

乙肝病毒核心蛋白 CTD 结构域与吲哚菁绿包封效应的相关性

魏亚敏¹, 李玉林², 张恒³, 张怡青⁴, 王晓军³, 王慧睿⁵, 肖蓬莉⁵, 钱鹏³, 任磊⁶, 王云龙^{1,2,4}

1 郑州大学 生命科学学院, 河南 郑州 450006

2 河南省生物工程技术研究中心, 河南 郑州 450000

3 河南省职工医院, 河南 郑州 450006

4 郑州职业技术学院, 河南 郑州 450052

5 郑州大学附属洛阳中心医院, 河南 洛阳 471000

6 厦门大学, 福建 厦门 361005

魏亚敏, 李玉林, 张恒, 张怡青, 王晓军, 王慧睿, 肖蓬莉, 钱鹏, 任磊, 王云龙. 乙肝病毒核心蛋白 CTD 结构域与吲哚菁绿包封效应的相关性. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1039-1049.

WEI YM, LI YL, ZHANG H, ZHANG YQ, WANG XJ, WANG HR, XIAO PL, QIAN P, REN L, WANG YL. Correlation of the CTD structural domain of hepatitis B virus core protein with the encapsulation effect of indocyanine green. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1039-1049.

摘要: 乙肝病毒核心蛋白 (hepatitis B virus core protein, HBc) 由于其天然的颗粒自组装能力和易修饰性, 已然成为药物载体蛋白研究的热点。HBc 的 C-末端聚精氨酸结构域 (CTD, aa 151-183) 的截短与否不会影响颗粒的自组装特性, 但对颗粒的内外电荷会产生一定影响, 进而影响药物包封。基于此, 本研究选择截短 HBc 的 CTD 和插入 RGD 肽, 构建并表达 3 种不同 C 末端长度的 HBc 变体 (RH) 包封 ICG (RH/ICG), 比较其纳米制剂的稳定性和药物活性。研究发现 RH160/ICG 在包封效率和生物成像方面存在较大优势。相比于其他 HBc 蛋白变体, RH160/ICG 可明显提高包封效率, 最高可达 $32.77\% \pm 1.23\%$ 。细胞毒性和溶血实验进一步表明 RH160/ICG 具有良好的生物相容性。细胞摄取和小鼠体内成像实验均显示 RH160/ICG 可在 4T1 小鼠乳腺癌细胞和肿瘤部位中高效递送 ICG, 具有较好的成像效果。研究结果为进一步扩大 ICG 的诊疗应用和开发以 HBc 为基础的纳米颗粒药物载体平台提供新的方向。

关键词: 乙肝病毒核心蛋白; 聚精氨酸结构域; 吲哚菁绿; 包封效率; 活体成像

Received: March 25, 2021; Accepted: June 11, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China-Henan Joint Fund Project (U1904206)

Corresponding author: WANG Yunlong. Tel: +86-371-67999699; E-mail: biowyl@126.com

基金项目: 国家自然科学基金-河南联合基金项目 (U1904206)

Correlation of the CTD structural domain of hepatitis B virus core protein with the encapsulation effect of indocyanine green

WEI Yamin¹, LI Yulin², ZHANG Heng³, ZHANG Yiqing⁴, WANG Xiaojun³,
WANG Huirui⁵, XIAO Pengli⁵, QIAN Peng³, REN Lei⁶, WANG Yunlong^{1,2,4}

1 School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450006, Henan, China

2 Henan Bioengineering Technology Research Center, Zhengzhou 450000, Henan, China

3 Henan General Hospital, Zhengzhou 450006, Henan, China

4 Zhengzhou Technical College, Zhengzhou 450052, Henan, China

5 Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471000, Henan, China

6 Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China

Abstract: Hepatitis B virus core protein (HBc) has become a hot spot in drug carrier protein research due to its natural particle self-assembly ability and ease of modification. The truncation of the C-terminal polyarginine domain (CTD, aa 151–183) of HBc does not affect the self-assembly of the particles. However, it does affect the internal and external charges of the particles, which may subsequently affect drug encapsulation. Thus, the truncated C-terminal polyarginine domain (CTD) of HBc and the inserted RGD peptide were selected to construct and express three HBc variants (RH) encapsulated with ICG (RH/ICG) with different C-terminal lengths to compare the stability and drug activity of their nanoformulations. RH160/ICG was found to have a great advantages in encapsulation efficiency and biological imaging. Compared with other HBc variants, RH160/ICG significantly improved encapsulation efficiency, up to 32.77%±1.23%. Cytotoxicity and hemolysis assays further demonstrated the good biocompatibility of RH160/ICG. Cell uptake and *in vivo* imaging experiments in mice showed that RH160/ICG could efficiently deliver ICG in tumor cells and tumor sites with good imaging effect. This research provides a new direction for further expanding the diagnosis and treatment application of ICG and development of HBc-based nanoparticle drug carrier platform.

Keywords: hepatitis B virus core protein; polyarginine domain; indocyanine green; encapsulation efficiency; *in vivo* imaging

乙肝病毒核心蛋白 (hepatitis B virus core protein, HBc) 由于其天然的颗粒自组装能力和易修饰的特性, 已成为载体蛋白研究的热点^[1-2]。HBc 由 N-末端自组装结构域(SA, aa 1–140)、C-末端聚精氨酸结构域 (CTD, aa 151–183) 和它们之间的连接链 (aa 141–149) 组成^[3]。HBc 的 CTD 有结合核酸的能力, 在颗粒自组装过程中被包埋在颗粒内部。冷冻电子

显微镜观察显示 HBc 的核酸含量随着 CTD 的截短而降低^[4-5]。另有研究显示, CTD 中的精氨酸可与负电荷产生静电相互作用进而加强乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 衣壳的组装和完整性^[6]。基于此, 可通过 CTD 引起的静电吸附促进 HBc 对小分子药物的包封。

RGD 肽是一种含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp) 的三肽序列, 可与肿瘤细胞

表面高表达的整合素 $\alpha V\beta 3$ 特异性结合,表现出优越的靶向标记肿瘤的作用。通过基因工程或化学耦联的方式,将 RGD 肽修饰在纳米载体表面,可增加纳米载体的肿瘤靶向性,如人血白蛋白、脂质体等。

吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 是目前唯一被批准用于临床的近红外成像试剂^[7-8]。但 ICG 在水溶液中的不稳定性及血浆快速清除率极大地限制了其在诊疗方面的应用^[9-10]。研究发现,可通过静电吸附将 ICG 包裹进入具有靶向功能的 HBc^[11],有效增加其稳定性和肿瘤靶向性,达到体内长循环的效果^[12-13]。然而已有研究发现,CTD 的截短会对 HBc 的电荷性质造成影响^[14],可能进一步影响其对药物的包封能力^[15-16]。而目前截短 CTD 对 ICG 包封的影响研究相对较少,需要进一步开展相关研究。

本研究通过截短 CTD 和插入 RGD 肽,构建了 3 种 RH 蛋白变体包封 ICG,比较包封效率,并对其性质、生物相容性和体内外成像能力进行了评估,结果显示 RH160/ICG 具有更出色的生物成像能力。

1 材料与方法

1.1 材料

RGD-HBc144 (RH144)、RGD-HBc160 (RH160) 和 RGD-HBc183 (RH183) 序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)、pET43.1a(+), 4T1 细胞由河南省生物工程技术研究中心提供;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、硫酸铵、PBS 购自国药集团化学试剂有限公司;DEME 培养基、小牛血清、DAPI 购自 Sigma-Aldrich;注射用吲哚菁绿购自丹东医创药业有限公司;凝胶过滤层析柱、离子交换层析柱购自 GE 公司。

1.2 RH 蛋白颗粒的制备及表征

截短 HBc1-183 的 144 位氨基酸和 160 位氨基酸,在其主要免疫区 (aa 78-82) 替换并插入 RGD 肽和富含甘氨酸的连接肽 (GTSGSSGSGSGGS GSGGGG)。随后,将 3 个 RH 蛋白的基因序列插入 pET-43.1a(+) (*Nde* I -*Xho* I), 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, IPTG 诱导表达 3 种 RH 蛋白。经离心、硫酸铵沉淀、离子交换层析和凝胶过滤层析获得 RH183、RH160 和 RH144 蛋白。所有纯化的 RH 均保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。利用 ExPASy 的 ProtParam tool 输入 RH183、RH160 和 RH144 氨基酸序列,计算纳米颗粒的等电点。分别利用 15%聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 和 1%天然琼脂糖凝胶电泳 (nature agarose gel electrophoresis, NAGE) 考察 RH183、RH160、RH144 蛋白的纯度和核酸含量。

1.3 RH/ICG 的制备及表征

通过脲素解聚法制备带有光敏剂 ICG 的重组 RH/ICG 纳米制剂 (RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG)。取一定量的 RH183、RH160 和 RH144 蛋白,分别加入 6 mol/L 脲素,混匀,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温磁力搅拌器上解聚 3 h,加入 ICG 溶液,黑暗条件下轻轻搅拌 2 h。最后,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下通过聚合缓冲液透析,以进行 RH183、RH160、RH144 的再组装以及去除游离的 ICG。

通过紫外分光光度计 (Thermo Fisher, NanoDrop™ One) 检测不同浓度 ICG 在 720 nm 处的吸光度,建立标准曲线,计算 ICG 浓度,根据公式 (1) 计算包封率。

$$\text{包封率 (EE\%)} = \frac{\text{负载的药物量}}{\text{加入的药物量}} \times 100 \quad (1)$$

透射电子显微镜 (JEM-1400 TEM) 考察 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 的外貌形态。将 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG

悬浮液 (0.5 mg/mL) 用 2% (W/V) 磷钨酸染色, 然后将其滴在涂有碳的 200 目铜网格上, 室温下干燥, 置于透射电镜下观察其表面形态并记录各自图片, 且分别选取 30 个颗粒测量其直径。

Zeta PALS 动态光散射 (dynamic light scattering, DLS, Malvern, Wano-2S) 检测器测量 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 的粒径分布和电位。在测量时, 将 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 的分散液用超纯水稀释至合适的浓度 (0.2 mg/mL)。

1.4 RH/ICG 稳定性

使用透析法检测 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 在 PBS (pH 7.4) 中泄漏 ICG 的能力^[17], 考察纳米制剂的稳定性。分别将 3 mL ICG、RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 置于透析袋 (MW=14 kDa) 中, 浸于 30 mL PBS (pH 7.4) 溶液里, 使用恒温振荡器 (37 °C) 以转速 100 r/min 搅拌。在 2、4、8、12、24、48、72 h 的时间点分别取样 1 mL, 取样后补充等体积的新鲜 PBS 介质。紫外分光光度计测定样品中 ICG 的浓度, 并计算累计泄漏率。

为了检测 ICG、RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 在水溶液中的稳定性, 将一定浓度的 ICG、RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 在 4 °C 避光条件下保存 14 d。分别在 0、1、3、5、7、14 d 预定时间内取出一定量样本, 利用紫外分光光度计 (Thermo Fisher, NanoDrop™ One) 测量样本的紫外可见吸收光谱 (200–850 nm)。动态光散射检测器分别检测 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 在 14 d 内粒径的变化, 考察其胶体稳定性。

1.5 生物相容性

将 4T1 细胞按照 5×10^3 个/孔的密度接种于

96 孔板中, 培养 24 h。弃去旧培养基, 每孔分别加入 100 μ L 含 RH160、RH183、RH160/ICG 和 RH183/ICG (以 HBc 浓度计, 分别为 100、120、140、160、180、200 μ g/mL) 的培养液。用培养基中未处理的细胞作为空白对照。37 °C 孵育 24 h, MTT 法测定细胞活力。

取 10 mL 新鲜兔血, 加入约 10 倍体积的 PBS, 摇动, 3 500 r/min 离心 10 min, 除去上清液。PBS 洗涤 2–3 次, 直到上清液未有红色出现为止^[18-19]。将收集到的红细胞稀释至 2% 红细胞悬液。取 1 mL PBS 作为阴性对照, 1 mL 去离子水作为阳性对照, 接着分别取 1 mL RH183/ICG 和 RH160/ICG (以 HBc 浓度计, 分别为 100、120、140、160、180、200 μ g/mL) 置于 EP 管中, 加入 400 μ L 2% 红细胞悬液。混合后置于 37 °C 恒温培养箱中静置 2 h。之后, 3 500 r/min 离心 10 min, 观察每个 EP 管的溶血和结块现象, 收集上清液。使用紫外可见分光光度计测量 541 nm 处的吸光度, 并按照公式 (2) 计算溶血率。

$$\text{溶血率} (\%) = \left(\frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{阴性对照组}}}{A_{\text{阳性对照组}} - A_{\text{阴性对照组}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

1.6 细胞摄取

将 4T1 细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 培养过夜。随后, 弃去旧培养基, 分别加入含有 ICG (等同于 RH160/ICG 的 ICG 浓度)、RH160/ICG (200 μ g/mL) 和 RH183/ICG (200 μ g/mL) 的新鲜培养液。37 °C 孵育 4 h, PBS 洗涤 2–3 次, 用预冷的甲醇固定 0.5 h, 5 μ g/mL DAPI 染色 10 min, PBS 洗涤 2–3 次。最后通过共聚焦激光扫描显微镜 (ZEISS, LSM700) 观察细胞摄取情况。

为了进一步考察 RH160/ICG 和 RH183/ICG 的摄取程度, 通过 ZEN 3.1 (blue edition) 测量 RH160/ICG 和 RH183/ICG 的荧光信号强度。

1.7 生物体内分布

动物实验经河南省生物工程技术研究中心实验动物伦理委员会批准 (DWLL2019005)。选取肿瘤体积约 100 mm^3 的 BALB/c, 随机分成 3 组, 每组 3 只: (1) ICG 组; (2) RH183/ICG 组; (3) RH160/ICG 组。通过静脉注射将上述药物注入 BALB/c 体内, 4%水合氯醛麻醉小鼠。分别在给药 2、8、24、48 h 时, 通过小动物活体成像仪 (PerkinElmer, IVIS[®]LuminaSeriesII) 监测肿瘤及全身的荧光强度。48 h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 收集主要脏器、组织和肿瘤, 拍摄荧光成像图片, 测定荧光信号强度。

1.8 统计学方法

实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。统计分析采用 one-sample *t*-test (OriginPro 8.0)^[20]。统计学的显著、非常显著和极非常显著差异分别表示为

$P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 RH 蛋白的制备和表征

RH183、RH160 和 RH144 序列设计如图 1 所示。ExPASy 的 ProtParam tool 分析 RH183、RH160 和 RH144 的等电点分别为 5.95、9.21 和 10.10。如图 2A 所示, SDS-PAGE 结果显示 RH183、RH160 和 RH144 约为 30 kDa、24 kDa 和 22 kDa。如图 2B 所示, NAGE 结果显示 RH183、RH160 和 RH144 的核酸含量随着 CTD 的截短而降低。

2.2 RH/ICG 的制备和表征

TEM 形貌见图 3A–C, 粒径分布见图 3D, 可以看到纳米颗粒呈现球形且粒径均匀分布。TEM 显示 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG

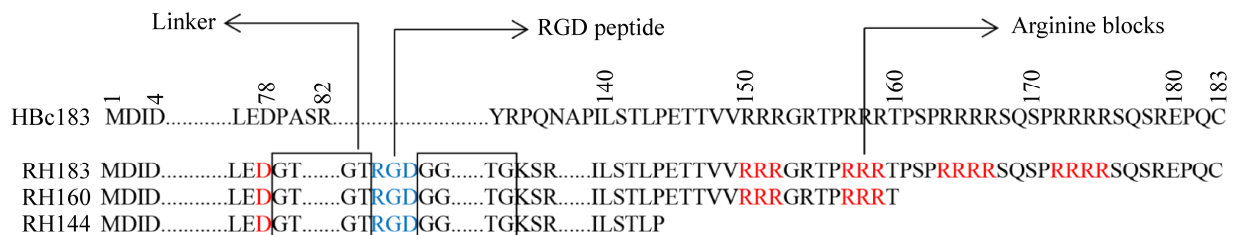


图 1 不同 C 末端长度的 RH 蛋白颗粒的氨基酸序列

Figure 1 Amino acid sequences of RH protein particles with different C-terminal lengths.

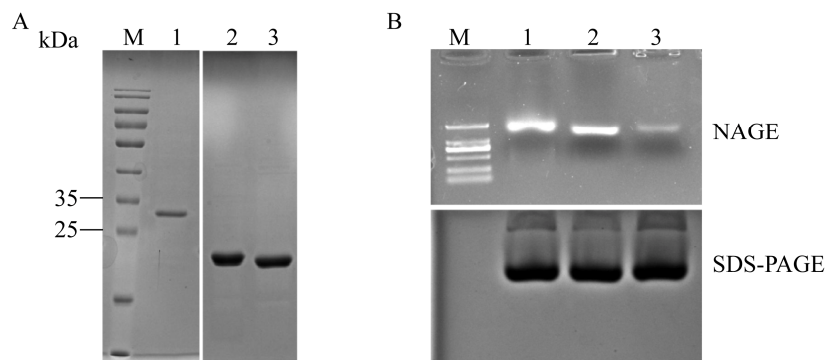


图 2 RH183、RH160 和 RH144 的 SDS-PAGE (A) 和 NAGE (B) 结果

Figure 2 SDS-PAGE (A) and NAGE (B) results of RH183, RH160 and RH144. M: protein marker; 1: RH183; 2: RH160; 3: RH144.

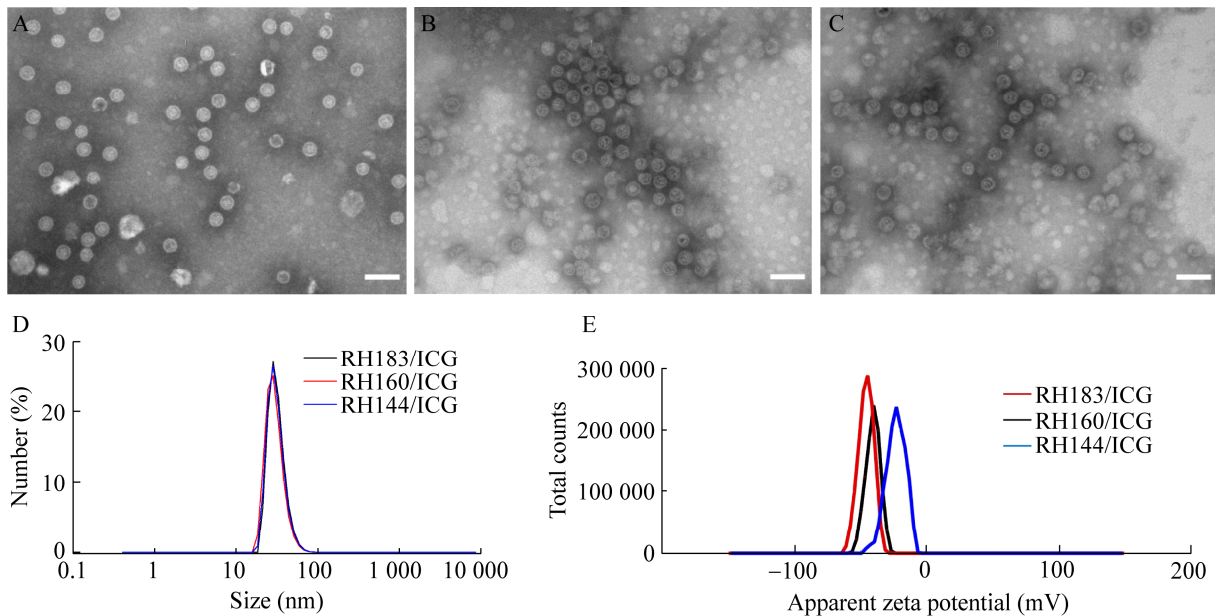


图3 RH183/ICG、RH160/ICG和RH144/ICG的电镜图片、粒径分布和Zeta电位

Figure 3 TEM image of RH183/ICG (A), RH160/ICG (B) and RH144/ICG (C) (scale bar=100 nm), particle size distribution (D) and Zeta potential (E) of RH183/ICG, RH160/ICG and RH144/ICG.

的直径分别为 (31.93 ± 3.13) nm、 (33.58 ± 3.72) nm 和 (36.35 ± 2.55) nm。图 3E 为电位分布图，RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 的电位分别是 -45.9 mV、 -40.8 mV 和 -23.5 mV，Zeta 电位 (正或负) 越高，体系越稳定^[21]。

2.3 RH/ICG 包封率

图 4 是 ICG 标准曲线，在 2.5 – 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 之间具有良好的线性关系 ($R^2=0.996$)。经计算，

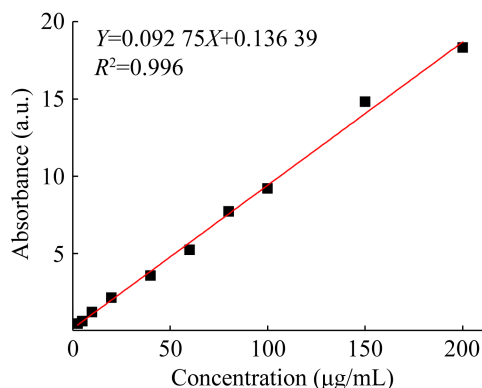


图4 ICG 标准曲线

Figure 4 The standard curve of ICG.

与 RH183/ICG (EE: $28.60\% \pm 1.37\%$) 和 RH144/ICG (EE: $19.50\% \pm 0.91\%$) 相比，RH160/ICG 明显提高了包封效率，达到 $32.77\% \pm 1.23\%$ 。

2.4 RH/ICG 稳定性

如图 5 所示，在 2 h 时 ICG 浓度均迅速增

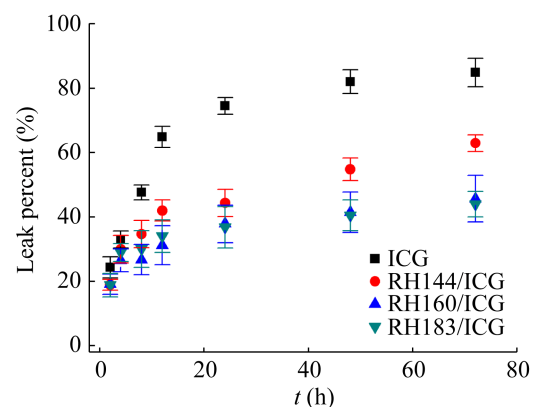


图5 ICG、RH183/ICG、RH160/ICG和RH144/ICG在PBS(pH7.4)中的累计泄漏率

Figure 5 *In vitro* leak profiles of ICG, RH183/ICG, RH160/ICG, and RH144/ICG in PBS (pH 7.4). $n=3$, $\bar{x} \pm s$.

大, 累计泄漏率达到 20%左右, 这可能是由于粘连在 RH 蛋白颗粒外部的 ICG 分子在短时间内快速解离所致^[22]。在 72 h 时游离 ICG 的累计泄漏率为 $84.83\% \pm 4.42\%$, 而 RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 的累计泄漏率分别为 $43.93\% \pm 3.95\%$ 、 $45.69\% \pm 7.24\%$ 和 $62.90\% \pm 2.61\%$, 相比于 ICG, 分别降低了 48.21%、46.14% 和 25.85%。

如图 6A–D 所示, 避光保存 14 d 后 ICG、RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 的吸光度分别降低了 68.39%、10.32%、11.86% 和 29.06%。如图 6E 所示, 保存 14 d 后 RH144/ICG 的直径增大至 (252.8 ± 10.63) nm, 而 RH183/ICG、RH160/ICG 的直径基本不变。结果表明 RH160/ICG 和 RH183/ICG 均表现出优异的体外

稳定性。

因为降解和自聚集作用^[23-24], 游离 ICG 吸光度在保存 14 d 后迅速降低。而 RH144 颗粒由于不含 CTD, 不能通过静电相互作用增加蛋白的稳定性, 其直径在短时间内迅速增大。

2.5 生物相容性

由于 RH144/ICG 的低包封效率和低稳定性, 本实验选择考察 RH160/ICG 和 RH183/ICG 的细胞毒性。由图 7A 可以看出, 随着蛋白浓度的增大, RH160 和 RH183 均未对 4T1 细胞系产生明显的细胞毒性, 细胞存活率均在 95% 以上。与 100 $\mu\text{g/mL}$ ICG 的细胞毒性相比, RH160/ICG 和 RH183/ICG 的细胞存活率基本没有变化, 存活率均在 90% 以上。

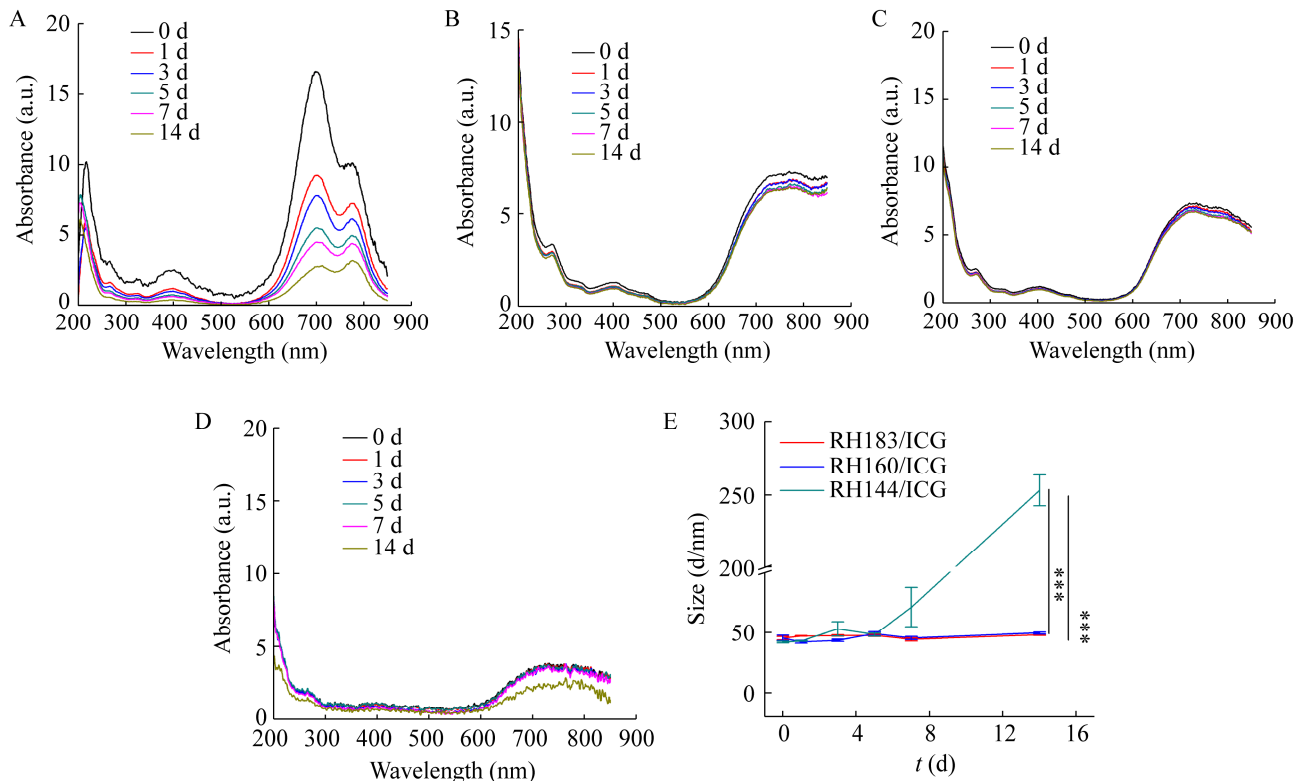


图 6 ICG (A)、RH183/ICG (B)、RH160/ICG (C)、RH144/ICG (D) 的紫外光谱吸收稳定性和胶体稳定性 (E)

Figure 6 UV-vis absorption stability of ICG (A), RH183/ICG (B), RH160/ICG (C), RH144/ICG (D) and colloidal stability (E). $n=3$, $\bar{x} \pm s$, ***: $P < 0.001$ vs. RH183/ICG, RH160/ICG.

溶血实验中, PBS 组、RH183/ICG 组和 RH160/ICG 组的红细胞均沉淀在底部, 上清液呈无色透明, 没有溶血现象发生。如图 7B 所示, RH183/ICG 和 RH160/ICG 的溶血率均在 0–5% 之间。去离子水 EP 管中溶液是透明的红色, 并且在其底部没有红细胞沉淀, 表明存在溶血但没有聚集。结果表明,

RH183/ICG 和 RH160/ICG 具有良好的生物相容性。

2.6 细胞摄取

从图 8A–B 可以看出, 经 RH160/ICG、RH183/ICG 和 ICG 处理的细胞的亮度依次递减, RH160/ICG 的红色荧光信号最强, 分别为 RH183/ICG 和游离 ICG 的 1.24 倍和 3.17 倍。

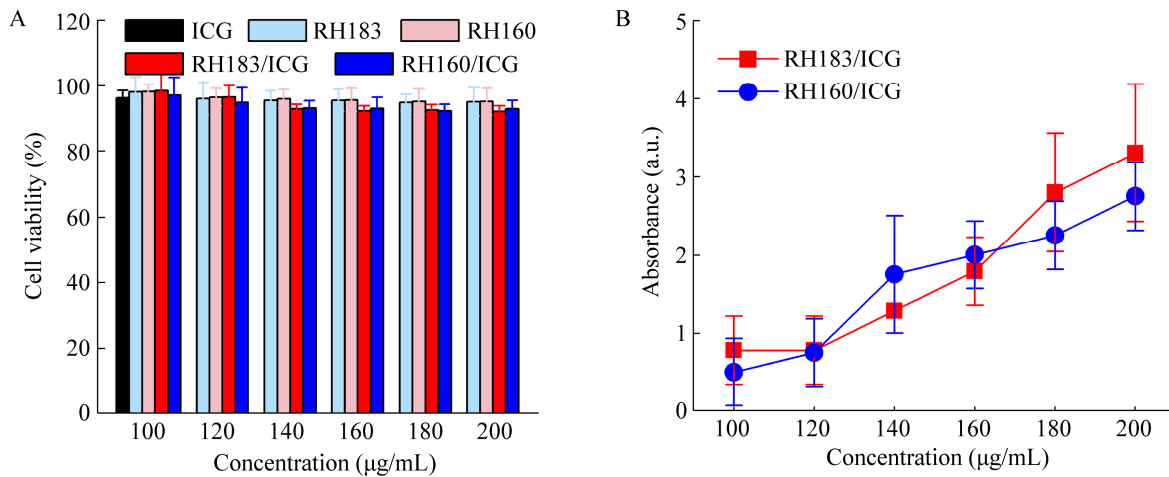


图 7 包封 ICG 前后 HBc 变体的细胞毒性 (A) 和 RH183/ICG、RH160/ICG 的溶血率 (B)

Figure 7 Cytotoxicity of HBc variants before and after ICG encapsulation (A) and hemolysis rate of RH183/ICG and RH160/ICG (B). $n=3$, $\bar{x} \pm s$.

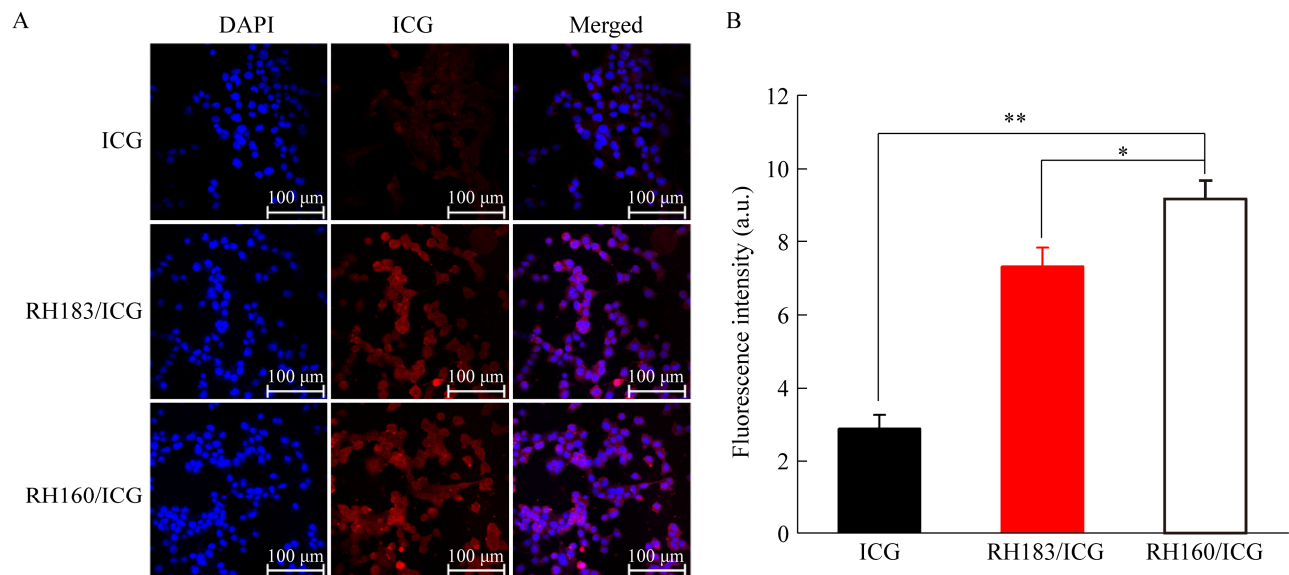


图 8 RH183/ICG 和 RH160/ICG 的细胞摄取 (A) 和荧光信号强度分析结果 (B)

Figure 8 Cellular uptake (A) and fluorescence signal intensity analysis of RH183/ICG and RH160/ICG (B). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. *: $P < 0.05$ vs. RH183/ICG, **: $P < 0.01$ vs. ICG.

RGD 可以和肿瘤细胞表面过表达的整合素特异性结合^[25-27], 提高了纳米载体肿瘤靶向性。因此, 含有 RGD 的纳米制剂可快速地与肿瘤细胞结合并通过内吞作用内化到 4T1 细胞内部^[28-29]。相比于游离 ICG, RH183/ICG 含有较低的 ICG 分子数量, 但其具有更出色的细胞摄取效果。

2.7 体内成像

如图 9A 所示, 注射 8 h, RH183/ICG 和 RH160/ICG 实验组小鼠荧光信号主要聚焦在肿瘤部位, ICG 组小鼠肿瘤部位虽然出现荧光信号但其信号强度较低, 表明 RH183/ICG 和 RH160/ICG 通过 RGD 的靶向作用可在肿瘤周围蓄积药物, 而 ICG 虽通过自由扩散的形式到达肿瘤部位, 但绝大部分 ICG 分子在扩散过程中已被代谢。注射 48 h, RH183/ICG 和 RH160/ICG 仍存在荧光信号, 但 ICG 肿瘤部位的荧光信号已经消失。脱颈椎处死小鼠后, 使用活体成像仪检测切除组织的离体荧光。如

图 9B 所示, RH183/ICG 组、RH160/ICG 和 ICG 组的小鼠肿瘤组织都有一定的荧光信号, 其中 RH160/ICG 的荧光信号最强。

3 讨论

乙肝病毒核心蛋白 (HBc) 的 C 末端聚精氨酸结构域 (CTD) 影响颗粒的电荷分布, 但不影响颗粒的自组装。因此, 本研究通过截短 CTD 探究其对 HBc 包封 ICG 的影响, 结果显示 RH160/ICG 的包封率高于 RH183/ICG 和 RH144/ICG, 最高可达 $32.77\% \pm 1.23\%$, 说明 RH160/ICG 具有更出色的 ICG 的包封效果, 过长和缺失 CTD 都会降低 ICG 包封效率, CTD 可以控制 HBc 药物包封。CTD 的存在使大肠杆菌在表达蛋白时裹入核酸, NAGE 结果显示 RH183 核酸含量高于 RH160, 这可能是 RH183/ICG 包封率降低的主要原因。如何去除核酸, 需进一步探讨。实验还发现, RH183/ICG、RH160/ICG 和 RH144/ICG 的电位绝对值依次减

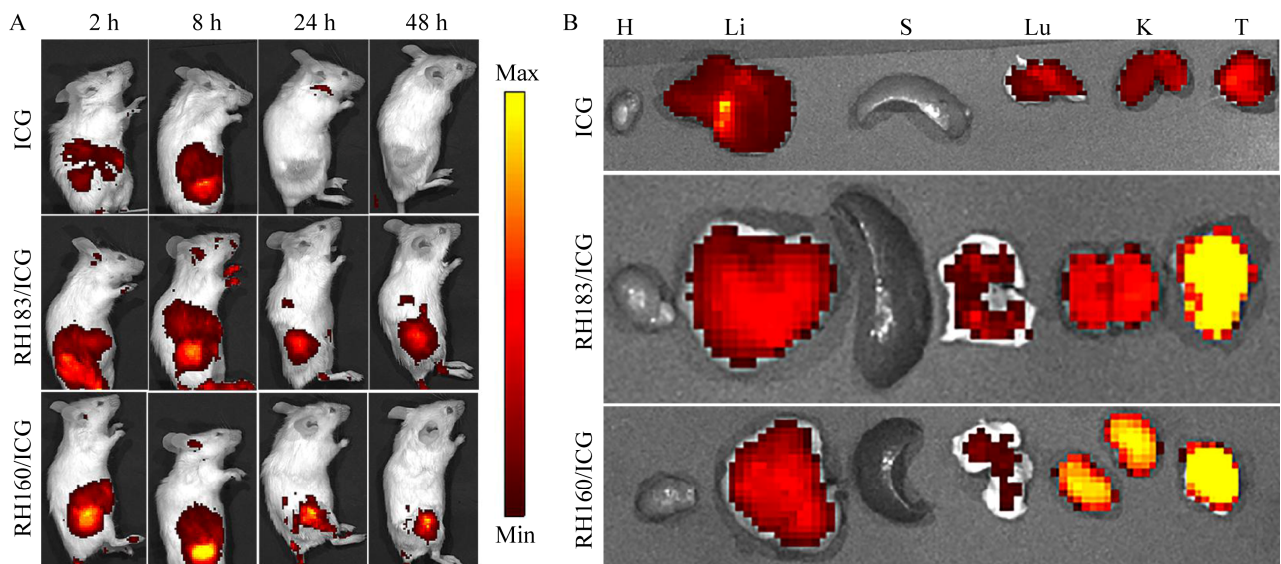


图 9 RH183/ICG 和 RH160/ICG 的小鼠荧光成像 (A) 和组织荧光成像 (B)

Figure 9 Fluorescence imaging in mice (A) and tissue fluorescence imaging of RH183/ICG and RH160/ICG (B). H: heart; Li: liver; S: spleen; Lu: lung; K: kidney; T: tumor.

小,且 RH144/ICG 的电位绝对值低于 30 mV, Zeta 电位愈高,颗粒的分散体系愈稳定,水相中颗粒分散稳定性的分界线一般认为在+30 mV 或 -30 mV,累计泄漏实验和保存 14 d 后的直径变化结果验证显示, RH144/ICG 的稳定性低于 RH160/ICG 和 RH183/ICG,初步原因可能是 ICG 与 CTD 的静电相互作用增加了 HBc 颗粒的稳定性。

细胞实验和动物实验进一步研究 RH183/ICG 和 RH160/ICG 是否存在药物活性差异。由于 ICG 是无毒性荧光染料,不会对细胞产生毒性,细胞毒性实验和溶血实验均表明 RH183/ICG 和 RH160/ICG 都具有良好的生物相容性,这说明截短 CTD 不影响 HBc 的生物相容性。细胞摄取实验表明, RH160/ICG 的荧光强度是 RH183/ICG 的 1.24 倍,说明 RH160/ICG 在细胞成像方面优于 RH183/ICG,截短 CTD 可提高细胞摄取能力。小鼠体内成像进一步表明, RH160/ICG 具有更优越的肿瘤靶向示踪效果,与细胞摄取结果一致, RH160/ICG 的包封率高于 RH183/ICG,含有更多的 ICG 分子,因此可以增强生物成像效果。

综上所述,本研究结果证明 CTD 可增强 HBc 的包封效率,继而影响药物活性,增强体内肿瘤荧光成像效果。比较而言 RH160/ICG 更有望成为潜在的生物成像剂。

REFERENCES

- [1] 杨秉芬,刘志敏. 乙肝核心抗原作为免疫载体蛋白的研究进展. 生物技术通讯, 2005, 16(2): 180-182.
Yang BF, Liu ZM. Advance on hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety. Lett Biotechnol, 2005, 16(2): 180-182 (in Chinese).
- [2] 杨星钰,薄洪,舒跃龙. 乙肝病毒核心抗原作为载体用于病毒样颗粒疫苗研究的主要进展. 病毒学报, 2012, 28(3): 311-316.
Yang XY, Bo H, Shu YL. Hepatitis B virus core antigen as a carrier for virus-like particle vaccine: a review. Chin J Virol, 2012, 28(3): 311-316 (in Chinese).
- [3] Zhang Y, Liu Y, Zhang B, et al. *In vitro* preparation of uniform and nucleic acid free hepatitis B core particles through an optimized disassembly-purification-reassembly process. Protein Expr Purif, 2021, 178: 105747.
- [4] Liu S, He J, Shih C, et al. Structural comparisons of hepatitis B core antigen particles with different C-terminal lengths. Virus Res, 2010, 149(2): 241-244.
- [5] Venkatakrisnan B, Zlotnick A. The structural biology of hepatitis B virus: form and function. Annu Rev Virol, 2016, 3(1): 429-451.
- [6] Sominskaya I, Skrastina D, Petrovskis I, et al. A VLP library of C-terminally truncated hepatitis B core proteins: correlation of RNA encapsidation with a Th1/Th2 switch in the immune responses of mice. PLoS One, 2013, 8(9): e75938.
- [7] Newman M, Chua PK, Tang FM, et al. Testing an electrostatic interaction hypothesis of hepatitis B virus capsid stability by using an *in vitro* capsid disassembly/reassembly system. J Virol, 2009, 83(20): 10616-10626.
- [8] 张麟,陈衡. 正负电荷改性乙肝病毒样颗粒的构建及性能评价. 天津大学学报(自然科学与工程技术版), 2020, 53(5): 450-458.
Zhang L, Chen H. Construction and characteristics of charge modified-hepatitis B virus core protein virus-like particles. J Tianjin Univ (Sci Technol Ed), 2020, 53(5): 450-458 (in Chinese).
- [9] Zhang Y, Song S, Liu C, et al. Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in *E. coli*: formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect *in vivo*. Cell Immunol, 2007, 247(1): 18-27.
- [10] 郑明彬,郑翠芳,龚萍,等. 吡啶菁绿纳米颗粒在癌症诊断和治疗中的应用. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(10): 971-976.
Zheng MB, Zheng CF, Gong P, et al. Application of indocyanine green nanoparticles in cancer diagnosis and treatment. Prog Biochem Biophys, 2013, 40(10): 971-976 (in Chinese).
- [11] 蒋丹丹,王云龙,李玉林,等. 含 RGD 修饰的病毒样颗粒递送 ICG 靶向肿瘤的研究. 中国生物工程杂志, 2020, 40(7): 22-29.
Jiang DD, Wang YL, Li YL, et al. Study on the

- delivery of RGD modified virus-like particles to ICG targeted tumors. *China Biotechnol*, 2020, 40(7): 22-29 (in Chinese).
- [12] 黎梦, 周宇, 邹宏密, 等. 载吲哚菁绿与阿霉素靶向纳米粒用于视网膜母细胞瘤体外成像的实验研究. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(6): 709-715.
- Li M, Zhou Y, Zou HM, et al. Application of nanoparticle loaded with indocyanine green and adriamycin in *in vitro* imaging of retinoblastoma: an experimental study. *J Chongqing Med Univ*, 2019, 44(6): 709-715 (in Chinese).
- [13] Shan WJ, Chen RH, Zhang Q, et al. Improved stable indocyanine green (ICG)-mediated cancer optotheranostics with naturalized hepatitis B core particles. *Adv Mater*, 2018, 30(28): 1707567.
- [14] Cao J, Wan S, Tian J, et al. Fast clearing RGD-based near-infrared fluorescent probes for *in vivo* tumor diagnosis. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, 7(4): 390-402.
- [15] Strods A, Ose V, Bogans J, et al. Preparation by alkaline treatment and detailed characterisation of empty hepatitis B virus core particles for vaccine and gene therapy applications. *Sci Rep*, 2015, 5: 11639.
- [16] Wang SN, Liu CX, Wang CY, et al. Arsenic trioxide encapsulated liposomes prepared via copper acetate gradient loading method and its antitumor efficiency. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15(3): 365-373.
- [17] Li Z, Li D, Zhang W, et al. Insight into the preformed albumin corona on *in vitro* and *in vivo* performances of albumin-selective nanoparticles. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14(1): 52-62.
- [18] Guo LT, Chen BA, Liu R, et al. Biocompatibility assessment of polyethylene glycolpoly L-lysine-poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15(5): 3710-3719.
- [19] Su Q, Yi Y, Guo M, et al. Construction and immunological evaluation of truncated hepatitis B core particles carrying HBsAg amino acids 119-152 in the major immunodominant region (MIR). *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(1): 84-89.
- [20] Rybka J, Mieloch A, Plis A, et al. Assembly and characterization of HBc derived virus-like particles with magnetic core. *Nanomaterials*, 2019, 9(2): 155.
- [21] Schumacher J, Bacic T, Staritzbichler R, et al. Enhanced stability of a chimeric hepatitis B core antigen virus-like-particle (HBcAg-VLP) by a C-terminal linker-hexahistidine-peptide. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 39.
- [22] Rüdert M, Vormittag P, Hillebrandt N, et al. Process monitoring of virus-like particle reassembly by di-afiltration with UV/Vis spectroscopy and light scattering. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(6): 1366-1379.
- [23] Xue P, Yang RH, Sun LH, et al. Indocyanine green-conjugated magnetic Prussian blue nanoparticles for synchronous photothermal/photodynamic tumor therapy. *Nano-Micro Lett*, 2018, 10(4): 1-15.
- [24] Bose RJC, Uday Kumar S, Zeng Y, et al. Tumor cell-derived extracellular vesicle-coated nanocarriers: an efficient theranostic platform for the cancer-specific delivery of anti-miR-21 and imaging agents. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 10817-10832.
- [25] Cheng KM, Du T, Li Y, et al. Dual-antigen-loaded hepatitis B virus core antigen virus-like particles stimulate efficient immunotherapy against melanoma. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(48): 53682-53690.
- [26] Shan W, Zheng H, Fu G, et al. Bioengineered nanocage from HBc protein for combination cancer immunotherapy. *Nano Lett*, 2019, 19(3): 1719-1727.
- [27] Shan W, Zheng H, Fu G, et al. Bioengineered nanocage from HBc protein for combination cancer immunotherapy. *Nano Lett*, 2019, 19(3): 1719-1727.
- [28] Zhao J, Ye Z, Yang J, et al. Nanocage encapsulation improves antiepileptic efficiency of phenytoin. *Biomaterials*, 2020, 240: 119849.
- [29] Wang Y, Zhang Y, Yu Y, et al. Preparation and preliminary evaluation of hepatitis B core antigen virus like nanoparticles loaded with indocyanine green. *Ann Transl Med*, 2020, 8(24): 1661.

(本文责编 郝丽芳)