

文章编号: 1006-3080(2026)02-0176-09

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250512001

多肽修饰牛血清白蛋白递送体系构建及其肝癌细胞 靶向诊疗研究

张智宁, 王辰瀚, 胡习乐, 贺晓鹏

(华东理工大学结构可控先进功能材料及其制备教育部重点实验室, 费林加诺贝尔奖
科学家联合研究中心, 上海 200237)

摘要: 肝癌(HCC)在我国发病率较高且往往难以在早期发现, 发展可特异性靶向示踪 HCC 细胞的诊断试剂有助于癌症的早期诊治。本文发展了一类新型磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)靶向诊疗生物材料, 利用牛血清白蛋白(BSA)为载体, 通过简易的马来酰亚胺与蛋白质半胱氨酸残基进行 Michael 加成反应, 在蛋白载体上修饰可靶向 GPC3 的多肽, 进而通过主体自组装将具有荧光性质和光动力治疗性能的二氢卟吩 e6(Ce6)负载于多肽修饰的 BSA 蛋白中, 以构建形成 HCC 特异靶向性的诊疗生物材料。研究表明, 该诊疗材料对 GPC3 高表达 HepG2 细胞的荧光强度显著强于低表达细胞($p < 0.001$), 且在 630 nm 光照下, 生物材料处理的 HepG2 细胞存活率显著低于对照组人肝癌细胞($p < 0.05$), 证实了生物材料的靶向诊疗效果。本文研究工作为 HCC 细胞的早期诊治提供了一类全新的靶向递送材料。

关键词: 肝癌; GPC3; 牛血清白蛋白; 靶向递送; 荧光成像

中图分类号: O69

文献标志码: A

肝癌(HCC)是全球第六大常见恶性肿瘤及第三大癌症相关死亡病因, 其预后高度依赖早期诊断与干预^[1]。早期 HCC(直径 < 3 cm)患者 5 年生存率可达 60%~70%, 而进展至晚期则骤降至 5%~10%^[2], 这一生存鸿沟与现有诊断技术的局限性直接相关, 由于传统影像学手段(超声、CT)对直径 < 2 cm 病灶的敏感性和特异性分别不足 50% 和 70%^[3], 且难以鉴别肝硬化结节与恶性病变, 更无法捕捉肿瘤微环境中唾液酸聚糖异常过表达^[4](如 Siglec 配体介导的免疫逃逸)等关键分子事件, 导致生物学行为评估与靶向治疗响应预测受阻(如索拉非尼治疗响应率 $< 30%$)。尽管手术切除是早期 HCC 的首选疗法^[5], 但多数患者确诊时已失去手术机会^[6], 而放疗、化疗、嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)细胞疗法及免疫检查点抑制剂^[7]等新兴治疗手段仍面临靶向性不足^[8-9]、脱毒效应显著^[10-11]等问题, 其根源在于 HCC 的高度异质性

及缺乏特异性主动靶向策略, 最终导致患者 5 年总生存率徘徊于低位^[12]。突破该困境需整合分子影像材料与精准递送系统, 以实现病灶早期识别和靶向治疗协同增效。

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)是一种在肝癌组织中高度保守的膜结合型氨基葡萄糖聚糖^[13]。GPC3 作为 HCC 特异性标志物^[14-15], 在 80% 以上的 HCC 组织中高表达, 其灵敏度和特异性分别达到 70%~94% 和 86%~100%^[16], 成为当前 HCC 精准诊疗的核心靶点^[17-19]。在治疗领域, 靶向 GPC3 的策略已从单一药物向多元化技术体系发展^[20-24]。在免疫治疗技术研究中, CAR-T 细胞疗法(如 CT011)在 II 期临床试验中展现出显著疗效^[25], 缓解率达 56.5%, 联合局部消融治疗可实现长期无病生存。同时, 发展双特异性抗体(如 CD3 和 GPC3 双抗 ERY974)激活 T 细胞或阻断免疫抑制信号(如 CD47)的策略也被证实

收稿日期: 2025-05-12

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划集成项目(92253306)

作者简介: 张智宁(1999—), 女, 山西运城人, 硕士生, 主要研究方向为化学生物学。E-mail: znzhang99@163.com

通信联系人: 贺晓鹏, E-mail: xphe@ecust.edu.cn

引用本文: 张智宁, 王辰瀚, 胡习乐, 等. 多肽修饰牛血清白蛋白递送体系构建及其肝癌细胞靶向诊疗研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2026, 52(2): 176-184.

Citation: ZHANG Zhining, WANG Chenhan, HU Xile, *et al.* Construction of Peptide-Modified Bovine Serum Albumin Delivery System for the Targeted Diagnosis and Treatment of Liver Cancer Cells[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(2): 176-184.

可增强抗肿瘤效应^[26]。据 Insight 数据库显示,全球近5年关于 GPC3 靶向的抗体药物偶联物(ADC)仅有2款进入临床阶段,如 MRG006A 进入 I 期临床^[27],通过靶向递送细胞毒性药物,在临床前模型中表现出剂量依赖性抑瘤活性。影像诊断技术同步研究中,基于 GPC3 的荧光材料已用于循环肿瘤细胞检测,钆塞酸二钠增强磁共振成像(MRI)联合影像组学分析^[28]可术前预测 GPC3 表达状态,而免疫组化(IHC)^[29-30]与血清 GPC3 检测^[31-32]仍是病理诊断和预后评估的重要手段。尽管现有技术靶向递送效率、毒性管理及肿瘤异质性响应等方面仍存在挑战,但未来通过新型纳米载体开发、多模态影像融合及个体化联合治疗策略, GPC3 靶向诊疗有望成为 HCC 精准医疗的关键研究方向。

牛血清白蛋白(BSA)具有良好的生物相容性且与人血清白蛋白(HSA)结构高度同源^[33], BSA 分子表面分布多个赖氨酸残基及唯一的游离半胱氨酸残基(Cys-34),其内部疏水空腔可容纳小分子药物,是一类理想、可灵活修饰的药物递送载体。本研究通过简便的巯基-马来酰亚胺(Mal)点击化学反应(Michael 加成反应),将马来酰亚胺基团修饰的 GPC3 靶向多肽 Mal-KKK-LH1 以物质的量之比 1:1 偶联至 BSA 表面,从而赋予 BSA 肝癌细胞靶向性。进一步地,通过主客体自组装,将光敏剂二氢卟吩 e6(Ce6)负载于 BSA 的疏水空腔,构建了具有 GPC3 靶向荧光成像及光动力治疗功能一体化的递送材料。通过细胞荧光成像、RNA 干扰、竞争结合实验及细胞毒性测试等系列生物学实验评价,验证了材料对 GPC3 高表达肝癌细胞的特异性靶向荧光成像与光动力治疗性能,为肝癌细胞精准诊治提供了有效工具。本研究创新性地利用 BSA 天然结构特性实现靶向肽偶联与光敏剂负载的协同设计,构建了兼具高生物相容性与靶向特异性的诊疗一体化应用平台,为基于 BSA 作为载体的抗肿瘤药物递送系统开发提供了新思路。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

pH=7.4 的磷酸缓冲溶液(PBS),塞维尔生物科技有限公司; Ce6, $w = 90\%$, 上海毕得医药科技股份有限公司; 氢氧化钠, $w = 98\%$, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 盐酸, $w = 36\% \sim 38\%$, 国药集团化学试剂有限公司; BSA, $w = 96\%$, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 二甲基亚砜(DMSO), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; MD34 透析袋和透析夹, 上海得

茜生物有限公司; 高糖 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养基, 上海源培生物科技股份有限公司; Cell Counting Kit-8 试剂盒, 上海碧云天生物科技股份有限公司; Lipo8000 转染试剂, 上海碧云天生物科技股份有限公司; RIPA(Radio-Immunoprecipitation Assay)裂解液, 上海碧云天生物科技股份有限公司; 胎牛血清(FBS), 赛默飞世尔科技公司; Trizol 试剂, 赛默飞世尔科技公司; 逆转录试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; SYBR 绿色荧光染料(SYBR GREEN), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

本实验所用的 Mal-KKK-LH1 的合成委托上海吉尔多肽有限公司定制。多肽采用固相 Fmoc 法构建,经高效液相色谱法(HPLC)纯化(纯度>95%)及液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术验证分子量一致性(误差<0.1%)。

1.2 测试与表征

紫外-可见分光光度计, UV-2450 型, 安捷伦科技(中国)有限公司; 荧光分光光度计, Cary Eclipse 型, 安捷伦科技(中国)有限公司; 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪, Ultrafle Xtreme 型, 布鲁克(北京)科技有限公司; 漩涡混匀器, VM-T1 型, 上海泰坦科技股份有限公司; 电子天平, ME104E 型, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 磁力搅拌器, IKA C-MAG-HS7 型, 艾卡(广州)仪器设备有限公司; 多功能酶标仪, Synergy2 型, 伯腾仪器(上海)有限公司; 单光子共聚焦显微镜, Leica TCS SP8 型, 徕卡显微系统(上海)贸易有限公司; 实时荧光定量 PCR(聚合酶链式反应)仪, LightCycler® 480 II 型, 罗氏集团; 电泳仪, PowerPac HC (164-5052) 型, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 转膜仪, VE-586 型, 上海天能科技有限公司; 荧光扫描仪, Odyssey 型, LI-COR 生物技术公司。

1.3 实验步骤

1.3.1 LH1-BSA 及其 Ce6 复合物构建 LH1-BSA 靶向递送材料构建示意图如图 1 所示。将 Mal-KKK-LH1 及 BSA 分别用无菌、pH = 7.4 的 PBS 溶解, 配制成质量浓度分别为 5、10 mg/mL 的溶液, 避光条件下按 $n(\text{BSA})/n(\text{Mal-KKK-LH1}) = 1.0/1.5$ 混合, 调节 BSA 终质量浓度至 1 mg/mL, 于室温下温和搅拌 8 h, 通过巯基-马来酰亚胺之间的共价偶联获得 LH1-BSA。随后将光敏剂 Ce6(10 mmol/L DMSO 母液)按 $n(\text{BSA}) : n(\text{Ce6}) = 1 : 5$ 加入, 室温下避光搅拌 6 h 实现光敏剂负载。进而, 负载光敏剂的递送材料经透析袋(10 kDa)透析 12 h(每 3 h 更换一次), 去除游离小分子及未偶联多肽, 获得粒径均一的 LH1-BSA@Ce6 复合物。按上述相同实验步骤制备未修

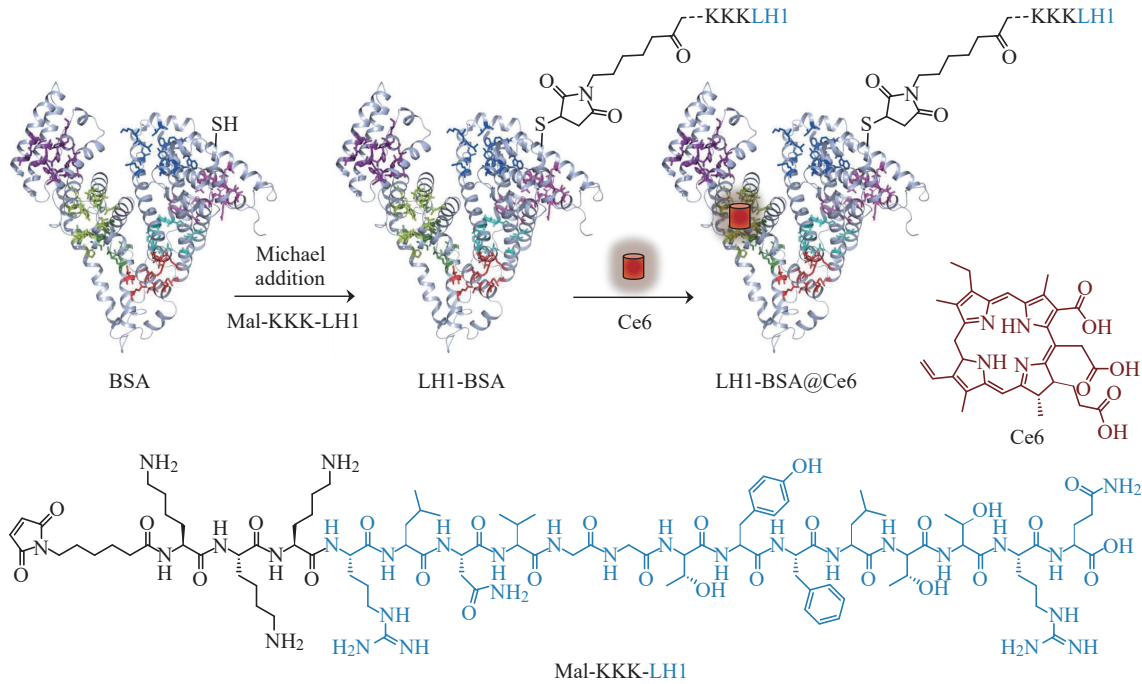


图 1 LH1-BSA 靶向递送材料构建示意图及多肽与光敏剂 Ce6 化学结构

Fig. 1 Schematic illustration of the construction of the delivery material LH1-BSA and chemical structures of the peptide ligand and photosensitizer Ce6

饰 BSA 负载 Ce6 体系作为对照材料。组装过程中全程避光且维持无菌操作。

1.3.2 Mal-KKK-LH1 与 BSA 偶联物质谱表征 质谱表征前,对 LH1-BSA 进行脱盐处理以满足检测要求:将透析纯化后的样品经超纯水置换 3 次以去除残留盐分,随后取 100 μL 溶液分装至离心管,并迅速转移至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂存。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析 LH1-BSA 分子量,通过对比偶联前后分子量变化(BSA 单体约 66.5 kDa,偶联多肽后理论增量约 2.2 kDa),定量评估靶向多肽与 HSA 的共价结合效率。样品全程维持低温,避免蛋白降解影响检测准确性。

1.3.3 LH1-BSA@Ce6 紫外吸收及荧光发射表征 将 PBS(pH = 7.4)配制的 Ce6 稀释溶液(10 $\mu\text{mol/L}$)与等浓度的 BSA@Ce6、LH1-BSA@Ce6 复合物进行平行测试,采用紫外-可见分光光度计与荧光分光光度计在相同测试条件下记录两者的光谱特性。紫外光谱使用 200~800 nm 全波长扫描,得到吸收曲线。荧光光谱使用 10 mm 石英比色皿盛装待测溶液。荧光分光光度计的仪器参数为:激发光波长 405 nm,狭缝宽度 5 nm,温度 25 $^{\circ}\text{C}$,发射波长范围 450~800 nm。

1.3.4 细胞培养及转染 使用两株人肝细胞癌细胞 HepG2 与 MHCC97-H,培养于含 5% CO_2 和 95% 空气(均为体积分数)的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,均使用高糖 DMEM 培养基外加 10%FBS 和 1% 三抗(均为体积

分数)。使用无菌焦碳酸二乙酯(DEPC)水重悬靶向人源 GPC3 的 siRNA(5'-CCAGUGGUCAGUCAAAU ATT-3')以及阴性对照 siRNA(5'-UUCUCCGAACGUG UCACGUTT-3')至其终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。吸取 125 μL 无血清培养基及 5 μL siRNA(100 pmol)置于 1.5 mL 离心管中,随后加入 4 μL Lipo8000 转染试剂吹打混匀,室温放置 15 min,均匀滴加至 6 孔板的对应孔中,轻轻摇晃混匀,分别培养 24、48 h 后,收集细胞样本用于实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)与蛋白质印迹(Western Blot(WB))实验。

1.3.5 RT-qPCR 向 6 孔板中加入 1 mL Trizol 试剂,反复多次吹打细胞至黏稠状消失,将其转移至 1.5 mL 离心管中,并加入 200 μL 氯仿,颠倒混匀后静置 5 min。随后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中以 12000 r/min 转速离心 15 min,小心吸取上层液体,并转移至新的离心管中。将 300 μL 异丙醇加入离心管中,混匀后静置 10 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中以 12000 r/min 转速离心 10 min,弃上清,加入适量 75%(体积分数)乙醇,轻轻弹匀沉淀,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中以 7500 r/min 转速离心 5 min,除去上层液体并控干管中水分,加入 DEPC 溶解 RNA 沉淀。对抽提得到的 RNA 进行浓度检测,依据 RNA 浓度计算出逆转录体系所需总量,使用逆转录试剂盒进行逆转录操作。将逆转录得到的 cDNA 与人源 GPC3 引物(5'-CAAGTCACTGCAAGTCACTCG-3')和 SYBR GREEN 按比例配制得到混合溶液,使用 Roche Light

Cycler仪器的两步扩增程序进行实时荧光定量 PCR 反应。

1.3.6 Western Blot 向 6 孔板加入 100 μL RIPA 蛋白裂解液(含蛋白酶、磷酸酶抑制剂),置于冰上充分裂解后转入离心管中,依次进行超声破碎、离心、BCA(Bicinchoninic Acid)蛋白定量,使用 5 \times SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)上样缓冲液及裂解工作液制备等浓度蛋白样品,100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 5 min,制得蛋白变性样品,随后依次进行电泳、转膜、封闭操作。待封闭结束,将购自爱博泰克公司的人反应性 GPC3 抗体 Rabbit pAb (A1946),置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 12 h, TBST(Tris-Buffered Saline with Tween-20) 浸洗 3 次,室温避光孵育兔源荧光二抗 1 h, TBST 再浸洗 3 次,随后采用荧光扫描仪进行条带显影。

1.3.7 细胞成像评价

(1) 靶向成像标记实验:将 HepG2 与 MHCC97-H 细胞分别接种到共聚焦小皿中,静置过夜贴壁后,加入不同浓度的 BSA@Ce6(BSA、Ce6 浓度比分别为 1/5、2/10,分别表示为 BSA@Ce6(1/5)、BSA@Ce6(2/10),以此类推)及 LH1-BSA@Ce6(Mal-KKK-LH1、BSA、Ce6 浓度比分别为 1/1/5、2/2/10,分别表示为 LH1-BSA@Ce6(1/1/5)、LH1-BSA@Ce6(2/2/10),以此类推)材料稀释液。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min 后吸除材料稀释液,用 PBS 清洗 3 遍,加入 500 μL 培养基后使用单光子共聚焦显微镜进行荧光成像拍摄。

(2) 竞争成像标记实验:将 HepG2 细胞接种到共聚焦小皿中,静置过夜贴壁后,分别加入浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Mal-KKK-LH1 多肽溶液。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min 后吸除 Mal-KKK-LH1 多肽溶液,用 PBS 清洗 3 遍,加入 LH1-BSA@Ce6(2/2/10) 材料稀释液。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min 后吸除 LH1-BSA@Ce6 材料稀释液,用 PBS 清洗 3 遍,加入 500 μL 培养基后使用单光子共聚焦显微镜进行荧光成像拍摄。

1.3.8 光动力治疗性能评价

(1) 对照实验组:将 HepG2 与 MHCC97-H 细胞分别接种到透明 96 孔板中,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度的 LH1-BSA@Ce6(Mal-KKK-LH1、BSA、Ce6 浓度比分别为 0、1/1/5、2/2/10、4/4/20、8/8/40)和 BSA@Ce6(BSA、Ce6 浓度比分别为 0、1/5、2/10、4/20、8/40)材料稀释液并孵育 24 h。每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,避光孵育 1 h 后,使用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值,评估材料的暗毒性。

(2) 光动力治疗实验组:材料孵育细胞 30 min 后,用 PBS 洗涤 3 次,加入新鲜培养基后采用 630 nm 光源照射 30 min,随后加入 CCK-8 试剂并按照上述

方法检测细胞活力,分析生物材料的光毒性效果。

2 结果与讨论

2.1 Mal-KKK-LH1 结构表征

通过高效液相色谱与质谱对 Mal-KKK-LH1 进行结构表征,结果显示其纯度大于 98%,测得分子量为 2203.55 Da,与理论分子量一致。MS (ESI) calcd. for $\text{C}_{100}\text{H}_{163}\text{N}_{29}\text{O}_{27}$: 2203.55 (m/z), found 2203.55 (m/z)。

2.2 LH1-BSA 结构及理化性能表征

BSA 的分子量约为 66.6 kDa,通过其唯一的半胱氨酸残基(Cysteine 34)与马来酰亚胺修饰的靶向肽 Mal-KKK-LH1(分子量约 2.2 kDa)发生 Michael 加成反应,理论上二者应以物质的量之比 1 : 1 结合。MALDI-TOF-MS 分析显示(如图 2(a)), LH1-BSA 偶联产物的分子量约为 68.8 kDa,与理论计算值(68.8 kDa)吻合,证明 BSA 与 Mal-KKK-LH1 间的成功偶联。然而受限于 BSA 原料纯度等因素,其反应效率约为 70%,该偶联过程仍存在优化空间。

随后,按照 1.3.3 节方法对 Ce6 (10 $\mu\text{mol/L}$)、BSA@Ce6(2/10)及 LH1-BSA@Ce6(2/2/10)溶液进行光谱表征。紫外吸收光谱显示(如图 2(b)),样品浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$, Ce6 在 403 nm 附近出现典型的卟啉类化合物 Soret 吸收峰。荧光发射光谱测试结果(图 2(c)),样品浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 显示, Ce6 在 657 nm 处呈现特征荧光发射峰。当 Ce6 被包载于 BSA 分子空腔内时,发射峰发生约 5 nm 的红移(移至 662 nm),且荧光强度显著增强。上述光谱变化表明, Ce6 分子通过疏水相互作用成功进入 BSA 蛋白空腔,其微环境极性的改变导致荧光发射红移^[34],从而验证了 Ce6 与 BSA 载体的有效复合。

2.3 HepG2 和 MHCC97-H 细胞的 GPC3 内源性表达检测

通过 RT-qPCR 与 WB 实验检测 HepG2 和 MHCC97-H 细胞中 GPC3 的表达水平。RT-qPCR 结果显示(图 3(a)), HepG2 细胞的 GPC3 mRNA 表达量显著高于 MHCC97-H 细胞,组间差异具有极显著统计学意义(**** $p < 0.0001$; 每组数据设置平行样个数 $n=3$)。WB 结果(图 3(b))进一步表明, HepG2 细胞中 GPC3 蛋白呈高表达,而 MHCC97-H 细胞中 GPC3 蛋白表达量极低。基于上述 mRNA 与蛋白水平的差异化表达特征,研究选定 GPC3 高表达的 HepG2 细胞与低表达的 MHCC97-H 细胞作为对照模型,为后续靶向递送效率的对比研究提供了可靠的细胞评价模型。本研究中 HepG2 与 MHCC97-H 细胞的 GPC3 表达差异(mRNA 与蛋白水平均呈显著分化),不仅

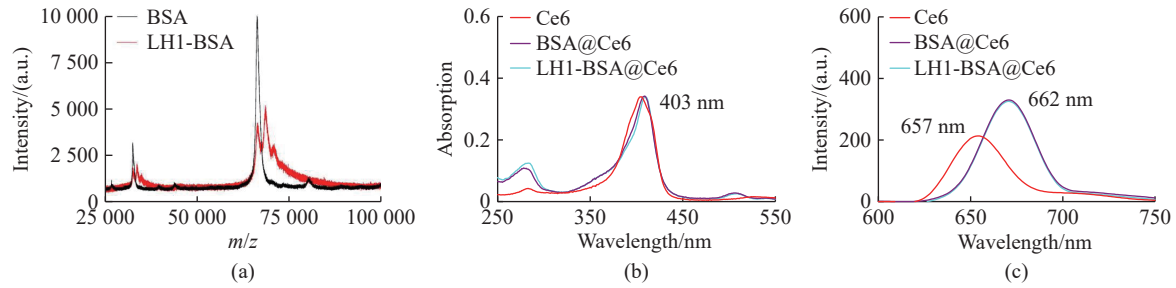


图 2 LHI-BSA 结构及理化性能表征。(a)BSA 与 LHI-BSA 的 MALDI-TOF-MS;(b)Ce6、BSA@Ce6 与 LHI-BSA@Ce6 分子的紫外吸收测试;(c)Ce6、BSA@Ce6 与 LHI-BSA@Ce6 的荧光发射光谱测试

Fig. 2 Characterization of the structure and photophysical properties of LHI-BSA. (a) MALDI-TOF-MS analysis of BSA and LHI-BSA; (b) UV-Vis absorption spectra of Ce6, BSA@Ce6 and LHI-BSA@Ce6; (c) Stacked fluorescence emission spectra of Ce6, BSA@Ce6 and LHI-BSA@Ce6

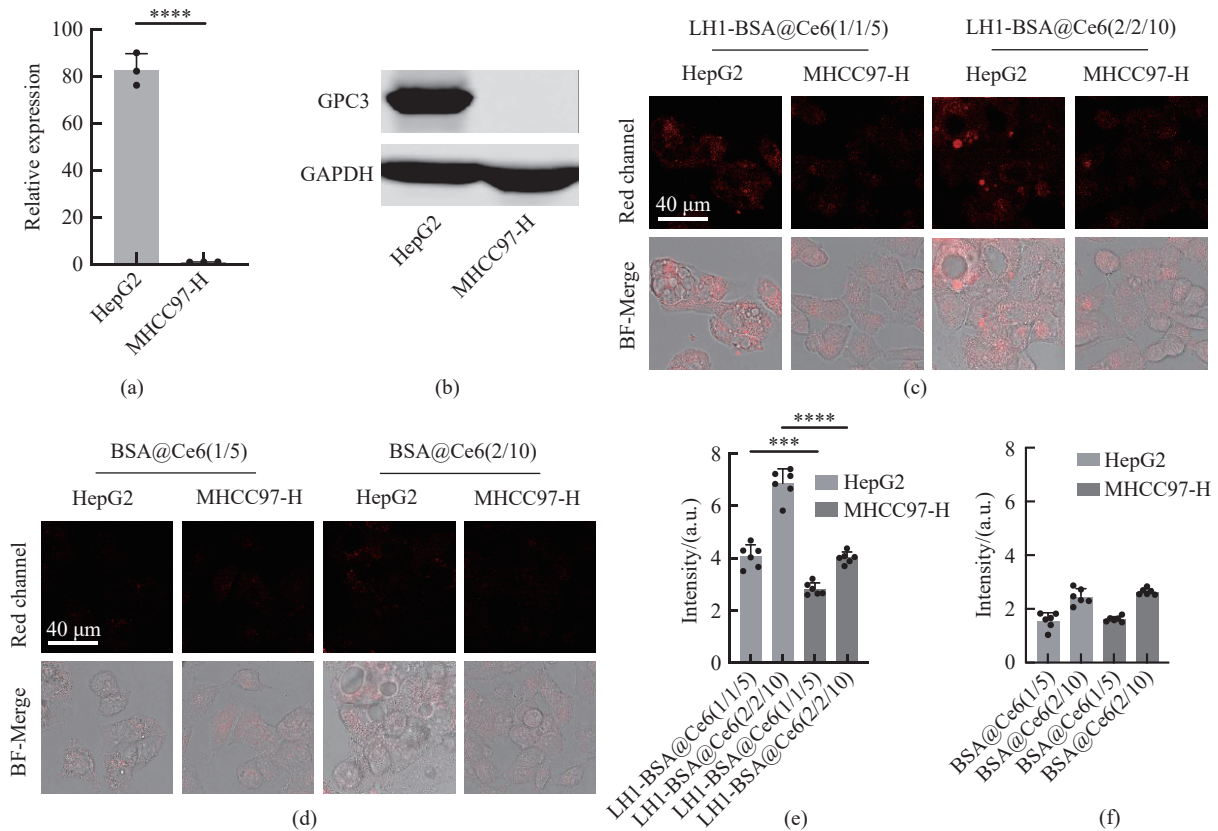


图 3 HepG2 和 MHCC97-H 的 GPC3 内源性表达检测及材料浓度依赖性荧光成像。(a)RT-qPCR 检测 GPC3 mRNA 相对表达量;(b)WB 分析 GPC3 蛋白表达水平;(c)~(f)靶向材料 LHI-BSA@Ce6(1/1/5)、LHI-BSA@Ce6(2/2/10)与对照材料 BSA@Ce6(1/5)、BSA@Ce6(2/10)对肝癌细胞(HCC)的荧光成像(BF: Bright Field)及定量分析

Fig. 3 Detection of endogenous GPC3 expression in HepG2 and MHCC97-H cells and concentration-dependent fluorescence imaging of cells. (a) RT-qPCR used to measure the relative expression of GPC3 mRNA in different cells; (b) WB used to analyze the protein expression level of GPC3 in different cells; (c~f) Fluorescence imaging (BF: Bright Field) and quantitative analysis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells incubated with LHI-BSA@Ce6(1/1/5), LHI/BSA/Ce6(2/2/10) and BSA@Ce6(1/5), BSA@Ce6(2/10)

为靶向递送效率的对比提供了理想模型,也与临床肝癌组织中 GPC3 的异质性表达特征形成呼应,增强了细胞模型的生理相关性。

2.4 HepG2 和 MHCC97-H 细胞荧光成像评价

将修饰靶向肽 Mal-KKK-LH1 的 LHI-BSA@Ce6 材料与未修饰靶向肽 Mal-KKK-LH1 的 BSA@Ce6 材料分别孵育 HepG2 和 MHCC97-H 细胞。通过单光子共聚焦显微镜成像,从浓度依赖性、GPC3 结合依

赖性和 GPC3 表达水平依赖性等多维度,评估两种材料对 GPC3 的靶向识别与递送能力。

2.4.1 材料浓度依赖性细胞荧光成像 将低浓度的 LHI-BSA@Ce6(1/1/5)与高浓度的 LHI-BSA@Ce6(2/2/10)与低浓度的 BSA@Ce6(1/5)、高浓度的 BSA@Ce6(2/10)分别孵育 HepG2、MHCC97-H 细胞 40 min,吸除材料溶液后,用 PBS 洗涤 3 次以去除未结合的游离材料,随后进行单光子荧光成像,实验结

果如图 3(c)~(f)所示。高、低两种浓度下, LH1-BSA@Ce6 在 HepG2 细胞中的荧光强度均显著高于在 MHCC97-H 细胞中的荧光强度(组间差异具有显著统计学意义, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; 每组数据设置平行样个数 $n=5$), 而 BSA@Ce6 在 HepG2 和 MHCC97-H 两种细胞中的荧光强度无明显差异, 且均低于同浓度下 LH1-BSA@Ce6 的荧光强度。上述结果表明, 靶向肽修饰材料可通过 Mal-KKK-LH1 多肽特异性识别 GPC3, 其靶向细胞摄取具有浓度依赖性。

靶向材料(LH1-BSA@Ce6)在高表达细胞中的荧光强度随浓度升高而显著增强, 而无靶向肽修饰的 BSA@Ce6 在两种细胞中均无浓度依赖性差异, 这一结果进一步印证了 Mal-KKK-LH1 多肽通过特异性结合 GPC3 受体介导的靶向摄取机制。与非靶向载体相比, 靶向材料的浓度依赖性优势提示其在临床应用中可通过优化给药浓度提升靶向富集效率, 为后续剂量优化实验提供了数据支撑。

2.4.2 GPC3 靶向细胞荧光成像评价 为进一步验证材料的特异性靶向能力, 开展了 GPC3 靶向递送材料与 Mal-KKK-LH1 多肽的竞争性结合成像实验。将 PBS 空白对照组、 $10 \mu\text{mol/L}$ 及 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 Mal-KKK-LH1 多肽溶液分别与 GPC3 高表达的 HepG2 细胞预孵育 40 min, 弃去上清后用 PBS 洗涤 3 次以清除未结合多肽, 随后加入 LH1-BSA@Ce6 (2/2/10) 继续孵育 40 min, 用 PBS 洗去未结合材料后进行共聚焦成像。实验结果显示, 细胞荧光信号强度随预孵育 Mal-KKK-LH1 浓度(低、高浓度分别表示为 Mal-KKK-LH1-1 和 Mal-KKK-LH1-2)升高而呈显著下降趋势(图 4(a)~(b)), 组间差异具有极显著统计学意义(**** $p < 0.0001$; 每组数据设置平行样个数 $n=6$)。上述 Mal-KKK-LH1 竞争抑制效应表明, Mal-KKK-LH1 可竞争性阻断材料与细胞表面 GPC3 的结合, 从而减少材料的靶向递送, 进一步证实材料的靶向识别能力源于 Mal-KKK-LH1 多肽与 GPC3 的特异性结合。竞争抑制效

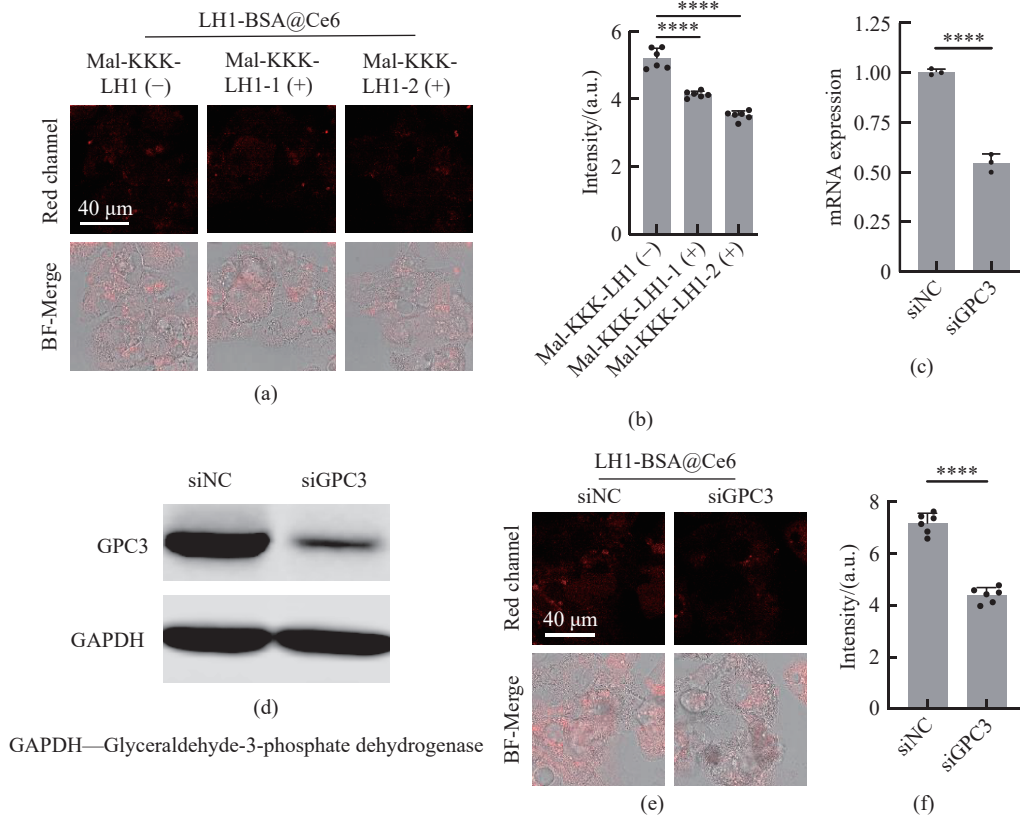


图 4 Mal-KKK-LH1 多肽竞争结合 GPC3 及 GPC3 高低表达的 HepG2 细胞系荧光成像。(a~b)预孵育 Mal-KKK-LH1 ($c(\text{Mal-KKK-LH1-1}) = 10 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{Mal-KKK-LH1-2}) = 20 \mu\text{mol/L}$)后, LH1-BSA@Ce6 (2/2/10) 对 HepG2 细胞的荧光成像及定量分析; (c)RT-qPCR 检测 GPC3 敲低 HepG2 细胞的 mRNA 相对表达量; (d)WB 分析 GPC3 敲低 HepG2 细胞的蛋白表达水平; (e~f)LH1-BSA@Ce6 (2/2/10) 分别对 siNC/siGPC3 转染后 HepG2 细胞的荧光成像及定量分析

Fig. 4 Fluorescence imaging of HepG2 cells in the presence of a competitive peptide ligand Mal-KKK-LH1 or with reduced GPC3 expression level by RNA interference (RNAi). (a~b) Fluorescence imaging and quantitative analysis of HepG2 cells treated with LH1-BSA@Ce6 (2/2/10) after a pre-incubation with Mal-KKK-LH1 ($c(\text{Mal-KKK-LH1-1}) = 10 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{Mal-KKK-LH1-2}) = 20 \mu\text{mol/L}$); (c) RT-qPCR detection of relative GPC3 mRNA expression in HepG2 cells with or without RNAi; (d) WB analysis of the GPC3 protein expression level in HepG2 cells with or without RNAi; (e~f) Fluorescence imaging and quantitative analysis of siNC/siGPC3-transfected HepG2 cells treated with LH1-BSA@Ce6 (2/2/10)

应呈现显著的 Mal-KKK-LH1 多肽浓度剂量梯度依赖性(**** $p < 0.0001$; 每组数据设置平行样个数 $n=6$), 与 Mal-KKK-LH1 多肽对 GPC3 的高亲和力特性一致, 进一步表明材料的靶向识别过程遵循受体与配体识别原理。

在此基础上, 进一步从靶点表达水平验证靶向特异性。研究采用 siRNA 瞬时转染技术敲低 HepG2 细胞的 GPC3 表达, RT-qPCR 与 WB 结果显示, 敲低组(siGPC3)的 GPC3 mRNA 及蛋白水平均显著低于对照组(siNC)(图 4(c)~(d)), 组间差异具有极显著统计学意义(**** $p < 0.0001$; 每组数据设置平行样个数 $n=3$), 表明所使用的 siGPC3 序列有效, 且瞬时转染操作具有良好的转染效率。将 LH1-BSA@Ce6 分别孵育对照组与敲低组细胞后, 共聚焦成像结果显示, 敲低组的 GPC3 荧光信号强度显著低于对照组(图 4(e)~(f)), 组间差异具有极显著统计学意义(**** $p < 0.0001$; 每组数据设置平行样个数 $n=6$)。不仅证实了 GPC3 表达水平对材料摄取的影响, 还排除了非特异性吸附或被动扩散等非靶向机制的干扰, 上述竞争性与 GPC3 靶点敲低细胞模型成像标记实验从“外源性阻断”和“内源性表达”调控两个维度共同证实: LH1-BSA@Ce6 材料的靶向摄取依赖于 GPC3 的表达水平及 Mal-KKK-LH1 多肽的特异性识别, 为材料的靶向机制提供了多层次实验证据。

2.5 生物材料光动力治疗性能评价

采用 CCK-8 法评估不同浓度 BSA@Ce6 与 LH1-

BSA@Ce6 的生物材料光动力治疗性能。具有靶向性能的生物材料 LH1-BSA@Ce6 设置 4 个浓度梯度(Mal-KKK-LH1、BSA、Ce6 浓度比分别为 1/1/5、2/2/10、4/4/20、8/8/40), 分别共同孵育 HepG2 和 MHCC97-H 细胞 24 h。光动力治疗性能实验结果(图 5(a))显示, 在无光照条件下, 即使在最高浓度比(8/8/40)下, 两种细胞存活率均维持在 95% 以上, 表明材料无显著生物毒性。在 630 nm 光照条件下, LH1-BSA@Ce6 孵育的 HepG2 细胞存活率下降幅度最大, 显著低于 GPC3 低表达的 MHCC97-H 细胞。无靶向性能的生物材料 BSA@Ce6 的光动力治疗性能实验结果(图 5(b))显示, 无论在无光照条件还是 630 nm 光照条件下, 即使在最高浓度比(8/40)下, 细胞存活率均维持在 95% 以上, 表现出极低的生物毒性与光损伤效应。BSA@Ce6 在光照条件下的细胞存活率(最低达 $95.63\% \pm 4.46\%$)与无靶向肽修饰的特性一致, 进一步验证了 Mal-KKK-LH1 多肽在光动力治疗中的核心靶向作用, 即通过特异性识别 GPC3 介导的内吞, 实现光敏剂在靶细胞内的精准释放, 而非依赖材料本身的被动渗透。研究结果提示, LH1-BSA@Ce6 生物材料在 Mal-KKK-LH1 多肽的靶向作用下, 或可将更多的 Ce6 靶向递送到 GPC3 高表达的 HepG2 细胞中, 在光照下产生更多的活性氧(ROS), 从而诱导更严重的细胞损伤, 显著降低细胞存活率。

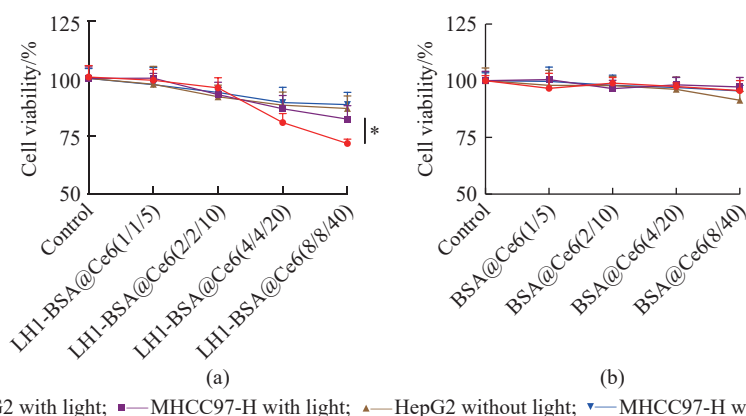


图 5 不同浓度 BSA@Ce6 与 LH1-BSA@Ce6 的材料光动力治疗性能。(a) 靶向材料 LH1-BSA@Ce6 在 HepG2 与 MHCC97-H 细胞上的光动力治疗性能; (b) 无靶向材料 BSA@Ce6 在 HepG2 与 MHCC97-H 细胞上的光动力治疗性能

Fig. 5 Photodynamic therapy (PDT) of HepG2 cells with BSA@Ce6 and LH1-BSA@Ce6 at different concentrations. (a) PDT performance of the targeted material LH1-BSA@Ce6 on HepG2 and MHCC97-H cells; (b) PDT performance of the non-targeted material BSA@Ce6 on HepG2 and MHCC97-H cells

3 结论

本文通过 Mal-KKK-LH1 与 BSA 半胱氨酸残基以物质的量之比 1 : 1 进行 Michael 加成偶联, 进而主

客体组装负载光敏剂 Ce6, 制备了一种具有高生物相容度的 GPC3 靶向诊疗生物材料 LH1-BSA@Ce6。借助结构和理化性能表征, 证实了 GPC3 靶向生物材料成功构建, 进而通过一系列生物学实验证明了该

材料可被内源性高表达 GPC3 的 HCC 细胞系选择性摄取 ($p < 0.001$), 并利用多肽竞争及 RNAi 实验验证了递送材料的 GPC3 靶向性。最终, 细胞毒性实验评价结果表明构建的生物材料无显著生物毒性, 且在特定波长光照射条件下, 该材料针对 GPC3 高表达的细胞系表现出更优的光动力杀伤能力 ($p < 0.05$)。后续将通过建立 HCC 动物模型验证构建的生物材料体内靶向成像与光动力治疗效果, 为基于生物蛋白构建的生物诊疗材料的临床转化提供实验依据。本文所构建的具有 GPC3 特异靶向性的递送材料 LH1-BSA 有望为 HCC 的精准诊治提供新的研究与临床转化工具。

参考文献:

- [1] LLOVET J M, MONTAL R, SIA D, *et al.* Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018, 15(10): 599-616.
- [2] SINGAL A G, PILLAI A, TIRO J. Early detection, curative treatment, and survival rates for hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis: A meta-analysis[J]. *PLOS Medicine*, 2014, 11(4): e1001624.
- [3] STEFANIUK P, CIANCIARA J, WIERCINSKA-DRAPALO A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16(4): 418-424.
- [4] WALL S van de, SANTEGOETS K C M, HOUTUM E J H van, *et al.* Sialoglycans and siglecs can shape the tumor immune microenvironment[J]. *Trends in Immunology*, 2020, 41(4): 274-285.
- [5] JIN H, SHI Y, LV Y, *et al.* EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib[J]. *Nature*, 2021, 595(7869): 730-734.
- [6] YANG X, YANG C, ZHANG S, *et al.* Precision treatment in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(2): 180-197.
- [7] TONG J, TAN Y, OUYANG W, *et al.* Targeting immune checkpoints in hepatocellular carcinoma therapy: Toward combination strategies with curative potential[J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2025, 14(1): 65.
- [8] CHAKRABORTY E, SARKAR D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. *Cancers*, 2022, 14(11): 2798.
- [9] LLOVET J M, BRUIX J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2008, 48(4): 1312-1327.
- [10] KING P D, PERRY M C. Hepatotoxicity of chemotherapy[J]. *The Oncologist*, 2001, 6(2): 162-176.
- [11] LEE C, RAFFAGHELLO L, LONGO V D. Starvation, detoxification, and multidrug resistance in cancer therapy[J]. *Drug Resistance Updates*, 2012, 15(1): 114-122.
- [12] VILLANUEVA A, SCHWARTZ M E, LLOVET J M. *Liver Cancer*[M]. Hoboken: Wiley, 2019: 89-100.
- [13] LEE S, LEE S, LEE H, *et al.* Therapeutic glypican-3 CRISPR genome-editing using ultralarge porous silica nano-depot for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Small Science*, 2025, 5(4): 2400447.
- [14] YU B, MA W. Biomarker discovery in hepatocellular carcinoma (HCC) for personalized treatment and enhanced prognosis[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2024, 79: 29-38.
- [15] ZHOU F, SHANG W, YU X, *et al.* Glypican - 3: A promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2018, 38(2): 741-767.
- [16] YASUDA E, KUMADA T, TOYODA H, *et al.* Evaluation for clinical utility of GPC3, measured by a commercially available ELISA kit with glypican - 3 (GPC3) antibody, as a serological and histological marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology Research*, 2010, 40(5): 477-485.
- [17] WU F, KUANG X, DENG S, *et al.* Conversion therapy strategy: A novel GPC3-targeted multimodal organic phototheranostics platform for mid-late-stage hepatocellular carcinoma[J]. *Materials Today Bio*, 2025, 30: 101442.
- [18] KOTHAWADE S, PADWAL V, LODHA P, *et al.* Advanced nanotheranostic approaches for hepatocellular carcinoma management[J]. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, 2025, 6: 100188.
- [19] LI Y, ZHU T, CHEN J, *et al.* Dual-targeted engineered bacterial outer membrane vesicles for hepatocellular carcinoma immunotherapy[J]. *Advanced Functional Materials*, 2024, 34(41): 2401355.
- [20] LIU Z, ZHANG J, TIAN Y, *et al.* Targeted delivery of reduced graphene oxide nanosheets using multifunctional ultrasound nanobubbles for visualization and enhanced photothermal therapy[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13: 7859-7872.
- [21] HABIBOLLAHI P, GUREVICH A, HUI J Z, *et al.* Integrated imaging probe and bispecific antibody development enables *in vivo* targeting of glypican-3-expressing hepatocellular carcinoma[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2024, 23(12): 1815-1826.
- [22] DOU W T, QIU P, SHI Y, *et al.* Orthogonally engineered albumin with attenuated macrophage phagocytosis for the targeted visualization and phototherapy of liver cancer[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145: 17377-17388.

- [23] ZHUO J, WANG Y, HUI H, *et al.* Enhanced glypican-3-targeted identification of hepatocellular carcinoma with liver fibrosis by pre-degrading excess fibrotic collagen[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 158: 435-448.
- [24] DOU W T, GUO C, ZHU L, *et al.* Targeted near-infrared fluorescence imaging of liver cancer using dual-peptide-functionalized albumin particles[J]. *Chemical & Biomedical Imaging*, 2023, 2(1): 47-55.
- [25] SHI Y, SHI D, CHI J, *et al.* Combined local therapy and CAR - GPC3 T - cell therapy in advanced hepatocellular carcinoma: A proof of concept treatment strategy[J]. *Cancer Communication*, 2023, 43(9): 1064-1068.
- [26] HASHIMOTO K, PERERA A, SUGAYA N, *et al.* A phase I dose escalation (DE) and cohort expansion (CE) study of ERY974, an anti-glypican 3 (GPC3)/CD3 bispecific antibody, in patients with advanced solid tumors.[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2017, 35(15): TPS3112.
- [27] WANG Y, LI H, SHEN H, *et al.* Abstract 3124: MRG006A, a novel glypican-3-targeting antibody-drug conjugate, demonstrated potent anti-tumor activity and good safety profile in preclinical studies[J]. *Cancer Research*, 2024, 84(6): 3124.
- [28] CHEN Y, QIN Y, WU Y, *et al.* Preoperative prediction of glypican-3 positive expression in solitary hepatocellular carcinoma on gadoxetate-disodium enhanced magnetic resonance imaging[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 973153.
- [29] ZHOU M, ZHOU Z, HU L, *et al.* Multiplex immunohistochemistry to explore the tumor immune microenvironment in HCC patients with different GPC3 expression[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2025, 23(1): 88.
- [30] JEON M, KIM J, KIM C. Multiplane spectroscopic whole-body photoacoustic imaging of small animals *in vivo*[J]. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2016, 54(2): 283-294.
- [31] YU J P, XU X G, MA R J, *et al.* Development of a clinical chemiluminescent immunoassay for serum GPC3 and simultaneous measurements along with AFP and CK19 in diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. 2014, 29(2): 85-93.
- [32] JIA X, LIU J, GAO Y, *et al.* Diagnosis accuracy of serum glypican-3 in patients with hepatocellular carcinoma: A systematic review with meta-analysis[J]. *Archives of Medical Research*, 2014, 45(7): 580-588.
- [33] BUJACZ A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2012, 68(10): 1278-1289.
- [34] MARCONI A, MATTIOLI E J, INGARGIOLA F, *et al.* Dissecting the interactions between chlorin e6 and human serum albumin[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2348.

Construction of Peptide-Modified Bovine Serum Albumin Delivery System for the Targeted Diagnosis and Treatment of Liver Cancer Cells

ZHANG Zhining, WANG Chenhan, HU Xile, HE Xiaopeng

(Key Laboratory for Advanced Materials & Institute of Fine Chemicals, Feringa Nobel Prize Scientist Joint Research Center, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) has a high incidence in China and is often difficult to detect early. Developing diagnostic reagents that can specifically target and trace HCC cells is crucial for early diagnosis and treatment of cancer. In this study, a novel glypican-3 (GPC3)-targeted theranostic biomaterial was developed. Using bovine serum albumin (BSA) as a carrier, GPC3-targeting peptides were modified onto the protein via a simple Michael addition reaction between maleimide and cysteine residues of the protein. Subsequently, chlorin e6 (Ce6), a photosensitizer with fluorescence and photodynamic therapy properties, was loaded into the peptide-modified BSA through host-guest self-assembly, constructing a HCC-specific targeted theranostic biomaterial. The results showed that the theranostic material exhibited significantly stronger fluorescence intensity in GPC3-highly expressed HepG2 cells than in low-expression cells ($p < 0.001$). Under 630 nm light irradiation, the viability of HepG2 cells treated with the biomaterial was significantly lower than that of control PLC (Primary Liver Carcinoma) cells at the same concentration ($p < 0.05$), confirming the targeted theranostic effect of the biomaterial. This work provides a novel targeting delivery material for the early diagnosis and treatment of HCC cells.

Key words: hepatocellular carcinoma; glypican-3; bovine serum albumin; targeted delivery; fluorescence imaging

(责任编辑: 张欣)