

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.002

· 基础研究 ·

cRGD 修饰负载锌的枝状介孔硅载体递送双硫仑靶向杀伤结直肠癌 CT26 细胞

杨阳^{1,2}, 朱烨飞², 王欣月², 高洁³, 张扬^{1,2} (1. 上海大学医学院, 上海 200444; 2. 同济大学医学院附属第十人民医院 纳米医学与肠道微生态研究中心, 上海 200072; 3. 海军军医大学附属长海医院 临床研究中心, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 制备一种精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸环肽(cRGD)修饰、Zn²⁺掺杂并负载双硫仑(DSF)的树枝状介孔硅纳米颗粒, 初步研究其对结直肠癌 CT26 细胞的靶向杀伤作用。**方法:** 采用水热合成法将 Zn²⁺ 锚定在树枝状介孔硅纳米颗粒的骨架中, 再将 DSF 负载在介孔孔道中, 偶联靶向配体 cRGD 到纳米颗粒的表面, 得到具有靶向功能的纳米颗粒 DSF@Zn-DMSN-cRGD。采用透射电镜(TEM)检测 DSF@Zn-DMSN-cRGD 的表面形貌, 通过能谱面扫得到元素映射图验证其中的元素分布, 通过激光粒度仪检测其粒径与电位变化, 使用红外光谱仪检测表面主要化学键。通过 TEM 观察载体 Zn-DMSN 在 pH6.5 和 pH7.4 的模拟体液中培养后的形态, 采用细胞摄取实验检测 cRGD 修饰的 Zn-DMSN 靶向 CT26 细胞的能力, 采用 CCK-8 法、Calcein-AM/PI 染色法和流式细胞术检测 DSF@Zn-DMSN-cRGD 对 CT26 细胞的杀伤能力及对细胞凋亡的影响。**结果:** TEM 观察表明 DSF@Zn-DMSN-cRGD 表面具有多孔径, 元素映射结果显示 Zn 元素和 DSF 成功负载在纳米颗粒表面, 红外光谱仪检测结果表明 cRGD 成功偶联在 DSF@Zn-DMSN 介孔硅复合载体的表面, 电位粒径结果显示粒径较未偶联 cRGD 前稍大, 电位明显增加 ($P < 0.0001$), TEM 观察发现 Zn-DMSN 在微酸性环境中其骨架崩解明显增多, 细胞摄取实验结果表明经 cRGD 修饰后的 Zn-DMSN 被 CT26 细胞内吞的效率显著增加 ($P < 0.05$)。CCK-8 法、Calcein-AM/PI 染色法和流式细胞术检测结果说明 DSF@Zn-DMSN-cRGD 能够高效杀伤 CT26 细胞 (均 $P < 0.0001$) 并诱导细胞发生凋亡 (均 $P < 0.0001$), 而对正常地肠上皮细胞 NCM460 无明显损伤。**结论:** 成功合成了一种掺杂锌、负载 DSF 并偶联 cRGD 的纳米颗粒 DSF@Zn-DMSN-cRGD, 其载体 Zn-DMSN 骨架具有良好的 pH 降解性, 其中的 cRGD 能促进纳米颗粒被 CT26 细胞靶向内吞; 在体外实验中, Zn-DMSN-cRGD 能够对结直肠癌 CT26 细胞产生强烈的靶向细胞毒性。

[关键词] 结直肠癌; 双硫仑; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸环肽; 锌; 原位螯合; CT26 细胞

[中图分类号] R979.1; R730.54; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)12-1043-08

The target killing effect of cRGD-modified Zinc-doped dendritic mesoporous silicon carrier delivering disulfiram against colorectal cancer CT26 cells

YANG Yang^{1,2}, ZHU Yefei², WANG Xinyue², GAO Jie³, ZHANG Yang^{1,2} (1. School of Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Nanomedicine and Intestinal Microecology Research Center, Shanghai Tenth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200072, China; 3. Clinical Research Unit, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a cyclic arginine-glycine-aspartate (cRGD)-modified, Zn²⁺-doped and disulfiram-loaded dendritic mesoporous silicon nanoparticles and to preliminarily investigate its targeting and killing effects against colorectal cancer CT26 cells. **Methods:** Firstly, Zn²⁺ was anchored in the skeleton of dendritic mesoporous silicon nanoparticles by hydrothermal synthesis method, then disulfiram was loaded into the pores, and the targeting ligand cRGD was coupled to the surface of the nanoparticles to obtain functional nanoparticles DSF@Zn-DMSN-cRGD. After that, transmission electron microscopy (TEM) was used to detect the surface morphology of DSF@Zn-DMSN-cRGD, and energy spectrum scanning was further used to obtain element mapping images to verify element distribution. Laser particle size analyzer was used to detect the changes of particle size and zeta potential, and infrared spectrometer was used to detect the major chemical bonds on the surface. The morphology of carrier Zn-DMSN after being co-cultured in simulated body fluid solution (pH6.5 and pH7.4) was observed by transmission electron microscopy. Cell uptake assay was used to

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (No. 32271384)

[作者简介] 杨阳 (1998—), 女, 硕士, 主要从事无机纳米材料应用于结直肠癌治疗的研究。E-mail: yangyang_jiayouya@163.com

[通信作者] 张扬, E-mail: zhangyang0202@tongji.edu.cn; 高洁, E-mail: gaojiehighclea@smmu.edu.cn

detect the ability of cRGD-modified Zn-DMSN to target CT26 cells. CCK-8 assay, Calcein-AM/PI staining and flow cytometry were used to detect the killing ability of DSF@Zn-DMSN-cRGD against CT26 cells and its influence on the apoptosis of CT26 cells. **Results:** The TEM image displayed that the surface of DSF@Zn-DMSN-cRGD was a multi-aperture structure. Element mapping images showed Zn and DSF were successfully loaded on the surface of nanoparticles. The results of infrared spectroscopy showed that cRGD was successfully coupled on the surface of DSF@Zn-DMSN. The particle size slightly increased after coupling cRGD, while the zeta potential obviously increased ($P < 0.0001$). The images of TEM showed that Zn-DMSN disintegrated faster in pH6.5 solution than in pH7.4 solution. The results of cell uptake experiments showed that the efficiency of CT26 cells uptaking cRGD-modified Zn-DMSN was enhanced prominently ($P < 0.05$). After DSF@Zn-DMSN-cRGD treatment, the results of CCK-8 assay, Calcein-AM/PI staining, and flow cytometry showed that DSF@Zn-DMSN-cRGD could efficiently kill CT26 cells (all $P < 0.0001$) and induce apoptosis (all $P < 0.0001$); there was no significant damage to normal colon epithelial cells. **Conclusion:** DSF@Zn-DMSN-cRGD has been successfully synthesized, and its core skeleton of carrier Zn-DMSN responds well to pH degradation. *In vitro*, DSF@Zn-DMSN-cRGD shows substantial targeted toxicity against colorectal cancer cell line CT26, among them, cRGD promotes the targeted endocytosis of nanoparticles by CT26 cells.

[Key words] colorectal cancer; disulfiram (DSF); arginine-glycine-aspartate (cRGD); Zn; *in situ* chelation; CT26 cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(12): 1043-1050. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.002]

结直肠癌具有极高的发病率和病死率,是威胁人类生命健康的主要疾病之一^[1]。2021年美国癌症协会的统计数据揭示,结直肠癌的新增病例及病死率在所有癌症中均排在第三位,与2020年相比增长率达5%,男性和女性的病死率分别为9%和8%^[2]。手术、放射治疗和化学药物治疗是当前治疗结直肠癌的主要手段,但化疗药物的系统毒性和耐药性问题仍然严重^[3]。双硫仑(disulfiram, DSF)是一种螯合二价金属离子的戒酒药物,已被发现与铜、锌等金属离子形成的复合物具有显著的抗肿瘤效应,可以通过原位螯合和激活自噬杀伤肿瘤细胞^[4-5]。本课题组前期开发的负载 Zn^{2+} 和DSF的介孔硅纳米颗粒(Zn^{2+} -doped and DSF-loaded dendritic mesoporous silicon nanoparticle, DSF@Zn-DMSN)能够响应肿瘤的酸性微环境,在化学治疗中显现出良好的效果,并能够激活树突状细胞及细胞毒性T细胞,促进化学免疫治疗^[6]。然而,DSF@Zn-DMSN相对较大的粒径限制了其在结直肠癌细胞内的摄取效率。LI等^[7]通过将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartate, RGD)多肽修饰的聚乙丙交酯纳米粒子应用于乳腺癌治疗,展示了通过RGD与整合素 $\alpha v \beta 3$ 的相互作用实现的肿瘤靶向和治疗效果。借鉴此策略,本研究构建一种新型纳米载体,通过将RGD环肽(cycle RGD, cRGD)修饰到介孔硅纳米颗粒表面,实现对结直肠癌细胞的靶向。载体具有锌掺杂和DSF负载,精心设计使DSF@Zn-DMSN-cRGD粒径约100 nm,以优化其体内分布和肿瘤组织的积累,绕过肝脾的单核吞噬系统,通过肿瘤酸性微环境响应,增强肿瘤内的吞噬效率及杀伤效率。这种设计不仅提高了纳米载体到达肿瘤组织的能力,还通过表面修饰的靶向性与微环境响应性的综合效应,希望能为结直肠癌的治疗提供一种优化治疗效果的新策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

小鼠结直肠癌CT26细胞购自中国科学院上海细胞库,人正常结肠上皮细胞NCM460购自北京百欧博伟生物技术有限公司。十六烷基三甲基溴化铵(货号57-09-0)、三乙醇胺(货号102-71-6)购自上海易恩化学技术有限公司,水杨酸钠(NaSal,货号S817536)、氨水($NH_3 \cdot H_2O$,货号A801009)购自上海麦克林生化科技有限公司,正硅酸乙酯(货号T110593)购自上海阿拉丁生化科技有限公司,盐酸(HCl,货号10011018)购自国药化学试剂有限公司,六水合硝酸锌($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$,货号10196-18-6)、N-羟基丁二酰亚胺(货号56480)购自Sigma-Aldrich公司,乙醇(货号64-17-5)、甲醇(货号67-56-1)购自上海凌峰化学试剂有限公司,DMEM培养基(货号C11995500BT)和胎牛血清(FBS,货号10099)购自Gibco公司,Hoechst(货号C1028)、Calcein-AM/PI细胞活性检测试剂盒(货号C2015M)、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(货号C1062L)均购自碧云天生物技术有限公司,DSF(货号T0054)购自陶术生物科技有限公司。cRGD购自上海吉尔生化有限公司。

Tecnai G2透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)购自美国FEI公司,Zetasizer Lab激光粒度仪购自英国马尔文仪器有限公司,Countess II细胞计数仪购自美国英杰生命技术有限公司,TS2R-FL荧光倒置显微镜购自日本Nikon公司,SpectraMax iD5多功能微孔板读板机购自上海美谷分子仪器有限公司,BD Fortessa流式细胞分析仪购自美国BD公司。

1.2 DSF@Zn-DMSN-cRGD合成方法

1.2.1 DSF@Zn-DMSN的制备

将1.535 g十六烷基三甲基溴化铵、0.309 mL三乙醇胺溶于去离子水中,并置于80 °C油浴锅中磁力搅

拌 1 h。继续加入 10 mL 正硅酸乙酯搅拌 2 h 后将其离心, 洗涤、收集产物, 得到纳米二氧化硅微球。将产物用盐酸:乙醇(1:9)混合溶液在 60 °C 萃取 12 h 以去除表面活性剂, 离心和洗涤后得到树枝状二氧化硅纳米颗粒(dendritic mesoporous silica nanosphere, DMSN)。将 65 mg DMSN、208 mg 六水合硝酸锌和 6 mL 氨水于去离子水中溶解, 将上述混合溶液转移到高压反应釜中, 140 °C 下反应 10 h。反应釜冷却后离心并洗涤得到白色反应物即为锌掺杂的枝状二氧化硅纳米颗粒(Zn-DMSN)。取 20 mg Zn-DMSN 和 80 mg DSF 溶于乙醇, 在 60 °C 搅拌 12 h, 离心并洗涤后收集得到产物 DSF@Zn-DMSN。将 DSF@Zn-DMSN、mPEG-硅烷和氨基 PEG-硅烷按质量 1:2.5:2.5 比例混合, 60 °C 搅拌 24 h 后得到 PEG 化的 DSF@Zn-DMSN。

1.2.2 DSF@Zn-DMSN-cRGD 的制备

将 cRGD、1 mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(1-Ethyl-3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride, EDC)和 4 mg N-羟基丁二酰亚胺溶于去离子水中, 搅拌 30 min 以活化 cRGD 上的羧基, 之后加入带有氨基的 DSF@Zn-DMSN, 利用酰胺化反应得到 DSF@Zn-DMSN-cRGD, 4 °C 搅拌过夜, 离心除去未反应的 cRGD, 使用去离子水重悬。

1.3 表征实验

在体外使用 pH7.4 和 pH6.5 的模拟体液(simulated body fluid, SBF)分别模拟正常组织和酸性肿瘤组织中的微环境, 在不同时间点收集其中的纳米颗粒, TEM 检测 DSF@Zn-DMSN-cRGD 等纳米颗粒的表面形貌和在不同 pH 溶液中降解后的形态进行扫描, 对 DSF@Zn-DMSN-cRGD 进行能谱面扫得到元素映射图片。使用激光粒度仪测量各纳米颗粒的粒径和电位变化。通过红外光谱仪检测偶联 cRGD 前后主要化学键和官能团的变化。

1.4 细胞摄取实验检测 cRGD 修饰前后的 Zn-DMSN 被 CT26 细胞内吞的效率

将 CT26 细胞置于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 在含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。将对数生长期的 CT26 细胞接种于含 6 孔板中培养 24 h, 使用 FITC 标记的 Zn-DMSN 和 Zn-DMSN-cRGD 分别培养 2、6 和 8 h, 在多聚甲醛固定、Hoechst 染色后, 使用 TS2R-FL 荧光倒置显微镜拍摄荧光图像, 观察 CT26 细胞吞噬纳米颗粒的过程。

1.6 CCK-8 实验检测 DSF@Zn-DMSN-cRGD 对 CT26 细胞增殖的影响

将 CT26 细胞接种在 96 孔板中培养 24 h, 使用不同质量浓度(0、0.5、0.75、1、1.25、1.5 μg/mL)的 DMSN、Zn-DMSN、DSF@Zn-DMSN 和 DSF@Zn-

DMSN-cRGD 处理 24 h, 每孔加入 100 μL CCK-8 液处理 30 min, 使用多功能微孔读板机在 450 nm 下检测每孔光密度(D)值。

1.7 Calcein-AM/PI 染色实验检测 DSF@Zn-DMSN-cRGD 杀伤 CT26 细胞的能力

将 CT26 细胞接种在 6 孔板中, 24 h 后观察细胞状态和密度。加入 1 μg/mL 的 DMSN、DSF@DMSN、Zn-DMSN、DSF@Zn-DMSN 和 DSF@Zn-DMSN-cRGD 处理 24 h。使用 Calcein-AM/PI 染色 15 min 后使用荧光显微镜观察并拍摄荧光图像。

1.8 流式细胞术检测 DSF@Zn-DMSN-cRGD 对 CT26 细胞凋亡的影响

将 CT26 细胞接种在 6 孔板中培养 24 h。加入 1 μg/mL 的 DMSN、DSF@DMSN、Zn-DMSN、DSF@Zn-DMSN 和 DSF@Zn-DMSN-cRGD 及预留不加药处理的细胞的空白对照组、PI 和 FITC 单染管组, 在培养 24 h 后, 收集所有细胞, 洗涤后使用 FITC 和 PI 染色, 使用流式细胞仪分析染色细胞以检测凋亡情况并使用 FlowJo 软件处理数据。

1.9 统计学处理

本文实验结果均采用 Graphpad Prism 8.0 软件处理并绘制图表, 均进行了 3 次或以上的独立重复实验以保证实验结果的准确性。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组样本比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)并组间两两比较。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功制备的 DSF@Zn-DMSN-cRGD 的理化性质符合实验设计要求

用简单易合成的方法合成 DMSN 并将 Zn²⁺ 掺杂在二氧化硅骨架上, 将 DSF 负载在孔径中后, 将 cRGD 偶联在复合介孔硅二氧化硅载体表面。使用 TEM 对制备的纳米颗粒的表面形貌和尺寸进行扫描, 结果(图 1)显示, DSF@Zn-DMSN-cRGD 等介孔硅纳米颗粒的尺寸均为 100~150 nm, 尺寸较为均一, 呈现多孔结构的球形结构, 均为单分散结构。DMSN 掺杂 Zn²⁺ 后结构形态发生改变, 形成了较大的孔隙结构和较厚的孔壁, 能够掺杂更多的 DSF。在 cRGD 偶联后, DSF@Zn-DMSN 的形貌未发生改变。

在拍摄 TEM 图像后, 对 DSF@Zn-DMSN-cRGD 的图像进行能谱面扫可以得到元素映射图片(图 2), 对纳米颗粒中存在的元素分布情况进行表征, 结果表明, DSF@Zn-DMSN-cRGD 中存在 Si、Zn 和 S 元素并均匀分布, 说明 Zn 和 DSF 被成功固定在介孔硅的枝状骨架或孔隙中。

采用激光粒度仪检测各纳米粒子的水合粒径(图3A)和zeta电位(图3B),结果显示,DSF@Zn-DMSN和DSF@Zn-DMSN-cRGD的水合粒径分别是 $(237.1 \pm 6.087) \text{ nm}$ 和 $(286.5 \pm 6.935) \text{ nm}$,在偶联cRGD后,粒径增加约50 nm($P=0.0124$);DSF@Zn-DMSN

和DSF@Zn-DMSN-cRGD的zeta电位分别为 $-(27.76 \pm 1.102) \text{ mV}$ 和 $-(2.03 \pm 0.889) \text{ mV}$,电位显著增加($P<0.0001$)。以上结果说明了cRGD可能偶联并包覆在DSF@Zn-DMSN表面。

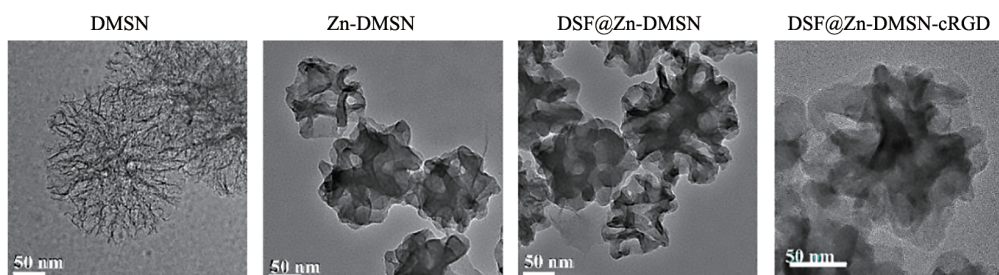


图1 TEM下观察DMSN、Zn-DMSN、DSF@Zn-DMSN、DSF@Zn-DMSN-cRGD的形态

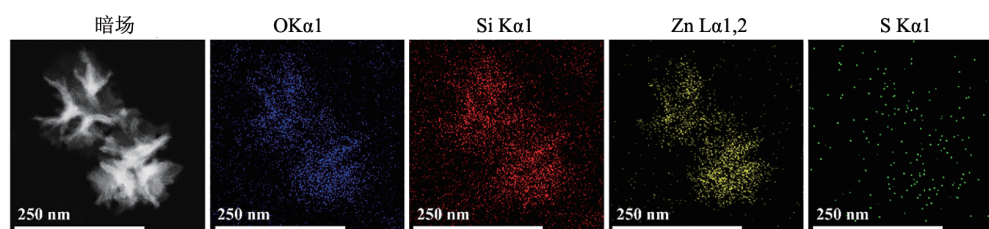


图2 DSF@Zn-DMSN-cRGD的元素映射图

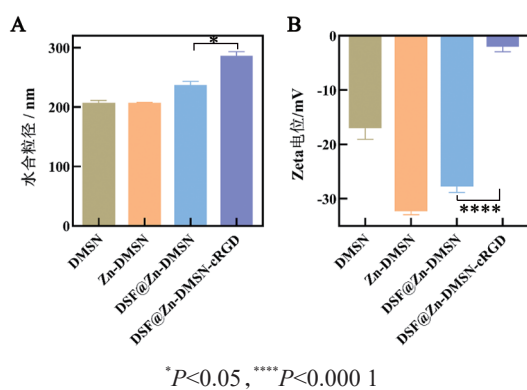


图3 激光粒度仪检测DMSN、Zn-DMSN、DSF@Zn-DMSN、DSF@Zn-DMSN-cRGD的水合粒径(A)和zeta电位(B)

2.2 cRGD成功包覆于DSF@Zn-DMSN表面

采用傅里叶红外光谱仪对DSF@Zn-DMSN-cRGD的各组分进行检测,DSF@Zn-DMSN由 Zn^{2+} 掺杂和DSF负载在DMSN中形成,在 3350 cm^{-1} 处是Si-O-H中羟基的伸缩振动峰, 2977 cm^{-1} 处为DSF中的甲基中C-H的伸缩振动, 1417 cm^{-1} 处是C=S和C-N的耦合振动峰, 1271 cm^{-1} 处为C=S的双键伸缩振动, 1198 cm^{-1} 处和 1148 cm^{-1} 处为C-S骨架振动峰,这说明DSF被吸附在Zn-DMSN的结构上形成DSF@Zn-DMSN。在cRGD偶联上DSF@Zn-DMSN后,DSF@Zn-DMSN-cRGD的红外光谱中(图4)显示 1686 cm^{-1} 处和 1641 cm^{-1} 处的吸收峰为酰胺中C-O的伸缩振动, 3274 cm^{-1} 处的O-H键较cRGD的红外光谱中峰有所增加,两者的结合对吸收

峰造成了较明显的影响。从谱图分析结果来看,DSF@Zn-DMSN-cRGD具有其主要组成成分的特征峰,直接说明cRGD的成功包覆。

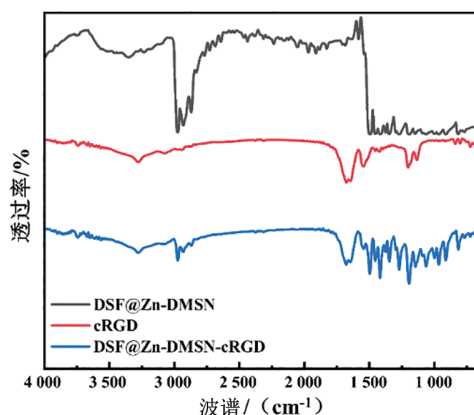


图4 傅里叶红外光谱图显示cRGD成功包覆于DSF@Zn-DMSN-cRGD的表面

2.3 Zn-DMSN在酸性环境中易发生骨架结构坍塌

TEM观察结果(图5)显示,在pH7.4的SBF溶液中,可以观察到随着时间的推移,Zn-DMSN产生了一些结构的崩塌,但大部分仍能够保持基本的形态完整。在pH6.5的SBF溶液中,Zn-DMSN在处理约24 h时,已经开始了结构的变形和塌陷,在48 h时,仅有少数骨架保持了原有骨框架形态,多数骨架结构已经崩溃。结果说明,酸性环境很大程度上影响了介

孔硅结构的稳定性,大量键的断裂有利于 Zn 离子和 DSF 的释放和有毒络合物质的生成。

2.4 cRGD 修饰能够促进 Zn-DMSN 被 CT26 细胞内吞
细胞摄取实验检测结果(图 6)显示,Zn-DMSN 和 Zn-DMSN-cRGD 两组的 FITC 绿色荧光强度均随

着时间增加逐渐升高,8 h 时 Zn-DMSN-cRGD 组的 FITC 荧光强度显著高于 Zn-DMSN 组($P<0.05$)。这说明随时间增加 DSF@Zn-DMSN-cRGD 被 CT26 细胞的摄取增加,cRGD 修饰可以增强 Zn-DMSN 被细胞内吞的效率。

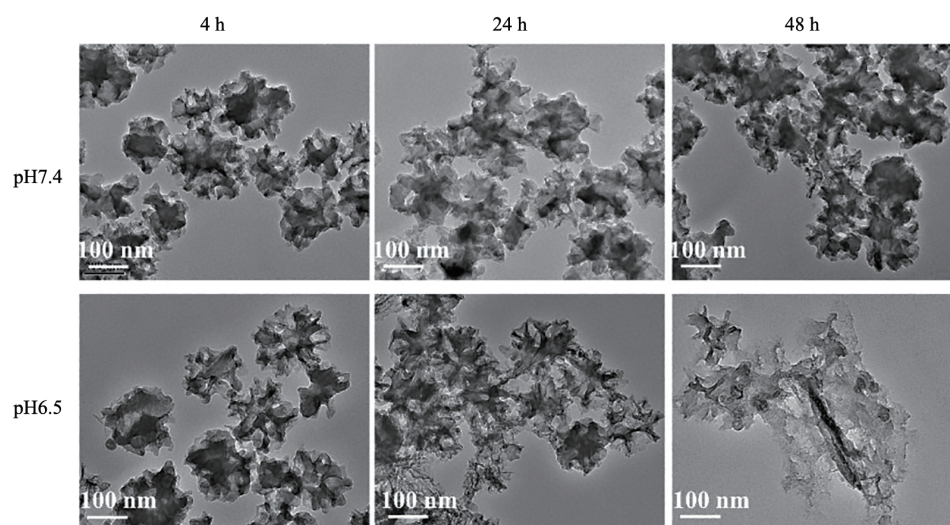
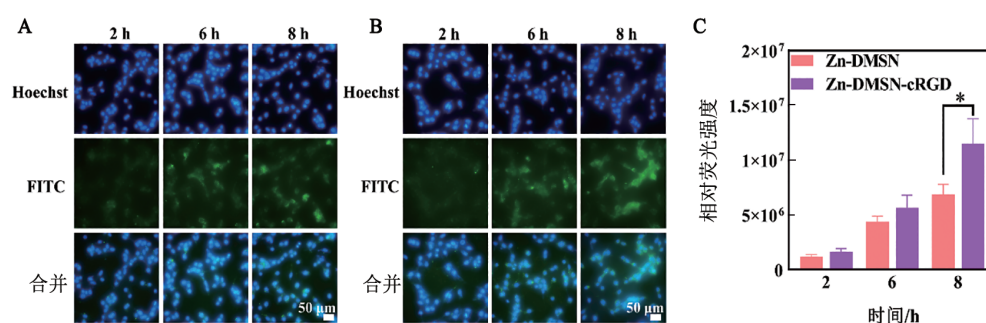


图 5 Zn-DMSN 分散在不同 pH 值的 SBF 溶液中在 4、24、48 h 时发生的结构骨架坍塌情况



A: 倒置荧光显微镜观察 CT26 细胞在不同时间点对 Zn-DMSN 的吞噬; B: 倒置荧光显微镜观察 CT26 细胞在不同时间点对 Zn-DMSN-cRGD 的吞噬; C: FITC 荧光强度定量统计。* $P<0.05$ 。

图 6 Zn-DMSN 和 Zn-DMSN-cRGD 在不同时间点被 CT26 细胞吞噬

2.5 DSF@Zn-DMSN-cRGD 能够杀伤 CT26 细胞但对正常结肠上皮 NCM46 细胞无伤害

CCK-8 法检测验证不同纳米颗粒对 CT26 细胞的毒性,结果(图 7A)表示,与 PBS 对照组相比,在 DMSN、Zn-DMSN 的质量浓度低于 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 共培养 24 h 时没有显示出明显的细胞毒性作用,而 DSF@Zn-DMSN 在 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 时的细胞活性即显著降低($P<0.0001$),说明产生了杀伤效果,并具有浓度依赖性趋势;DSF@Zn-DMSN-cRGD 在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时就开始产生了较强的抑制效果,且同为 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 时同时,DSF@Zn-DMSN-cRGD 组 CT26 细胞存活率显著低于 DSF@Zn-DMSN 组($P<0.0001$)。

为了进一步考察 DSF@Zn-DMSN-cRGD 载体的生物安全性,将 Zn²⁺和 DSF 与正常结肠上皮细胞 NCM460 进行共培养 24 h,结果(图 7B、C)显示,在 Zn²⁺和 DSF 质

量浓度为 0.25、0.5、1、2、4 $\mu\text{g/mL}$ 时,NCM460 细胞存活率均无显著差异,这表明 DSF@Zn-DMSN-cRGD 在发挥治疗作用时,其释放的 Zn²⁺和 DSF 并不会产生细胞毒性,Zn²⁺和 DSF 的使用剂量是生理状态下的无毒浓度,对 NCM460 细胞具有安全性。

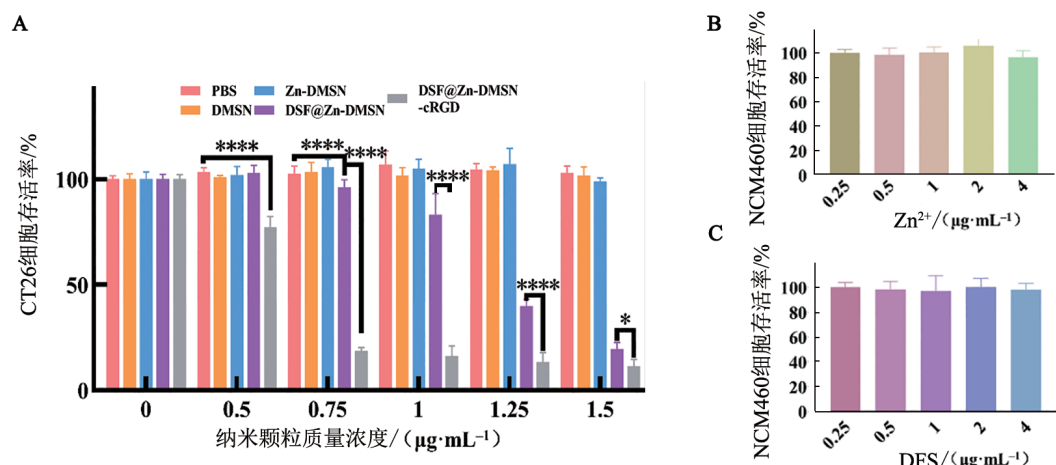
2.6 DSF@Zn-DMSN-cRGD 处理能够杀伤 CT26 细胞并促进其凋亡

Calcein-AM/PI 染色法检测结果(图 8)显示,PBS、DMSN、DSF@DMSN 和 Zn-DMSN 组均没有明显的红色荧光,说明它们对 CT26 细胞均未发生明显的杀伤;DSF@Zn-DMSN 组出现红色荧光,荧光强度显著高于上述 4 组(均 $P<0.0001$),说明 DSF@DMSN 对 CT26 细胞产生杀伤作用;DSF@Zn-DMSN-cRGD 组的红色荧光强度显著高于 DSF@Zn-DMSN ($P<0.0001$),结果说明 DSF@Zn-DMSN-cRGD 对

CT26细胞具有最强的细胞毒性作用。

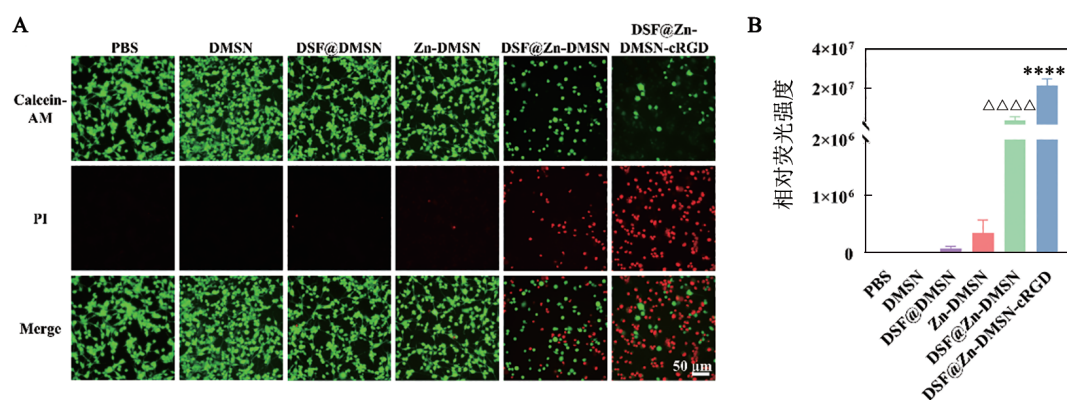
流式细胞术检测凋亡结果(图9)显示,DSF@Zn-DMSN组凋亡率为(78.80±0.56)%,较PBS、DMEM、

DSF@DMSN和Zn-DMSN组显著升高(均 $P<0.0001$),DSF@Zn-DMSN-cRGD组的凋亡率为(88.79±0.39)%,显著高于DSF@Zn-DMSN组($P<0.0001$)。



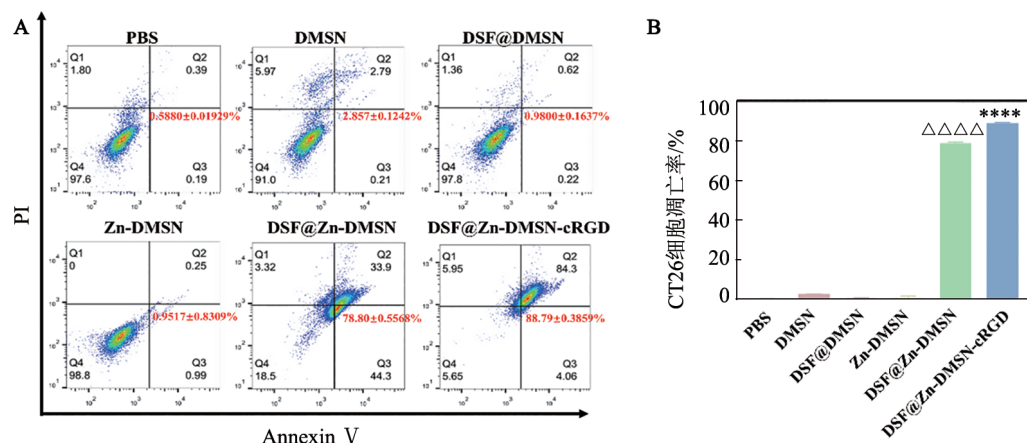
A: CCK-8法检测各纳米颗粒干预对CT26细胞的杀伤效果;B: CCK-8法检测 Zn^{2+} 对NCM460的细胞存活率的影响;C: CCK-8法检测DSF对NCM460的细胞存活率的影响。 $^*P<0.05$, $^{****}P<0.0001$ 。

图7 DSF@Zn-DMSN-cRGD能够杀伤CT26细胞而对NCM460细胞无明显损伤



A: CT26细胞Calcein-AM/PI染色的荧光图像(红色荧光为PI标记的死细胞,绿色荧光为Calcein-AM标记的活细胞);B: PI荧光强度定量统计。与DSF@Zn-DMSN组相比, $^{****}P<0.0001$;与PBS、DMEM、DSF@DMSN和Zn-DMSN组相比, $\Delta\Delta\Delta P<0.0001$ 。

图8 DSF@Zn-DMSN-cRGD能够有效杀伤CT26细胞



A: 流式细胞术检测CT26细胞凋亡情况;B: CT26细胞凋亡率数据统计。与DSF@Zn-DMSN组相比, $^{****}P<0.0001$;与PBS、DMEM、DSF@DMSN和Zn-DMSN组相比, $\Delta\Delta\Delta P<0.0001$ 。

图9 DSF@Zn-DMSN-cRGD处理能够促进CT26细胞凋亡

3 讨论

3.1 成功制备具有良好 pH 降解性的 cRGD 偶联介孔硅载体

介孔硅纳米颗粒是一种因为具有独特的理化性质而形成并被应用的生物载体。介孔硅具有较大的比表面积和规则的孔径结构,表面易于修饰功能基团,可负载多种功能性分子和药物^[8],被应用于构建药物递送系统和药代动力学的研究,可以实现高效持续的难溶性药物的递送和药物控制释放^[9]。Zn-O 键和 Si-O 键很容易在肿瘤酸性的微环境中发生断裂^[10-11],因此 Zn-DMSN 作为抗肿瘤药物载体容易发生骨架坍塌,释放出 Zn 元素和装载的药物,有助于实现在肿瘤部位有效杀伤药物的控制释放。此外,介孔硅的应用被进一步创新探索,金属离子或金属纳米颗粒可以通过光、酸、氧化还原等作用被固定在介孔硅的表面或孔隙中,受到刺激时则可从介孔硅的框架里释放,因此介孔硅与金属离子联用目前被应用于抗菌、抗癌等多领域的研究^[12-13]。介孔硅独特的多孔结构便于载药,其载药方法主要包括物理吸附和溶剂挥发法^[14]。其中物理吸附法操作简单,将介孔硅浸泡在含有药物的溶液中直到饱和,药物可深入介孔硅的孔道之中,而在药物溶出时由孔径内扩散到介质中或者控制介孔硅载体崩解从而释放^[15]。多项研究表明^[16-17],DSF 作为一种金属依赖性的戒酒药物,可以与金属离子螯合产生毒性物质而抑制肿瘤生长。Zn 元素是人体必须的微量元素,目前已被验证参与了多种癌症的发生发展^[18-19]。Zn 与 DSF 联用可以抑制肿瘤生长,使用介孔硅运输 DSF 和 Zn 至肿瘤部位可以解决 DSF 溶解度低的问题和避免对正常组织的损伤。对于纳米载体而言,输送抗癌物质到肿瘤部位分为主动靶向或被动靶向,肿瘤部位血管壁间隙较宽、淋巴回流消失,纳米药物主要通过高渗透长滞留效应被动靶向肿瘤组织^[20-21]。在一般情况下 cRGD 可以识别在癌细胞表面过度表达的整合素,具有良好的靶向性^[22-23]。因此采用 cRGD 偶联修饰介孔硅载体是改善其靶向肿瘤效率、提高空间准确性的有效策略。本研究将金属 Zn 离子固定在介孔硅的框架中,装载难溶性药物 DSF 形成纳米介孔硅复合载体 DSF@Zn-DMSN,将 cRGD 偶联在介孔硅载体 DSF@Zn-DMSN 上,形成介孔硅复合载体 (DSF@Zn-DMSN-cRGD)。偶联 cRGD 后介孔硅载体粒径增加且保持均一,电位增加,元素均匀分布。为了进一步验证载体纳米颗粒 Zn-DMSN 的生物学性质,在体外使用 pH7.4 和 pH6.5 的 SBF 分别模拟正常组织和酸性肿瘤组织中的微环境,在不同时间点

收集其中的纳米颗粒,并通过 TEM 观察其形貌发现, Zn-DMSN 作为载体的核心骨架能在酸环境下崩解,但在正常组织中不会崩解而无药物释放,保证了载体的生物安全性。因此,DSF@Zn-DMSN-cRGD 稳定性好,可以高效负载药物和 Zn^{2+} 以及修饰多肽,生物相容性好,并且可以在酸性环境中响应性降解,实现肿瘤部位控制释放。

3.2 cRGD 修饰介孔硅载体能够增强对 CT26 细胞的靶向杀伤

体外 CT26 细胞摄取荧光纳米颗粒实验结果表明, Zn-DMSN-cRGD 被 CT26 细胞的摄取效率高于 Zn-DMSN,这主要归因于 cRGD 可以识别肿瘤细胞表面过度表达的整合素,产生主动靶向效果。DSF 和 Zn^{2+} 在肿瘤酸性微环境中被释放出来后螯合形成毒性络合物,对于肿瘤细胞具有极强的杀伤效果。同时 cRGD 能够促进更多的 DSF+Zn 复合介孔硅纳米颗粒被细胞内吞,应能产生更好的杀伤效果。为了验证 DSF@Zn-DMSN-cRGD 纳米颗粒对 CT26 细胞的毒性,本研究通过体外实验证实,DSF@Zn-DMSN-cRGD 能够显著杀伤 CT26 细胞,其机制是,在肿瘤细胞的微酸性环境中 DSF@Zn-DMSN-cRGD 骨架坍塌释放出游离 Zn^{2+} 和 DSF,它们可原位螯合形成金属络合物,从而抑制肿瘤生长。同时,细胞内过量的 Zn^{2+} 可以激活自噬信号通路,破坏细胞内环境稳态。在给药浓度大于 $0.75 \mu\text{g/mL}$ 时,DSF@Zn-DMSN-cRGD 抑制 CT26 的细胞活性显著高于 DSF@Zn-DMSN,这应该归因于 cRGD 显著增加了 CT26 细胞的内吞效率,从而增加了细胞内可以产生细胞毒性药物的有效浓度。在生理环境下,DSF 被代谢为二硫代氨基甲酸酯(dithiocarbamate, DTC),可以与金属离子高效螯合形成毒性物质,最终导致细胞凋亡^[16]。DSF 也通过 Zn 依赖性的基质金属蛋白酶或者铜/锌超氧化物歧化酶活性介导细胞凋亡^[24]。流式细胞术检测结果表明,DSF@Zn-DMSN-cRGD 和 DSF@Zn-DMSN 均可以导致肿瘤细胞发生凋亡,DSF@Zn-DMSN-cRGD 促进 CT26 细胞凋亡的能力更强。

综上,本研究设计了一个具有肿瘤微环境响应性的 DSF@Zn-DMSN-cRGD 介孔硅复合载体系统主动靶向杀伤结直肠癌 CT26 细胞的策略。这种新型纳米颗粒载体易于合成,故它具有临床转化和规模化应用的潜力。本课题组后续将进一步验证 DSF@Zn-DMSN-cRGD 对体内原发结直肠癌的治疗效果。

[参考文献]

- [1] ARNOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M, *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J].

- Gut, 2017, 66(4): 683-691. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.
- [3] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, *et al.* Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J]. Cancer Commun, 2019, 39(1): 1-12. DOI: 10.1186/s40880-019-0368-6.
- [4] SKROTT Z, MISTRIK M, ANDERSEN K K, *et al.* Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer *via* p97 segregase adaptor NPL4[J]. Nature, 2017, 552(7684): 194-199. DOI: 10.1038/nature25016.
- [5] ZHANG W, ZHAI Q, LI M, *et al.* Anti-cancer effects of disulfiram in cervical cancer cell lines are mediated by both autophagy and apoptosis[J]. Bull Exp Biol Med, 2022, 172(5): 642-648. DOI: 10.1007/s10517-022-05447-w.
- [6] YANG Y, ZHU Y, WANG K, *et al.* Activation of autophagy by *in situ* Zn²⁺ chelation reaction for enhanced tumor chemoimmunotherapy[J]. Bioact Mater, 2023, 29: 116-131. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.06.022.
- [7] LI Z F, LIU P X, CHEN W, *et al.* Hypoxia-cleavable and specific targeted nanomedicine delivers epigenetic drugs for enhanced treatment of breast cancer and bone metastasis[J/OL]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 221 [2023-08-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37438800/>. DOI: 10.1186/s12951-023-01939-7.
- [8] WANG Y, ZHAO Q F, HAN N, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications[J]. Nanomed Nanotechnol Biol Med, 2015, 11(2): 313-327. DOI: 10.1016/j.nano.2014.09.014.
- [9] HOANG THI T T, CAO V D, NGUYEN T N Q, *et al.* Functionalized mesoporous silica nanoparticles and biomedical applications[J]. Mater Sci Eng C, 2019, 99: 631-656. DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.129.
- [10] MÜLLER K H, KULKARNI J, MOTSKIN M, *et al.* pH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution[J]. ACS Nano, 2010, 4(11): 6767-6779. DOI: 10.1021/nn101192z.
- [11] LI Z W, RONG L. Cascade reaction-mediated efficient ferroptosis synergizes with immunomodulation for high-performance cancer therapy[J]. Biomater Sci, 2020, 8(22): 6272-6285. DOI: 10.1039/D0BM01168A.
- [12] YANG S B, HAN X G, YANG Y, *et al.* Bacteria-targeting nanoparticles with microenvironment-responsive antibiotic release to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and associated infection[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(17): 14299-14311. DOI: 10.1021/acsami.7b15678.
- [13] KANKALA R K, LIN W Z, LEE C H. Combating antibiotic resistance through the synergistic effects of mesoporous silica-based hierarchical nanocomposites[J/OL]. Nanomaterials, 2020, 10(3): 597 [2023-08-07]. <https://doi.org/10.3390/nano10030597>. DOI: 10.3390/nano10030597.
- [14] WU S H, MOU C Y, LIN H P. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles[J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(9): 3862-3875. DOI: 10.1039/C3CS35405A.
- [15] LU J, LIONG M, ZINK J, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs[J]. Small, 2007, 3(8): 1341-1346. DOI: 10.1002/smll.200700005.
- [16] WU W C, YU L D, JIANG Q Z, *et al.* Enhanced tumor-specific disulfiram chemotherapy by *in situ* Cu²⁺ chelation-initiated nontoxicity-to-toxicity transition[J]. J Am Chem Soc, 2019, 141(29): 11531-11539. DOI: 10.1021/jacs.9b03503.
- [17] LU C, LI X Y, REN Y Y, *et al.* Disulfiram: a novel repurposed drug for cancer therapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2021, 87(2): 159-172. DOI: 10.1007/s00280-020-04216-8.
- [18] NI C, LOU X, YAO X, *et al.* ZIP1⁺ fibroblasts protect lung cancer against chemotherapy *via* connexin-43 mediated intercellular Zn²⁺ transfer[J/OL]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5919 [2023-08-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36207295/>. DOI: 10.1038/s41467-022-33521-4.
- [19] LV C X, KANG W Y, LIU S, *et al.* Growth of ZIF-8 nanoparticles *in situ* on graphene oxide nanosheets: a multifunctional nanopatform for combined ion-interference and photothermal therapy[J]. ACS Nano, 2022, 16(7): 11428-11443. DOI: 10.1021/acsnano.2c05532.
- [20] IYER A K, HE J, AMIJI M M. Image-guided nanosystems for targeted delivery in cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(19): 3230-3240. DOI: 10.2174/092986712800784685.
- [21] ACHARYA S, SAHOO S K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(3): 170-183. DOI: 10.1016/j.addr.2010.10.008.
- [22] LAFOYA B, MUNROE J, MIYAMOTO A, *et al.* Beyond the matrix: the many non-ECM ligands for integrins[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 449 [2023-08-07]. <https://doi.org/10.3390/ijms19020449>. DOI: 10.3390/ijms19020449.
- [23] DUAN H, LIU Y, GAO Z, HUANG W. Recent advances in drug delivery systems for targeting cancer stem cells[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(1): 55-70. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.09.016.
- [24] MARIKOVSKY M, NEVO N, VADAI E, *et al.* Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis[J]. Int J Cancer, 2002, 97(1): 34-41. DOI: 10.1002/ijc.1565.

[收稿日期] 2023-08-09

[修回日期] 2023-11-15

[本文编辑] 黄静怡