红细胞膜仿生氮化硼纳米球的制备及其作为抗肿瘤药物载体的研究

冯诗倪[1]，张慧杰[2]，高晓冬[1]，中西秀树[*1]

（1. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室 / 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 药学院，江苏 无锡 214122）

摘要：作者利用红细胞（Red blood cell，RBC）膜对 BNNS 进行包被，构建出新型仿生纳米给药系统 RBC-BNNS。采用透射电镜（Transmission electron microscopy，TEM）、粒径及电位分析等手段表征并对比了红细胞膜包被前后 BNNS 的基础性能。在此基础上，选用阿霉素（Doxorubicin，DOX）作为抗癌药物模型，对比了细胞膜包被前后载体对阿霉素装载量的变化。选用 HeLa 细胞为肿瘤细胞模型，考察了 RBC-BNNS 的生物安全性以及 DOX@RBC-BNNS 的细胞摄取和体外抗肿瘤效果。

关键词：氮化硼纳米球；红细胞膜；阿霉素；药物递送；癌症治疗

中图分类号：R 945　**文章编号**：1673-1689(2019)09-0072-06　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.09.010

Erythrocyte Membrane Biomimetic Boron Nitride Nanospheres as Carrier for the Delivery of Antitumor Drug

FENG Shini[1]，*ZHANG Huijie*[2]，*GAO Xiaodong*[1]，*NAKANISHI Hideki*[*1]

（1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology，Ministry of Education / School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Pharmaceutical Sciences，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：In this work，red blood cell（RBC）membrane coating technique was used to camouflage inorganic BNNS，thus forming biomimetic RBC-membrane-coated BNNS（RBC-BNNS）drug delivery system. The functionalization of BNNS with RBC-membrane was characterized by transmission electron microscopy（TEM），particle size and zeta potential analysis. Besides，the influence of RBC-membrane modification to the drug loading capacity was also analyzed with doxorubicin（DOX）as model drug. Then，the human cervical carcinoma cell line HeLa cells was selected as model cancer cells to investigate the biocompatibility of RBC-BNNS and the cellular uptake and antitumor effect of DOX@RBC-BNNS.

Keywords：Boron nitride nanosphere，red blood cell membrane，doxorubicin，drug delivery，cancer therapy

收稿日期：2017-11-30

基金项目：国家自然科学基金项目（21778023，21576118）；江苏省自然科学基金项目（BK20170202）。

作者简介：冯诗倪（1990—），女，博士，主要从事纳米医学研究。E-mail：fengshini1990@163.com

*** 通信作者**：中西秀树（1973—），男，博士，教授，主要从事酵母遗传学研究。Email：hideki@jiangnan.edu.cn

引用本文：冯诗倪，张慧杰，高晓冬，等. 红细胞膜仿生氮化硼纳米球的制备及其作为抗肿瘤药物载体的研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(09)：72-77.

恶性肿瘤严重威胁人类的生命健康。化疗药物因其适用于所有肿瘤类型,是目前应用最为广泛的肿瘤治疗方法之一。然而,化疗药物缺乏靶向性,在杀伤肿瘤细胞的同时也会无选择性的杀伤正常组织细胞;且药物在机体内代谢较快,容易被肾脏清除,无法达到良好的治疗效果[1]。为改善化疗药物的治疗效果,近年来药物载体递送系统(Drug delivery system,DDS)的发展提供了一种全新的化疗药物递送方式。DDS 可利用肿瘤部位高通透性和滞留(EPR)效应促进化疗药物进入肿瘤细胞,提高肿瘤部位药物浓度,进而增强肿瘤治疗效果[2]。

随着纳米技术的不断发展,具有多种功能的纳米材料被广泛应用于生物医学领域[3]。氮化硼(Boron nitride,BN)纳米材料凭借其优异的抗氧化性、化学稳定性、润滑性能、以及较高的导热性成为研究者关注的热点之一,并被广泛用作复合物材料、光学与电子材料等[4]。BN 具有与碳纳米材料相似的结构和性质,它可看成是 B 原子与 N 原子交替连接代替 C 原子的位置而得[5]。研究表明,BN 具有比碳纳米材料更优异的生物相容性,是一种在医学上极具潜力的纳米材料[6]。BNNS 作为一种新型 BN 纳米材料,具有均一的球形结构和较低的结构诱导毒性。2011 年,Zhi 等[7]首先报导了 BNNS 具有良好的生物相容性,并且较易被细胞摄取。Zhang 等[8]曾利用 BNNS 作为纳米载体递送具有免疫刺激活性的含有 CpG 基序的寡脱氧核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide,CpG ODN)。实验结果表明,BNNS 可以保护 CpG ODN 在血清中不被酶解,促进其被免疫细胞摄取。BNNS 能显著提高 CpG ODN 的免疫刺激活性,并刺激免疫细胞产生大量抗肿瘤细胞因子。此外,研究发现 BN 可以递送高浓度硼原子到肿瘤组织中,大大高于血液和其它组织中硼原子含量,使其在硼中子俘获治疗(Boron neutron capture therapy,BNCT)的应用中极具潜力[9-10]。BN 纳米材料作为药物载体或可实现化疗与 BNCT 疗法相结合的肿瘤协同治疗。这将有可能为抗肿瘤治疗提供一种安全高效的新策略。正因如此,BNNS 在作为抗癌药物载体方面显示了一定的优越性。然而,迄今为止基于 BNNS 的抗肿瘤药物载体鲜有报导,BNNS 在生物医学领域的应用仍待探索和发掘。此外,BNNS 的表面疏水性能使其难以充分分散在有机溶剂和水中,易产生团聚现象,极大地限制了其发展与应用[11]。因此,必须对 BN 纳米材料进行表面功能化修饰。

近年来,受到自然界生物近乎完美的结构、功能启示,仿生技术引起了研究人员的广泛关注[12]。通过对机体内源性功能成分的模仿,仿生药物载体能够与机体实现完美兼容,更加高效地进行药物递送。红细胞是脊椎动物血液中数量最多的一种血细胞,负责向机体各个组织细胞输送氧气并回收二氧化碳等代谢产物。在血液循环系统中,红细胞寿命长达 120 d。红细胞优异的系统循环能力得益于其独特的形变能力和细胞膜表面的免疫抑制相关蛋白[13]。Zhang[14]课题组利用低渗处理制得天然红细胞膜,并对金纳米颗粒进行包被。实验结果表明,红细胞膜的包被能帮助金纳米颗粒在血液中维持良好的稳定性,抑制巨噬细胞的吞噬。Rao 等人[15]利用微流控电穿孔技术将红细胞膜镀层于磁性纳米粒子外,制备出具有核-壳结构的仿生磁性纳米粒子 RBC-MNs。基于纳米粒子优良的磁性、光热性能和红细胞膜的血液长循环特点,RBC-MNs 被用于肿瘤增强核磁共振成像和光热疗法。结果表明 RBC-MNs 能够有效逃逸免疫细胞的吞噬,通过 EPR 效应大量聚集于肿瘤组织中,显示出良好的抗肿瘤效果。

作者拟借助红细胞膜良好的流动性,通过物理挤压的方式将其包覆于 BNNS 外表面,同时,将疏水性小分子化疗药物 DOX 嵌插于红细胞膜磷脂双分子层内,构建出红细胞膜包被的,装载 DOX 的仿生药物递送系统 DOX@RBC-BNNS,并对该递送系统进行表征和体外抗肿瘤效果验证(图 1)。

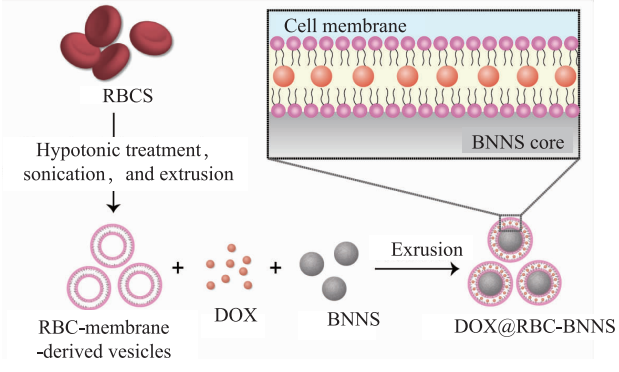


图 1 DOX@RBC-BNNS 的制备过程

Fig. 1 Schematic illustration of the preparation process of DOX@RBC-BNNS

1 材料与方法

1.1 实验材料

DOX：上海生工生物工程股份有限公司产品；昆明小鼠(雌性,均 6-8 周龄)：维通利华实验动物技术有限公司产品；人宫颈癌细胞 HeLa 细胞株：中科院细胞库提供；DMEM 培养基和胎牛血清蛋白(FBS)：美国 Gibco 公司产品；Cell-Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒：日本 Donjindo 公司产品；Alexa Fluor® 488-鬼笔环肽及 DAPI：Invitrogen 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 红细胞小体的制备 利用眼球取血法取昆明小鼠全血约 2 mL 置于 5 mL 离心管中(内含 0.5 mL 质量分数 3.8%柠檬酸钠溶液作为抗凝剂)。将上述血液于 4 ℃下 3 000 r/min 离心 20 min,吸除上层血液绒毛层。再将红细胞置于预冷的等渗磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中重悬,后于 4 ℃下离心洗涤 3 次。将洗净后的红细胞置于预冷的 0.2×PBS 低渗缓冲液中重悬,随后置于 4℃冰箱中放置 1 h,使之在低渗缓冲液中完全溶血。然后于 4 ℃,9 000 r/min 条件下离心 15 min,使红细胞膜沉淀,去除血红蛋白。重复离心洗涤 3 次，经额定功率为 60 W 的水浴超声 20 min 后,制得红细胞小体。

1.2.2 RBC-BNNS 的构建 BNNS 采用化学气相沉积法(CVD)制备而成[16]。将制得的红细胞小体和 BNNS 按质量浓度比为 1:1 共混，使用迷你挤压器(Avanti)进行往复的挤压过筛，依次使用孔径为 400 nm 及 200 nm 的 Millipore 聚碳酸脂膜,连续过膜挤压 20 次,制得红细胞膜包被的 RBC-BNNS。

1.2.3 RBC-BNNS 的表征 RBC-BNNS 的形态表征由 JEM-2100 透射电子显微镜(JEOL,Japan)在加速电压为 80 kV 时得到。表面电位及水合粒径由 Nano ZS Zetasizer(Malvern,England)测得。紫外-可见光吸收光谱由 Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific)测得。

1.2.4 细胞培养 实验用细胞为人宫颈癌细胞 HeLa 细胞。HeLa 细胞培养于 DMEM(含有质量分数 10%加热灭活后的 FBS 及 1%链霉素/青霉素双抗)中。置于 37℃,环境湿润的体积分数 5% CO_2 培养箱内培养。当细胞贴壁生长大于 80%时进行细胞传代。

1.2.5 RBC-BNNS 的生物安全性考察 利用 CCK-8 法来检测 HeLa 细胞的活性。取对数生长期的细胞,稀释成 1×10^5 个/mL 单细胞悬液,以每孔 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中。将培养板置于 37 ℃,体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。随后向培养板中加入系列质量浓度的 BNNS 和 RBC-BNNS,将 96 孔板放在培养箱内继续培养 24 h。最后向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育约 3 h,用酶标仪测定每个孔在 450 nm 处的吸光度值。

1.2.6 DOX 的装载 首先以 PBS 作为缓冲液分别制备 1 mg/mL 的 BNNS 和 RBC-BNNS 溶液,分别取 1 mL 于离心管中,再向其中加入 500 μL DOX 溶液(1 mg/mL)。制备 DOX@BNNS 时：将 BNNS 与 DOX 的混合液在避光条件下室温震荡 24 h。随后,经 13 500 r/min 离心 20 min 收集样品并用 PBS 洗涤数次,离心收集得到 DOX@BNNS；制备 DOX@RBC-BNNS 时：将 RBC-BNNS 与 DOX 的混合液在避光条件下通过孔径为 200 nm 的迷你挤压器连续过膜挤压,随后,经 13 500 r/min 离心 20 min 后收集样品并用 PBS 洗涤数次,得到 DOX@RBC-BNNS。利用 Nanodrop 检测上清中游离 DOX 的量，通过计算得到载体上 DOX 的装载量。

1.2.7 DOX@RBC-BNNS 的细胞摄取 将 HeLa 细胞接种于 35 mm 的 Petri 培养皿中,培养 24 h 使细胞贴壁后向培养液中加入 2.5 μg/mL 的 DOX@RBC-BNNS,37 ℃下分别孵育 0.5 h、2 h 及 4 h。孵育结束后，用 PBS 洗涤细胞，加入体积分数 3.7%甲醛固定 30 min。用 PBS 洗涤细胞 2 次后,细胞膜和细胞核分别用 Alexa Fluor® 488 鬼笔环肽和 DAPI 染色,再用 PBS 洗涤 2 次,最后用激光共聚焦显微镜分别在 405 nm 和 488 nm 通道观察 HeLa 细胞对 DOX@RBC-BNNS 的摄取情况并采集相应的荧光图像。

1.2.8 DOX@RBC-BNNS 体外抗肿瘤效果评价 取对数生长期的 HeLa 细胞，质量分数 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液，以 1×10^4 个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板中,100 μL/孔。细胞培养 24 h 后,分别加入终质量浓度为 2 μg/mL 的游离 DOX、DOX@BNNS 及 DOX@RBC-BNNS，继续培养细胞 48 h。实验终止前，各孔分别加入 CCK-8 溶液 10 μL，继续培养 3 h 后，用酶标仪测定每个孔在 450 nm 处的吸光度值。

1.2.9 统计学分析 选用 Student 检验法对数据进行统计学差异分析。数据的表达方式均为平均值

标准偏差。显著性差异分别被标注为 *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

2 结果与讨论

2.1 RBC–BNNS 的构建与表征

通过 CVD 法制备得到的 BNNS 具有均一的球形结构,通过透射电镜(图 2)可以清晰的观察到该纳米球呈现聚集状态,平均粒径约为 100 nm。经 RBC 包被后,BNNS 表面的晶体结构消失,边缘可见半透明的膜结构,且 RBC–BNNS 在透射电镜下呈现出良好的单分散状态,粒径增加为约 130 nm。该结果证明 RBC 膜成功包被于 BNNS 表面。

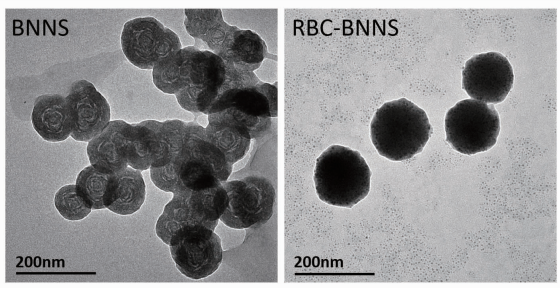


图 2 BNNS 和 RBC–BNNS 的透射电镜图片

Fig. 2 TEM images of BNNS and RBC–BMMS

随后,利用动态光散射粒度仪对 RBC–BNNS 的粒径、Zeta 电位及稳定性进行考察。图 3 显示,BNNS 的水合粒径为 763 nm,这是由于 BNNS 在水溶液中的团聚所造成。通过低渗处理制得的红细胞小体的水合粒径为 227 nm,将其包被于 BNNS 表面后,RBC–BNNS 的粒径降为 150 nm,说明 RBC–BNNS 在溶液中呈单分散状态。细胞膜磷脂双分子层外部亲水,使 RBC–BNNS 表面具备亲水性,在溶液中表现出良好的分散性。Zeta 电位结果显示,BNNS 表面电位约为–32.2 mV,而 RBC–BNNS 的电位约为–10.6 mV,与红细胞小体的表面电位(–9.5 mV)相似。以上结果表明,RBC 膜的包被改善了 BNNS 的表面疏水性,极大提升了 BNNS 的溶液分散性。此外,Zeta 电位的变化间接证明了 RBC–BNNS 的成功制备。

图 4 显示了 RBC–BNNS 在 PBS 缓冲液中的长期稳定性。结果表明 RBC–BNNS 的粒径在 14 d 内无显著变化,说明该仿生纳米载体具有良好的分散性和稳定性。这种理想的分散稳定性增加了 RBC–BNNS 的静脉给药可操作性,同时也将有助于维持药物在系统循环过程中的稳定性,避免血管堵塞等不良反应的发生。

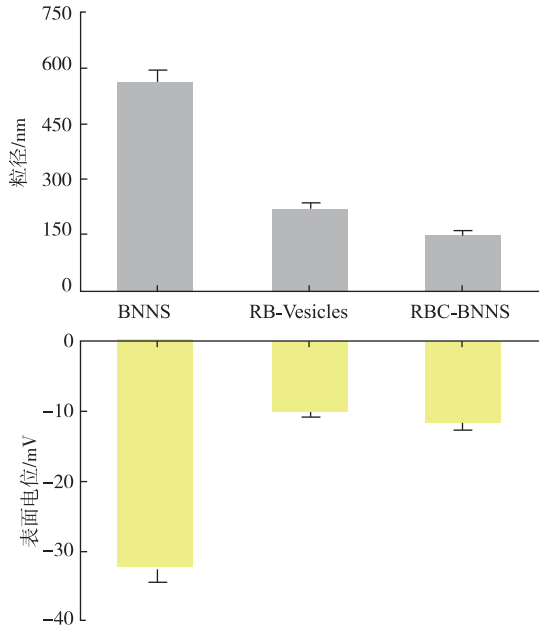


图 3 BNNS,RBC 小体和 RBC–BNNS 的粒径及表面电位

Fig. 3 Hydrodynamic size and surface zeta potential of BNNS,RBC–Vesicles and RBC–BNNS

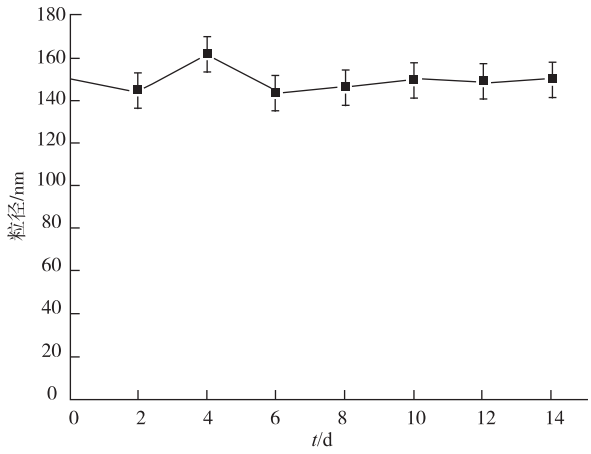


图 4 基于粒径变化的 RBC–BNNS 稳定性考察

Fig. 4 Stability of RBC–BNNS in terms of particle size

2.2 RBC–BNNS 的生物安全性

理想的药物载体必须具备优异的生物安全性。为此,利用 CCK–8 法对 BNNS 及 RBC–BNNS 的生物安全性进行了考察。图 5 为不同质量浓度的 BNNS 和 RBC–BNNS 对 HeLa 细胞存活率的影响。结果表明 BNNS 和 RBC–BNNS 在最高质量浓度 100 μg/mL 范围内未表现明显的细胞毒性,细胞活

性均保持在90%以上,展现出良好的生物相容性。

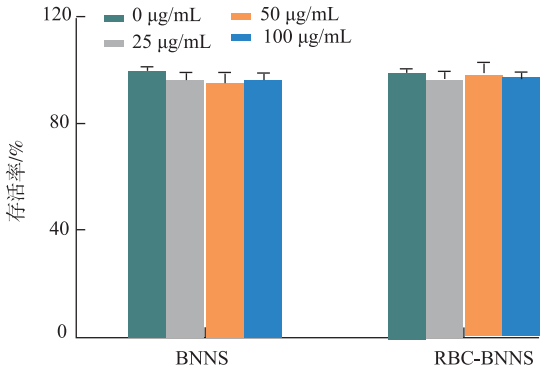


图 5　BNNS 和 RBC–BNNS 的细胞毒性检测

Fig. 5　Cytotoxicity of BNNS and RBC–BNNS

2.3　DOX@RBC–BNNS 的细胞摄取

BN 纳米材料与石墨具有相似的结构和性质,可与疏水性小分子药物 DOX 通过 π 键相互结合。而 RBC–BNNS 则通过其外层 RBC 膜的疏水性磷脂双分子层贮存 DOX。DOX 在 RBC–BNNS 上的装载量为 214.3 μg/mg，远高于其在 BNNS 上的装载量(6.7 μg/mg)(图 6),这是由于 RBC–BNNS 增强的溶液分散性提升了载体的比表面积,且药物装载过程中的机械挤压力促进了药物在 RBC–BNNS 上的装载。

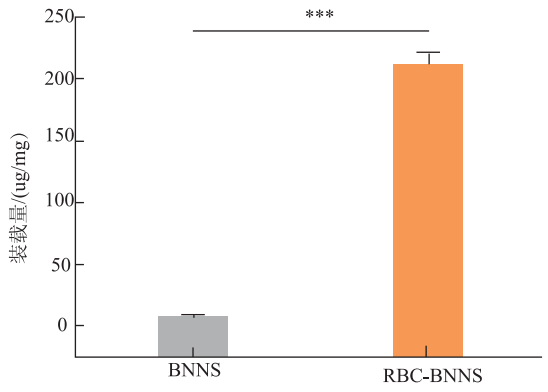
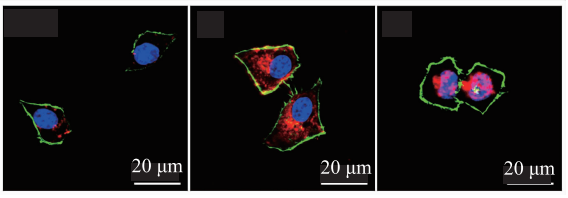


图 6　BNNS 和 RBC–BNNS 的 DOX 装载量

Fig. 6　DOX loading capacity of BNNS and RBC–BNNS

选择 HeLa 细胞作为肿瘤细胞模型来评价 DOX@RBC–BNNS 的细胞摄取情况。DOX 在488 nm 激发光激发下能产生红色荧光，可通过CLSM 考察细胞对药物载体的摄入。CLSM 成像结果如图 7 所示，在 0.5 h 时，仅有少量 DOX@RBC–BNNS 进入 HeLa 细胞;随着培养时间增长至 2 h,大量红色荧光定位于细胞质中；共孵育 4 h 后,HeLa 细胞在细胞核区域显示出明亮的红色荧光。该结果证明 DOX@RBC–BNNS 能够被 HeLa 细胞快速高效摄取，随后 DOX 能够从载体上有效释放并进入细胞核发挥作用。



(a)0.5 h　(b)2 h　(c)4 h

细胞核用 DAPI 标记,显示蓝色荧光;细胞膜用 Alexa Fluor® 488 鬼笔环肽标记,显示绿色荧光

图 7　HeLa 细胞与 DOX@RBC–BNNS 共培养0.5 h,2 h 及 4 h 后的共聚焦显微镜图片

Fig. 7　CLSM images of HeLa cells after incubation with DOX@RBC –BNNS for 0.5 h,2 h and 4 h, respectively

2.4　DOX@RBC–BNNS 的体外抗肿瘤效果

最后，利用 CCK–8 法验证 DOX@RBC–BNNS 对肿瘤细胞的杀伤效果。如图 8 所示,游离 DOX 与载药纳米粒子均表现出对肿瘤细胞的杀伤作用,但游离 DOX 及 DOX@BNNS 对肿瘤细胞的杀伤力相对较弱。这是由于 DOX 通过被动扩散途径进入细胞且易被泵出；而 DOX@BNNS 较差的溶液分散性限制了细胞对药物的摄入[17]。DOX@RBC–BNNS 对肿瘤细胞的杀伤效果最为明显,或与其优越的分散性和高效的细胞摄取有关。以上结果表明,RBC–BNNS 在癌症治疗中有很强的药物运载和运输潜力,可被用作有效的药物载体进行深入研究。

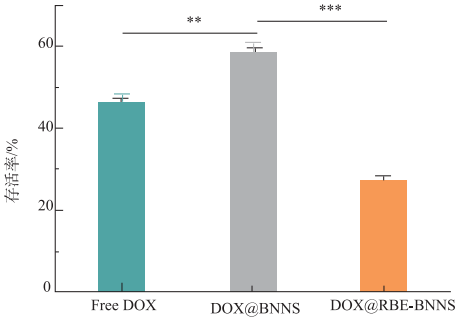


图 8　HeLa 细胞与游离 DOX,DOX@BNNS 及 DOX@RBC–BNNS 共培养 48 h 后的相对细胞活性

Fig. 8　Relative viability of HeLa cells incubated with free DOX,DOX@BNNS and DOX@RBC–BNNS for 48 hours

3 结 语

采用低渗处理分离纯化红细胞膜,通过机械挤压将其包被于 BNNS 外,制备了一种新型仿生药物运输载体 RBC-BNNS。该载体具有均一的粒径及良好的分散性,在 PBS 中能保持较长时间的稳定。体外毒性实验表明该载体具有优越的生物相容性。该载体的 DOX 的装载量为 214.3 μg/mg,远高于 BNNS。RBC-BNNS 能够有效输送 DOX 进入肿瘤细胞,并在胞内进行药物释放。此外,细胞毒性实验初步验证了 DOX@RBC-BNNS 比游离 DOX 具有更显著的癌细胞杀伤效果。综上,该仿生药物载体在肿瘤治疗中具有潜在的应用前景,为开发安全高效的药物载体提供了新思路。

参考文献:

[1] BRIGGER I,DUBERNET C,COUVREUR P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis [J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**,2002,54(5):631-651.

[2] PEER D,KARP J M,HONG S,et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy [J]. **Nature Nanotechnology**,2007,2(12):751-760.

[3] CHEN J X,CAO L J,MENG Z M,et al. Study of temperature sensitive nano drug delivery system based on hyaluronic acid[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(12):1294-1299.

[4] CHOPRA N G,LUYKEN R J,CHERREY K,et al. Boron-nitride nanotubes[J]. **Science**,1995,269(5226):966-967.

[5] ZHI C Y,BANDO Y,TANG C C,et al. Boron nitride nanotubes [J]. **Materials Science & Engineering R-Reports**,2010,70(3-6):92-111.

[6] HORVATH L,MAGREZ A,GOLBER D,et al. In vitro investigation of the cellular toxicity of boron nitride nanotubes [J]. **ACS Nano**,2011,5(5):3800-3810.

[7] ZHI C,MENG W,YAMAZAKI T,et al. BN nanospheres as CpG ODN carriers for activation of toll-like receptor 9 [J]. **Journal of Materials Chemistry**,2011,21(14):5219-5222.

[8] ZHANG H J,YAMAZAKI T,ZHI C Y,et al. Identification of a boron nitride nanosphere-binding peptide for the intracellular delivery of CpG oligodeoxynucleotides[J]. **Nanoscale**,2012,4(20):6343-6350.

[9] CIOFANI G,RAFFA V,MENCIASSI A,et al. Folate functionalized boron nitride nanotubes and their selective uptake by glioblastoma multiforme cells:implications for their use as boron carriers in clinical boron neutron capture therapy[J]. **Nanoscale Research Letters**,2009,4(2):113-121.

[10] NAJAMURA H,KOGANEI H,MIYOSHI T,et al. Antitumor effect of boron nitride nanotubes in combination with thermal neutron irradiation on BNCT[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**,2015,25(2):172-174.

[11] WENG Q H,WANG B J,WANG X B,et al. Highly water-soluble,porous,and biocompatible boron nitrides for anticancer drug delivery[J]. **ACS Nano**,2014,8(6):6123-6130.

[12] PARODI A,MOLINARO R,SUSHNITHA M,et al. Bio-inspired engineering of cell- and virus-like nanoparticles for drug delivery[J]. **Biomaterials**,2017,147:155-168.

[13] HU C-M J,FANG R H,ZHANG L. Erythrocyte-inspired delivery systems [J]. **Advanced Healthcare Materials**,2012,1(5):537-547.

[14] GAO W,HU C-M J,FANG R H,et al. Surface functionalization of gold nanoparticles with red blood cell membranes[J]. **Advanced Materials**,2013,25(26):3549-3553.

[15] RAO L,CAI B,BU L L,et al. Microfluidic electroporation-facilitated synthesis of erythrocyte membrane-coated magnetic nanoparticles for enhanced imaging-guided cancer therapy[J]. **ACS Nano**,2017,11(4):3496-3505.

[16] TANG C C,BANDO Y,HUANG Y,et al. Synthetic routes and formation mechanisms of spherical boron nitride nanoparticles[J]. **Advanced Functional Materials**,2008,18(22):3653-3661.

[17] FENG S,ZHANG H,YAN T,et al. Folate-conjugated boron nitride nanospheres for targeted delivery of anticancer drugs[J]. **International Journal of Nanomedicine**,2016,11:4573-4582.