

基于T细胞膜修饰的基因递送系统介导脑胶质瘤 低温光热治疗研究

高潇涵¹ 孙枝红² 刘杰² 赵琪² 孙成铭^{1,2*}

(¹青岛大学青岛医学院, 青岛 266021; ²青岛大学附属烟台毓璜顶医院, 烟台 264000)

摘要 脑胶质瘤是中枢神经系统最为常见的恶性肿瘤, 其在低温光热治疗时面临着热休克蛋白的抵抗和血脑屏障的阻碍等难题。基于此, 该研究将T细胞膜修饰于搭载光热剂和HSP90-siRNA的载体表面而合成新型的基因递送系统aT@FVNPs, 以期实现脑胶质瘤的低温光热治疗。通过纳米粒度分析仪、紫外-可见光谱仪、荧光光谱仪等测定载体的基本性能, 以小鼠内皮细胞Bend.3、脑胶质瘤细胞GL261为研究对象, 测定aT@FVNPs穿透内皮细胞性能、敲低HSP90和体外杀伤肿瘤细胞的能力。结果显示aT@FVNPs更易透过内皮细胞屏障, 并通过敲低HSP90而在低温光热条件下诱导更强的脑胶质瘤细胞杀伤效果。此外, 通过小鼠原位脑胶质瘤模型, 进一步评价aT@FVNPs体内脑胶质瘤靶向潜能, 显示相较于FVNPs组, 其表现出更强的脑胶质瘤部位富集能力; 并且在激光处理下, aT@FVNPs组表现出更为明显的病理性坏死, 诱导细胞凋亡。总之, aT@FVNPs能够跨越血脑屏障而靶向至脑胶质瘤部位, 并通过抑制热休克蛋白表达以实现在低温光热条件下有效杀伤肿瘤细胞的目的。

关键词 脑胶质瘤; 低温光热治疗; 热休克蛋白; 血脑屏障; 基因递送系统

Study on Gene Delivery System Mediated by T Cell Membrane Modification for Low-Temperature Photothermal Therapy of Glioma

GAO Xiaohan¹, SUN Zhihong², LIU Jie², ZHAO Qi², SUN Chengming^{1,2*}

(¹Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China;

²the Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital of Qingdao University, Yantai 264000, China)

Abstract Gliomas are the most common malignant tumors of the central nervous system and face challenges such as resistance from heat shock proteins and obstacles posed by the blood-brain barrier during low-temperature photothermal therapy. In this study, a novel gene delivery system, aT@FVNPs, is synthesized by modifying T cell membranes with photothermal agents and HSP90-siRNA on the surface of carriers. This system aims to achieve effective low-temperature photothermal therapy for gliomas. The basic properties of the carriers were determined using a nanoparticle size analyzer, UV-visible spectrophotometer, and fluorescence spectrometer. The performance of aT@FVNPs in penetrating endothelial cells and the ability to knock down HSP90 and kill tumor cells *in vitro* were assessed using mouse endothelial cells (Bend.3) and glioma cells (GL261). The results showed that aT@FVNPs more readily crossed the endothelial cell barrier and induced stronger glioma cell killing under low-temperature photothermal conditions due to HSP90 knockdown. Additionally, using a mouse orthotopic glioma

收稿日期: 2024-08-27

接受日期: 2024-10-28

山东省自然科学基金(批准号: ZR2022MH100)资助的课题

*通信作者。Tel: 0535-6691999, E-mail: chengmingsun012@163.com

Received: August 27, 2024

Accepted: October 28, 2024

This work was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (Grant No.ZR2022MH100)

*Corresponding author. Tel: +86-535-6691999, E-mail: chengmingsun012@163.com

model, the *in vivo* targeting potential of aT@FVNPs was further evaluated, demonstrating a stronger accumulation at the glioma site compared to the FVNPs group. With laser irradiation, aT@FVNPs group showed more obvious pathological necrosis and induced cell apoptosis. In summary, aT@FVNPs can cross the blood-brain barrier and target glioma sites, effectively killing tumor cells under low-temperature photothermal conditions by inhibiting heat shock protein expression.

Keywords glioma; low-temperature photothermal therapy; heat shock proteins; blood-brain barrier; gene delivery system

脑胶质瘤是一种中枢神经系统最常见的原发性颅内恶性肿瘤,其发病率和致死率逐年呈现上升趋势,严重威胁人类生命健康。脑胶质瘤目前的主要治疗策略仍是以手术为主,放化疗为辅,但治疗效果并不乐观,因此,临床亟需探寻一种有效且特异靶向清除脑胶质瘤细胞的治疗策略,这对于全面提升脑胶质瘤的治疗效果具有十分重要的意义^[1-3]。光热治疗(photothermal therapy, PTT)是一种新型的癌症治疗微创模式,其兼具辐射和温度可控等优势,尤其是近年来纳米技术的不断发展,更是为专属的热传递提供助力,促使光热治疗成为癌症精准治疗中的新范例。虽然光热治疗在大多数实体瘤治疗中取得了一定的研究进展,但由于脑部结构的复杂性和重要性,其在脑胶质瘤的治疗中仍极具挑战性^[4-5]。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一种体内热应激蛋白,可提高细胞对外界环境的应激能力,尤其是耐热的能力,是脑胶质瘤低温光热治疗的重要靶点^[6-7]。相关研究表明,通过 siRNA 干扰或小分子抑制剂等抑制 HSPs 蛋白表达可增强肿瘤细胞的热敏感性^[8-10],实现在相对低的温度下有效地杀伤肿瘤细胞,从而避免非特异性热损伤对脑部重要功能区的破坏,这对于光热疗法在脑胶质瘤诊疗领域的应用至关重要。

除了热休克蛋白的抵抗作用外,血脑屏障的阻碍也极大地限制了光热治疗在脑胶质瘤中的应用。血脑屏障(blood brain barrier, BBB)是由脑神经胶质细胞和毛细血管形成的大脑的天然保护结构,在维护中枢神经系统的内稳态方面具有重要价值^[11-13]。但也是由于血脑屏障的存在限制了绝大部分药物进入脑部病变组织中,这使得脑胶质瘤的诊断和治疗非常棘手。微血管内皮细胞是血脑屏障的结构基础,而内皮细胞间紧密连接(tight junction, TJ)和较弱的胞饮作用,成为阻止药物或大分子物质跨越血脑屏障的关键^[13-14]。常见的免疫细胞如巨噬细胞、树突

状细胞、T细胞等通过血液循环并与内皮细胞相互作用以透过血脑屏障进入至脑胶质瘤微环境中。T细胞跨越血脑屏障主要是源于T细胞表面的膜蛋白与内皮细胞间黏附分子等相互作用,调控内皮细胞间紧密连接,打开血脑屏障限制性通道,有利于T细胞穿过内皮细胞到达脑胶质瘤血管周围^[15-17]。基于此,T细胞衍生而来的细胞膜修饰的纳米载体具有类似的作用,可作为穿梭递送小分子药物或核酸类药物至脑胶质瘤部位的“天然纳米运输机”,助力于脑胶质瘤的精准、高效治疗。

本研究基于T细胞膜的特点,将其通过物理挤压的方式修饰于搭载近红外光热剂和 siRNA 形成的颗粒骨架外而形成基因递送系统 aT@FVNPs,测定其基本性能及在脑胶质瘤中的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

小鼠内皮细胞 Bend.3 和脑胶质瘤细胞 GL216 购于中国科学院上海细胞库;小鼠 T 淋巴细胞 CTLL-2 购于武汉普诺赛生命科技有限公司;Calcein-AM/PI 购于 Dojindo Laboratories;Annexin V-FITC/PI 购于诺唯赞生物技术股份有限公司;HSP90-siRNA 由通用生物股份有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 aT@FVNPs 的制备和性能测定 将处于对数生长期的 CTLL-2 接种于 150 mm 培养皿中扩大培养后收集于 50 mL 离心管中,室温 $1\ 200\times g$ 离心 5 min,去除上清;随后转移至 15 mL 离心管中,经 PBS 洗涤 3 次后,向其中加入含有蛋白酶抑制剂的中性细胞裂解液,在冰浴条件下超声破碎 10 min;收集悬浊液, $3\ 500\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min,弃去沉淀将收集的上清再经 $20\ 000\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 25 min;弃去沉淀,将收集的上清液 $100\ 000\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 50 min,所得的沉淀即为 CTLL-2 细胞膜。

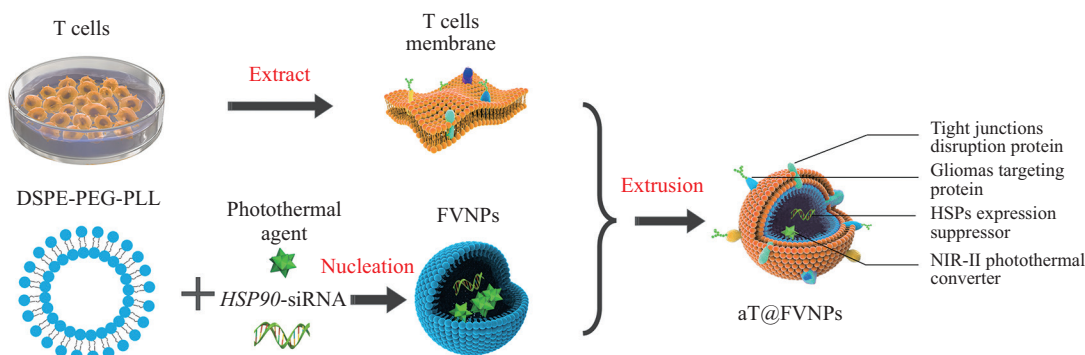


图1 aT@FVNPs的制备示意图

Fig.1 Schematic illustration of the construction of aT@FVNPs

将DSPE-PEG-NH₂和SPDP混溶于DMSO中,并向其中加入DEPC处理的1× PBS溶液,室温下搅拌2 h后转入至10 kDa超滤离心管中,于室温条件下,5 000 r/min离心过滤15 min,并经DEPC水洗涤3次;随后,向其中加入1× PBS溶液(DEPC处理)溶解的HSP90-siRNA,4 °C反应过夜,即为DSPE-PEG-siRNA。接下来,将DSPE-PEG-siRNA、DSPE-PEG-MAL和光热剂混溶于THF中,并快速向其中加入DEPC水,冰浴条件下超声混匀后,转入至10 kDa超滤离心管中5 000 r/min、4 °C离心20 min浓缩,反复洗涤5次,即为FVNPs。为了制备最终的基因递送载体aT@FVNPs,将CTLL-2细胞膜重悬于DEPC水中,并将其通过0.22 μm的针头式过滤器,使细胞膜均匀覆盖于滤膜表面,再将合成的FVNPs匀速通过过滤器,反复重复10次,即为aT@FVNPs(图1)。采用水合粒径分析仪Zetasizer Nano ZS(Malvern Panalytical公司)测定FVNPs和aT@FVNPs的粒径分布和表面电位电势;采用紫外-可见光光谱仪和荧光光谱仪测定FVNPs和aT@FVNPs的吸收波谱和荧光波谱;红外热成像仪测定在波长为808 nm激光照射下FVNPs和aT@FVNPs组的不同时间点的温度变化;此外,通过监测溶血率变化而评估FVNPs和aT@FVNPs组的生物安全性。

1.2.2 体外aT@FVNPs透过血脑屏障性能测定 以小鼠脑微血管内皮细胞Bend.3为基础,通过Transwell小室构建体外血脑屏障模拟体系。具体来说,将处于对数生长期的Bend.3细胞均匀地接种于上层小室中,而处于对数生长期的脑胶质瘤细胞GL261均匀接种于下层小室中,于37 °C恒温培养箱中过夜培养后分别将等浓度的Cy5标记的FVNPs、aT@FVNPs加入至上层小室中,37 °C孵育3 h后,

置于共聚焦显微镜上测定FVNPs和aT@FVNPs被GL261细胞摄入的情况。

1.2.3 体外抗肿瘤效果测定 为了测定aT@FVNPs诱导的细胞凋亡水平,将GL261以1×10⁴个/孔的细胞密度接种于8孔的共聚焦培养皿中,分别将FVNPs和aT@FVNPs加入至共聚焦培养皿中,37 °C孵育3 h后,808 nm激光器(温度控制在<43 °C)照射3 min,处理后继续于37 °C恒温培养箱中避光培养12 h,再向其中加入Calcein-AM/PI染色液,去除多余染色液,通过共聚焦显微镜观察不同处理组肿瘤细胞的凋亡情况;此外,将GL261以1×10⁵个/孔的细胞密度接种至6孔板中,于37 °C恒温培养箱中过夜培养后分别向其中加入FVNPs和aT@FVNPs,37 °C孵育3 h后,808 nm激光器(温度控制在<43 °C)照射3 min,避光培养12 h,收集处理后的各组细胞,4 °C(1 000 r/min)离心5 min后去除培养基,并用预冷的PBS洗涤3次,随后向其中加入Annexin V/FITC(5 μL)和PI(10 μL),混匀后避光于室温下孵育15 min,再经PBS洗涤后,进行流式细胞分析。

1.2.4 体内荧光成像性能和抗肿瘤效果测定 本研究参照烟台毓璜顶医院伦理委员会的相关制度要求开展实验(伦理批准号: 2021-414)。以6~8周雌性BALB/c小鼠(济南朋悦实验动物技术有限公司)为研究对象,采用脑立体定位仪建立小鼠原位脑胶质瘤模型,监测小鼠脑胶质瘤肿瘤体积增长至适宜大小后开展后续实验。将荷瘤小鼠分为FVNPs和aT@FVNPs组,利用光热剂的近红外二区成像能力进行成像观测,分别测定各处理组不同时间点(0 h、3 h、12 h、24 h、48 h)体内的主要器官和肿瘤组织的分布及荧光信号强度。

以上述原位构建的脑胶质瘤模型为基础,待肿瘤生长至适宜大小后,对小鼠进行随机分组,分

为6组每组3只,即为PBS、PBS+Laser、FVNPs、FVNPs+Laser、aT@FVNPs、aT@FVNPs+Laser。分别通过尾静脉注射方式向小鼠体内注入各纳米载体(光热剂, 1.5 mg/kg)。处理24 h后,将激光处理组小鼠进行麻醉并固定,采用808 nm(0.25 W/cm²)激光器照射小鼠肿瘤部位10 min,并在光照过程中持续监控温度,控制温度不超过43 °C。光热治疗7天后,麻醉后颈椎脱臼处死小鼠,分离小鼠脑部并置于4%多聚甲醛中于室温下固定10 min。切片处理后,通过H&E法和TUNEL法测定肿瘤部位病理性变化。

1.2.5 统计学分析 数据分析使用GraphPad Prism 8.0软件,其中计量资料数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料数据以百分比(%)表示。不同组的组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异性显著且具有统计学意义。

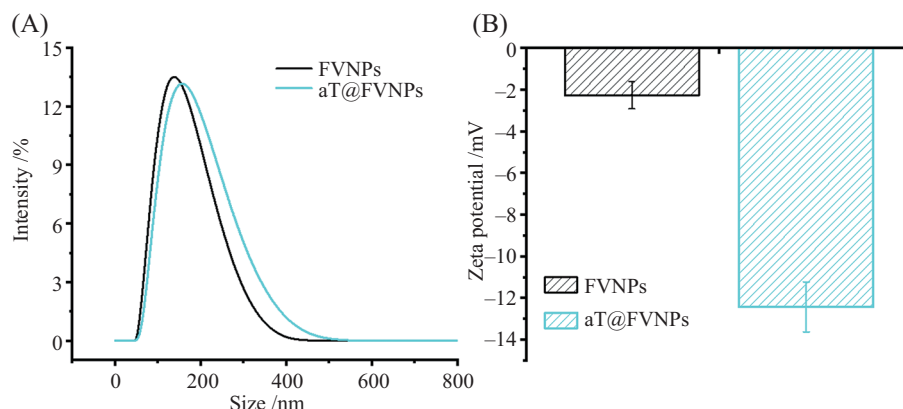
2 结果

2.1 aT@FVNPs的基本性能测定

利用T细胞衍生而来的细胞膜修饰的纳米载体具有类似于T细胞的功能,可辅助递送核酸类药物至脑胶质瘤部位。本研究首先将光热剂和HSP90-siRNA装载至DSPE-PEG、DSPE-PEG-MAL等形成的球状结构(FVNPs)中,并将提取的T细胞膜通过物理挤压的方式附着于FVNPs表面而形成新型仿生基因递送载体aT@FVNPs。图2A的水合粒径结果显示aT@FVNPs的平均水合粒径为(163.5±5.5) nm,相较于FVNPs的水合粒径(142.4±4.7) nm增加12 nm,这也

与现有报道天然细胞膜厚度为5~10 nm相一致^[14-15]; FVNPs和aT@FVNPs的Zeta电位分析结果显示(图2B),aT@FVNPs的表面电荷为(-12.43±1.20) mV,而FVNPs的表面电荷则为(-2.26±0.66) mV,aT@FVNPs的表面电荷低于FVNPs,这是由于细胞膜表面为负电荷,将其修饰于FVNPs进一步增加了负电荷携带量。综合水合粒径和电位电势结果表明T细胞膜已成功修饰于FVNPs表面,制备的载体符合预期。

进一步测定T细胞修饰对负载的光热剂的光学性质影响,紫外-可见光(ultraviolet-visible, UV-vis)测定结果显示aT@FVNPs的最大光吸收波长在672 nm,这与FVNPs的最大光吸收波长相一致,说明T细胞膜修饰并未对光吸收产生影响(图3A);近红外荧光光谱分析结果显示aT@FVNPs的最大发射波长则为1 020 nm,其略高于FVNPs最大发射波长998 nm,表明细胞膜修饰后促进载体的发射光谱右移(图3B),这也与之前报道的相一致^[18];随后,本研究继续探讨细胞膜修饰后对光热性能的影响,通过近红外热成像仪实时监测FVNPs和aT@FVNPs经808 nm激光处理不同时间的温度变化,结果显示FVNPs和aT@FVNPs不同时间点的温度变化曲线基本重合,无明显区别,说明细胞膜的修饰并没有影响载体的光热性能(图3C);此外,基因递送载体良好的生物相容性和生物安全性也是理想递送系统必须具备的关键条件。为了测定aT@FVNPs是否具有良好的生物相容性和生物安全性,本研究一方面体外模拟血液环境,测定aT@FVNPs处理后的溶血率,结果如图3D所示,aT@



A: FVNPs与aT@FVNPs的水合粒径分布; B: FVNPs与aT@FVNPs的电位电势。

A: characterization of the hydrated particle size distribution of FVNPs and aT@FVNPs; B: characterization of the electric potential of FVNPs and aT@FVNPs.

图2 FVNPs和aT@FVNPs的水合粒径和电位电势测定

Fig.2 Determination of the hydrated particle size and potential of FVNPs and aT@FVNPs

FVNPs(光热剂, 10 $\mu\text{g/mL}$)和对照组的溶血率基本一致, 显著低于FVNPs(光热剂, 10 $\mu\text{g/mL}$), 表明aT@FVNPs具有良好的生物相容性; 另一方面, 以内皮细胞为研究对象, 测定不同浓度处理条件下, FVNPs和aT@FVNPs对细胞的毒性, 结果如图3E显示, 相较于FVNPs处理组, aT@FVNPs在高浓度时也无明显的细胞毒性。上述研究结果表明, aT@FVNPs兼具良好的光学性能、生物相容性和生物安全性, 具有作为核酸药物递送载体的基本性能。

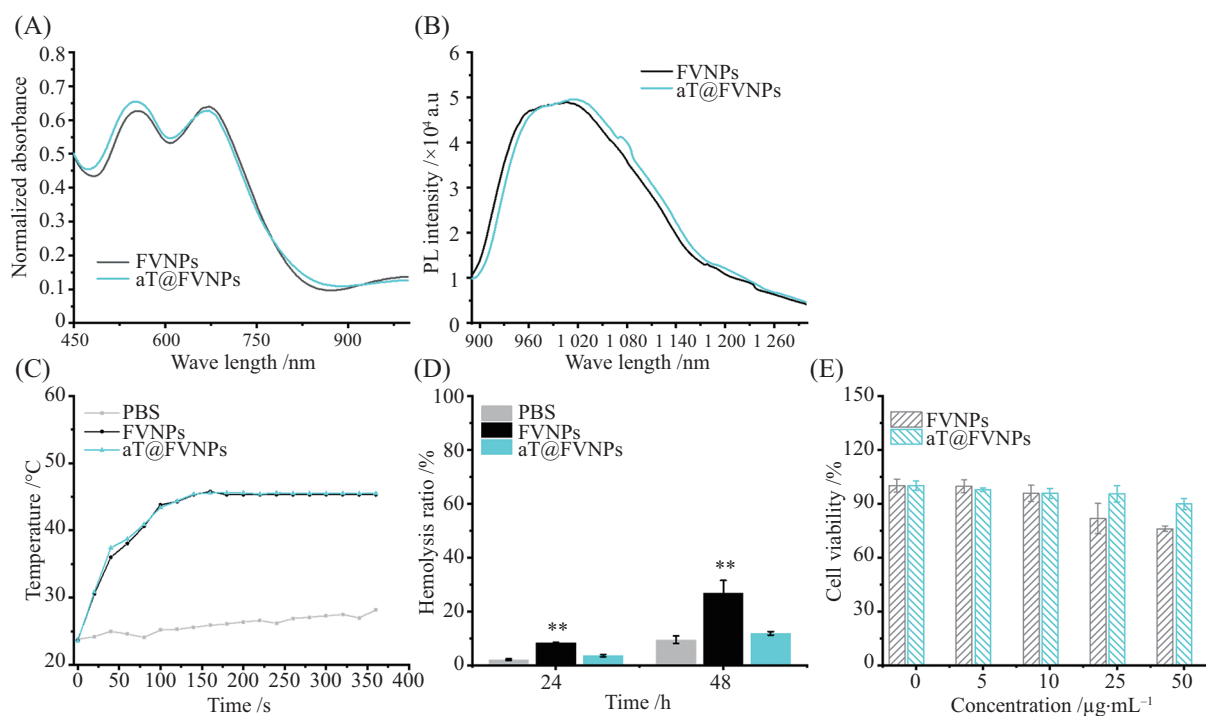
2.2 aT@FVNPs体外靶向性和HSP90敲低效果评价

为了测定aT@FVNPs透过内皮细胞屏障靶向至肿瘤细胞的能力, 本研究以小鼠内皮细胞Bend.3和脑胶质瘤细胞GL261为基础, 通过Transwell小室建立体外血脑屏障模拟模型。本研究以Cy5探针为荧光标签, 测定aT@FVNPs透过内皮细胞的能力, 如图4A结果所示, 相较于FVNPs(光热剂, 10 $\mu\text{g/mL}$)处理组, aT@FVNPs(光热剂, 10 $\mu\text{g/mL}$)表现出更强的内皮细胞透过能力, 更易被脑胶质瘤细胞摄取; 此外, 进一步测定

体外aT@FVNPs(光热剂, 10 $\mu\text{g/mL}$)敲低HSP90的效果, 结果显示相较于FVNPs(光热剂, 10 $\mu\text{g/mL}$)处理组, aT@FVNPs处理组不论是从基因水平还是蛋白水平均能显著敲低HSP90的表达(图4B和图4C)。上述结果表明aT@FVNPs不仅具有跨越内皮细胞的潜能, 还能通过降低热休克蛋白表达水平而提高肿瘤细胞的热敏感性。

2.3 aT@FVNPs体外肿瘤细胞杀伤效果评价

前面研究结果显示aT@FVNPs可以敲低HSP90的表达而提高肿瘤细胞的热敏感性。基于此, 本研究以小鼠脑胶质瘤细胞GL261为研究对象, 评估aT@FVNPs体外肿瘤细胞杀伤性能。激光共聚焦结果显示, 相较于对照组和FVNPs处理组, aT@FVNPs(光热剂, 10 $\mu\text{g/mL}$)在808 nm激光诱发的低温光热条件下(热成像仪监控温度 $\sim 43^\circ\text{C}$)凋亡细胞的荧光信号(红色)强度最强(图5A); 此外, 流式分析结果显示aT@FVNPs低温光热处理组的凋亡细胞比率(20.3%)显著高于FVNPs组(8.44%)和对照组(图5B)。综合上述结

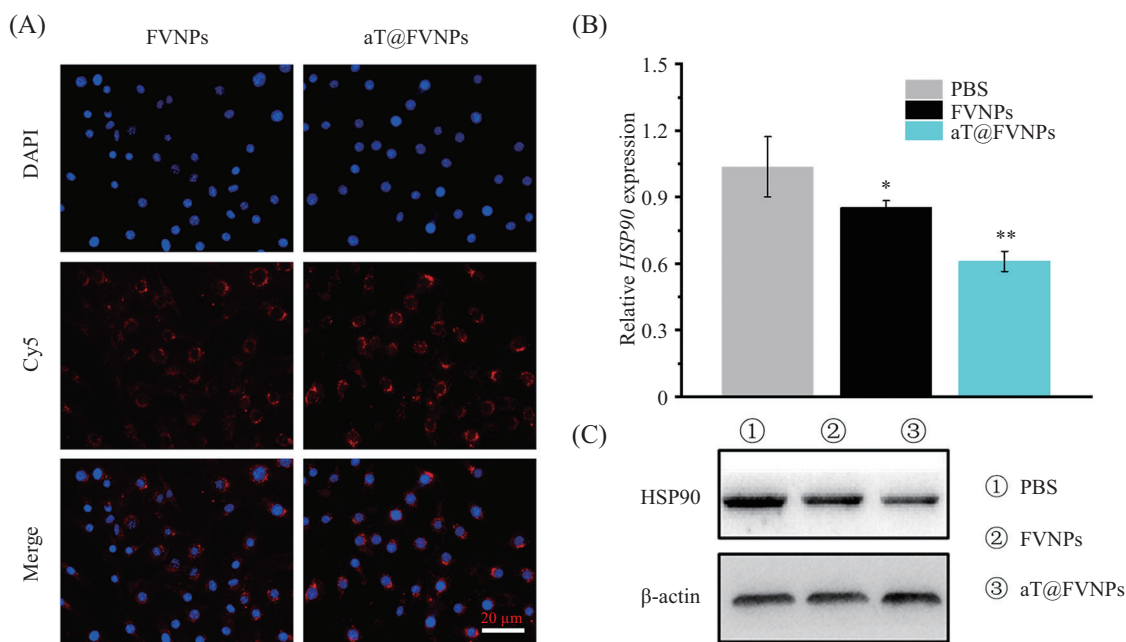


A: FVNPs与aT@FVNPs的紫外-可见光吸收光谱; B: FVNPs与aT@FVNPs的近红外荧光光谱; C: FVNPs与aT@FVNPs经808 nm激光处理不同时间的温度变化; D: 相同浓度(10 $\mu\text{g/mL}$) FVNPs与aT@FVNPs处理红细胞后的溶血率变化; E: CCK-8实验测定不同浓度(0、5、10、25、50 $\mu\text{g/mL}$) FVNPs与aT@FVNPs处理后细胞存活率。

A: UV (ultraviolet) absorption spectra of the photothermal agent FVNPs and aT@FVNPs; B: near-infrared fluorescence spectra of FVNPs and aT@FVNPs; C: temperature change of FVNPs and aT@FVNPs solutions over time under 808 nm laser irradiation; D: hemolysis assay to evaluate the hemolysis rate of red blood cells treated with FVNPs and aT@FVNPs at the same concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$; E: CCK-8 (Cell Counting Kit-8) assay to evaluate cell viability after treatment with FVNPs and aT@FVNPs at different concentrations of 0, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$.

图3 FVNPs和aT@FVNPs吸收-发射光谱、光热性能、生物相容性及生物安全性

Fig.3 Absorption emission spectra, photothermal properties, biocompatibility and biosafety of FVNPs and aT@FVNPs



A: FVNP(10 μg/mL)与aT@FVNP(10 μg/mL)处理后Bend.3细胞摄取的荧光图像,其中Cy-5标签(红色)标记FVNP与aT@FVNP, DAPI(蓝色)标记细胞核; B: FVNP与aT@FVNP *HSP-90* mRNA表达水平; C: FVNP与aT@FVNP *HSP-90* 的蛋白表达水平。

A: uptake of FVNP (10 μg/mL) and aT@FVNP (10 μg/mL) by Bend.3 cells. The blue fluorescence is from DAPI, which labels the cell nuclei. The red fluorescence indicates FVNP and aT@FVNP labeled with Cy-5 tags; B: *HSP-90* mRNA expression levels in FVNP and aT@FVNP treatment groups; C: protein expression levels of *HSP-90* in FVNP and aT@FVNP treatment groups.

图4 FVNP和aT@FVNP体外透过内皮细胞屏障和HSP90敲低性能

Fig.4 *In vitro* penetration of endothelial cell barrier and HSP90 knockdown performance of FVNP and aT@FVNP

果表明, aT@FVNP表现出更强的肿瘤杀伤性能,可实现在低温光热条件下有效地杀伤脑胶质瘤细胞。

2.4 aT@FVNP体内脑胶质瘤靶向性测定

在体外 aT@FVNP可跨越内皮细胞被肿瘤细胞摄取的基础上,本研究进一步探讨 aT@FVNP体内跨越血脑屏障靶向脑胶质瘤部位的能力。以小鼠原位脑胶质瘤模型为基础,利用光热剂的近红外二区成像能力,评估 aT@FVNP(光热剂, 1.5 mg/kg)体内不同时间的生物分布情况,结果如图6A显示, 3 h 时 aT@FVNP处理组脑胶质瘤部位可检测到荧光信号,并且随着时间的推移荧光信号逐渐增强, 24 h 时荧光信号达到最强,而 FVNP处理组的脑胶质瘤部位荧光信号则相对较弱。此外,本研究亦对脑胶质瘤部位的荧光信号进行统计分析(图6B),结果也进一步说明不同时间点的 aT@FVNP组的荧光信号强度显著高于 FVNP组。综合体内成像结果进一步说明 aT@FVNP因 T 细胞膜的修饰显著增强了其跨越血脑屏障而靶向脑胶质瘤部位的能力。

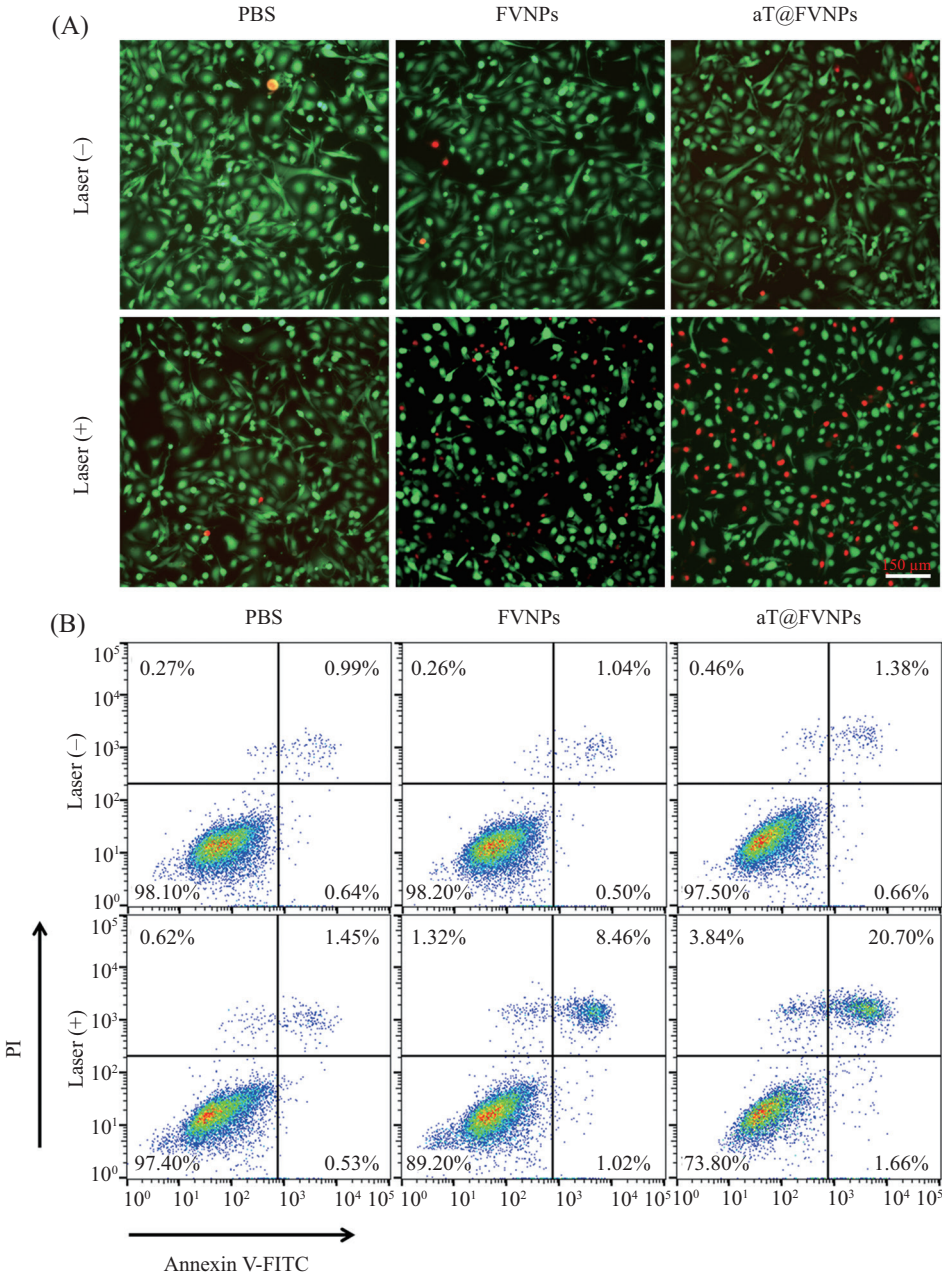
2.5 aT@FVNP体内脑胶质瘤治疗效果评价

在 aT@FVNP体外抗肿瘤效果评价的基础上,

我们进一步测定 aT@FVNP的体内抗肿瘤治疗效果。以小鼠原位脑胶质瘤模型为基础,待原位肿瘤生长至实验适宜条件后,进行随机分组,即为 PBS、PBS+Laser、FVNP、FVNP+Laser、aT@FVNP、aT@FVNP+Laser。组织切片 H&E 染色结果(图7A)显示,相较于其他组, aT@FVNP+Laser 处理组肿瘤细胞病理变化明显,表现出明显的坏死形态;此外,进一步的肿瘤部位凋亡指标 TUNEL 检测结果示(图7B), aT@FVNP+Laser 处理组荧光信号强度最强,表明凋亡细胞比例最多。综合上述结果说明, aT@FVNP在光照处理下表现出更强的肿瘤杀伤性能,具有可实现低温光热条件下高效地杀伤脑胶质瘤细胞的潜能。

3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统常见的原发性恶性肿瘤,患者5年生存率不足10%,手术、放疗和化疗等传统的标准化治疗方式仅能为患者提供有限的缓解而无法从根本上实现治愈和避免复发^[1-3]。光热治疗作为一种不同于传统治疗方式的新型微创抗癌技

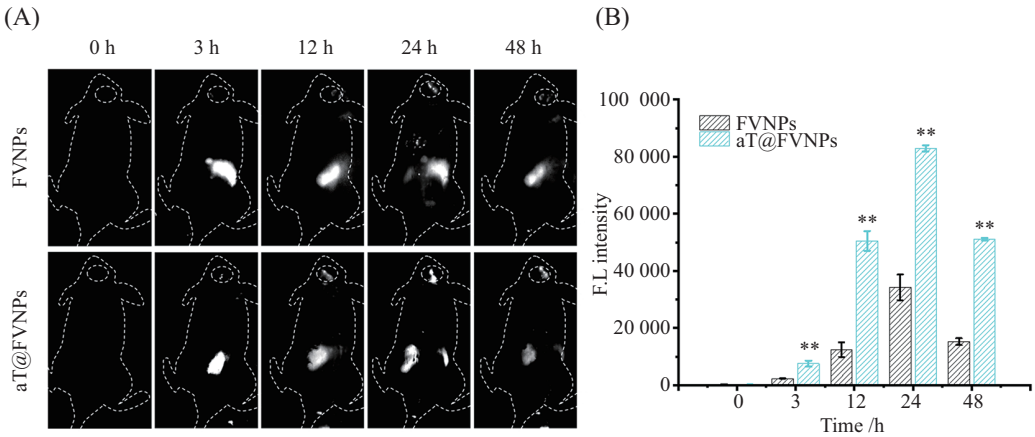


A: 钙黄绿素/碘化丙啉染色(Calcein-AM/PI)测定不同处理组诱导的细胞凋亡水平[Calcein-AM(绿色)指示活细胞, PI(红色)指示凋亡细胞]。B: 流式细胞术测定不同处理组的细胞凋亡比例。
A: evaluation of apoptosis levels induced by different treatment groups using Calcein-AM/PI staining [Calcein-AM (green) indicates live cells, while PI (red) indicates apoptotic cells]. B: measurement of apoptotic cell percentages in different treatment groups by flow cytometry.

图5 FVNPs和aT@FVNPs体外脑胶质瘤杀伤效果
Fig.5 The killing effect of FVNPs and aT@FVNPs to glioma cells *in vitro*

术, 其具有无创新局部治疗、辐射和温度可控性等诸多优势, 将光能转化为热能从而实现有效的肿瘤细胞杀伤。光热治疗过程中若想实现有效的肿瘤消除, 激光诱发的治疗温度需 $>50^{\circ}\text{C}$, 而这种非特异性高温或热扩散现象则会诱导临近正常组织炎症性病变或器官的热损伤, 尤其是对于结构复杂的脑部区域^[4-5]。光热治疗之所以需要达到较高温度才能有效

地杀伤肿瘤细胞, 究其原因主要是热休克蛋白的保护效应, 其可通过介导的热阻作用有效地修复较低温度下($42^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$)肿瘤细胞的热损伤。热休克蛋白在脑胶质瘤等多数肿瘤细胞中处于高表达状态, 其亦是脑胶质瘤低温光热治疗的重要靶点^[19-20]。为了解决脑胶质瘤低温光热治疗过程中HSPs保护作用的问题, 研究人员通过抑制HSPs蛋

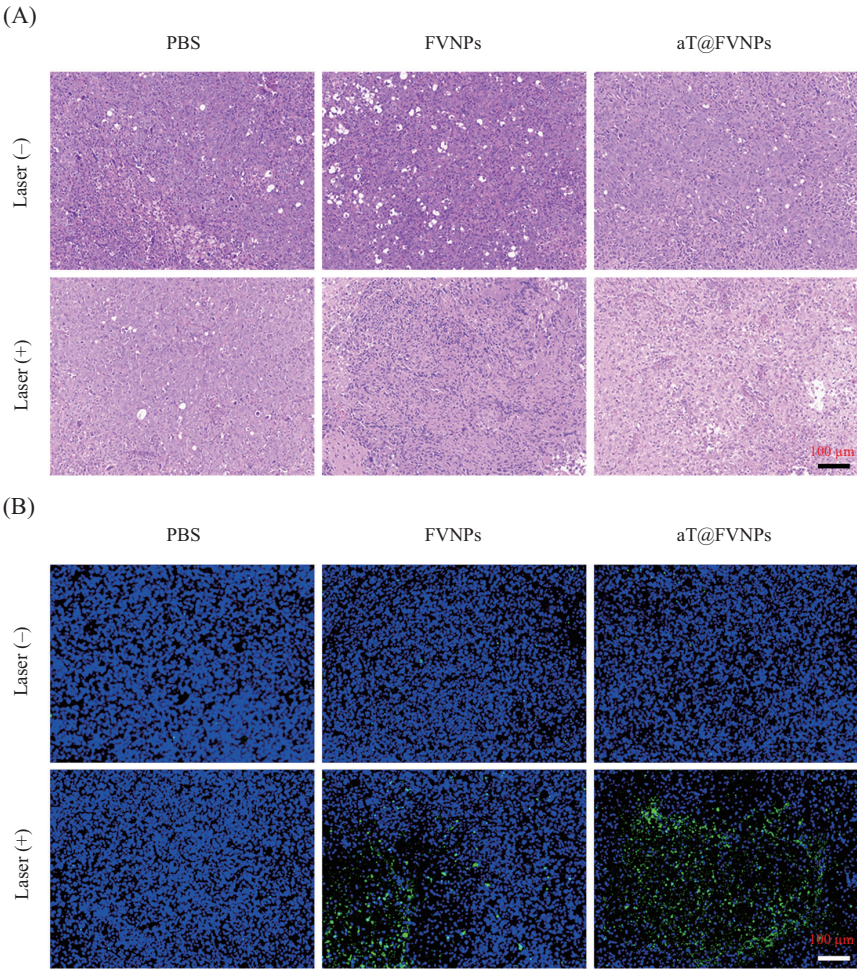


A: FVNP与aT@FVNP处理后体内不同时间的生物分布; B: FVNP与aT@FVNP处理后肿瘤部位荧光信号随时间的变化分析。 ** $P<0.01$, 与FVNP组比较。

A: the biodistribution of FVNP and aT@FVNP at different time points *in vivo*; B: analysis of the temporal variation of fluorescence signals from FVNP and aT@FVNP at tumor sites. ** $P<0.01$ vs FVNP group

图6 FVNP和aT@FVNP体内跨越血脑屏障及脑胶质瘤靶向能力

Fig.6 The ability of FVNP and aT@FVNP to cross the blood-brain barrier and target gliomas *in vivo*



A: 不同处理组肿瘤部位切片的H&E染色; B: 不同处理组肿瘤部位切片的TUNEL检测, 其中TUNEL染色显示的绿色荧光指示凋亡细胞, DAPI(蓝色)标记细胞核。

A: H&E staining of tumor sections in different treatment groups; B: TUNEL detection of tumor sections in different treatment groups, in which the green fluorescence indicates apoptotic cells and DAPI (blue) labels the nuclei.

图7 FVNP和aT@FVNP体内抗肿瘤治疗效果

Fig.7 Effect of FVNP and aT@FVNP on anti-tumor therapy *in vivo*

白的表达,从而实现在低温条件下有效地杀死肿瘤细胞。GAO等^[8]设计了一种含有藤黄酸(HSP90天然抑制剂)温敏相转变脂质体,从而降低治疗所需温度表现出良好的肿瘤杀伤效果;FAN等^[10]开发一种基于多功能金纳米棒(gold nanorod, GNR)的纳米系统,通过局部诱导肿瘤细胞饥饿状态和*B7-H3*基因沉默,降低热休克蛋白表达水平,从而降低肿瘤细胞的耐热性,提高低温光热治疗效果。与上述针对性地抑制HSPs蛋白表达的设计思路相类似,本研究构建的新型基因递送系统可以高效地将其中搭载有光热剂和HSP90-siRNA的载体递送至脑胶质瘤细胞内,抑制HSP90蛋白表达,从而增强脑胶质瘤细胞的热敏感性而实现有效的肿瘤细胞杀伤效果。

此外,若想将治疗性载体成功递送至病变部位,血脑屏障是首要攻克的障碍。血脑屏障是存在于血液和脑组织之间集体的保护性生理屏障,防止有害物质侵入至脑部以维持中枢神经系统稳态,但也正是因血脑屏障的存在,阻碍了近98%小分子药物和几乎全部的大分子药物无法到达脑部病灶部位。为了克服血脑屏障的限制性障碍,山东大学姜新义教授研究团队^[21]精心设计一种“特洛伊木马”(Th17细胞)细胞递送载体,成功将治疗性药物透过血脑屏障安全输送至多发性硬化病灶部位;PAN等^[22]受缺血性脑卒中发生后激活的中性粒细胞通过表面的蛋白与内皮细胞的黏附分子相互作用而透过血脑屏障募集至病变部位启发,构建了一种可特异性结合于中性粒细胞表面的药物递送载体,搭乘中性粒细胞这一“便车”而穿透血脑屏障,富集于缺血侧脑部病变部位而发挥治疗作用;YUAN等^[23]研究发现巨噬细胞来源的外泌体具有亲本细胞的特点,可通过与脑部微血管内皮细胞上的黏附分子间相互作用,跨越血脑屏障。上述研究成果也为本研究方案的设计提供了重要参考,本研究利用激活T细胞表面蛋白分子与内皮细胞上的黏附分子作用,以达到高效跨越血脑屏障这一目的。将T细胞膜修饰于基因递送系统表面,从而实现跨越血脑屏障精准递送治疗性药物。体外和体内研究结果已证实,T细胞膜修饰的基因递送系统可以特异性穿透血脑屏障靶向至肿瘤部位,并具有良好的生物安全性。

综上所述,本研究制备的T细胞膜修饰的基因递送系统,具有良好的生物相容性,可特异性跨越血脑屏障而靶向脑胶质瘤部位,并通过搭载的HSP90-

siRNA抑制热休克蛋白的表达,从而实现在低温下有效地杀伤脑胶质瘤细胞。本研究的初步研究结果充分验证制备的基因递送系统抗肿瘤性能,为脑胶质瘤的低温光热治疗提供重要的参考范例。

参考文献(References)

- [1] ONISHI M, ICHIKAWA T, KUROSUMI K, et al. Angiogenesis and invasion in glioma [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2011, 28(1): 13-24.
- [2] FURNARI F B, FENTON T, BACHOO R M, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(21): 2683-710.
- [3] WELLER M, WEN P Y, CHANG S M, et al. Glioma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10(1): 33.
- [4] LIU Y, BHATTARAI P, DAI Z, et al. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 2053-108.
- [5] LI X S, LOVELL J F, YOON J Y, et al. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17: 657-74.
- [6] HAGYMASI A T, DEMPSEY J P, SRIVASTAVA P K. Heat-shock proteins [J]. *Curr Protoc*, 2022, 2(11): e592.
- [7] MAZURAKOVA A, SOLAROVA Z, KOKLESOVA L, et al. Heat shock proteins in cancer-known but always being rediscovered: their perspectives in cancer immunotherapy [J]. *Adv Med Sci*, 2023, 68(2): 464-73.
- [8] GAO G, JIANG Y W, GUO Y X, et al. Enzyme-mediated tumor starvation and phototherapy enhance mild-temperature photothermal therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(16): 1909391.
- [9] DING F, GAO X H, HUANG X G, et al. Polydopamine-coated nucleic acid nanogel for siRNA-mediated low-temperature photothermal therapy [J]. *Biomaterials*, 2020, 245: 119976.
- [10] FAN R, CHEN C, HU J, et al. Multifunctional gold nanorods in low-temperature photothermal interactions for combined tumor starvation and RNA interference therapy [J]. *Acta Biomater*, 2023, 159: 324-37.
- [11] AL RIHANI S B, BATARSEH Y S, KADDOUMIA A. The blood-brain barrier in health and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9261.
- [12] WU J R, HERNANDEZ Y, MIYASAKI K F, et al. Engineered nanomaterials that exploit blood-brain barrier dysfunction for delivery to the brain [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, 197: 114820.
- [13] WU D, CHEN Q, CHEN X, et al. The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 217-44.
- [14] HANG Z, ZHOU L, XING C, et al. The blood-brain barrier, a key bridge to treat neurodegenerative diseases [J]. *Ageing Res*, 2023, 91: 102070.
- [15] CHUNTOVA P, DOWNEY K M, HEGDE B, et al. Engineered T-cells for malignant glioma: overcoming the barriers to effective immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2019, 9: 3062.
- [16] CAO Z, LIU X, ZHANG W, et al. Biomimetic macrophage membrane-camouflaged nanoparticles induce ferroptosis by promoting mitochondrial damage in glioblastoma [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(23): 23746-60.

- [17] HAN D, WANG F, QIAO Z, et al. Neutrophil membrane-camouflaged nanoparticles alleviate inflammation and promote angiogenesis in ischemic myocardial injury [J]. *Bioact Mater*, 2022, 23: 369-82.
- [18] GALLO J, VILLASANTE A. Recent advances in biomimetic nanocarrier-based photothermal therapy for cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15484.
- [19] ZHANG M, BI X. Heat shock proteins and breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 876.
- [20] LANG B J, PRINCE T L, OKUSHA Y, et al. Heat shock proteins in cell signaling and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2022, 1869(3): 119187.
- [21] SHI C, ZHANG J, WANG H, et al. Trojan horse nanocapsule enabled *in situ* modulation of the phenotypic conversion of Th17 cells to Treg cells for the treatment of multiple sclerosis in mice [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(11): e2210262.
- [22] PAN J, WANG Z, HUANG X, et al. Bacteria-derived outer membrane vesicles hitchhike neutrophils to enhance ischemic stroke therapy [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(38): e2301779.
- [23] YUAN D, ZHAO Y, BANKS W, et al. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain [J]. *Biomaterials*, 2017, 142: 1-12