

## • 医药生物技术 •

# Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的制备及其在哮喘治疗中的应用

陈慧, 高宗林, 曹旭妮

华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237

陈慧, 高宗林, 曹旭妮. Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的制备及其在哮喘治疗中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2870-2877.

Chen H, Gao ZL, Cao XN. Preparation of anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 nanoparticles for asthma treatment. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2870-2877.

**摘要:** 哮喘作为常见的呼吸性疾病之一, 严重危害人类的健康, 造成了严重的医疗负担。最新研究表明表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 参与哮喘的发生发展。为构建靶向 EGFR 用于哮喘治疗的纳米粒子, 通过基因工程方法将抗 EGFR 的单链抗体 (Single chain antibody fragment, scFv) 修饰在铁蛋白重链亚基 (Human ferritin H-chain, FTH1) N 端, 采用混合复性的方式成功构建 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子。通过透射电子显微镜对纳米粒子的结构进行分析, 结果表明, 纳米粒子可以自组装成中空笼状结构, 粒径约为 12 nm。采用 SDS-PAGE 对纯化后的纳米粒子进行半定量分析发现, 亚基物质的量之比为 FTH1: anti EGFR scFv::FTH1=7:3。在哮喘小鼠动物模型上发现 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子能有效抑制哮喘小鼠肺组织中杯状细胞增生及粘液分泌, 对胶原沉积纤维化也有一定抑制效果。这些研究为铁蛋白应用于哮喘的治疗提供了良好的基础。

**关键词:** 铁蛋白, 纳米粒子, 表皮生长因子受体, 哮喘

## Preparation of anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 nanoparticles for asthma treatment

Hui Chen, Zonglin Gao, and Xuni Cao

School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** Asthma is a common respiratory disease that affects 300 million of people worldwide, posing a serious health risk and medical burden. Development of new anti-asthmatic drugs and alternative treatment regimens is therefore encouraged. Recent studies have shown that Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is involved in asthma development. In order to construct nanoparticles targeting EGFR for asthma treatment, a single chain antibody fragment (scFv) against EGFR was

**Received:** September 27, 2020; **Accepted:** January 18, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21375039).

**Corresponding author:** Xuni Cao. Tel: +86-21-64253117; E-mail: caoxuni@ecust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21375039) 资助。

网络出版时间: 2021-02-01

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210201.1106.003.html>

genetically engineered and modified at the N-terminal end of the human ferritin H-chain (FTH1) to construct Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 nanoparticles. Transmission electron microscopy showed that the nanoparticles were self-assembled into hollow cage-like structures with the particle size of about 12 nm. Semi-quantitative analysis of the purified nanoparticles by SDS-PAGE revealed the mass ratio of FTH1 to Anti EGFR scFv::FTH1 was 7:3. In House Dust Mite (HDM) driven models, Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 nanoparticles efficiently attenuated several key features of asthma, including goblet cell hyperplasia, mucous metaplasia and subepithelial fibrosis, showing the potential of using ferritin based nanoparticle for asthma treatment.

**Keywords:** ferritin, nanoparticle, epidermal growth factor receptor (EGFR), asthma

哮喘由于其多种发病因素及高发病率而成为严重危害人类健康的呼吸系统疾病之一<sup>[1]</sup>。哮喘常见的症状主要包括患者杯状细胞增生引起的粘液高分泌导致气道阻塞、炎性细胞浸润引起的气道炎症、气道高反应性以及气道纤维化引起的气道重塑<sup>[2]</sup>。临床上用于哮喘治疗的药物主要有糖皮质激素类<sup>[3]</sup>、 $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂类<sup>[4]</sup>和白三烯受体拮抗剂<sup>[5]</sup>等类别。在很多疾病中, EGFR 均过表达, 如哮喘、恶性胶质瘤、结直肠癌、脑瘤等<sup>[6]</sup>。近年来大量研究表明 EGFR 参与的信号通路与哮喘患者的气道炎症及气道重塑具有密切联系, 因此以 EGFR 为靶点进行靶向性治疗为哮喘的治疗提供了一种新的研究思路<sup>[7]</sup>。

纳米粒子因为其本身具有优于小分子药物或抗体药物独特的特性, 如颗粒小、比表面积大、具有实体瘤的高通透性和滞留效应 (EPR 效应) 等被广泛地应用于癌症的诊断和治疗中<sup>[8-9]</sup>。通常功能化的纳米粒子可以通过受体-配体或者抗原-抗体的特异性结合实现肿瘤等细胞的靶向识别, 使其能够特异性地结合到肿瘤细胞相关的抗原或者受体上<sup>[10-11]</sup>。铁蛋白是一种生物来源的、广泛存在于生物体内、由 24 个蛋白质亚基自组装形成的中空笼状结构的纳米粒子<sup>[12]</sup>。它能够提供表面、内部和亚基与亚基之间 3 个界面, 以及多种修饰位点, 如氨基、羧基和硫醇基等, 因此可以通过化学偶联的方法或者采用基因工程的方法对其进行修饰, 使其实现功能化<sup>[13-14]</sup>。此外, 铁蛋白也可以作为一种载体用于药物分子的携带, 如雷帕霉素和阿霉素<sup>[15]</sup>等。因此, 铁蛋白能作为诊

断试剂或药物载体很好地应用到生物学当中。但是鲜有研究报道将铁蛋白应用于哮喘及相关疾病的治疗。

本研究采用基因工程的方法, 将抗 EGFR 的单链抗体 (scFv) 修饰到铁蛋白重链亚基 (FTH1) 的 N 端, 成功构建 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子, 并且对其进行一系列表征。对该纳米粒子用于屋尘螨 (House dust mite, HMD) 激发的哮喘小鼠模型的治疗效果进行了进一步的研究。本研究工作为铁蛋白纳米粒子的功能化及其应用于哮喘治疗提供了良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

菌株与质粒: 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21 (DE3) 购自北京天根生化科技有限公司; pET-28a(+)、FTH1/pET-28a(+) 和 Anti EGFR scFv::FTH1/pET-28a(+) 质粒为本实验室保存。

试剂: 胰蛋白胨 (Tryptone)、酵母抽提物 (Yeast Extract) 购自英国 OXOID 公司; 乙二胺四乙酸 (EDTA)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、硫酸卡那霉素 (KANA)、异丙基- $\beta$ -硫代半乳糖苷 (IPTG)、考马斯亮蓝 R-250、亚甲双叉丙烯酰胺、丙烯酰胺、TritonX-100 均购自上海捷瑞生物工程有限公司; 牛血清白蛋白购自上海捷倍思基因技术有限公司; 蛋白质分子量标准 (Protein molecular weight marker) 购自 Sigma 公司; HDM 购自美国 Greer 公司; 马松 (Masson) 三色法染

色试剂盒购自上海博古生物科技有限公司;糖原过碘酸雪芙(PAS)染色液购自北京索莱宝生物科技有限公司;固体石蜡、OCT包埋剂、中性树胶均购自国药集团化学试剂有限公司;其他试剂至少为分析纯,均购于国药集团化学试剂有限公司。

实验仪器:分析天平(瑞士Mettler Toledo, EL104型);纯水仪(德国Millipore, Academic型);台式冷冻振荡器(中国太仓市科教器材厂, HZ-9210K);蛋白电泳仪(伯乐生命医学产品(上海)有限公司, Bio-Rad);离心机(美国BECKMAN coulter, Allegra X-12R型, 德国Sigma, 3K15型);压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂, SYQ-DSX-280B型);多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司, Synergy H1型);超净工作台(中国苏州净化设备有限公司, SW-CJ-1FD型);石蜡切片机(德国Leica, RM2235型);普通光学显微镜(日本, Olympus)。

实验动物:SPF级BALB/c雌性小鼠(体重18–22 g, 5–8周龄, 上海斯莱克实验动物有限公司)。

## 1.2 Anti EGFR scFv::FTH1 的表达与纯化

实验室保存有转化了 anti EGFR scFv::FTH1/pET-28a(+)质粒的 *E. coli* BL21(DE3)。培养于卡那霉素终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至菌液  $OD_{600}$  值达到 0.4–0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37  $^{\circ}\text{C}$  下诱导表达 3 h。离心收集 50 mL 菌液中的菌体沉淀, 加入 25 mL Buffer A (50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, pH 7.9, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤) 重悬菌体沉淀, 并进行超声破碎细胞(条件:功率 300 W, 工作 1 s, 间歇 1 s, 30 min), 离心取沉淀, 于沉淀中加入 25 mL Buffer B (50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100, pH 7.9, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤), 研磨, 重悬沉淀, 反复洗涤离心粗包涵体, 直到获得纯净的 Anti EGFR scFv::FTH1 包涵体。

## 1.3 FTH1 的表达与纯化

实验室保存有转化了 FTH1/pET-28a(+) 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)。培养于卡那霉素终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的 LB 液体培养基中, 待菌液  $OD_{600}$  值达到 0.4–0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  下诱导表达 3 h, 离心收集菌体沉淀, 用超声波细胞粉碎仪破碎细胞, 离心取上清, 得 FTH1 粗蛋白, 再将 FTH1 粗蛋白于 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中热变性, 离心取上清用 Suporose 6 凝胶层析柱进一步纯化即可得纯度较高的 FTH1 蛋白。

## 1.4 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的制备

通过蛋白变性和混合复性的方法制备得到 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子。首先分别将纯化后的 FTH1 和 anti EGFR scFv::FTH1 两种亚基进行变性, 即分别加入 Buffer C (8 mol/L Urea, 50 mmol/L Tris-OH, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, pH 7.9, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤), 充分溶解之后, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  摇床中振荡过夜。

随后通过梯度透析的方法逐步降低变性溶液中尿素的浓度, 进行纳米粒子复性。因采用变性后的 anti EGFR scFv::FTH1 亚基不能单独复性自组装成特征结构, 结果见下文所述, 因此将变性后的 FTH1 与 anti EGFR scFv::FTH1 亚基以摩尔比 6:4 混合, 最终混合蛋白总质量为 5 mg, 加入 Buffer C 后总体积为 50 mL, 将三者混匀, 装入预处理过的透析袋中置于 1 L 复性液中, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱复性, 大约 6–8 h 更换一次复性液。复性液配方如下所示:

步骤 1: 50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.1% PEG, 10% Glycerol, 6 mol/L Urea, 0.5 mmol/L  $\text{CuSO}_4$ , pH 7.9; 步骤 2: 50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.1% PEG, 10% Glycerol, 4 mol/L Urea, 0.5 mmol/L  $\text{CuSO}_4$ , pH 7.9; 步骤 3: 50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.1% PEG, 10% Glycerol, 3 mol/L Urea, 0.5 mmol/L

CuSO<sub>4</sub>, pH 7.9; 步骤 4: 50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.1% PEG, 10% Glycerol, 2 mol/L Urea, 0.5 mmol/L CuSO<sub>4</sub>, pH 7.9; 步骤 5: 50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.1% PEG, 10% Glycerol, 1 mol/L Urea, 0.5 mmol/L CuSO<sub>4</sub>, pH 7.9; 步骤 6: 50 mmol/L Tris-OH, 50 mmol/L NaCl, 10% Glycerol, pH 7.9。

复性完成之后收集透析袋中的蛋白溶液, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 除去可能存在的极大团聚物。使用 50 kDa 超滤管对得到的目的纳米粒子溶液进行超滤浓缩至 1 mg/mL。

### 1.5 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的纯化

通过混合复性的方法构建出目的纳米粒子后, 使用弱阴离子交换层析柱 (DEAE-Sephacel Fast Flow, 体积 2 mL) 对其进行纯化。将 DEAE-Sephacel Fast Flow 层析柱用 PB 缓冲液 (145 mmol/L NaCl, 86 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 18 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7.2, 0.22 μm 滤膜过滤) 平衡, 上样, 再使用 PB 缓冲液冲洗 10 min 以洗脱未结合的杂蛋白; 最后使用 NaCl 线性梯度洗脱蛋白, 本研究中采用的洗脱条件为: NaCl 浓度 0–0.5 mol/L 梯度上升, 时间为 60 min。分段收集流穿液后进行浓缩即为目的蛋白。

### 1.6 纳米粒子的表征和组分分析

#### 1.6.1 蛋白的折叠组装和组分分析

采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (NATIVE-PAGE) 对分段收集流穿液的纯度进行表征, 考察纯化后的 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的折叠组装情况, 采用 SDS-PAGE 对其进行组分分析。

#### 1.6.2 TEM 检测

将蛋白 (浓度在 0.2–0.5 g/L 之间) 溶液滴于放置有滤纸的铜网上, 使用 1% 磷钨酸对蛋白进行负染。通过透射电子显微镜 (TEM) 观察负染后目的纳米粒子的形态结构和自组装情况。

### 1.7 哮喘动物模型的建立及其在哮喘治疗中的应用

#### 1.7.1 哮喘动物模型的建立及药物干预

本研究中通过屋尘螨 (HDM) 诱发建立哮喘模型, 采用滴鼻的方式来致敏与激发。HDM 滴鼻剂量为 30 μg/d, 造模的周期为 4 周。造模第 2 周起, 开始进行鼻腔内 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 蛋白纳米粒子 (0.01 nmol) 干预, 对照组注射等剂量的地塞米松 (DXM) 和 FTH1 蛋白; 阳性对照组小鼠注射等剂量的 PBS。

#### 1.7.2 小鼠肺组织石蜡包埋及切片

最后一次小鼠鼻内激发后 24 h 采用颈椎脱臼法将小鼠处死, 解剖并收集小鼠完整的肺部组织。肺组织的处理过程为: 使用 75% 酒精清洗肺叶表面, 然后将其肺叶浸泡于 4% 多聚甲醛溶液内, 固定 24–48 h; 接着通过逐步提高酒精浓度对组织进行脱水, 酒精梯度分别为 50%、70%、85%、95%、100%, 每个梯度处理 1 h; 然后对组织进行透明处理: 先将肺组织转移至纯酒精与二甲苯等体积比的混合液中浸渍 1.5 h, 再转入纯二甲苯中浸渍 1 h; 随后进行浸蜡与包埋: 将预先在 65 °C 恒温箱内融化好的石蜡与二甲苯配制成体积比为 1:1 的混合溶液, 将组织置于其中, 浸泡 2 h 后, 再将组织转入 65 °C 恒温箱内的石蜡液中浸泡 3 h, 此过程重复 2 次; 浸蜡结束后, 将组织置于包埋盒中, 并在其表面浇上融化好的石蜡, 待包埋盒内蜡液表面凝固后将其置于 4 °C 冰箱中过夜冷却后切片。

#### 1.7.3 肺组织石蜡切片 PAS 染色

首先将石蜡切片进行脱蜡、水化后平铺于载玻片上; 在切片上的肺组织附近滴加过碘酸反应液至完全覆盖肺组织, 染色 10 min, 水洗沥干; 滴加雪夫反应液至完全覆盖肺组织, 避光染色 10–20 min, 水洗沥干; 滴加苏木素染液反应 1 min, 水洗并重复该步骤 1 次; 最后使用酸性乙醇分化数秒, 流水冲洗至组织显蓝色。染色结束后依次用 95% 乙醇、100% 乙醇、二甲苯对组织进行脱水、

透明,重复2次;最后使用中性树胶对组织进行封固。利用光学显微镜观察小鼠肺组织PAS染色情况。采用Image J和Prism软件对气道周围的PAS染色阳性面积进行数据统计( $n=6$ ), $P<0.05$ 为显著性差异。

#### 1.7.4 肺组织石蜡切片 Masson 三色染色

首先将石蜡切片进行脱蜡后平铺于载玻片上;在切片上的肺组织附近滴加苏木素至完全覆盖肺组织,染色10 min,水洗至组织呈蓝色,沥干;在切片上的肺组织附近滴加丽春红品红染液至完全覆盖肺组织,染色15 min,随后分别用1%磷钼酸水溶液分化5 min,1%苯胺蓝染5 min;最后滴加1%冰醋酸水溶液分化10 s。染色结束后依次用95%乙醇、100%乙醇、二甲苯对组织进行脱水、透明,重复2次;最后使用中性树胶对组织进行封固。利用光学显微镜观察小鼠肺组织Masson染色情况。采用Image J和Prism软件对气道周围的Masson染色阳性面积进行数据统计( $n=6$ ), $P<0.05$ 为显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的制备、纯化与组分分析

本研究通过蛋白变性和混合复性的方法,制备得到了anti EGFR scFv::FTH1/FTH1纳米粒子。

对复性成功的anti EGFR scFv::FTH1/FTH1纳米粒子使用弱阴离子交换层析(DEAE-Sepharose Fast Flow)进行纯化,阴离子交换层析图谱如图1A所示,蓝色曲线为紫外UV280 nm波长蛋白吸收值,可表征蛋白洗脱情况。由图谱可知,蛋白在不同NaCl浓度下被洗脱,说明其为不同成分。分别收集在不同NaCl梯度下洗脱的蛋白流穿液,即1号、2号、3号峰附近蛋白流穿液,并进行超滤浓缩。

采用NATIVE-PAGE对浓缩后的蛋白进行分析,如图1B所示,M为商业化的马脾去铁铁蛋白(Apoferritin, APO),1、2、3泳道依次为1号、

2号、3号峰蛋白浓缩液。其中,可明显发现1号样品条带很集中没有明显弥散现象,并且其凝胶孔内没有团聚物,说明1号样品纯度较高,即为目的蛋白;2号和3号蛋白条带颜色较浅,大部分为弥散条带,并且凝胶孔内也有团聚物,说明其蛋白样品主要为杂质成分。

得到较纯的纳米粒子后,采用SDS-PAGE对其亚基组成进行半定量分析。如图2所示,1-7泳道为不同摩尔质量的FTH1蛋白,其摩尔质量依次为0.0116 nmol/L、0.0175 nmol/L、0.0233 nmol/L、0.0291 nmol/L、0.0347 nmol/L、0.0403 nmol/L和0.0465 nmol/L,8-9泳道为摩尔数不同的纯化后的anti EGFR scFv::FTH1/FTH1纳米粒子。

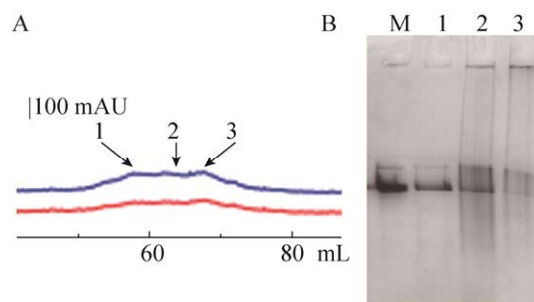


图1 弱阴离子交换层析纯化anti EGFR scFv::FTH1/FTH1的色谱图(A)和NATIVE-PAGE图(B)

Fig. 1 Chromatography (A) and the NATIVE-PAGE (B) image of purified anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 by anion exchange chromatography. M: APO; 1-3: flow-through.

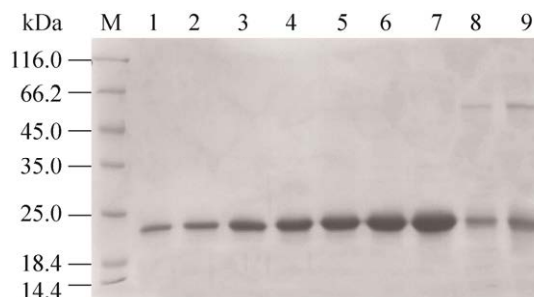


图2 SDS-PAGE分析纯化后纳米粒子组分

Fig. 2 Analysis of the composition of purified nanoparticles by SDS-PAGE. M: marker; 1-7: gradually increased molar of FTH1; 8-9: different molar of FTH1/anti EGFR scFv::FTH1 nanoparticles.

进一步使用 Image J 软件对 SDS-PAGE 凝胶图像进行分析并统计其灰度值, 计算纳米粒子中 FTH1 的摩尔数。最终得到两种亚基的摩尔数之比为 FTH1 : anti EGFR scFv::FTH1=7 : 3, 与最初的投料 6 : 4 相比, anti EGFR scFv::FTH1 亚基的比例在折叠的过程中有所损失, 可能与两者在折叠的过程中速度不同有关。

## 2.2 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的表征

采用 TEM 直接考察纳米粒子的结构和自组装情况, 结果如图 3 所示, A 为 FTH1 和 anti EGFR scFv::FTH1 混合复性的 TEM 结果图, 可以明显地观察到其蛋白结构基本为中空笼状结构, 其粒径约为 12 nm, 与文献[13]报道中折叠较好的铁蛋白纳米粒子形态相似; B 为 anti EGFR scFv::FTH1 自组装折叠的结果图, 蛋白未见明显结构, 说明 anti EGFR scFv::FTH1 亚基本身并不能正确地自组装成目的结构。

## 2.3 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子对哮喘小鼠治疗效果的评价

### 2.3.1 糖原 PAS 染色评价纳米粒子干预后肺组织粘液分泌与杯状细胞增生的情况

PAS 染色的原理为: 过碘酸使细胞内的多糖乙二醇基氧化成二醛, 再与雪芙液的无色品红结合, 红色定位于胞浆上。哮喘模型肺组织中的杯状细胞及其分泌的粘液中含有大量糖原, 因此可以

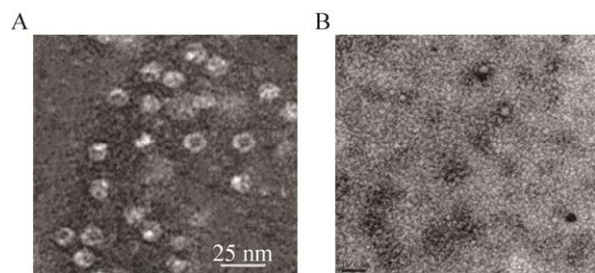


图 3 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子的表征  
Fig. 3 Characterization of anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 nanoparticles. (A) Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1. (B) Self-assembled anti EGFR scFv::FTH1.

通过 PAS 染色观察肺组织中杯状细胞增生肥大及气道周围粘液的分泌情况。染色结果如图 4 所示。

通过比较阳性对照组 (PBS 处理组) 与其他各实验组, 可观察到阳性组气道周围有明显的粘液高分分泌现象, 表明实验成功构建 HDM 哮喘小鼠模型, 为接下来分析纳米粒子对哮喘小鼠病理组织的分析奠定了基础; 通过比较各组对哮喘小鼠黏液分泌的抑制情况, 实验结果表明 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子及地塞米松治疗组与阳性组差异明显, 且二者无明显差异, FTH1 组与阳性组无明显差异, 说明 Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子能有效地抑制哮喘小鼠气道杯状细胞增生及黏液分泌, 其治疗哮喘的关键在于 anti EGFR scFv。

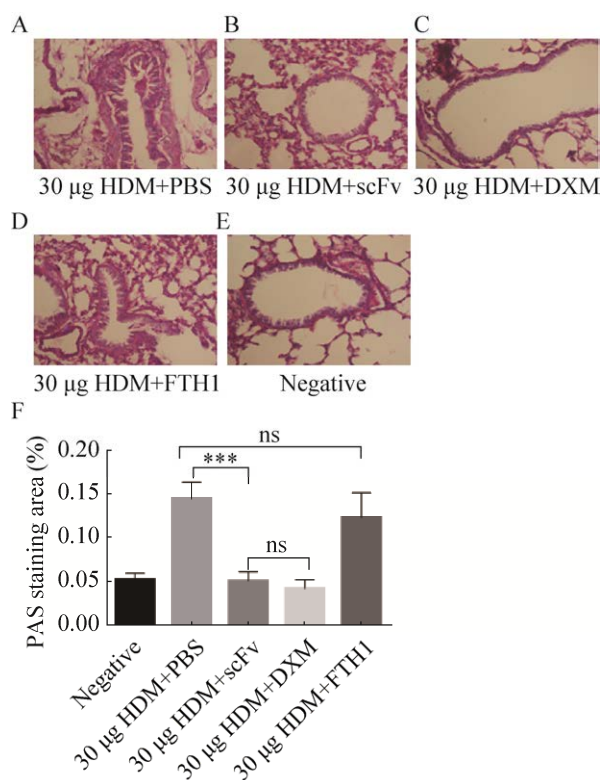


图 4 不同纳米粒子对 HDM 模型小鼠肺组织杯状细胞增生和黏液分泌的影响

Fig. 4 Effects of different nanoparticles on the goblet cell hyperplasia and mucous metaplasia. (A) Positive control group. (B) Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 nanoparticles intervention group. (C) Dexamethasone intervention control group. (D) FTH1 intervention group. (E) Negative control group. (F) Positive area rate in PAS of each group. Data represent  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \*\*\* $P<0.001$ .



### 2.3.2 Masson 三色染色评价蛋白纳米粒子干预后肺组织气道周围胶原沉积纤维化情况

Masson 三色染色是用于组织中纤维及炎症因子染色和检测的方法之一。胶原纤维、粘液染色后呈蓝色，胞浆、肌肉、纤维素、神经胶质染色后呈红色，胞核呈黑蓝色。哮喘模型的肺组织由于大量胶原纤维沉积导致气道重塑，因此可以通过 Masson 三色染色观察肺组织气道周围胶原纤维化情况。染色结果如图 5 所示，阳性组气道周围有明显的胶原纤维沉积现象，表明实验成功构建了 HDM 哮喘小鼠模型；通过比较各组对哮

喘小鼠气道周围胶原纤维化的抑制情况，可发现地塞米松和 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 组与阳性组差异明显，且二者之间无明显差异，FTH1 组与阳性组无明显差异，说明 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 蛋白纳米粒子对于 HDM 造模哮喘小鼠的胶原纤维沉积纤维化症状有很好的抑制作用，其治疗哮喘的关键在于 anti EGFR scFv。

## 3 讨论

本研究在铁蛋白的基础上，采用基因工程的方法将抗 EGFR 单链抗体修饰在 FTH1 N 端，anti EGFR scFv::FTH1 在大肠杆菌中经诱导表达后，主要以包涵体的形式存在，因此采用包涵体变性和复性的方式以恢复其生物活性。因为 anti EGFR scFv::FTH1 亚基分子或许与整合蛋白存在一定的相互作用，导致自行组装困难，所以本研究采用混合复性的方法将变性后的 anti EGFR scFv::FTH1 亚基和 FTH1 以一定比例混合后进行复性，成功折叠复性了 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子。为了进一步提高纳米粒子的纯度，采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换层析的方法对该纳米粒子进行纯化并通过 SDS-PAGE 灰度值分析方法对两种亚基的比例进行了半定量分析，为后续有效亚基的浓度计算提供了有效的方法。通过 TEM 对目的纳米粒子的结构进行表征，结果表明 anti EGFR scFv::FTH1 自身不能自组装成特征的笼状结构，而 anti EGFR scFv::FTH1 和 FTH1 两种亚基混合后能正确自组装成均一的笼状结构。进一步在 HDM 哮喘小鼠模型上的应用显示 anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 纳米粒子能有效缓解哮喘相关症状：PAS 染色结果显示该纳米粒子能显著抑制哮喘小鼠肺组织中杯状细胞增生及粘液分泌，Masson 三色染色发现其对哮喘小鼠肺组织中的胶原沉积纤维化也有抑制效果。这些研究为单链抗体修饰笼状蛋白提供了方法和策略，为哮喘的靶向治疗提供了一种新的材料，拓宽了该类纳米粒子在生物医药方面的应用。

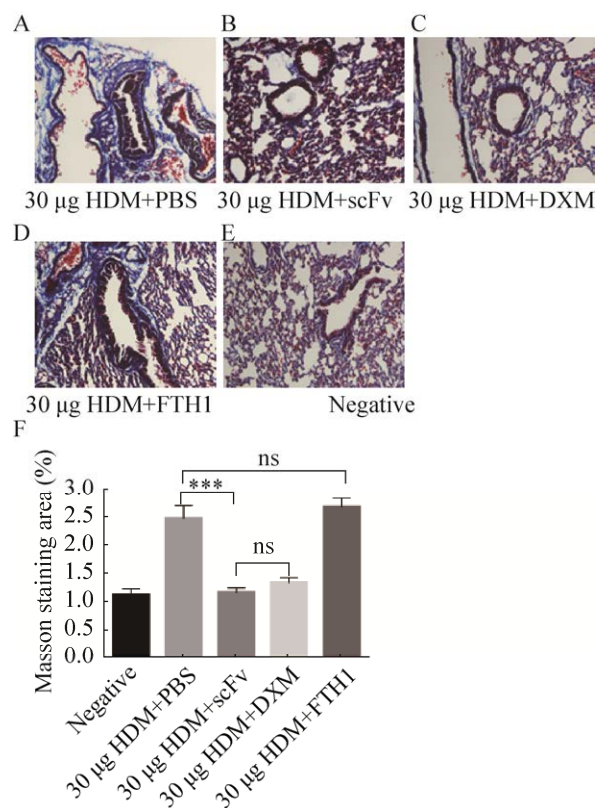


图5 不同纳米粒子对HDM模型小鼠肺组织胶原纤维沉积的影响

Fig. 5 Effects of different nanoparticles on the subepithelial fibrosis. (A) Positive control group. (B) Anti EGFR scFv::FTH1/FTH1 nanoparticles intervention group. (C) Dexamethasone intervention control group. (D) FTH1 intervention group. (E) Negative control group. (F) Positive area rate in Masson of each group. Data represent  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \*\*\* $P<0.001$ .

## REFERENCES

- [1] Bulut I, Ozseker ZF, Coskun A, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) levels in patients with severe allergic asthma are reduced by omalizumab. *J Asthma*, 2017, 55(10): 1116-1121.
- [2] Kalinowski A, Ueki I, Min-Oo G, et al. EGFR activation suppresses respiratory virus-induced IRF1-dependent CXCL10 production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(2): L186-L196.
- [3] Rahman HMA, Ahmed K, Rasool MF, et al. Pharmacological evaluation of smooth muscle relaxant and cardiac-modulation potential of *Phyllanthus nodiflora* in *ex-vivo* and *in-vivo* experiments. *Asian Pacific J Trop Med*, 2017, 10(12): 1146-1153.
- [4] Edgell H, Moore LE, Chung C, et al. Short-term cardiovascular and autonomic effects of inhaled salbutamol. *Respirat Physiol Neurobiol*, 2016, 231: 14-20.
- [5] Koster ES, Philbert D, Winters NA, et al. Adolescents' inhaled corticosteroid adherence: the importance of treatment perceptions and medication knowledge. *J Asthma*, 2015, 52(4): 431-436.
- [6] Thomas SM, Grandis JR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(3): 255-268.
- [7] Kanojia D, Zhou WD, Zhang JJ, et al. Proteomic profiling of cancer stem cells derived from primary tumors of HER2/Neu transgenic mice. *Proteomics*, 2012, 12(22): 3407-3415.
- [8] Dufort S, Sancey L, Coll JL. Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(2): 179-189.
- [9] Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul*, 2001, 41(1): 189-207.
- [10] Zhu J, Huang H, Dong SW, et al. Progress in aptamer-mediated drug delivery vehicles for cancer targeting and its implications in addressing chemotherapeutic challenges. *Theranostics*, 2014, 4(9): 931-944.
- [11] Grobmyer SR, Morse DL, Fletcher B, et al. The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. *J Surg Oncol*, 2011, 103(4): 317-325.
- [12] Watt RK. The many faces of the octahedral ferritin protein. *BioMetals*, 2011, 24(3): 489-500.
- [13] Li X, Qiu LH, Zhu P, et al. Epidermal growth factor-ferritin H-chain protein nanoparticles for tumor active targeting. *Small*, 2012, 8(16): 2505-2514.
- [14] 沈阳, 边成原, 詹家荣, 等. 铁蛋白系统纳米粒子的构建及其相互作用. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(3): 308-315.  
Shen Y, Bian CY, Zhan JR, et al. Construction and interaction of ferritin based system nanoparticles. *J East China Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2018, 44(3): 308-315 (in Chinese).
- [15] 黄雅佩, 黄培森, 陈小东, 等. 铁蛋白重链亚基纳米载药系统的构建及其特性. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(5): 629-635.  
Huang YP, Huang PS, Chen XD, et al. Epidermal growth factor-ferritin H-chain nanoparticles as nanocarrier of doxorubicin. *J East China Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2015, 41(5): 629-635 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)