

文章编号 1672-6634(2021)06-0104-07

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2021.06.013

# 镍螯合脂质体修饰对 TRAIL 稳定性及半衰期的影响

王菲菲<sup>1</sup>,袁风娇<sup>2</sup>,杨玉娇<sup>1</sup>,路岳<sup>1</sup>,李军<sup>1</sup>,贾殿隆<sup>1</sup>,柳仁民<sup>1</sup>

(1. 聊城大学 药学院, 山东 聊城 252059; 2. 聊城市人民医院 转化医学研究联合实验室, 山东, 聊城, 252000)

**摘要** 目的:将 TRAIL 用镍螯合脂质体进行修饰,研究其对 TRAIL 稳定性及半衰期的影响。方法:制备镍螯合脂质体(LS-Ni),将其与含 6His 标签的 TRAIL 孵育,得到 TRAIL 脂质体(LS-Ni-T);采用离心法与 SDS-PAGE 研究 TRAIL 与 LS-Ni 的亲合吸附效果;在正常及肿瘤细胞中检测 LS-Ni-T 的细胞毒性;评估 LS-Ni-T 在储存条件(4 °C)和生理条件(37 °C)下的稳定性;将 LS-Ni-T 经尾静脉注射小鼠体内,一定时间后分离血浆,测试其对 Colo205 细胞的细胞毒性以反映 LS-Ni-T 体内半衰期。结果:LS-Ni-T 平均粒径为 127.33 ± 0.87 nm,电泳显示 TRAIL 可高效与 LS-Ni 结合,LS-Ni-T 与 TRAIL 对正常及肿瘤细胞的毒性无显著性差异,LS-Ni-T 在 4 °C 和 37 °C 下的稳定性显著优于 TRAIL,药代动力学实验表明 LS-Ni-T 血浆代谢显著慢于 TRAIL。结论:镍螯合脂质体修饰可增强 TRAIL 蛋白的体外稳定性并延长体内血浆半衰期。

**关键词** TRAIL, 镍螯合脂质体, 稳定性, 半衰期

**中图分类号** R943; R96

**文献标识号** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## The Effect of Nickel Chelating Liposome Modification on the Stability and Half-life of TRAIL

WANG Feifei<sup>1</sup>, YUAN Fengjiao<sup>2</sup>, YANG Yujiao<sup>1</sup>, LU Yue<sup>1</sup>,  
LI Jun<sup>1</sup>, JIA Dianlong<sup>1</sup>, LIU Renmin<sup>1</sup>

(1.School of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2.Joint Laboratory for Translational Medicine Research, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China)

**Abstract** Objective: The TRAIL was modified with nickel chelating liposomes, and the effect on the stability and half-life of TRAIL was studied. Methods: We firstly prepared nickel chelating liposomes (LS-Ni), and incubated them with TRAIL containing 6His tags to obtain TRAIL liposomes (LS-Ni-T); The coupling efficiency of TRAIL and LS-Ni was subsequently detected by SDS-PAGE after centrifugation; The cytotoxicity of LS-Ni-T in normal and tumor cells was then detected; And the stability of LS-Ni-T under storage conditions (4 °C) and physiological conditions (37 °C) was evaluated; Finally, LS-Ni-T was intravenously injected into mice, and the plasma was separated for testing its cytotoxicity on Colo205 to

收稿日期:2021-04-06

基金项目:国家自然科学基金项目(31401217);山东省自然科学基金项目(ZR2019PH006);山东省自然科学基金重点项目(ZR202010290031);聊城大学研究基金资助

通讯作者:贾殿隆,男,汉族,博士,讲师;研究方向:药物靶向递送,E-mail:jiadianlong@lcu.edu.cn;柳仁民,男,汉族,博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:liurenmin@lcu.edu.cn。

reflect the plasma half-life of LS-Ni-T *in vivo*. Result: The average particle size of LS-Ni-T was  $127.33 \pm 0.87$  nm; SDS-PAGE showed that TRAIL could efficiently combine with LS-Ni; There is no significant difference in the toxicity of LS-Ni-T and TRAIL to normal and tumor cells; The stability of LS-Ni-T at 4 °C and 37 °C is significantly better than that of TRAIL; Pharmacokinetic experiments showed that the clearance of LS-Ni-T in plasma is significantly slower than that of TRAIL. Conclusion: Nickel chelating liposome modification could enhance the *in vitro* stability of TRAIL and prolong its plasma half-life *in vivo*.

**Key words** TRAIL, nickel chelated liposome, stability, half-life

## 0 引言

特异性诱导肿瘤细胞凋亡是一种关键的抗癌策略<sup>[1]</sup>。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子超家族成员之一<sup>[2]</sup>,其胞外段经蛋白酶水解形成可溶型 TRAIL(sTRAIL)。它可通过激活肿瘤细胞表面高表达的死亡受体(DRs) 4 和 5,启动 Caspase 信号途径,选择性地诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[3]</sup>。而对多数正常细胞则表现出无毒或低毒性,具有良好的肿瘤细胞杀伤选择性<sup>[4]</sup>。因此,TRAIL 一经发现就被认为是极具潜力的抗癌药物<sup>[5, 6]</sup>。

可溶型 TRAIL 的活性状态为非共价连接的三聚体形式,稳定性欠佳。并且,TRAIL 作为小分子蛋白质,进入血液后可被肾小球的滤过作用快速清除<sup>[7]</sup>,造成其血浆半衰期极短(小鼠 3-5 min,灵长类 30-60 min),生物利用度较低,严重限制了其体内抗肿瘤疗效,这是导致其临床试验失败的一个重要原因<sup>[8]</sup>。对 TRAIL 蛋白进行修饰改造以延长其血浆半衰期已成为近些年的研究热点。如韦小越等<sup>[9]</sup>用 PEG 修饰可显著延长 TRAIL 血浆半衰期并提高其稳定性;罗岚等<sup>[10]</sup>将抗体 Fc 结构域与 TRAIL 融合表达形成 TRAIL-Fc 融合蛋白,其体内半衰期得到大幅提升;Lim<sup>[11]</sup>等利用肝素和聚赖氨酸将 TRAIL 制成纳米制剂可明显改善其体内代谢。

脂质体(Liposome, LS)是一种常见的药物载体,其制备简单且经济,具有良好的功能化和修饰潜力<sup>[12, 13]</sup>,小分子药物经脂质体修饰递送可有效改善体内代谢性质。纳米级的脂质体还可通过增强渗透性和滞留(EPR)效应在肿瘤微环境中富集<sup>[14]</sup>。亦有相关文献报道利用脂质体对 TRAIL 进行修饰改造。如范丽<sup>[15]</sup>采用薄膜水化法将 TRAIL 包裹于脂质体内部以改善其体内代谢,但 TRAIL 被脂质体包裹后可能限制其与死亡受体的结合,造成杀伤活性下降;Seifert 等<sup>[16]</sup>利用双官能团的 PEG 将 TRAIL 共价连接到脂质体表面,有效延长了其血浆半衰期,但此方法工艺相对复杂;Miguel 等<sup>[17]</sup>将 DOGS-NTA-Ni 脂材掺入脂质体得到镍螯合脂质体( LS-Ni),再将带 6His 标签的 TRAIL 与 LS-Ni 进行混合孵育,可使其亲和吸附于脂质体表面。此方法工艺简单稳定,是一种理想的 TRAIL 修饰递送策略。他们对此方法制备的脂质体 TRAIL 进行体内外抗肿瘤活性研究,但并未探讨此修饰方法对 TRAIL 稳定性及血浆半衰期的影响。本研究,采用乙醇注入法制备镍螯合脂质体,再将其与 TRAIL 孵育得到 TRAIL 脂质体( LS-Ni-T),重点研究了镍螯合脂质体修饰 TRAIL 后,对 TRAIL 蛋白体外稳定性及体内血浆半衰期的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

TRAIL 的制备参照先前的方法<sup>[18]</sup>。Cell Counting Kit-8(CCK8)试剂盒购自美国 MedChem Express (MCE)公司;DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Thermo Fisher Scientific(GIBCO)公司;氢化大豆卵磷脂(HSPC)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-mPEG2000)购自西安瑞禧公司;胆固醇(CHOL)购自 Sigma 公司;1,2-二油酰基-甘油-3[(N-(5-氨基-1-羧基戊基)-亚氨基二乙酸)琥珀酰基](DOGS-NTA-Ni)购自美国 Avanti Polar Lipids 公司;聚碳酸酯膜购自 Whatman 公司。ZETASIZER 分析仪是由英国 Malvern 公司制造;脂质体挤出器 LF-1 由美国 Avanti 公司制造;XP6 百万分之一超微量天平为德国梅特勒-托利多公司制造;Synergy H1 酶标仪为美国 BioTek 公司生产。

## 1.2 实验方法

1.2.1 镍整合脂质体(LS-Ni)以及空白脂质体(LS)的制备。镍整合脂质体所使用的脂材及比例如下: HSPC:CHOL:DSPE-mPEG 2000:DOGS-NTA-Ni=8:1:0.5:0.5, W/W。按照以上比例分别精确称取各组分于 1.5 mL EP 管,加入适量的无水乙醇,65 °C 水浴条件下使脂材全部溶解,涡旋均匀形成油相;取 3 mL PBS(pH 7.4)于 5 mL 离心管中,65 °C 水浴预热,磁力搅拌使 PBS 形成漩涡,即为水相。用注射器将油相快速注入预热的水相中,在 65 °C 下温和搅拌孵育 30 min,形成脂质体,浓度为 10 mg/mL。将脂质体转入孔径为 100 kua 的透析袋中,用 PBS(pH 7.4)透析两次,每次三个小时,完全除去乙醇。再将其装入脂质体挤出器,依次通过孔径为 200 nm 及 100 nm 的聚碳酸酯膜,分别挤出 21 次,获得粒径均一的镍整合脂质体(LS-Ni)。普通脂质体(LS)制备时不加入 DOGS-NTA-Ni,其制备方法及比例与上述方法相同。

1.2.2 LS-Ni-T 的制备。取适量 PBS(pH 7.4)透析后的 TRAIL 蛋白与 LS-Ni 在室温孵育 30 min(TRAIL: DOGS-NTA-Ni=2:1, W/W),期间用移液器温和混匀三至四次,形成 LS-Ni-T 溶液。LS/T 的制备按照上述投料量将 TRAIL 与 LS 混合得到。

1.2.3 LS-Ni-T 的表征。将新制备的 TRAIL / LS-Ni / LS-Ni-T 以及不同储存时间的 LS-Ni-T,用 PBS 按照体积比为 1 : 100 的比例稀释,采用英国 Malvern 公司的 ZETASIZER 分析仪测定粒径和 Zeta 电位,每份样品重复 3 次。

1.2.4 SDS-PAGE 检测 LS-Ni 对 TRAIL 的亲合吸附效果。通过高速离心检测镍整合脂质体亲和吸附 TRAIL 的效果。取 30  $\mu$ L LS-Ni-T,21000 g 离心 10 min,分别收集上清液和沉淀,沉淀用 15  $\mu$ L 电泳上样缓冲液重悬。用不含 DOGS-NTA-Ni 的普通脂质体与 TRAIL 混合所得的 LS/T 作为对照组。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对它们进行电泳检测。

1.2.5 细胞培养。人表皮鳞状癌细胞株(A431)、人非小细胞肺癌细胞株(A549)、人源胚胎肾细胞(293T)用 DMEM+10% FBS 培养基,人结肠癌细胞株(Colo205)用 RPMI-1640+10% FBS 培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>(相对湿度 90%)培养箱中培养,每 2-3 d 更换一次培养基。取对数生长期的细胞接种于培养皿或培养瓶中,生长至 80%-90%密度时传代或铺板,进行后续细胞实验。

1.2.6 细胞毒性分析。采用 CCK8 试剂盒检测 LS-Ni-T 对肿瘤细胞及正常细胞的杀伤作用。收集对数生长期的细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔培养板,培养 24 h。丢弃旧的培养基,分别加入培养基稀释的药物(TRAIL 或 LS-Ni-T,每孔 100  $\mu$ L),每个样品平行三个复孔,空白对照组仅给予培养基。各组细胞继续培养 24 h。每孔加入 10  $\mu$ L CCK8 试剂,继续培养 1-4 h,至部分样品孔呈现暗黄色。用 SYNERGY H1 酶标仪在 450 nm 处读取吸光光度值(OD)。计算相对细胞存活率  $x(\%) = [(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{未给药组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.2.7 LS-Ni-T 稳定性考察。将 LS-Ni-T 和 TRAIL 分别用 PBS 稀释至 100 nM,生理条件(37 °C)下孵育一定时间(0、4、12、24 和 48 h),用含 10% FBS 的培养基再将蛋白稀释至 10 nM,加入提前接好 Colo205 细胞的 96 孔培养板中,37 °C 孵育 24 h,用 CCK8 试剂盒检测细胞存活率。将制备好的 LS-Ni-T 和 TRAIL 分别置于无菌 1.5 mL EP 管中,密闭,于储存条件(4 °C)分别放置 0、5、10、15 和 20 d,测定储存后 TRAIL/LS-Ni-T 的杀伤活性,并与初始值比较,评价稳定性。

1.2.8 药代动力学分析。通过检测给药后血浆对 Colo205 细胞的杀伤活性随时间的变化趋势,评估镍整合脂质体亲和吸附 TRAIL 后,对 TRAIL 蛋白的血浆半衰期的影响。将 6 周龄的昆明小鼠分为三组(每组 3 只),尾静脉分别注射 TRAIL、LS-Ni-T 和 LS/T(各组 TRAIL 换算剂量均为 3 mg/kg),分别在药物注射 10 min、0.5、1、2、4 和 8 h 后,通过眼球取血,用乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝,4000 g 离心 4 min,得到小鼠血浆。将血浆稀释 10、25、50、100 和 250 倍,测试其对 Colo205 细胞的杀伤活性,来反映 TRAIL、LS-Ni-T 及 LS/T 在血浆中的存留情况。

1.2.9 统计学处理。实验所得数据均以平均值(Mean  $\pm$  SD)表示,各组数据差异性比较采用 t-test(非参数检验)方法进行分析。结果用平均数的平均值  $\pm$  标准误差(SEM)表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 LS-Ni-T 的制备

如“1.2.1 镍整合脂质体(LS-Ni)以及空白脂质体(LS)的制备”所述,制备镍整合及空白脂质体。LS-Ni 与 TRAIL 室温孵育 30 min,得到镍整合脂质体修饰的 TRAIL,即 LS-Ni-T,结构如图 1(a)所示。其制备过程如图 1(b)所示。

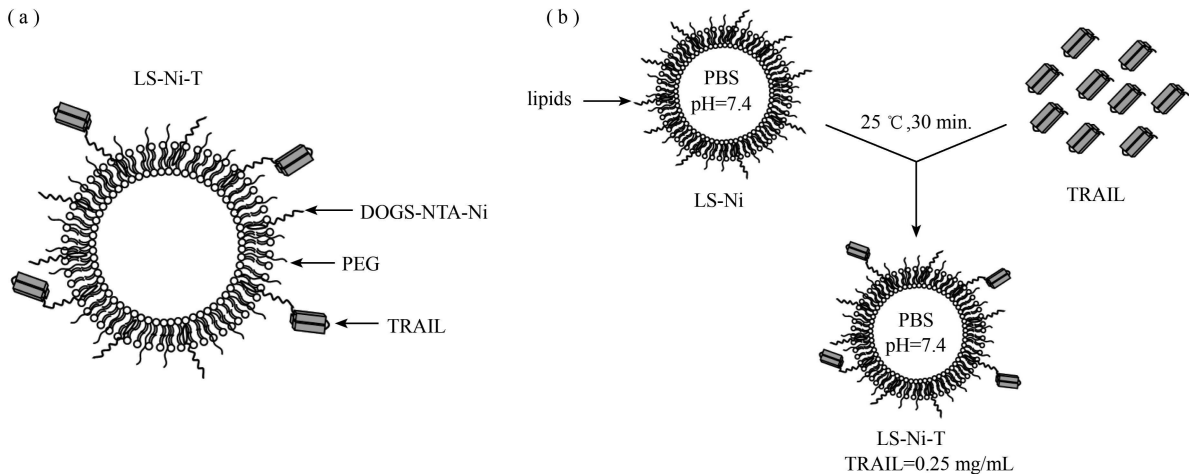
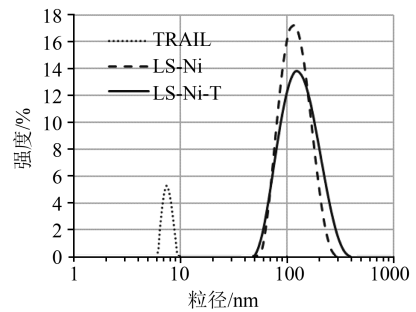


图 1 TRAIL 脂质体的结构与构建示意图

### 2.2 LS-Ni-T 的表征

图 2 为 TRAIL 蛋白的粒径分布图。由检测结果可知,TRAIL 蛋白的平均粒径为  $8.15 \pm 0.25$  nm,LS-Ni 的平均粒径为  $119.23 \pm 0.73$  nm,LS-Ni-T 的平均粒径为  $127.33 \pm 0.87$  nm。相关数据见表 1,LS-Ni-T 粒径相比 LS-Ni 增大约 8 nm,提示 TRAIL 通过镍整合剂亲和吸附在脂质体表面,从而使其粒径增加。TRAIL、LS-Ni 以及 LS-Ni-T 的多分散指数(PDI)均小于 0.2,表明 TRAIL、LS-Ni 以及 LS-Ni-T 是高度均匀分布的,其 Zeta 电位分别为  $-5.34 \pm 0.659$  mV、 $-1.20 \pm 0.130$  mV、 $-6.95 \pm 0.870$  mV。



注:TRAIL、LS-Ni 和 LS-Ni-T 与 PBS 溶液按照 1 : 100 的比例稀释,用 ZETASIZER Nano Series 进行检测。

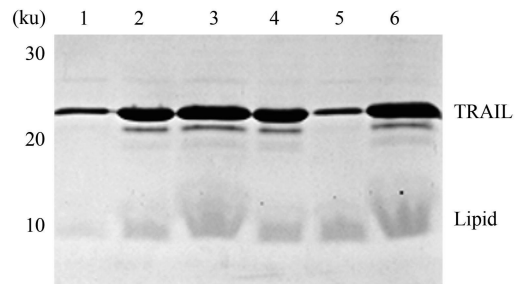
图 2 TRAIL、LS-Ni、LS-Ni-T 的粒径检测

表 1 TRAIL, LS-Ni 和 LS-Ni-T 的表征分析

样品	平均粒径/nm	多分散指数	Zeta 电位/mV
TRAIL	$8.15 \pm 0.25$	$0.192 \pm 0.003$	$-5.34 \pm 0.659$
LS-Ni	$119.23 \pm 0.73$	$0.177 \pm 0.004$	$-1.20 \pm 0.130$
LS-Ni-T	$127.33 \pm 0.87$	$0.158 \pm 0.004$	$-6.95 \pm 0.870$

### 2.3 LS-Ni-T 中 TRAIL 的亲合吸附效果

高速离心可将部分脂质体沉降,而 TRAIL 作为小分子蛋白在同离心力下不能沉降,但当它与 LS-Ni 亲和后,则在理论上可被离心沉降下来。据此来检测 LS-Ni-T 中 TRAIL 被脂质体亲和和吸附效果。如图 3 所示,高速离心后,LS-Ni-T 离心上清(泳道 1)中 TRAIL 蛋白量明显比 LS/T 上清(泳道 4)中的少;而 LS-Ni-T 离心沉淀(泳道 2)中 TRAIL 蛋白量显著多于 LS/T 沉淀中(泳道 5)TRAIL 的量。这表明在 LS-Ni-T 中,TRAIL 可高效亲和和吸附在脂质体上,而被大量离心沉降下来。

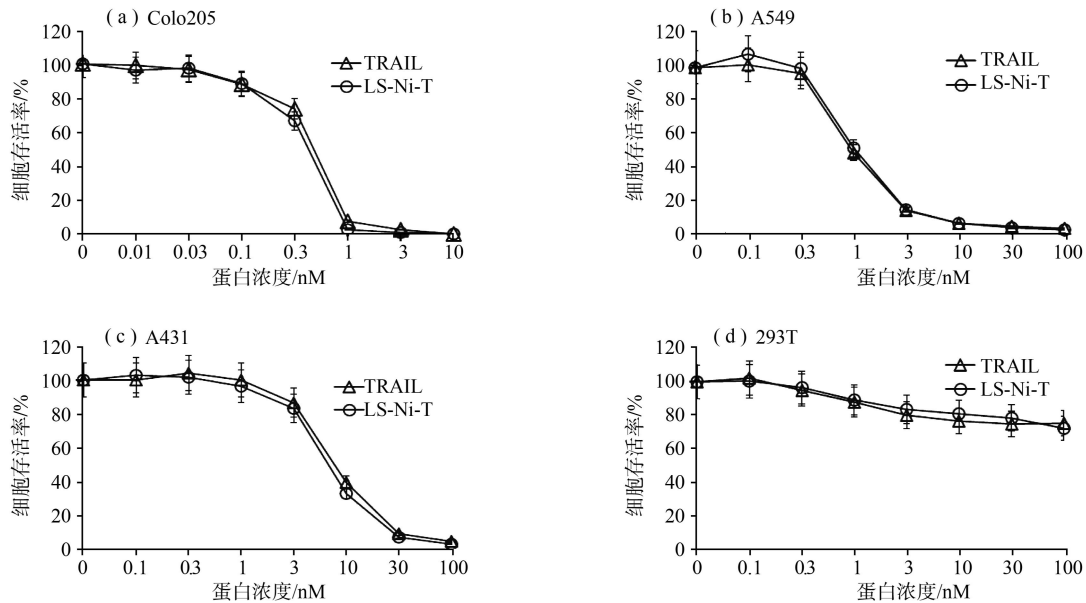


注:泳道 1:LS-Ni-T 离心上清液;泳道 2:LS-Ni-T 离心沉淀;泳道 3:未离心 LS-Ni-T;泳道 4:LS/T 离心上清液;泳道 5:LS/T 离心沉淀;泳道 6:未离心 LS/T。

图 3 SDS-PAGE 检测 LS-Ni 亲和吸附 TRAIL 的效率

## 2.4 杀伤活性分析

选用肿瘤细胞 Colo205、A549、A431 和正常细胞 293T, 研究 TRAIL 经镍螯合脂质体修饰后杀伤活性的变化。将 TRAIL 及 LS-Ni-T 用完全培养基稀释不同倍数, 分别加入 Colo205、A549、A431 及 293T 细胞中, 通过细胞存活率来反应镍螯合脂质体修饰对 TRAIL 杀伤活性的影响, 结果见图 4。由图 4 可见, 肿瘤细胞存活率随着药物浓度的增加而降低, 呈现明显的浓度依赖性。LS-Ni-T 与 TRAIL 的细胞杀伤曲线几乎重合, 二者对这三种肿瘤细胞的杀伤活性无显著差异(图 4(a, b, c))。正常细胞 293T, LS-Ni-T 与 TRAIL 在 0-100 nM 浓度范围均不产生明显的杀伤作用, 二者的杀伤曲线同样高度重合(图 4(d))。这些结果表明, 镍螯合脂质体修饰 TRAIL 不影响其对肿瘤细胞的杀伤活性及对正常细胞的毒性。



注:(a) TRAIL 和 LS-Ni-T 对 Colo205 细胞的杀伤曲线;(b) TRAIL/LS-Ni-T 对 A549 细胞的杀伤曲线;  
(c) TRAIL/LS-Ni-T 对 A431 细胞的杀伤曲线;(d) TRAIL/LS-Ni-T 对 293T 细胞的杀伤曲线。

图 4 杀伤活性分析

## 2.5 LS-Ni-T 稳定性分析

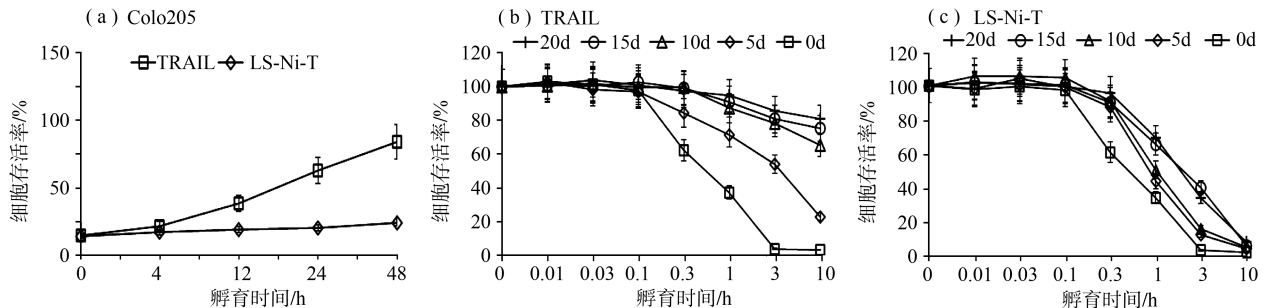
将 LS-Ni-T 于 4 °C 储存放置, 在 0、5、10、15 和 20 d 分别取样, 用粒度仪测定其平均粒径, 多分散指数和 Zeta 电位。如表 2 所示, 其平均粒径和 Zeta 电位各时间内变化不大, 无统计学差异, 但储存后的多分散指数 (PDI) 相比于第 0 d 有一定的增长。由此可知 LS-Ni-T 在 4 °C 储存条件下平均粒径与表面 Zeta 电位保持稳定, 但粒径均一性有所下降。

表 2 LS-Ni-T 在 4 °C 储存后的表征分析

样品	平均粒径/nm	多分散指数	Zeta 电位/mV
0 d	120.03±0.867	0.189±0.005	-5.36±0.138
5 d	123.07±2.57	0.267±0.028	-5.49±0.567
10 d	125.67±4.27	0.313±0.008	-5.41±0.333
15 d	125.73±1.67	0.339±0.016	-6.50±0.470
20 d	127.07±1.63	0.345±0.023	-6.10±0.740

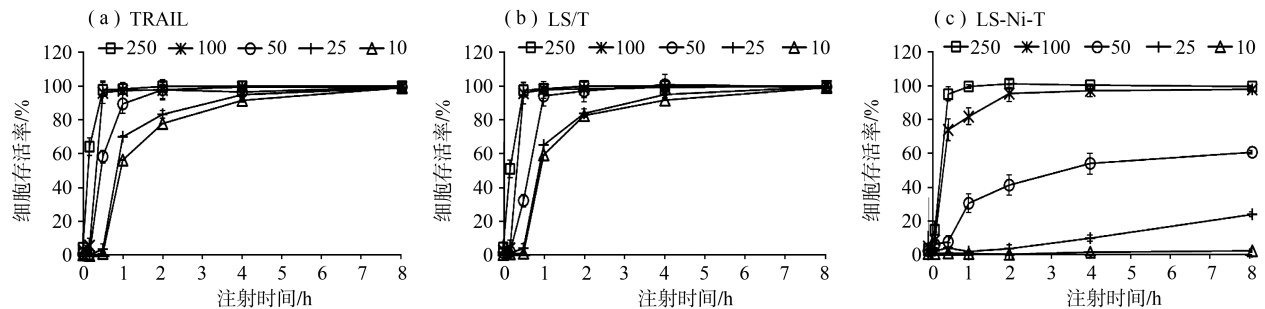
作为多聚体蛋白, TRAIL 稳定性欠佳, 其杀伤活性在溶液中会逐渐下降。本研究中进一步测试了镍螯合脂质体修饰对 TRAIL 稳定性的影响。将 LS-Ni-T 和 TRAIL 在生理条件 (37 °C) 孵育 0、4、12、24 和 48 h, 或在 4 °C 储存 0、5、10、15 和 20 d, 分别检测其对 Colo205 细胞的杀伤活性, 以此来反映二者的稳定性。如图 5 (a) 所示, 在 37 °C 条件下, TRAIL 蛋白的杀伤活性随孵育时间的延长快速下降, 孵育 48 h 后, 1 nM 浓

度下其对 Colo205 细胞的杀伤效率不足 20%,而 LS-Ni-T 的杀伤活性几乎没有变化。如图 5(b)和 5(c)所示,TRAIL 在 4 °C 条件下储存,杀伤活性逐渐下降,其在放置 10、15 和 20 d 后的杀伤活性较新制备的 TRAIL 显著降低,而 LS-Ni-T 在 4 °C 储存 5、10、15 和 20 d 后,其杀伤活性与新制备的 LS-Ni-T 无显著性差异。以上结果表明,无论是在 37 °C 孵育还是在 4 °C 储存,游离的 TRAIL 蛋白稳定性不佳,但镍整合脂质体亲和吸附 TRAIL 后,会对其活性产生保护作用,增强其稳定性。



注:(a) TRAIL 和 LS-Ni-T 在 37°C 孵育 0、4、12、24 和 48 h,检测它们对 Colo205 的杀伤活性;(b) TRAIL 在 4 °C 储存 0、5、10、15 和 20 d,检测其杀伤活性;(c) LS-Ni-T 在 4 °C 储存 0、5、10、15 和 20 d,检测其杀伤活性。

图 5 LS-Ni-T 稳定性分析



注:(a) 游离 TRAIL 的体内半衰期;(b) LS/T 的体内半衰期;(c) LS-Ni-T 的体内半衰期。

图 6 药代动力学实验

## 2.6 药代动力学实验

镍整合脂质体亲和吸附 TRAIL 后,理论上可避免其在血浆中被肾小球的滤过作用快速清除,从而延长 TRAIL 蛋白的血浆半衰期,在本研究中对此进行了验证。将 6 周龄的昆明小鼠分为三组,每组三只,分别尾静脉注射 3 mg/kg 的 TRAIL、LS/T 和 LS-Ni-T,在 0.25、0.5、1、2、4 和 8 h 眼球取血,EDTA-2Na 抗凝,离心得小鼠血浆。将血浆稀释不同倍数,用 Colo205 细胞检测其杀伤活性并绘制活性变化曲线,以此来反映 TRAIL、LS/T 和 LS-Ni-T 在血浆中的代谢情况。如图 6 所示,TRAIL 和 LS/T 组体内代谢 1 h 后,其血浆稀释 50 倍已检测不出对细胞的杀伤作用(图 6 (a)、(b)),而 LS-Ni-T 组代谢 8 h 后的血浆稀释 50 倍仍能杀伤近一半的细胞(图 6 (c))。进一步比较各组血浆稀释 10、25、100 和 250 倍的杀伤曲线,LS/T 组相比 TRAIL 组杀伤活性无显著性差异,而 LS-Ni-T 组活性下降明显比 TRAIL 及 LS/T 组延缓。以上数据表明,镍整合脂质体亲和吸附 TRAIL 形成 LS-Ni-T 后,可显著延长 TRAIL 的体内血浆半衰期。

## 3 结论

镍整合脂质体修饰是一种简单有效的 TRAIL 递送策略。本研究,利用 DOGS-NTA-Ni 脂材制备了含镍整合剂的脂质体 LS-Ni,再将其与含 6His 标签的 TRAIL 进行孵育,使 TRAIL 亲和吸附到脂质体表面,得到 LS-Ni-T。研究结果表明,TRAIL 可有效吸附到 LS-Ni 上,其修饰并不改变 TRAIL 对肿瘤细胞的杀伤活性,但可显著提高 TRAIL 在 4 °C 储存条件和 37 °C 生理条件下的稳定性。更为重要的是,本研究证实镍整合脂质体修饰可显著延长 TRAIL 的体内半衰期,将为后续这类药物的开发提供有价值的参考。

## 参 考 文 献

- [1] DE MIGUEL D, LEMKE J, ANEL A, et al. Onto better TRAILs for cancer treatment [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(5): 733-747.
- [2] WILEY S R, SCHOOLEY K, SMOLAK P J, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 673-682.
- [3] 张少华, 刘凯歌, 成碧萍, 等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体抑制卵巢癌 3AO 细胞增殖并促进细胞凋亡 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(5): 453-457.
- [4] HONG R, HAN S I. Extracellular acidity enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis via DR5 in gastric cancer cells [J]. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 2018, 22(5): 513-523.
- [5] MARTINEZ-LOSTAO L, MARZO I, ANEL A, et al. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer [J]. *Biochemical pharmacology*, 2012, 83(11): 1475-1483.
- [6] 陈剑秋, 成诗银, 张惠中, 等. 重组 TRAIL 基因真核表达载体的构建及其诱导喉癌细胞株 Hep2 凋亡的效应 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005(2): 229-232.
- [7] XIANG H, NGUYEN C B, KELLEY S K, et al. Tissue distribution, stability, and pharmacokinetics of Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human colon carcinoma COLO205 tumor-bearing nude mice [J]. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 2004, 32(11): 1230-1238.
- [8] UCKUN F M, MYERS D E, QAZI S, et al. Recombinant human CD19L-sTRAIL effectively targets B cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2015, 125(3): 1006-1018.
- [9] 韦小越. 抗体偶联药物设计中新型载体和新型靶点的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [10] 罗岚, 刘洪洪, 李祥, 等. 含人 Fc 重组凋亡融合蛋白体内外抗肿瘤活性初步研究 [J]. *中国医药生物技术*, 2011, 6(1): 18-23.
- [11] LIM S M, KIM T H, JIANG H H, et al. Improved biological half-life and anti-tumor activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) using PEG-exposed nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(13): 3538-3546.
- [12] BOZZUTO G, MOLINARI A. Liposomes as nanomedical devices [J]. *International journal of nanomedicine*, 2015, 10: 975-999.
- [13] TORCHILIN V P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2005, 4(2): 145-160.
- [14] OROUJENI M, GAROUSI J, ANDERSSON K G, et al. Preclinical evaluation of [(68)Ga]Ga-DFO-ZEGFR:2377: a promising antibody-based probe for noninvasive PET imaging of EGFR expression in tumors [J]. *Cells*, 2018, 7(9): 141.
- [15] 范丽. 复方 TRAIL/DOX 脂质体用于脑胶质瘤的治疗研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [16] SEIFERT O, POLLAK N, NUSSER A, et al. Immuno-LipoTRAIL: Targeted delivery of TRAIL-functionalized liposomal nanoparticles [J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(5): 879-887.
- [17] DE MIGUEL D, GALLEGRO-LLEYDA A, ANEL A, et al. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells [J]. *Leuk Res*, 2015, 39(6): 657-666.
- [18] JIA D, YANG H, TAO Z, et al. Preparation and characterization of a novel variant of human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand from the rhesus monkey, *Macaca mulatta* [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2016, 100(7): 3035-3047.