靶头修饰对PEG-PCL胶束在人宫颈癌细胞内转运行为的影响Δ

杨金津[1,2]，于清华[1,2]，于凌波[1,2]，张亚东[2,3]，梁冬芹[2]，孙钰钰[2]，王慧云[2]，崔亚男[2#]（1.山东第二医科大学药学院，山东 潍坊 261053；2.济宁医学院药学院，山东 日照 276826；3.山东第一医科大学药学院，山东 泰安 271016）

中图分类号 R943　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408(2024)12-1431-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.04

摘　要　目的 研究转铁蛋白靶向肽T7（7pep）对聚乙二醇-聚己内酯（PEG-PCL）胶束在人宫颈癌HeLa细胞内转运行为的影响。**方法** 以香豆素-6（C6）为荧光指示探针，通过薄膜分散法制备包载有C6的PEG-PCL（PEG-PCL-C6）胶束以及靶头7pep修饰的PEG-PCL（7pep-PEG-PCL-C6）胶束。比较两种胶束的粒径、多分散指数及外观形态；比较两种胶束被HeLa细胞实时摄取的情况及其入胞后与早期内吞体（EE）、内吞循环室（ERC）、晚期内吞体（LE）的共定位情况。**结果** PEG-PCL-C6和7pep-PEG-PCL-C6胶束的平均粒径分别为（75.0±2.3）、（82.0±1.5）nm，多分散指数分别为0.17±0.20、0.17±0.32，外观均为规整的圆球形。7pep-PEG-PCL-C6胶束的入胞速度和入胞量均明显快/多于PEG-PCL-C6胶束。7pep-PEG-PCL-C6胶束比PEG-PCL-C6胶束能够更快地进入EE，而入胞后PEG-PCL-C6胶束进入ERC的速率较7pep-PEG-PCL-C6胶束快，且PEG-PCL-C6胶束和7pep-PEG-PCL-C6胶束在LE均有逐渐累积的趋势，但7pep-PEG-PCL-C6胶束入胞60 min时与LE的皮尔森系数、信号重叠比率、共定位比率均显著低于入胞30 min时（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论** 靶头7pep修饰可提高PEG-PCL-C6胶束的入胞速率和入胞量，还可改变其胞内转运行为。

关键词 转铁蛋白靶向肽T7；胶束；转铁蛋白受体；靶向递送系统；细胞转运

Effects of targeting modification on intracellular transportation of PEG-PCL micelles in human cervical cancer cells

YANG Jinjin[1,2], YU Qinghua[1,2], YU Lingbo[1,2], ZHANG Yadong[2,3], LIANG Dongqin[2], SUN Yuyu[2], WANG Huiyun[2], CUI Yanan[2] (1. School of Pharmacy, Shandong Second Medical University, Shandong Weifang 261053, China; 2. School of Pharmacy, Jining Medical University, Shandong Rizhao 276826, China; 3. School of Pharmacy, Shandong First Medical University, Shandong Tai'an 271016, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of transferrin-targeting peptide T7 (7pep) on intracellular transportation of polyethylene glycol-polycaprolactone (PEG-PCL) micelles in human cervical cancer HeLa cells. **METHODS** Using coumarin-6 (C6) as fluorescent indicator probe, both coumarin-6 (C6)-loaded PEG-PCL (PEG-PCL-C6) micelles and 7pep-modified PEG-PCL (7pep-PEG-PCL-C6) micelles were prepared by film-dispersion method. The particle size, polydispersity index and appearance morphology were compared between two types of micelles; the real-time uptake of two types of micelles by HeLa cells was compared, and the colocalization of two types of micelles with early endosomes (EE), endocytic recycling compartments (ERC) and late endosomes (LE) after entry into the cells was observed. **RESULTS** The particle sizes of PEG-PCL-C6 and 7pep-PEG-PCL-C6 micelles were (75.0±2.3) and (82.0±1.5) nm; the polymer dispersity indexes were 0.17±0.20 and 0.17±0.32, respectively, with a regular spherical appearance. The colocalization results showed that entry speed and amount of 7pep-PEG-PCL-C6 micelles were significantly faster/more than those of PEG-PCL-C6 micelles. 7pep-PEG-PCL-C6 micelles entered EE faster than PEG-PCL-C6 micelles, while PEG-PCL-C6 micelles entered ERC at a faster rate than 7pep-PEG-PCL-C6 micelles, and both PEG-PCL-C6 micelles and 7pep-PEG-PCL-C6 micelles tended to accumulate gradually in LE; Pearson coefficient, signal overlap ratio, and colocalization ratio of 7pep-PEG-PCL-C6 micelles with LE were significantly lower 60 minutes after entering the cell than those 30 minutes after entering the cell ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Targeting 7pep modification can increase the entry speed and amount of PEG-PCL-C6 micelles, and also alter their intracellular transportation behavior.

KEYWORDS transferrin-targeting peptide T7; micelle; transferrin receptor; targeting drug delivery system; cellular transport

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No.81903553）；山东省自然科学基金项目（No.ZR2017QH006）；济宁医学院教育教学研究项目（No.yb202223）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：药剂学。E-mail：yangjinjin0328@163.com

＃**通信作者** 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：药物递送及机制。E-mail：guancyn@sina.com

药物递送系统的药效不仅取决于内吞量，还与胞内转运途径显著相关[1—2]。传统观点认为，配体修饰的主动靶向制剂会以配体-受体复合物的形式共同内吞入胞，在早期内吞体（early endosome，EE）的偏酸性环境下，配体与受体解离，受体会循环返回至膜表面进行下一轮的循环，而配体与主动靶向制剂则继续转运进入晚期内吞体（late endosome，LE）/溶酶体中降解[3—4]。然而，转铁蛋白受体（transferrin receptor，TfR）介导的细胞内吞是一个特例：转铁蛋白（transferrin，Tfn）与TfR在胞外结合后，会以TfR-Tfn-Fe^{2+}复合物的形式内吞入胞，EE仅释放Fe^{2+}，使复合物转变为受体-脱铁蛋白形式，而配体和受体并未解离，剩下的脱铁蛋白仍会与受体以复合物的形式共同转运返回至膜表面，在遇到胞外的偏中性环境时，该复合物会再次将配体释放至胞外基质中[5]。因此，对TfR介导的主动靶向递送系统的胞内转运行为进行研究，将为该类纳米递送系统的设计提供重要参考。由于Tfn分子量大，在对纳米载体进行修饰的时候，会导致纳米载体粒径变化过大进而影响后续细胞转运机制的考察。转铁蛋白靶向肽T7（transferrin-targeting peptide T7，7pep）是一种通过噬菌体展示技术筛选得到的短肽，能够与TfR特异性结合，被广泛用作构建肿瘤靶向药物递送系统的配体[6—8]。基于此，本研究以香豆素-6（coumarin-6，C6）为荧光指示探针，通过薄膜分散法制备包载有C6的聚乙二醇-聚己内酯（polyethylene glycol-polycaprolactone，PEG-PCL）胶束（简称“PEG-PCL-C6胶束”）或靶头7pep修饰的PEG-PCL胶束（简称“7pep-PEG-PCL-C6胶束”），然后观察靶头7pep修饰对PEG-PCL胶束在人宫颈癌HeLa细胞内转运行为的影响，以期为主动靶向纳米给药系统的设计与研发，以及相关细胞机制研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括191L型气套式CO_2培养箱（美国CTI公司）、FDU-2110型冷冻干燥机（上海爱朗仪器有限公司）、TCS SP8型激光共聚焦显微镜（德国Leica公司）、Nano-ZS90型激光粒度仪（英国Malvern公司）、LC-20AT型高效液相色谱仪（日本Shimadzu公司）、N-1300型旋转蒸发仪（日本东京理化器械株式会社）、JEM-2100PLUS型透射电镜（日本JEOL公司）。

1.2 主要药品与试剂

PEG_{2000}-b-PCL_{5000}（批号MKCM9500）购自德国Merck公司；7pep-PEG_{2000}-b-PCL_{5000}（批号20231222）由济宁医学院药学院实验室自制；C6（批号LT60P69）购自北京百灵威科技有限公司；乙腈（批号B2211267，纯度≥99.9%）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；胎牛血清（批号2282897RP）购自美国Gibco公司；RPMI1640培养基（批号L0403400）购自中科迈晨（北京）科技有限公司；牛血清白蛋白（BSA）、0.25%的胰蛋白酶消化液、抗荧光衰减封片剂、4%组织细胞固定液、曲拉通X-100（批号分别为1218Q057、20210201、20221114、20201224、112K022）均购自北京索莱宝科技有限公司；CellMask™橙色细胞质膜染色剂（批号2549243）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；兔源Rab5、Rab11B多克隆抗体（货号分别为ab13253、ab3612）和兔源Rab7单克隆抗体（货号ab126712）、Alexa Fluor® 647标记的驴抗兔IgG H&L二抗（货号ab150075）均购自英国Abcam公司。

1.3 细胞

人宫颈癌HeLa细胞购自国家生物医学实验细胞资源库。

2 方法

2.1 两种胶束的制备

2.1.1 PEG-PCL-C6胶束

茄形瓶中加入PEG_{2000}-b-PCL_{5000}乙腈溶液（2 mg/mL）和C6乙腈溶液（1 μg/mL）各2 mL，于40 ℃下避光旋转蒸发至茄形瓶底部出现荧光薄膜，将薄膜温度升至60 ℃后，加入60 ℃的磷酸盐缓冲液（PBS）2 mL，涡旋4 min，超声5 min，过0.22 μm滤膜，即得PEG-PCL-C6胶束。

2.1.2 7pep-PEG-PCL-C6胶束

茄形瓶中依次加入7pep-PEG_{2000}-b-PCL_{5000}乙腈溶液（0.672 mg/mL）1.2 mL、PEG_{2000}-b-PCL_{5000}乙腈溶液（2 mg/mL）1.7 mL以及C6乙腈溶液（1 μg/mL）2 mL，其他步骤同“2.1.1”项，即得7pep-PEG-PCL-C6胶束。

2.2 胶束粒径、多分散指数测定及外观形态观察

利用激光粒度仪，采用动态光散射法测定PEG-PCL-C6胶束或7pep-PEG-PCL-C6胶束的粒径及多分散指数（polymer dispersity index，PDI），设定激光束波长为633 nm，入射光与散射光束的夹角为90 °，测定温度为25 ℃，循环数为“自动”。采用透射电镜法观察两种胶束的外观形态，取胶束的水分散液5 μL，轻轻滴于铜网上，静置10 min，吸干铜网表面多余的液体，负染、晾干后观察并拍照。

2.3 胶束细胞内转运行为的考察

2.3.1 HeLa细胞对胶束的实时摄取观察

将HeLa细胞以每孔6.0×10^5个的密度接种到共聚焦玻底小皿中，置于37 ℃的细胞培养箱中孵育过夜，加入500 μL的CellMask™橙色细胞质膜染色剂，染色10

min，吸弃染料，用PBS洗涤3次。将玻底小皿水平置于激光共聚焦显微镜载物台上，采集选定细胞的明场图像；设定488 nm绿色激发通道和555 nm橙色激发通道，于小皿中加入200 μL的PEG-PCL-C6胶束或7pep-PEG-PCL-C6胶束（用完全培养基稀释，C6质量浓度为150 ng/mL，下同），利用X-Y-t程序每隔3 s对视野选定区域进行图像采集，持续3 min。

2.3.2　胶束在HeLa细胞内的分布考察

将HeLa细胞以每孔1.0×10^5个的密度接种到24孔板中，当细胞密度达80%左右时，加入1 mL的PEG-PCL-C6胶束或7pep-PEG-PCL-C6胶束作为实验组，同时设置空白对照组（加入1 mL完全培养基），分别于细胞培养箱中孵育3、5、10、15、30、60 min。孵育结束后，迅速吸弃上清液，并用冰PBS洗涤细胞3次，加入4%组织细胞固定液500 μL固定细胞，加入含0.2%曲拉通X-100的磷酸缓冲盐溶液（TPBS）透化细胞5 min，再加入含3%BSA的TPBS溶液，于37 ℃孵育1 h。然后，实验组分别加入用含1% BSA的TPBS溶液稀释的Rab5、Rab11B、Rab7抗体（稀释比例分别为1∶100、1∶200、1∶200），空白对照组加入含1%BSA的TPBS溶液，于4 ℃下孵育过夜；次日取出细胞，吸弃上清液，用PBS洗涤细胞3次，加入二抗（稀释比例为1∶200），于37 ℃下孵育1 h，吸弃上清液，再用PBS洗涤细胞3次。通过激光共聚焦显微镜观察Rab5、Rab11B、Rab7在细胞内的荧光染色情况，通过共聚焦分析软件计算皮尔森相关系数、信号重叠比率以及共定位比率来评价胶束与EE、内吞循环室（endocytic recycling compartments，ERC）以及LE的共定位情况。按照时间先后，每个内吞体设定3个观测时间。

2.4　统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。每个样品至少采集3个不同视野单细胞的数据，结果以平均值或$\bar{x}\pm s$表示，采用双尾t检验分析比较同一时间两组胶束的差异，采用单因素方差分析比较同组胶束不同时间的差异。检验水准$\alpha=0.05$。

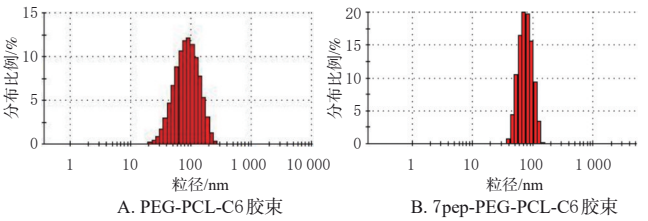
3　结果

3.1　胶束的粒径、PDI及外观形态

PEG-PCL-C6胶束和7pep-PEG-PCL-C6胶束的平均粒径分别为（75.0±2.3）、（82.0±1.5）nm，PDI分别为0.17±0.20、0.17±0.32，外观均为规整的圆球形。结果见图1和图2。

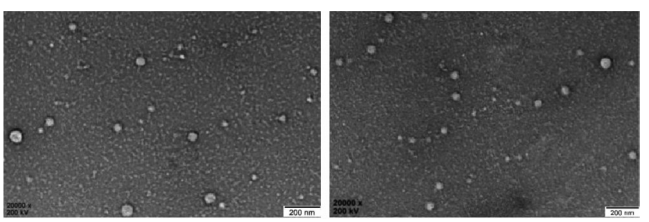
3.2　细胞对胶束的实时摄取情况

PEG-PCL-C6胶束和7pep-PEG-PCL-C6胶束在考察时间段内均有明显的入胞行为。7pep-PEG-PCL-C6胶束整体的入胞速度和入胞量均明显快/多于PEG-PCL-C6胶束。两种胶束入胞0、30 s以及3 min时的激光共聚焦实时显微镜图见图3。



A. PEG-PCL-C6胶束　　B. 7pep-PEG-PCL-C6胶束

图1　两种胶束的粒径检测结果



A. PEG-PCL-C6胶束　　B. 7pep-PEG-PCL-C6胶束

图2　两种胶束的外观形态显微镜图

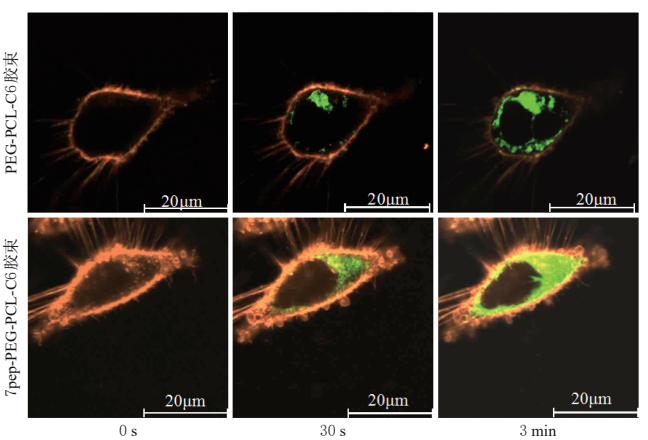


图3　两种胶束入胞的激光共聚焦实时显微镜图

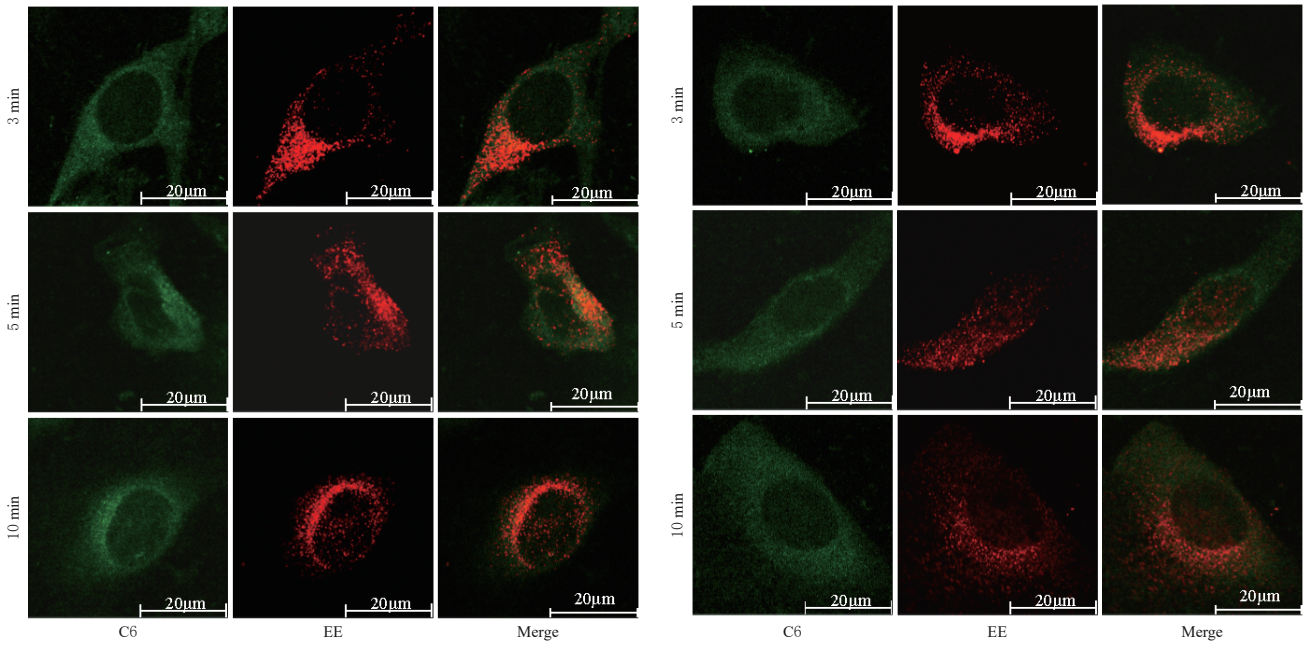
3.3　胶束在HeLa细胞内的分布情况

3.3.1　胶束与EE的共定位情况

7pep-PEG-PCL-C6胶束在入胞5、10 min时与EE的皮尔森相关系数、信号重叠比率和共定位比率（入胞10 min时除外）均显著高于PEG-PCL-C6胶束（$P<0.05$或$P<0.01$），表明与PEG-PCL-C6胶束比较，7pep-PEG-PCL-C6胶束能够更快地进入EE。结果见图4和图5。

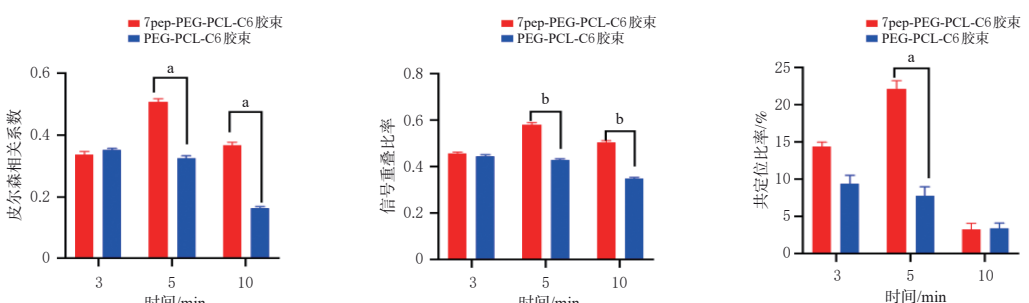
3.3.2　胶束与ERC的共定位情况

PEG-PCL-C6胶束在入胞5 min时与ERC的共定位比率最高，而7pep-PEG-PCL-C6胶束在入胞10 min时与ERC的共定位比率最高，且入胞10 min时7pep-PEG-PCL-C6胶束与ERC的皮尔森相关系数、信号重叠比率、共定位比率均显著高于其入胞5 min时（$P<0.01$）。在考察时间范围内，入胞5 min时，7pep-PEG-PCL-C6胶束的皮尔森相关系数、信号重叠比率、共定位比率均显著低于PEG-PCL-C6胶束（$P<0.01$）。结果见图6和图7。



A. 7pep-PEG-PCL-C6胶束　　B. PEG-PCL-C6胶束

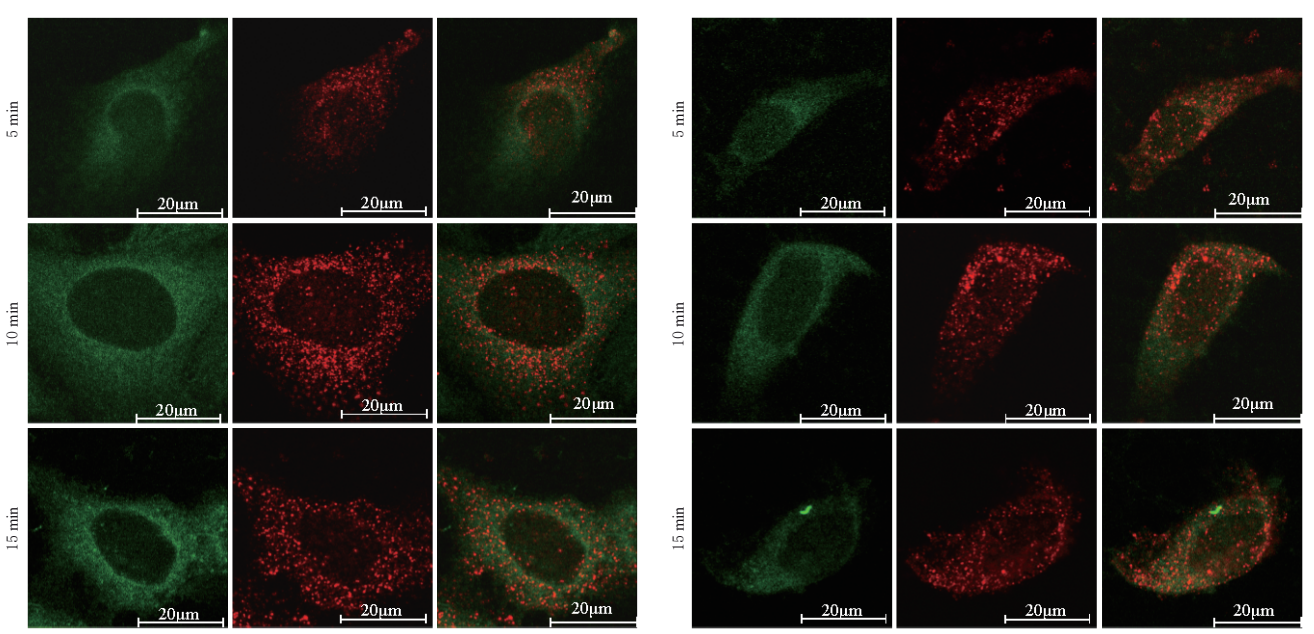
图4　两种胶束与EE共定位的激光共聚焦显微镜图



A. 皮尔森相关系数　　B. 信号重叠比率　　C. 共定位比率

a：与PEG-PCL-C6胶束比较，$P<0.01$；b：与PEG-PCL-C6胶束比较，$P<0.05$。

图5　两种胶束与EE的共定位参数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

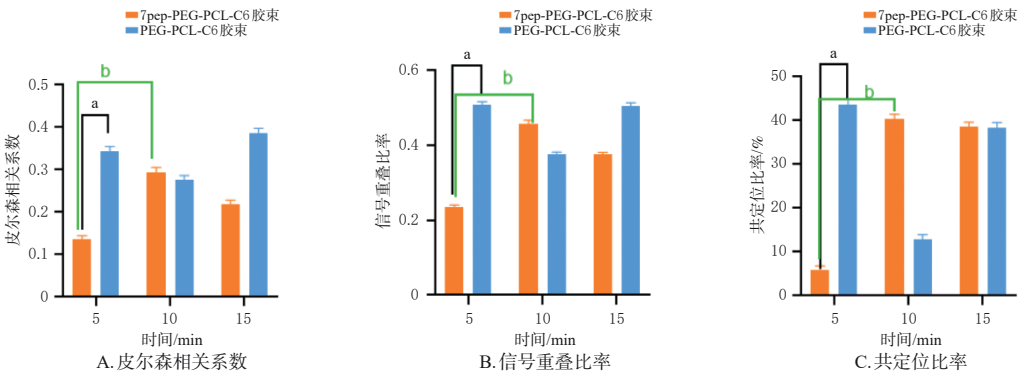


A. 7pep-PEG-PCL-C6胶束　　B. PEG-PCL-C6胶束

图6　两种胶束与ERC共定位的激光共聚焦显微镜图

3.3.3　胶束与LE的共定位情况

7pep-PEG-PCL-C6胶束入胞15 min后与LE的共定位比率呈先增加后降低的趋势，而PEG-PCL-C6胶束入胞15 min后与LE的共定位比率几乎呈增加趋势。7pep-PEG-PCL-C6胶束入胞60 min时与LE的皮尔森相关系数、信号重叠比率、共定位比率均显著低于入胞30 min时（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图8和图9。



a：与PEG-PCL-C6胶束比较，$P<0.01$；b：7pep-PEG-PCL-C6胶束不同时间比较，$P<0.01$。

图7　两种胶束与ERC的共定位参数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

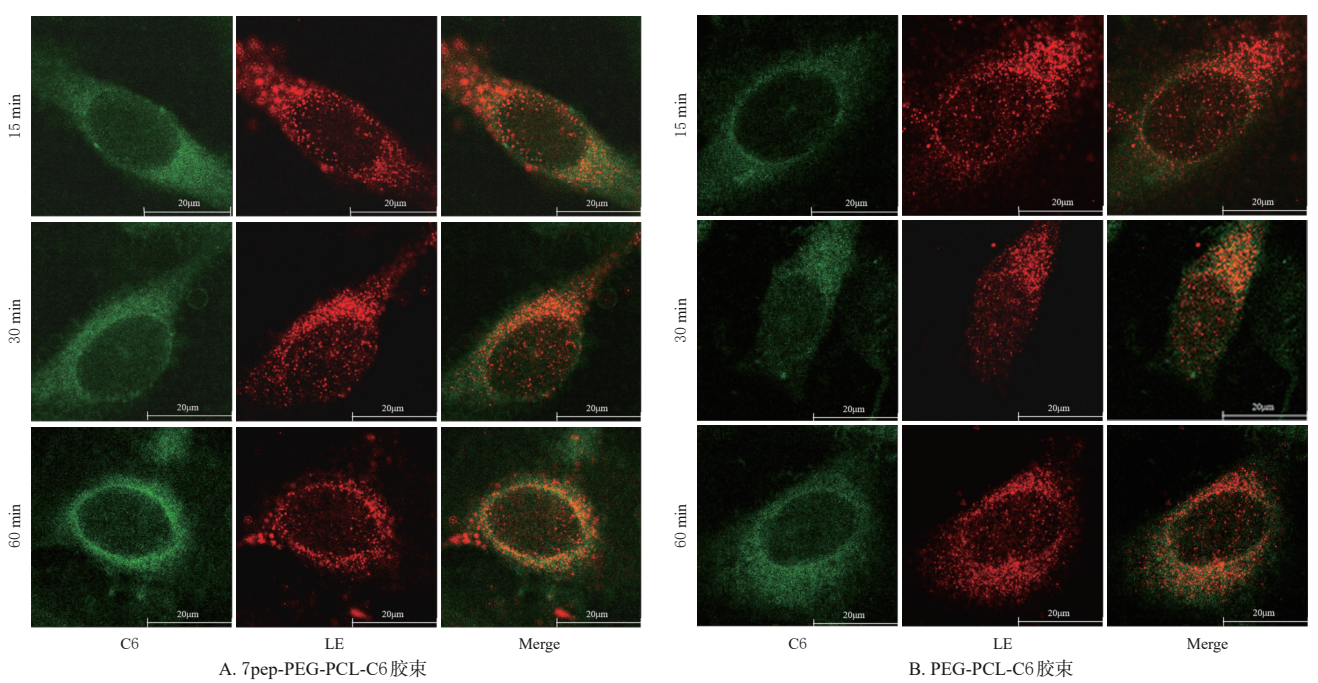
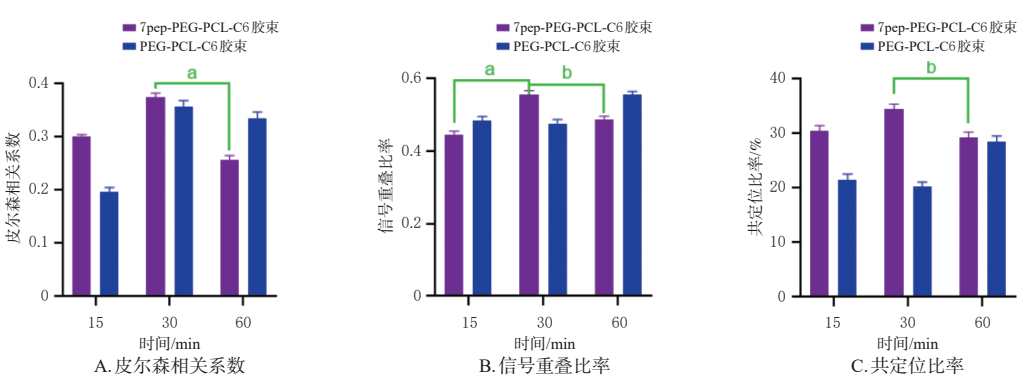


图8　两种胶束与LE共定位的激光共聚焦显微镜图



a：7pep-PEG-PCL-C6胶束不同时间比较，$P<0.05$；b：7pep-PEG-PCL-C6胶束不同时间比较，$P<0.01$。

图9　两种胶束与LE的共定位参数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

4 讨论

本课题采用薄膜分散法制备了7pep-PEG-PCL-C6胶束以及PEG-PCL-C6胶束，结果显示，两种胶束的粒径差别不大，均在80 nm左右，且分布均匀，外观相似，可以用于后续细胞转运机制的比较研究。

纳米给药系统入胞后的经典路线是先进入EE（特异性标记物为Rab5蛋白），然后是ERC（特异性标记物为Rab11B蛋白），最后是LE（特异性标记物为Rab7蛋白）[9-10]。本研究采用免疫组化法，利用Rab5、Rab11B以及Rab7的特异性抗体对细胞进行免疫荧光染色，同时结合两种胶束的细胞实时摄取实验结果发现，7pep-PEG-PCL-C6胶束的入胞速度和入胞量均明显快/多于PEG-PCL-C6胶束，具有明显的主动靶向特征；7pep-PEG-PCL-C6胶束比PEG-PCL-C6胶束能够更快地进入EE，但入胞后的PEG-PCL-C6胶束转运进入ERC的速率较7pep-PEG-PCL-C6胶束快，且PEG-PCL-C6胶束和7pep-PEG-PCL-C6胶束在LE均有逐渐累积的趋势；不同的是，PEG-PCL-C6胶束进入LE后持续累积，而7pep-PEG-PCL-C6胶束进入LE后随着时间的延长，皮尔森系数、信号重叠比率、共定位比率均先升高后降低。由此可见，7pep-PEG-PCL-C6胶束的胞内转运行为与PEG-PCL-C6胶束不同，可能存在LE逃逸情况。

综上所述，靶头7pep修饰可提高PEG-PCL-C6胶束的入胞速率和入胞量，还可以改变其胞内的转运行为。本研究可为今后主动靶向药物递送系统的构建以及临床转化提供参考。

参考文献

[1] RAGELLE H, COLOMBO S, POURCELLE V, et al. Intracellular siRNA delivery dynamics of integrin-targeted, PEGylated chitosan-poly(ethylene imine)hybrid nanoparticles: a mechanistic insight[J]. J Control Release, 2015, 211: 1-9.

[2] DOUGLAS K L, PICCIRILLO C A, TABRIZIAN M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68(3): 676-687.

[3] SPRINGER A D, DOWDY S F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics [J]. Nucleic Acid Ther, 2018, 28(3): 109-118.

[4] HARFORD J, BRIDGES K, ASHWELL G, et al. Intracellular dissociation of receptor-bound asialoglycoproteins in cultured hepatocytes: a pH-mediated nonlysosomal event [J]. J Biol Chem, 1983, 258(5): 3191-3197.

[5] KLAUSNER R D, ASHWELL G, VAN RENSWOUDE J, et al. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80(8): 2263-2266.

[6] LIU W, SU C, QI Y, et al. Brain-targeted heptapeptide-loaded exosomes attenuated ischemia-reperfusion injury by promoting the transfer of healthy mitochondria from astrocytes to neurons[J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 242.

[7] CHENG S Z, TU M L, LIU H X, et al. A novel heptapeptide derived from *Crassostrea gigas* shows anticoagulant activity by targeting for thrombin active domain[J]. Food Chem, 2021, 334: 127507.

[8] 胡洁琳，汪勒，庞良芳. 脑肿瘤靶向肽T7修饰的纳米结构脂质载体的制备和表征[J]. 中国新药杂志，2019，28(3)：353-359.
HU J L, WANG L, PANG L F. Preparation and evaluation of brain tumor targeting peptide T7-modified nanostructured lipid carriers[J]. Chin J N Drugs, 2019, 28(3): 353-359.

[9] GRANT B D, DONALDSON J G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(9): 597-608.

[10] SAHAY G, ALAKHOVA D Y, KABANOV A V. Endocytosis of nanomedicines[J]. J Control Release, 2010, 145(3): 182-195.

（收稿日期：2024-02-17　修回日期：2024-05-23）
（编辑：邹丽娟）