



工程化细菌膜仿生纳米药物递送系统的建立及在 脑胶质瘤治疗中的作用研究*

赵印震¹, 李玉林², 李 娇², 倪明立³, 王继创², 王晓军³, 程 蕾², 牛文革³, 张应福³, 王云龙^{2Δ}

1. 洛阳职业技术学院(洛阳 471099); 2. 河南省生物工程技术研究中心(郑州 450001); 3. 河南省职工医院(郑州 450002)

【摘要】 目的 制备工程化细菌膜仿生纳米粒Angiopep-2 *E. coli* membrane (ANG-2 EM)@PDA-PEI-CpG(简称ANG-2 EM@PPC), 实现药物高效地靶向输送, 治疗脑胶质瘤。**方法** 利用实验室构建inaX-N-angiopep-2工程菌表达, 溶菌酶处理超滤离心获得ANG-2 EM; 采用超声法包覆细菌膜制备ANG-2 EM@PPC; Western blot、琼脂糖凝胶电泳、透射电子显微镜(TEM)验证制备情况; 检测粒径和Zeta电位以考察ANG-2 EM@PPC的稳定性。细胞水平研究: CCK-8法考察ANG-2 EM@PPC的对中性粒细胞存活率的影响。设计并构建流动腔模型, 流式细胞术测定中性粒细胞的摄取效率, 以考察在炎症环境下ANG-2 EM@PPC搭中性粒细胞便车的效率。荧光显微镜表征中性粒细胞死亡方式, Western blot和流式细胞术考察中性粒细胞凋亡小体的产生。动物水平研究: 颅内注射小鼠胶质瘤-荧光素酶标记(GL261-Luc)细胞, 建立原位脑胶质瘤小鼠模型, 并验证小鼠肿瘤组织炎症环境。将肿瘤模型小鼠分为3组(均 $n=3$), 分别尾静脉注射DiR、ANG-2 EM@PDA-PEI-CpG、EM@PDA-PEI-CpG(均10 mg/kg), 荧光图像检测3种制剂在体内和脑内的分布情况; 肿瘤模型小鼠分为6组(均 $n=4$), 分别尾静脉注射PBS、PDA、PC、PPC、EM@PPC、ANG-2 EM@PPC(均10 mg/kg), 活体成像观察肿瘤消退状况并检测小鼠生存率、体质量以评价体内药效学, TUNEL染色(脑组织)、HE染色(脑、心、肝、脾、肺、肾组织)评价治疗效果。**结果** TEM结果显示成功制备工程化细菌膜仿生纳米粒, PPC具有明显的壳核结构, 壳厚约8.2 nm。由于ANG-2 EM的包覆, ANG-2 EM@PPC的壳厚度增加到约9.6 nm且其表面有1层边界明显的细菌膜覆盖。放置1周内, 稳定性良好。细胞实验中, CCK-8法示, ANG-2 EM@PPC对中性粒细胞的活力没有明显的影响。流式细胞术检测示, ANG-2 EM@PPC在激活中性粒细胞中的摄取增强, 在静止状态下搭中性粒细胞便车的效率比流动条件下高; 与EM@PPC组相比, ANG-2 EM@PPC组搭中性粒细胞便车的效率增高(摄取效率24.9% vs. 31.1%)。荧光显微镜示, ANG-2 EM@PPC改变中性粒细胞死亡途径, 从中性粒细胞胞外捕获网相关死亡(neutrophil extracellular traps-osis, NETosis)向凋亡转变; Western blot证实中性粒细胞凋亡小体的产生, 流式细胞术结果显示其产生比例高达77.7%。动物实验中, DiR组、EM@PPC组、ANG-2 EM@PPC组制剂在脏器(心、肝、脾、肺、肾)中分布没有明显差别($P>0.05$), 但在脑组织中, EM@PPC组、ANG-2 EM@PPC组高于DiR组($P<0.05$), ANG-2 EM@PPC可以穿过血脑屏障到达脑实质, 对脑部肿瘤处的中性粒细胞有很高的亲和力, 并可以被其内化。与PBS、PDA、PC、PPC组相比, EM@PPC组生存率和小鼠体质量改善, 肿瘤荧光强度减弱, 凋亡细胞增加, ANG-2 EM@PPC组上述趋势更明显; 各组HE染色均未见异常。**结论** 成功制备了具有炎症响应特性的ANG-2 EM@PPC纳米递送系统, 该系统能跨越血脑屏障靶向聚集于肿瘤炎症微环境, 提高抗胶质瘤疗效。该研究为胶质瘤治疗提供新的给药策略, 也为其他中枢神经系统疾病的非侵入性炎症微环境靶向药物递送提供新的思路。

【关键词】 中性粒细胞 脑胶质瘤 炎症 血脑屏障 工程化细菌膜

Establishment of an Engineered Bacterial Membrane Biomimetic Nanodrug Delivery System and Its Role in the Treatment of Glioma ZHAO Yinzen¹, LI Yulin², LI Jiao², NI Mingli³, WANG Jichuang², WANG Xiaojun³, CHENG Lei², NIU Wenge³, ZHANG Yingfu³, WANG Yunlong^{2Δ}. 1. Luoyang Vocational and Technical College, Luoyang 471099, China; 2. Henan Provincial Biotechnology Research Center, Zhengzhou 450001, China; 3. Henan Provincial Staff Hospital, Zhengzhou 450002, China

Δ Corresponding author, E-mail: biowyl@126.com

【Abstract】 Objective To develop engineered bacterial membrane biomimetic nanoparticles, Angiopep-2 *E. coli* membrane (ANG-2 EM)@PDA-PEI-CpG (ANG-2 EM@PPC), for efficient targeted drug delivery in the treatment of glioma, and to provide theoretical and technical support for targeted glioma therapy. **Methods** The expression of inaX-N-angiopep-2 engineered bacteria was constructed in the laboratory, and ANG-2 EM was obtained through lysozyme treatment and ultrafiltration centrifugation. ANG-2 EM@PPC was prepared by ultrasonication of bacterial membranes. Western blotting, agarose gel electrophoresis, and transmission electron microscopy (TEM) were used to verify the preparation. Particle size and Zeta potential were measured to investigate the stability of ANG-2 EM@PPC. Regarding cell experiments, CCK-8 assay was performed to determine the effect of ANG-2 EM@PPC on the survival rate of neutrophils.

* 中原学者工作站项目(No. 234400510005)资助

Δ 通信作者, E-mail: biowyl@126.com

出版日期: 2024-07-20

A flow chamber model was designed and constructed, and the uptake efficiency of neutrophils was measured by flow cytometry to investigate the hitchhiking efficiency of ANG 2 EM@PPC on neutrophils in inflammatory environment. Neutrophil death patterns were characterized by fluorescence microscopy, and flow cytometry and Western blotting were performed to examine neutrophil apoptotic bodies and the proportion of apoptotic bodies produced. Regarding animal experiments, a mouse model of *in situ* glioma was established and the inflammatory environment of tumor tissue was verified. The tumor model mice were divided into three groups, including DiR group, EM@PPC group, and ANG-2 EM@PPC group (all $n=3$), which were injected with DiR, ANG-2 EM@PDA-PEI-CpG, and EM@PDA-PEI-CpG via the tail vein, respectively (all at 10 mg/kg). Fluorescence images of organs and the brain were used to examine the distribution of the three formulations *in vivo* and in the brain. The tumor model mice were further divided into PBS group, PDA group, PC group, PPC group, EM@PPC group, and ANG-2 EM@PPC group (all $n=4$), which were injected with PBS, PDA, PC, PPC, EM@PPC, and ANG-2 EM@PPC injected via the tail vein, respectively (all at 10 mg/kg). Imaging was performed *in vivo* to observe tumor regression, and the survival rate and body mass of mice were measured to evaluate *in vivo* pharmacodynamics. TUNEL staining (brain tissue) and HE staining (brain, heart, liver, spleen, lung and kidney tissues) were performed to evaluate the therapeutic effect. **Results** The results of TEM showed successful preparation of engineered bacterial membrane biomimetic nanoparticles, with PPC exhibiting a distinct shell-core structure and a shell thickness of about 8.2 nm. Due to the coating of ANG-2 EM, the shell thickness of ANG-2 EM@PPC increased to about 9.6 nm, with a clear bacterial membrane layer on the surface. Stability was maintained for at least one week. ANG-2 EM@PPC had no significant effect on the activity of neutrophils according to the findings from the CCK-8 assay. Flow cytometry showed that ANG-2 EM@PPC uptake is enhanced in activated neutrophils and hitchhiking on neutrophils was more efficient in the stationary state than that in the flowing condition. Compared with the EM@PPC group, the neutrophil hitchhiking ability of the ANG-2 EM@PPC group was enhanced (uptake efficiency 24.9% vs. 31.1%). Fluorescence microscopy showed that ANG-2 EM@PPC changed the death pathway of neutrophils from neutrophil extracellular traps-osis (NETosis) to apoptosis. Western blot confirmed the production of neutrophil apoptotic bodies, and flow cytometry showed that the production rate was as high as 77.7%. Animal experiments showed that there was no significant difference in the distribution of engineered bacterial membrane biomimetic nanoparticles in the organs (heart, liver, spleen, lungs, and kidney) in the DiR group, the EM@PPC group, and the ANG-2 EM@PPC group ($P>0.05$), but there was higher distribution in the brain tissue in EM@PPC and ANG-2 EM@PPC groups compared to the DiR group ($P<0.05$). Engineered bacterial membrane biomimetic nanoparticles crossed the blood-brain barrier (BBB), and exhibited high affinity to and internalization by neutrophils located in brain tumors. Compared with PBS, PDA, PC, and PPC groups, the survival rate and body mass of mice in the EM@PPC group were improved, tumor fluorescence intensity was weakened, and apoptotic cells were increased. These trends were even more prominent in the ANG-2 EM@PPC group. No abnormality was found in the HE staining of any group. **Conclusion** An ANG-2 EM@PPC nanodelivery system with inflammation response characteristics was successfully prepared, capable of crossing BBB and targeting the tumor inflammatory microenvironment to improve the anti-glioma efficacy. This study provides a new drug delivery strategy for glioma treatment and offers a new idea for targeted drug delivery in the non-invasive inflammatory microenvironments in other central nervous system diseases.

【Key words】 Neutrophils Glioma Inflammation Blood-brain barrier Engineered bacterial membranes

在脑胶质瘤的治疗研究中,国内外学者持续探索突破血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的新方法^[1-5]。纳米载体在脑胶质瘤中的应用在医学界引起广泛关注,目前临床上常用的载体包括金属纳米颗粒(nanoparticles, NPs)、脂质体、树枝状聚合物等,通过受体介导的跨膜转运、转运体介导的转运、吸附介导的转运等方式穿透BBB实现治疗的目的^[6-9]。张姝月等^[10]构建了巨噬细胞膜仿生白蛋白纳米体系,有较好的胶质瘤靶向递药性能。TOPÇU等^[11]证明了抗体偶联纳米给药系统中的纳米颗粒能够与脑癌细胞特异性结合,在靶向脑肿瘤治疗方面展现出了巨大潜力。尽管已有纳米载体展现出在脑肿瘤治

疗中的潜力,但实现高效、靶向且安全的药物递送仍面临巨大挑战。目前,纳米载体的设计需考虑其生物相容性、稳定性及BBB穿透性,而这些特性往往相互制约,成为研究瓶颈。此外,虽然中性粒细胞等免疫细胞在肿瘤微环境中的特异性趋向作用受到关注^[12-13],但如何有效利用这一特性,并将其与纳米技术结合以实现精准递药,仍是当前研究的热点与难点。基于上述研究,本研究建立工程化细菌膜仿生纳米粒ANG-2 EM@PDA-PEI-CpG(简称ANG-2 EM@PPC,其中ANG-2指angiopep-2多肽,EM指*E. coli* membrane),探讨其在脑胶质瘤中的治疗作用,为脑胶质瘤的靶向治疗提供新思路,也为其他脑部疾病的治

疗研究开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料

pET(30a)-inaX-N/angiopep-2重组质粒由北京擎科生物有限公司进行构建, *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞(河南省生物工程技术研究中心);小鼠中性粒细胞(自提);小鼠胶质瘤-荧光素酶标记(GL261-Luc)细胞、GL261细胞、bEnd.3细胞(中国科学院细胞库);雄性C57/BL6小鼠(北京斯贝福),动物生产许可证号SCXK(Yu)2018-0004,于药学院IVC动物房饲养,自由采食、饮水。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、BCA蛋白浓度测定试剂盒、小鼠外周血中性粒细胞分离液试剂盒(北京索莱宝);超敏ECL化学发光试剂盒(新赛美);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(南京诺唯赞);QuickBlock™ Western封闭液、细胞凋亡检测试剂盒(碧云天);OmpA抗体(Biorbyt);His-Tag抗体(Cell Signaling Technology);山羊抗兔IgG、HRP Conjugated(Cwbio);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)ELISA kit、转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)ELISA kit、白细胞介素(interleukin, IL)-6 ELISA kit、IL-10 ELISA kit(杭州联科)。HT-7700透射电子显微镜(HITACHI)、GH17-DR3506酶标仪(中西器材)、CytoFLEX流式细胞分析仪(Beckman Coulter)、FV3000激光扫描共聚焦显微镜(Olympus)。所有程序均经河南省生物工程技术研究中心实验动物伦理委员会批准,批准号DWLL2024005。

1.2 inaX-N/angiopep-2制备及验证

于NCBI获取inaX-N(ACN91081.1)、angiopep-2(TFFYGGSRGKRNNFKTEEY)基因序列,构建pET(30a)-inaX-N/angiopep-2重组质粒表达载体,转化,将重组菌株涂布于含卡那霉素的LB固体琼脂培养基上,37℃过夜;挑取单菌落至含卡那霉素的LB液体培养基中,37℃培养2 h, IPTG诱导6 h,得到inaX-N-angiopep-2培养菌液。取3个500 μ L等份inaX-N/angiopep-2菌液,一、二、三等份置于冰上,二、三等份中加入20 μ L 25 mmol/L CaCl₂,三等份再加入2.5 μ L 20 mg/mL蛋白酶K,37℃水浴锅孵育20 min后加入6 μ L 200 mmol/L EDTA。离心得沉淀, SDS-PAGE进行检测。由于蛋白酶K无法进入细菌内部,只能对细菌表面的蛋白进行消化,故此方法是验证蛋白是否存在于细菌表面的金标准之一。

1.3 PEI-CpG的制备及表征

向含有2 mg PEI的EP管中加入1 mL去离子水配制PEI溶液,将其与CpG溶液(10 OD)按一定N/P比例(PEI分

子中氮原子和DNA分子中磷酸根基团的摩尔比)混合,25℃孵育30 min,于30 kD的超滤管中离心(2 000 r/min, 30 min)去除水分。琼脂糖凝胶电泳表征:向含有0.25 g琼脂糖粉末的50 mL锥形瓶中加入25 mL 1×TAE,微波炉煮沸3次溶化,室温下放置5 min后,加入2.5 μ L Gold View I,制备成1%琼脂糖凝胶。配制样品(N/P比为0、1、2、3、4、5、6、7.5、9和10的PEI-CpG溶液),电泳(100 V, 12 min)。凝胶成像仪成像。

1.4 ANG-2 EM@PPC的制备

ANG-2 EM的制备:取40 mL的inaX-N/angiopep-2菌液,离心(4℃、10 000 r/min、10 min);加入4 mL溶菌酶溶液(1 mg/mL),37℃孵育20 min后,加入15 mL PBS,使菌液分散在100 kD的超滤管中,离心得ANG-2 EM, PBS重悬收集备用;PPC的制备:取139.6 μ L PEI(2 mg/mL)加入到含有552 μ L DEPC水溶解CpG(10 OD)溶液的EP管内,混匀,25℃下水浴30 min,30 kD的超滤管中离心去除水分;接着用1 mL的Tris-HCl(pH 8.5, 10 mmol/L)进行重悬至10 mL圆底烧瓶中,加入1.26 mg盐酸多巴胺粉末,室温搅拌12 h;30 kD超滤管进行离心,重悬收集备用;ANG-2 EM@PPC的制备:将ANG-2 EM与PPC按照菌膜蛋白质量与PPC的质量比为5:1的比例进行混合包膜,超声8 min后30 kD超滤管进行离心,收集备用。

1.5 ANG-2 EM@PPC的表征和稳定性考察

透射电子显微镜(TEM)表征:取新制的纳米粒,去离子水稀释后滴加于碳支持膜上,滴加2%的磷钨酸染色液,放入TEM观察拍照,并以PC和PPC颗粒为对照。另取新制的ANG-2 EM@PPC,以PPC为对照,观察7 d内的粒径变化和Zeta电位,检测ANG-2 EM@PPC的稳定性。

1.6 ANG-2 EM@PPC体外抗肿瘤活性实验

1.6.1 细胞毒性考察

取小鼠新鲜抗凝全血,根据小鼠外周血中性粒细胞分离液试剂盒说明书提取中性粒细胞。以每孔 8×10^3 细胞接种到96孔板中,培养1 h, CCK-8法检测细胞毒性。加入不同质量浓度PPC和ANG-2 EM@PPC纳米粒(PDA质量浓度为5、10、20、40、60、80及100 μ g/mL),培养4 h后加入CCK-8混合溶液,孵育3 h,酶标仪测定450 nm处的吸光度值,此值正比于细胞存活率。

1.6.2 中性粒细胞及ANG-2 EM@PPC搭便车效率研究

将中性粒细胞以 1×10^6 /孔的密度接种在6孔板中。加入ANG-2 EM@PPC孵育以考察静止状态下中性粒细胞的摄取情况。将ANG-2 EM@PPC和中性粒细胞通过恒流泵(剪切应力为1.25 dyn/cm²)进行流动。收集中性粒细胞。离心(1 000 r/min, 5 min),置于流式细胞仪上分析

摄取情况。恒流泵中激活状态下的中性粒细胞(加fMLP诱导中性粒细胞激活)分别与EM@PPC和ANG-2 EM@PPC在含有炎性内皮细胞(加入TNF- α 20 ng/mL)的环境中诱导细胞24 h, 平板流动腔中进行循环1 h, 收集中性粒细胞。离心, PBS重悬沉淀, 加入APC anti-CD11b(1 : 100), 冰上避光孵育30 min, 离心, 弃去上清液。流式细胞分析仪分析摄取效率。

1.6.3 中性粒细胞死亡方式转变研究及凋亡小体的提取

中性粒细胞以每孔 5×10^5 /mL细胞接种于多聚赖氨酸包被的24孔板爬片上, 培养30 min, 待细胞贴壁后, 加入100 nmol/L 佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)诱导中性粒细胞产生中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)。然后分别加入EM@PPC和ANG-2 EM@PPC孵育4 h, 流式细胞术分析。中性粒细胞用星孢菌素($10 \mu\text{mol/L}$)诱导24 h, 加入ANG-2 EM@PPC($100 \mu\text{g/mL}$)孵育1 h, 根据凋亡小体(apoptotic bodies, Abs)提取试剂盒提取Abs, 常规Western blot、流式细胞术检测。

1.6.4 细胞摄取分析

中性粒细胞以 5×10^5 /孔接种于多聚赖氨酸包被的24孔爬片中, 过夜培养24 h; 用 $10 \mu\text{L}$ DiO(2 mg/mL)标记中性粒细胞Abs后, 加入到含有GL261细胞爬片的24孔板中; 加入 $1 \mu\text{L}$ fMLP诱导中性粒细胞激活后加入PPC或者ANG-2 EM@PPC; 多聚甲醛固定, Phalloidin标记细胞骨架, DAPI染色10 min, 封片剂封片, 置于激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)下观察摄取情况并拍照记录。

1.7 ANG-2 EM@PPC体内抗肿瘤活性实验

1.7.1 原位脑胶质瘤小鼠模型的建立及活体成像

原位脑胶质瘤小鼠模型建立方法: 取36只小鼠, 异氟烷麻醉小鼠, 立体定位仪上固定。消毒后剪开小鼠头部中部皮肤, 长约1 cm, 显示前囟及矢状缝。前颅外后0.15 mm, 往右2 mm处行颅骨钻孔。抽取GL261-Luc单细胞悬液 $5 \mu\text{L}$ (2×10^5 个细胞), 沿针孔垂直缓慢进针深度3 mm, 停留10 min后缓慢注射荷瘤细胞, 速度 $1 \mu\text{L/min}$ 。颅内注射并维持5 min后缓慢退针后缝合。10 d后, 腹腔注射200 μL 活体成像底物D-荧光素钾盐(3 mg/mL), 显像系统进行图像采集。依据活体成像活细胞“GL261-Luc-底物”氧化反应发光原理, 图像中有荧光者记为肿瘤形成, 无荧光者记为无肿瘤形成。

1.7.2 荷瘤小鼠中性粒细胞浸润, 血清和肿瘤的炎症因子水平考察

取模型组小鼠和对照组小鼠(正常小鼠), 每组3只。

中性粒细胞浸润检测: 小鼠断头取脑, 制备脑组织石蜡切片、脱蜡、抗原修复, 封闭, Ly6G一抗(稀释比例1 : 200)4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜。第二天加入荧光标记的二抗, 避光孵育90 min, 再向组织滴加DAPI染色液, 避光孵育15 min。抗荧光猝灭剂进行封片。共聚焦显微镜拍照并采集图像。使用Image J 1.53量化分析, 计算平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。血清和脑胶质瘤炎症因子水平检测: 收集眼球血液样本, 自然凝固离心取血清备用; 小鼠断头取肿瘤侧大脑组织, 组织匀浆机完全溶解组织, 离心取上清液备用; 分别按照TNF- α 、IL-6、TNF- β 1和IL-10 ELISA酶联免疫吸附检测试剂盒说明书, 450 nm和570 nm波长测定吸光度值, 绘制标准曲线, 计算炎症因子的含量。

1.7.3 ANG-2 EM@PPC分布考察

取模型组小鼠, 分为游离DiR组、ANG-2 EM@PPC组和EM@PPC组, 每组3只。分别尾静脉注射DiR、ANG-2 EM@PDA-PEI-CpG、EM@PDA-PEI-CpG(均 10 mg/kg)。在1、2、4、8、12和24 h时, 活体成像荧光系统对脑组织和主要器官(心、肝、脾、肺、肾)进行荧光分布监测。ImageJ定量。12 h后处死小鼠, 取小鼠脑冷冻切片, Ly6G抗体、CD31抗体进行免疫荧光染色, 置于CLSM进行荧光扫描, 并保存图片。

1.7.4 ANG-2 EM@PPC的体内药效学评价及生物安全性评价

实验分组为PBS、PDA、PC、PPC、EM@PPC和ANG-2 EM@PPC组, 每组4只。分别尾静脉注射PBS、PDA、PC、PPC、EM@PPC、ANG-2 EM@PPC(均 10 mg/kg), 给药3次, 每隔2 d进行活体成像观察肿瘤消退状况。观察小鼠状态并绘制小鼠体质量变化曲线。治疗结束后, 取小鼠脑组织及主要器官(心、肝、脾、肺和肾), 体积分数4%多聚甲醛固定24 h, 脱水、包埋, 制成组织蜡块, HE染色法观察各组细胞形态分析其病理学变化情况。使用末端脱氧核苷酸转移酶(dUTP)缺口末端标记(TUNEL)法检测脑组织细胞凋亡。

1.8 统计学方法

所有实验至少进行3次独立重复实验, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据统计分析均采用GraphPad Prism 8.0进行。两组间计量资料比较采用Bonferroni法, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 InaX-N/angiopep-2制备

InaX-N/angiopep-2蛋白的预测分子量为22 kD左右,

SDS-PAGE结果显示(图1A),泳道3在26 kD左右有明显较粗的蛋白条带,初步确定inaX-N/angiopep-2蛋白正常表达;Ang-2 EM与诱导后的inaX-N/angiopep-2全菌蛋白分子量保持一致,说明蛋白表达正确。

2.2 inaX-N/angiopep-2蛋白成功展示于细菌的表面

结果如图1B所示,经蛋白酶K消化后,inaX-N/angiopep-2重组菌的蛋白条带部分消失,目的条带被部分降解,出现许多小分子量蛋白,确证目的蛋白成功展示于细菌的表面。

2.3 PEI-CpG的制备及琼脂糖凝胶电泳分析

不同N/P比例PEI-CpG复合物的电泳结果如图1C所示,随着N/P比例增加,CpG条带逐渐消失并弥散在泳道上,当N/P比例增至6时,CpG条带完全消失,表明此时CpG与PEI完全形成复合物。

2.4 TEM结果分析

TEM结果表明PC、PPC和ANG-2 EM@PPC具有均一的球形结构。与PC相比,PPC具有明显的壳核结构,壳厚度约8.2 nm。由于ANG-2 EM的包覆,ANG-2 EM@PPC的壳厚度增加到约9.6 nm。ANG-2 EM@PPC表面有一层边界明显的细菌膜覆盖,表明ANG-2 EM@PPC制备成功。见图2A。

2.5 稳定性考察

图2B、2C结果显示,ANG-2 EM@PPC的粒径和Zeta电位在7 d内没有明显的变化,表明ANG-2 EM@PPC的稳定性良好。

2.6 细胞毒性与中性粒细胞摄取结果分析

CCK-8结果显示(图2D),不同质量浓度的药物处理

中性粒细胞后,细胞的存活率在95%以上,表明各组药物对中性粒细胞没有明显的毒性,生物相容性良好。中性粒细胞摄取结果显示(图2E),激活状态下的中性粒细胞摄取ANG-2 EM@PPC的效率是未激活状态下的中性粒细胞组摄取ANG-2 EM@PPC效率的101.8倍,是激活状态下的中性粒细胞组摄取PPC效率的6.8倍。

2.7 中性粒细胞搭便车效率研究

流动腔模型流式细胞术分析结果显示,静止状态下的中性粒细胞摄取ANG-2 EM@PPC与流动条件下的中性粒细胞相比,摄取效率(22.9% vs. 11.9%)是后者的1.92倍。见附图1(所有附图均请见网络资源附件)。

2.8 ANG-2 EM@PPC搭便车效率研究

流动腔实验检测搭中性粒细胞便车的效率结果显示,与EM@PPC组(24.9%)相比,ANG-2 EM@PPC在炎性部位的降速将中性粒细胞的搭便车效率(31.1%)提升至前者的1.25倍。见附图2。

2.9 ANG-2 EM@PPC稳定进入中性粒细胞内且改变其死亡方式

荧光显微镜表征结果(图3A)显示,与其他组比较,ANG-2 EM@PPC稳定进入中性粒细胞并很少有纳米粒从细胞中释放出来。与PBS组(2.52 ± 1.28)相比,ANG-2 EM@PPC组caspase-3活性(19.38 ± 3.12)是前者的约6.7倍(图3B),中性粒细胞从中性粒细胞胞外捕获网相关死亡(neutrophil extracellular traps-osis, NETosis)向凋亡转变。

2.10 中性粒细胞Abs的提取及表征结果分析

差速离心法收集凋亡小体进行Western blot(图3C),

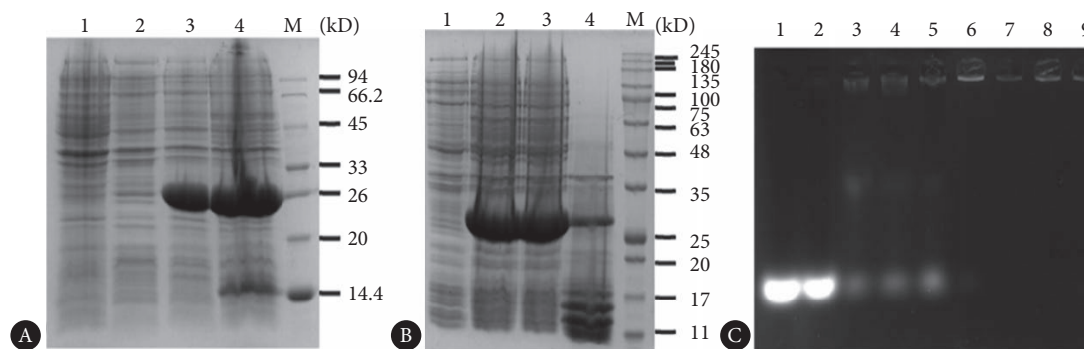


图1 inaX-N/angiopep-2、PEI-CpG的制备及表征

Fig 1 Preparation and characterization of inaX-N/angiopep-2 and PEI-CpG

A, Expression of inaX-N/angiopep-2 protein in *Escherichia coli* and analysis of extracted bacterial membranes. 1, BL21 (DE3) negative control; 2, inaX-N/angiopep-2 induction pre-whole bacteria; 3, inaX-N/angiopep-2 induction after whole bacteria; 4, Ang-2 EM, (M) protein marker. B, Analysis of inaX-N/angiopep-2 protein after proteinase K treatment. 1, whole bacteria before inaX-N/angiopep-2 induction; 2, whole bacteria ice bath (precipitation) after inaX-N/angiopep-2 induction; 3, whole bacteria plus CaCl₂ (precipitation) after inaX-N/angiopep-2 induction; 4, whole bacteria plus proteinase K (precipitation) after inaX-N/angiopep-2 induction; M, protein marker. C, Agarose gel electrophoresis of PEI-CpG prepared with different nitrogen-phosphorus ratios. 1, CpG; 2, PEI : CpG=1 : 1; 3, PEI : CpG=2.5 : 1; 4, PEI : CpG=4 : 1; 5, PEI : CpG=5 : 1; 6, PEI : CpG=6 : 1; 7, PEI : CpG=7.5 : 1; 8, PEI : CpG=9 : 1; 9, PEI : CpG=10 : 1.

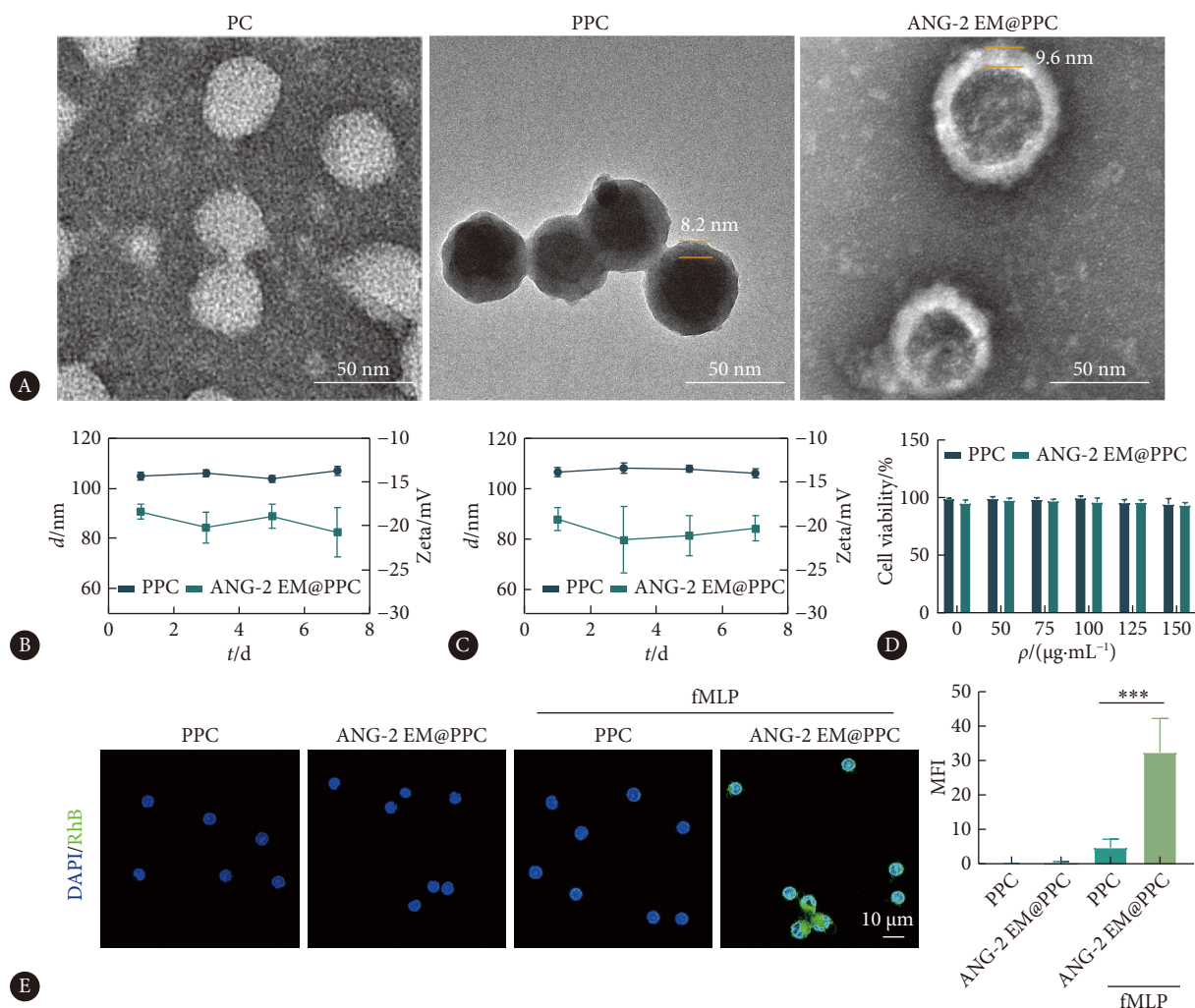


图 2 ANG-2 EM@PPC 的制备及表征

Fig 2 Preparation and characterization of ANG-2 EM@PPC

A, TEM results for PC, PPC, and ANG-2 EM@PPC nanosystems; B and C, stability investigation, analysis of particle size and Zeta potential of ANG-2 EM@PPC after dispersion in PBS and 10% FBS solution over different time intervals; D, effect of different concentrations on neutrophil viability after incubation; E, semi-quantitative analysis of PPC and ANG-2 EM@PPC uptake in unactivated and activated neutrophils, $n=6$, *** $P<0.001$. MFI: mean fluorescence intensity.

Abs和凋亡的中性粒细胞一样,高表达cleaved caspase-3蛋白和caspase-3蛋白,表明成功提取中性粒细胞Abs。流式细胞术结果显示,Abs产生比例高达77.7%。见附图3。

2.11 GL261细胞对中性粒细胞Abs的摄取结果分析

对小鼠胶质瘤GL261细胞摄取中性粒细胞Abs进行考察,结果如图3D所示,GL261细胞对Abs的摄取效率高于Control组[(17.62±3.58)% vs. (0.36±0.11)%],差异有统计学意义($t=11.804$, $P=0.007$)。

2.12 荷瘤小鼠脑胶质瘤中的中性粒细胞浸润和炎症因子结果分析

植入GL261-Luc细胞后第10天,肿瘤呈现明显的中性粒细胞浸润。免疫荧光结果显示(图4A、表1),肿瘤模型组Ly6G MFI值是对照组的2.8倍,中性粒细胞浸润程度增加;ELISA检测血清和脑组织炎症因子结果显示(表1),血

清和脑组织中,促炎因子(IL-6和TNF- α)表达水平高于抗炎因子(IL-10、TGF- β 1)的表达,脑胶质瘤处于一个炎性环境。

2.13 ANG-2 EM@PPC在体内的分布

如图4B所示,不同制剂组的脏器(心、肝、脾、肺、肾)分布没有明显差别;如图4C所示,与游离DiR组相比,ANG-2 EM@PPC和EM@PPC在脑组织中明显蓄积($P<0.001$),且ANG-2 EM@PPC组到达脑部的积累更明显。定量结果显示,ANG-2 EM@PPC在脑部的荧光强度约为EM@PPC的2.01倍。

2.14 ANG-2 EM@PPC在脑内的分布

如图4D所示,脑部肿瘤处,中性粒细胞的天蓝色信号包裹PDA红色信号与CpG绿色信号共定位后的黄色信号,表明ANG-2 EM@PPC对脑部肿瘤处的中性粒细胞有

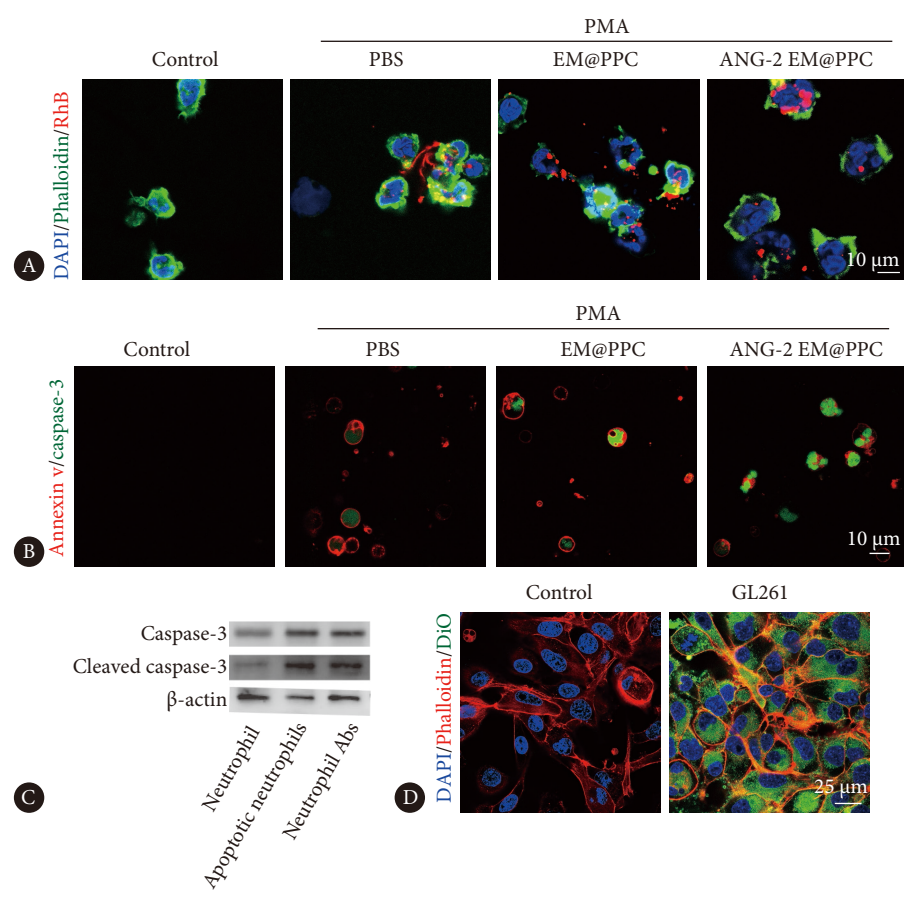


图 3 ANG-2 EM@PPC的体外抗肿瘤活性试验

Fig 3 Antitumor activity of ANG-2 EM@PPC in vitro

A, Distribution of AANG-2 EM@PPC in neutrophils; B, annexin V-mCherry/caspase-3 dual labeling technology to detect neutrophil apoptosis images; C, Western blot analysis of caspase-3 and cleaved caspase-3 in neutrophils, apoptotic neutrophils and Abs; D, uptake fluorescence image and semi-quantitative analysis of DiO-labeled Abs in GL261 cells. PMA: phorbol myristate acetate.

表 1 荷瘤小鼠脑组织中的中性粒细胞浸润情况及炎症情况分析

Table 1 Analysis of neutrophil infiltration and inflammation in the brain tissue of tumor-bearing mice

Index	<i>n</i>	Control	GL261 model	<i>t</i>	<i>P</i>
MFI	3	2.52±0.87	7.63±1.61	4.836	0.005
IL-6 in serum/(pg/mL)	3	68.46±17.54	259.83±32.58	8.950	<0.001
TNF-α in serum/(pg/mL)	3	21.32±6.58	366.87±59.45	10.006	<0.001
IL-10 in serum/(pg/mL)	3	55.49±11.46	289.83±42.86	9.149	<0.001
TGF-β1 in serum/(ng/mL)	3	9.83±2.35	33.98±7.62	5.246	0.003
IL-10 in brain/(ng/g)	3	0.63±0.18	2.39±0.76	3.903	0.011
TNF-α in brain/(ng/g)	3	2.72±0.96	6.51±1.73	3.318	0.021

MFI: mean fluorescence intensity.

很高的亲和力,并可以被其内化。ANG-2 EM@PPC的黄色信号没有与CD31的粉红色信号共定位,表明ANG-2 EM@PPC可以穿过BBB到达脑实质。

2.15 ANG-2 EM@PPC的体内药效学评价

与PBS、PDA、PC、PPC组相比,EM@PPC治疗后,生存率有所提高,而ANG-2 EM@PPC治疗后,生存率显著

提高(图5A),该组小鼠体质量在第5天时已恢复至基线(第0天)水平附近(图5B)。脑组织TUNEL染色结果显示(图5C),EM@PPC治疗后,小鼠脑组织凋亡细胞数量有所升高,而ANG-2 EM@PPC治疗组的小鼠脑组织凋亡细胞数量升高最明显。给药期间的活体成像见图5D,EM@PPC治疗后,小鼠体内总荧光强度有所降低,而

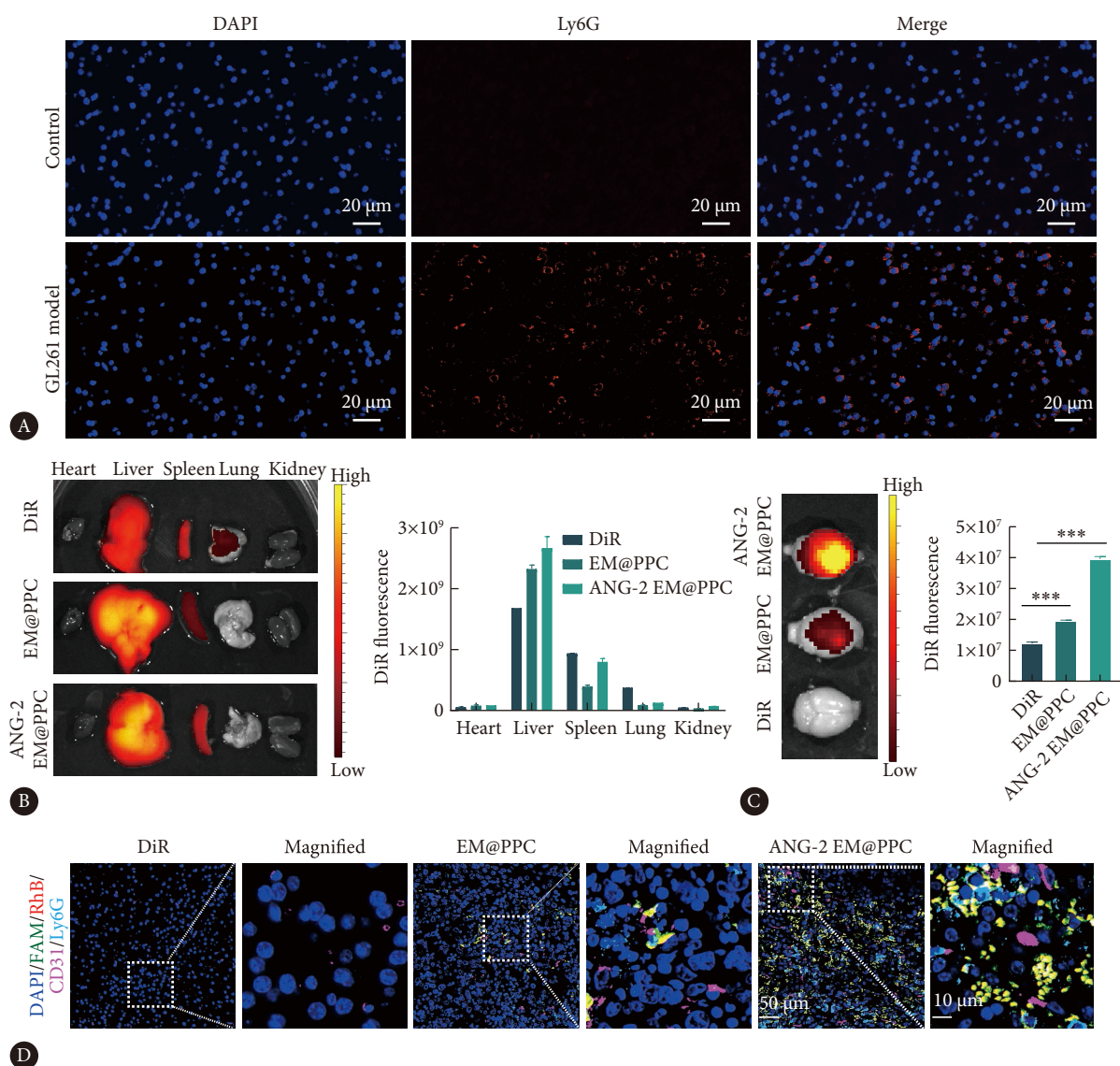


图 4 ANG-2 EM@PPC体内抗肿瘤活性实验

Fig 4 ANG-2 EM@PPC *in vivo* anti-tumor activity experiment

A, CLSM images of brain tumor sections; B, fluorescence images and fluorescence intensity analysis results of different preparation groups ($n=3$); C, fluorescence images and fluorescence intensity analysis of mouse brains from different preparation groups ($n=3$, *** $P<0.001$); D, distribution of ANG-2 EM@PPC in the brain tissue of glioma mice.

ANG-2 EM@PPC治疗后,小鼠体内总荧光强度明显降低。

2.16 ANG-2 EM@PPC的生物安全性评价

HE染色显示(图6)各治疗组小鼠的主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、脑)组织均未产生明显的病理变化,表明该药物递送系统具有良好的体内安全性。

3 讨论

癌症的发生和发展通常与慢性炎症有关,某些癌症治疗方法已被证明可以引起急性炎症。一旦引发炎症,中性粒细胞就是关键的细胞类型,它能够主动归巢到组织损伤或感染的部位,沿着趋化因子的浓度梯度,穿过内皮衬里,深入非血管区域。在本研究过程中,植入GL261-

Luc细胞后第10天,肿瘤呈现明显的中性粒细胞浸润,中性粒细胞用荧光素标记的Ly6G抗体标记,肿瘤模型组的中性粒细胞浸润程度是对照组的2.8倍;对血清和脑组织炎症因子进行ELISA检测,血清中促炎因子(IL-6和TNF- α)表达水平高于抗炎因子(IL-10、TGF- β 1)的表达;而脑组织中,促炎因子(TNF- α)表达水平同样高于抗炎因子(IL-10)的表达,表明脑胶质瘤处于一个炎性环境。中性粒细胞被用作药物或NPs的“自身宿主”天然载体,用于纳米介导治疗。因此,本研究所采用的中性粒细胞搭便车策略在肿瘤炎症治疗方面可行。

细菌膜包覆法作为一种仿生策略在开发具有较高载药量、增强脑靶向性的智能药物递送系统方面具有极大

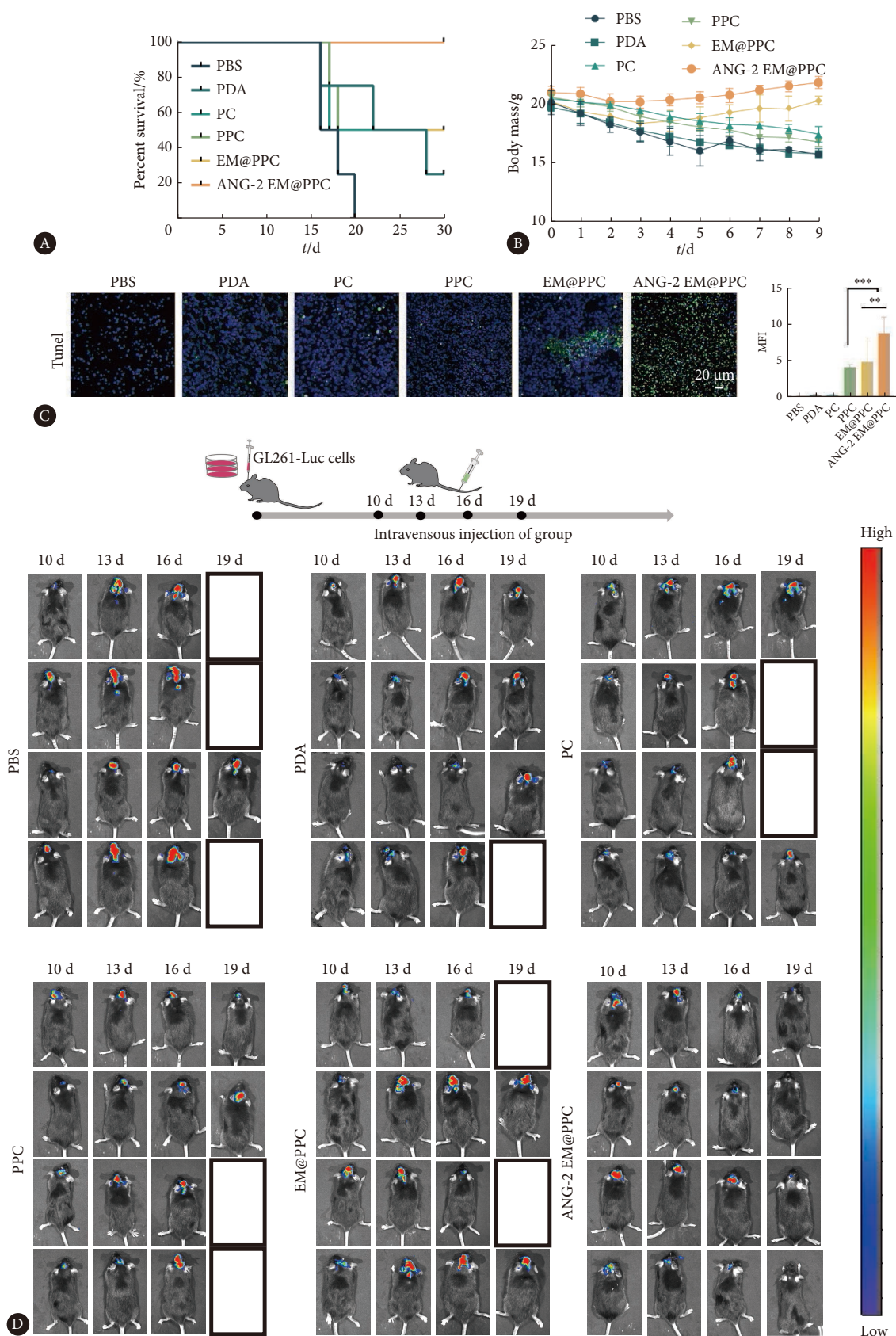


图5 给药模型中不同制剂组对小鼠健康状况和小鼠脑细胞凋亡的影响

Fig 5 The effects of different formulation groups on the health status of mice and apoptosis of mouse brain cells in the dosing model

A, Mouse survival results; B, body mass change results of mice; C, TUNEL staining results and *in vivo* imaging during dosing for quantitative analysis of apoptotic cells ($n=3$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$); D, live imaging during administration. The blanks indicate death.

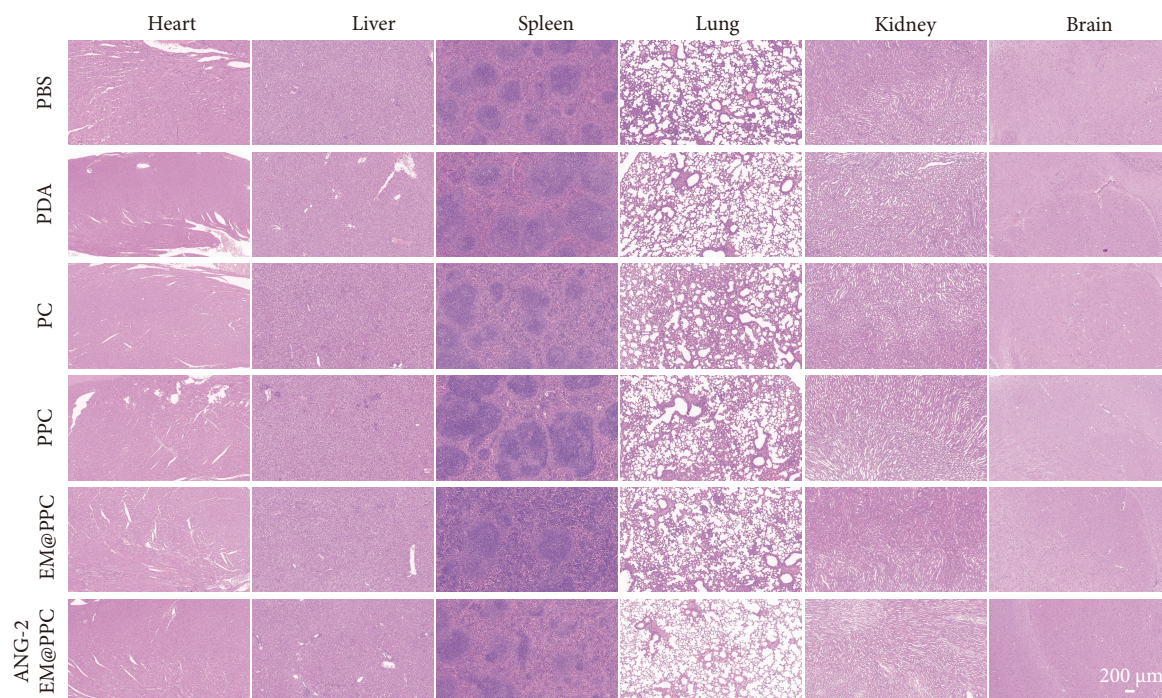


图 6 不同制剂组主要脏器(心、肝、脾、肺、肾和脑)的HE染色结果

Fig 6 H&E staining results of major organs (heart, liver, spleen, lung, kidney, and brain) in different preparation groups

的潜力。ANG-2是一种对低密度脂蛋白受体相关蛋白-1具有高亲和力的活性靶肽,具有脑穿透能力。本研究通过制备工程化的细菌膜,利用ANG-2可富集炎症血管内皮细胞的特性,可以触发炎症血管部位的ANG-2 EM@PPC黏附。与EM@PPC组相比,由于ANG-2 EM@PPC和中性粒细胞在炎症内皮细胞部位的黏附(降速),ANG-2EM@PPC组将中性粒细胞的搭便车效率提高至前者的1.25倍,从而提高复杂流动血液中的中性粒细胞劫持效率。本研究证实了ANG-2 EM@PPC在炎症内皮细胞部位的降速,有效提高了中粒细胞搭便车效率,为后续跨越BBB进行递药提供了依据。合成的纳米颗粒不具有主动趋化特性,不易跨越常见的生物屏障,一般只能通过EPR效应被动靶向至肿瘤部位,因此肿瘤富集效率相对较低。肿瘤的发生发展与慢性炎症紧密相关。中性粒细胞可以快速响应炎症,大量产生并通过趋化反应穿过多道生理屏障到达炎症部位。因此中性粒细胞已被发展为纳米药物的细胞载体,用于克服纳米药物递送过程的多重生理屏障,但如何发展可实现高效特异靶向体内中性粒细胞的普适性方法是未来实现该思路的关键。本研究使用的是工程化的细菌膜来包覆药物递送系统,能够提高递送效率,为其他同类型的研究搭乘中性粒细胞效率相关实验提供借鉴和参考。

本研究中,ANG-2 EM@PPC搭便车中性粒细胞介导中性粒细胞从NETosis到凋亡的调控,从而抑制肿瘤生

长。体外实验结果表明,基于搭便车中性粒细胞和死亡模式重编程,揭示了一种新的药物递送途径,在该途径中,ANG-2 EM@PPC处理的中性粒细胞Abs诱导胶质瘤GL261细胞凋亡,是本研究的独特发现之处,关于NETs能介导癌细胞侵袭特性的发生及进展,临床方面的研究较少,可在后续进行进一步研究。

针对胶质瘤研究首要的一点是建立准确可靠的胶质瘤模型。脑原位移植瘤模型形成的胶质瘤生物学性质与人类更接近,是一种理想的研究脑胶质瘤的生物学行为和治疗方法的实验工具,但不如皮下移植瘤易于观察。脑胶质瘤模型制备的结果受多种因素的影响,为保证造模成功,本研究可为原位脑胶质瘤模型建立提供一定的参考:①保证细胞活力及接种数量。整个接种过程中要将细胞悬液置于冰上保存,用时摇匀,避免细胞贴壁、堆积,保持浓度均匀。②选择合适的接种部位。选择的注射点的目的是保证肿瘤能在该位点的前后、左右、上下方向有足够的生长空间,从而保证肿瘤生长的大小和良好的生长形态。采取立体定向仪下准确的定位,既保证足够的深度,又防止肿瘤细胞进入侧脑室。③防止动物模型感染。

本研究成功制备了ANG-2 EM@PDA-PEI-CpG这种具有炎症响应特性的纳米颗粒,证明了该纳米颗粒能跨越BBB靶向聚集于肿瘤炎症微环境,并提高抗胶质瘤效应,该研究为胶质瘤治疗提供新的给药策略。

* * *

作者贡献声明 赵印震负责正式分析、经费获取、研究项目管理和初稿写作, 李玉林负责数据审编和监督指导, 李娇负责数据审编、正式分析和验证, 倪明立负责研究方法和提供资源, 王继创负责正式分析和调查研究, 王晓军负责验证和可视化, 程蕾负责研究项目管理和审读与编辑写作, 牛文革负责调查研究和提供资源, 张应福负责研究方法和提供资源, 王云龙负责论文构思、数据审编和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊, 且对将要发表版本进行最终定稿, 并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution ZHAO Yinzhen is responsible for formal analysis, funding acquisition, project administration, and writing--original draft. LI Yulin is responsible for data curation and supervision. LI Jiao is responsible for data curation, formal analysis, and validation. NI Mingli is responsible for methodology and resources. WANG Jichuang is responsible for formal analysis and investigation. WANG Xiaojun is responsible for validation and visualization. CHENG Lei is responsible for project administration and writing--review and editing. NIU Wenge is responsible for investigation and resources. ZHANG Yingfu is responsible for methodology and resources. WANG Yunlong is responsible for conceptualization, data curation, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] TSIEH C. Stereotactic radiation therapy with concurrent immunotherapy for recurrent glioblastoma--hope or hype? *Neuro Oncol*, 2021, 23(4): 535–536. doi: 10.1093/neuonc/noab029.
- [2] SABU A, LIU T, NG S, *et al.* Nanomedicines targeting glioma stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(1): 158–181. doi: 10.1021/acsami.2c03538.
- [3] MALONG L, NAPOLI I, CASAL G, *et al.* Characterization of the structure and control of the blood-nerve barrier identifies avenues for therapeutic delivery. *Dev Cell*, 2023, 58(3): 174–191.e8. doi: 10.1016/j.devcel.2023.01.002.
- [4] HARATI R, VILLÉGIER A, BANKS W, *et al.* Susceptibility of juvenile and adult blood-brain barrier to endothelin-1: regulation of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression and transport activity. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 273–288. doi: 10.1186/1742-2094-9-273.
- [5] FAN Y, XU C, DENG N, *et al.* Understanding drug nanocarrier and blood-brain barrier interaction based on a microfluidic microphysiological model. *Lab Chip*, 2023, 23(7): 1935–1944. doi: 10.1039/d2lc01077a.
- [6] QIU Z Y, YU Z H, XU T, *et al.* Novel nano-drug delivery system for brain tumor treatment. *Cells*, 2022, 11(23): 3761. doi: 10.3390/cells11233761.
- [7] HSU T I, CHEN Y P, ZHANG R L, *et al.* Overcoming the blood-brain tumor barrier with docetaxel-loaded mesoporous silica nanoparticles for treatment of temozolomide-resistant glioblastoma. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(17): 21722–21735. doi: 10.1021/acsami.4c04289.
- [8] ZHOU Y, PENG Z, SEVEN E S, *et al.* Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release*, 2018, 270: 290–303. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.12.015.
- [9] FOSSATI G, RICEVUTI G, EDWARDS S W, *et al.* Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathol*, 1999, 98(4): 349–354. doi: 10.1007/s004010051093.
- [10] 张姝月, 何美, 孙晨, 等. 巨噬细胞膜仿生白蛋白纳米体系的构建及其胶质瘤靶向递药性能评价. *中国药理学杂志*, 2022, 57(8): 636–644. doi: 10.11669/cpj.2022.08.008.
ZHANG S Y, HE M, SUN C, *et al.* Construction of macrophage membrane-coated albumin nanoparticles and its drug delivery evaluation for glioma *in vitro*. *Chin Pharm J*, 2022, 57(8): 636–644. doi: 10.11669/cpj.2022.08.008.
- [11] TOPÇU B T, BOZDAĞ PEHLIVAN S, AKDAĞ Y, *et al.* Antibody conjugated nano-enabled drug delivery systems against brain tumors. *J Pharm Sci*, 2024, 113(6): 1455–1469. doi: 10.1016/j.xphs.2024.03.017.
- [12] WANG Z, YANG CH, LI L L, *et al.* CD62Ldim neutrophils specifically migrate to the lung and participate in the formation of the pre-metastatic niche of breast cancer. *Front Oncol*, 2020, 10: 540484. doi: 10.3389/fonc.2020.540484.
- [13] MARKWELL S M, ROSS J L, OLSON C L, *et al.* Necrotic reshaping of the glioma microenvironment drives disease progression. *Acta Neuropathol*, 2022, 143(3): 291–310. doi: 10.1007/s00401-021-02401-4.

(2024-05-22收稿, 2024-07-02修回)

编辑 吕熙



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© 2024《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有

Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Science)