

## 穿膜肽提高纳米银穿膜活性的研究

刘金华<sup>1,2</sup>, 郭倩倩<sup>1,2</sup>, 华海婴<sup>1</sup>, 袁波<sup>3</sup>, 赵永星<sup>1\*</sup>, 黄永焯<sup>2\*</sup> (1.郑州大学, 郑州 450001; 2.中科院上海药物所, 上海 201203; 3.山东中医药大学附属医院, 济南 250000)

**摘要:** 目的 合成纳米银, 在其表面修饰穿膜肽(TAT), 并检测修饰后纳米银粒对人乳腺癌耐阿霉素细胞(MCF-7/ADR)的穿膜活性。方法 通过化学还原法制备纳米银(AgNP), 并通过 Ag-S 共价键与 TAT 连接修饰 AgNP。通过粒度仪、透射电镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪以及二喹林甲酸法等仪器及方法对其表征、共价连接及 TAT 的介导活性进行测定。结果 成功制备了 10 nm 以下的 AgNP, 且修饰 TAT 后的 AgNP(AgNP-TAT)表现出了比 AgNP 更强的穿膜活性。结论 TAT 修饰 AgNP 后能显著提高其穿膜活性。

**关键词:** 纳米银; 穿膜肽; MCF-7/ADR; 细胞摄取

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)10-0865-04

### The Penetrating Activity of Nano-silver Mediated by Cell Penetrating Peptide

LIU Jinhua<sup>1,2</sup>, GUO Qianqian<sup>1,2</sup>, HUA Haiying<sup>1</sup>, YUAN Bo<sup>3</sup>, ZHAO Yongxing<sup>1\*</sup>, HUANG Yongzhuo<sup>2\*</sup> (1.Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2.Shanghai Institute of Materia Medica Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3.Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To assess the intracellular delivery efficiency of silver nanoparticles surface-modified by cell penetrating peptides(TAT) in human breast cancer drug doxorubicin-resistant MCF-7/ADR cells. **METHODS** Silver nanoparticle(AgNP) was prepared by chemical reduction and was modified with TAT by Ag-S covalent bond. The TAT-AgNP was characterized using particle analyzer, TEM, laser confocal microscopy, and TGA, and TAT-mediated cellular uptake were measured using FACS. **RESULTS** The AgNP with diameter below 10 nm was successfully synthesized. The cell penetrating activity of TAT-modified AgNP (AgNP-TAT) was higher than that of AgNP. **CONCLUSION** The cell penetrating activity of AgNP was significantly improved by modification with TAT.

**KEY WORDS:** silver nanoparticles; cell penetrating peptide; MCF-7/ADR; cell uptake

纳米银(AgNP)具有潜在的生物学方面的应用价值, 已有文献报道, AgNP 具有明显的抗菌<sup>[1]</sup>、抗病毒<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>等生物活性。Gopinath 等<sup>[4]</sup>报道了 AgNP 可以使细胞内的线粒体膜通透性发生改变, 从而促进肿瘤细胞的凋亡; Verma 等<sup>[5]</sup>研究也表明纳米银具有较好的抗癌活性。但是 AgNP 作为一种刚性的无机纳米材料较难进入细胞, 使其作用的发挥受到一定程度的限制。

穿膜肽(TAT)是来源于人免疫缺陷病毒 HIV-1 转导结构域的一段由 11 个氨基酸组成的富含精氨酸的多肽, 体内外实验都验证了它具有快速穿过细胞膜进入细胞的作用。它可以与蛋白质或肽结合, 促进蛋白质或肽进入细胞和动物的组织, 但不影响其所携带蛋白质的生物活性<sup>[6-7]</sup>。迄

今为止, 研究表明不同的 TAT 融合蛋白在胞质或胞核中都具有生物学活性<sup>[7-10]</sup>。因此, 笔者推测 AgNP 接上 TAT 不会影响其生物学活性, 并能够增加其穿过细胞膜的性能, 从而提高 AgNP 的作用效果。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 药品与试剂** 硝酸银、硼氢化钠、聚乙烯吡咯烷酮 K-30(PVP), 均购自国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 5-((2-(3S-(甲硫基)琥珀(氨基)荧光素(A-685)(美国 Invitrogen 公司); DAPI 染色液(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)(碧云天生物技术研究所); TAT 由吉尔生化上海有限公司合成。超纯水, 实验室自制。

基金项目: 国家自然科学基金(91029743; 81172996)

作者简介: 刘金华, 女, 硕士生 Tel: (021)20231000-1403 E-mail: cnliujinhua@163.com \*通信作者: 赵永星, 男, 博士, 副教授 Tel: (0371)67781908 E-mail: yongxing\_zhao@hotmail.com 黄永焯, 男, 博士, 研究员 Tel: (021)20231000-1401 E-mail: yzhuang@mail.shcnc.ac.cn

**1.1.2 仪器** UV-2450 分光光度计(日本岛津); MALVERN ZETA SIZER N 粒度仪分析仪(ZEN3690, 马尔文); JEM-200CX 透射电子显微镜(日本日立公司); FV1000 激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯); 流式细胞仪(美国 FACS Calibur); P-4010 电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP, 日本日立公司); TG 209 F3 热重分析仪(德国 NETZSCH 公司)。

**1.1.3 细胞株及细胞培养** 人乳腺癌耐药细胞株(MCF-7/ADR)购自中科院上海细胞库。采用含 10% 胎牛血清 RPIM1640 完全培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中连续培养。采用含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化液消化细胞, 进行传代培养 2~3 代, 取对数生长期细胞进行实验。

## 1.2 方法

**1.2.1 AgNP 的合成**<sup>[11]</sup> 精密称取 17.1 mg PVP, 置 25 mL 圆底烧瓶中, 加入 7.5 mL 超纯水使其溶解, 室温下磁力搅拌 30 min。缓慢滴加 6 mol·L<sup>-1</sup> 的硝酸银溶液 1.25 mL, 继续中速搅拌 30 min, 最后快速注入新配制的 0.008 mol·L<sup>-1</sup> NaBH<sub>4</sub> 5 mL, 快速搅拌 60 min。

**1.2.2 AgNP 的修饰**<sup>[12]</sup> 量取制备好的 AgNP 溶液 2 mL, TAT 水溶液 1 mL, 置适宜的圆底 EP 管里, 充分混匀(C<sub>AgNP</sub>: C<sub>TAT</sub> = 1: 1), 置 37 °C 水浴中 2.5 h。采用截留分子量为 12 000 的透析袋透析除去溶液中游离的 TAT, 截留分子量为 10 000 的超滤浓缩管对其进行超滤浓缩。

AgNP 及 AgNP-TAT 的荧光修饰: 量取制备好的 AgNP 溶液 2 mL, 荧光素溶液 1 mL, 置适宜的圆底 EP 管中, 充分混匀(C<sub>AgNP</sub>: C<sub>荧光素</sub> = 1: 1), 置 37 °C 水浴中 2.5 h, 同法制备得到荧光修饰的 AgNP-TAT。

采用二喹林甲酸法(BCA 法)及热重分析法(TGA 法)测定 AgNP-TAT 上 TAT 的量: 使用 Biomiga 公司提供的 BCA 法蛋白浓度定量试剂盒, 参照文献[13]对修饰到 AgNP 上的穿膜肽进行含量测定。

采用 TG 209 F3 热重分析仪对 AgNP 及 AgNP-TAT 进行热重分析。分析的温度范围是 30~500 °C, 上升速率为 10 °C·min<sup>-1</sup>。根据 AgNP 及 AgNP-TAT 失重变化来直接测定 AgNP-TAT 上 TAT 的量。

**1.2.3 纳米粒的表征** 用紫外分光光度计对相同浓度的 AgNP 及 AgNP-TAT 的 UV 吸收光谱进行扫描, 扫描的波长范围为 300~800 nm。用粒度仪

分析仪对 AgNP 及 AgNP-TAT 的粒径及电位进行测定分析。用透射电子显微镜对 AgNP 及 AgNP-TAT 的形貌及均匀性进行分析。

## 1.2.4 AgNP 及 AgNP-TAT 穿膜活性的研究

**1.2.4.1 样品制备** 量取一定量的荧光素修饰的 AgNP 及 AgNP-TAT, 采用截留分子量为 12 000 的透析袋将游离的荧光素透析干净, 截留分子量为 10 000 的超滤浓缩管将其浓缩到适宜的浓度, 待用。

**1.2.4.2 MCF-7/ADR 细胞摄取实验** 取对数生长期 MCF-7/ADR 细胞, 以每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞的密度接种于 24 孔板, 常规培养。培养 24 h 细胞贴壁后, 将培养体系换成无血清的 RPIM 1640 培养基, 将制备好的 AgNP 及 AgNP-TAT 分别加入, 使两者终浓度均为 36.3 μmol·L<sup>-1</sup>, 另设一组空白对照组, 每组设置 3 个复孔, 摄取 2 h, 用 4% 的多聚甲醛固定, 采用 DAPI 染细胞核, 用 90% 的甘油固定(整个操作过程均用 pH 7.4 的无菌 PBS 冲洗细胞), 激光共聚焦显微镜观察 MCF-7/ADR 细胞的摄取情况。

取对数生长期 MCF-7/ADR 细胞, 以每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞的密度接种于 6 孔板, 常规培养。培养 24 h 细胞贴壁后, 将培养体系换成无血清的 RPIM 1640 培养基, 将制备好的 AgNP 及 AgNP-TAT 分别加入, 使两者终浓度均为 36.3 μmol·L<sup>-1</sup>, 另设一组空白对照组, 每组两个复孔, 摄取 2 h 后用 0.25% 的胰蛋白酶将其消化并收集到 FACS 管中, 轻轻的反复吹打使其成单细胞悬液, 流式细胞仪定量测定摄取率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AgNP 的表征

采用紫外分光光度计对 AgNP 及 AgNP-TAT 在 300~800 nm 内进行光谱扫描, 结果见图 1。AgNP 形成过程包括成核和长大 2 个过程, 两者的相对速率决定了 AgNP 溶胶的粒径分布状况。AgNP 纳米粒产生等离子共振的区域在 380~400 nm。由图 1 可知, 本实验中 AgNP 的最大吸收波长为 396 nm, 符合典型的纳米银的最大吸收波长的范围, 且修饰 TAT 后 AgNP-TAT 的吸收峰和最大吸收波长基本没有发生变化, 表明 AgNP 修饰 TAT 不会使自身的性质发生改变。

粒度仪分析仪及透射电子显微镜对 AgNP 及 AgNP-TAT 的粒径及形态测定分析结果见图 2 和图 3。粒度仪测得 AgNP 及 AgNP-TAT 的粒径均

<10 nm。TEM 图则显示 AgNP 及 AgNP-TAT 的形状多为球形而且粒子大小均匀,说明 AgNP 形成过程中各粒子晶核的形成、长大 2 个过程达到了相对均衡的速率。由两图粒子大小及均一度得出,在 AgNP 上修饰 TAT 的过程基本没有影响 AgNP 的粒径及形态,没有使得 AgNP 发生聚集和沉淀。

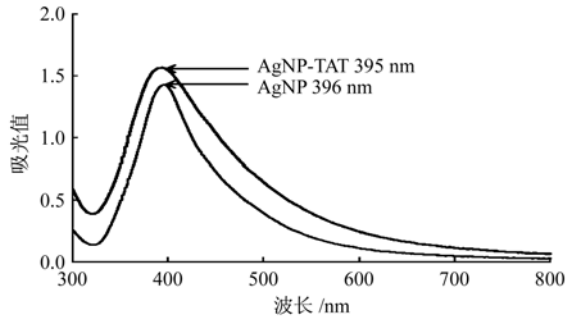


图 1 AgNP 及 AgNP-TAT 的紫外光谱图  
Fig 1 The ultraviolet spectrum of AgNP and AgNP-TAT

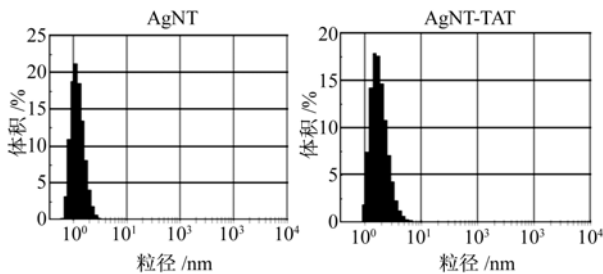


图 2 AgNP 及 AgNP-TAT 的粒径图  
Fig 2 The particles size distribution of AgNP and AgNP-TAT

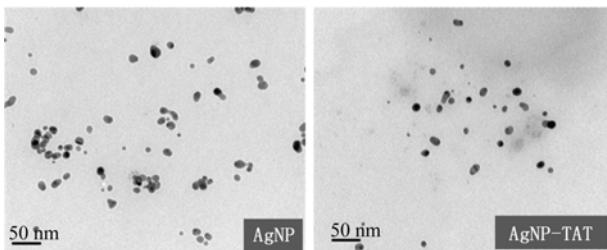


图 3 AgNP 及 AgNP-TAT 的透射电镜图  
Fig 3 The TEM of AgNP and AgNP-TAT

对 AgNP 修饰 TAT 后,纳米粒的电位从-16.8 mV 增加到+13.8 mV,结果见图 4。TAT 通过自身携带的巯基可以与 AgNP 共价连接形成 Ag-S 键<sup>[12]</sup>,由于 TAT 本身带有较强的正电荷,AgNP 的电位变化(由负到正)表明了 AgNP 表面成功修饰了 TAT。无论是 AgNP 还是 AgNP-TAT 的电位峰都是单峰,说明每个 AgNP 粒子表面修饰 TAT 的量比较均一。

## 2.2 AgNP 上修饰 TAT 的量

BCA 法测定 TAT 量的标准曲线为:  $y=0.590x+$

$0.310(r=0.999)$ ,在  $0\sim 0.091\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性良好。由 BCA 法间接算出的连接在 AgNP 上的 TAT 占 AgNP-TAT 的重量比为 28.14%。AgNP 及 AgNP-TAT 的 TGA 谱图见图 5,由图 5 可以看出,在温度上升到 500 °C 时,AgNP 的质量减少 23.53%,而 AgNP-TAT 的质量减少了 46.06%,两者的差即为连接在 AgNP 上的 TAT 的量,即由热重分析结果可以看出连接到 AgNP 表面上的 TAT 的量占 AgNP-TAT 重量的 22.53%,基本上与 BCA 法测定结果相符。两种测定方法都证实在 AgNP 上连接上了 TAT。

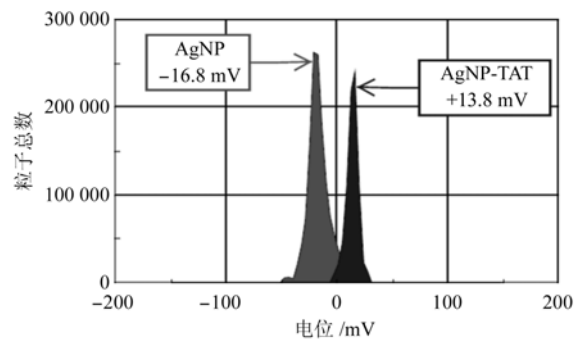


图 4 AgNP 及 AgNP-TAT 的电位图  
Fig 4 The potential of AgNP and AgNP-TAT

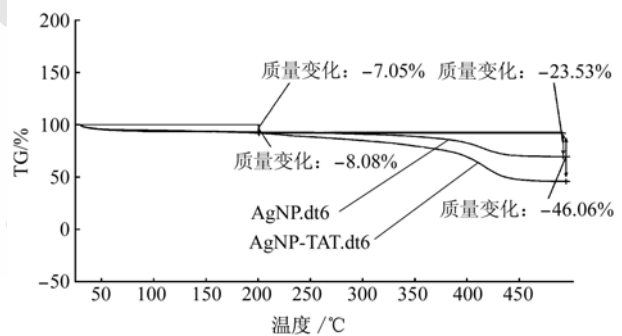


图 5 AgNP 及 AgNP-TAT 的热重分析谱图  
Fig 5 Thermogram of AgNP and AgNP-TAT

## 2.3 MCF-7/ADR 细胞摄取实验

激光共聚焦显微镜测定结果显示,AgNP-TAT 的细胞摄取后的荧光强度与 AgNP 组相比明显增强,结果见图 6。

利用 FCS Express V3 软件对 FACS 结果处理得出:空白对照组的摄取率为 0.16%,AgNP 组为 27.34%,而 AgNP-TAT 组的摄取效率明显增加,达到了 93.54%。无论是从定性还是定量结果来看,AgNP-TAT 组的摄取都比 AgNP 组有了明显的提高,结果表明 TAT 修饰 AgNP 后能明显提高 AgNP 对 MCF-7/ADR 细胞的穿膜效果。

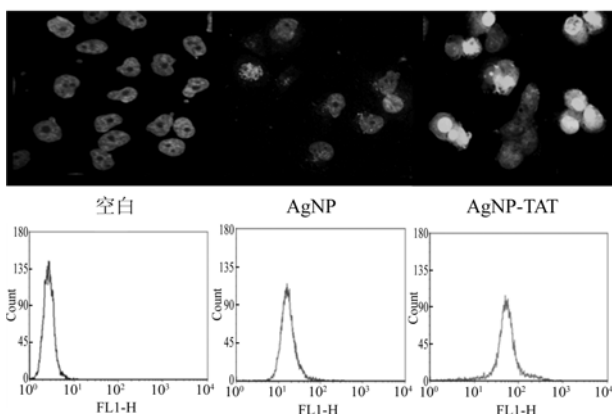


图6 MCF-7/ADR 细胞的 Confocal 及 FACS 图  
Fig 6 The confocal and FACS of MCF-7/ADR

### 3 讨论

本实验采用化学还原法成功制备了粒径 10 nm 以下的纳米粒, 所制备的材料稳定性好、分布均匀。紫外光谱扫描显示其具有典型的 AgNP 的紫外吸收光谱特征。通过共价键在纳米银上成功修饰了穿膜肽, 且修饰后没有改变 AgNP 的本质。激光共聚焦显微镜照片及流式细胞仪检测结果显示, 修饰穿膜肽后纳米银的穿膜活性得到了极大的提高。本实验成功解决了 AgNP 作为一种刚性的金属纳米粒穿过细胞膜进入细胞困难的问题, 为 AgNP 发挥其潜在的抗菌、抗病毒和抗肿瘤作用提供了很好的前提, 具有广阔的应用前景。

### REFERENCES

[1] YOON K Y, BYEON J H, PARK J H, et al. Antimicrobial characteristics of silver aerosol nanoparticles against *Bacillus subtilis* bioaerosols [J]. *Environ Eng Sci*, 2008, 25(2): 289-294.

[2] SUN R W Y, CHEN R, CHUNG N P Y, et al. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells [J]. *Chem Commun(Camb)*, 2005(40): 5059-5061.

[3] YOUNGS W J, ROBISHAW N, PANZNER M J, et al. Treatment of breast cancer with silver antitumor drugs encapsulated in biodegradable polymeric nanoparticles [J]. *Nanotech*, 2009(2): 5-8.

[4] GOPINATH P, GOGOI S K, CHATTOPADHYAY A, et al. Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for *in vitro* gene therapy [J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(7): 075104.

[5] VERMA S K, MANI P, SHARMA N R, et al. Histidylated lipid-modified Sendai viral envelopes mediate enhanced membrane fusion and potentiate targeted gene delivery [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35399-35409.

[6] SCHWARZE S R, HRUSKA K A, DOWDY S F. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? [J]. *Trends Cell Bio*, 2000, 10(7): 290-295.

[7] LINDGREN M, HALLBRINK M, PPROCHIANTZ A, et al. Cell-penetrating peptides [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21(3): 99-103.

[8] EZHEVSKY S A, HO A, BECKER-HAPAK M, et al. Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes *in vivo* [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(14): 4773-4784.

[9] NAGAHARA H, VOCERO-AKBANI A M, SNYDER E L, et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27(Kip1) induces cell migration [J]. *Na Med*, 1998, 4(12): 1449-1452.

[10] KLEKOTKA P A, SANTORO S A, HO A, et al. Mammary epithelial cell-cycle progression via the alpha(2)beta(1) integrin: Unique and synergistic roles of the alpha(2) cytoplasmic domain [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(3): 983-992.

[11] LOGAR M, JANCAR B, SUVOROV D, et al. In situ synthesis of Ag nanoparticles in polyelectrolyte multilayers [J]. *Nanotechnology*, 2007, 18(32): 325601.

[12] SHKILNYY A, SOUCE M, DUBOIS P, et al. Poly(ethylene glycol)-stabilized silver nanoparticles for bioanalytical applications of SERS spectroscopy [J]. *Analyst*, 2009, 134(9): 1868-1872.

[13] SMITH P K, KROHN P I, HERMANSON G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. *Anal Biochem*, 1985, 150(1): 76-85.

收稿日期: 2012-02-09

## 茵陈蒿汤保肝作用的血清药理学研究

窦志华<sup>1</sup>, 罗琳<sup>2\*</sup>, 候金燕<sup>3</sup>, 张琳<sup>1</sup>, 杨爱华<sup>3</sup>, 安莉萍<sup>3</sup> (1.南通大学附属南通第三医院, 江苏 南通 226006; 2.南通大学, 江苏 南通 226001; 3.南京中医药大学, 南京 210046)

**摘要:** 目的 建立茵陈蒿汤血清药理学研究方法。方法 建立 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝细胞损伤细胞模型, SD 大鼠为含药血清供体, 以含药血清对损伤肝细胞增殖(WST-8 法)的影响为指标, 采用正交试验法优选含药血清的制备方法, 并确定体系中血清添加量。结果 每天以成人等效剂量 10 倍的茵陈蒿汤水提醇沉液间隔 8 h 分 2 次给正常大鼠灌胃给药, 连续 3 d, 末次给药后 1 h 采集血浆, 体系中加入 20%含药血清能明显提高损伤肝细胞的增殖能力。结论 适宜条件下制备的茵陈

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(08KJB360009); 江苏省中医药局科研计划项目(HZ07071)

作者简介: 窦志华, 男, 博士, 主任中医师, 硕导 Tel: (0513)85116027 E-mail: zhihuadou@163.com \*通信作者: 罗琳, 女, 博士生, 副教授, 硕导 Tel: (0513)85051726 E-mail: luolin@ntu.edu.cn