

HA-zein@QT 纳米药物递送系统的 微流控精准构建及性能研究

陈明慧¹, 刘谟浩¹, 李勇¹, 程航¹, 耿鹏², 邱昆成¹,
邓改改¹, 曾建红¹, 黄文权¹

(1. 三峡大学健康医学院, 2. 材料与化工学院, 宜昌 443002)

摘要 玉米醇溶蛋白(Zein)在抗癌药物递送系统(DDS)中表现出巨大的潜力, 但传统 zein 基 DDS 存在功能单一、粒径不均一、重现性差和抗癌效果差等缺陷. 本文以槲皮素(化学药物)-TCPP(光敏剂)为模型药(QT), 基于微流控技术调控载体与模型药物的共组装, 精准构建了 HA-zein@QT 纳米药物递送系统, 达到协同增效抗肿瘤的目的. 采用透明质酸(HA)功能化 α -zein, 以提高载体的生物相容性、稳定性和细胞摄取能力. 采用计算机仿真筛选出混合效率为 99.54% 的高效混合芯片, 通过该芯片制备的 HA-zein@QT 平均粒径为 (50.6 ± 1.7) nm, PDI 为 0.196. 稳定性实验表明, HA-zein@QT 与去离子水、PBS 缓冲溶液和 1640 培养基共孵育后, 表现出较高的稳定性. 活性氧和 \cdot OH 检测结果表明, HA-zein@QT 暴露于近红外光可促进 1O_2 和 \cdot OH 生成. 生物相容性实验表明, 所制备 DDS 与血红细胞孵育后的溶血率仅为 3.75%, 且与非肿瘤细胞共孵育后细胞存活率均大于 84.57%, 证明其具有较高的生物相容性. 通过肿瘤细胞毒性研究发现, A549, HCT116 和 HCT8 细胞的存活率分别为 28.2%, 20.2% 和 24.6%, 表明 HA-zein@QT 对肿瘤细胞具有较高的抑制能力. 本文通过微流控精准构建 zein 基 DDS, 为抗肿瘤药物的递送提供了一种高效、低毒的新策略.

关键词 玉米醇溶蛋白; 微流控; 药物递送; 联合治疗

中图分类号 O621

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240480

Microfluidic Precise Construction and Performance Studies of HA-zein@QT Nanodrug Delivery System

CHEN Minghui^{1#}, LIU Mohao^{1#}, LI Yong¹, CHENG Hang¹, GENG Peng², QIU Kuncheng¹,
DENG Gaigai^{1*}, ZENG Jianhong^{1*}, HUANG Wenquan^{1*}

(1. College of Medicine and Health Science, 2. College of Materials and Chemical Engineering,
China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract Zein shows great potential in anti-cancer drug delivery systems (DDS). However, the zein-based DDS prepared by the traditional method has its shortcomings, such as single function, uneven particle size, poor batch reproducibility and anti-cancer effect. In this work, the quercetin (chemical drug)-TCPP (photosensitizer) was used as the model drug (QT). The co-assembly of the carrier and the model drug was accurately controlled by microfluidic

收稿日期: 2024-10-23. 网络首发日期: 2024-11-26.

联系人简介: 黄文权, 男, 博士, 副教授, 主要从事药物载体的合成与修饰方面的研究. E-mail: huangwenquan@ctgu.edu.cn

邓改改, 女, 博士, 副教授, 主要从事天然药物活性分析及代谢方面的研究. E-mail: denggaigai@ctgu.edu.cn

曾建红, 女, 博士, 教授, 主要从事先导化合物抗肿瘤活性及其作用机理方面的研究. E-mail: 59747528@qq.com

基金项目: 湖北省自然科学基金(批准号: 2024AFB059)和三峡大学高层次人才科研启动及平台建设经费(拔尖人才)(批准号: 8220309)资助.

Supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province, China(No.2024AFB059) and the Funds for Scientific Research Start-up and Platform Construction of China Three Gorges University High-level Talents(Top-notch Talents)(No.8220309).

#共同第一作者.

technology. And the HA-zein@QT nanodrug delivery system was precisely constructed to achieve the synergistic anti-tumor. Hyaluronic acid(HA) was used to functionalize α -zein to improve the biocompatibility, stability and cell uptake of the carrier. The microfluidic chip with a high mixing efficiency of 99.54% was screened by computer simulation. The average particle size and PDI of the prepared HA-zein@QT were (50.6 \pm 1.7) nm and 0.196, respectively. The results of stability experiments suggested that HA-zein@QT showed high stability after co-incubation with deionized water, PBS and 1640 medium. The results of reactive oxygen species and \cdot OH detection showed that the $^1\text{O}_2$ and \cdot OH increased after exposure to near-infrared light. HA-zein@QT showed a low hemolysis rate(3.75%) after co-incubation with red blood cells. And a high survival rate (>84.57%) of non-tumor cells was obtained. This evidence indicated that the prepared DDS had high biocompatibility. The cytotoxicity experiment showed that the survival rates of A549, HCT116 and HCT8 cells were 28.2%, 20.2% and 24.6%, respectively. This indicated that HA-zein@QT had a high inhibitory ability to tumor cells. It is expected that the microfluidics precise construction of zein-based DDS will provide a new strategy for achieving high efficiency and minimal side effects in anti-tumor drug delivery.

Keywords Zein; Microfluidic; Drug delivery; Combination therapy

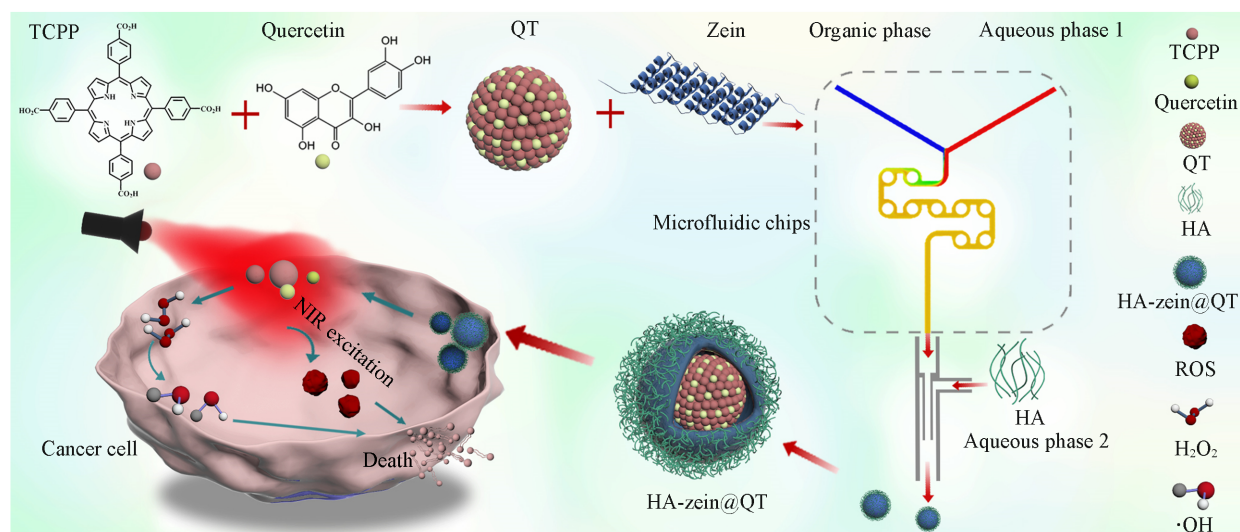
癌症发病率和死亡率日益增多,传统的化疗方法具有毒副作用大、靶向性差及生物相容性低等缺陷,已无法满足临床需求^[1].近年来,光动力治疗(Photodynamic therapy, PDT)成为抗癌药物高效递送的热点^[2].该方法采用光敏剂(如卟啉类)在近红外光(NIR)的激发下产生活性氧(ROS)破坏细胞结构,引发细胞程序性死亡^[3].将PDT与化疗药物结合构建药物递送系统(DDS),能以更小创伤达到协同增效的目的^[4].然而,该DDS所用光敏剂和化学抗癌药通常具有一定的光毒性和副作用、生物相容性低及靶向性差等缺点^[5].因此,如何实现安全且有效的药物递送显得尤为关键.

玉米醇溶蛋白(Zein)具有高生物相容性^[6]、低毒性^[7]、生物降解性^[8]及易功能化等优势,将其制成功能化纳米颗粒(NPs)可提高DDS的生物相容性、细胞摄取和靶向能力^[9].因具有良好的自组装特性zein可用于疏水药物的包封.Wang等^[10]制备了磷脂-zein复合NPs并应用于异甘草素的负载,与未包封的药物相比,制备的DDS可使肿瘤体积减少41.4%,实现了DDS在肿瘤部位的富集.此外,zein基NPs可增强对光或胃酸不稳定药物的稳定性.Zhang等^[11]采用zein制备了多组分复合NPs并用于姜黄素的负载,实现高的包封率(91.18%),增强了姜黄素的抗氧化和缓释性能,并提高其对胃酸的稳定性.虽然zein在抗肿瘤应用方面取得了一定进展,但仍然存在以下两方面的主要问题:zein的等电点为6.2^[12],使其在生理环境(pH=7.4)下不稳定,易发生聚集而形成大颗粒;传统的制剂方法(如反溶剂法)无法精准控制zein基DDS的制备过程参数,导致制备的DDS粒径不均一、批次间差异大.而zein基DDS的稳定性、粒径均一性和重复性与其共组装过程密切相关.因此,亟需开发新型制剂手段,以精确控制zein与模型药物的共组装过程.

随着微流控技术的发展,zein基DDS的制备难题有望得到解决.研究表明,微流控在提高NPs的稳定性和均一性方面具有独特的优势^[13,14].通过优化微流控通道结构、流量比、混合时间和芯片材质等参数,可精准调控载体与药物的共组装过程,实现个性定制DDS的尺寸、形状、组成和表面性质等物理化学特性^[15,16].Na等^[17]基于微流控芯片调控自组装,构建了具有高均一性的脂质体(50~130 nm),使mRNA的包封率达到90%以上.因此,采用微流控技术有望调控zein基DDS的共组装过程,实现连续精准制备均一、稳定、具有特定功能的DDS.

本文利用微流控技术调控HA-zein@QT纳米药物递送系统的共组装过程,并对其理化性质和递送性能进行了研究(Scheme 1).以槲皮素(Q)和中-四(4-羧基苯基)卟吩(TCPP)作为模型药物(QT),采用透明质酸(HA)功能化 α -zein,通过计算机仿真筛选出具有高效混合性能的芯片,用于调控HA-zein与模型药物的共组装,以提高DDS的生物相容性、均一性和稳定性.采用非肿瘤细胞MTT实验和血细胞溶血实验,考察了所制备DDS的生物相容性.以HCT116, HCT8和A549为肿瘤模型细胞,评估了所制备DDS的化学与光动力联合治疗性能.通过荧光和流式细胞术,进一步定性和定量研究了其细胞摄

取、产生 ROS 的能力. 本文通过微流控精准构建 HA-zein@QT 纳米 DDS, 有望解决传统抗癌 DDS 在制备工艺和药物递送性能的局限性问题.



Scheme 1 Precise preparation of HA-zein@QT and the combination of chemo-photodynamic therapy

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Zein, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 透明质酸(HA, $M_w=20000$)、1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)、中-四(4-羧基苯基)卟吩(TCPP)、考马斯亮蓝、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)和二甲基亚砜(DMSO), 分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司; CCK8, 索莱宝科技有限公司; 嵌段式聚醚(F127), 优级纯, 上海源叶生物科技有限公司; 胰蛋白酶消化液、PBS 粉末和 4% 多聚甲醛固定液, 武汉赛维尔生物科技有限公司.

Fourier Transform 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), 美国 PE 公司; NS-90Z 型纳米粒度及电位分析仪(DLS), 珠海欧美克仪器有限公司; Shimadzu UV-2600 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis), 日本 Shimadzu 公司; H-7500 型透射电子显微镜(TEM), 日本 Hitachi 公司.

1.2 实验过程

1.2.1 仿真设置 采用 CAD 对微通道进行 3D 建模, 通过 mesh 软件进行网格划分, 采用 Fluent 软件对 3 种微流控芯片(“特斯拉”芯片、“三角形”芯片和分裂汇聚芯片)的流体流动进行仿真计算. 入口设置为 velocity-inlet, 有机相与 1 号水相和 2 号水相的流速(mL/min)比为 1:9:10, 出口设置为压力出口. 采用 coupled 算法对通道内流体流动进行求解计算, 设置收敛精度为 0.00001, 迭代次数为 50000 次.

1.2.2 α -zein 的分离纯化 α -zein 的分离纯化主要利用 α -zein 在异丙醇中的溶解性差异. 称取 250 g 市售 zein, 加入 2 L 95% 异丙醇溶液中提取 30 min, 以 8000 r/min 转速离心 5 min, 上层清液经抽滤并浓缩至黏稠状, 随后透析并冻干. 采用索氏提取器除去色素(正己烷/二氯甲烷体积比为 1:1), 反复脱色至无色素渗出, 将样品干燥并粉碎过 4 号筛, 即得纯化的 α -zein.

1.2.3 HA-zein 的制备 配制 5, 10 和 15 mg/mL 的 α -zein 溶液(DMSO)作为有机相. 以超纯水为 1 号水相, 浓度为 1, 0.4 和 0.2 mg/mL 的 HA 溶液为 2 号水相, 温度设置为 20, 30 和 40 °C. 将各相接入相应注射泵, 有机相和 1 号水相流体通过微流控芯片后, 再经过同轴三通通道与 2 号水相混合, 制备得到 HA-zein.

1.2.4 QT 的制备 分别配置 TCPP 与槲皮素的 DMSO 溶液(溶质质量比分别为 2:1, 1:1 和 1:2)、F127 溶液(1 mg/mL), 将上述 DMSO 溶液滴加到 F127 溶液中, 涡旋混匀制备得到 QT, 经超滤离心(4200 r/min, 15 min)收集样品, 并分散于超纯水中, 于 4 °C 避光保存, 备用.

1.2.5 HA-zein@QT 的制备 HA-zein@QT 的制备过程与 HA-zein 基 NPs 相似, 有机相为 α -zein (5 mg/mL)、槲皮素(1 mg/mL)和 TCPP(1 mg/mL)的 DMSO 溶液, 1 号水相为 F127 溶液(1 mg/mL), 2 号水相为 HA 溶液(0.2 mg/mL), 其中有机相与 1 号水相和 2 号水相的流速比分别为 1:3:4, 1:6:7 和 1:9:10.

1.2.6 单线态氧检测 将 H_2O_2 与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和 HA-zein@QT 加入离心管中混合均匀, 混合后溶液中 TMB 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, HA-zein@QT 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, H_2O_2 浓度为 10 mmol/L. 分别与 pH=7.4 和 5.0 的缓冲液孵育 30 min 后, 用 UV-Vis 光谱检测吸光度变化.

1.2.7 $\cdot\text{OH}$ 检测 将 H_2O_2 与 TMB 和 HA-zein@QT 加入离心管中混合均匀, 混合后溶液中 TMB 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, HA-zein@QT 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, H_2O_2 浓度为 10 mmol/L, 分别与 pH=7.4 和 5.0 的缓冲液孵育 30 min 后, 用 UV-Vis 光谱检测吸光度变化.

1.2.8 血液相容性考察 取小鼠血液经离心(3000 r/min, 5 min)获取红细胞, 用生理盐水稀释得到 2% 的红细胞混悬液. 将 500 μL 红细胞溶液与 500 μL 超纯水、生理盐水、HA-zein@QT 溶液(其中 TCPP 浓度为 50, 25, 12.5 和 6.25 $\mu\text{g/mL}$)混合, 于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 后离心, 检测上层清液. 以生理盐水为阴性对照, 超纯水为空阳性对照, 检测波长为 540 nm.

1.2.9 细胞毒性实验 采用非肿瘤细胞 NCM460 和 FHC 考察了载体的生物相容性, 采用肿瘤细胞 HCT116, HCT8 和 A549 考察了肿瘤抑制能力. 将细胞培养 24 h 后, 移除培养基并分别加入 100 μL 含有 TCPP 浓度为 50, 25, 12.5, 6.25 和 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 的游离 TCPP, QT 和 HA-zein@QT. 在给药孵育 4 h 后, 采用 NIR 光(660 nm, 66 mW/cm²)照射 5 min. 避光孵育 20 h 后, 在每孔中加入含 CCK8 的培养基, 孵育 2 h 后, 采用酶标仪在 450 nm 处测量吸光值.

1.2.10 细胞摄取实验 将 HCT116 肿瘤细胞(2×10^5 个/孔)接种到 6 孔板中培养 24 h, 加入 TCPP 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 α -zein@QT 和 HA-zein@QT 孵育. 竞争性抑制组先加入 2 mg/mL LHA 孵育 1 h, 随后加入 HA-zein@QT 孵育 4 h, 移除培养液, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次, 采用胰酶消化并离心收集细胞, 通过流式细胞仪进行检测. 荧光显微镜定性实验用多聚甲醛固定细胞, 并采用 DAPI 染色后直接拍照.

1.2.11 细胞内 ROS 检测 将 HCT116 肿瘤细胞(2×10^5 个/孔)接种到 6 孔板中培养 24 h, 移去培养基, 分别加入 200 μL TCPP 和 HA-zein@QT(TCPP 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$)的无血清培养基共孵育 4 h, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 2 次. 采用 DCFH-DA 探针在 37 $^\circ\text{C}$ 下染色 30 min, 暴露于 NIR 光(660 nm, 66 mW/cm²)5 min. 移去检测液并用 PBS 缓冲溶液清洗 2 次, 避光组细胞加入 HA-zein@QT, 添加探针孵育并采用荧光显微镜观察.

2 结果与讨论

2.1 微流控芯片筛选

采用 Fluent 软件模拟几种商品化芯片的微尺度流体混合过程, 计算结果如图 1 所示. 图 1(A)~(C) 为不同芯片混合的浓度云图, “特斯拉”芯片[图 1(A)]、“三角形”芯片[图 1(B)]和分裂汇聚芯片[图 1(C)]的混合效率分别为 88.87%, 95.81% 和 99.54%, 表明分裂汇聚芯片具有较高的混合效率.

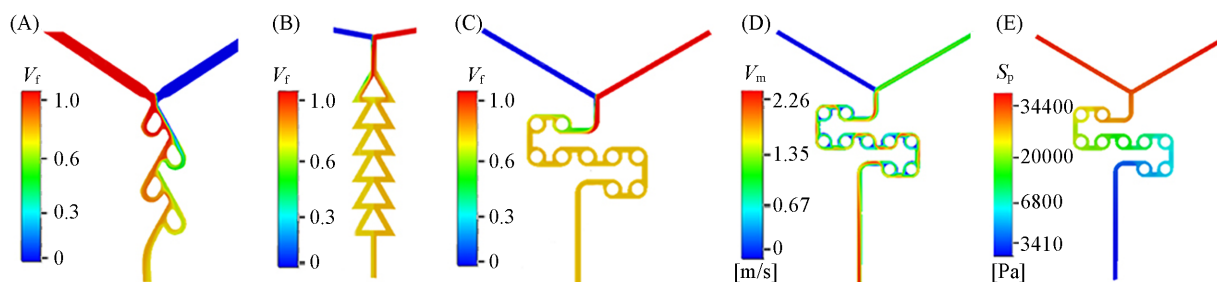


Fig. 1 Concentration contours of “Tesla” chip(A), “triangular” chip(B) and split-and-recombine chip(C), velocity contour of split-and-recombine chip(D), and pressure contour of split-and-recombine chip(E)

V_f : Volume fraction; V_m : flow velocity; S_p : pressure.

图1(C)~(E)为分裂汇合芯片的浓度云图、速度云图和压力云图. 浓度云图表明, 流体在汇合处开始发生混合, 进入混合单元后发生快速混合. 速度云图表明, 流体流速最高可达到2.26 m/s. 压力云图表明, 最高压力为0.034 MPa, 说明芯片内部压力很小. 因此, 通过计算机仿真模拟可筛选出具有高混合效率的微流控芯片, 有利于了解其内部速度和压力大小, 优化流体混合过程参数.

2.2 HA-zein的制备与表征

在制备 HA-zein 前先对 zein 进行纯化. 图 S1(A) (见本文支持信息) 示出了 α -zein 的分离纯化步骤, 结果表明 α -zein 的回收率为 76.3%. 市售 zein 存在较多的色素而显示淡黄色, 经纯化后 α -zein 颜色偏白 [图 S1(B)]. SDS-PAGE 结果 [图 S1(B)] 表明, α -zein 在 22000 和 24000 Da 处显示出两条明显的条带. 与 α -zein 相似, 市售 zein 在 22000 和 24000 Da 处存在典型的条带, 此外在 12000, 14000 和 40000 Da 处出现一条比较浅的电泳带, 表明其存在较多的杂蛋白. 紫外光谱 [图 S1(C)] 表明, 市售 zein 在 461 nm 处存在明显的色素峰, 而 α -zein 在此处不存在峰, 表明 α -zein 经纯化后已基本除去了色素.

为验证 HA-zein 的成功制备, 采用红外光谱 (FTIR) 分析了 HA-zein 复合物中 HA 与 α -zein 的相互作用. FTIR 谱图 [图 2(A)] 中, α -zein 在 3413, 1648 和 1537 cm^{-1} 处的峰可分别对应酰胺 A 带 (O—H 拉伸振动)、酰胺 I 带 (C—O 伸缩振动) 和酰胺 II 带 (C—N 伸缩振动), 这是 zein 二级结构的特征吸收峰^[18,19]. 在 HA 的 FTIR 谱图中, 3467, 1619 和 1054 cm^{-1} 处的峰可分别归属于 O—H, C=O 和 C—O 伸缩振动, 这是 HA 典型的特征峰^[20,21]. 与 HA-zein 和 α -zein 相比, 在 HA 与 α -zein 直接物理混合样品的 FTIR 光谱中未观察到新峰或原有峰的位移. HA-zein 复合物在 1041 cm^{-1} 处发现 C—O 伸缩振动峰, 推测是 HA 与 α -zein 作用后发生了红移^[22]. 酰胺 I 带 (C—O 伸缩) 从 1648 cm^{-1} 蓝移至 1656 cm^{-1} 处、酰胺 A 带 (O—H 拉伸振动) 从 3413 cm^{-1} 蓝移至 3419 cm^{-1} 处^[23]. 由此可推断 HA 与 α -zein 之间发生了氢键与疏水相互作用^[24,25]. 为进一步验证其相互作用, 采用荧光光谱分析了 α -zein 与 HA 的相互作用 [图 2(B)], 以 280 nm 为激发波长, 收集发射波长在 300~500 nm 范围内的数据. 在 α -zein 的荧光光谱中, 310 nm 处为 α -zein 的酪氨酸特征荧光峰^[26], 峰强为 1912.95. 随着 HA 的量从 0.1 mg 增加到 0.9 mg, 310 nm 处的荧光峰强度逐渐增强, 表明 zein 与 HA 的结合导致 α -zein 的荧光增强. 这有可能是因为 HA 糖链上的羟基与 α -zein 中的

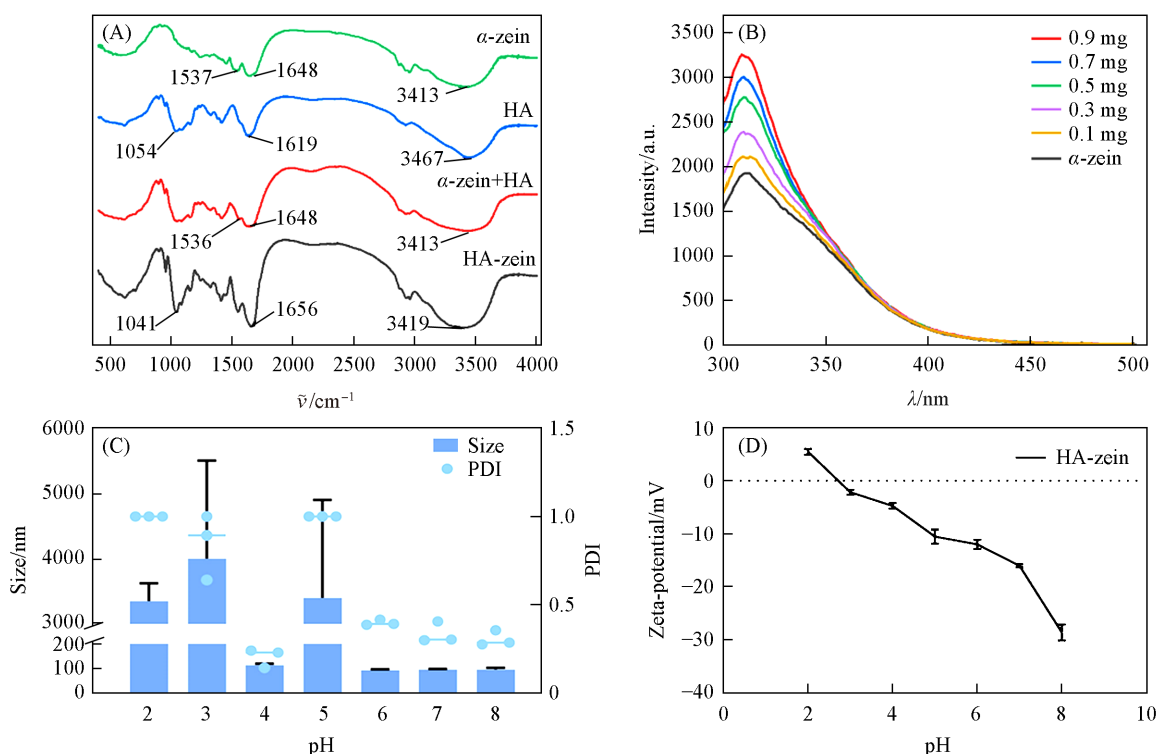


Fig. 2 FTIR spectra of α -zein, HA, HA+zein and HA-zein(A), fluorescence spectra(B), the particle size and PDI of HA-zein(C), and the zeta potential of HA-zein(D)

酪氨酸等氨基酸残基发生了相互作用, 导致荧光基团的局部微环境发生改变^[27]. 综上 FTIR 和荧光检测结果, 证明了 HA-zein 的成功制备.

本文通过微流控技术制备了 HA-zein 基 NPs, 结果表明 HA-zein 在 pH<5 时粒径和 PDI 偏大, 说明 NPs 容易发生黏连和聚集, 稳定性较差. 而在 pH>5 时, HA-zein 粒径为 (104.1±1.6) nm [图 2(C)], PDI<0.4, 表明在该 pH 范围内 NPs 具有较高的均一性和稳定性. 尤其在 pH=7.4 时, zeta 电位约为 -25 mV [图 2(D)], 表明在生理条件下存在较强的静电斥力, 有效防止了颗粒之间聚集. 上述实验结果表明, HA-zein 基 NPs 在 pH=7.4 的生理条件下, 粒径分布均一, 具备良好的稳定性, 是一种有潜力的药物递送载体.

2.3 HA-zein@QT 的制备与表征

实验中通过微流控精准控制过程参数, 使用 HA-zein 将模型药物 QT 包覆. 基于前期大量预实验, 本实验选择 α -zein 浓度 [$c(\alpha\text{-zein})$]、温度 (t) 和流速比为正交因素, 以粒度大小和 PDI 为评价指标, 考察了微流控参数对粒径和 PDI 的影响, 结果列于表 1. 由极差分析得出最优制备条件为 $c(\alpha\text{-zein})=5$ mg/mL, $t=30$ °C 和流速比为 1:9:10, 所制备 NPs 的粒径大小为 (50.6±1.7) nm, PDI 为 0.196. 与 HA-zein@QT 相比, α -zein@QT 的粒径 [(58.2±0.2)] nm 和 PDI (0.28) 略大 [见本文支持信息图 S2(A)]. 并且 α -zein@QT 在 pH=7.0 时电势为 -0.27 V [见本文支持信息图 S2(B)], 说明颗粒稳定性较差. FTIR 谱图 [见本文支持信息图 S2(C)] 出现了 α -zein 的特征峰 (3413 cm^{-1}), 证明其成功包载.

Table 1 Orthogonal experiment results

Runs	$c(\alpha\text{-zein})/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$t/^\circ\text{C}$	Flow-rate ratio/ $(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	Size/nm	PDI
1	2.5	20	1:3:4	354.8±10.6	0.437
2	2.5	30	1:6:7	214.3±4.5	0.314
3	2.5	40	1:9:10	80.7±1.4	0.247
4	5	30	1:9:10	72.5±9.6	0.214
5	5	40	1:3:4	293.1±5.0	0.437
6	5	20	1:6:7	260.9±29.4	0.389
7	10	40	1:6:7	275.2±18.3	0.356
8	10	20	1:9:10	53.4±7.8	0.18
9	10	30	1:3:4	213.8±16.4	0.416
k1	191.9	231.5	223.0		
k2	206.2	162.2	216.3		
k3	180.8	185.1	139.5		
R	-25.4	-69.3	-83.5		
Optimum	5	30	1:9:10	50.6±1.7	0.196

图 3(A) 为所制备 NPs 的实物图, 采用透射电镜 (TEM) 对其形貌和尺寸进行了表征 [图 3(B)], 发现制备了粒径为 50 nm 的球形 NPs, 具有较高分散性, 无明显团聚现象. 为考察所制备 DDS 的稳定性, 采用粒度仪监测了 HA-zein@QT 的粒径稳定性. 结果表明, 分散在纯化水和 PBS 缓冲液中的粒径均

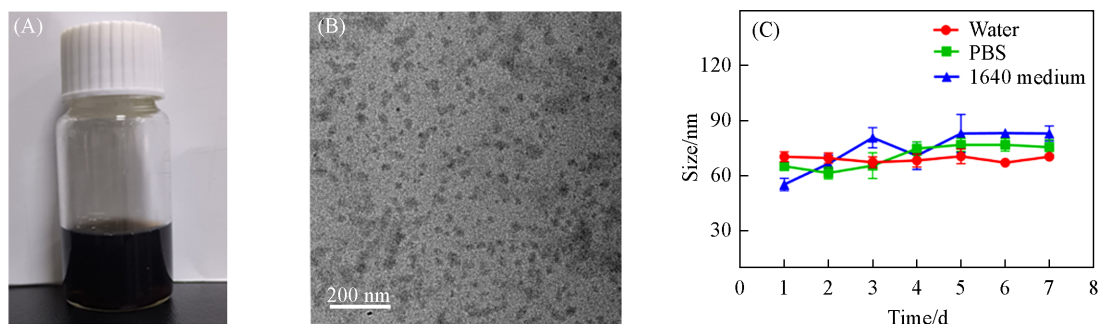


Fig. 3 Digital picture(A) and TEM image(B) of HA-zein@QT, particle size of HA-zein@QT after incubating with water, PBS and 1640 medium(C)

无显著差异,分散在1640培养基中的粒径略大于纯化水中的粒径,但仍然小于100. 这表明HA-zein@QTNPs在生理环境下表现出优异的稳定性[图3(C)]. 采用高效液相(HPLC)检测了TCPP和槲皮素的包封率(EE, %)及载药量(LC, %), 流动相为乙腈/水(体积比1:1), 流速0.5 mL/min, 槲皮素和TCPP的检测波长分别为385和420 nm. 计算公式如下: $EE(\%) = (\text{包封的药物量} / \text{包封与未包封的总药量}) \times 100\%$; $LC(\%) = (\text{纳米颗粒所含药量} / \text{纳米颗粒的总质量}) \times 100\%$. 结果表明, HA-zein@QT中槲皮素和TCPP的包封率分别为91.50%和92.74%, 载药量分别为6.54%和6.62%, 可用于下一步的性能研究.

2.4 HA-zein@QT的理化性能

以DPBF为探针, 检测了HA-zein@QT在NIR(660 nm)照射下的ROS产率(图4). 不同照射时间以及不同溶液中, 吸光度降低的强度间接反映了HA-zein@QT生成ROS的能力. 图4(A)表明, DPBF溶液组峰值随着时间改变并未产生变化, 而HA-zein@QT组经相同方法处理后的DPBF峰值随着时间的延长而变小[图4(B)], 表明有ROS生成. 在pH=7.4的H₂O₂溶液中, 410 nm处峰的吸光度下降更为明显[图4(C)], 尤其是酸性模拟肿瘤微环境(pH=5.0)下, 410 nm处峰的吸光度下降最迅速[图4(D)], 且ROS产率在一定时间内与光照时间呈正相关. 图5(A)示出了HA-zein@QT产生·OH的结果, 实物图表明HA-zein@QT+H₂O₂(pH=5.0)溶液出现明显的显色反应. 这说明HA-zein@QT可将H₂O₂分解为·OH, 将无色TMB氧化成蓝色氧化态. 由图5(A)可见, pH=5.0时混合溶液在650 nm处出现一个强特征吸收峰, 而pH=7.4时吸收峰较弱, 说明HA-zein@QT在pH=5.0环境下产生·OH能力比pH=7.4时强. 因此, HA-zein@QT在模拟肿瘤微环境(强氧化还原和酸性环境)下, 经NIR照射会快速释放¹O₂和·OH, 可增强光动力与化学联合治疗效果.

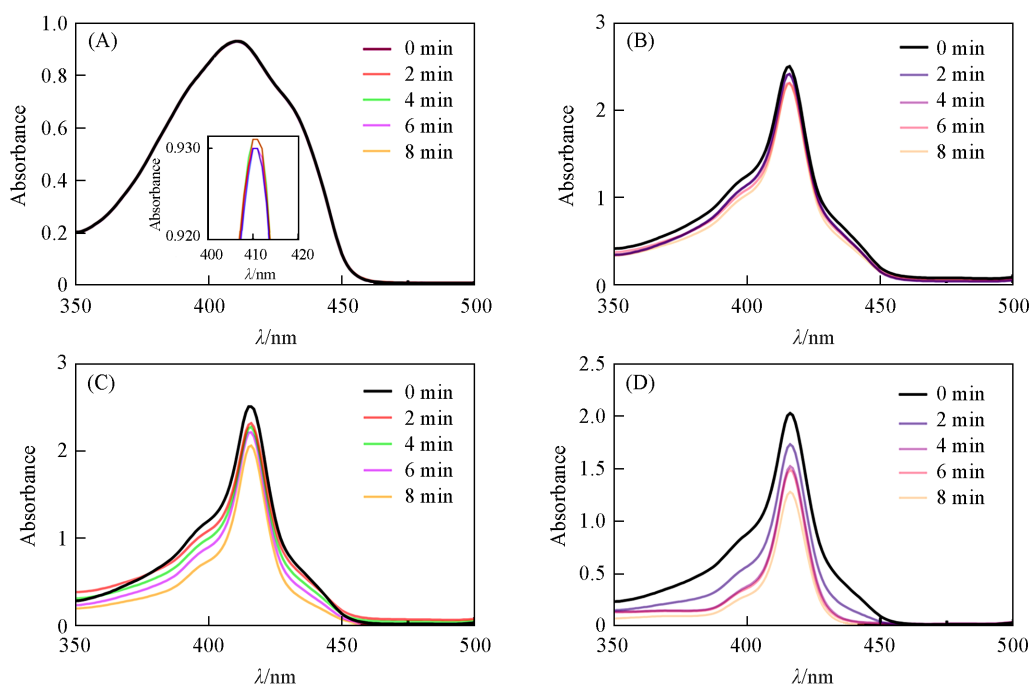


Fig. 4 Absorbance of DPBF over time(A), the absorbance of HA-zein@QT(B), the absorbance of HA-zein@QT in the H₂O₂ solution(pH=7.4)(C) and H₂O₂ solution(pH=5.0)(D)

生物相容性是影响DDS癌症治疗的重要因素, 实验考察了红细胞与HA-zein@QT的血液相容性. 图5(B)结果表明, 共孵育3 h后红细胞均未出现溶血现象, [图5(C)]定量结果表明溶血率均低于5%, 证明HA-zein@QT具有良好的血液相容性. 为评估所制备DDS对非肿瘤细胞的毒性, 采用人结肠NCM460和FHC细胞评估了HA-zein@QT的安全性. 结果表明, 在HA-zein@QT各个浓度范围内, NCM460和FHC细胞的活力范围分别为90.8%~110.1%和84.6%~97.8%[图5(D)~(E)], 均在80%以上. 综上所述, 制备的NPs具有良好的生物相容性.

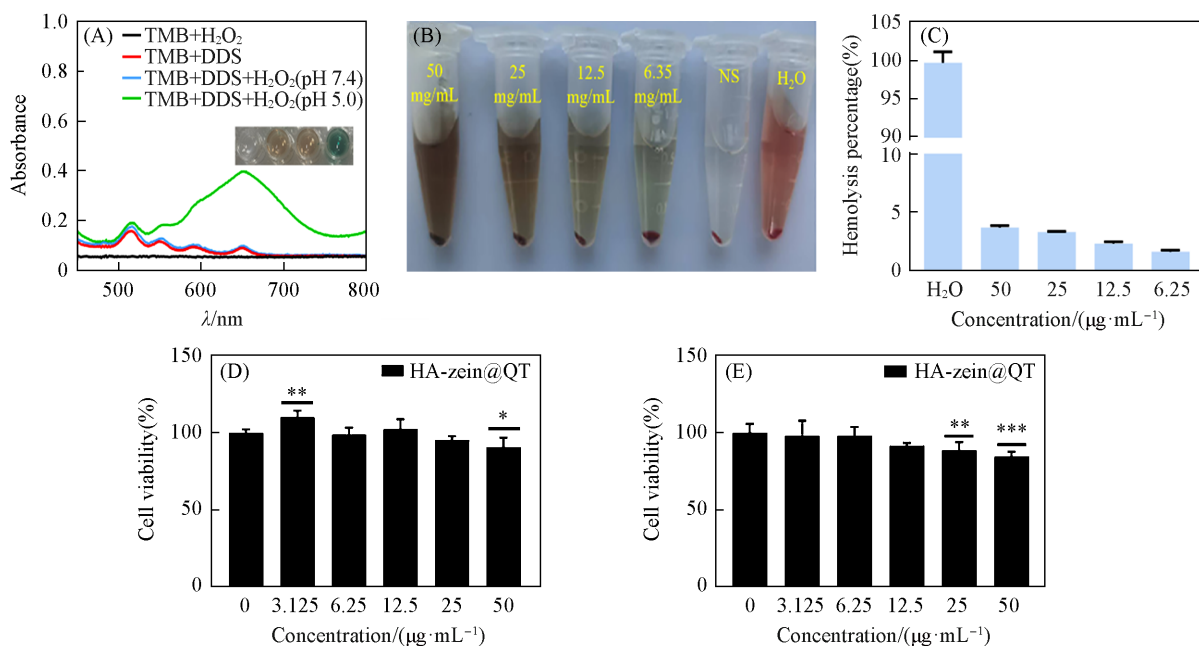


Fig. 5 $\cdot\text{OH}$ production result(A), the solution before and after the reaction, hemocompatibility experiment result(B), hemocompatibility experiment quantitative result(C), NCM460 cell viability result(D), FHC cell viability result(E)

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$, $n=5$, NS: normal saline.

2.5 细胞实验研究

以 HCT116, HCT8 和 A549 为模型细胞, 评估了所制备 DDS 对肿瘤细胞的抑制能力. 结果表明, TCPP (浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$) 与 3 种细胞共孵育 24 h 后, 在无 NIR 照射条件下, HCT116, HCT8 和 A549 细胞存活率分别为 83.5%, 79.0% 和 77.6%, 说明 TCPP 对 3 种细胞类型均未展现出明显的细胞毒性. QT 对 3 种细胞表现出一定的浓度依赖性抗肿瘤效果, 但细胞存活率较高, 这可能是因为低浓度槲皮素发挥的抗肿瘤效果有限. 在 660 nm NIR 照射下, TCPP 经激发后细胞存活率有所降低, 在药物浓度达到 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, HCT116, HCT8 和 A549 细胞的活率分别为 30.0%, 26.0% 和 33.0%. HA-zein@QT 在无 NIR 照射时, 药物浓度达到 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, 3 种细胞存活率分别为 75.5% [图 6(A)], 81.2% [图 6(B)] 和 85.7% [图 6(C)], 表明在无 NIR 照射时 HA-zein@QT 对 3 种肿瘤细胞增殖没有明显的抑制作用. HA-zein@QT 组在 NIR 照射下, 当药物浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, HCT116, HCT8 和 A549 肿瘤细胞的活率分别为 20.2%, 24.6% 和 28.2%, 表现出较强的肿瘤细胞杀伤能力. 综上, 所制备 DDS 在 NIR 照射下产生

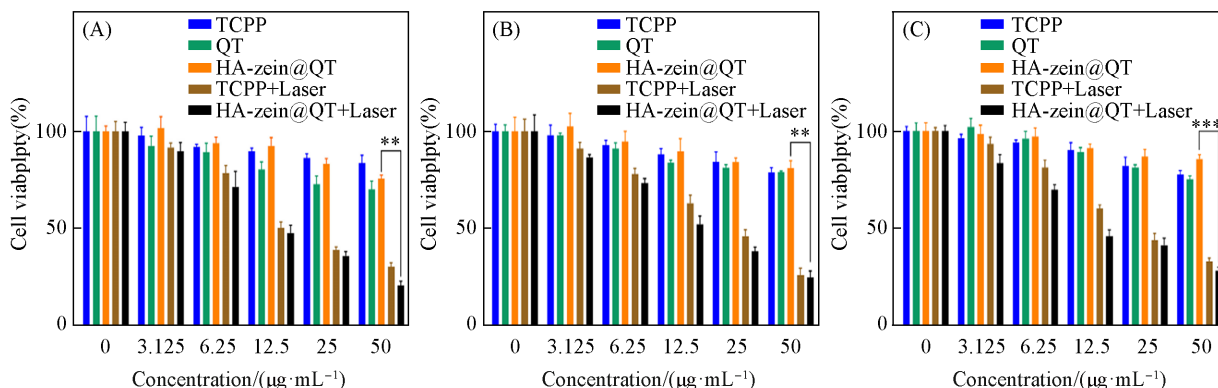


Fig. 6 Result of cells toxicity conducted with different DDS concentrations and different tumor cells, HCT116(A), HCT8(B) and A549(C)

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, $n=5$.

PDT与化疗联合治疗效果, 实现协同增效抗肿瘤的目的.

为考察采用HA功能化zein后DDS的细胞摄取情况, 采用荧光显微镜和流式细胞术考察了HCT116肿瘤细胞对HA-zein@QT的定性和定量摄取. 由[图7(A)]可见, α -zein@QT组细胞的荧光强度较弱, 而HA-zein@QT对HCT116细胞表现出较强的红色荧光信号, 说明HA修饰后可提高DDS的摄取能力. 流式细胞术定量研究结果[图7(C)~(K)]表明, HA-zein@QT的摄取率(89.5%)和荧光强度(1681.67)远高于竞争性抑制组(Competitive inhibition, CI)的摄取率(65.0%)和荧光强度(269.33), 进一步说明其具有较高的细胞摄取能力. 综上所述, HA-zein@QT通过HA功能化zein从而具备更强的细胞摄取能力, 有利于提高肿瘤细胞治疗效果.

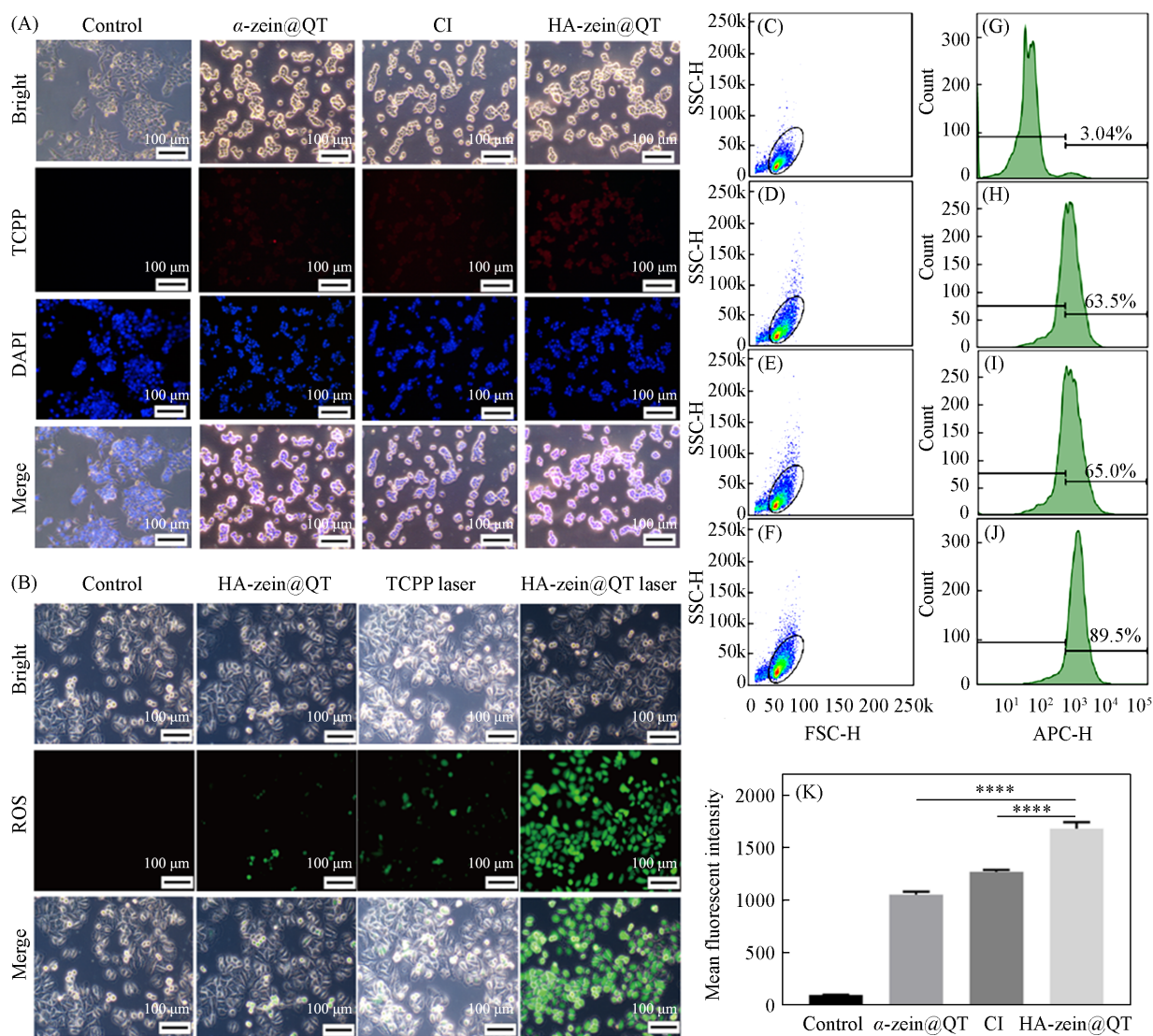


Fig. 7 HCT116 cells uptake result of HA-zein@QT(A), ROS levels of HCT116 cells(B), flow cytometry quantitative analysis of HA-zein@QT in HCT116 cells(C—J), control(C, G), α -zein(D, H), CI(E, I), HA-zein@QT(F, J), and flow cytometry fluorescence intensity(K)

以DCFH-DA为荧光探针, 在细胞水平上检测了所制备DDS的ROS产生能力. 图7(B)结果表明, TCPP处理组的HCT116细胞表现出较弱绿色荧光, 而HA-zein@QT处理组的HCT116细胞则表现出更强绿色荧光信号. 这表明在NIR照射下, HA的靶向摄取作用致使HA-zein@QT在HCT116细胞中产生了大量ROS. 此外, 肿瘤微环境触发HA-zein@QT分解后可产生 $\cdot\text{OH}$ [图5(A)], 可进一步增强抗肿瘤效果. 综上所述, HA-zein@QT是一种生物相容性高, 可产生ROS和 $\cdot\text{OH}$ 的DDS, HA的靶向作用可进一步增强其光动力和化学治疗效果.

3 结 论

采用微流控技术调控槲皮素(化学药物)-TCPP(光敏剂)与 HA-zein 的共组装过程,精准构建了 HA-zein@QT 纳米药物递送系统.采用 HA 功能化 α -zein,显著提高了 DDS 的生物相容性、稳定性和细胞摄取能力. HA-zein@QT 具有良好的血液相容性,对非肿瘤细胞的抑制率小,可确保其药物递送过程的安全性和有效性.体外 ROS 检测结果表明, NIR 可使 $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 生成量增大,有利于杀伤肿瘤细胞.在 NIR 照射条件下, HA-zein@QT 可显著抑制 A549, HCT116 和 HCT8 细胞的增殖,从而达到治疗效果.摄取实验结果表明, HA-zein@QT 可通过 HA 功能化 zein 增加 HCT116 细胞对 DDS 的摄取,以达到更高的肿瘤抑制率.本文基于微流控技术精准构建了 HA-zein@QT,可有效杀伤肿瘤细胞,表现出优异的化学与 PDT 协同治疗效果,可为抗癌 DDS 的精准构建提供一种有前景的策略.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240480>.

参 考 文 献

- [1] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A., *CA-Cancer J. Clin.*, **2018**, 68(6), 394—424
- [2] Sao W., Lee J. Y., Li F. Y., Ling D. S., *Chem. J. Chinese Universities*, **2020**, 41(11), 2356—2382 (邵伟, Lee Jiyoung, 李方园, 凌代舜. 高等学校化学学报, **2020**, 41(11), 2356—2382)
- [3] Zhang S. W., Wang J., Kong Z. Q., Sun X. X., He Z. G., Sun B. J., Luo C., Sun J., *Biomaterials*, **2022**, 282, 121433
- [4] Mao J. J., Pillai G. G., Andrade C. J., Ligibel J. A., Basu P., Cohen L., Khan I. A., Mustian K. M., Puthiyedath R., Dhiman K. S., Lao L. X., Ghelman R., Guido P. C., Lopez G., Gallego-Perez D. F., Salicrup L. A., *CA-Cancer J. Clin.*, **2022**, 72(2), 144—164
- [5] Karges J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61(5), e202112236
- [6] Liu X. B., Ibarra-Sanchez L. A., Miller M. J., Lee Y. S., *Curr. Res. Food Sci.*, **2022**, 5, 1110—1117
- [7] Yu X. L., Han N., Dong Z. Y., Dang Y. N., Zhang Q., Hu W. J., Wang C. H., Du S. Y., Lu Y., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, 14(38), 42988—43009
- [8] Song J. R., Sun C. X., Gul K., Mata A., Fang Y. P., *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2021**, 20(2), 1120—1149
- [9] Liu G. J., An D. Y., Li J. J., Deng S. M., *Front. Pharmacol.*, **2023**, 14, 1120251
- [10] Wang Y., Zhang C., Xiao M., Ganesan K., Gao F., Liu Q. Q., Ye Z., Sui Y., Zhang F., Wei K. H., Wu Y. B., Wu J. M., Du B., Xu C., Li Y., Li P., Zhang J. M., Chen J. P., *J. Drug Deliv. Sci. Tec.*, **2023**, 79, 103922
- [11] Zhang X. Y., Cheng Y. X., Lin H., Zhang H. L., Zhang W. N., He J. B., *LWT-Food Sci. Technol.*, **2024**, 203, 116376
- [12] Wang Q., Gao Z. L., Zhao K. J., Zhang P. Y., Zhong Q. Z., Yu Q., Zhai S. M., Cui J. W., *Chin. Chem. Lett.*, **2022**, 33(4), 1917—1922
- [13] Liu Y., Yang G. Z., Hui Y., Ranaweera S., Zhao C. X., *Small*, **2022**, 18(36), 2106580
- [14] Ahn J., Ko J., Lee S., Yu J., Kim Y., Jeon N. L., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, 128, 29—53
- [15] Gao Z. J., Mansor M. H., Winder N., Demiral S., MacInnes J., Zhao X. B., Muthana M., *Pharmaceutics*, **2023**, 15(7), 1811
- [16] Fondaj D., Arduino I., Lopodota A. A., Denora N., Iacobazzi R. M., *Pharmaceutics*, **2023**, 15(7), 1953
- [17] Na G. S., Joo J. U., Lee J. Y., Yun Y., Kaang B. K., Yang J. S., Kim K., Kim D. P., *J. Control. Release*, **2024**, 373, 161—171
- [18] Wang Q. M., Tang Y. W., Yang Y. X., Lei L., Lei X. J., Zhao J. C., Zhang Y. H., Li L., Wang Q., Ming J., *Food Hydrocolloid.*, **2022**, 124, 107251
- [19] Shi Y. F., Rong S., Guo T. X., Zhang R. Y., Xu D. X., Han Y. H., Liu F. G., Su J. Q., Xu H. X., Chen S., *Food Chem.*, **2024**, 430, 137110
- [20] Li Y. T., Wan Z. Y., Zhao S. L., Lu H., McClements D. J., Liu X. B., Liu F. G., *Food Hydrocolloid.*, **2024**, 154, 110064
- [21] Zhu J., Li F. X., Wang X. L., Yu J. Y., Wu D. Q., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(16), 13304—13316
- [22] Chen S., Han Y. H., Wang Y. Q., Yang X., Sun C. X., Mao L. K., Gao Y. X., *Food Chem.*, **2019**, 276, 322—332
- [23] Liang X., Cao K. X., Li W., Li X. Q., McClements D. J., Hu K., *Food Res. Int.*, **2021**, 145, 110425
- [24] Chen S., Han Y. H., Jian L., Liao W. Y., Zhang Y. H., Gao Y. X., *Carbohydr. Polym.*, **2020**, 236, 116090
- [25] Müller V., Piai J. F., Fajardo A. R., Fávoro S. L., Rubira A. F., Muniz E. C., *J. Nanomater.*, **2011**, 2011, 928728
- [26] Joye I. J., Davidov-Pardo G., Ludescher R. D., McClements D. J., *Food Chem.*, **2015**, 185, 261—267
- [27] Wang Y. H., Wan Z. L., Yang X. Q., Wang J. M., Guo J., Lin Y., *Food Hydrocolloid.*, **2016**, 54, 40—48

(Ed.: L, V, K)