

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.09.020

◆ 校庆约稿 ◆



余娴

专家简介

余娴(1978-),女,博士,主任药师,硕士研究生导师,重庆医科大学附属第二医院I期临床试验研究室主任。2001年毕业于川北医学院,2009年清华大学协和医学院获博士学位。重庆医科大学附属第二医院优秀青年人才,重庆市药物代谢重点实验室主要学术带头人,国家自然科学基金评审专家。主要从事临床药理研究,具备临床医学、药理学及免疫学等多学科教育背景和研究工作经验。承担我国首个重组亚单位新冠疫苗的I期临床试验,作为PI或SUB-I承担多项创新药物I期临床研究,作为负责人主持2项国家自然科学基金项目,发表学术论文50余篇,其中SCI收录论文10余篇,作为第一发明人获国家授权发明专利1项。

自组装形成的透明质酸-铜-槲皮素配位聚合物纳米粒子对乳腺癌的协同治疗作用

岳瀚勋^{1,2},余娴¹,赵轩¹,雍琴¹

(1.重庆医科大学附属第二医院I期临床试验研究室,重庆400010;2.中国平煤神马医疗集团总医院,河南平顶山467000)

【摘要】目的:探讨自组装形成的具有协同治疗作用的透明质酸-铜-槲皮素配位聚合物纳米粒子(HCQ NP)对乳腺癌的协同治疗作用。**方法:**采用自组装方法合成HCQ NP,并通过透射电镜、动态光散射、红外光谱分析和电感耦合等离子体质谱对其进行表征;采用亚甲基蓝紫外吸收法测定HCQ NP与不同浓度的过氧化氢(H₂O₂)反应生成羟基自由基(·OH)的能力;在模拟肿瘤微环境下,采用CCK-8法分别评价不同浓度的HCQ NP对乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制效果。**结果:**自组装形成的HCQ NP具有形状类似球形、大小均一的特点,并对乳腺癌MDA-MB-231细胞具有显著的协同抑制作用。**结论:**自组装形成的HCQ NP对乳腺癌MDA-MB-231细胞具有协同抑制作用。

【关键词】自组装;透明质酸-铜-槲皮素配位聚合物纳米粒;协同治疗作用;乳腺癌

【中图分类号】R73-36 **【文献标志码】**A

Synergistic therapeutic effect of self-assembled hyaluronic acid-copper-querceetin coordination polymer nanoparticles on breast cancer

YUE Han-xun^{1,2}, YU Xian¹, ZHAO Xuan¹, YONG Qin¹

(1. Clinical Laboratory I, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010; 2. China Pingmei Shenma Medical Group General Hospital, Pingdingshan 467000, Henan, China)

【Abstract】 Objective: To explore the synergistic therapeutic effect of hyaluronic acid-cu-querceetin coordination polymer nanoparticles(HCQ NP) formed by self-assembly and the inhibitory effect on breast cancer. **Methods:** HCQ NP was synthesized by self-assembly method and characterized by transmission electron microscopy, dynamic light scattering, infrared spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry. The methylene blue ultraviolet absorption method was used to determine the ability of HCQ NP to react with different concentrations of hydrogen peroxide(H₂O₂) to generate hydroxyl radicals(·OH). In the simulated tumor microenvironment, the CCK-8 method was used to evaluate the inhibitory effects of different concentrations of HCQ NP on breast cancer MDA-MB-231 cells. **Results:** The self-assembled HCQ NPs had the characteristics of similar spherical shape and uniform size, and had a significant synergistic inhibitory effect on breast cancer MDA-MB-231 cells. **Conclusion:** The self-assembled HCQ NPs have a significant synergistic inhibitory effect on breast cancer MDA-MB-231 cells.

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82072327)

作者简介:岳瀚勋(1991-),男,硕士研究生,初级药师。E-mail:hanxunY@163.com

通讯作者:余娴。E-mail:xiannyu@outlook.com

[Key words] Self-assembly; Hyaluronic acid-copper-quercetin coordination polymer nanoparticles; Synergistic therapeutic effect;

Breast cancer

目前,乳腺癌已取代肺癌成为女性发病率最高的恶性肿瘤^[1]。随着对乳腺癌研究的深入,越来越多的治疗手段被应用于临床,如化疗、免疫治疗、靶向治疗等^[2]。但三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)作为乳腺癌中一种特殊类型,其治疗仍主要为含铂两药联合化疗^[3]。尽管联合化疗已明显提高疗效和降低不良反应,但由于药物本身毒性大和治疗缺乏靶向性,导致其不良反应仍较多且难以耐受^[4-6]。克服这些问题的有效方法之一就是选择毒性低的药物并将其封装于具有靶向作用的纳米载体中形成纳米药物。槲皮素是一种黄酮类天然化合物,广泛存在于日常饮食中,具有显著抗肿瘤作用和良好的安全性^[7]。但槲皮素有口服生物利用度低、水溶性差、代谢迅速及易被酶降解等缺点,限制了其临床应用。对槲皮素进行改性是解决上述问题的有效方法,包括形成金属配合物^[8]。铜离子是一种能与槲皮素发生配位作用的副族金属,研究^[9]表明,槲皮素-铜配合物具有明确的抗肿瘤作用。此外,铜离子也可通过触发类芬顿反应将肿瘤微环境中过量产生的低毒性过氧化氢(H_2O_2)转化成更具细胞毒性的羟基自由基($\cdot OH$)来达到协同抗肿瘤作用^[10]。低分子量透明质酸作为一种高效的肿瘤靶向递送载体,其优越性主要体现在具有良好的生物相容性、生物可降解性和特殊的 CD44 受体结合能力^[11]。在生理条件或适当 pH 环境下通过透明质酸分子中糖醛酸的羧基充分解离,然后与铜离子形成离子对,可使槲皮素-铜配合物靶向高表达 CD44 受体的肿瘤细胞。本研究拟将槲皮素作为化学治疗剂和自载材料,铜离子作为连接点和类芬顿反应试剂,透明质酸作为靶向递送载体,利用上述材料自组装形成配位聚合物纳米粒的方法开发一种具有多功能的透明质酸-铜-槲皮素配位聚合物纳米粒(hyaluronic acid-cu-quercetin coordination polymer nanoparticles, HCQ NP)并阐明其体外抗三阴人乳腺癌的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

槲皮素(Sigma-Aldrich 公司),氯化铜(梯希爱(上海)化成工业发展有限公司),透明质酸(Lifecore Co. (Chaska, MN)), Tris-HCl 8.8(上海碧云天生物技术有限公司),二甲基亚砜(DMSO, 重庆塞米克),亚甲蓝(上海碧云天生物技术有限公司), CCK-8 细胞计数试剂(MCE 公司),RPMI-1640 培养

基、胎牛血清、胰酶细胞消化液(重庆塞米克),三阴人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 来自于重庆市生物化学与分子药理学重点实验室。人正常肝组织细胞 LO2 细胞来自于厦门大学。

1.2 方法

1.2.1 HCQ NP 的合成及表征 HCQ NP 的合成采用自组装方法,具体如下:吸取 1 mL 透明质酸溶液(10 mg/mL)和 150 μL 氯化铜溶液(5 mg/mL)于反应瓶中,并将其置于磁力搅拌器上以 500 rpm 搅拌反应 4 min;然后吸取 150 μL Tris-HCl 8.8 溶液加入反应瓶中反应 4 min,以促进透明质酸与铜离子充分反应;吸取 125 μL 槲皮素溶液(20 mg/mL)逐滴加入到反应瓶中反应 4 h;最后将上述反应液透析 24 h 并于室温下保存备用。将 HCQ NP 样品和经过硝化和干燥处理的样品分别进行透射电镜、动态光散射、电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma massspectrometry, ICP-MS)和红外光谱(fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)检测,测定 HCQ NP 的形态、粒径、样品中铜离子的含量及纳米粒的结构。

1.2.2 HCQ NP 生成羟基自由基能力的检测 采用亚甲蓝光度法。设置 HCQ NP 组(HCQ);HCQ NP + 1nM H_2O_2 组[HCQ + H_2O_2 (1nM)];HCQ NP + 2nM H_2O_2 组[HCQ + H_2O_2 (2nM)];HCQ NP + 4nM H_2O_2 组[HCQ + H_2O_2 (4nM)],亚甲蓝溶液组(methylene blue, MB)为空白对照。将上述各组与亚甲蓝溶液放置于 37 $^{\circ}C$ 避光条件下孵育 30 min;使用紫外可见分光光度计依次测量各组亚甲蓝在波长 666 nm 处的吸光度。

1.2.3 HCQ NP 的抗乳腺癌作用检测 采用 CCK-8 法。设置 5 μL HCQ NPs 组(HCQ)和 5 μL HCQ NP + 50 μM H_2O_2 组(HCQ + H_2O_2);10 μL HCQ NPs 组(HCQ)和 10 μL HCQ NP + 50 μM H_2O_2 组(HCQ + H_2O_2);15 μL HCQ NPs 组(HCQ)和 15 μL HCQ NP + 50 μM H_2O_2 组(HCQ + H_2O_2);20 μL HCQ NPs 组(HCQ)和 20 μL HCQ NP + 50 μM H_2O_2 组(HCQ + H_2O_2),PBS 组为空白对照组;MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板(3×10^3 /孔)中,加入正常培养基贴壁 24 h 后,吸出原有培养基,各组分别加入正常培养基(含 89% RPMI-1640,10% 胎牛血清,1% 双抗)及各组相应处理因素;置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 条件下的孵箱中培养 48 h;将各组培养基弃去,加入含有 10% CCK-8 试剂的培养基,培养 3 h 后用酶标仪在 450 nm 下检测各组吸光度。

1.2.4 HCQ NP 的生物相容性检测 采用 CCK-8 法。设置 5 μL HCQ NPs 组(HCQ);10 μL HCQ NPs 组(HCQ);15 μL HCQ NPs 组(HCQ);20 μL HCQ NPs 组(HCQ),PBS 组为空白对照组;LO2 细胞接种于 96 孔板(3×10^3 /孔)中,加入正常培养基贴壁 24 h 后,吸出原有培养基,各组分别加入正常培养基(含 89% RPMI-1640,10% 胎牛血清,1% 双抗)及各组相应处理因素;置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下的孵箱中培养 48 h;将各组培养基弃去,加入含有 10% CCK-8 试剂的培养基,培养 3 h 后用酶标仪在 450 nm 下检测各组吸光度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCQ NP 的表征

透射电镜观察显示,HCQ NP 的形状类似球形,大小均一。通过动态光散射检测的粒径结果比透射电镜的大,主要原因是动态光散射检测的是纳米粒的水合粒径。HCQ NP 经硝化处理通过 ICP-MS 测得铜离子浓度为 6.663 mg/L,根据硝化处理时的稀释比例计算得合成的 HCQ NP 样品中铜离子浓度为 133.262 mg/L。将经干燥处理后得到的 HCQ NP 粉末进行红外检测,通过对比发现 HCQ NP 的红外吸收光谱上存在槲皮素及透明质酸的特征吸收峰,但有部分偏移,槲皮素中羰基($\text{C}=\text{O}$)的振动频率位于 1661 cm^{-1} ,制备成纳米粒后 $\text{C}=\text{O}$ 向低波数方向发生位移,表明槲皮素羰基参与了配位作用。相比于槲皮素振动频率位于 1308 cm^{-1} 的 $\text{C}-\text{OH}$ ($\text{C}-3$ 位),纳米粒中消失,表明该结构也参与了与铜离子的配位^[12]。见图 1、图 2 及表 1。

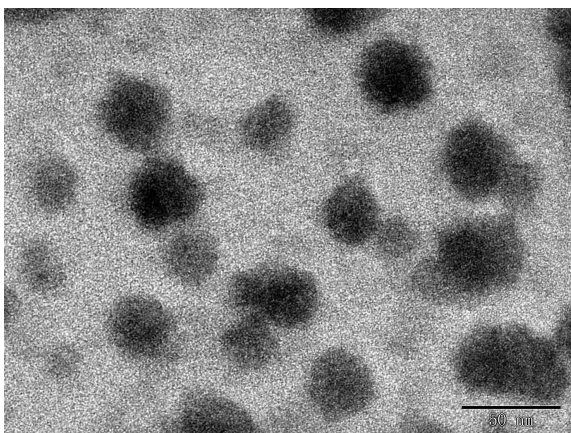


图 1 HCQ NP 电镜透射

表 1 HCQ NP 的粒径和 zeta 电位径($\bar{x} \pm s$)

	Size	Zeta
HCQ NP	(78.62 \pm 1.60) nm	(-7.29 \pm 0.73) mV

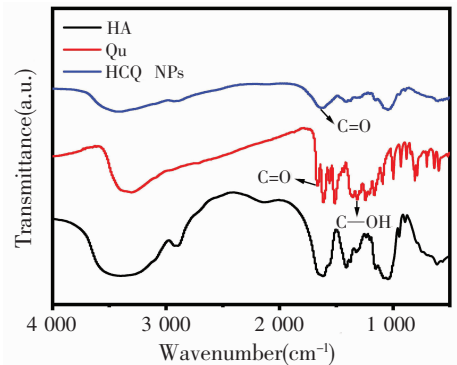


图 2 HCQ NP 的 FT-IR 结果

2.2 HCQ NP 生成羟基自由基的能力

检测 HCQ NP 生成羟基自由基能力,结果显示相对于对照组和 HCQ NP 组,HCQ NP + H_2O_2 组更能生成羟基自由基,导致 MB 吸光度下降,且随着 H_2O_2 浓度的提高,MB 的吸光度也降低($P < 0.05$)。见图 3。

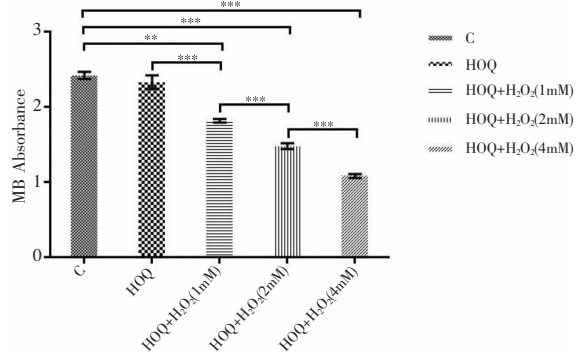


图 3 HCQ NP 的羟基自由基生成能力($n=3$)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.3 HCQ NP 的协同抗肿瘤作用

HCQ 组和 HCQ + H_2O_2 组对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用强于对照组($P < 0.05$),HCQ + H_2O_2 组强于 HCQ 组($P < 0.05$),且随着剂量的增大,抑制作用也随之加强。见图 4。

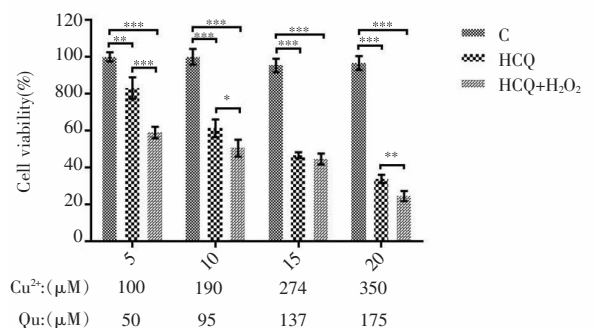


图 4 HCQ NP 的协同抗肿瘤作用($n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.4 HCQ NP 的生物相容性

相对于对照组, HCQ 组在不同剂量下均未对 LO2 细胞产生明显的影响 ($P > 0.05$)。见图 5。

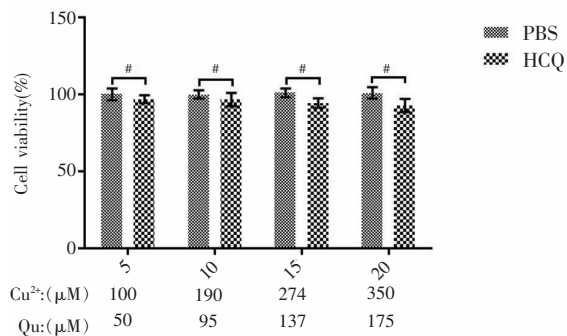


图 5 HCQ NP 的生物相容性 ($n=3$)
$P > 0.05$ 。

3 讨论

TNBC 作为乳腺癌中一种特殊类型, 具有高侵袭和高转移的特性, 是目前乳腺癌中预后最差的一种亚型。由于内分泌治疗和针对 HER-2 的靶向治疗对 TNBC 无效, 至今对 TNBC 仍缺乏令人满意的综合治疗方案^[13]。槲皮素作为天然化合物的代表, 具有良好的安全性和广泛的抗癌谱, 能够通过改变细胞周期进程、抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、抑制血管生成等多种途径发挥抗肿瘤作用^[7]。研究^[14]表明, 槲皮素对 TNBC 包括其代表细胞 MDA-MB-231 有良好的抑制作用。化学动力学疗法是一种新兴的抗肿瘤疗法, 具有无创、高效等特点, 通过芬顿或类芬顿反应, 将肿瘤微环境中过量产生的 H_2O_2 转化为更具细胞毒性的羟基自由基, 从而达到抗肿瘤作用^[15-18]。但由于槲皮素存在水溶性差、酶降解等问题影响临床应用, 所以需要对其进行改性。形成金属配合物是改性方法之一^[8], 不仅克服了临床应用限制问题, 还引入了铜离子, 从而引入了化学动力学疗法, 使其具有协同抗乳腺癌作用。

本实验成功制备了 HCQ NP (图 1、表 1 及图 2)。随后亚甲蓝吸光度实验表明, 只有在 H_2O_2 存在的情况下, HCQ NP 才能产生羟基自由基, 从而使亚甲蓝的吸光度降低, 而且 H_2O_2 浓度越高, 产生羟基自由基的能力越强 (图 3), 提示在肿瘤微环境下 (与正常组织相比, 具有高浓度 H_2O_2 的特点), 可望通过化学动力学疗法发挥抗肿瘤作用。TNBC 具有易复发的特点, 所以需要联合疗法以求最大程度的杀灭癌细胞。肿瘤微环境相比于正常组织具有高浓度 H_2O_2 ^[19], 本实验证实 (图 4) 在模拟肿瘤微环境下, 即 HCQ + H_2O_2 组具有更显著的抗肿瘤作用。出现这种结果的原因是在没有 H_2O_2 存在的情况

下, HCQ NP 发挥抗乳腺癌作用依靠的是槲皮素的作用; 而在模拟肿瘤微环境下, 即 H_2O_2 存在的情况下, HCQ NP 除了具有槲皮素的抗乳腺癌作用外, 还具有铜离子通过触发类芬顿反应而发挥的化学动力学抗乳腺癌作用。此外由于纳米粒通常会在肝脾等血流丰富的器官蓄积造成严重的不良反应^[20], 所以在研究中我们选择了人正常肝组织细胞 LO2 来验证 HCQ NP 的生物相容性, 而实验表明 HCQ NP 未对正常细胞产生明显的影响 (图 5), 说明 HCQ NP 生物相容性良好。

综上, 本研究中槲皮素作为化学治疗剂和自载材料、铜离子作为连接点和类芬顿反应试剂、透明质酸作为靶向递送载体自组装形成的 HCQ NP, 具有明确的化学治疗与化学动力学治疗协同的抗三阴乳腺癌作用, 且具有良好的生物相容性。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 黎立喜, 翟婧彤, 马飞. 2019 年乳腺癌治疗新进展[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2020, 6(1): 63-69.
- [3] 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会. 中国晚期乳腺癌规范诊疗指南 (2020 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(10): 781-797.
- [4] Zhang RX, Wong HL, Xue HY, et al. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy - Strategies and perspectives [J]. J Control Release, 2016, 240: 489-503.
- [5] Zatloukal P, Petruzelka L, Zemanová M, et al. Gemcitabine plus cisplatin vs. gemcitabine plus carboplatin in stage IIIb and IV non-small cell lung cancer: a phase III randomized trial [J]. Lung Cancer, 2003, 41(3): 321-331.
- [6] Tyagi AK, Agarwal C, Daniel CF, et al. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells [J]. Oncol Rep, 2004, 11(2): 493-499.
- [7] Kim SH, Yoo ES, Woo JS, et al. Antitumor and apoptotic effects of quercetin on human melanoma cells involving JNK/P38 MAPK signaling activation [J]. Eur. J. Pharmacol, 2019, 860(5): 172568.
- [8] Lee YH, Tuyet PT. Synthesis and biological evaluation of quercetin-zinc (II) complex for anti-cancer and anti-metastasis of human bladder cancer cells [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2019, 55(6): 395-404.
- [9] Tan J, Wang B, Zhu L. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper (II) complex: potential mechanism of its antitumor properties [J]. Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, 2009, 14(5): 727-739.
- [10] Liu CH, Wang DD, Zhang SY, et al. Biodegradable Biomimic Copper/Manganese Silicate Nanospheres for Chemodynamic/Photody-

- namic Synergistic Therapy with Simultaneous Glutathione Depletion and Hypoxia Relief[J]. ACS Nano, 2019, 13(4): 4267 - 4277.
- [11] Marlène R, Vanina C, Auzély-Velty R. Design of Soft Nanocarriers Combining Hyaluronic Acid with Another Functional Polymer for Cancer Therapy and Other Biomedical Applications[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(7): 338.
- [12] 尹文萱, 王兴涌, 王建怀, 等. 芦丁和槲皮素及其金属配合物的 FTIR 研究[J]. 中国矿业大学学报, 2009, 38(6): 884 - 888.
- [13] 许人元, 王晓东. 三阴性乳腺癌的治疗进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2020(8): 1033 - 1037.
- [14] 孙怡, 顾君. 槲皮素抑制乳腺癌细胞迁移侵袭及分子机制研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1144 - 1150.
- [15] Li CY, Wang Y, Du YL, *et al.* Side effects-avoided theranostics achieved by biodegradable magnetic silica-sealed mesoporous polymer-drug with ultralow leakage[J]. Biomaterials, 2018, 186(5): 1 - 7.
- [16] Gu ZJ, Zhu S, Yan L, *et al.* Graphene-Based Smart Platforms for Combined Cancer Therapy [J]. Adv Mater, 2019, 31(9): 1800662.
- [17] Lin LS, Song JB, Song L, *et al.* Simultaneous Fenton-like Ion Delivery and Glutathione Depletion by MnO₂-Based Nanoagent to Enhance Chemodynamic Therapy [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, 57(18): 4902 - 4906.
- [18] Zhong L, Wang L, Xu L, *et al.* The role of NOS-mediated ROS accumulation in an early phase Cu-induced acute cytotoxicity in MCF-7 cells[J]. Biometals, 2015, 28(1): 113 - 122.
- [19] Tang ZM, Zhang HL, Liu YY, *et al.* Antiferromagnetic Pyrite as the Tumor Microenvironment-Mediated Nanoplatfor for Self-Enhanced Tumor Imaging and Therapy[J]. Adv Mater, 2017, 29(47), Doi: 10.1002/adma.201701683.
- [20] 张乐帅. 肝微组织用于纳米材料安全性评价的探索[C]. 中国毒理学会第九次全国毒理学大会.