis in quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Data were presented as mean ± SD of triplicate experiments (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

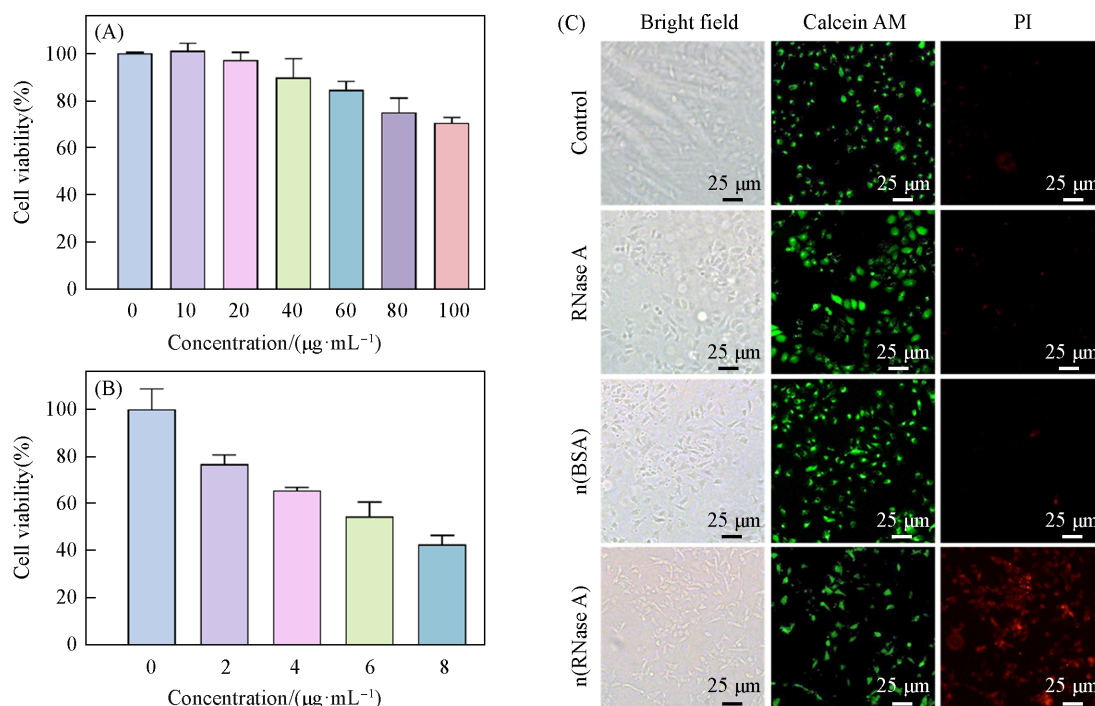


Fig. 4 Cell viability of A549 cells after the treatment with n(BSA) at different concentrations for 24 h(A), anti-proliferative effect of n(RNase A) against A549 cells through MTT assay(B) and live/dead staining assay of A549 cells after the treatment with n(RNase A)(C)

Data were presented as mean value ± SD ( $n = 3$ ).

明纳米胶囊介导 RNase A 进入细胞后,能够成功发挥其 RNA 降解活性,进而抑制肿瘤细胞增殖。

#### 2.4 n(RNase A)纳米胶囊诱导 A549 细胞凋亡性能

细胞凋亡是抑制肿瘤细胞增殖的关键因素。因此,为了进一步验证 n(RNase A)纳米胶囊对 A549 细胞的增殖抑制作用是否与细胞凋亡有关,通过 TUNEL 染色技术对 n(RNase A)纳米胶囊处理后 A549 细胞的早期凋亡情况进行检测,结果如图 5(A)所示。游离 RNase A 和 n(BSA)纳米胶囊处理细胞后,细胞核结构完整,且未观察到明显的绿色荧光信号,表明二者均未能诱导细胞早期凋亡。值得注意的是, n(RNase A)纳米胶囊处理细胞后,观察到细胞核轻微的结构变形以及显著的绿色荧光信号产生,表明 n(RNase A)纳米胶囊能够诱导 A549 细胞凋亡。进一步地,使用 Annexin-FITC 和 PI 染料对 n(RNase A)纳米胶囊处理后的细胞染色,通过流式细胞术对细胞凋亡情况进行定量分析,结果如图 5(B)所示。用游离 RNase A 组和 n(BSA)纳米胶囊处理细胞后,总细胞凋亡率分别为 7.75% 和 6.03%,表明 RNase A 不能被细胞摄取,无法执行其抗肿瘤功能,而用 n(RNase A)纳米胶囊处理细胞后,总细胞凋亡比例显著升高,达到 29.22%,表明纳米胶囊介导 RNase A 内吞后,通过胞内 RNA 分子的高效切割实现细胞凋亡通路的激活,进而诱导肿瘤细胞死亡。上述结果表明, n(RNase A)纳米胶囊能够激活肿瘤细胞凋亡信号通路进而抑制细胞增殖。

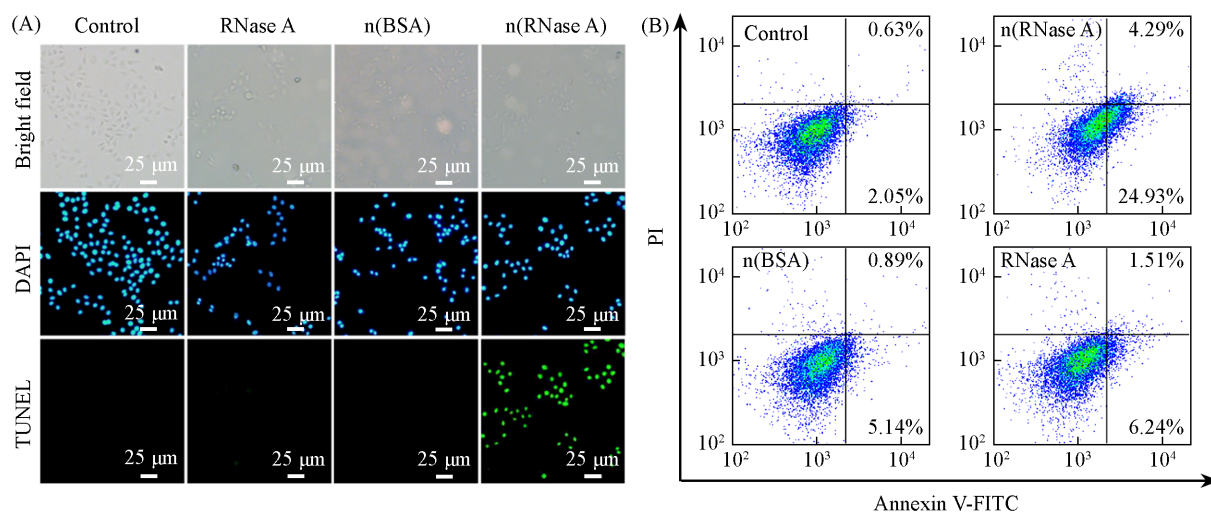


Fig. 5 TUNEL cell staining assay of A549 cells treated with n(RNase A) capsules for 24 h(A), flow cytometric analysis of cell apoptosis after the treatment with n(RNase A) capsules for 24 h using Annexin-FITC/PI staining(B)

### 3 结 论

采用酶分子表面引发原位聚合策略,成功地将抗肿瘤酶分子 RNase A 封装于纳米胶囊中,并实现 RNase A 的高效胞内递送。构建的 n(RNase A)纳米胶囊呈现均一的球形结构,且聚合物的引入并未明显改变 RNase A 的催化活性, n(RNase A)纳米胶囊能够被非小细胞肺癌细胞系 A549 有效摄取,内吞后其能够通过切割细胞质中的 RNA 分子诱导细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖。综上,基于酶分子表面引发原位聚合的策略为抗肿瘤酶分子的胞内递送提供了一种有效策略,为酶分子在重大疾病治疗中的应用带来了新的机遇。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Thai A. Y., Solomon B. J., Sequist L. V., Gainer J. F., Heist R. S., *Lancet*, 2021, 398(10299), 535—554
- [ 2 ] Han B., Zheng R., Zeng H., Wang S., Sun K., Chen R., Li L., Wei W., He J., *J. Natl. Cancer Cent.*, 2024, 4(1), 47—53
- [ 3 ] Harada G., Yang S. R., Cocco E., Drilon A., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2023, 20(4), 229—249
- [ 4 ] Lahiri A., Maji A., Potdar P. D., Navneet S., Parikh P., Bishit B., Mukherjee A., Paul M. K., *Mol. Cancer*, 2023, 22(1), 40
- [ 5 ] Abdelaziz H. M., Gaber M., Abd-Elwakil M. M., Mabrouk M. T., Elgohary M. M., Kamel N. M., Kabary D. M., Freag M. S., Samaha

- M. W., Mortada S. M., Elkhodairy K. A., Fang J. Y., Elzoghby A. O., *J. Control. Release*, **2018**, 269(10), 374—392
- [ 6 ] Wathoni N., Puluhulawa L. E., Joni I. M., Muchtaridi M., Mohammed A. F. A., Elamin K. M., Milanda T., Gozali D., *Drug Deliv.*, **2022**, 29(1), 2959—2970
- [ 7 ] Mathieu L. N., Larkins E., Sinha A. K., Mishra-Kalyani P. S., Jafri S., Kalavar S., Ghosh S., Goldberg K. B., Pazdur R., Beaver J. A., Singh H., *Clin. Cancer Res.*, **2023**, 29(16), 2973—2978
- [ 8 ] Zhu X., Yu Z., Feng L., Deng L., Fang Z., Liu Z., Li Y., Wu X., Qin L., Guo R., Zheng Y., *Carbohydr. Polym.*, **2021**, 268, 118237
- [ 9 ] Guo Z. P., Lin L., Chen J., Tian H. Y., Chen X. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2020**, 41(2), 235—242 (郭兆培, 林琳, 陈杰, 田华雨, 陈学思. 高等学校化学学报, **2020**, 41(2), 235—242)
- [ 10 ] Zhou T., Yuan S., Qian P., Wu Y., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2023**, 39(1), 72—82
- [ 11 ] Zhang Y., Jiang S., Lin J., Huang P., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61(41), e202208583
- [ 12 ] Chen T., Yi J., Zhao Y., Chu X., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140(31), 9912—9920
- [ 13 ] Tang J., Liu Y., Qi D., Yang L., Chen H., Wang C., Feng X., *Small*, **2021**, 17(25), e2101219
- [ 14 ] Cui H., Zhang M., Zhang L., Li H., Wang Y., Zhao Y., Chen Q., Wang J., *J. Colloid Interface Sci.*, **2023**, 634, 388—401
- [ 15 ] Jia J., Zhang S., Wen K., Li Q., *Int. J. Nanomedicine*, **2019**, 14, 9971—9981
- [ 16 ] Jiang L., Liang X., Jia J., Han H., Tang J., Li Q., *J. Mater. Chem. B*, **2024**, 12(11), 2869—2876
- [ 17 ] Wu D., Zhang Z., Li X., Zhu T., Wang J., Hu Q., *Biomacromolecules*, **2023**, 24(2), 1022—1031
- [ 18 ] Ouyang J., Zhang Z., Li J., Wu C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, 63(16), e202400105
- [ 19 ] Abdelmohsen L. K., Nijemeisland M., Pawar G. M., Janssen G. J., Nolte R. J., van Hest J. C., Wilson D. A., *ACS Nano*, **2016**, 10(2), 2652—2660
- [ 20 ] Wu Y. S., Shang Y. X., Jiang Q., Ding B. Q., *Chem. J. Chinese Universities*, **2022**, 43(8), 20220179 (仵宇帅, 尚颖旭, 蒋乔, 丁宝全. 高等学校化学学报, **2022**, 43(8), 20220179)
- [ 21 ] Qin X., Yu C., Wei J., Li L., Zhang C., Wu Q., Liu J., Yao S. Q., Huang W., *Adv. Mater.*, **2019**, 31(46), e1902791
- [ 22 ] Jia X., Wang L., Du J., *Nano Res.*, **2018**, 11(10), 5028—5048
- [ 23 ] Pelegri-O'Day E. M., Lin E. W., Maynard H. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136(41), 14323—14332
- [ 24 ] Yan M., Du J. J., Gu Z., Liang M., Hu Y. F., Zhang W. J., Priceman S., Wu L. L., Zhou Z. H., Liu Z., *Nat. Nanotechnol.*, **2010**, 5(1), 48—53
- [ 25 ] Liang X., Wen K., Chen Y., Fang G., Yang S., Li Q., *Int. J. Nanomedicine*, **2022**, 17, 4843—4860
- [ 26 ] Han L., Liu C., Qi H., Zhou J., Wen J., Wu D., Xu D., Qin M., Ren J., Wang Q., Long L., Liu Y., Chen I., Yuan X., Lu Y., Kang C., *Adv. Mater.*, **2019**, 31(19), 1805697
- [ 27 ] Shen X., Pan D., Gong Q., Gu Z., Luo K., *Bioact. Mater.*, **2023**, 32, 445—472
- [ 28 ] Sun J. H., Guo C. Y., Dong J., Zhang R. P., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, 44(8), 20230044 (孙菁华, 郭春燕, 董杰, 张瑞平. 高等学校化学学报, **2023**, 44(8), 20230044)
- [ 29 ] Yang D., Chen Q., Zhang M., Feng G., Sun D., Lin L., Jing X., *Int. J. Nanomedicine*, **2022**, 17, 4879—4894
- [ 30 ] Zhao S., Duan F., Liu S., Wu T., Shang Y., Tian R., Liu J., Wang Z. G., Jiang Q., Ding B., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2019**, 11(12), 11112—11118

(Ed.: V, K, S)