

读书报告

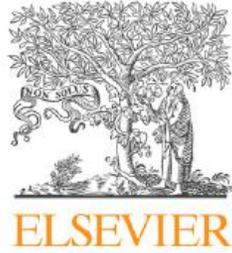
汇报人：程利娇

2018.07.07





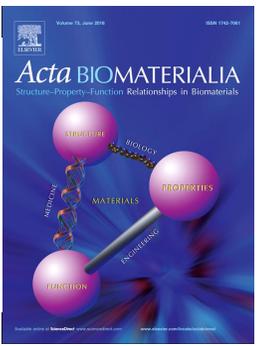
文章



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Acta Biomaterialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actabiomat



Charge-selective fractions of naturally occurring nanoparticles as bioactive nanocarriers for cancer therapy



Yongzhong Wang^{a,b,1}, Sijia Yi^{b,1}, Leming Sun^{a,b}, Yujian Huang^{a,b}, Mingjun Zhang^{a,b,*}

^a Department of Biomedical Engineering, Dorothy M. Davis Heart & Lung Research Institute, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA

^b Department of Mechanical, Aerospace and Biomedical Engineering, The University of Tennessee, Knoxville, TN 37996, USA

IF: 6.66

目录
CONTENTS



01

Introduction

02

Materials and
methods

03

Results and
discussion

04

Conclusions





PART 01

Introduction



Introduction



目前，由纳米颗粒、脂质体和大分子物质等结合不同的抗癌化学药物制成的**抗癌载体药物**已得到广泛研究。

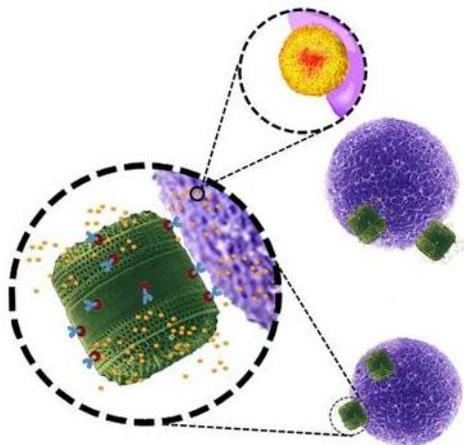
载体通常为惰性生物材料，简单地结合或包被免疫刺激剂和化疗药物，很少有工程生物材料发挥免疫刺激剂或佐剂的作用。

Introduction



天然纳米粒子因其本身的生物活性生物，具有多种理化性质和生物功能。对天然纳米粒子的研究将为开发用于癌症治疗的生物活性纳米材料提供重要的参考依据。

近年来，开发应用天然纳米材料对更有效的癌症治疗和检测至关重要。（ Brannon-Peppas *et al.*, 2004）



天然纳米粒子的工程载体系统具有显著的抗肿瘤特性，并在化学疗法，免疫疗法，放射疗法，热疗法和光动力学疗法中具有很大的应用潜力。（ Praetorius *et al.*, 2007）



Introduction

Materials Views

www.MaterialsViews.com

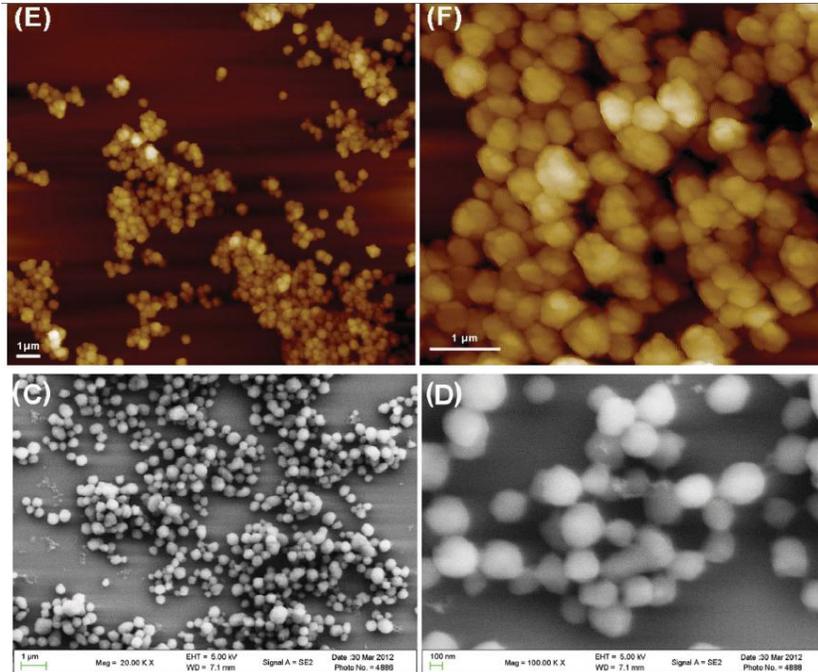
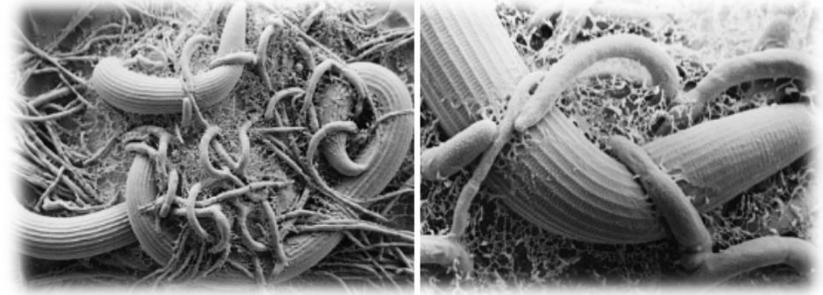
ADVANCED
FUNCTIONAL
MATERIALS

www.afm-journal.de

Naturally Occurring Nanoparticles from *Arthrobotrys oligospora* as a Potential Immunostimulatory and Antitumor Agent

Yongzhong Wang, Leming Sun, Sijia Yi, Yujian Huang, Scott C. Lenaghan, and Mingjun Zhang*

FULL PAPER



通过洗脱透析收集的真菌纳米粒子 (FNPS)

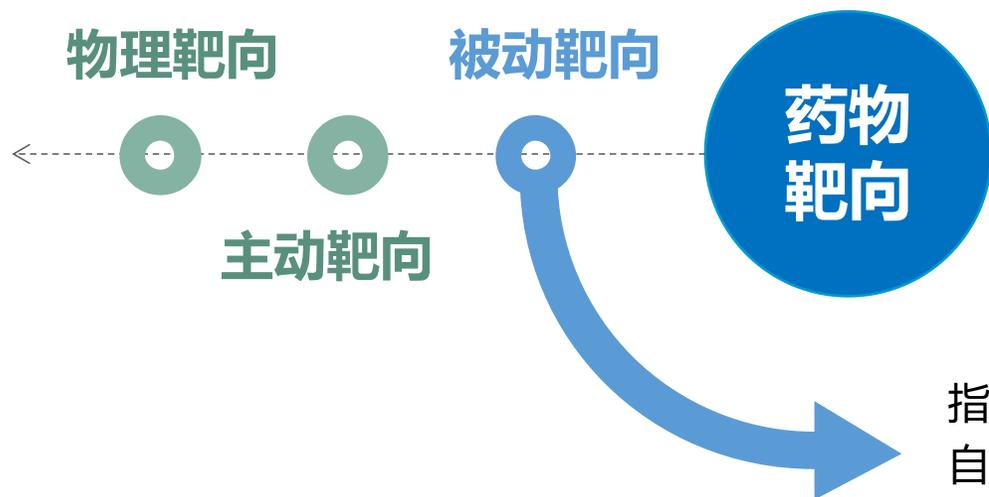
SEM、AFM观察, FNPS直径为300-400 nm。

FNPS具有免疫刺激和抗肿瘤治疗的潜力。

2012年, 作者课题组的研究



Introduction



指利用特定组织、器官的生理结构特点，使药物在体内能够产生自然的分布差异，从而实现靶向效应。

药物或其载体的尺寸效应：大于 $7\mu\text{m}$ 的微粒通常会被肺部的小毛细管以机械滤过方式截留，被单核细胞摄取进入肺组织或肺气泡；大于 200nm 的微粒则易被脾脏和肝脏的网状内皮系统吞噬。

EPR效应（Enhanced Permeability and Retention effect）：肿瘤组织中的新生血管较多且血管壁间隙较宽、结构完整性差，淋巴回流缺失。 100nm 左右的大分子类药物或颗粒物质更易于聚集在肿瘤组织内部，从而实现靶向效果。



Introduction

技术要点:

为利用FNPS作为药物载体，在体内有效将化学药物输送到肿瘤组织中。需进一步将天然的FNPS进行纯化，减小粒径，从而不影响其生物活性，如免疫刺激和细胞毒性。建立一种新的分离方法——表面电荷选择性分离法。

研究目的:

对分离纯化得到的FNPS的理化性质进行表征，通过研究其对细胞的免疫激活活性、癌细胞的毒性机制和联合癌症治疗效应，探讨FNP及作为药物载体在肿瘤治疗中的应用潜力。



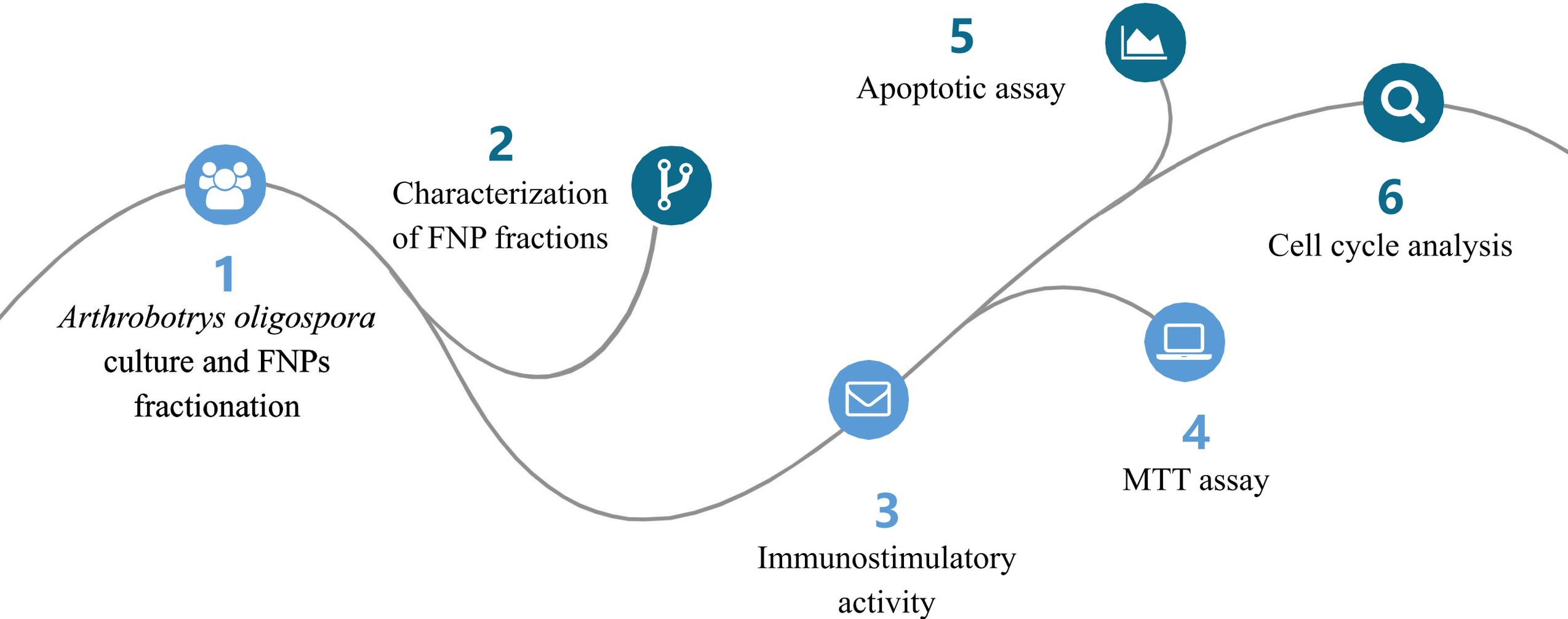
PART **02**

Materials and methods



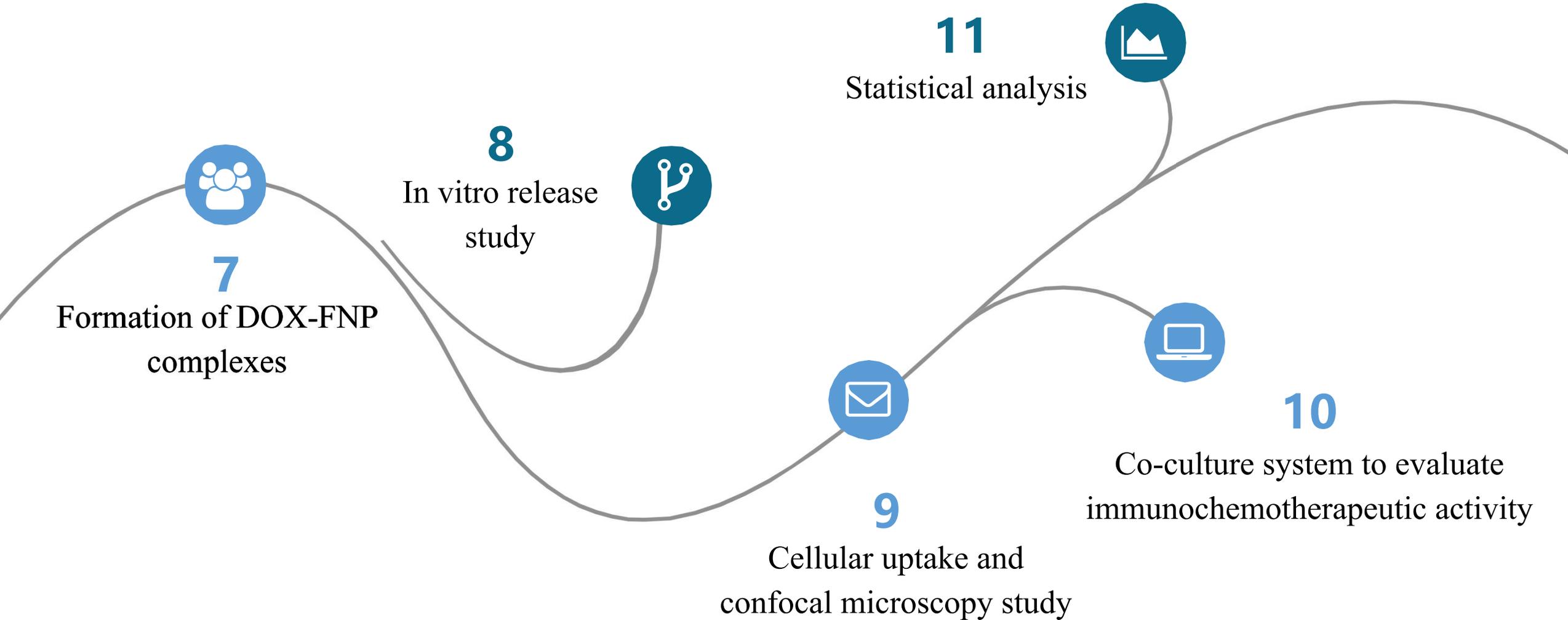


Materials and methods



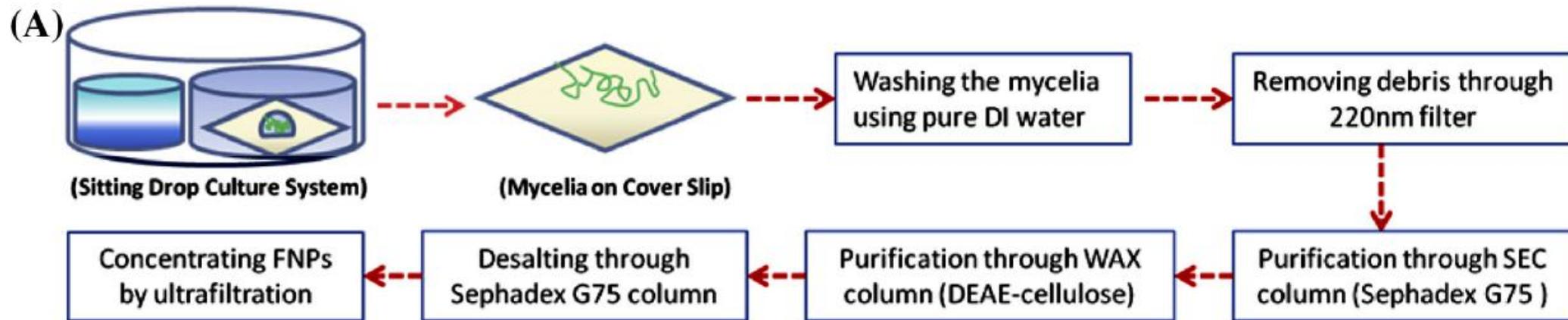


Materials and methods





1. *Arthrobotrys oligospora* culture and FNPs fractionation



- 1、分生孢子悬浮液（约1000~2000分生孢子，200ul）接种于培养基中，25°C培养7d。
- 2、用蒸馏水冲洗10次，收集到的水中含有纳米粒子。
- 3、通过0.2um 注射器过滤器进行过滤。
- 4、Sephadex G-75（葡聚糖凝胶）层析柱。
- 5、DEAE-纤维素弱阴离子交换层析。
- 6、Sephadex G-75 层析柱。
- 7、离心过滤管将脱盐后的FNPS浓缩至150ul。

✈ 2、 Characterization of FNP fractions



AFM: 表征FNP组分的纳米形貌和颗粒大小。

DLS、电泳光散射法(ELS): 分析FNP在水悬浮液中的粒径分布和zeta电位。

SDS-PAGE: 定性测定FNP颗粒的化学成分。

定量测定FNP颗粒的化学成分:

蒽酮-硫酸法: 测定多糖总量。

蛋白多糖检测试剂盒: 测定每个样品中的GAG含量。

卡唑法: 测定醛酸含量。

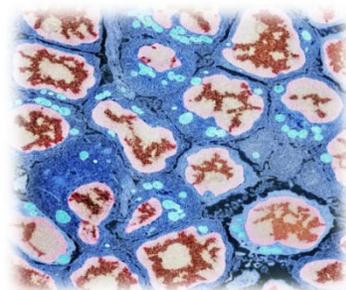
BCA蛋白测定法: 测定蛋白质浓度。



✈ 3、 Immunostimulatory activity



巨噬细胞 RAW 264.7 (ATCC TIB-71)
DMEM 培养基



脾细胞 C57BL/6
RPMI 1640 培养基

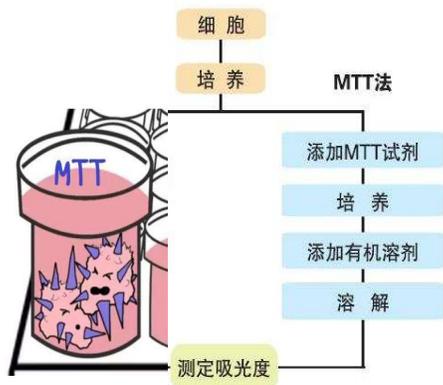
ELISArray试剂盒：小鼠常用细胞因子和趋化因子多分析试剂盒。
检测12种细胞因子 (IL-1A、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17A, IFN γ 、TNF α 、G-CSF、GM-CSF)
12种趋化因子(RANTES、MCP-1、MIP-1a、MIP-1b、SDF-1、IP-10、MIG、Eotaxin、TARC、MDC、KC和 6 Ckine)。



4、MTT assay

MTT法：对纯化FNP组分的以及DOX-FNP复合物对A 549、B16BL6、MCF-7和MCF-7/ADR细胞的杀伤作用进行检测。

| 细胞 | A549、 B16BL6 | MCF-7、 MCF-7/ADR | MIH3T3 |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|
| 培养基 类型 | DMEM | RPMI 1640 | DMEM-a |



FNP：测定570 nm吸光度。

DOX-FNP复合物：通过“Dos-eResp”函数图确定 IC_{50} 平均值。



5. Apoptotic assay

经细胞凋亡诱导的细胞，提取总DNA：

凋亡细胞形成明显的梯状 DNA，坏死细胞为不清晰弥散状 DNA。
细胞 DNA 在琼脂糖凝胶的顶部，是一个没有受到切割的高分子

TUNEL 法：

DNA 断裂的原位末端标记法，可对 DNA 分子断裂缺口中的 3'-OH 进行原位标记，借助一种可观测的标记物，如荧光素，对凋亡细胞的核 DNA 中产生的 3'-OH 末端进行原位标记，用荧光显微镜即可进行观察。

凋亡细胞采用 TUNEL 法，使用 APO-BrdU™ 试剂盒 (Invitrogen, Eugene, OR) 检测。
流式细胞仪进行分析。





6、Cell cycle analysis



为确定细胞周期，A 549和B16BL6细胞于24孔板中，10ug /ml FNP处理，37°C，5% CO₂培养24h。



细胞经胰蛋白酶处理后，用PBS洗涤，并在4°C下在75%乙醇中固定2小时。



固定细胞于37°C黑暗条件下，使用碘化丙啶/RNase A染色缓冲液染色30 min。

最后，流式细胞仪进行分析。

7、 Formation of DOX-FNP complexes

(1) 60 μ L(3m M)的DOX与100~200 μ L的FNPs样品混合, 在20 mM, pH7.0的HEPES缓冲液中, 制备了DOX-FNP的配合物。

(2) DOX-FNP: 10000rpm 离心10 min。沉淀物分散在500 μ LPBS缓冲液中,在水浴超声波仪中超声10 min。

(3) 紫外吸收法测定分散相中DOX在480 nm处的含量, 计算化合物中DOX的包封率。

(4) DOX在PBS缓冲液中的稳定性, 将分散的配合物应用于SephadexG75柱进行分析。

(5) 用AFM、DLS和ELS分析对DOX-FNP配合物的形貌、粒径和Zeta电位进行了表征。



8、 In vitro release study

在不同的pH值下测定DOX-FNP复合物的释放。

150 μ L of the DOX–FNP1 complexes (168 μ M for DOX)

200 μ L of DOX–FNP2 complexes (126 μ M for DOX)

84 μ L of free DOX (300 μ M)

1 \times PBS: p H 7.4

0.1 M acetic acid buffer: p H 5.5

37°C恒温搅拌培养

在不同的时间点采集透析液 (0.5ml)，并立即补充相同体积的新鲜培养基。

在 λ_{ex} 480nm和 λ_{ex} 590nm 处测定透析液中DOX的浓度。

✈ 9、 Cellular uptake and confocal microscopy study

流式细胞仪定量检测癌细胞内DOX及DOX-FNP复合物的摄取；
共聚焦显微镜观察在癌细胞内的分布。

FITC 荧光染料标记DOX-FNP复合物和游离DOX；
核特异性染料Hoechst 33342标记肿瘤细胞核；
Lysotracer Green DND-26染料标记溶酶体。





10、Co-culture system to evaluate immunotherapeutic activity

采用小鼠B16BL6肿瘤细胞与C57BL/6脾细胞共培养系统，研究DOX-FNP复合物的体外免疫治疗效果。

在DOX浓度为 $1\mu\text{M}$ 时，游离DOX和DOX-FNP配合物



$5\mu\text{M}$ CFSE标记的 2×10^5 肿瘤细胞与 5×10^6 脾细胞

共同培养

培养24小时后，用流式细胞仪对CFSE标记的癌细胞进行筛选后，用PI摄取法测定肿瘤细胞的死亡情况。



PART **03**

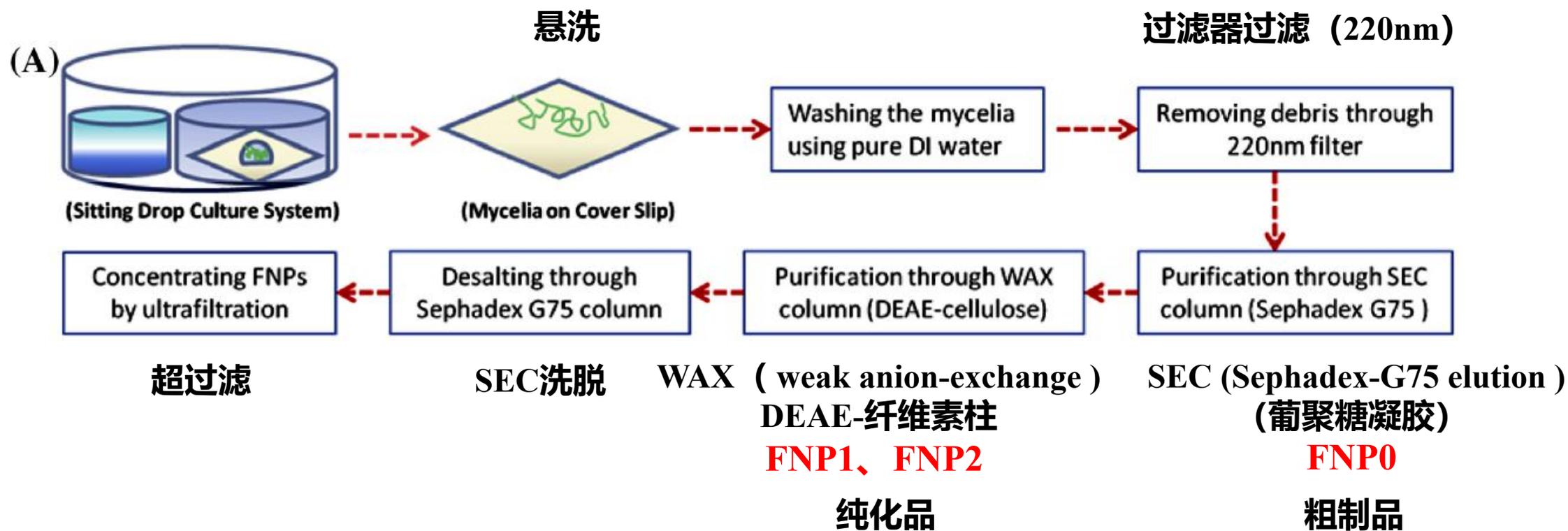
Results and discussion





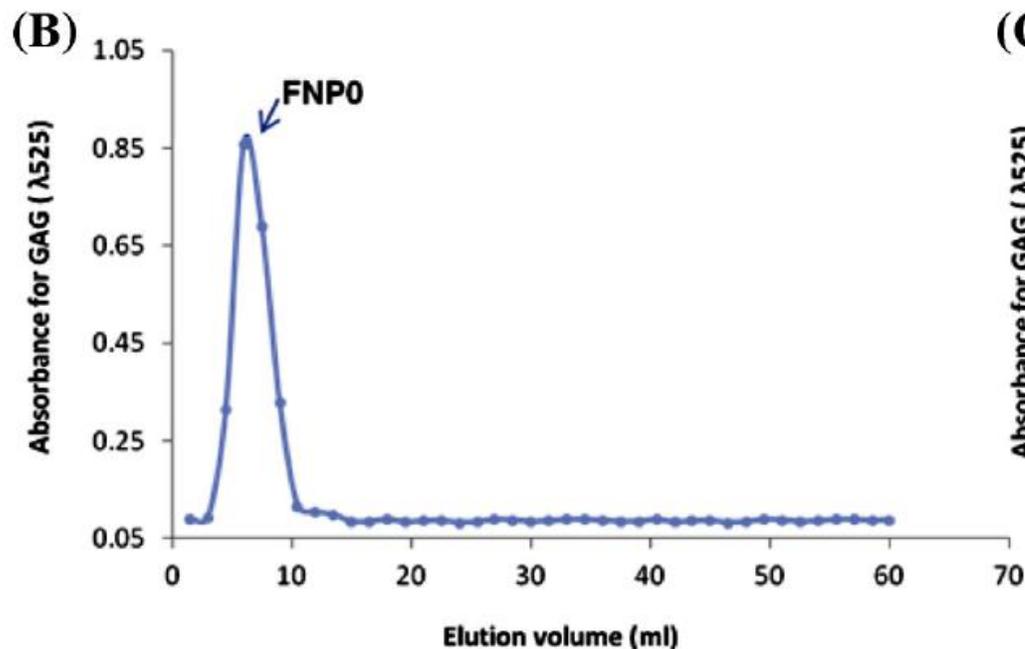
1、FNP的纯化及表征

SEC-WAX-SEC procedure

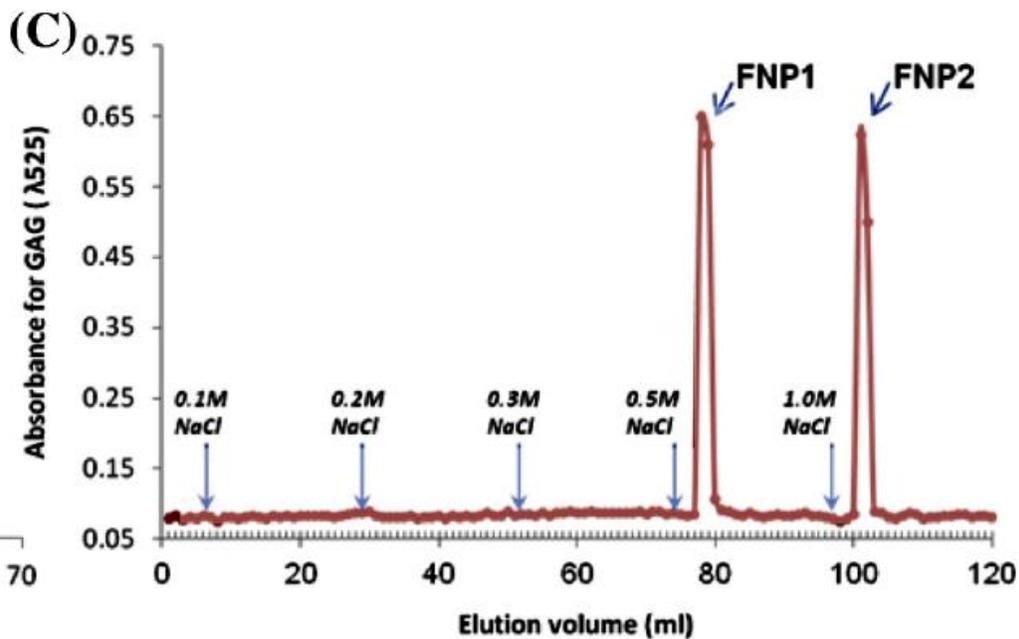




1、FNP的纯化及表征



SEC (Sephadex G75, 15 mm \times 70 mm) column

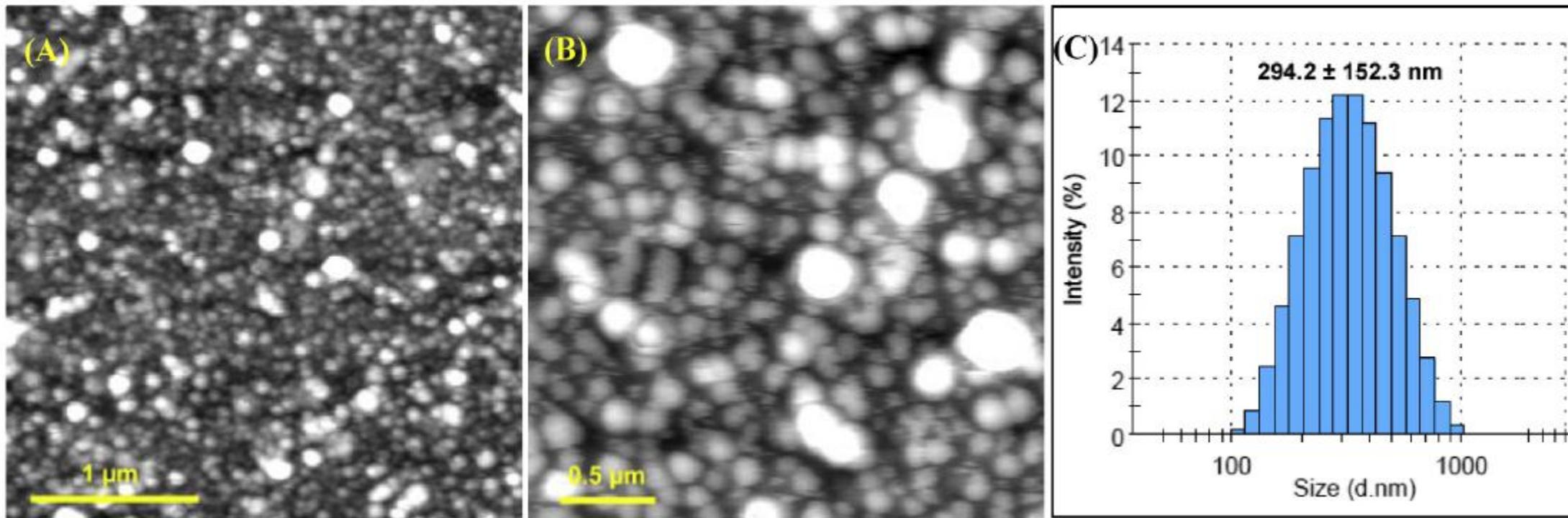


WAX (DEAE-cellulose, 10 mm \times 70 mm) column

糖胺聚糖 (GAG) 总含量二甲基亚甲基蓝 (DMMB) 比色法:
用GAG浓度测定FNPs的洗脱曲线, 并与洗脱体积进行对比。
通过高盐萃取可溶性GAG, 与二甲基亚甲基蓝染料结合, 在丙酮解离溶液中, 释放紫红色染料, 由分光光度计比色分析, 定量检测样品中GAG 含量。

✈️ 1.1、FNP的表征分析

FNP0

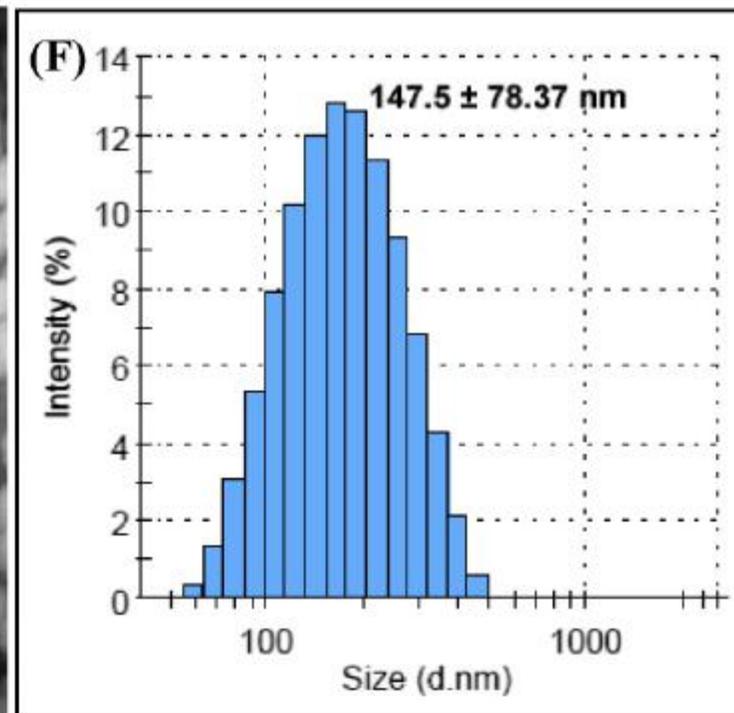
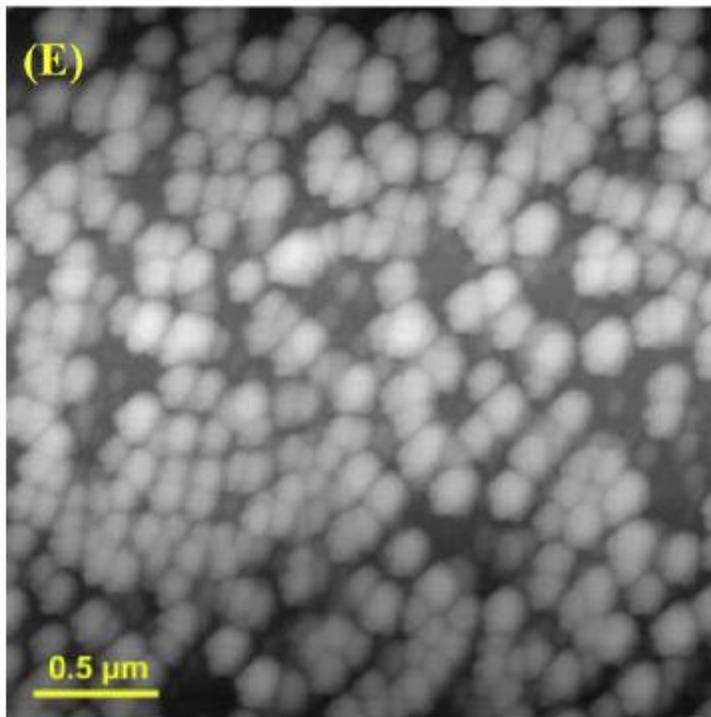
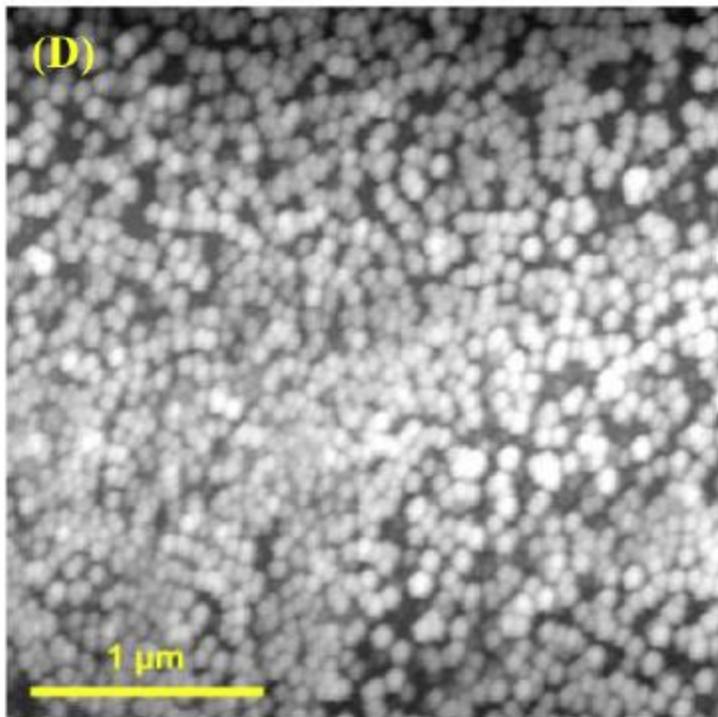


AFM (原子力显微镜) 显示:
FNP0、FNP1、FNP2 纳米颗粒为球形,
直径100-300nm。

动态光散射(DLS)和电泳光散射(ELS):
平均粒径为300nm。

✈️ 1.1、FNP的表征分析

FNP1: 0.5 M Nacl

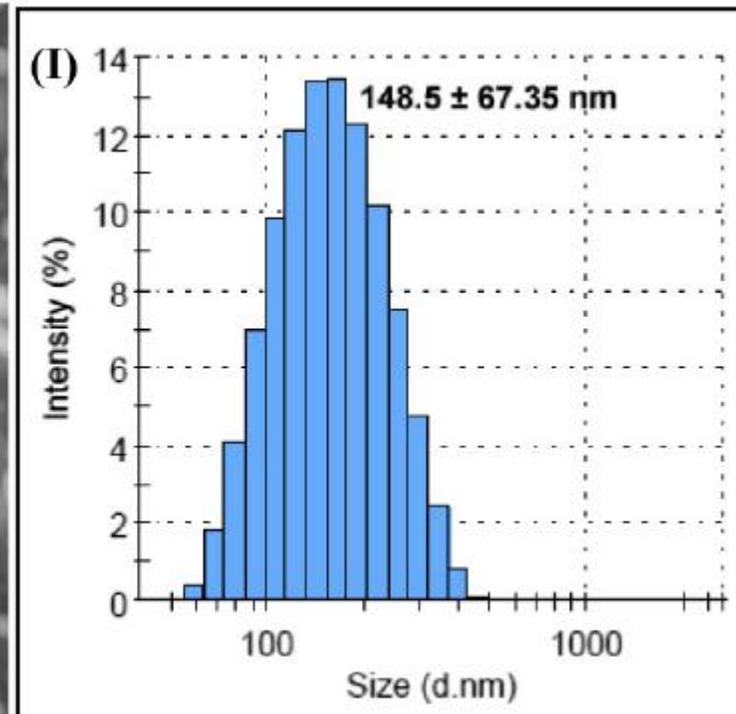
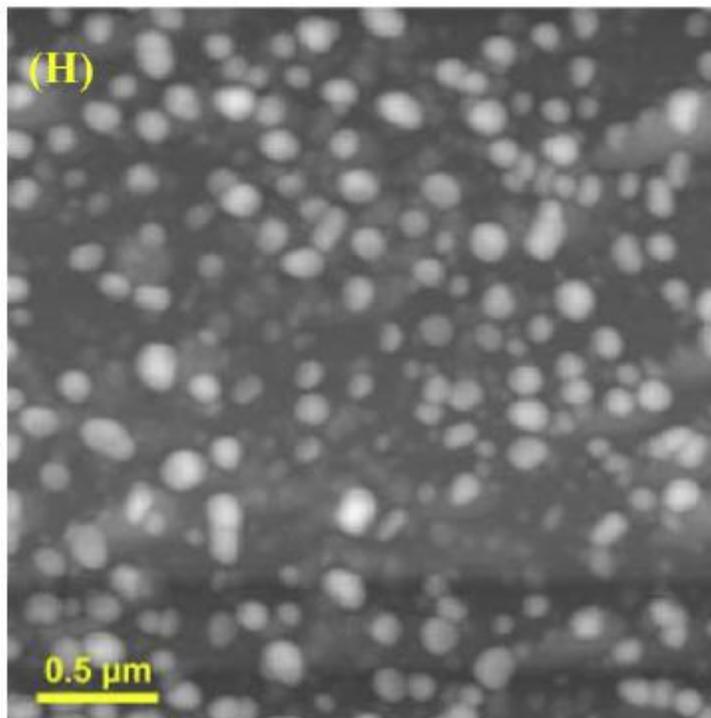
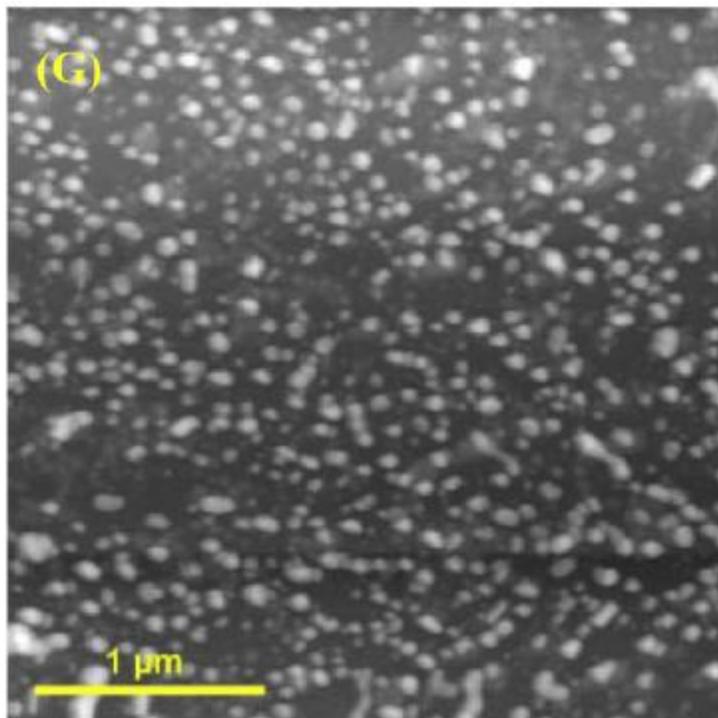


DLS与ELS分析显示:

平均粒径为150nm。

✈️ 1.1、FNP的表征分析

FNP2: 1.0 M Nacl



DLS与ELS分析显示:

平均粒径为150nm。

1.2、FNP的组分分析

GAG和中性多糖是FNP1和FNP2的主要组分，其组成类似于FNP0。

Table 1
Physicochemical characterization of the FNP fractions prepared following the SEC-WAX-SEC procedure.

| | Size (nm) | Polydispersity index | Zeta potential (mV) | Protein (µg/ml) ^a | GAG (µg/ml) ^a | Uronic acid (µg/ml) ^a | Total Sugar (µg/ml) ^a |
|------|---------------|----------------------|---------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| FNP0 | 294.2 ± 152.3 | 0.267 | -30.7 ± 9.1 | 661.1 ± 10.7 | 187.6 ± 10.7 | 162.6 ± 23.1 | 410.1 ± 6.4 |
| FNP1 | 147.5 ± 78.4 | 0.202 | -26.9 ± 6.9 | 86.8 ± 6.3 | 296.5 ± 38.1 | 153.9 ± 10.8 | 506.2 ± 25.2 |
| FNP2 | 148.5 ± 67.4 | 0.195 | -32.1 ± 7.6 | 3.7 ± 0.7 | 98.7 ± 7.4 | 40.4 ± 7.7 | 162.7 ± 8.5 |

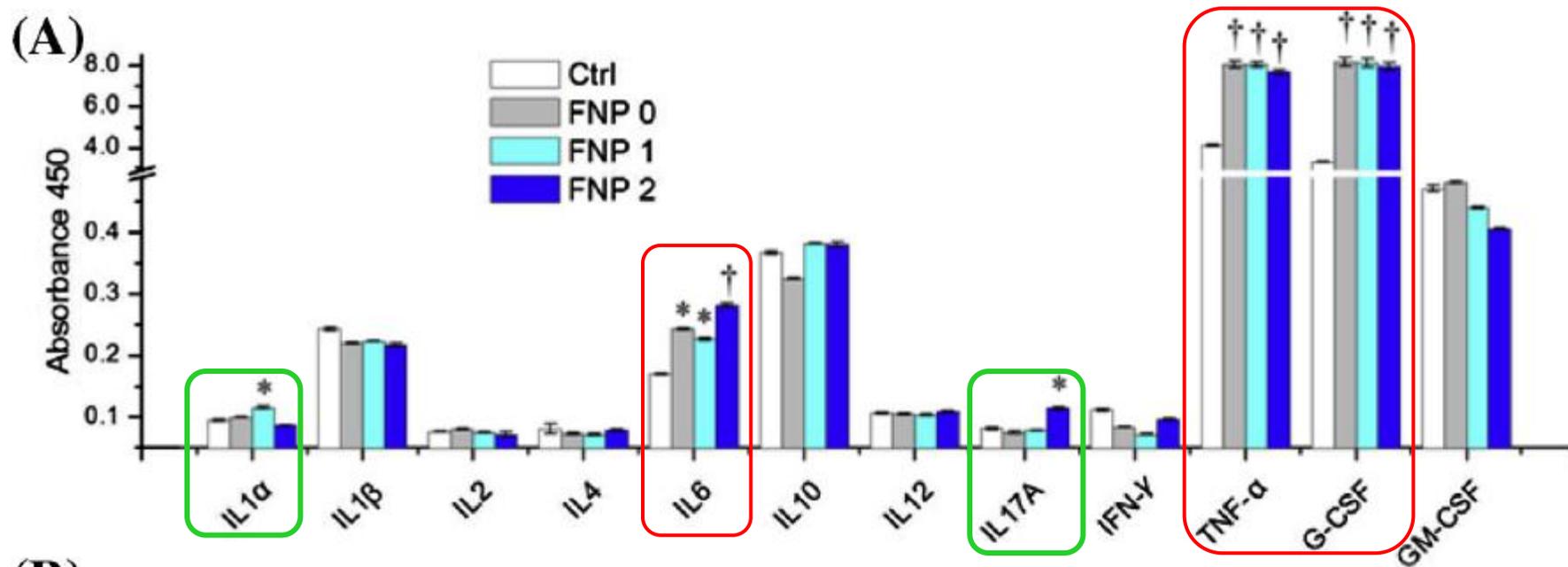
| Zeta电位[mV] | 胶体稳定性 |
|------------|--------|
| 0 到 ±5 | 稳定性极差 |
| ±10 到 ±20 | 较差的稳定性 |
| ±30 到 ±40 | 一般的稳定性 |
| ±40 到 ±60 | 较好的稳定性 |
| 超过±61 | 稳定性极好 |

FNP0 中的大多数蛋白质是游离的。通过具有较低盐浓度 (<0.5M NaCl) 的分级过程将这些未结合的蛋白质完全洗掉。

FNP1中大多数GAG可能与核心蛋白通过共价键结合形成蛋白多糖。

2、FNP对巨噬细胞及脾细胞的免疫刺激作用

巨噬细胞-细胞因子

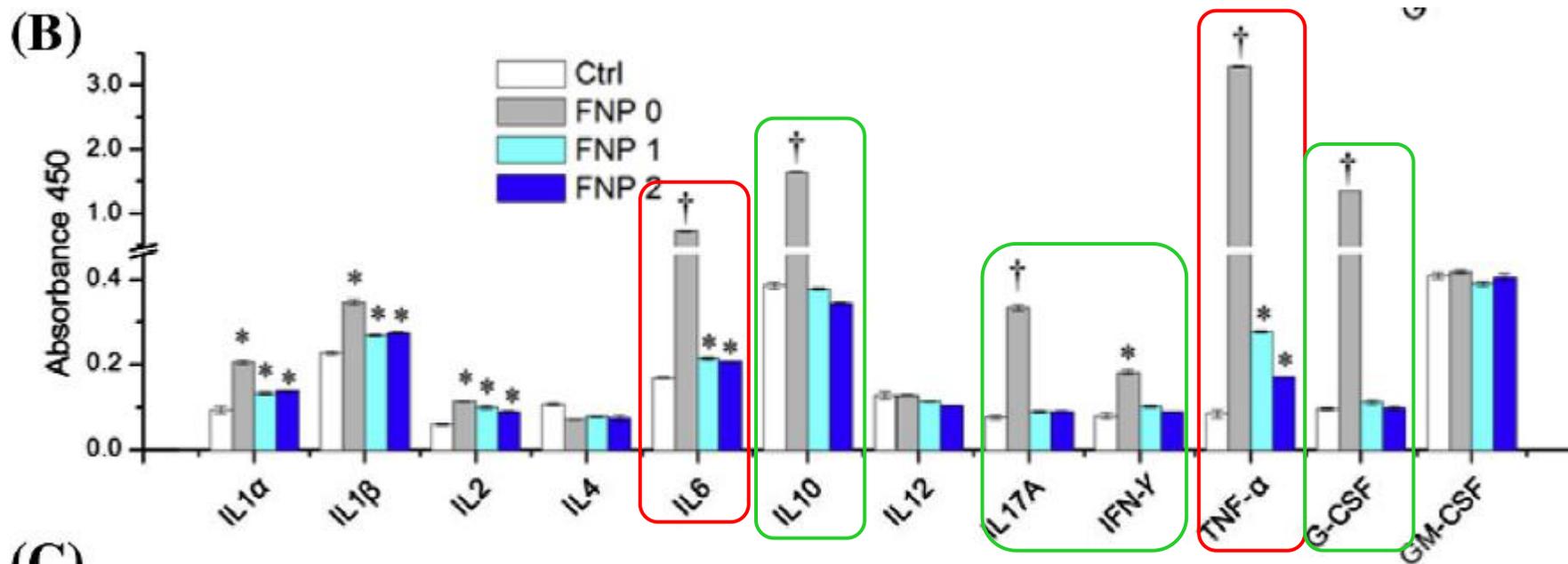


FNP0、FNP1、FNP2: 巨噬细胞中IL-6, TNF- α 和G-CSF显著升高。

FNP1、FNP2: IL-1 α 和IL-17A也显著升高。

2、FNP对巨噬细胞及脾细胞的免疫刺激作用

脾细胞-细胞因子

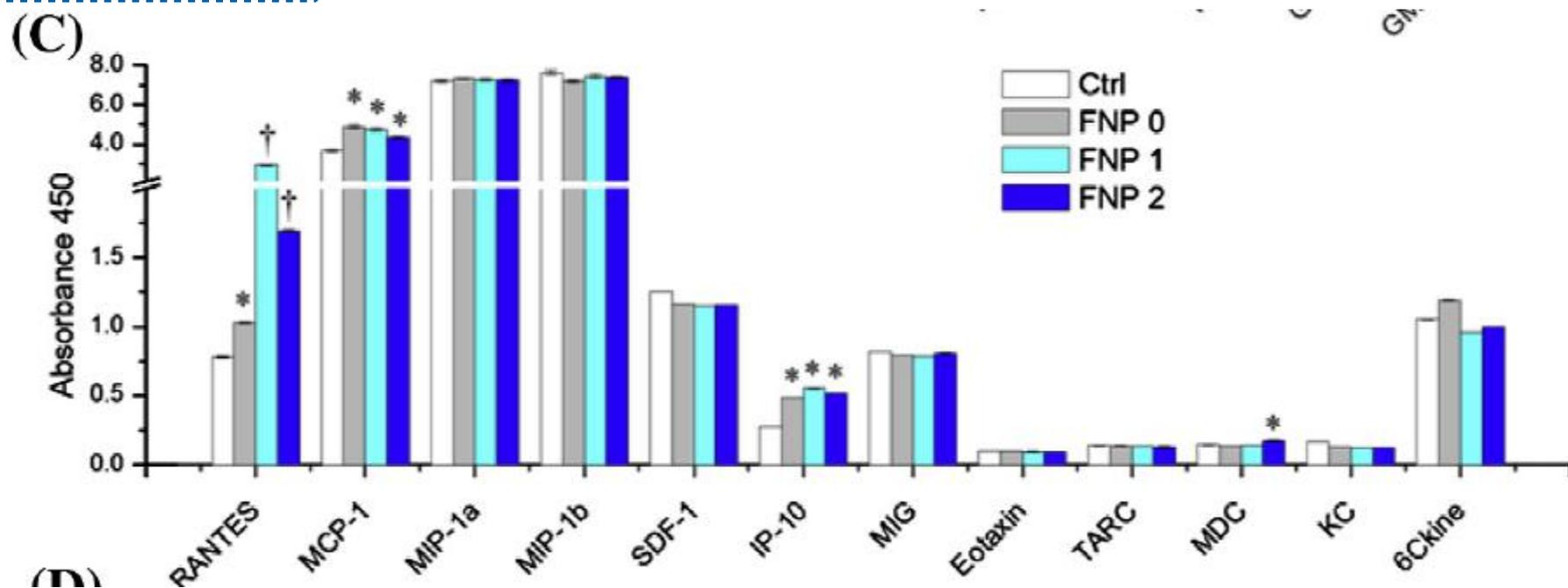


粗制品FNP0: IL-10, IL-17A, IFN- γ 、和G-CSF显著升高。

纯化品FNP1、FNP2: 未显示。

2、FNP对巨噬细胞及脾细胞的免疫刺激作用

巨噬细胞-趋化因子

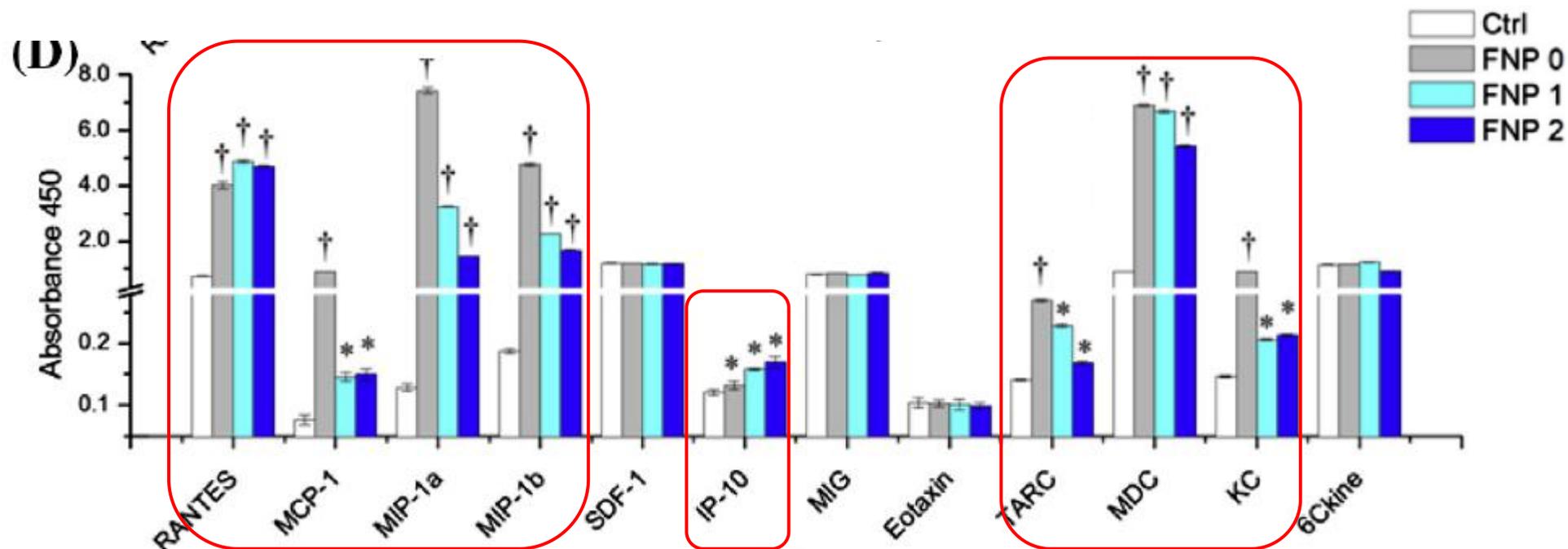


FNP0、FNP1、FNP2: RANTES, MCP-1和IP-10显著升高。

FNP2: MDC显著升高。

2、FNP对巨噬细胞及脾细胞的免疫刺激作用

脾细胞-趋化因子



2、FNP对巨噬细胞及脾细胞的免疫刺激作用

小结

细胞因子：FNP0、FNP1、FNP2均可使巨噬细胞和脾细胞IL-6，TNF- α 含量显著升高。

趋化因子：FNP0、FNP1、FNP2均可使巨噬细胞和脾细胞 RANTES，MCP-1和IP-10 显著升高。

RANTES：调解活化正常T细胞表达和分泌的趋化因子，增强了免疫及抗肿瘤能力。

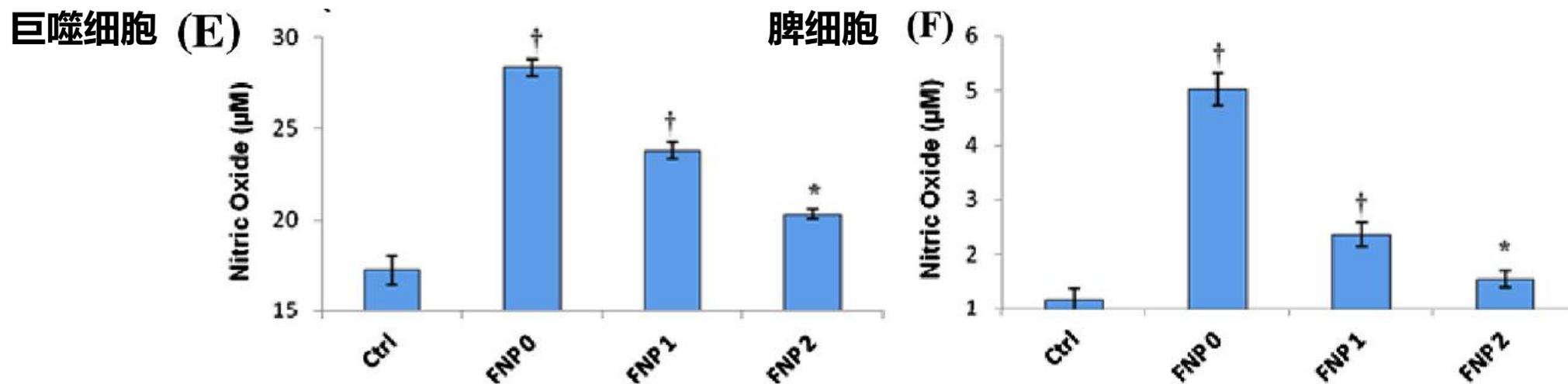
MCP-1：特异性作用于单核细胞的趋化蛋白，激活单核和巨噬细胞，抑制肿瘤细胞的生长。

IP-10：是新发现的属于CXC类的正趋化因子，具有强大的招募中性粒细胞,促进多种细胞因子分泌，抑制肿瘤细胞生长及转移等多种生物学作用。

FNP对巨噬细胞及脾细胞具有免疫刺激作用。

2、FNP对巨噬细胞及脾细胞的免疫刺激作用

FNP对杀菌介质一氧化氮(NO)的刺激作用

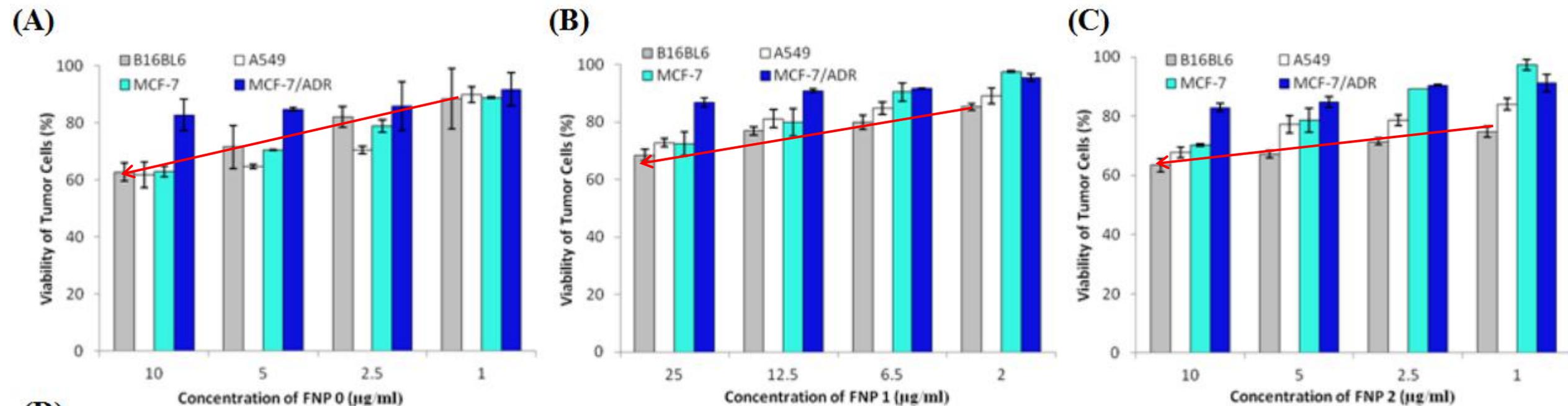


NO是巨噬细胞定向杀伤肿瘤细胞和微生物的重要调节因子和介质。

经处理的巨噬细胞和脾细胞产生的NO含量明显增加，从而证实真菌分泌的纳米颗粒FNPs作为生物活性纳米载体在癌症治疗中的抗癌免疫潜力。

3.1 FNP的对肿瘤细胞的毒性检测

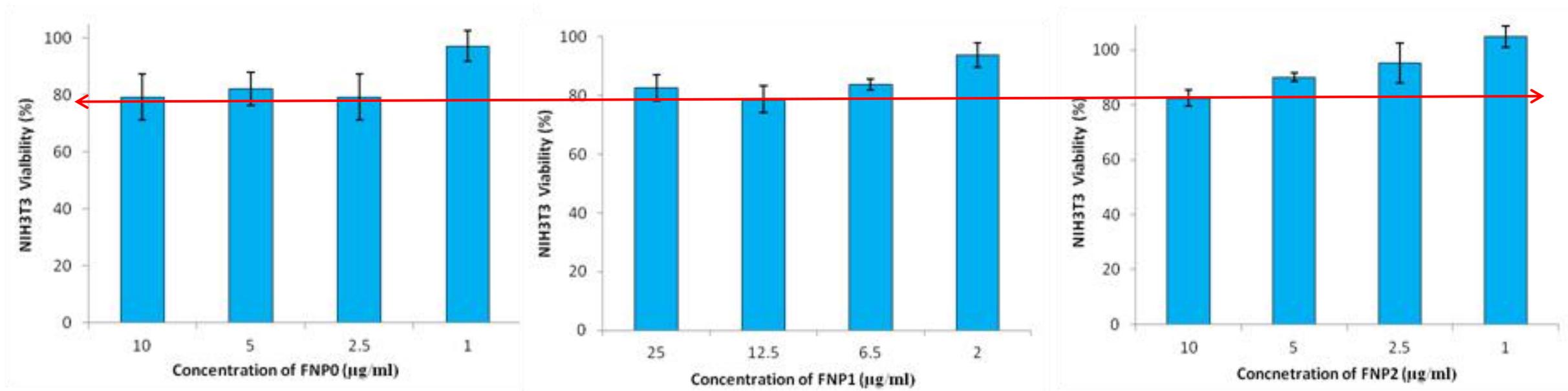
FNP0、FNP1、FNP2对四种肿瘤细胞（肺癌A549细胞、小鼠黑色素瘤B16BL6细胞、人乳腺癌MCF-7细胞、多耐药性细胞系MCF-7/ADR）的细胞毒性：



三种FNP对肿瘤细胞系呈现剂量依赖性细胞毒性。

3.2 FNP的对 NIH3T3 细胞的毒性检测

NIH3T3是一种小鼠胚胎成纤维细胞，常用于纳米材料的生物相容性评估。



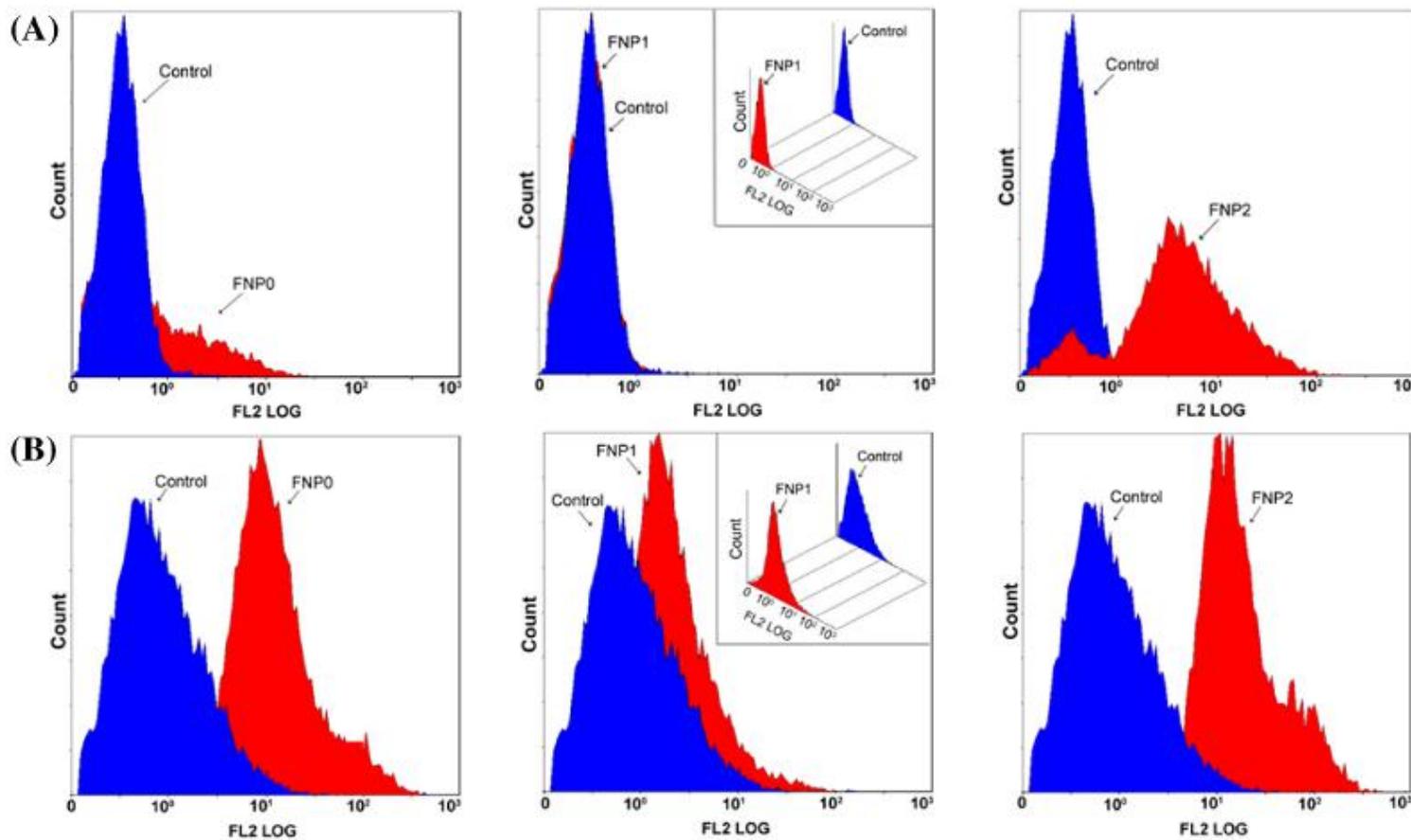
FNP0、FNP1、FNP2:

对 NIH3T3 细胞的抑制率 $\leq 20\%$ ，表明 FNP 对正常细胞没有强烈的细胞毒性作用。

但对肿瘤细胞具有略高的细胞毒性，特别是对敏感的肿瘤细胞。



3.3 细胞凋亡检测



肺癌A549细胞

48小时 (细胞凋亡测定)

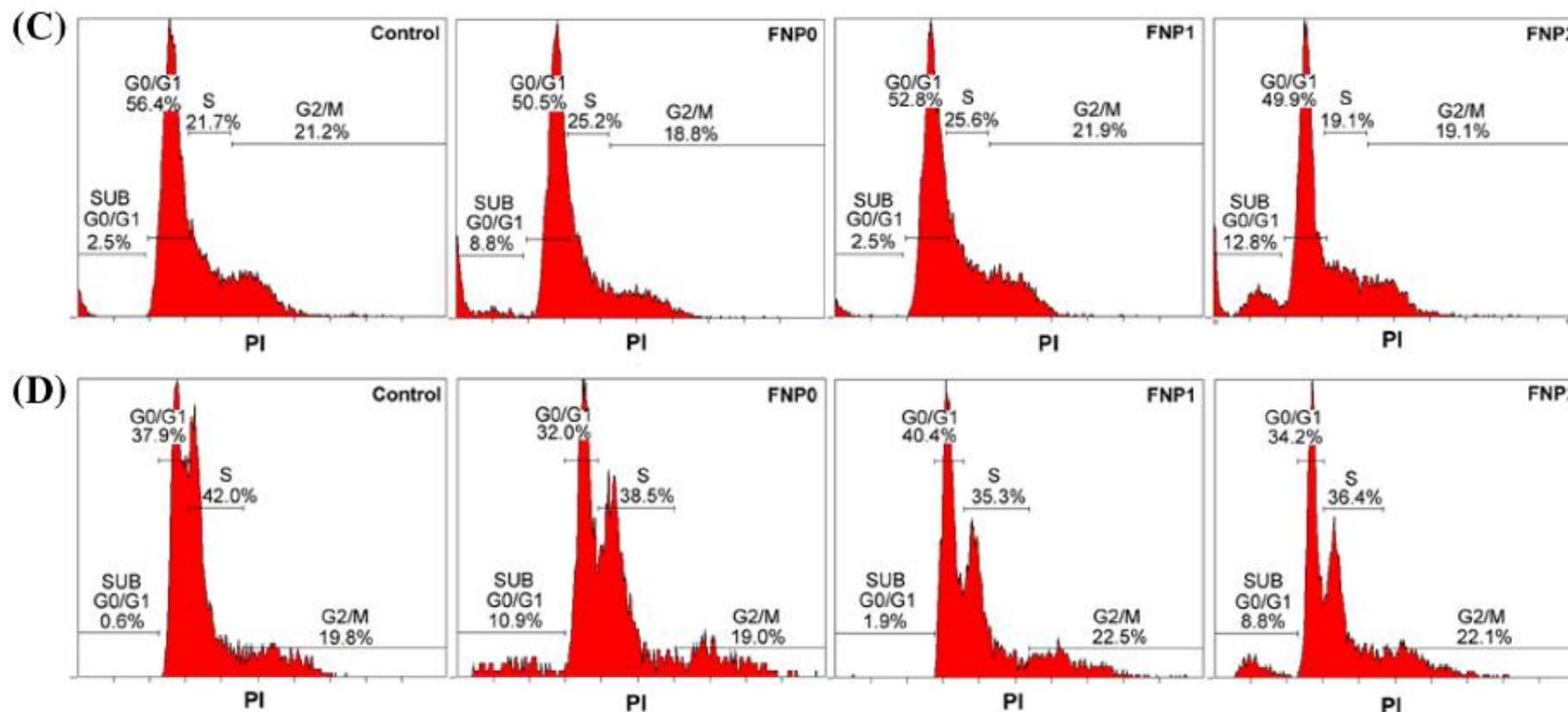
黑色素瘤B16BL6细胞

FNP2: 强烈诱导A549细胞和B16BL6细胞的凋亡;

FNP0: 与FNP2相似, 但凋亡诱导能力较弱;

FNP1: 对A549肿瘤细胞中没有诱导凋亡的能力, 对B16BL6细胞中具有微弱的细胞凋亡作用。

3.4 细胞周期分析



肺癌A549细胞

24小时 (细胞周期分析)

黑色素瘤B16BL6细胞

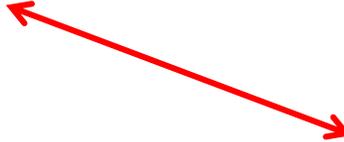
对于细胞周期分析，细胞用PI染色，然后用流式细胞仪检测。

粗制FNP0 和纯化的FNP2：在两种肿瘤细胞中的 **SUB G0 / G1期** 阻滞细胞周期。

FNP1：与对照组无差异。

3. FNP的对细胞的毒性检测

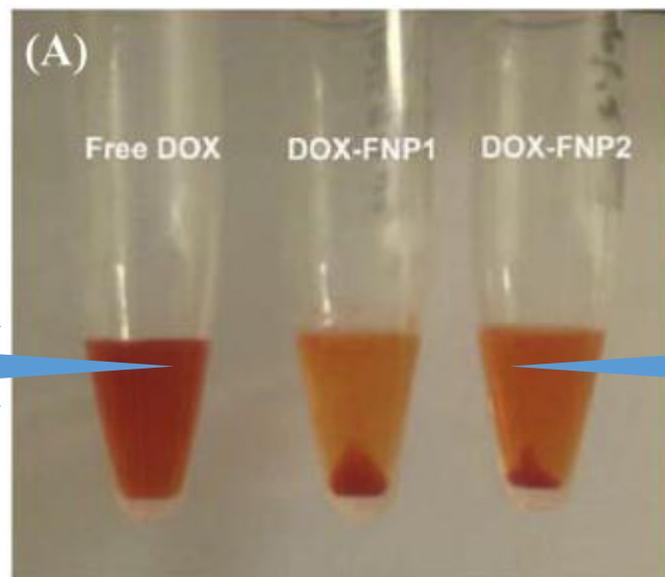
小结

- 1、尽管FNPs仅具有轻度的细胞毒活性，但由于FNPs诱导免疫细胞分泌多种促炎细胞因子和趋化因子，故仍可作为一种潜在的免疫调节剂。
- 2、相比FNP0与FNP1，FNP2对肿瘤细胞具有更强的细胞毒性。
- 3、对于细胞凋亡与细胞周期分析，纯化的FNP2可强烈诱导A549细胞和B16BL6细胞凋亡。
- 4、尽管FNP1、FNP2显示出相似的免疫刺激活性，但对细胞的毒性作用却不同，表明纯化的FNP1和FNP2具有不同的细胞毒性机制。

4.1 DOX-FNP复合物的形成

由于FNP1和FNP2的负表面电荷，DOX在HEPES缓冲液中携带来自pH 7.0的氨基质子化的正电荷，通过静电相互作用与FNPs很容易地结合。

当DOX在中性 pH (20 mM HEPES缓冲液, pH7.0) 或酸性pH中新鲜溶解时, 在10,000rpm离心10 min后DOX溶液中未观察到明显的沉淀。



20mM HEPES缓冲液, pH 7.0中混合DOX和FNP时, DOX可有效与FNP1和FNP2结合。10,000 rpm离心10 min后过夜形成沉淀。

收集沉淀, 将其悬浮在PBS缓冲液 (pH 7.4) 中, 形成 DOX-FNP 复合物。



4.2 DOX-FNP的表征

包封率：是指被包裹的DOX在FNP载体悬液中占DOX药物总量的百分量。反映了DOX药物被FNP载体包封的程度。

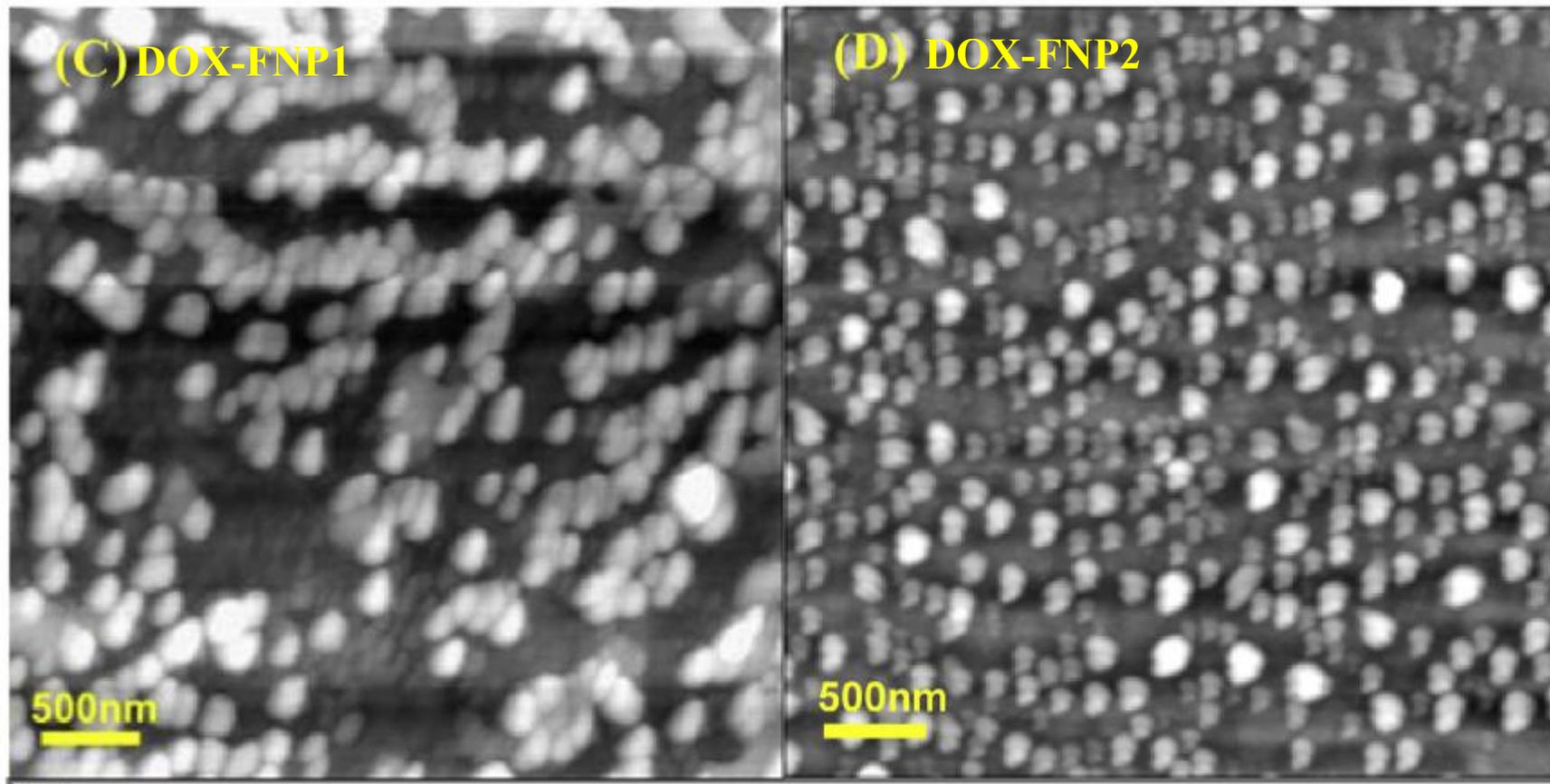
Table 2

Physical characteristics and cytotoxicity of the DOX-FNP complexes.

| | Size (nm) | Polydispersity index | Zeta potential (mV) | Entrapment ratio (%) |
|----------|--------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| DOX-FNP1 | 194.5 ± 79.5 | 0.241 | -22.20 ± 7.48 | 77.4% ± 2.4% |
| DOX-FNP2 | 186.9 ± 89.7 | 0.279 | -24.24 ± 5.95 | 72.2% ± 0.72% |
| Free DOX | - | - | - | - |

对于DOX-FNP1和DOX-FNP2复合物，通过DLS分析测量的粒子直径<200nm，与单独的FNP(150 nm)相比尺寸略微增加。

✈ 4.2 DOX-FNP的表征



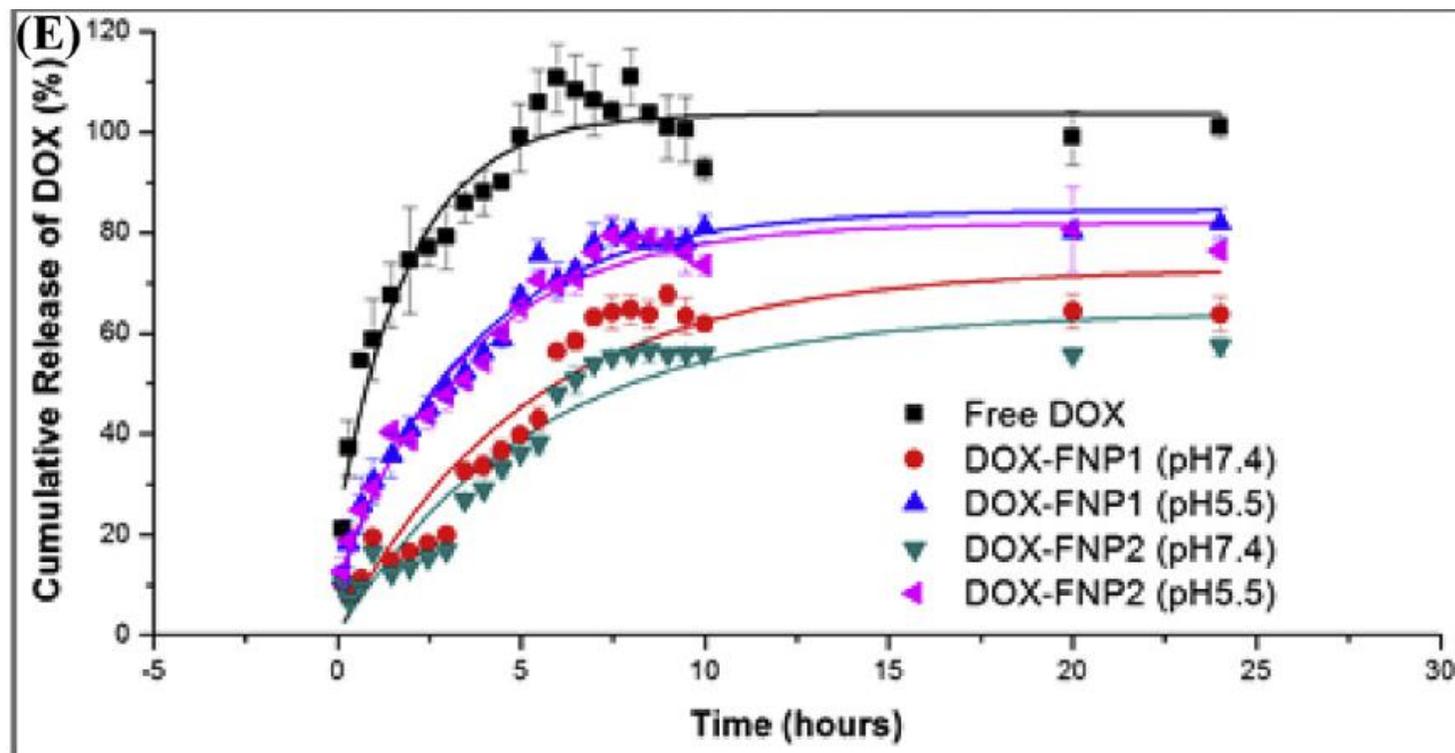
使用AFM对DOX-FNP复合物的形态进行观察：

两种DOX-FNP复合物均为球形纳米颗粒，直径 <200 nm。



4.3 pH 对DOX-FNP复合物药物释放量的影响

通过将透析管浸泡在含有6ml释放缓冲液的大容量离心管中，进一步研究不同pH条件下两种配合物对DOX的释放能力。



5小时后，游离DOX释放率达到100%。

两种配合物的DOX释放：至少要9-10h。

两种配合物，DOX的释放速率随释放介质pH的降低而增加。

24h后，在pH5.5时，两种配合物释放的药物占总释药量的80%。

在不同的pH条件下，两种DOX-FNP复合物的总释放药物显着不同。

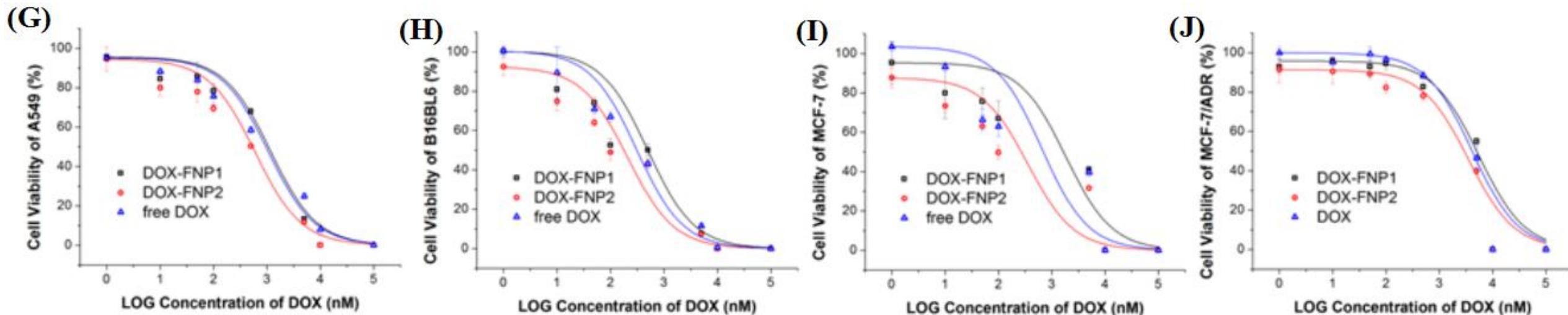
4 DOX-FNP复合物

小结

- 1、通过对 DOX-FNP的表征分析，为球形纳米颗粒，直径 <200 nm，与FNP无较大差异。
- 2、通过对包封率的测定，DOX-FNP复合物较稳定，可直接作为纳米抗肿瘤药物，无需除去游离的DOX，可直接进行细胞毒性、体外免疫以及细胞摄取实验。
- 3、通过探究pH 对DOX-FNP复合物药物释放量的影响，较低的 pH 环境下，DOX释放量高。



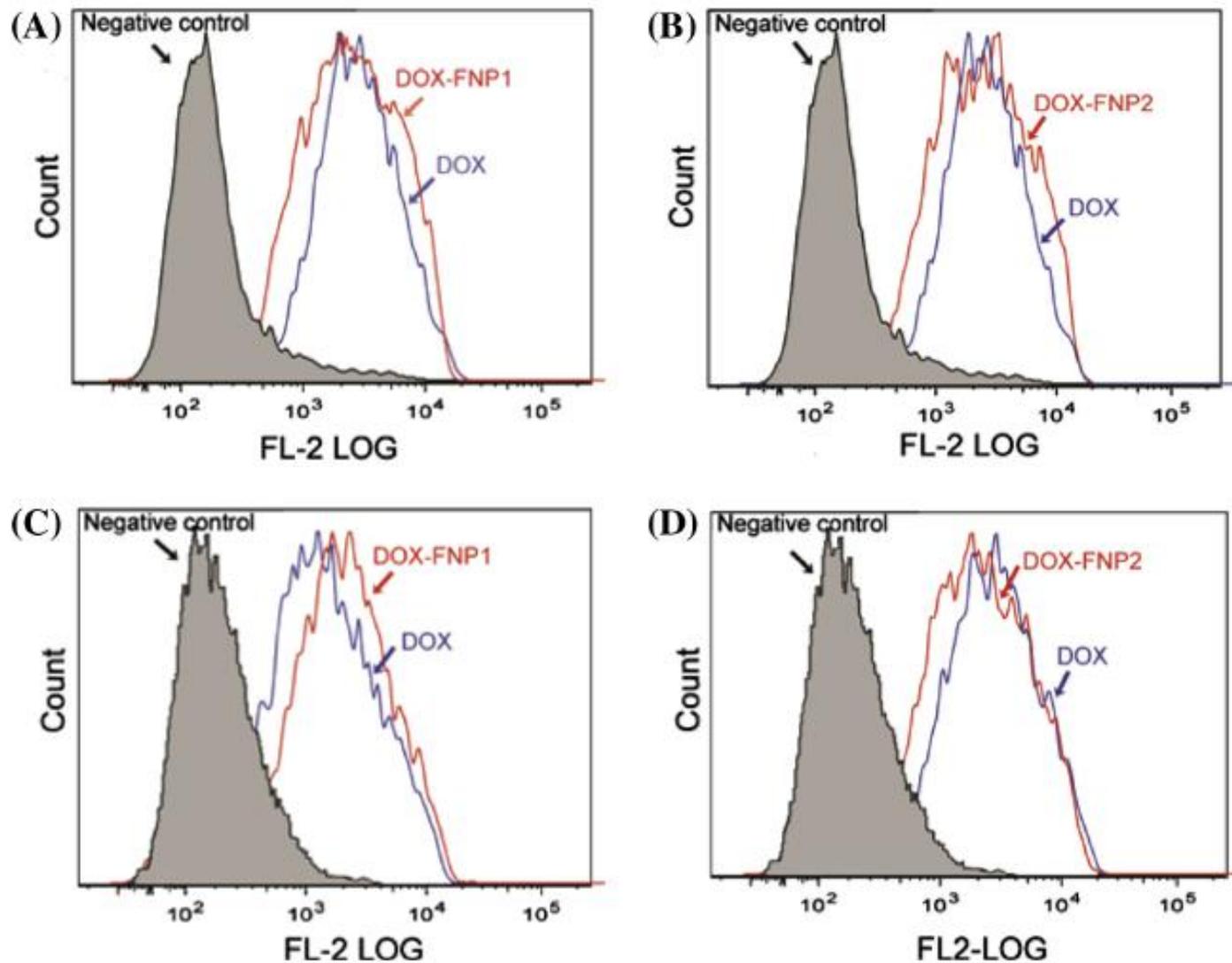
5.1 DOX-FNP对肿瘤细胞的毒性测定



| | IC ₅₀ (nM) | | | |
|----------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | A549 | B16BL6 | MCF-7 | MCF-7/ADR |
| DOX-FNP1 | 1170.6 ± 92.33 | 494.87 ± 38.00 | 1830.5 ± 270.5 | 5464.6 ± 16.87 |
| DOX-FNP2 | 599.34 ± 15.85 | 209.63 ± 23.72 | 355.71 ± 23.06 | 3522.6 ± 110.0 |
| Free-DOX | 1052.5 ± 67.58 | 308.82 ± 26.55 | 648.39 ± 75.77 | 4177.4 ± 116.1 |

DOX-FNP2: IC₅₀值最小,
表明其对四种癌细胞的毒性最强。

5.2 DOX-FNP在肿瘤细胞中的摄取



A549细胞 (A, B) 和 B16BL6细胞 (C, D) 对DOX摄取的定量分析

10 μ M DOX-FNP复合物或DOX, 共培养4小时

A 549和B16BL6肿瘤细胞孵育4h后, 在10 μ m的DOX浓度下, DOX-FNP复合物和游离的DOX的荧光均无显著性差异($P>0.05$)。

表明: DOX-FNP复合物对肿瘤细胞摄取DOX不受阻碍。

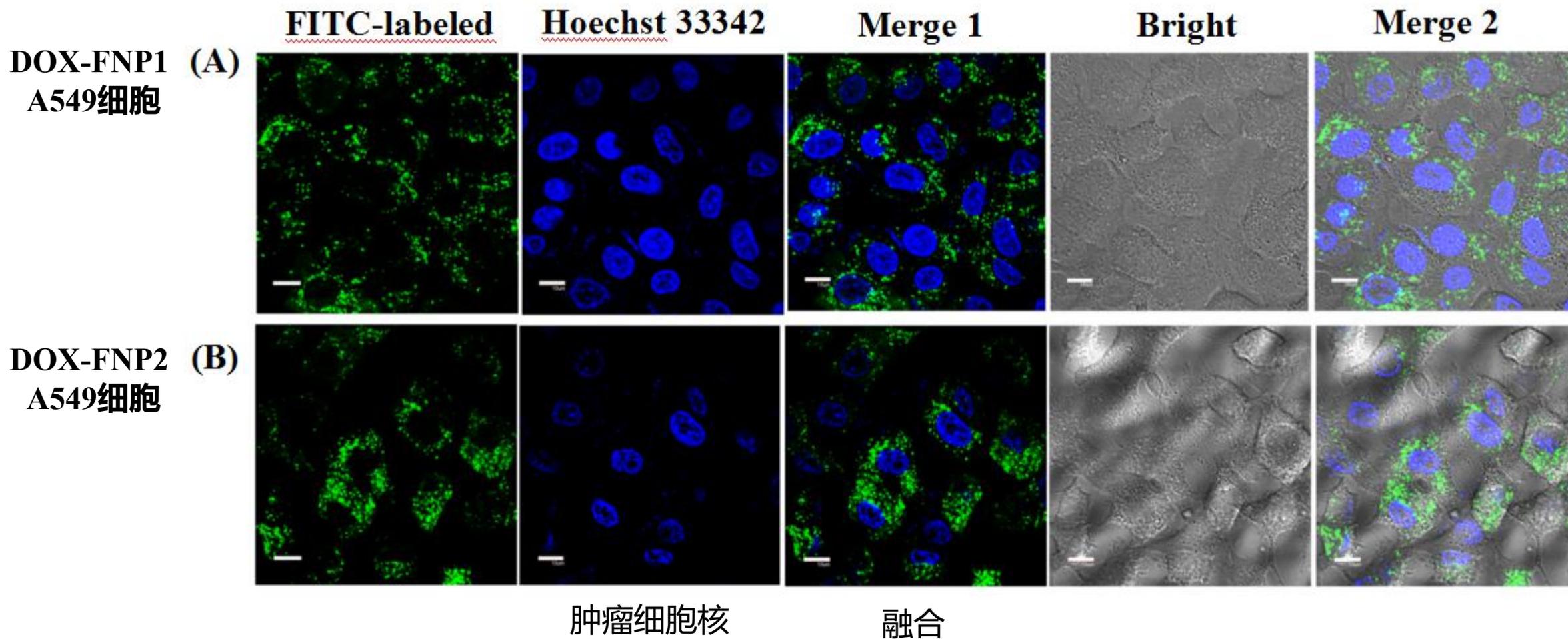
5.3 DOX-FNP在肿瘤细胞中的分布

Table S1. Characteristics of the FITC-labeled FNP fractions.

| | Size (nm) | Zeta potential (mV) | Conjugation ratio (%) |
|--------------------------|------------|---------------------|-----------------------|
| <u>FITC-labeled FNP1</u> | 246.9±42.6 | -19.9±3.8 | 0.031%±0.007% |
| <u>FITC-labeled FNP2</u> | 252.5±60.6 | -27.1±0.9 | 0.025%±0.009% |

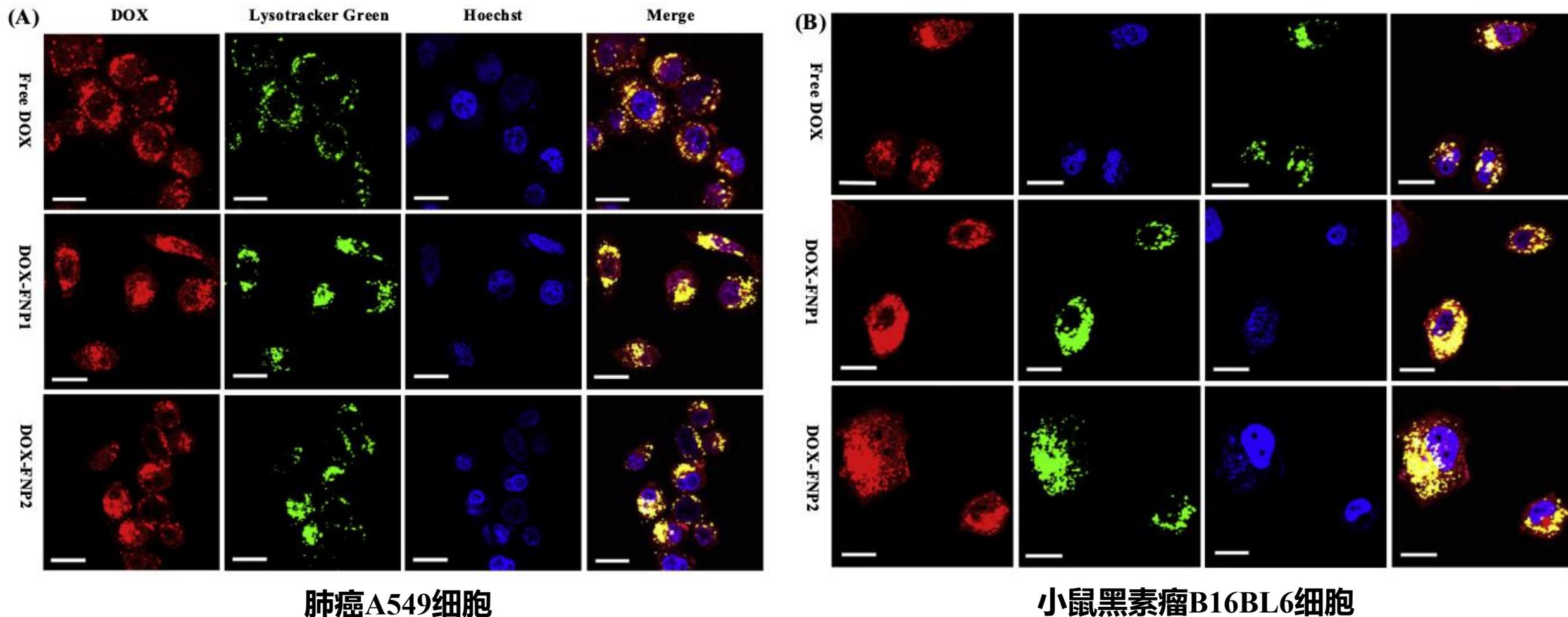
使用荧光染料FITC对DOX-FNP进行标记

5.3 DOX-FNP在肿瘤细胞中的内化分析



DOX-FNP1、DOX-FNP2经4h孵育后可被肿瘤细胞快速摄取。

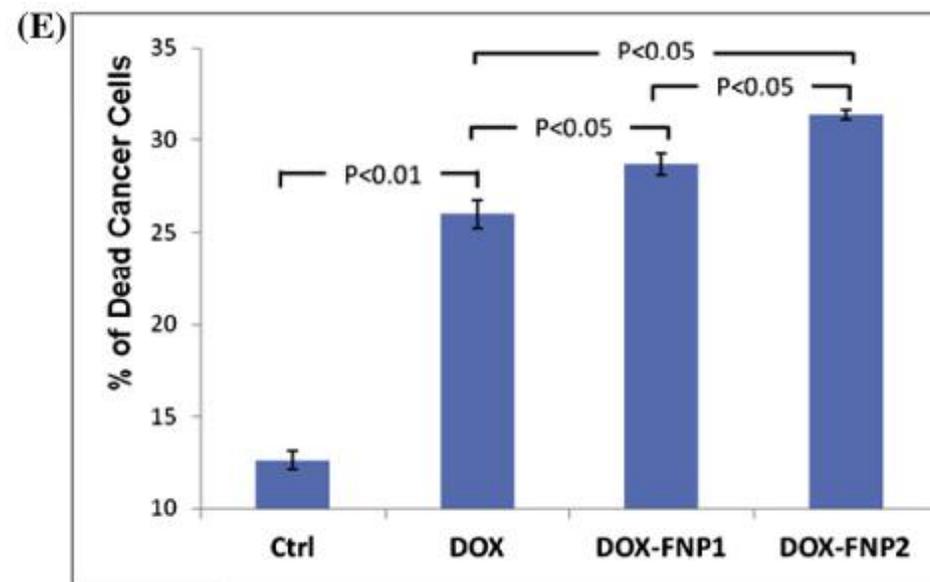
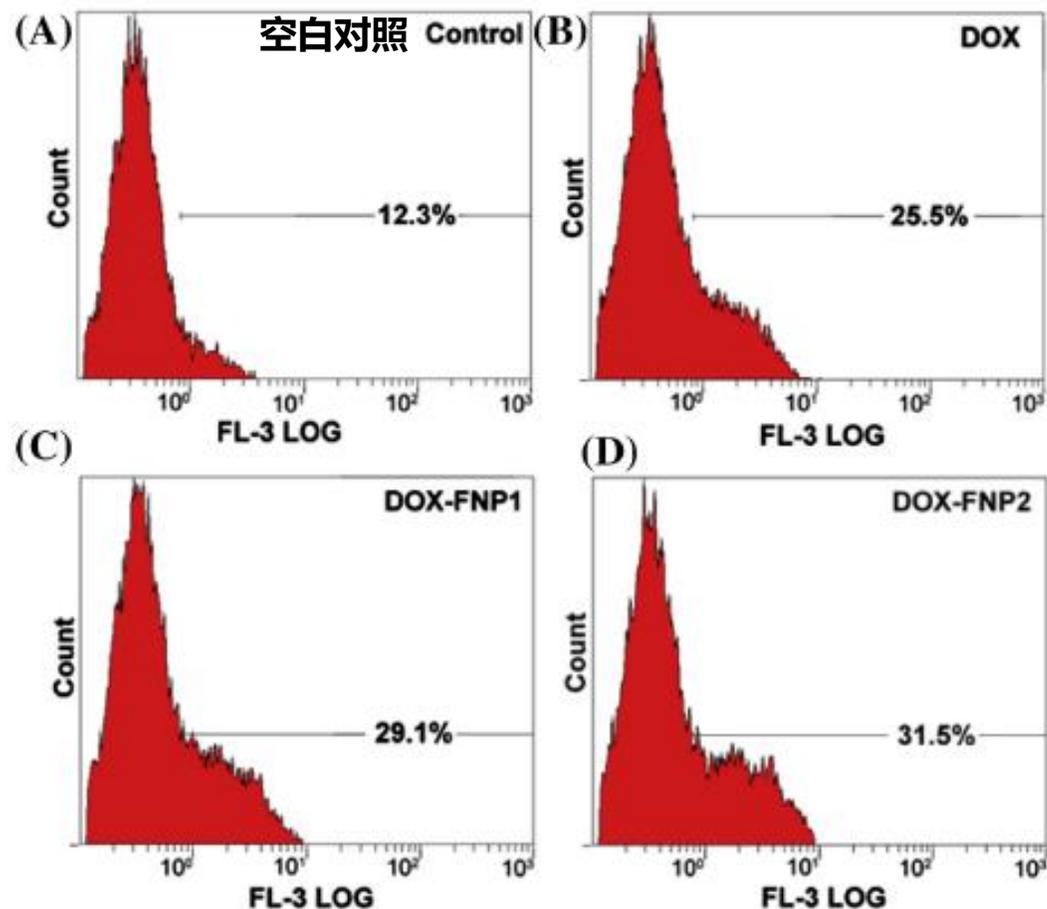
DOX-FNP复合物及游离的DOX在细胞内分布的共聚焦图像。



- 1、处理4h后，两种肿瘤细胞内DOX-FNP复合物和游离DOX均有不同的细胞内分布。
- 2、两种复合物DOX共同孵育的细胞中，大部分分布在内溶酶体室。
- 3、大部分游离的DOX位于细胞器外。

6、DOX-FNP在体外共培养系统中的免疫化疗活性

B16BL6肿瘤细胞与C57BL / 6脾细胞，在DOX浓度为 $1\mu\text{m}$ 的条件下，与DOX-FNP复合物或游离DOX共培养24h。



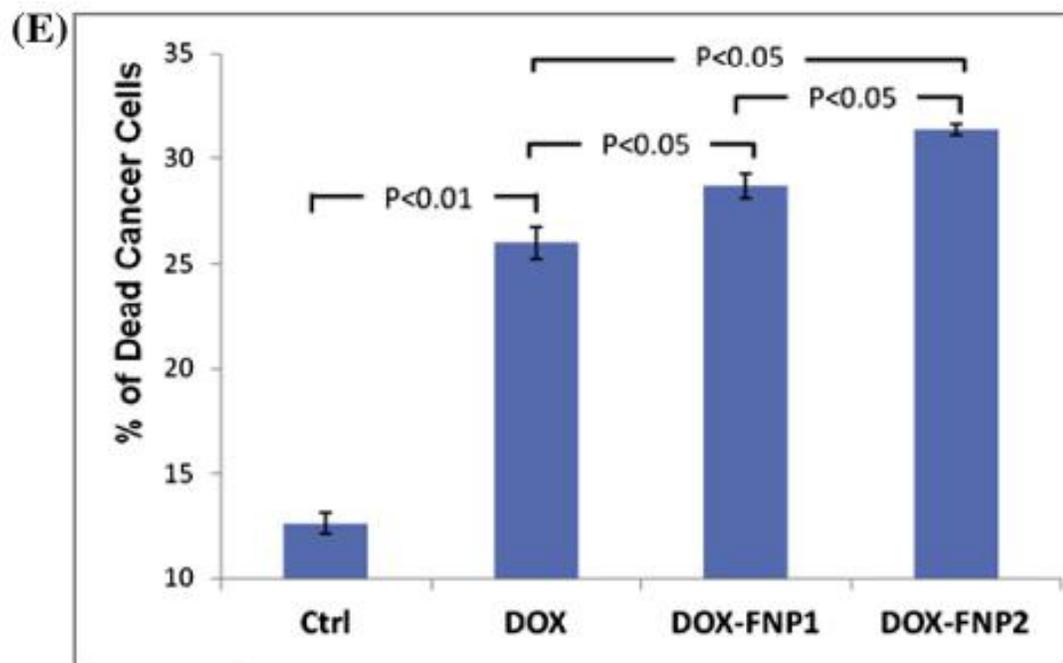
DOX-FNP 2和DOX-FNP 1复合物的肿瘤细胞死亡率分别为31.5%和29.1%，明显高于游离DOX的25.5%。

与游离DOX相比，两种配合物均能明显提高癌细胞的死亡率，表现出联合癌症治疗的潜力。



6、DOX-FNP在体外共培养系统中的免疫化疗活性

| | IC ₅₀ (nM) | | | |
|-----------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | A549 | B16BL6 | MCF-7 | MCF-7/ADR |
| DOX-FNP1 | 1170.6 ± 92.33 | 494.87 ± 38.00 | 1830.5 ± 270.5 | 5464.6 ± 16.87 |
| DOX-FNP2 | 599.34 ± 15.85 | 209.63 ± 23.72 | 355.71 ± 23.06 | 3522.6 ± 110.0 |
| Free-DOX | 1052.5 ± 67.58 | 308.82 ± 26.55 | 648.39 ± 75.77 | 4177.4 ± 116.1 |



FNPs的免疫刺激与纳米复合物的体外细胞毒性具有协同作用。



PART **04**

Conclusions





Conclusions



01

本研究的目的是通过研究不同的FNP作为生物活性纳米载体对细胞的免疫刺激活性、癌细胞的毒性机制和联合癌症治疗效应，探讨FNP及作为药物载体在肿瘤治疗中的应用潜力。

建立一种新的分离纯化方法——表面电荷选择性分离法。



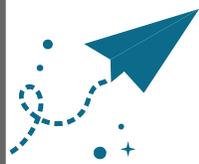


通过ELISArray测定，两种TNP均被证实可增强来自巨噬细胞和脾细胞的多种促炎细胞因子和趋化因子的分泌。

表明纯化的FNP在抗肿瘤治疗中具有潜在免疫调节作用。



Conclusions



MTT测定显示两种纯化的FNP对多种肿瘤细胞具有轻度至中度的细胞毒性，但FNP2具有比FNP1更强的细胞毒活性。

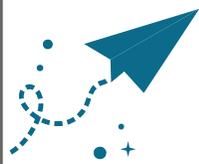
细胞凋亡测定和细胞周期分析进一步证明了这一点，FNP2可以通过诱导细胞凋亡和阻止肿瘤细胞在G0 / G1期增殖，来抑制肿瘤细胞的生长。

03





Conclusions



通过探究pH 对DOX-FNP复合物药物释放量的影响，较低的pH 环境下，DOX释放量高。

原因：较低pH导致纳米颗粒表面上的羧基或硫酸酯基团较强质子化，导致较低的负电荷。与中性pH值相比，低pH可使复合物的静电相互作用减弱，DOX-FNP解离速度加快。

该特性被认为有利于被动类型的肿瘤靶向，因为实体瘤的间隙空间具有较低的pH值。

04





共培养实验

04

脾细胞与肿瘤细胞共培养，DOX-FNP复合物比游离DOX具有更高的抗肿瘤活性，表明FNP_s的免疫刺激与纳米复合物体外细胞毒性的协同作用。

开发了一种联合抗癌疗法，使用FNP_s的电荷选择性部分作为生物活性纳米载体，可能为癌症联合治疗开辟了一条新途径。



请各位老师批评指正

