

• 生物技术与方法 •

PhaP 介导 EGFR 靶向多肽修饰的肿瘤靶向 PHBHHx 纳米药物递送载体的构建

樊帆, 马建岗, 卢晓云, 牛腾, 吴志民

西安交通大学 生命科学与技术学院 生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049

樊帆, 马建岗, 卢晓云, 等. PhaP 介导 EGFR 靶向多肽修饰的肿瘤靶向 PHBHHx 纳米药物递送载体的构建. 生物工程学报, 2017, 33(6): 1028–1036.

Fan F, Ma JG, Lu XY, et al. Development of tumor targeting PHBHHx nanoparticles by PhaP mediated immobilization of EGFR-targeting peptide. Chin J Biotech, 2017, 33(6): 1028–1036.

摘要: 聚羟基脂肪酸 (PHA) 颗粒表面结合蛋白 PhaP 具有与疏水性高分子材料表面紧密结合的能力, 本研究将 EGFR 靶向多肽 (ETP) 与 PhaP 进行融合表达, 构建了 ETP-PhaP 融合蛋白表达的重组工程菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)(pPI-ETP-P)。经对工程菌株的诱导表达及 ETP-PhaP 融合蛋白的纯化后, 通过 PhaP 蛋白介导能够有效地将 ETP-PhaP 融合蛋白修饰于 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯 (PHBHHx) 纳米微球表面, 构建成为具有 EGFR 靶向作用的药物递送载体。分别检测宫颈癌细胞系 SiHa(EGFR 高表达) 和 CaSKi(EGFR 低表达) 对 ETP-PhaP 修饰的 PHBHHx 纳米药物载体和未经修饰的纳米药物载体的吞噬情况。结果显示, 纯化的 ETP-PhaP 融合蛋白能够很好地吸附于 PHBHHx 颗粒的表面, 经 ETP-PhaP 融合蛋白修饰的 PHBHHx 纳米药物载体对 EGFR 高表达的宫颈癌 SiHa 细胞的靶向效果强于 EGFR 低表达的 CaSKi 细胞系。这一结果表明了 PhaP 介导的 PHBHHx 纳米微球表面 EGFR 靶向多肽修饰具有简便、高效的优势, 为疏水性纳米药物载体表面功能多肽修饰提供了一种新策略。

关键词: PHA 颗粒表面结合蛋白, 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯, 表皮生长因子受体, 肿瘤靶向, 药物递送载体

Received: November 18, 2016; **Accepted:** February 6, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81172170, 81371288).

Corresponding author: Xiaoyun Lu. Tel/Fax: +86-29-82668463; E-mail: luxy05@mail.xjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81172170, 81371288)资助。

网络出版时间: 2017-04-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170411.1704.002.html>

Development of tumor targeting PHBHHx nanoparticles by PhaP mediated immobilization of EGFR-targeting peptide

Fan Fan, Jiangang Ma, Xiaoyun Lu, Teng Niu, and Zhimin Wu

Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

Abstract: PHA granule binding protein phasin (PhaP) has a high affinity for hydrophobic materials and can bind to hydrophobic polymers via strong hydrophobic interaction. In this study, an EGFR-targeting peptide (ETP) was fused with PhaP and the fusion protein ETP-PhaP was produced in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) (pPI-ETP-P) and then purified by Ni affinity purification. The tumor targeting PHBHHx nanoparticles were developed based on PhaP mediated ETP immobilization and the cellular uptake of the ETP-PhaP modified PHBHHx NPs and none modified PHBHHx NPs by cervical cancer cell lines SiHa (EGFR over expressed) and CaSKi (EGFR low expressed) were analyzed. The purified ETP-PhaP could be adsorbed onto the hydrophobic surface of PHBHHx NPs. The ETP-PhaP modified PHBHHx NPs could target to EGFR over expressed cervical cancer cells SiHa more efficiently than to the EGFR low expressed CaSKi cells. These results demonstrated the advantage in effectiveness and convenience of PhaP mediated ETP adsorption on PHBHHx nanoparticles, providing a novel strategy for hydrophobic nanocarrier surface modification.

Keywords: PhaP, PHBHHx, EGFR, tumor targeting, drug delivery carrier

纳米技术的快速发展及其在抗肿瘤药物递送领域的应用已经显示出其在延长药物作用时间、增加疗效、降低毒副作用、缓控释给药等方面的优势^[1-3]。通过在纳米药物载体表面修饰特定的肿瘤靶向分子,可以进一步提高纳米药物在肿瘤局部的聚集,并可以通过配体受体介导的细胞内吞作用,实现肿瘤细胞内释药,减少肿瘤药物耐药性的产生等^[4-5]。生物可降解高分子材料肿瘤靶向纳米药物开发中常用的载体材料,因其良好的生物相容性、控释能力以及生物可降解性而被广泛用于纳米药物^[6-8],但其表面功能性靶向分子的修饰方法仍然较为局限。

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoate, PHA) 是一类由多种微生物胞内合成的生物可降解聚酯材料^[9],基于其脂肪族生物聚酯的化学性质,其在作为疏水性药物的包封及缓释载体

方面具有很好的优势^[10-13]。3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯 (PHBHHx) 是 PHA 家族中可加工性能较好的一种。PHBHHx 具有良好的生物可降解性和生物相容性^[14]。天然 PHA 颗粒表面结合的 PHA 颗粒表面结合蛋白 (PhaP) 是一种低分子量的两亲性蛋白^[15],除了可与 PHA 材料结合之外,还可以在菌体中结合在胞内形成的三酰甘油包涵体上^[16],或通过疏水作用与疏水性高分子如聚乳酸或聚苯乙烯等材料表面很好地结合^[17]。PhaP 蛋白能够与其他蛋白或多肽分子融合表达,从而通过 PhaP 介导将功能多肽或蛋白质固定化呈递于疏水材料表面^[18-19]。有学者先后将麦芽糖结合蛋白 (MBP)、 β -半乳糖苷酶 (LacZ)、氯霉素乙酰基转移酶 (CAT)^[18]、小鼠白细胞介素-2 (IL-2)、髓磷脂寡树突胶质细胞糖蛋白 (MOG)^[19]等多种蛋白通过此方法与 PhaP

融合表达后合成了表面负载相关蛋白的 PHA 微球。Yao 等还通过将人类酸性糖蛋白 (hAGP) 及人类表皮生长因子 (hEGF) 与 PhaP 融合表达, 构建了 hAGP-PhaP 和 hEGF-PhaP 修饰的 PHA 纳米颗粒, 分别实现了其对肝癌细胞和巨噬细胞的靶向聚集作用^[20]。本课题组前期也通过将人类免疫共刺激分子 B7-2 与 PhaP 蛋白融合表达后呈递于 PHBHHx 纳米颗粒表面, 使功能化的纳米微球具有活化淋巴细胞的生物活性作用^[21]。本研究中, 我们将表皮生长因子受体靶向多肽 (ETP) 与 PhaP 蛋白融合表达, 经过重组大肠杆菌的诱导表达和 ETP-PhaP 融合蛋白的分离纯化后, 通过 PhaP 蛋白与 PHBHHx 纳米微球表面的相互作用, 构建了具有 EGFR 靶向性的 PHBHHx 纳米药物递送载体。采用 ETP 多肽而非天然的 EGF 对 PHBHHx 纳米微球表面进行修饰, 在实现微球对 EGFR 的靶向作用的同时, 能够减少采用天然 EGF 靶向 EGFR 时可能造成的对受体功能的激活作用及由于受体激活引起的下游的细胞效应。研究中通过体外细胞学实验证明了 ETP-PhaP 修饰的 PHBHHx 纳米微球靶向肿瘤细胞表面 EGFR 的有效性, 使得 PhaP 介导的纳米微球表面多肽修饰技术为包括 PHA 在内的多种疏水性高分子微球表面的功能化修饰提供了简便高效的策略。

1 材料与方法

1.1 ETP-PhaP 融合蛋白表达质粒的构建及诱导表达

编码 ETP-PhaP 融合蛋白的 DNA 序列片段由上海捷瑞生物技术有限公司合成, 在 ETP-PhaP 融合蛋白编码序列 3'端设计合成有一个组氨酸标签, 且 DNA 片段 5'和 3'端分别合成有 *Nde* I

和 *Bam*H I 的酶切位点序列。合成的 DNA 片段经双酶切后亚克隆至表达载体 pTwin2 中, 获得的 ETP-PhaP 融合蛋白表达质粒 pPI-ETP-P 转入 *E. coli* BL21(DE3)菌株中构建得到用于该融合蛋白表达的重组 *E. coli* BL21(DE3)(pPI-ETP-P) 工程菌。采用添加 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基进行重组大肠杆菌 BL21(DE3)(pPI-ETP-P) 菌株的培养, 在 200 r/min、37 °C 下培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.7 时, 添加 0.5 mmol/L 的 IPTG 并在 23 °C 下继续培养 6 h 进行 ETP-PhaP 融合蛋白的诱导表达。

1.2 ETP-PhaP 融合蛋白的分离纯化

培养结束后收集菌体, 超声裂解后于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 上清中的 ETP-PhaP 融合蛋白进一步通过镍亲和柱 (GE Healthcare, USA) 进行纯化, 洗脱的纯化蛋白进行脱盐处理后进行 12%的 SDS-PAGE 分离, 并通过抗组氨酸标签抗体为一抗, HRP 偶联的小鼠 IgG 抗体为二抗进行 ETP-PhaP 融合蛋白的免疫印迹鉴定。

1.3 载荧光素 PHBHHx 纳米微球的制备

称取 20 mg PHBHHx 材料 (用于制备游离 PHBHHx 纳米颗粒) 或 20 mg PHBHHx 材料和 2 mg 罗丹明 B (用于制备 PHBHHx 纳米荧光颗粒) 溶于 1 mL 氯仿中。将溶解有荧光素和材料的氯仿溶液用注射器缓慢加入 5 mL 的 1% PVA (*W/V*) 溶液中并超声分散 10 min 形成乳液。将乳化液转移至磁力搅拌器上, 充分搅拌 6 h 使 PHBHHx 纳米颗粒固化, 室温下减压蒸馏除去体系中残留的氯仿。制备的纳米颗粒悬液在 12 000 r/min 离心 20 min, 用双蒸水清洗沉淀部分后将其重悬于 5 mL 的 PBS 缓冲液中, 采用颗粒粒度分析仪 (马尔文公司, 英国) 测定 PHBHHx 纳米颗粒粒径及分布。通过气相色谱法测定得到的 PHBHHx 纳米

微球的质量,分别计算制备游离 PHBHHx 纳米微球和载罗丹明 B 的 PHBHHx 纳米微球的产率。

1.4 PHBHHx 纳米颗粒表面 ETP-PhaP 蛋白的修饰及表征

将 200 μL 浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ETP-PhaP 融合蛋白与 1 mL 的 PHBHHx 纳米颗粒悬液 (1 mg/mL) 混合后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 3 h。进一步在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 条件下离心 30 min 收集修饰后的 PHBHHx 纳米颗粒。收集获得的修饰后颗粒经 PBS 缓冲液洗涤 2 次后,其表面结合的蛋白组分用 200 mL 的 1 \times Laemmli SDS-PAGE 缓冲液(Tris-HCl 63 mmol/L,甘油 10%,SDS 2%,溴酚蓝 0.002 5%,pH 6.8)变性洗脱,用 10%的 SDS-PAGE 分离后,转印至 PVDF 膜进行 Western blotting 鉴定(一抗:组氨酸标签抗体,CW0286;二抗:抗小鼠 IgG 抗体,CW0102,Beijing CoWin Bioscience Co. Ltd.)。上清组分通过 BCA 法进行蛋白浓度测定,并与颗粒表面洗脱的蛋白一起进行 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测。

1.5 人宫颈癌 SiHa 和 CaSki 细胞的体外培养及其 EGFR 表达水平鉴定

采用添加 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,体外培养人宫颈癌 SiHa 和 CaSki 细胞。Western blotting 检测两种细胞中 EGFR 的表达水平。EGFR 特异性抗体(#d38b1,Cell Signaling Technology)为一抗(1:1 000),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(北京中杉金桥生物公司)为二抗(1:5 000),DAP 化学发光底物购自 Thermo Scientific (34079)。

1.6 ETP-PhaP 修饰的 PHBHHx 纳米颗粒的吞噬检测

为检测 ETP-PhaP 修饰的 PHBHHx 纳米颗粒

对 EGFR 高表达肿瘤细胞的体外靶向效果,0.5 mg/mL 的 ETP-PhaP 修饰及未经修饰的 PHBHHx 荧光纳米颗粒分别与 SiHa 和 CaSki 细胞共同孵育 1 h。孵育结束后,用 PBS 将细胞清洗 3 次,荧光显微镜观察细胞,并用酶标仪测定每孔细胞的荧光强度。

1.7 数据处理与统计学分析

所有实验设至少 3 个平行样品,实验数据表示为 3 次独立实验结果的平均数 \pm 标准差;应用软件 SPSS 13.0 进行 t 检验, $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 ETP-PhaP 融合蛋白表达载体的构建及表达宿主的验证

ETP-PhaP 融合蛋白的编码序列经 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切后插入表达载体 pTwin2 质粒中,获得 ETP-PhaP 融合蛋白的表达质粒 pPI-ETP-P(图 1A),将其转化入 *E. coli* BL21(DE3) 并再次进行质粒酶切验证(图 1B),获得重组 ETP-PhaP 融合蛋白表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)(pPI-ETP-P)。

2.2 ETP-PhaP 融合蛋白的诱导表达及纯化

重组 *E. coli* BL21 (DE3) (pPI-ETP-P)经 IPTG 诱导表达 ETP-PhaP 融合蛋白,培养结束后裂解菌体,以镍亲和柱纯化 ETP-PhaP 融合蛋白,纯化过程各组分的 SDS-PAGE 图如图 2A 所示,图中在重组菌全菌裂解液(泳道 2)及纯化出的目标蛋白样品(泳道 4)中在 ETP-PhaP 融合蛋白 15.5 kDa 理论分子量大小的位置上均有一条明显的蛋白条带。Western blotting 结果显示(图 2B),这两条蛋白条带均可被抗组氨酸标签抗体特异识别,判断为诱导表达出的 ETP-PhaP 融合蛋白。

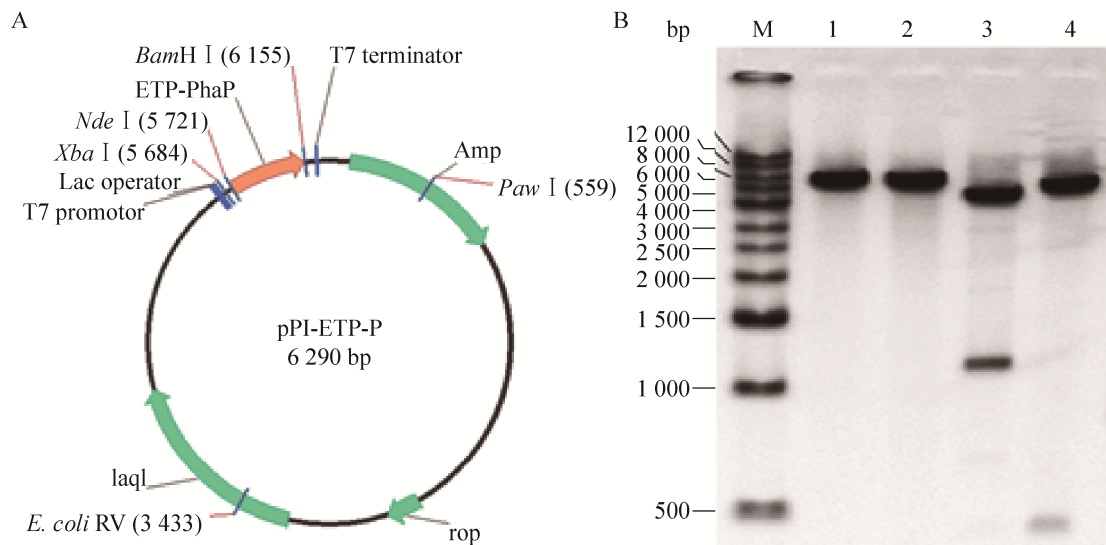


图1 pPI-ETP-P质粒(A)及其酶切验证图(B)

Fig. 1 pPI-ETP-P plasmid map (A) and verification (B). M: DNA marker (Shanghai Genesay Biotech Co., Ltd. China). 1: pPI-ETP-P digested with *Xba* I; 2: pPI-ETP-P digested with *Bam*H I; 3: pPI-ETP-P digested with *Xba* I + *Pvu* I; 4: pPI-ETP-P digested with *Xba* I + *Bam*H I.

2.3 PHBHHx 荧光纳米微球的制备及表征

采用乳化/溶剂挥发方法制备得到了空白及包裹荧光素罗丹明 B 的 PHBHHx 纳米颗粒。空白 PHBHHx 纳米颗粒的平均粒径 ((155.7±17.2) nm) 略小于载荧光素的 PHBHHx 纳米颗粒 ((187.6±11.1) nm)，但两者的粒径分布都较为均一，多分散系数 (PDI) 分别为 0.153 与 0.037。两种颗粒表面 Zeta 电位均为 -30 mV 左右，其中空白 PHBHHx 纳米颗粒为 (-29.2±1.5) mV，载荧光素的 PHBHHx 纳米颗粒为 (-30.1±1.3) mV。包裹荧光素罗丹明 B 的 PHBHHx 纳米颗粒的产率 (45.9%±3.1%) 略低于空白 PHBHHx 纳米颗粒的产率 (61.7%±2.3%)。

2.4 ETP-PhaP 融合蛋白在 PHBHHx 纳米微球表面的修饰

将 500 μL 浓度为 1 mg/mL 的 ETP-PhaP 融合

蛋白 (500 μg) 与 2 mL 的 PHBHHx 纳米颗粒悬液 (0.5 mg/mL) 在 4 °C 条件下混合孵育 3 h 后，离心分别收集颗粒及上清，颗粒经缓冲液洗涤后，其表面结合蛋白经 100 μL 的 1×Laemmli SDS-PAGE 缓冲液洗脱。BCA 法对孵育结束后上清中的蛋白定量检测结果显示，上清中残留蛋白浓度为 (138.8±4.6) μg/mL，计算可知 PHBHHx 纳米颗粒表面对 ETP-PhaP 融合蛋白的吸附量约为 (153±11.5) μg/mg。分别将上清和颗粒表面洗脱的融合蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测，结果如图 3 所示。上清及颗粒表面 ETP-PhaP 融合蛋白比值的计算值与 Western blotting 结果灰度比值分析相符。

2.5 ETP-PhaP 蛋白修饰的 PHBHHx 荧光纳米微球对宫颈癌细胞的体外靶向能力

研究中首先验证了人宫颈癌 SiHa 细胞和 CaSki 细胞 (图 4A) 的 EGFR 表达水平，其 Western

blotting 检测结果见图 4B。

在此基础上进一步开展了 ETP-PhaP 融合蛋白修饰的 PHBHHx 荧光纳米颗粒体外靶向 EGFR 的效果研究。体外培养的细胞分别用荧光强度相等的罗丹明 B 溶液、未经修饰 PHBHHx 荧光纳米颗粒和 ETP-PhaP 修饰的 PHBHHx 荧光纳米颗粒处理 1 h 后, 荧光显微镜观察结果如图 5A 所示, 各样品经蛋白定量均一化后检测细胞内荧光强度, 结果见图 5B。

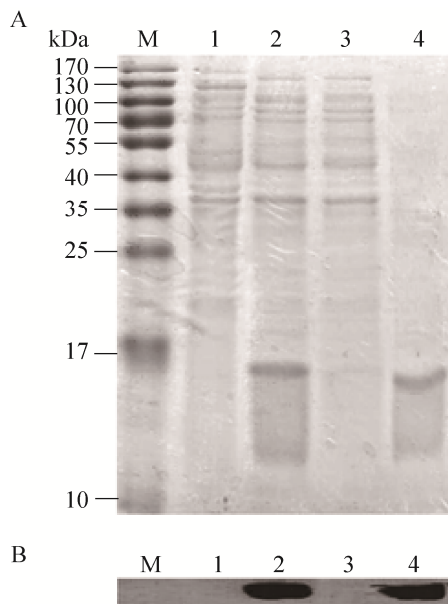


图 2 重组工程菌表达 ETP-PhaP 融合蛋白的 SDS-PAGE 图 (A) 及免疫印迹检测结果 (B)

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of ETP-PhaP fusion protein expressed by recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) harboring pPI-ETP-P plasmid. M: protein weight marker (Institute of Biochemistry and Cell Biology, SIBS, CAS, China). 1: whole crude lysate of wild type *E. coli* BL21 (DE3). 2: whole crude lysate of recombinant *E. coli* BL21 (DE3) harboring pPI-ETP-P plasmid. 3: the washing fraction of induced recombinant *E. coli* BL21 (DE3) (pPI-ETP-P) lysate. 4: the ETP-PhaP fusion protein eluted from His-Tag affinity column.

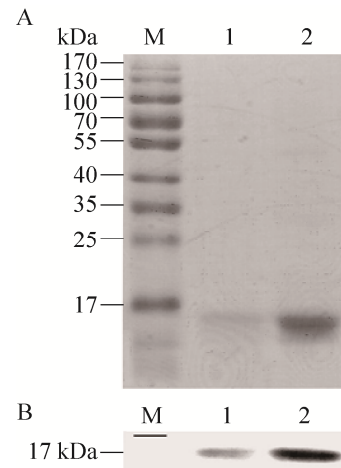


图 3 PHBHHx 颗粒表面及孵育上清中 ETP-PhaP 融合蛋白的 SDS-PAGE 图 (A) 及免疫印迹检测结果 (B)
Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of ETP-PhaP fusion protein in the supernatant (1) and on the surface of PHBHHx NPs (2). M: protein weight marker (Institute of Biochemistry and Cell Biology, SIBS, CAS, China). 10 μ L of each sample was loaded into SDS-PAGE.



图 4 SiHa 及 CaSKi 细胞光镜照片 (A) 及其 EGFR 表达水平的 Western blotting 鉴定图 (B)

Fig. 4 Light microscope picture of SiHa and CaSKi cells (A) and Western blotting analysis of EGFR level (B). Bar = 50 μ m.

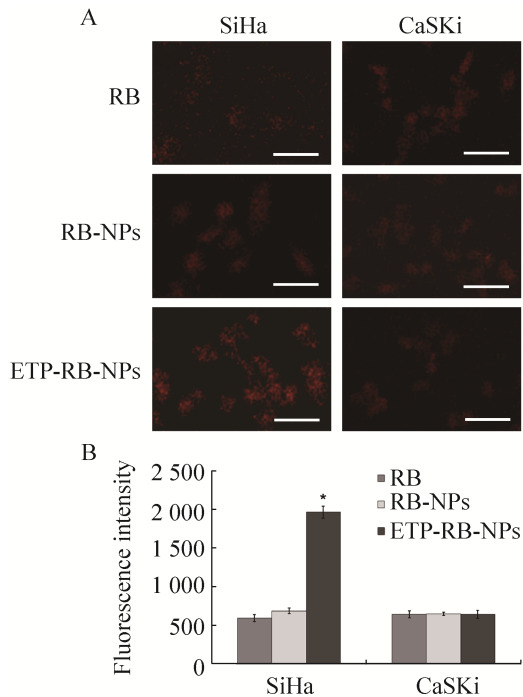


图5 SiHa及CaSKi细胞对游离罗丹明B、未经修饰和经ETP-PhaP修饰的PHBHHx荧光纳米颗粒的吞噬
Fig. 5 Cellular uptake of RB, free and ETP-PhaP modified PHBHHx NPs by SiHa and CaSKi cells. Bar = 50 μm . * $P < 0.01$, compare with SiHa cells treated with free RB.

由图中可以看出，用罗丹明B和未经ETP-PhaP融合蛋白修饰的载罗丹明B的纳米颗粒处理细胞后，SiHa和CaSKi细胞在显微镜下均呈现微弱的橙红色荧光着色。而用ETP-PhaP修饰的荧光纳米颗粒处理两种细胞后，表面EGFR低表达的CaSKi细胞着色未见增强，而在SiHa细胞内可以明显观察到橙红色荧光信号增强，荧光定量检测结果也显示ETP-PhaP修饰的荧光纳米颗粒处理的SiHa细胞内荧光强度增加约2.3倍，说明ETP-PhaP修饰的荧光纳米颗粒可以经由SiHa细胞表面的EGFR与ETP多肽的识别，更好地被EGFR高表达的SiHa细胞摄取内吞入胞。

3 讨论

PHA是一种天然生物可降解聚酯材料，在体内具有良好的生物相容性和生物可降解性，其降解产物3-羟基丁酸是人体正常代谢的中间产物酮体的一种，对细胞安全无毒。PHA在组织工程领域的应用已得到广泛的研究^[22-23]，大量实验证明PHA材料对细胞的生物相容性优于其他生物降解高分子材料（如PLA、PLGA、壳聚糖等）。近年来，其作为药物递送载体的研究也崭露头角^[10-13]。PHA纳米颗粒避免了很多纳米微球（如脂质体等）在大剂量使用时的毒性问题^[24]，其在体内可完全降解并被彻底代谢掉，不存在体内蓄积的潜在隐患。基于PHA材料的聚酯特性、良好的生物相容性和生物安全性，其在疏水性药物的控释方面有着独特的优势^[25]。PHA作为药物载体的另一优势在于其表面可通过疏水作用吸附大量PHA颗粒结合蛋白（PhaP）。而PhaP易与其他蛋白或多肽分子融合表达，从而可以方便地将多种靶向多肽分子通过与PhaP蛋白融合表达而高效地结合在PHA颗粒表面。

本研究中，我们将具有EGFR靶向作用的短肽ETP融合于PHA颗粒结合蛋白PhaP的氨基端，获得的ETP-PhaP融合蛋白经纯化后由PhaP介导吸附于制备好的PHBHHx纳米颗粒表面。经测定及计算可以得到，PHBHHx纳米颗粒表面对ETP-PhaP融合蛋白的吸附量约为 $(153 \pm 11.5) \mu\text{g}/\text{mg}$ ，即每毫克PHBHHx纳米颗粒约吸附10 nmol的融合蛋白。考虑PHBHHx的密度约为 $1.25 \text{ g}/\text{cm}^3$ ，则每毫克材料制备的颗粒数约为 4.0×10^{11} 个，由此可粗略计算出平均每个PHBHHx纳米微球上能够结合 1.5×10^4 个融合蛋白分子。这一估算值提示PHBHHx纳米颗粒表面结合的ETP-PhaP融合蛋白较为丰富，进一步可以通过定量质谱等技术对

颗粒表面的蛋白结合量进行更为精确的测定。

在进行 PHBHHx 颗粒表面蛋白修饰的研究中,为了保证 ETP-PhaP 融合蛋白能够充分与颗粒结合,本实验中设定了孵育时间为 3 h,且使用了过量的 ETP-PhaP 融合蛋白。而在实验过程中我们也发现,PhaP 介导的 PHBHHx 颗粒表面融合蛋白的修饰在孵育 1 h 左右即可达到饱和。

对于包封有药物的高分子纳米载体而言,在药物装载后进行的修饰、分离等后续处理步骤都有可能造成包封药物的泄露或损失,因此,后续加工步骤越少,工艺越简单,造成的药物损失越少。经 PhaP 介导的 PHBHHx 颗粒表面多肽修饰的过程非常简单,不需添加任何额外的反应物或催化剂,只需将制备好的颗粒与融合蛋白溶液共混。通过控制投放的 PHBHHx 颗粒量与融合蛋白的量,能够实现全部融合蛋白均被吸附至颗粒表面。与采用化学交联法对高分子纳米颗粒表面修饰的工艺相比,通过 PhaP 介导进行 PHBHHx 微球表面多肽的修饰极大地降低了颗粒修饰后繁琐的反应、分离及纯化等步骤,也不存在反应物或催化剂残留等潜在问题,是一种非常方便高效的方法。

与未经 ETP-PhaP 修饰的纳米颗粒相比,ETP-PhaP 修饰后的 PHBHHx 荧光纳米颗粒能够更好地被 EGFR 高表达的 SiHa 细胞所摄取。而对 EGFR 低表达的 CaSKi 细胞而言,修饰与否并未对 PHBHHx 纳米颗粒的被动摄取造成明显影响。这一体外结果显示 ETP-PhaP 修饰后的 PHBHHx 纳米颗粒具有针对 EGFR 选择性的肿瘤细胞靶向能力。

4 结论

通过 PhaP 介导进行 PHBHHx 微球表面多肽

修饰的技术化工艺简单,成本低廉,能够有效实现 EGFR 靶向多肽在 PHBHHx 纳米药物载体表面的功能化修饰,使其具有明显的体外 EGFR 高表达肿瘤细胞的靶向作用。这一方法未来可进一步用于多种不同靶向分子修饰的抗肿瘤药物递送载体的构建与开发。

REFERENCES

- [1] Seigneuric R, Markey L, Nuyten DS, et al. From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. *Cur Mol Med*, 2010, 10(7): 640–652.
- [2] Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 2009, 3(1): 16–20.
- [3] Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, et al. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett*, 2010, 10(9): 3223–3230.
- [4] Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(11): 653–664.
- [5] Dong XW, Mumper RJ. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. *Nanomedicine*, 2010, 5(4): 597–615.
- [6] Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mater Sci Eng C*, 2016, 60: 569–578.
- [7] Kamaly N, Yameen B, Wu J, et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. *Chem Rev*, 2016, 116(4): 2602–2603.
- [8] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, 2010, 385(1): 113–142.
- [9] Yin J, Chen XM, Chen GQ. Progress on polyhydroxyalkanoates (PHA). *Chin J Biotech*, 2016, 32(6): 726–737 (in Chinese). 尹进, 车雪梅, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯的研究进展. *生物工程学报*, 2016, 32(6): 726–737.
- [10] Lu XY, Ciralo E, Stefania R, et al. Sustained

- release of PI3K inhibitor from PHA nanoparticles and *in vitro* growth inhibition of cancer cell lines. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(5): 1423–1433.
- [11] Xiong YC, Yao YC, Zhan XY, et al. Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors. *J Biom Sci Polymer Ed*, 2010, 21(1): 127–140.
- [12] Lu XY, Li MC, Zhu XL, et al. Microbial synthesized biodegradable PHBHHxPEG hybrid copolymer as an efficient intracellular delivery nanocarrier for kinase inhibitor. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 4.
- [13] Shrivastav A, Kim HY, Kim YR. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 581684.
- [14] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 2005, 26(33): 6565–6578.
- [15] Pieper-Fürst U, Madkour MH, Mayer F, et al. Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *J Bacteriol*, 1995, 177(9): 2513–2523.
- [16] Hänisch J, Wältermann M, Robenek H, et al. The *Ralstonia eutropha* H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in *Rhodococcus opacus* PD630 and *Mycobacterium smegmatis* mc²155, and provides an anchor to target other proteins. *Microbiology*, 2006, 152(11): 3271–3280.
- [17] Wang ZH, Wu HN, Chen J, Zhang J, et al. A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles. *Lab Chip*, 2008, 8(11): 1957–1962.
- [18] Banki MR, Gerngross TU, Wood DW. Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using *in vivo* polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Sci*, 2005, 14(6): 1387–1395.
- [19] Backstrom BT, Brockelbank JA, Rehm BH. Recombinant *Escherichia coli* produces tailor-made biopolyester granules for applications in fluorescence activated cell sorting: functional display of the mouse interleukin-2 and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 3.
- [20] Yao YC, Zhan XY, Zhang J, et al. A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials*, 2008, 29(36): 4823–4830.
- [21] Li MC, Liu QQ, Lu XY, et al. Heterologous expression of human costimulatory molecule B7-2 and construction of B7-2 immobilized polyhydroxyalkanoate nanoparticles for use as an immune activation agent. *BMC Biotechnol*, 2012, 12: 43.
- [22] Li Z, Loh XJ. Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(10): 2865–2879.
- [23] You M, Peng G, Li J, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide. *Biomaterials*, 2011, 32(9): 2305–2313.
- [24] Yah CS, Simate GS, Iyuke SE. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pak J Pharm Sci*, 2012, 25(2): 477–491.
- [25] Fan F, Lu XY, Ren K, et al. Entrapment and sustained release of hydrophobic drugs with different molecular weights from PHBHHx-PEG nanoparticles. *Chin J Biomed Eng*, 2014, 23(2): 66–73.

(本文责编 郝丽芳)