

CD44 靶向透明质酸-二硫键-香叶醇偶联物抗前列腺癌研究

李先明 1 肖龙椅 1 林子健 1 李柏鑫 1 赵韞琦 2 俞涵 2

1 温州市第二外国语学校 325000 2 温州肯恩大学 325000

[摘 要]为培养科技创新后备人才，温州市科协、市教育局组织实施了科技“青苗计划”，让高中生跟着高校导师做科研。本项目由温州肯恩大学赵韞琦教授指导，主要基于前列腺癌细胞特异性靶向，研发前列腺癌微环境响应纳米递药系统，减少药物毒副作用，对提高前列腺癌患者治疗适应性、阻断癌细胞转移途径、提升五年生存率等，具有重要的现实和研究意义。本实验在不同浓度处理下偶联药物实现了抑制细胞生长的能力，为进一步抗癌活性研究提供支持。

[关键词]青苗计划；CD44；偶联物；前列腺癌；治疗

[中图分类号] G641 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1647-9325 (2023)-0054-13 **[收稿日期]** 2023-05-11

1.实验缘起

随着人口老龄化、饮食结构和环境因素的改变，前列腺癌发病率呈逐年上升趋势，成为增长最快的恶性肿瘤之一^[1]。开发新型药物和技术治疗，无论对于国家、社会、家庭还是患者来说，都是一件迫在眉睫的事情。靶向治疗是目前肿瘤治疗研究领域的重要方向，其高度特异性干预方式被认为是提高肿

瘤治疗效果和减少肿瘤化疗不良反应的重要途径。本项目基于前列腺癌细胞特异性靶向，研发前列腺癌微环境响应纳米递药系统（图 1），减少药物毒副作用，对提高前列腺癌患者治疗适应性、阻断癌细胞转移途径、提升五年生存率等，具有重要的现实和研究意义。

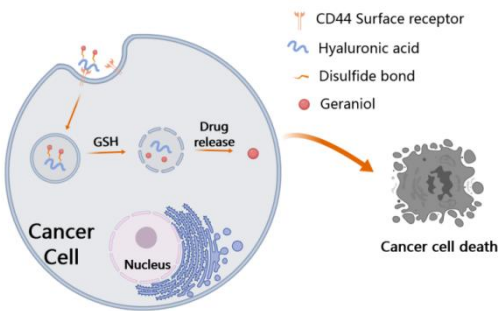


图 1. 前列腺癌肿瘤微环境 GSH 响应靶向释药机制

1.1 透明质酸对 CD44 阳性癌细胞靶向
透明质酸是一种天然多糖，广泛分布于

人体的一种水溶性、生物可降解聚合物。由于其优异的生物安全性、生物降解性和非免

疫原性等特性，其已被广泛应用于递药系统的研究中^[2]。CD44 是 HA 的细胞表面受体之一，是存在于细胞表面的一种糖蛋白，广泛参与多种细胞功能，包括细胞增殖，细胞分化，癌细胞的转移等，也是用于区分正常细胞和癌细胞的生物标记物之一^[3]。研究表明 CD44 在前列腺癌细胞的增殖，迁移和入侵等方面发挥作用^[4]。前列腺癌细胞表面 CD44 的表达水平证实与上皮间质转化和转移程度相关，能够用于预测癌症治疗效果，帮助做出前列腺癌个性化临床治疗决策^[5]。使用 HA 作为载体，可以实现化疗药物对 CD44 阳性前列腺癌细胞进行特异性靶向。

1.2 肿瘤微环境响应药物释放

肿瘤微环境是肿瘤发生发展，耐药，抗药的关键。如何避免肿瘤微环境的对药物运送的影响或者利用肿瘤微环境的特点实现药物的定点释放也是肿瘤治疗的关键问题。肿瘤通常具有与正常组织不同的独特结构和微

环境，例如：高水平的谷胱甘肽（Glutathione, GSH）是肿瘤微环境（Tumor microenvironment, TME）的特殊特征之一^[6]。谷胱甘肽是抗氧化系统中最主要的抗氧化剂，可以清除肿瘤环境中高表达活性氧，以免氧化应激造成的 DNA,蛋白质,和脂质损伤而触发的细胞死亡^[7]。作为肿瘤环境中处于高表达的抗氧化剂，二硫键（Disulfide bond）可以通过硫醇-二硫化物交换反应在肿瘤中迅速分裂^[8]。该特性也被引入药物偶联设计，用于新型递药系统应对癌症的研究。

本研究假设透明质酸-二硫键-香叶醇偶联物可以通过透明质酸递送香叶醇至 CD44 高表达的前列腺癌中，通过高表达的谷胱甘肽逐渐释放和积累香叶醇分子而提高抗癌作用。我们将应用人源前列腺癌 PC-3 的细胞体外模型，研究该偶联药物的抗前列腺癌作用效果和机制。

2.实验步骤

2.1 细胞培养（PC-3 人源前列腺癌细胞） 培养箱条件：37° C，5% CO₂

2.1.1 从培养瓶中取出并丢弃用过的细胞培养基。

2.1.2 使用平衡盐溶液（PBS）洗涤细胞（每个 25T 培养瓶约 4 mL）。

2.1.3. 从培养皿中取出并丢弃洗涤液。

2.1.4. 将 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 添加到培养瓶的一侧（25T 培养瓶 1 ml）。

轻轻摇动容器以完全覆盖细胞层。

2.1.5. 将培养容器在 37 ° C 下孵育大约 3-4 分钟（PC-3 细胞系）。

2.1.6.按 1:1 的比例加入预热的培养基，轻轻吹打至细胞悬浮。 转移至 15ml 离心管中。

2.1.7.离心机离心（1000 转，3 分钟）

2.1.8. 去除并弃去上清液。 加入 1 ml 培养基重悬。

2.1.9. 以所需的传代比例将所需体积的细胞移入新培养瓶中。加入培养基(25T: 4-5 ml), 轻轻上下左右来回摇晃约八次, 使细胞分布均匀

例如 1: 4 传 : 1ml 中取 250 ul 在 4-5 ml 培养基中

2.2 铺板+细胞毒性实验

2.2.1 上述操作第八步中的重悬细胞液部分用于铺板, 铺 96 孔板 5000 cells/ well 90 ul/ well

2.2.2 按照传代示例中的步骤进行步骤 6 (假设此时细胞悬液体积为 4 ml)

2.2.3 取出 10ul 细胞悬液+10ul 台盼蓝溶液

2.2.4 使用 Countess 机器计算密度 (假设这次是 $8.5 \times 10^5/\text{ml}$)

2.2.5 按照传代示例步骤 8 中的步骤操作 (1 ml 培养基重悬)。

2.2.4- 取出铺板所需的量。 (如果你需要的总体积是 10ml, 你需要取出 163ul)

$$C1v1=C2V2 \quad 8.5 \times 10^5 \text{cells/ml} \times 4 \text{ml} / 1 \text{ml} \times x / 10 \text{ml} = 5000 \text{cells} / 0.09 \text{ml} \quad X = 163 \text{ul}$$

2.2.5 在 96 孔板中根据试验设计每孔加入 90ul 细胞悬液

2.2.6 过夜等细胞贴壁

2.2.7 加药处理 48h

2.2.8 每孔加入 10 ul CCK-8 Buffer, 孵育 3 小时。注: CCK-8 孵育条件与细胞培养条件相同。

2.2.9 用酶标仪在 450 nm 和 650 nm 处测量 OD 值。试剂盒: ~~增强型细胞计数试剂盒 8 (WST-8/CCK8) (Elabscience)~~

2.2.10 用 GraphPad Prism 8.0.1 软件分析 IC₅₀ 半抑制浓度

3.数据分析

细胞毒性实验 HA-SS-GERANIOL 浓度设置: 5、2、1、0.1、0.01 mg/ml

HA-SS-GERANIOL Concentration(mg/ml)	Log C	OD Value Mean(450nm)	OD Value Mean(650nm)	OD Value Mean(450nm-650nm)
5.00	0.6990	0.1737	0.0505	0.1232
2.00	0.3010	0.1654	0.0444	0.1210
1.00	0.0000	0.1974	0.0459	0.1515
0.10	-1.0000	1.4064	0.0594	1.3470

0.01	-2.0000	1.9119	0.0587	1.8532
------	---------	--------	--------	--------

标准化数据后 HA-SS-Geraniol 浓度-反应曲线变化，经 GraphPad Prism 8.0.1 软件分析 IC₅₀ 半抑制浓度为 0.1677 mg/ml

因 HA-SS-Geraniol 的载药量为 11.5%，所以该偶联药物发挥半抑制浓度实际药效为 0.019 mg/ml。

4. 实验结论

该结果表明在不同浓度处理下该偶联药物实现了抑制细胞生长的能力，为进一步抗癌活性研究提供支持。

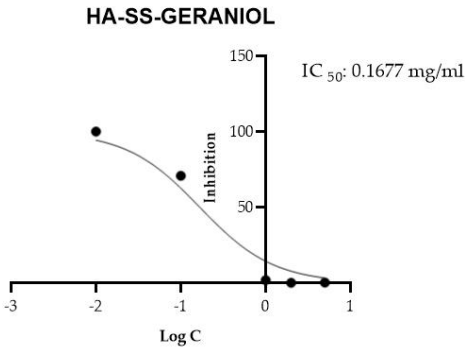
参考文献：

1. Xia, C., Dong, X., Li, H., Cao, M., Sun, D., He, S., Yang, F., Yan, X., Zhang, S., Li, N., & Chen, W. (2022). Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chinese medical journal*, 135(5), 584–590.

2. Mohammed, M., Devnarain, N., Elhassan, E., & Govender, T. (2022). Exploring the applications of hyaluronic acid-based nanoparticles for diagnosis and treatment of bacterial infections. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 14(4), e1799.

3. Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44: More than a mere stem cell marker. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 81(Pt A), 166–173.

4. Li, W., Qian, L., Lin, J., Huang, G., Hao, N., Wei, X., Wang, W., & Liang, J. (2017).



CD44 regulates prostate cancer proliferation, invasion and migration via PDK1 and PFKFB4. *Oncotarget*, 8(39), 65143–65151.

5. Korski, K., Malicka-Durczak, A., & Bręborowicz, J. (2014). Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, 65(4), 291–295.

6. Wang, C. Y., Yamada, H., Morton, K. C., Zukowski, K., Lee, M. S., & King, C. M. (1988). Induction of repair synthesis of DNA in mammary and urinary bladder epithelial cells by N-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines. *Cancer research*, 48(15), 4227–4232.

7. Niu, B., Liao, K., Zhou, Y., Wen, T., Quan, G., Pan, X., & Wu, C. (2021).

Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. *Biomaterials*, 277, 121110.

Redox-sensitive carrier-free nanoparticles self-assembled by disulfide-linked paclitaxel-tetramethylpyrazine conjugate for combination cancer

8. Zou, L., Liu, X., Li, J., Li, W., Zhang, L., Fu, C., Zhang, J., & Gu, Z. (2021).

chemotherapy. *Theranostics*, 11(9), 4171–4186.

CD44 targeting hyaluracid-disulfide bond-geranyiol conjugate against prostate cancer

Li Xianming 1 Xiao Long chair 1 Lin Zijian 1 Li Baixin 1 Zhao Yunqi 2 Yu Han 2

(Wenzhou Second Foreign Language School 325000 2 Wenzhou Ken En University 325000)

Abstract: In order to cultivate the reserve talents of scientific and technological innovation, the Wenzhou Association for Science and Technology and the Municipal Education Bureau of Wenzhou organized the implementation of the science and technology "green seedling Plan", allowing high school students to do scientific research with their college tutors. This project by Wenzhou Ken university professor Zhao Yun qi guidance, mainly based on prostate cancer cell specific targeting, research and development of prostate cancer microenvironment response nano drug system, reduce drug side effects, to improve the adaptability of treatment in patients with prostate cancer, blocking cancer metastasis, improve survival rate, five years, has important reality and research significance. This experiment achieved the ability to inhibit cell growth at different concentrations of treatment, providing support for further anticancer activity studies.

Key words: green seedling plan; CD44; conjugate; prostate cancer; treatment