

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.003

· 基础研究 ·

CPC/CMC-CD55sp 纳米微球对宫颈癌 Caski 细胞的靶向杀伤作用

刘慧慧, 姬欢欢, 朱峰, 姜良乾, 刘国祥, 李冰(青岛大学医学部 生物学教研室, 山东 青岛 266021)

[摘要] **目的:**制备一种新型 C-藻蓝蛋白(C-phycoerythrin, CPC)/羧甲基壳聚糖-CD55 配体肽(carboxymethyl chitosan-CD55-specific ligand peptide, CMC-CD55sp) (CPC/CMC-CD55sp) 纳米微球, 并探究其对宫颈癌 Caski 细胞的靶向治疗作用。**方法:**采用离子交联法制备新型 CPC/CMC-CD55sp 纳米微球, 通过透射电镜(DLS)和红外光谱仪(FTIR)观察纳米微球的表征, Western blotting 和流式细胞术检测 CD55 在 Caski 细胞和成纤维(L-929)细胞表面的表达情况, CCK-8 法检测纳米微球对 Caski 细胞增殖的影响, 流式细胞术和荧光显微镜检测纳米微球被细胞摄取情况, Western blotting 和流式细胞术检测纳米微球对 Caski 细胞凋亡相关信号蛋白和凋亡率的影响, 溶血试验测定药物的生物安全性。**结果:**成功制备新型 CPC/CMC-CD55sp 纳米微球, 其形态良好、直径分布均匀, CD55 在宫颈癌细胞 Caski 表面高表达而在小鼠 L-929 细胞表面低表达($P<0.01$)。纳米微球能靶向、高效地到达 Caski 细胞并被摄入细胞; 其在人外周血中溶血作用微弱, 且在安全范围; 其对 Caski 细胞的增殖具有明显的抑制作用并且能够诱导 Caski 细胞凋亡($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**新型 CPC/CMC-CD55sp 纳米微球能够靶向抑制宫颈癌 Caski 细胞的增殖并诱导其凋亡, 具有较好的安全性, 为海洋抗肿瘤药物的研发提供了新思路。

[关键词] 藻蓝蛋白; 羧甲基壳聚糖; CD55 特异性配体肽; 纳米微球; Caski 细胞

[中图分类号] R730.51; R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1223-07

Targeted antitumor effects of C-PC/CMC-CD55sp nanospheres on cervical carcinoma Caski cells

LIU Huihui, JI Huanhuan, ZHU Feng, JIANG Liangqian, LIU Guoxiang, LI Bing (Department of Biology, Faculty of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare a new type of phycoerythrin/carboxymethyl chitosan-CD55 ligand peptide (CPC/CMC-CD55sp) nanospheres, and to study its targeted therapeutic effect on cervical cancer Caski cells. **Methods:** The novel CPC/CMC-CD55sp nanospheres (CPC/CMC-CD55sp) were synthesized by ionic cross-linking method, and the properties of nanospheres were observed by transmission electron microscopy (DLS) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The expression of CD55 on the surface of Caski and fibroblast (L-929) cells was detected by Western blotting and flow cytometry. The effect of nanospheres on the proliferation of Caski cells was detected by CCK-8. Flow cytometry and fluorescence microscopy were used to detect the uptake of microspheres by Caski cells; Western blotting and flow cytometry were used to detect the effect of CPC/CMC-CD55sp on expressions of apoptosis-related proteins and apoptosis rate in Caski cells; the hemolysis test was used to determine the biological safety of the drug. **Results:** CPC/CMC-CD55sp was successfully prepared with good morphology and uniform diameter; and CD55 was highly expressed on the surface of Caski cells but low expressed on the surface of L-929 cells ($P<0.01$). CPC/CMC-CD55sp could targeted and efficiently reach Caski cells and be ingested into the cells. It exhibited weak hemolysis effect on human peripheral blood, which was in the safe range. CPC/CMC-CD55sp displayed obvious inhibitory effect on Caski cell proliferation, and could induce cell apoptosis ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** The new CPC/CMC-CD55sp can targeted inhibit the growth of cervical cancer Caski cells via inducing its apoptosis and has good bio-safety, which provides a new idea for the research and development of anti-tumor marine drugs.

[Key words] C-phycoerythrin(CPC); carbocymethyl chitosan(CMC); CD55-specific ligand peptide (CD55sp); nanoparticles; Caski cell

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1223-1229. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.003]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81471546, 81001346)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81471546, 81001346)

[作者简介] 刘慧慧(1991-), 女, 硕士生, 主要从事靶向抗肿瘤药物的研究, E-mail: huihuiwfyxswjs@163.com

[通信作者] 李冰(LI Bing, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事海洋生物防治肿瘤的研究, E-mail: libing-516619@163.com

C-藻蓝蛋白(C-phycoerythrin, CPC)是从螺旋藻中提取的一种生物活性物质,具有很高的营养价值,可补充人体蛋白和维生素^[1-3];它属于PBP家族,主要由 α 亚基和 β 亚基组成^[4-5];可以从不同的藻类获得,如螺旋藻、乔丝藻^[6]。近年来,海洋活性物质已被证明具有良好的抗癌活性,且毒副作用小^[7]。有研究^[8-9]表明,CPC对多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用,如乳腺癌、肝癌等。但其含量低、稳定性差、易降解、利用率低,且天然CPC的开发过程中存在成本高、杂质多、周期长等问题,上述原因限制了其应用。随着纳米技术的发展,纳米材料与药物联合治疗多种疾病越来越受到人们的欢迎。为了克服CPC的降解,增强其靶向性,本研究利用离子交联法将羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC)纳米粒和CD55配体肽(CD55-specific ligand peptide, CD55sp)将CPC包裹制成新型CPC/CMC-CD55sp纳米微球。利用CD55sp与CD55特异性结合作为靶向分子,与纳米药物连接,实现药物的靶向投递,显著降低CPC的降解,提高CPC的稳定性,并长时间保持药物的有效浓度,从而提高药物的利用率,为CPC抗肿瘤应用提供实验依据,为海洋药物的开发提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌Caski细胞株、小鼠成纤维(L-929)细胞株与人体新鲜血液均由青岛大学医学院附属医院馈赠。CPC购自台州宾美生物有限公司,CMC购自青岛弘海生物技术有限公司,CD55sp由中肽生化有限公司合成,CCK-8试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,Annexin V-PE/7-AAD凋亡试剂盒购自上海翊圣生物技术有限公司,FITC-CD55兔抗人一抗购自Abcam公司,兔抗人 β -actin、羊抗兔IgG抗体均购自南京恩京生物有限公司,DAPI染色液购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 纳米微球的制备和理化性质检测

用离子交联法制备纳米微球。将4 ml的CPC溶液逐滴加入6 ml的CMC溶液中(CMC:CPC=3:2)。混合均匀,在磁力搅拌器上逐滴加入CaCl₂溶液,4℃搅拌30 min,然后加入2 mg/ml的EDC(1,3-二甲氨基丙基-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)溶液1 ml,于4℃冰箱搅拌1 h,加入0.1 mg/ml的CD55sp 2 ml并搅拌12 h,即得CPC/CMC-CD55sp纳米微球,用孔径为0.22 μ m的无菌滤器过滤后于4℃冰箱保存。将干燥的CMC、CPC/CMC与溴化钾混合,然后研磨成粉末,随后用红外光谱仪进行检测,扫描范围为500~4 000 cm⁻¹。将CMC、CPC/CMC、CPC/CMC-CD55sp纳米

微球悬液于超声波清洗机中分散10 min,然后在铜网中均匀滴加分散液,让其沉降10 min,用滤纸吸去多余的液体,完全干燥后,于透射电镜下观察微球的形态。

1.3 流式细胞术和Western blotting检测细胞表面CD55的表达情况

Caski和L-929细胞于CO₂培养箱中培养24 h,用PBS洗涤2次,再用100 μ l的PBS重悬细胞,然后加入FITC标记的CD55单克隆抗体,室温避光孵育30 min;用50目单细胞滤网过滤细胞使其分散成单细胞悬液,用流式细胞仪检测。使用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白样品的浓度。首先,将蛋白与SDS蛋白上样缓冲液混合,于95℃水浴锅中煮10 min,然后将蛋白样品用12% SDS-PAGE凝胶电泳分离,将蛋白样品转到PVDF膜上,室温在5%BSA中封闭1 h, TBST洗涤3次,每次5 min,于室温在一抗稀释液中孵育2 h或在4℃冰箱孵育12 h,用TBST洗涤3次后,于室温在二抗稀释液中孵育1 h, TBST洗涤3次后,加入配制好的ECL发光液,室温避光反应1 min,对PVDF膜进行曝光。

1.4 溶血实验检测纳米微球生物安全性

用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养Caski细胞和L-929细胞,溶血实验检测纳米微球的生物安全性。实验分为5组:阳性对照组(Triton-X-100处理)、阴性对照组(PBS处理)、CPC组、CPC/CMC组(非微球组)、CPC/CMC-CD55sp组(微球组)。将新鲜的人体全血用0.9%的生理盐水稀释10倍,轻轻混匀,避免红细胞破裂,1 500×g离心5 min,弃去上清。沉淀物用0.9%生理盐水洗涤3次,制成5%的细胞悬液。每组1 ml的细胞悬液中加入0.4 ml不同质量浓度的纳米微球(0.01、0.05、0.10、0.30、0.50、1.00 mg/ml),37℃水浴锅孵育2 h,3 000×g离心10 min,取上清。在540 nm下检测光密度(D)值,计算溶血率。溶血率(%)=(D_{样品}-D_{阴性对照})/(D_{阳性对照}-D_{阴性对照})。其中D_{样品}、D_{阳性对照}、D_{阴性对照}分别代表不同纳米微球处理组、Triton-X组、PBS组的D值。

1.5 CCK-8法检测纳米微球对细胞增殖的影响

取对数生长期的Caski和L-929细胞,胰酶消化后制成细胞悬液,在96孔板中加入100 μ l细胞悬液,每孔中的细胞密度为1×10⁴个,CO₂培养箱中培养24 h;用不同浓度的纳米微球(终质量浓度为0、10、50、100、200 μ g/ml)处理细胞,每孔加入100 μ l,每种纳米微球浓度设置5个复孔,培养24 h;设置相应只含有培养液和纳米微球的空白孔作为空白对照组,其余各种分别加入20 μ l的CCK-8溶液,继续培养4 h;用酶标仪检测450 nm处的D值,计算每个组的细胞存活率并计算IC₅₀值(半数抑制浓度,即达到50%抑制

效果时抑制剂的浓度), 并作为后续实验的纳米微球作用浓度。细胞存活率($\%$)= $D_{\text{样品}}/D_{\text{对照}}\times 100\%$ 。

1.6 荧光显微镜观察和流式细胞术检测细胞对纳米微球的摄取情况

由于 CPC 自带红色荧光, 可以通过共聚焦显微镜观察红色荧光在细胞内的分布, 从而显示细胞对 CPC 的摄取量。加药处理 24 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化制成细胞悬液, 4℃离心收集细胞, 用预冷的 PBS 重新吹散, 再离心收集细胞, 上荧光显微镜和流式细胞仪检测。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡率

Caski 细胞纳米微球处理 24 h 后, 收集细胞; 加入 1×结合缓冲液重悬细胞, 最终收集的细胞个数为 5×10^5 个; 取 2 管凋亡细胞作为单染管, 一管加入 5 μl 的 Annexin PE, 另一管加入 10 μl 7-AAD 作为对照组, 其他各组分别加入 5 μl 的 Annexin PE 和 10 μl 7-AAD, 轻轻吹打, 混匀细胞; 室温避光孵育 15 min; 加入 1×

结合缓冲液, 轻轻混匀, 用 50 目单细胞滤网将样品过滤成单细胞悬液, 用流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理

采用 OriginPro 8、GraphPad Prism5、Image J 处理图像, 利用 SPSS13.0 统计软件分析数据, 计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 成功制备 CPC/CMC 纳米微球模型

红外光谱分析结果(图 1)显示, 空载 CMC 与 CPC/CMC 纳米微球的官能团峰值发生了明显的改变(箭头所指为两者之间官能团峰值的差异), 说明 CPC 已经被包裹在 CMC 中; 电镜观察结果(图 2)显示, 纳米微球呈现规则的球形, 分散均匀, CD55sp 均匀规则地包裹在 CPC/CMC 的外面。表明 CPC/CMC-CD55sp 纳米微球模型制备成功。

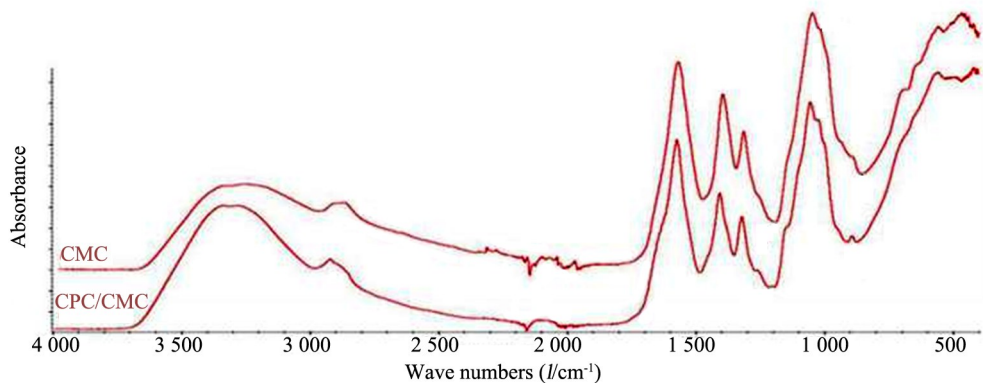
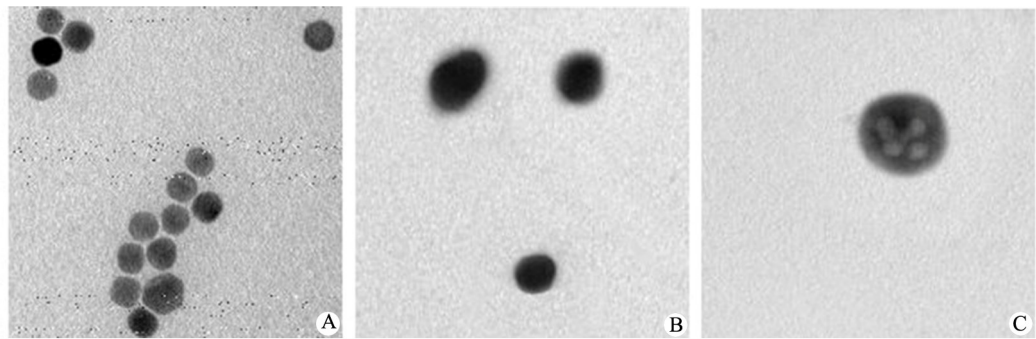


图1 CMC 和 CPC/CMC 微球官能团的红外光谱

Fig. 1 Infrared spectra of functional group of CMC and CPC/CMC nanoparticles



A: CPC; B: CPC/CMC; C: CPC/CMC-CD55sp

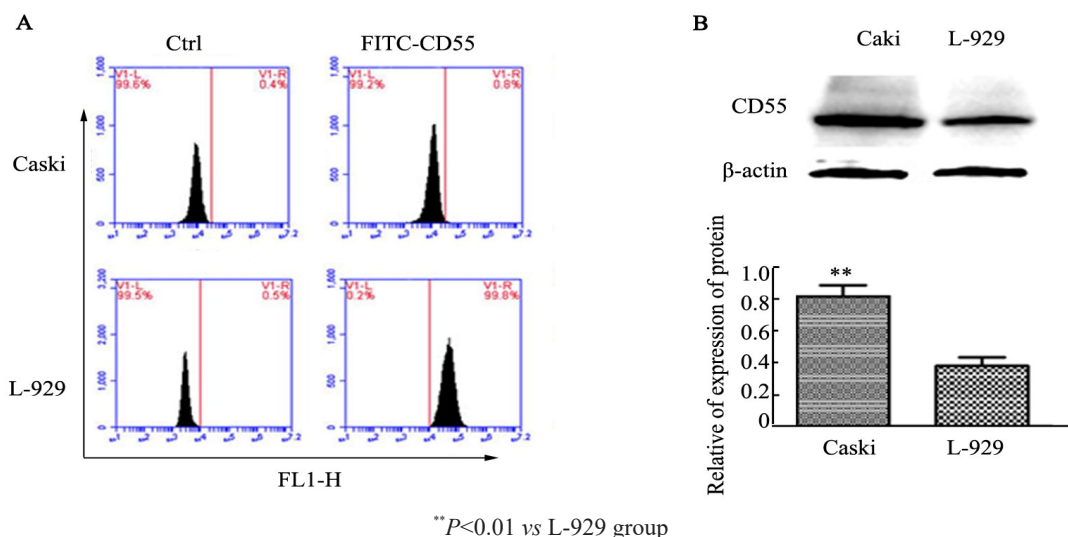
图2 CPC、CPC/CMC 和 CPC/CMC-CD55sp 微球的透射电镜图($\times 50\,000$)

Fig. 2 TEM pictures of CPC, CPC/CMC and CPC/CMC-CD55sp nanospheres($\times 50\,000$)

2.2 CD55 在 Caski 细胞表面明显高表达而在 L-929 细胞表面低表达

流式细胞术检测结果(图 3A)显示, CD55 在宫颈癌 Caski 细胞表面明显高表达, 在正常细胞小鼠

L-929 细胞表面低表达 [$(98.80\pm 9.31)\%$ vs (0.87 ± 0.10) , $P<0.01$]. Western blotting 检测结果(图 3B)显示, 在蛋白水平上, CD55 在 Caski 细胞表面高表达而在 L-929 细胞表面低表达 ($P<0.01$)。



A: CD55 expression on surface of Caski and L-929 cells by flow cytometry;
B: Expression of CD55 protein on L-929 and Caski cells was detected by Western blotting

图3 CD55在Caski和L-929细胞表面的表达水平

Fig. 3 Expression of CD55 on surface of Caski and L-929 cells

2.3 纳米微球具有较好的生物安全性

纳米微球通过血液到达肿瘤细胞,因此评估药物在血液中的安全性极为重要。溶血实验以溶血值来表示,溶血值小于5%即可以说明药物是安全的,其值越低表明越安全。结果(图4)显示,各个药物组溶血值均小于5%,且纳米微球组的溶血值最低($P < 0.01$),说明纳米微球CPC/CMC-CD55sp具有较好的生物安全性。

2.4 纳米微球明显抑制细胞的增殖能力

CKK-8法检测结果显示,当药物剂量达到50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,纳米微球CPC/CMC-CD55sp组对L-929细胞抑制作用明显高于CPC组和CPC/CMC组($P < 0.05$,图5A);当药物剂量达到10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,纳米微球CPC/CMC-CD55sp组对Caski细胞的抑制作用就明显高于CPC组和CPC/CMC组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图5B),且随着剂量的增加,其抑制作用更加明显,具有更高的杀伤毒性。计算各种药物的 IC_{50} 值,Caski细胞均明

显低于L-929细胞(57.70 ± 6.15 vs 123.19 ± 13.22 , $P < 0.01$),说明同等浓度的药物对Caski细胞的抑制增殖作用更明显。

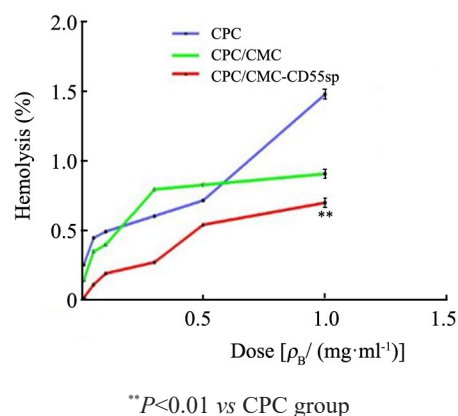
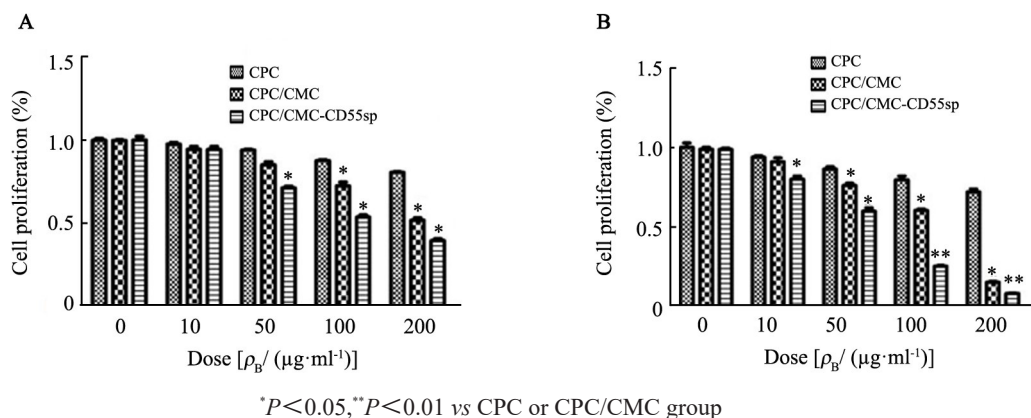


图4 溶血实验检测纳米微球的安全性

Fig. 4 Safety of nanoparticles was detected by hemolysis test



A: L-929 cell; B: Caski cell

图5 不同质量浓度CPC、CPC/CMC和CPC/CMC-CD55sp对Caski和L-929细胞增殖的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of CPC, CPC/CMC and CPC/CMC-CD55sp on proliferation of Caski and L-929 cells

2.5 纳米微球在Caski细胞中摄入具有明显靶向性

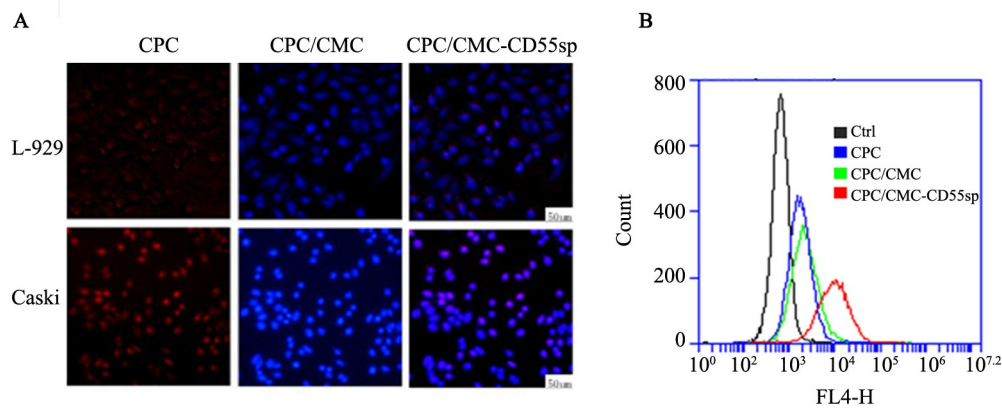
荧光显微镜下显示,CPC/CMC-CD55sp 处理细胞 4 h 后,Caski 细胞中红色荧光强度明显高于 L-929 细胞,表明纳米微球被 Caski 细胞摄入多,可能与 CD55sp 的导向性有关(图 6A)。流式细胞术检测结果(图 6B)显示,不同药物处理细胞 24 h 后,靶向药物组在 Caski 细胞中红色荧光强度明显高于其他组,从另一个角度也证实了纳米微球被 Caski 细胞摄入最多,表明 CD55sp 的导向性起了关键作用。

2.6 纳米微球可诱导 Caski 细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图 7)显示,经纳米微球处理细胞 24 h 后,CPC/CMC-CD55sp 组 Caski 细胞凋亡率明显高于对照组、CPC 组和 CPC/CMC 组(15.5% vs 4.5%、7.4%、10.5%, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.7 纳米微球明显提高或降低 Caski 细胞中的 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达量

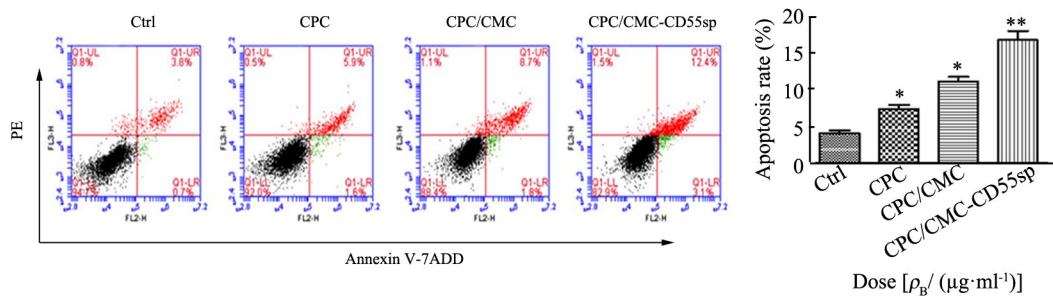
Western blotting 结果(图 8)显示,经 CPC/CMC-CD55sp 纳米微球处理后,Caski 细胞中 caspase-3 蛋白表达量增加,Bcl-2 蛋白表达量明显减少(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



A: Immunofluorescence microscope($\times 100$); B: Flow cytometry

图 6 Caski 细胞对纳米微球的摄取率

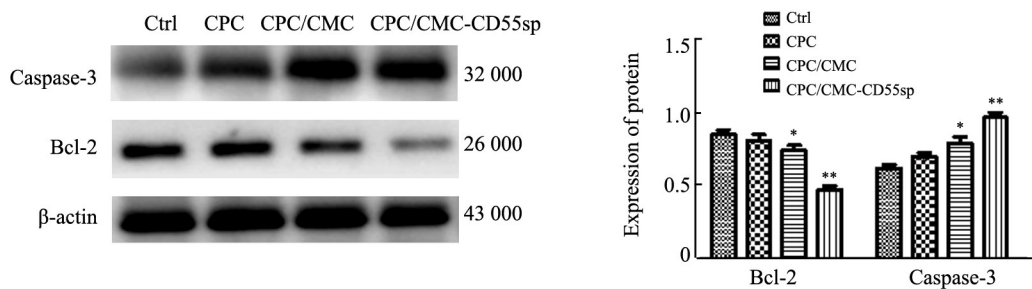
Fig 6 Uptake rate of nanoparticles by Caski cells



* $P<0.05$,** $P<0.01$ vs Ctrl group

图 7 纳米微球对 Caski 细胞凋亡率的影响

Fig. 7 Effect of nanospheres on apoptosis rate of Caski cells



* $P<0.05$,** $P<0.01$ vs Ctrl group

图 8 CPC/CMC-CD55sp 对 Caski 细胞中 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of CPC/CMC-CD55sp on expression of caspase-3 and Bcl-2 protein in Caski cells

3 讨论

宫颈癌在女性癌症中发病率高居第2位,病死率居第3位。世界上死于宫颈癌的女性大部分生活在发展中国家和地区,特别是在非洲的中部、南部和东部,是导致女性死亡的主要原因^[8]。但目前常规的治疗方法毒副作用较大,因此寻找高效低毒的治疗药物是目前宫颈癌治疗的新方向。

肿瘤靶向给药系统已成为当今肿瘤治疗的重要组成部分,由于其特异性和选择性给药等特点,克服了传统药物的诸多缺点,如减少药物毒副作用,延长体内生物半衰期,增强药物的有效作用时间。纳米材料与药物结合能更好地治疗疾病,如肿瘤^[9-10]、肥胖^[11]等。纳米药物被用于治疗脑肿瘤,能够穿越血脑屏障(BBB)/血脑肿瘤屏障(BTB)以杀死肿瘤细胞并提高患者生存率^[12];用于治疗肝癌动脉化疗栓塞的纳米复合载体解决了缺乏有效的药物载体将药物靶向投递到肿瘤组织的难题^[13]。

CPC对恶性肿瘤的治疗起重要的作用^[8],是一种潜在的天然抗炎药^[4],具有广泛的医学价值,如抗肿瘤^[14]、抗氧化^[15]、抗炎症^[16],还可以去除受损神经细胞的自由基,防止DNA氧化损伤,从而防止自由基诱导的神经元凋亡^[17];CPC还可抑制EMT^[18]。此外,CPC能促进动物血细胞的再生^[19],提高淋巴细胞的活性,提高机体的免疫功能,具有药物开发的潜力^[20]。但是,CPC稳定性差,在体内易降解的特性限制了其应用。

CD55又称衰变加速因子,是一种糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定膜抑制剂,能抑制补体的激活,防止补体激活的损伤,在多种肿瘤细胞中高表达并对肿瘤细胞的增殖起着重要的调控作用。补体调节蛋白CD55,可以通过干扰C3/C5转化酶在经典和替代途径中抑制补体活化^[21]。人血细胞、血管内皮细胞、黏膜上皮细胞等均可表达补体调节蛋白。CD55可以保护宿主细胞免受病原微生物的损伤,在胃癌、结肠癌、乳腺癌、食管腺癌中的表达显著高于非癌变组织^[22-26]。

本研究显示,CD55在Caski细胞表面高表达,在正常L-929细胞中表达较低。靶向纳米微球通过CD55sp与CD55的特异靶标作用,其可以与Caski细胞中CD55的特异性结合,从而实现靶向给药。纳米微球可以靶向、快速到达肿瘤部位。与正常L-929细胞相比,4 h后到达Caski细胞表面并进入细胞的药物明显增加。药物可以通过血液到达肿瘤细胞,因此评估血液中药物的安全性非常重要。药物的生物安全性采用溶血实验检测,溶血率越低,其生物安全性

越高^[27]。本研究显示,溶血率小于5%,表明该药物安全性较好,CPC/CMC-CD55sp纳米微球的溶血率远低于5%。

肿瘤细胞最显著的特征是增殖^[25]。本研究显示,CPC/CMC-CD55sp能抑制Caski细胞的增殖并诱导肿瘤细胞凋亡,其作用机制如下:首先,CD55sp与CD55分子特异性结合,将CPC/CMC-CD55sp引导到Caski细胞表面,再通过受体介导的内吞作用将药物导入细胞,然后CMC降解释放CPC,抑制Caski细胞的增殖并从而抑制Bcl-2蛋白的表达,并触发大量细胞色素C释放到细胞质中,最终激活Caspase家族,凋亡小体形成,引起Caski细胞凋亡。CPC/CMC-CD55sp提高了CPC的稳定性和低利用率,为进一步研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] RASTOGI R P, SONANI R R, MADAMWAR D. Effects of PAR and UV radiation on the structural and functional integrity of phycoerythrin, phycoerythrin and allophycocyanin isolated from the marine cyanobacterium *lyngbya* sp. A09DM[J]. *Photochem Photobiol*, 2015, 91(4): 837-844. DOI:10.1111/php.12449.
- [2] MADAMWAR D, PATEL D K, DESAI S N, et al. Apoptotic potential of C-phycoerythrin from *phormidium* sp. A27DM and *halomicronema* sp. A32DM on human lung carcinoma cells[J]. *Excli J*, 2015, 14(8): 527-539. DOI:10.17179/excli2014-696.
- [3] CHEN Z, ZHAN J, CHEN Y, et al. Effects of phosphorylation of beta subunits of phycocyanins on state transition in the model cyanobacterium *synechocystis* sp. pcc 6803[J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(10): 1997-2013. DOI: 10.1093/pcp/pcv118.
- [4] DE JESUS RAPOSO M F, DE MORAIS R M, DE MORAIS A M. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae[J]. *Life Sci*, 2013, 93(15): 479-486. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.08.002.
- [5] KISSOUDI M, SARAKATSANOS I, SAMANIDOU V. Isolation and purification of food-grade C-phycoerythrin from *Arthrospira platensis* and its determination in confectionery by HPLC with diode array detection[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(4): 975-981. DOI: 10.1002/jssc.201701151.
- [6] STADNICHUK I N, KRASIL'NIKOV P M, ZLENKO D V. Cyanobacterial phycobilisomes and phycobiliproteins[J]. *Mikrobiologiya*, 2015, 84(2): 131-143.
- [7] JUNG I L. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95492[2018-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991666/>. DOI: 10.1002/jssc.201701151.
- [8] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 177-193. DOI: 10.3322/caac.21395.
- [9] RAVI M, TENTU S, BASKAR G, et al. Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(9): 768-774. DOI: 10.1186/s12885-

- 015-1784-x.
- [10] KUNTE M, DESAI K. The inhibitory effect of C-phycocyanin containing protein extract (C-PC Extract) on human matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in hepatocellular cancer cell line (HepG2)[J]. *Protein J*, 2017, 36(3): 186-195. DOI: 10.1007/s10930-017-9707-0.
- [11] ZHANG Y, YU J, QIANG L, et al. Nanomedicine for obesity treatment[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(4): 373-379. DOI: 10.1007/s11427-017-9257-1.
- [12] NINGARAJ N S, REDDY P L, KHAITAN D. Targeting brain tumors with nanomedicines: overcoming challenges of blood brain barrier[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2018, 13(2): 110-119. DOI: 10.2174/1574884713666180412150153.
- [13] KIM D H, LARSON A C. Nanocomposite carriers for transarterial chemoembolization of liver cancer[J]. *Interv Oncol*, 2016, 4(11): 173-182.
- [14] LI B, GAO M H, CHU X M, et al. The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 749(1): 107-114. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.01.009.
- [15] NIU Y J, ZHOU W, GUO J, et al. C-Phycocyanin protects against mitochondrial dysfunction and oxidative stress in parthenogenetic porcine embryos[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16992[2018-09-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29208995/>. DOI: 10.1038/s41598-017-17287-0.
- [16] RIMBAU V, CAMINS A, ROMAY C, et al. Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus[J]. *Neurosci Lett*, 1999, 276(2): 75-78.
- [17] PATTARAYAN D, RAJARAJAN D, AYYANAR S, et al. C-phycocyanin suppresses transforming growth factor-beta1-induced epithelial mesenchymal transition in human epithelial cells[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(3): 426-431. DOI: 10.1016/j.pharep.2016.12.013.
- [18] CHANG C J, YANG Y H, LIANG Y C, et al. A novel phycobiliprotein alleviates allergic airway inflammation by modulating immune responses[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(1): 15-25. DOI: 10.1164/rccm.201001-0009OC.
- [19] MARIN-PRIDA J, PAVON-FUENTES N, LLOPIZ-ARZUAGA A, et al. Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(1): 49-60. DOI: 10.1016/j.taap.2013.05.021.
- [20] LIAO G, GAO B, GAO Y, et al. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34564[2018-09-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5046139/>. DOI: 10.1038/srep34564.
- [21] PIO R, CORRALES L, LAMBRIS J D. The role of complement in tumor growth [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 772(3): 229-262. DOI: 10.1007/978-1-4614-5915-611.
- [22] 殷启凤, 杨鹏, 王玉娟, 等. 新型羧甲基壳聚糖包裹C-藻蓝蛋白负载CD59配体的靶向纳米微球的制备及其对HeLa细胞的杀伤作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(2): 127-133. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.005.
- [23] MADJD Z, DURRANT L G, BRADLEY R, et al. Loss of CD55 is associated with aggressive breast tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(8): 2797-2803.
- [24] SHANG Y, CHAI N, GU Y, et al. Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer[J]. *Arch Pathol Laborat Med*, 2014, 138(7): 910-919. DOI: 10.5858/arpa.2013-0064-OA.
- [25] MURAO T, SHIOTANI A, FUJITA Y, et al. Overexpression of CD55 from Barrett's esophagus is associated with esophageal adenocarcinoma risk[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(1): 99-106. DOI: 10.1111/jgh.13055.
- [26] MENG Z W, LIU M C, HONG H J, et al. Expression and prognostic value of soluble CD97 and its ligand CD55 in intrahepatic cholangiocarcinoma[J/OL]. 2017, 39(3): 1010428317694319[2018-09-19]. <https://doi.org/10.1177/1010428317694319>. DOI: 10.1177/1010428317694319.
- [27] 马晓丽, 曹雷雨, 王晓, 等. 雷莫芦单抗治疗晚期非小细胞肺癌有效性及安全性的Meta分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(5): 515-521. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.013.
- [收稿日期] 2018-07-19 [修回日期] 2018-10-08
[本文编辑] 王映红