

基于金纳米粒-白蛋白融合蛋白递送系统的非药物靶向溶栓策略

鲁津津, 刘 春, 孙思荣, 陈敬华, 高 敏*

(江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 血栓是导致心肌梗塞、脑卒中等心血管疾病的主要因素之一。纤维蛋白溶酶类抗血栓药物虽然已被广泛应用于临床, 但依然受到治疗窗口狭窄、半衰期短、易失活和因非靶向性造成的异常出血等不良反应的限制。因此, 有效地将溶栓物质靶向输送到血栓部位并将不良反应降至最低至关重要。基于人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 在血液中的长循环效果和优异的载药特性, 本研究运用基因工程技术在 HSA 的 N 末端融合一段能靶向血栓部位的功能肽 (P-selectin binding peptide, PBP), 经毕赤酵母表达并纯化得到具有血栓靶向功能的白蛋白融合蛋白。该融合蛋白包载金纳米粒子 (gold nanoparticles, Au NPs) 后能够形成均一稳定的纳米粒 (PBP-HSA@Au), 粒径为 17.7 ± 1.0 nm, zeta 电位为 -11.3 ± 0.2 mV。细胞毒性和溶血实验证明 PBP-HSA@Au 生物相容性好, 血小板靶向实验表明 PBP 的引入赋予了 PBP-HSA@Au 血栓靶向能力, 近红外光 (near infrared ray, NIR) 照射后, PBP-HSA@Au 能将光能快速转化为热能进而破坏纤维蛋白, 表现出优异的溶栓效果。本研究设计的白蛋白融合蛋白递送系统为血栓治疗提供了一种精准、快速、非药物的治疗策略, 该体系设计简单、生物相容性高, 具有较强的临床应用性。研究涉及的所有动物实验均按照江南大学动物实验伦理委员会批准的方案执行[JN.No20230915S0301015(423)]。

关键词: 血栓; 光热治疗; 靶向溶栓; 融合蛋白; 人血清白蛋白; 金纳米粒

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)02-0455-09

Drug-free targeted thrombolytic strategy based on gold nanoparticles-loaded human serum albumin fusion protein delivery system

LU Jin-jin, LIU Chun, SUN Si-rong, CHEN Jing-hua, GAO Min*

(School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Thrombus is a major factor leading to cardiovascular diseases such as myocardial infarction and stroke. Although fibrinolytic anti-thrombotic drugs have been widely used in clinical practice, they are still limited by narrow therapeutic windows, short half-lives, susceptibility to inactivation, and abnormal bleeding caused by non-targeting. Therefore, it is crucial to effectively deliver thrombolytic agents to the site of thrombus with minimal adverse effects. Based on the long blood circulation and excellent drug-loading properties of human serum albumin (HSA), we employed genetic engineering techniques to insert a functional peptide (P-selectin binding peptide, PBP) which can target the thrombus site to the N-terminus of HSA. The fusion protein was expressed using *Pichia pastoris* and purified by Ni-chelating affinity chromatography. After being loaded with gold nanoparticles (Au NPs), the fusion protein formed homogeneous and stable nanoparticles (named as PBP-HSA@Au) with a diameter of 17.7 ± 1.0 nm and a zeta potential of -11.3 ± 0.2 mV. Cytotoxicity and hemolysis tests demonstrated the superb biocompatibility of PBP-HSA@Au. Platelet-targeting experiments confirmed the thrombus-targeting ability conferred by the introduction of PBP into PBP-HSA@Au. Upon near-infrared ray (NIR) irradiation, PBP-HSA@Au rapidly converted light energy into heat, thereby disrupting fibrinogen and exhibiting outstanding thrombolytic

收稿日期: 2023-08-23; 修回日期: 2023-12-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32101072); 江苏省自然科学基金项目 (BK20210473).

*通讯作者 Tel: 86-510-85911900, E-mail: mingao@jiangnan.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0991

efficacy. The designed HSA fusion protein delivery system provides a precise, rapid, and drug-free treatment strategy for thrombus therapy. This system is characterized by its simple design, high biocompatibility, and strong clinical applicability. All animal experiments involved in this study were carried out under the protocols approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Jiangnan University [JN. No20230915S0301015(423)].

Key words: thrombus; photothermal therapy; targeted thrombolysis; fusion protein; human serum albumin; gold nanoparticle

血栓是目前三大心血管疾病(心肌梗死、脑卒中、静脉血栓栓塞症)共同的病理基础,也是全球死亡率的主要来源之一^[1,2]。血栓主要由不溶性纤维蛋白、激活的血小板,以及聚集的白细胞和红细胞等组成的无结构凝块^[3],当其破裂并阻断健康器官的血液供应时会发生致命的心血管疾病。基于血栓的主要成分,现有抗血栓药物可分为抗血小板药、抗凝药和纤溶药三大类,虽然它们在临床上得到了广泛应用,但依然存在治疗窗口狭窄、半衰期短、靶向性差、非正常出血等不良反应^[4-6]。因此,将溶栓物质有效输送到血栓部位并将不良反应降至最低至关重要。血小板在生理条件下维持血管完整,但是在病理条件下参与了血栓形成^[7]。在血栓形成的进程中,P-选择素在活化的血小板和内皮细胞表面快速表达,驱动血小板间和血小板-内皮细胞相互作用的辅助机制,进而促进血栓的形成^[8],因此,P-选择素已被评估为血栓疾病早期诊断及治疗的典型生物标志物^[9,10]。P-选择素的高表达也使其成为靶向受损动脉的极佳候选分子,研究表明谷氨酸-色氨酸-缬氨酸-天冬氨酸-缬氨酸序列(Glu-Trp-Val-Asp-Val, EWVDV)与P-选择素具有极高亲和力和结合特异性^[11,12]。

光热疗法(photothermal therapy, PTT)是一种常用的非侵入性的肿瘤治疗方式,具有良好的精准性和较低的毒副作用,其作为一种新型的血栓治疗方式也引起了人们的广泛关注^[13,14]。由光热转换剂介导的局部热效应可以破坏纤维蛋白之间的非共价连接进而分解血凝块并增强药物的溶栓效果。其中,金纳米粒(gold nanoparticles, Au NPs)具有良好的局域表面等离子体共振特性,较好的生物相容性,不会引起显著的毒性或免疫反应,在药物递送和光热治疗方面应用最广^[15,16]。当近红外光(near infrared ray, NIR)照射到Au NPs上时,Au NPs能够将光能转化为热能,迅速产生局部升温,破坏血栓中的纤维蛋白实现溶栓效果^[15,17]。此外,金纳米粒还具有计算机断层扫描(computed tomography, CT)成像功能^[18],然而,Au NPs本身无法准确靶向和富集到血栓部位,导致成像效果和溶栓效果不理想。这种非靶向和高剂量的Au NPs在施以光照时容易对周围组织和细胞可能带来一定的光毒性,导致正常组织

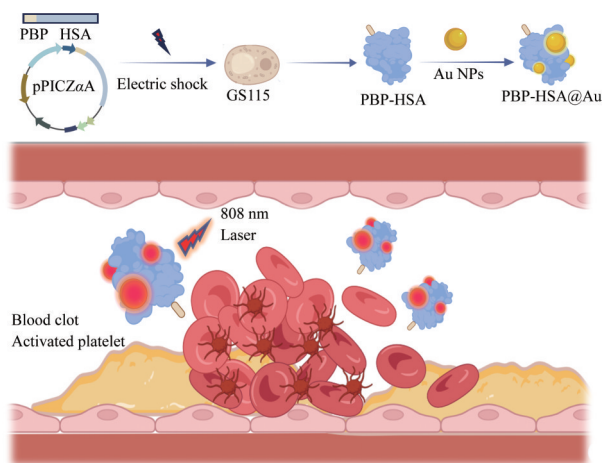
的损伤或其他不良反应。

纳米技术的发展极大地提升了药物或其他活性分子的递送效率和生物利用度。将活性分子包载在精细化设计的纳米载体中能够赋予其靶向性、溶解性、响应释放、富集药物等多种功能。其中,蛋白纳米粒作为纳米载体的研究越来越受到关注,内源性蛋白相比合成的聚合物载体等材料具有更好生物相容性,无抗原性。人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是由585个氨基酸残基组成的蛋白质,是血浆的主要成分也是许多内源因子和外源药物的载体^[19]。HSA在人体血液循环中的半衰期约为20天,稳定性极佳且体内分布广,没有酶学和免疫学活性,具有抗炎、抗氧化、抗凝和抗血小板聚集活性以及胶体渗透作用^[20,21]。此外,白蛋白独特的空间结构能通过物理吸附或者化学键合的方式包载药物,因此是一种理想的运输溶栓物质的生物活性蛋白载体。利用基因工程技术还可以将功能性的肽段与白蛋白基因融合,选择合适的系统表达获得具有多功能的蛋白载体^[22,23]。Albiglutide首次使用白蛋白融合技术制备了成人2型糖尿病治疗药物,并获得了FDA和欧洲药品管理局的批准^[24]。

基于上述研究现状,本研究以人血清白蛋白HSA为核心蛋白,运用基因工程技术将靶向血栓部位的多肽序列(P-selectin binding peptide, PBP)与HSA蛋白序列融合,通过毕赤酵母表达系统(GS115)获得具有血栓靶向能力的融合白蛋白载体(PBP-HSA),通过HSA对金纳米粒(Au NPs)的物理吸附作用将Au NPs包载在PBP-HSA中形成复合物(PBP-HSA@Au)。该递送体系将Au NPs富集在血栓部位,施加808 nm近红外激光辐照后显示出良好的光热溶栓效果(合成路线1)。这种无药物的靶向溶栓策略设计简单、安全性高,具有较强的临床应用性。

材料与方法

药品与试剂 大肠杆菌DH5 α 、JM109及pPICZaA质粒均由本实验室保存;柠檬酸钠(北京颖诺凯胜科技有限公司, KYGJ910);巴斯德毕赤酵母GS115(D0412)、酵母粉(ST969)、质粒小量抽提试剂盒(D0007M)(碧



Scheme 1 The schematic route of Au NPs-loaded HSA fusion protein (PBP-HSA@Au) and its application in targeted thrombolysis. The HSA fusion protein (PBP-HSA) was fabricated using genetic engineering technology, in which PBP was fused at the N-terminal of albumin and expressed by *Pichia Pastoris* strain GS115. After being loaded with Au NPs, the PBP-HSA@Au nanoparticles would undergo targeted accumulation at the site of blood clots and play a role in thrombolytic therapy upon NIR laser irradiation. NPs: Nanoparticles; HAS: Human serum albumin; PBP: P-selectin binding peptide

云天生物技术公司); Zeocin 选择性抗生素 (S24063)、琼脂糖 (S25757) (上海源叶生物科技有限公司); Gelred 核酸染料 (P1902978)、四氯金酸 (HAuCl_4 , 01032322)、甘氨酸 (P2232057)、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, P2273445) (Adamas 公司); 氯化钠 (NaCl , P2534927)、胰蛋白胨 (3604646) (英国 OXOID 有限公司); 无氨基酵母氮源培养物 (YNB, Y8040)、山梨醇 (S8090) (索莱宝生命科学有限公司); 生物素、四氮唑蓝 (MTT, C10769614) (上海生工生物有限公司); 咪唑 (I823673, 上海麦克林生化科技有限公司); GoldBand 5000 DNA Marker (10504ES60)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (20201ES76)、三色预染蛋白质分子量标准 Marker (20350ES) (翌圣生物科技股份有限公司); 胰酶细胞消化液 (21089531, 上海泰坦科技股份有限公司); Dulbecco's Modified Eagle's Medium 培养基 (DMEM, RNBL3626, 美国 Sigma 公司); 其他试剂均为分析纯并购自国药集团化学试剂有限公司。

仪器 超净工作台、 CO_2 细胞培养箱、酶标仪 (Thermo Scientific 公司); 电子天平 [奥豪斯仪器 (常州) 有限公司]; 恒温振荡培养箱 (苏州捷美电子有限公司); 电转仪、PCR 仪、Eppendorf-5804 R 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 红外热成像仪 (美国菲力尔公司); MOS-450 圆二色光谱仪 (法国比奥罗杰有限公司); 超

纯水机 (上海和泰仪器有限公司); 超滤离心浓缩管、切向超滤仪 Lab (美国 Millipore 公司); 蛋白纯化仪 (思拓凡生物科技有限公司, Cytiva); 电泳仪 (伯乐中国公司); zeta 电位及纳米粒度分析仪 (英国马尔文公司); 紫外分光光度计 [岛津 (上海) 实验器材有限公司]。

动物 SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 5~7 周, 体重 110~150 g, 合格证号: NO.202362393, 许可证号: SCXK (苏) 2022-0006; 昆明小鼠, SPF 级, 雌性, 6 周, 体重 30~35 g, 合格证号: NO.202371399, 许可证号: SCXK (苏) 2022-0006。均购自苏州斯贝福生物技术有限公司。本研究的全部动物实验均按照江南大学动物实验伦理委员会批准的方案执行 [JN.No20230915S0301015(423)]。

酵母最适密码子的优化 从 NCBI 数据库中获得人血清白蛋白的基因编码序列 (coding sequence, CDS), 将其与 PBP 序列的基因序列相结合, 利用密码子的简并性, 通过毕赤酵母的密码子偏好性数据进行密码子优化, 选择 Xho I 和 Not I 作为酶切位点, 合成目的基因。

表达菌株 GS115/pPICZαA-PBP-HSA 的构建 将携带表达载体 pPICZαA-PBP-HSA 的大肠杆菌 JM 109 菌株进行质粒抽提, 并将 10 μg 质粒利用 Sal I 酶切线性化并回收, 电转至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中 (1 500 V, 5.5 ms), 通过添加博来霉素的抗性 YPD 平板筛选阳性菌株, 经过菌落 PCR 鉴定重组菌。其中载体的通用引物序列为: AOX1 上游引物 5'-GACTGGTTC CAATTGACAAGC-3', AOX1 下游引物 5'-GGCAAAT GGCATTCTGACAT-3'。PCR 设置条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s 扩增 30 个循环; 补充延伸 72 °C 5 min, 最终产物 4 °C 保存。鉴定成功的菌株命名为 GS115/pPICZαA-PBP-HSA。目的基因与载体 pPICZαA 的构建均经测序验证。

融合蛋白的诱导表达 在超净工作台内挑取单菌落接种于 10 mL YPD 培养基培养 24 h (29 °C, 220 r·min⁻¹, 下同), 用接种环挑取 GS115/pPICZαA-PBP-HSA 的菌液进行平板划线, 调整抗性平板的博来霉素浓度为 50、100、150 μg·mL⁻¹, 进行高拷贝子筛选。最终挑取浓度为 150 μg·mL⁻¹ 抗性平板中的多个单菌落进行蛋白表达验证。将单菌落接种于 10 mL YPD 培养基培养 24 h, 以 1% 的体积分数接种到 20 mL BMGY 培养基中培养至吸光度 $A_{600\text{nm}}$ 至 2~6 L·mol⁻¹·cm⁻¹, 室温离心 (1 500~3 000 ×g; 5 min) 收集菌体, 用 BMMY 培养基重悬菌体后加入 20 mL BMMY 培养基中, 每 24 h 添加 1% (体积分数) 甲醇进行诱导培养 96 h; 随后低温离心 (10 000 r·min⁻¹; 10 min) 收集上清液, 通过 SDS-PAGE 进一步鉴定目的融合蛋白的表达, 筛选高表达蛋白菌株进行后续发酵。离心收集发酵上清液后, 通过切向

超滤仪浓缩上清液用于 AKTA 蛋白纯化系统进一步纯化蛋白。通过 PBP-HSA 融合蛋白的 C 末端的 His 标签与镍柱的亲合作用实现目的蛋白的分离纯化,洗脱过程用含有 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的洗脱液进行 0%~100% 线性洗脱并收集紫外吸收峰处样品,随后用 Millipore 超滤浓缩管对所得纯蛋白进行浓缩置换。

金纳米粒子的合成 用超纯水配制质量分数为 1% 的四氯金酸和质量分数为 1.14% 的柠檬酸钠溶液作为母液,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。先在圆底烧瓶中加入 50 mL 0.01% 的 HAuCl_4 溶液,油浴加热并剧烈搅拌使溶液沸腾,随后迅速加入 1.5 mL 的柠檬酸钠持续搅拌。当观察到溶液由浅黄色变为蓝色最终变为酒红色时停止搅拌,冷却至室温后收集溶液,并通过高速离心 ($13\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min) 收集沉淀,用超纯水洗涤 3 次后,重悬得到合成的 Au NPs 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中避光保存。

融合蛋白 PBP-HSA 的理化表征 将市售 HSA 或表达纯化得到的融合蛋白 PBP-HSA 用 PBS 缓冲液 ($\text{pH } 7.4$) 稀释至 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,采用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 测量其在 PBS 缓冲液中的粒径、zeta 电位。采用圆二色光谱仪对融合蛋白的二级结构进行测定,以确定蛋白活性,融合蛋白水溶液测试浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,波长范围为 $0\sim 250 \text{ nm}$ 。

Au NPs 的理化表征 用超纯水将 Au NPs 按照一定比例稀释,采用 DLS 测量其粒径、zeta 电位。并利用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 对制备的粒子进行形貌观察。

PBP-HSA@Au 的制备及理化表征 于室温下将融合蛋白 PBP-HSA 与 Au NPs 二者混合搅拌 2 h ,离心除去未包载 Au NPs ($13\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min),通过凝胶阻滞及考马斯亮蓝染色观察蛋白-金复合物阻滞情况考察包封情况。采用 DLS 测量其粒径、zeta 电位,紫外分光光度计观察特征峰验证二者的结合。

细胞毒性测定 PBP-HSA 及 PBP-HSA@Au 分别经 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌并稀释至一系列浓度。通过 MTT 法测定蛋白和 Au NPs 对人主动脉血管平滑肌细胞 (HA-VSMC) 及人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的毒性。具体操作步骤为:取生长状态良好的 HA-VSMC 或 HUVEC 细胞,在 96 孔板中以每孔 $8\ 000$ 个细胞的密度接种,待细胞贴壁后,用不同浓度的样品 (0 、 0.2 、 0.5 、 1 、 2 、 $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理细胞 24 h ,PBS 为对照组。 24 h 后,吸去培养液,PBS 清洗细胞 3 遍后,用培养基稀释 MTT 溶液至浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,每孔加入 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 并于培养箱中继续培养 4 h 。最后,吸去培养液,每孔加入 $100 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO,置于摇床上低速振荡 10 min ,用

酶标仪测定 490 nm 处吸光度值,并计算细胞存活率。

溶血实验 从昆明小鼠眼眶采集血液样本于抗凝管中,玻璃棒搅动除去纤维蛋白后,离心 ($1\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 获得红细胞,并用 PBS 洗涤至上清无色,将获得的红细胞用 PBS 稀释 10 倍。PBP-HSA、Au NPs 为实验组,PBS 为阴性对照,去离子水为阳性对照,分别与红细胞稀释液等体积混合。所有组别在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h ,离心 ($1\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min) 获取上清,使用酶标仪在 540 nm 处检测上清液吸光度计算溶血率。

活化血小板靶向实验 从昆明小鼠眼眶采集血液样本与抗凝剂混合,离心 ($200 \times g$, 10 min , 室温) 取上清液,即得富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP),将 PRP 再次离心 ($1\ 200 \times g$, 5 min , 室温) 获得白色沉淀,即为血小板。使用 PBS 重悬血小板,细胞计数仪计数后以每孔 1×10^7 个细胞的密度铺于 96 孔板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 使其贴壁。随后,加入 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 凝血酶 ($1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$),保持 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min ,得到活化的血小板。分别在活化的血小板中加入罗丹明修饰的融合蛋白 PBP-HSA 和未融合 PBS 的人血清白蛋白溶液。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后吸去上清,PBS 洗涤 3 次,利用荧光显微镜观察红色荧光情况,再将孔板中的血小板收集后利用流式细胞仪分析阳性细胞情况。

体外光热效应测定 以 PBS 作为空白对照对测试样品施以 808 nm 近红外激光辐照 10 min ,使用热成像仪监测 PBP-HSA@Au 的温度变化。随后调整近红外激光辐照功率 (1.0 、 2 、 $2.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$),记录温度变化情况。

体外溶栓实验 从昆明小鼠眼眶采集血液样本, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 形成血凝块,PBS 洗涤血凝块至上清无色。随后,将凝块切割成相同体积小凝块并置于多个玻璃瓶中,设置 PBS 为对照,加入等体积 PBP-HSA@Au (2 、 3 、 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 Au NPs (以上述 PBP-HSA@Au 为定量标准,使得每组加入 Au NPs 等量) 与上述凝块孵育,近红外激光辐照 (808 nm , $2.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 20 min) 后取上清液,测定 450 及 540 nm 处吸光度,作为血栓溶解后纤维蛋白及血红蛋白的指标评估溶栓情况。

体内溶栓实验 用异氟烷麻醉 SD 大鼠,解剖分离其左侧颈动脉,再将浸泡过浓度为 10% 的三氯化铁 (FeCl_3) 水溶液的滤纸条包裹住分离的颈动脉 5 min ,随后取下滤纸条,观察动脉血栓造模成功后缝合伤口。通过尾静脉分别给药 PBP-HSA@Au 与 HSA@Au ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 30 min 后利用近红外辐照 (808 nm , $2.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 血栓部位 15 min 进行光热治疗。治疗结束后处死大鼠,剥离颈总动脉制作切片并进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,在显微镜下观察血管堵塞情况。

统计学分析 所有实验至少独立重复3次, 实验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所得数据采用 GraphPad Prism 8.0 进行作图, 采用 *t* 检验进行两组样本组间比较, 以 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

结果与讨论

1 融合蛋白的构建、表达与纯化及理化性质表征

线性化质粒导入毕赤酵母后, 菌落 PCR 的琼脂糖凝胶电泳图 (图 1A) 显示 1~5 号单克隆均在 2 500 bp 左右出现明显条带, 与预期 2 424 bp 一致, 而未处理的毕赤酵母对照组未出现明显条带, 实验结果表明 pPICZ α A-PBP-HSA 成功转入毕赤酵母 GS115 表达菌株中。经甲醇诱导后, 收集发酵培养的上清液进行 SDS-PAGE, 结果显示 1 号及 5 号菌株在 72 kDa 上方出现明显的蛋白条带 (图 1B), 该条带分子量范围与预期的 74 kDa 相符合, 说明 PBP-HSA 融合蛋白在毕赤酵母中完成了胞外分泌表达。根据上述实验结果, 本研究选用 1 号菌株进行后续发酵。收集发酵液经切向超滤仪初步浓缩后进入镍柱纯化, 0.5 mol·L⁻¹ 咪唑洗脱液进行 0~100% 线性洗脱并收集唯一吸收峰处样品 (图 1C), 收集得到的蛋白样品经 SDS-PAGE 分析显示条带单一, 分子量正确 (图 1D)。经计算, PBP-HSA 融合蛋白的摇瓶产量可达 2 g·L⁻¹。上述实验结果表明, PBP-HSA 融合蛋白可由毕赤酵母胞外分泌表达, 表达产物中杂蛋白不多, 结合亲和层析可以获得高纯度 PBP-HSA。圆二色光谱图 (图 1E) 显示 PBP-HSA 融合蛋白

在 208 和 222 nm 出现双负峰, 该峰型是典型的 α 螺旋结构与市售 HSA 具有相同二级结构^[25]。通过纳米粒度仪测得 PBP-HSA 融合蛋白粒径为 6.7 ± 1.8 nm (图 1F), 与 HSA (4.3 ± 1.1 nm) 大小相似。上述实验结果说明, PBP 靶向肽的引入并未造成 HSA 主体的构象改变, PBP-HSA 融合蛋白具有 HSA 类似活性。

2 Au NPs 及 PBP-HSA@Au 的制备与表征

纳米粒度分析仪测得 Au NPs 在超纯水中粒径约为 13.3 ± 0.3 nm, PDI 为 0.161, 粒子分散性较好, TEM 图像显示 Au NPs 呈均匀球形 (图 2A)。蛋白吸附金纳米粒子后会使金纳米粒阻滞在凝胶中, 因此, 本研究采用琼脂糖凝胶电泳评估融合蛋白 PBP-HSA 对 Au NPs 的包载情况以及二者的最适比例。电泳图 (图 2B) 显示, 在 Au NPs 质量不变的情况下, 调整 Au NPs:PBP-HSA 质量比为 1:50 时, 形成的复合物存在明显阻滞效果, 而游离的 Au NPs 未见其阻滞在上样孔中, 结果表明 PBP-HSA 能够稳定吸附 Au NPs, 后续 PBP-HSA@Au 样品均采用 Au NPs:PBP-HSA = 1:50 的最佳比例制备。经离心除去未包载的 Au NPs 后, 对样品进行紫外-可见光吸收峰扫描, 图 2C 的光谱图显示 PBP-HSA@Au 除具有 280 nm 处蛋白特征吸收峰外, 还出现了与游离 Au NPs 相同的 520 nm 处特征峰, 结果证明 PBP-HSA 融合蛋白对 Au NPs 的成功吸附。采用 zeta 电位及纳米粒度仪测量 PBP-HSA@Au 的粒径与尺寸分布及电位变化, 结果显示 PBP-HSA@Au 的粒径约 17.7 ± 1.0 nm (图 2D), 与 PBP-HSA 相比有所增大 (图 2E), 该现象再

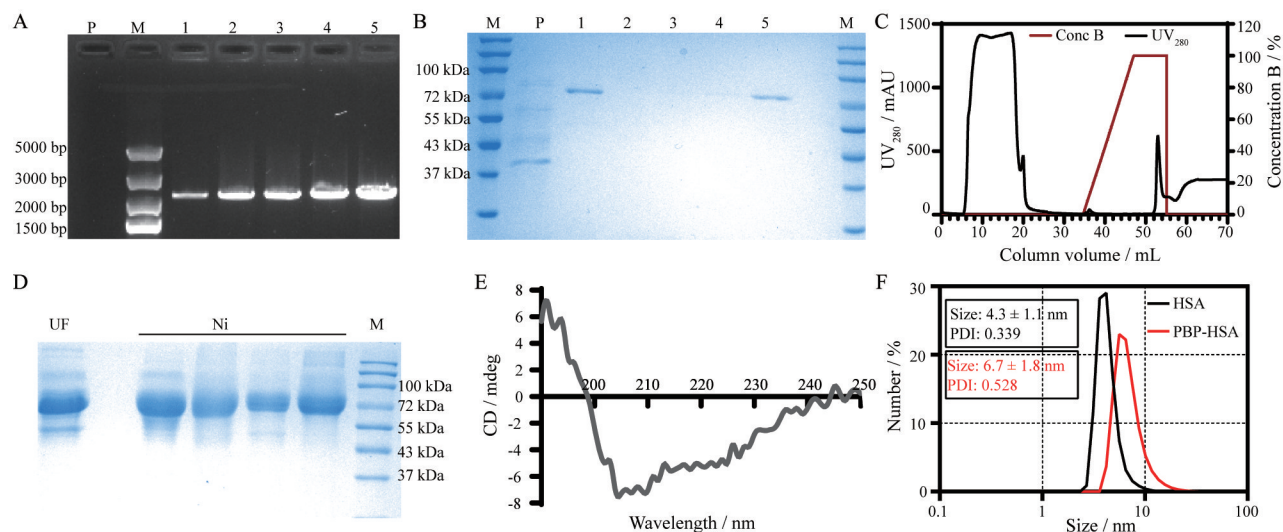


Figure 1 The construction and characterization of PBP-HSA fusion protein. A: The PCR bands of recombinant colonies (P: Plasmid empty vector; M: GoldBand 5000 DNA marker; No. 1-5: Different recombinant colonies); B: Screening of high copy recombinant transformants reflected by SDS-PAGE (P: Plasmid empty vector; M: Protein marker; No. 1-5: Different recombinant colonies); C: Purification of PBP-HSA fusion protein by Ni-NTA; D: SDS-PAGE analysis of PBP-HSA in GS115/pPICZ α A-PBP-HSA (UF: Ultrafiltration sample before purification; Ni: Ni-sepharose purified sample; M: Protein marker); E: The circular dichroism (CD) spectrum of PBP-HSA; F: Hydrodynamic sizes of HSA (black) and PBP-HSA (red) protein in PBS solution. PDI: Polydispersity index

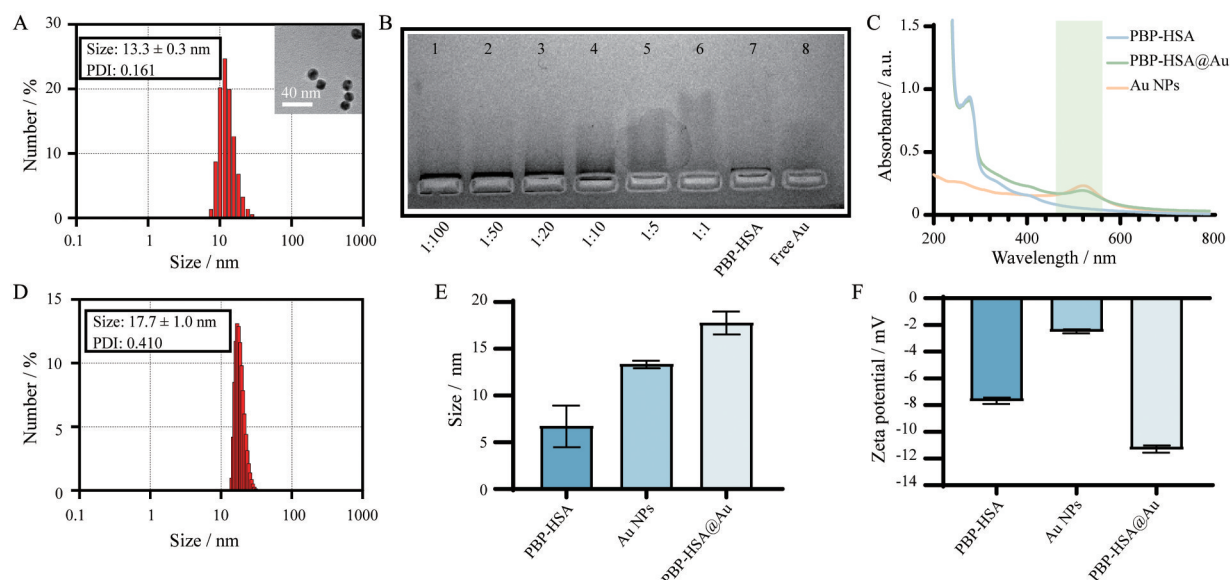


Figure 2 The characterization of PBP-HSA@Au nanoparticles. A: Hydrodynamic size of Au NPs in aqueous solution detected by DLS and the morphology of Au NPs imaged by TEM; B: The combination of PBP-HSA and Au NPs confirmed by agarose gel retardation assay; C: The UV-Vis spectra of PBP-HSA, Au NPs and PBP-HSA@Au nanoparticles; D: Hydrodynamic size of PBP-HSA@Au in PBS solution; E: The comparison of particle sizes among PBP-HSA, Au NPs and PBP-HSA@Au; F: The comparison of zeta potentials among PBP-HSA, Au NPs and PBP-HSA@Au. $n = 3, \bar{x} \pm s$

次说明 PBP-HSA@Au 复合物的成功制备; 由于融合蛋白本身带负电荷, 柠檬酸钠法合成的金纳米粒子也呈负电荷, 二者形成的复合物表明电位下降 (图 2F), 该趋势与理论吻合。

3 生物相容性及血栓靶向性

载体的生物相容性对于溶栓治疗至关重要, 良好的血液相容性意味着载体与血液的相容性高, 不易引发不良反应, 也可以确保递送载体在血液中的稳定性, 使其能够有效地输送活性成分到血栓部位。同样, 载体对血管平滑肌细胞和内皮细胞的毒性也是设计心血管疾病药物递送载体需要考量的重点。本研究采用 MTT 法检测 PBP-HSA@Au 体系对 VSMC 和 HUVEC 细胞活力的影响, 两种细胞与不同浓度 PBP-HSA、PBP-HSA@Au 孵育 24 h 后, 细胞的存活率均大于 80% (图 3A、B)。溶血实验结果显示, 与阴性组相比, PBP-HSA 及 PBP-HSA@Au 的溶血率远低于上限 (5%) (图 3C)。上述实验结果表明 PBP-HSA 的生物相容性较好, HSA 是血液中最丰富的蛋白质之一, 能够在血液循环中维持稳定的浓度, 具有极佳的血液相容性, 本研究的实验现象同样说明了构建的 PBP-HSA 融合蛋白具有与 HSA 相当的生物安全性。

为了考察 PBP 的引入是否可以赋予 HSA 靶向血栓的能力, 本研究使用凝血酶刺激血小板构建了血栓部位活化血小板的模型, 从光学显微镜拍摄的图片可以看出, 凝血酶刺激后的血小板形态发生变化, 体积变

大, 该现象与已有文献报道一致, 证明活化血小板模型的成功构建。PBP 通过与血栓部位活化的血小板特异性结合实现靶向, 从荧光显微镜观察到修饰靶向肽的融合蛋白 PBP-HSA 比未修饰靶向肽的白蛋白 HSA 在活化的血小板中分布更多 (图 3D), 流式细胞术的定量结果也显示, PBP-HSA 组相比 HSA 组有更高的阳性细胞率 (图 3E) 和更强荧光强度 (图 3F), 实验现象证实了 PBP-HSA 的靶向性。

4 体外光热效应

当 Au NPs 的尺寸和形状满足特定条件时会发生表面等离子体共振, 使得 Au NPs 对特定波长的光强吸收, 并将其转化为热能。为了考察 Au NPs 包载在 PBP-HSA 融合蛋白时是否还具有光热转换能力, 利用热成像仪检测了 808 nm 近红外激光辐照下 PBP-HSA@Au 的光热转换效应。实验结果显示, 激光持续照射 10 min 内 PBP-HSA@Au 产生的温度逐渐上升并趋于平缓, 而对照组未见明显上升 (图 4A、B), 随着辐照强度提升, 温度上升越明显 (图 4C), 因此, PBP-HSA@Au 的光热性能表现出明显的时间依赖性, 强度依赖性, 随着功率提升, 升温效果更显著, PBP-HSA 的包覆并未影响 Au NPs 的光热转换能力。为了保证后续实验效果和效率, 本研究选用激光强度为 $2.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 、辐照时间 10 min 进行后续实验。

5 体外溶栓效果

为了评价 PBP-HSA@Au 的溶栓效果, 将等体积血

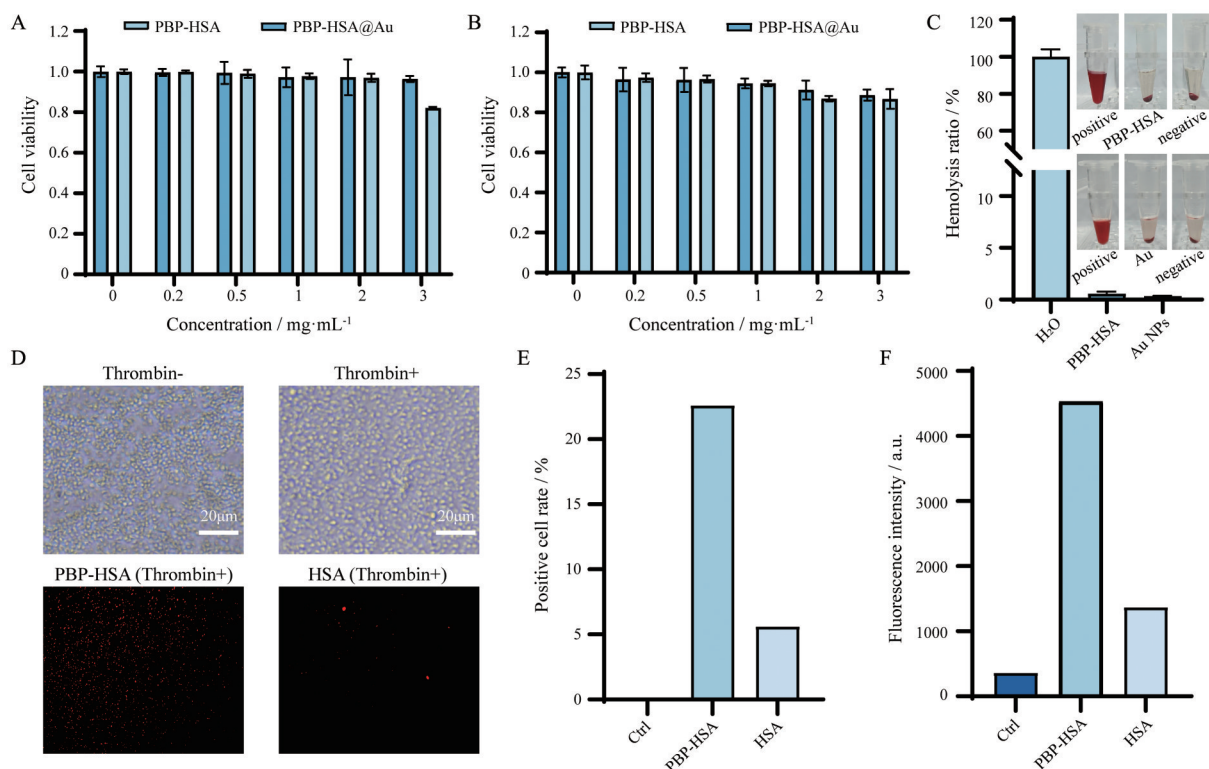


Figure 3 The biocompatibility and platelet-targeting capability of PBP-HSA@Au nanoparticles. A: Relative cell viability of VSMCs cells; B: HUVECs cells incubated with various concentrations of PBP-HSA and PBP-HSA@Au for 24 h; C: Hemolysis ratios of red blood cells (RBCs) with the treatment of PBP-HSA and Au NPs for 4 h; D: The optical images of activated platelets after thrombin treatment (*upper panel*); fluorescent images of rhodamine-labeled protein nanoparticles (PBP-HSA and HSA) accumulated on activated platelets (*lower panel*); E: Positive cell rate; F: fluorescent intensities of activated platelets detected by flow cytometry with the treatment of rhodamine-labeled PBP-HSA and HSA. $n = 3, \bar{x} \pm s$

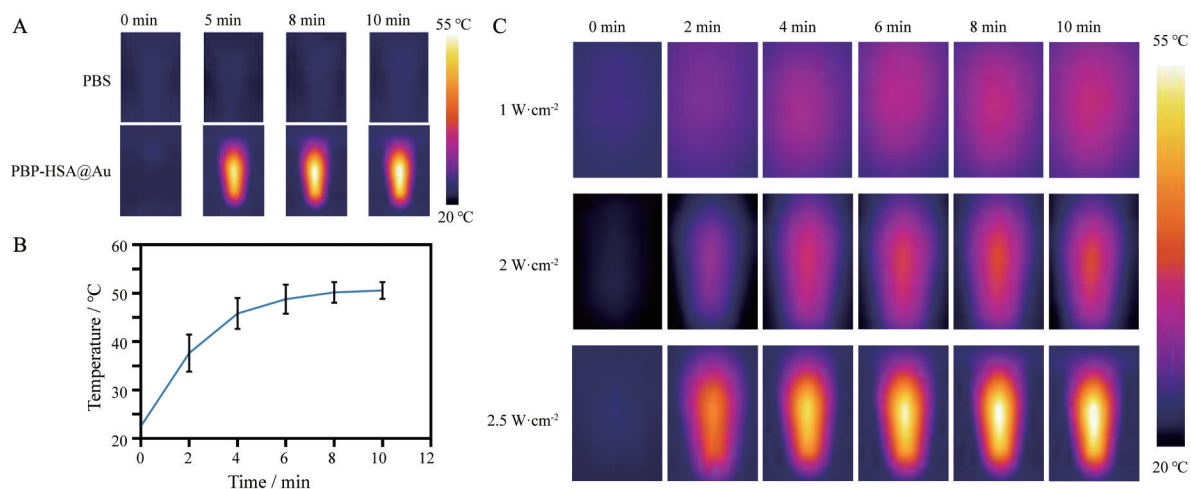


Figure 4 The *in vitro* evaluation of photothermal effect. A: Infrared thermal images of PBS and PBP-HSA@Au nanoparticles; B: Photothermal curve of PBP-HSA@Au nanoparticles irradiated with NIR laser (808 nm, 2.5 W·cm⁻²); C: Infrared thermal images of PBP-HSA@Au under different power intensities (808 nm, 1, 2, 2.5 W·cm⁻²). $n = 3, \bar{x} \pm s$

凝块分别与 2、3、5 mg·mL⁻¹ PBP-HSA@Au 或 Au NPs 共孵育并用近红外激光辐照后, 观察到血凝块迅速崩解, 体积减小, 上清中出现明显浑浊^[26], 图 5A 直观地证明血栓被有效溶解, 并且蛋白与金纳米结合的复合体

系溶栓现象更明显。此外, 使用酶标仪测量上清在 450 及 540 nm 处吸光度值, 与 PBS 组 (0.09 ± 0.01) 相比, 不同浓度下的 PBP-HSA@Au 组溶液中纤维蛋白明显增加 (1.02 ± 0.05、1.37 ± 0.04、1.40 ± 0.04), 相同浓

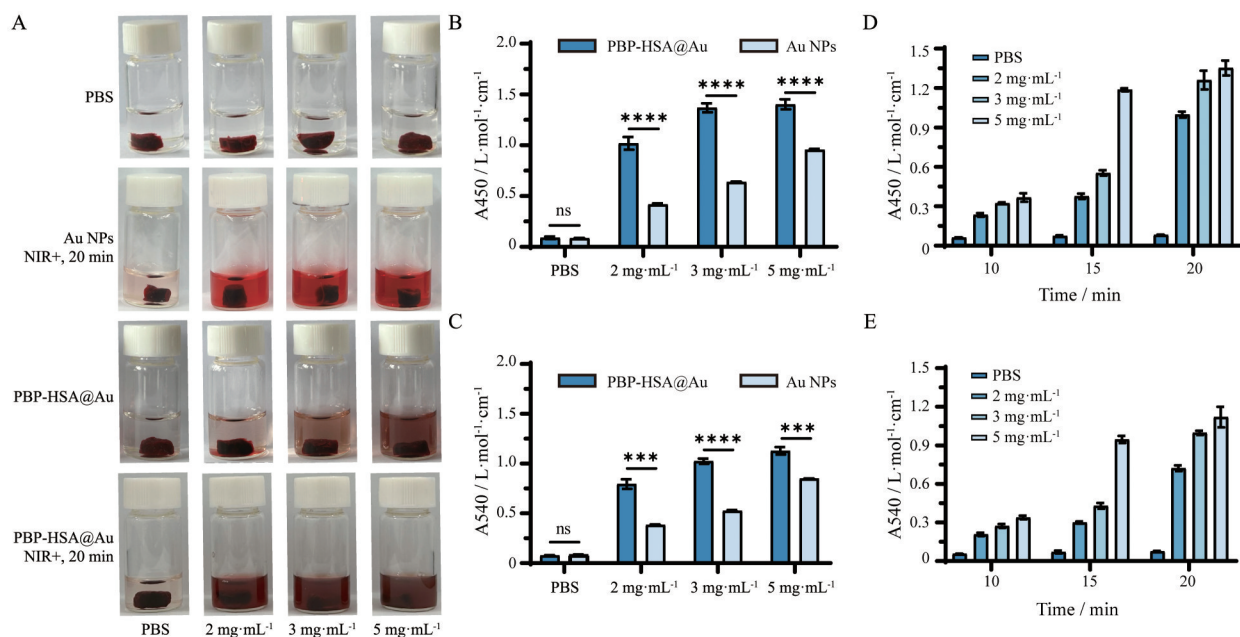


Figure 5 The *in vitro* evaluation of thrombolytic effect. A: Images of established *in vitro* thrombus model and thrombolytic effects of PBP-HSA@Au and Au NPs irradiated with NIR laser (808 nm, 2.5 W·cm⁻²); B: The fibrous protein level assayed by UV-Vis absorptiophotometry after different concentrations of PBP-HSA@Au and Au NPs with laser treatment; C: The hemoglobin level assayed by UV-Vis absorptiophotometry after different concentrations of PBP-HSA@Au and Au NPs with laser treatment; D: The fibrous protein level assayed by UV-Vis absorptiophotometry during different irradiation duration; E: The hemoglobin level assayed by UV-Vis absorptiophotometry during different irradiation duration. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$

度下的 Au NPs 组的纤维蛋白含量比之较少 (0.41 ± 0.01 、 0.64 ± 0.01 、 0.96 ± 0.01) (图 5B); 此外, 血红蛋白含量比 PBS 组 (0.08 ± 0.01) 也明显上升 (0.80 ± 0.04 、 1.02 ± 0.02 、 1.13 ± 0.03), 而相同浓度的 Au NPs 的血红蛋白含量也较低 (0.38 ± 0.01 、 0.53 ± 0.01 、 0.85 ± 0.01) (图 5C), 每组间差异均具有统计学意义, $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PBP-HSA@Au 组纤维蛋白和血红蛋白含量均为最高。通过不同时间点上清吸光度分析, PBP-HSA@Au 的光热溶栓具有明显的时间依赖性和浓度依赖性 (图 5D、E)。体外溶栓实验证明了 PBP-HSA@Au 这种非药物溶栓策略的可行性与有效性。

6 体内溶栓效果

如图 6A 所示, 实验采用 FeCl₃ 成功诱导建立了主动脉血栓模型。动脉组织切片染色图片 (图 6B) 显示正常血管腔内无凝块填充, 造模后血管腔内几乎完全堵塞。非靶向组 HSA-@Au 给药并光照处理后的血管腔内凝块有少许溶解, 而靶向组 PBP-HSA@Au 处理的血管内凝块出现大量塌陷和溶解, 血管通畅程度明显改善。实验结果表明 Au NPs 产生的光热效应可以破坏纤维蛋白网状结构进而消融血栓凝块, 融合靶向肽的白蛋白包载 Au NPs 可以增强其对血栓病灶部位的靶向性, 进而提升溶栓效果。

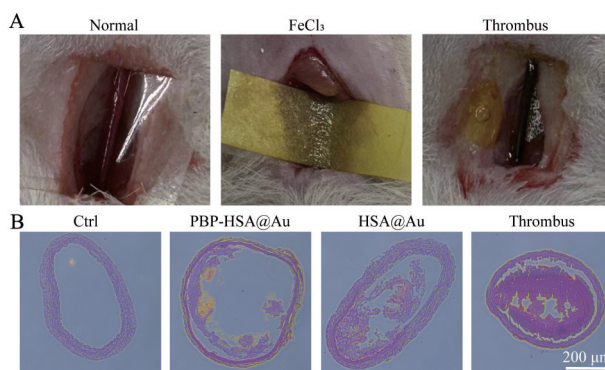


Figure 6 The *in vivo* evaluation of thrombolytic effect. A: Thrombus model in left carotid artery of rats; B: Representative histological analysis of blood vessels after photothermal treatment with HSA@Au and PBP-HSA@Au nanoparticles. Scale bar: 200 μm

结论

本研究通过基因工程技术成功构建了 GS115/pPICZαA-PBP-HSA 表达菌株, 并通过甲醇诱导得到以人血清白蛋白 HSA 为核心主体的能够靶向激活血小板的融合蛋白 PBP-HSA, 发酵表达产量较高, 易于纯化。PBP-HSA 包载 Au NPs 后形成的非药物靶向溶栓复合物 (PBP-HSA@Au) 显示出良好的稳定性, 生物相容性, 优异的光热性能和靶向激活血小板的能力。在

HSA 上引入 PBP 靶向肽形成的融合蛋白载体保留了 HSA 自身优异的生物活性还赋予了递送体系靶向血栓的能力, 该载体与 Au NPs 形成的复合物保留了 Au NPs 自身的光热转换能力, 还能将 Au NPs 富集在血栓部位, 在体内外均展现出显著的溶栓效果。本研究设计的非药物靶向溶栓策略能够减轻现存非靶向溶栓药物治疗造成的出血并发症, 具有一定的临床应用潜力, 能够为新型溶栓疗法的设计提供参考依据和理论基础。

作者贡献: 鲁津津负责实验操作和文章撰写; 刘春和孙思荣参与了部分实验操作; 陈敬华负责实验总体设计; 高敏负责实验总体设计, 经费支持及稿件修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Su M, Dai QX, Chen C, et al. Nano-medicine for thrombosis: a precise diagnosis and treatment strategy [J]. *Nanomicro Lett*, 2020, 12: 96-116.
- [2] Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the american heart association [J]. *Circulation*, 2022, 145: e153-e639.
- [3] Zhao ZQ, Zhang XB, Zhang HY, et al. Elaborately engineering a self-indicating dual-drug nanoassembly for site-specific photo-thermal-potentiated thrombus penetration and thrombolysis [J]. *Adv Sci*, 2022, 9: 2104264.
- [4] Mackman N, Bergmeier W, Stouffer GA, et al. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 333-352.
- [5] Tang MQ, Hu CJ. Progresses and analysis in fibrinolytic drugs induced hemorrhage [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1521-1527.
- [6] Zhou SY, Zhao WB, Hu JL, et al. Application of nanotechnology in thrombus therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 12: e2202578.
- [7] Wang SL, Wang RF, Meng NN, et al. Engineered platelets-based drug delivery platform for targeted thrombolysis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 2000-2013.
- [8] Yan HY, Mi XY, Midgley AC, et al. Targeted repair of vascular injury by adipose-derived stem cells modified with P-selectin binding peptide [J]. *Adv Sci*, 2020, 7: 1903516.
- [9] Perkins LA, Anderson CJ, Novelli EM. Targeting P-selectin adhesion molecule in molecular imaging: P-selectin expression as a valuable imaging biomarker of inflammation in cardiovascular disease [J]. *J Nucl Med*, 2019, 60: 1691-1697.
- [10] Panicker SR, Mehta-D'souza P, Zhang N, et al. Circulating soluble P-selectin must dimerize to promote inflammation and coagulation in mice [J]. *Blood*, 2017, 130: 181-191.
- [11] Appeldoorn CCM, Molenaar TJM, Bonnefoy A, et al. Rational optimization of a short human P-selectin-binding peptide leads to nanomolar affinity antagonists [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 10201-10207.
- [12] Modery CL, Ravikumar M, Wong TL, et al. Heteromultivalent liposomal nanoconstructs for enhanced targeting and shear-stable binding to active platelets for site-selective vascular drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 9504-9514.
- [13] Refaat A, del Rosal B, Bongcaron V, et al. Activated platelet-targeted IR780 immunoliposomes for photothermal thrombolysis [J]. *Adv Funct Mater*, 2023, 33: 2209019.
- [14] Yao YH, Ran GL, Hou CL, et al. Nonaromatic organonickel(II) phototheranostics [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 7346-7356.
- [15] Dong LN, Liu X, Wang T, et al. Localized light-Au-hyperthermia treatment for precise, rapid, and drug-free blood clot lysis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 1951-1956.
- [16] Park S, Kim H, Lim SC, et al. Gold nanocluster-loaded hybrid albumin nanoparticles with fluorescence-based optical visualization and photothermal conversion for tumor detection/ablation [J]. *J Control Release*, 2019, 304: 7-18.
- [17] Chang LH, Chuang EY, Cheng TM, et al. Thrombus-specific theranostic nanocomposite for codelivery of thrombolytic drug, algae-derived anticoagulant and NIR fluorescent contrast agent [J]. *Acta Biomater*, 2021, 134: 686-701.
- [18] Wang ZM, Chen LN, Chu ZY, et al. Gemcitabine-loaded gold nanospheres mediated by albumin for enhanced anti-tumor activity combining with CT imaging [J]. *Biomater Adv*, 2018, 89: 106-118.
- [19] Fanali G, di Masi A, Trezza V, et al. Human serum albumin: from bench to bedside [J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33: 209-290.
- [20] di Masi A, Trezza V, Leboffe L, et al. Human plasma lipocalins and serum albumin: plasma alternative carriers? [J]. *J Control Release*, 2016, 228: 191-205.
- [21] Zoellner H, Siddiqui S, Kelly E, et al. The anti-apoptotic activity of albumin for endothelium is inhibited by advanced glycation end products restricting intramolecular movement [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2009, 14: 575-586.
- [22] Tao HY, Wang RQ, Sheng WJ, et al. The development of human serum albumin-based drugs and relevant fusion proteins for cancer therapy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 187: 24-34.
- [23] Shen YT, Wang MY, Wang H, et al. Multifunctional human serum albumin fusion protein as a docetaxel nanocarrier for chemo-photothermal synergetic therapy of ovarian cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14: 19907-19917.
- [24] Rendell MS. Albiglutide for the management of type 2 diabetes [J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2018, 13: 1-8.
- [25] Wang MY, Zhang L, Cai YF, et al. Bioengineered human serum albumin fusion protein as target/enzyme/pH three-stage propulsive drug vehicle for tumor therapy [J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 17405-17418.
- [26] Wang XL, Wei CC, Liu MK, et al. Near-infrared triggered release of uPA from nanospheres for localized hyperthermia-enhanced thrombolysis [J]. *Adv Funct Mater*, 2017, 27: 1701824.