

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-02-009

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

NLS-KALA-SA 纳米粒的制备及细胞核靶向性评价

马凯伦¹, 谷继伟², 颜承云¹

(1. 桂林医学院药学院, 桂林 541199; 2. 佳木斯大学附属第一医院, 佳木斯 154000)

摘要 目的 构建由融合肽 KALA、硬脂酸(SA)、核定位信号(NLS)组成的细胞核靶向多肽纳米载体(NLS-KALA-SA, NKS)。方法 采用 Fmoc 多肽固相合成法人工合成 NLS-KALA-SA 多肽纳米载体。结果 NLS-KALA-SA 纳米颗粒呈球形, 平均尺寸为(76.4±7.6) nm, Zeta 电位为(43.7±5.8) mV。纳米颗粒呈正态分布, 粒径分布较窄, 多分散度指数(PI<0.3)。细胞摄取实验研究表明, 包载香豆素-6(C-6)的 NLS-KALA-SA 纳米粒子(C-6/NKS)主要积聚在 A549 细胞的细胞核中。细胞毒性实验研究表明, 在检测浓度为 0.01 ~ 1 000 mg/mL 时, NLS-KALA-SA 对 A549 细胞几乎没有细胞毒性。结论 NLS-KALA-SA 是一种安全无毒且具有跨膜转运和核定位功能的纳米载体, 有望成为一种有前景的癌症治疗多肽纳米载体。

关键词: 核定位信号; KALA 肽; 纳米粒; 核靶向; 肺癌

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)02-0061-07

Preparation of NLS-KALA-SA nanoparticles and evaluation of their nuclear targeting properties

MA Kailun¹, GU Jiwei², YAN Chengyun¹

(1. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154000, China)

Abstract Objective To construct a nucleus-targeted nanocarrier (NLS-KALA-SA, NKS) consisting of fusion peptide KALA, nuclear localization signal(NLS) and stearic acid(SA). **Methods** The polypeptide nanocarrier NLS-KALA-SA was synthesized by Fmoc solid phase synthesis method. **Results** The NLS-KALA-SA nanoparticles were spherical shaped with an average size of (76.4±7.6) nm and a Zeta potential of (43.7±5.8) mV. The diameter of nanoparticles follows a normal distribution, with a narrow particle size distribution and a polydispersity index (PI) (PI<0.3). The results of cellular uptake study showed that NLS-KALA-SA nanoparticle loaded with coumarin-6 (C6) (C6/NKS) was predominantly accumulated in the nucleus of A549 cells. The results of cellular toxicity experiments showed that NLS-KALA-SA was almost no cytotoxic to A549 cells at all tested concentrations range of

基金项目: 国家自然科学基金项目(ZZ165006); 广西自然科学基金项目(2022GXNSFDA035085)。

第一作者: 马凯伦, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤靶向。

通信作者: 颜承云, 405870793@qq.com。

0.01–1 000 mg/mL. **Conclusion** The results demonstrate that the NLS-KALA-SA is safe and non-toxic nanocarrier with transmembrane transport and nuclear localization functions, which is expected to become a promising peptide nanocarrier for cancer treatment.

Keywords: nuclear localization signal; KALA peptide; nanoparticles; nucleus-targeted; lung cancer

恶性肿瘤现已成为危害人们生活和身体健康的一种恶性病。近年来,由于分子生物学和基因组重建科技的进展,基因组疗法已经被认识到其可以通过改变和修复遗传物质来实现对恶性肿瘤的治愈^[1-2]。然而,要实现这一目标,需要将目的基因准确地传递给患者的组织、细胞以及细胞器,并高效表达。基因治疗是解决这一系列复杂问题的关键。因此,建立高效、安全、靶向的基因转染载体在恶性肿瘤临床治疗应用中具有重要的研究价值^[3-4]。

细胞穿膜肽(Cell-Penetrating peptides, CPPs),是一类可以将重要的化学成分从外部输送到细胞内的短链蛋白。它们可以自发地越过细胞的屏蔽,从而发挥出跨膜传输功能的作用^[5-6]。近年来, CPPs 技术的应用越来越广泛,它不仅能够成为一种高效的药物传输介质,还能够将多种生物成分,如基因、siRNA、小分子药物、蛋白、载药纳米粒、胶束等,安全高效地输入到细胞中^[7-8]。KALA 融合肽(WEAK-LAKALAKALAKHLAKALAKALACEA)是一种高效的人造阳离子穿膜肽,其表现出良好的穿膜特性。特殊的 pH 值可使其形态发生显著的改变,从 α -螺旋的二次构造转到无规卷曲,通过改变其内部结构,溶酶体的膜结构会遭到破坏,从而促使 DNA 逃逸进入细胞内部^[9]。KALA 融合肽一端含有疏水的亮氨酸残基,相反的一端含有亲水的赖氨酸残基,是一种具有两亲特性,可以自组装形成带正电纳米粒,用作基因传递的载体^[10-11]。

早期微量注射研究表明,当 pDNA 被注射到细胞质中,细胞转染率低于 1%,而直接注射到细胞核中,转染率达到 50%^[12]。细胞核的 C 端,存在一段与之相近的序列,它们在确保蛋白质的准确穿越到核中起着极其重要的作用,即核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。通过 NLS 介导,大分子物质和基因载体与核转运蛋白发生交互作用,从而实现对基因的转移,从而极大地改善转移的效率^[13]。

目前,许多具备核定向功能的肽被应用到核膜转运,其中 PKKKRKV 应用最广泛,它来源于 SV40 病毒的 T 抗原^[14]。NLS 的结构十分紧凑,它不仅可以将外界的物质通过膜的方式传输到细胞内,还可以将其中的基因传递到细胞核,大大增强蛋白质的传递能力和速度^[15-16]。

在本研究中,通过 Fmoc 多肽固相合成技术,制备出一种新型的纳米基因载体,它可以通过 NLS、KALA 和硬脂酸(SA)的结合,从而实现跨膜转运和细胞核靶向作用。同时,本研究还对其物理和化学特征、细胞核特异性能以及潜在的细胞毒性等方面进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

肺癌 A549 细胞(由桂林医学院科学实验中心提供);香豆素-6(C-6,分子质量:350.43,购自西格玛奥德里奇贸易有限公司);2-氯三苯甲基氯树脂(购自日本纳卡拉有限公司);所有 Fmoc 氨基酸(购自上海吉尔多肽有限公司);*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、*N,N*-二异丙基乙胺(DiEA)、*O*-(1H-苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基异脲六氟化磷(HBTU)、硬脂酸(SA)(购自瑞士罗氏应用科学公司);其他溶剂和试剂均为色谱纯或分析纯(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准 Fmoc 固相合成法制备 NLS-KALA-SA 多肽 NLS-KALA-SA 多肽是通过标准 Fmoc 固相合成法手工合成^[17-18]。首先,将肽序列组装在反应管中的 2-氯三苯甲基氯化物树脂(1 g)上,连接第 1 个氨基酸(Fmoc-L-Pro-OH)后,加入哌啶进行脱保护,通过茚三酮测定法监测偶联效果。重复上述步骤,将这些氨基酸按照 NLS-KALA-SA 多肽的化学结构示意图,如图 1 所示,从右到左的顺序连接,最后将硬

脂酸偶联到末端氨基酸后,得到最终目标产物。采用高效液相色谱仪(购自美国 Waters 公司)检测目标产物的纯度,并通过电喷雾电离质谱仪(ESI/MS)(购自美国 AB SCIEX 公司)对其分子质量进行了检测。

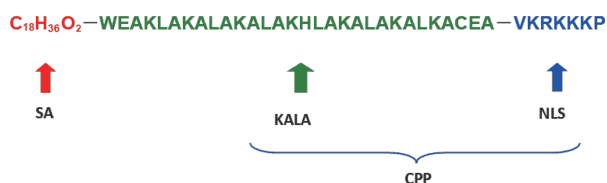


图 1 NLS-KALA-SA 多肽化学结构示意图

1.2.2 透析分离法分析 NLS-KALA-SA 纳米粒的外貌形态 将 NLS-KALA-SA 聚合物(60 mg)溶于 10 mL 50% 甲醇水溶液中,使用超声波振荡器(购自日本 SONOTEC 公司)混合,将所获得的溶液通过 0.22 mm 的膜过滤器挤出 3 次,得到 NLS-KALA-SA 纳米混悬液。将一滴用蒸馏水稀释(1:100)的 NLS-KALA-SA 纳米悬浮液滴到铜栅上,并用质量分数为 2% 的磷钨酸负染色。使用电子透射显微镜(TEM)(购自美国 Philips 公司)分析纳米颗粒的外貌形态。

1.2.3 激光粒度分析仪测定 NLS-KALA-SA 纳米粒的粒径和 Zeta 电位 将 10 μL NLS-KALA-SA 悬浮液用 1 mL 蒸馏水稀释,然后采用激光粒度分析仪(购自英国 Malvern 公司)来测量纳米颗粒的平均粒度和粒度分布,其中颗粒的尺寸用体积直径来表示。此外,使用 Zeta 电位分析仪(购自美国 Beckman 公司)测量粒径表面电荷(Zeta 电位值)。

1.2.4 细胞摄取实验 NLS-KALA-SA 纳米粒的细胞摄取实验按照先前的实验方法完成^[18]。在 37 °C 的环境中,将肺癌 A549 细胞(1×10⁵ 个细胞/孔)接种到 24 孔板中,经过 24 h 的孵育,细胞分别与游离香豆素 C6、包载香豆素-6 的 NLS-KALA-SA (C6/

NKSN) 纳米颗粒和包载香豆素-6 的 LipofectaminTM 2000 (C6/LfTM 2000) 纳米颗粒混合,每个实验组均含有 10 mg/mL 的香豆素-6,经过 4 h 孵育。PBS 洗涤细胞 3 次,并用 1.5% 甲醛固定。细胞核和细胞膜分别用 DAPI 和 WGA Alexa 350 染色 15 min。再次用 PBS 洗涤细胞,通过共聚焦激光扫描显微镜(购自日本 OLYMPUS 公司)图像分析确定 NLS-KALA-SA 纳米粒在细胞中的位置。

1.2.5 MTT 法检测细胞毒性 通过 5 × 10³ 个细胞/孔接种的方式,把 A549 细胞加入 96 孔板内,并且控制温度为 37 °C,CO₂ 含量为 5%,然后放入含有 10% 胎牛血清(FBS)培养基,经过 24 h 的生长过程。用含有所需量测试样品的新鲜 DMEM(200 mL)代替生长培养基。孵育 4 h 或 48 h 后,每个实验孔分别用 5 mg/mL MTT 溶液 20 mL 处理。然后,将溶液分离并用 200 mL 二甲基亚砷取代,孵育 4 h 后溶解形成的晶体。通过使用微孔板读取器(购自美国 Bio-Rad 公司)读取在 490 nm 处检测板的吸光度。细胞存活率(%) = A_{OD 样品}/A_{OD 对照品} × 100%, A_{OD 对照品}、A_{OD 样品} 分别代表对照品和样品的吸光度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,进行 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NLS-KALA-SA 多肽的合成

通过标准 Fmoc 固相合成法手工合成 NLS-KALA-SA 多肽。所有质荷比(*m/z*)峰都对应于目标多肽的片段分子量。结果表明,NLS-KALA-SA 多肽被成功获得。此外,在质谱分析中没有其他杂质峰,证明合成的产物是相对纯净的,该目标产物的纯度至少 95%。NLS-KALA-SA 多肽的质谱图如图 2 所示。

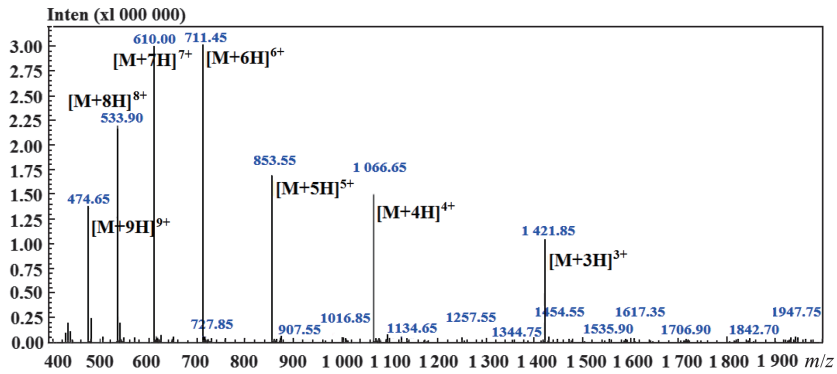
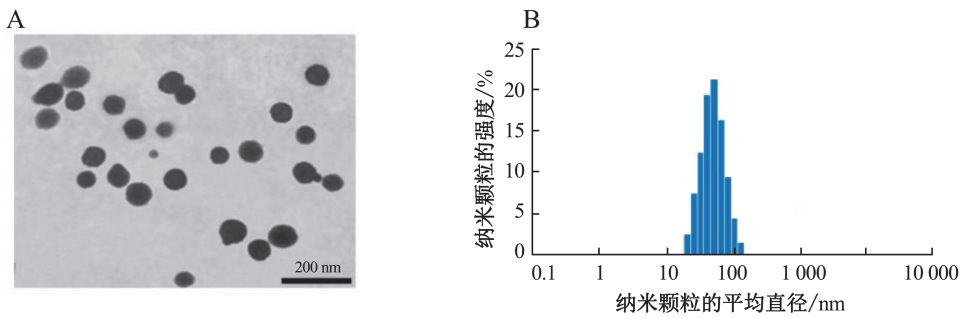


图 2 NLS-KALA-SA 多肽的质谱图

2.2 NLS-KALA-SA 纳米粒的外貌形态、粒径和 Zeta 电位

采用透析分离法获得 NLS-KALA-SA 纳米颗粒，所制备的纳米颗粒是球形的，表面光滑，粒径均匀，

粒径尺寸小于 100 nm，结果如图 3A 所示。NLS-KALA-SA 纳米颗粒的平均直径为 (76.4 ± 7.6) nm，Zeta 电位值为 (43.7 ± 5.8) mV，结果如图 3B 所示。多分散度指数 (PI) 为 (0.255 ± 0.035) 。



注：A. NLS-KALA-SA 纳米粒的透射电子显微镜；B. NLS-KALA-SA 纳米粒粒径分布。

图 3 NLS-KALA-SA 纳米粒的形貌和粒径分布

2.3 NLS-KALA-SA 纳米粒的细胞摄取

在共聚焦激光扫描显微镜下，观察用 C-6、C-6/NKSN 和 C6/LfTM2000 处理的 A549 细胞的共聚焦荧光图像。激发后，细胞中的香豆素-6 具有绿色荧光，而细胞核中的 DAPI 具有蓝色荧光，细胞膜中的 WGA 具有红色荧光。培养 4 h 后，与游离 C-6 对照，C-6/NKSN 和 C-6/LfTM2000 在 A549 细胞的细胞中

显示出更强的绿色，其中 C-6/NKSN 绿色荧光是最强的。A549 细胞的细胞内荧光强度依次为：C-6/NKSN > C6/LfTM2000 > 游离 C-6 > 对照组。结果表明，当 A549 细胞与 C6/NKSN 孵育时，C-6 主要积聚在细胞核中。C-6/NKSN 的合并图像验证了 NLS-KALA-SA 纳米粒子能够到达细胞核，结果如图 4 所示。

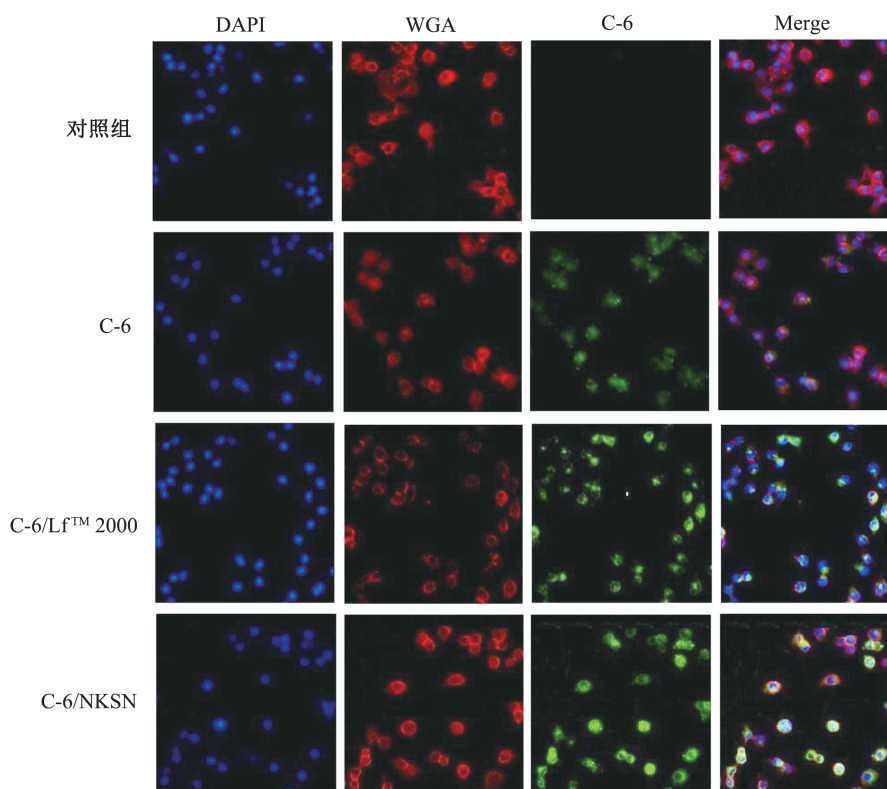


图 4 C-6、C-6/NKSN、C-6/Lf™ 2000 以及 WGA 细胞的绿色、蓝色以及红色的分布情况

2.4 NLS-KALA-SA 细胞毒性

采用 MTT 法检测 NLS-KALA-SA 对 A549 细胞的细胞毒性。在 0.01~1 000 mg/mL 的所有测试浓度内,细胞存活率高于 95%,结果如图 5 所示。实验结果表明,NLS-KALA-SA 对 A549 细胞几乎没有细胞毒性。

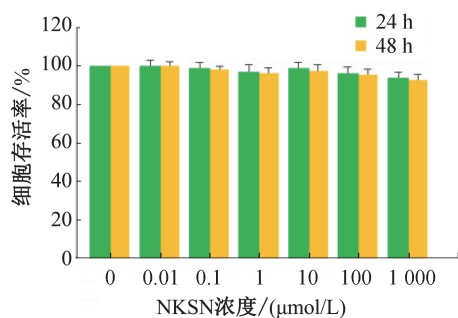


图 5 A549 细胞与不同浓度 NLS-KALA-SA (NKSN) 共同培养 48 h 后的细胞存活率

3 讨论

本研究在 Fmoc 保护下,通过标准固相合成法合

成 NLS-KALA-SA 多肽,并通过质谱分析证实目标产物被成功获得。本研究获得的自组装 NLS-KALA-SA 纳米粒具有适宜的直径(76.4 nm<100 nm),表明其具有长循环特性,并能通过 EPR 蓄积到肿瘤部位。NLS-KALA-SA 纳米粒 Zeta 电位值(43.7 mV>25 mV),表明该纳米体系,由于粒子间存在静电相互排斥作用,具有较好的稳定作用,同时也说明该纳米粒可以通过其表面的正电荷与肿瘤细胞表面的负电荷相互吸附,实现细胞的内存。

基因载体的设计不仅需要满足包载特定基因与细胞结合、跨膜传递、内涵体逃离等要求,更重要的是它们必须能够精确地将基因传输至细胞核^[19-20],从而实现基因的有效传输。

本研究通过分析包载香豆素-6(C6)的 NLS-KALA-SA 纳米粒子细胞摄取共聚焦荧光图像,从而评价载体的细胞核靶向性。C6/NKSN 在 A549 细胞中呈现最强的绿色荧光,细胞核经染色后呈蓝色荧光,影像重叠后,细胞核位置呈黄色荧光,表明 NLS-KALA-SA 纳米载体能够将 C6 传递到细胞核。上述结果验证了 NLS-KALA-SA 的细胞核靶向性。NLS-

KALA-SA 纳米载体细胞核靶向性是通过组成中 KALA 肽跨膜转运功能及 NLS 的核定位功能实现。

相关研究^[13]结果表明,大分子物质及基因载体可以通过 NLS 介导与核转运蛋白相互作用进入细胞核。KALA 肽具有一种特殊的蛋白,它的二级结构是 α -螺旋,而且随着 pH 值的升高,它的 DNA 序列也发生改变,从而形成一种新的无规卷曲形态。它不仅自发地穿越细胞膜,还可以帮助 DNA 的逃逸^[9]。NLS-KALA-SA 多肽纳米载体,通过 NLS 及 KALA 的介导,具有主动穿过细胞膜和跨膜转运入核的能力。另外,在 α -螺旋肽的二级结构上,SA 烷基链的连接能够有效地增加载体的稳定性,从而促进其形成一种新的、具有良好稳定性的自组装性共聚物。因此,NLS-KALA-SA 纳米传递系统通过载体表面正电荷与肿瘤细胞表面的负电荷结合及 KALA 穿膜作用实现细胞内吞;通过多肽载体 α -螺旋构象转变可以逃离内涵体进入细胞质;通过 NLS 与核转运蛋白相互作用,快速定位细胞核。

基因载体除了能够提供精确的靶向性、高效的转染性以外,还应具备良好的相容性、持久的稳定性及其生物降解性的特征。因此,载体的安全性评价至关重要。本研究采用 MTT 法检测 NLS-KALA-SA 纳米基因载体对 A549 细胞毒性,在 0.01~1 000 mg/mL 测试浓度内,NLS-KALA-SA 对 A549 细胞几乎没有细胞毒性。这一结果验证了 NLS-KALA-SA 基因载体具有良好的安全性。NLS-KALA-SA 基因载体由氨基酸和脂肪酸构成,具有生物可降解性、生物相容性以及生物活性^[21-22]。与传统的病毒载体^[23-24]及其非病毒载体^[25-26]相比较,NLS-KALA-SA 基因载体避免了一些潜在的风险,包括免疫反应、细胞病理学异常、体内野生型病毒形成、致畸、致突变等,因此安全可靠。

在本实验中,成功完成 NLS-KALA-SA 纳米基因的制备,并进行了理化特征、细胞核靶向性及细胞毒性的体外实验。

4 结论

本研究设计了一种新型的核靶向纳米基因载体(NLS-KALA-SA,NKSN),该载体由融合肽 KALA、硬

脂酸(SA)、核定位信号(NLS)组成。NLS-KALA-SA 纳米颗粒呈球形,平均尺寸为 (76.4 ± 7.6) nm,Zeta 电位为 (43.7 ± 5.8) mV。纳米颗粒呈正态分布,粒径分布较窄,多分散度指数(PI) <0.3 。细胞摄取实验研究表明,包载香豆素-6(C6)的 NLS-KALA-SA 纳米粒子(C6/NKSN)主要积聚在 A549 细胞的细胞核中。细胞毒性研究表明,在 0.01~1 000 mg/mL 检测浓度内,NLS-KALA-SA 对 A549 细胞几乎没有细胞毒性。以上结果表明,NLS-KALA-SA 是一种安全无毒,具有跨膜转运和核定位功能的纳米载体,有望成为一种有前景的癌症治疗多肽纳米基因载体。

参考文献

- [1] 刘国庆,徐一童,洗勋德.基因治疗:过去、现在和未来[J].中国医药导刊,2023,25(1):9-12.
- [2] NALDINI L. Gene therapy returns to centre stage[J]. Nature,2015,526(7573):351-360.
- [3] 张思汗,许斌.肿瘤免疫治疗药物的开发现状及展望[J].临床与病理杂志,2021,41(10):2447-2460.
- [4] YLÄ-HERTTUALA S, BAKER A H. Cardiovascular gene therapy: past, present, and future[J]. Mol Ther,2017,25(5):1095-1106.
- [5] EL-ANDALOUSSI S, HOLM T, LANGEL U. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications[J]. Curr Pharm Des,2005,11(28):3597-3611.
- [6] Current understanding of the mechanisms by which membrane-active peptides permeate and disrupt model lipid membranes[J]. Curr Top Med Chem,2015,16(2):170-186.
- [7] ULASOV A V, ROSENKRANZ A A, SOBOLEV A S. Transcription factors: time to deliver[J]. J Control Release,2018,269:24-35.
- [8] DISSANAYAKE S, DENNY W A, GAMAGE S, et al. Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides[J]. J Control Release,2017,250:62-76.
- [9] SHAHEEN S M, AKITA H, NAKAMURA T, et al. KALA-modified multi-layered nanoparticles as gene carriers for MHC class-I mediated antigen presentation for a DNA vaccine[J]. Biomaterials,2011,32(26):6342-6350.
- [10] WAN Y, MOYLE P M, CHRISTIE M P, et al. Nanos-

- ized, peptide-based multicomponent DNA delivery systems; optimization of endosome escape activity [J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2016, 11(8):907-919.
- [11] HYODO M, SAKURAI Y, AKITA H, et al. "Programmed packaging" for gene delivery[J]. *J Control Release*, 2014, 193:316-323.
- [12] CAPECCHI M R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells[J]. *Cell*, 1980, 22(2 Pt 2):479-488.
- [13] BERNHOFER M, GOLDBERG T, WOLF S, et al. NLSdb-major update for database of nuclear localization signals and nuclear export signals[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D503-D508.
- [14] KALDERON D, RICHARDSON W D, MARKHAM A F, et al. Sequence requirements for nuclear location of Simian virus 40 large-T antigen[J]. *Nature*, 1984, 311(5981): 33-38.
- [15] LI N, YANG H J, YU Z Z, et al. Nuclear-targeted siRNA delivery for long-term gene silencing[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(4):2816-2822.
- [16] TAMMAM S N, AZZAZY H M E, LAMPRECHT A. The effect of nanoparticle size and NLS density on nuclear targeting in cancer and normal cells; impaired nuclear import and aberrant nanoparticle intracellular trafficking in glioma[J]. *J Control Release*, 2017, 253:30-36.
- [17] KUO W Y, HWU L, WU C Y, et al. STAT3/NF- κ B-regulated lentiviral TK/GCV suicide gene therapy for cisplatin-resistant triple-negative breast cancer [J]. *Theranostics*, 2017, 7(3):647-663.
- [18] BARZEL A, PAULK N K, SHI Y, et al. Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice[J]. *Nature*, 2015, 517(7534):360-364.
- [19] WIETHOFF C M, MIDDAGH C R. Barriers to nonviral gene delivery[J]. *J Pharm Sci*, 2003, 92(2):203-217.
- [20] GUAN S, LI L, ZHU X, et al. An in vitro investigation of a detachable fork-like structure as efficient nuclear-targeted sub-unit in A2780 cell cultures [J]. *Int J Pharm*, 2020, 500(1-2):100-109.
- [21] HAN J, YEOM Y I. Specific gene transfer mediated by galactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells[J]. *Int J Pharm*, 2000, 202(1/2):151-160.
- [22] MOK H, PARK T G. Self-crosslinked and reducible fusogenic peptides for intracellular delivery of siRNA[J]. *Biopolymers*, 2008, 89(10):881-888.
- [23] ROBBINS P D, GHIVIZZANI S C. Viral vectors for gene therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80(1):35-47.
- [24] HUMPHREYS I R, SEBASTIAN S. Novel viral vectors in infectious diseases[J]. *Immunology*, 2018, 153(1): 1-9.
- [25] PEDDADA L Y, GARBUZENKO O B, DEVORE D I, et al. Delivery of antisense oligonucleotides using poly(alkylene oxide)-poly(propylacrylic acid) graft copolymers in conjunction with cationic liposomes[J]. *J Control Release*, 2014, 194:103-112.
- [26] ZENG Y, ZHOU Z X, FAN M M, et al. PEGylated cationic vectors containing a protease-sensitive peptide as a miRNA delivery system for treating breast cancer[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(1):81-92.

[收稿日期:2023-09-01]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:周寿红]