



Angiopep-2修饰的细菌外囊泡载药系统治疗胶质母细胞瘤效果研究

孙波, 吕宗强, 罗宁, 李荣, 王洪祥, 陈菊祥

Effect of Angiopep-2-functionalized bacterial extracellular vesicles system on glioblastoma

SUN Bo, LYU Zongqiang, LUO Ning, LI Rong, WANG Hongxiang, CHEN Juxiang

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202506017>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

脑胶质瘤微流控芯片模型的构建及中药半枝莲药效评价应用研究

Construction of glioma microfluidic chip model and its application research on evaluation the medicinal efficacy of the Chinese medicine *Scutellaria barbata*

药学实践与服务. 2025, 43(2): 59–66 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202409034

M2型巨噬细胞外泌体喷剂对压力性损伤的疗效及作用机制

Therapeutic effects and mechanisms of M2 macrophage exosome spray on pressure injuries

药学实践与服务. 2025, 43(9): 436–442 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202503066

社区药学门诊服务对2型糖尿病患者的管理效果分析

Analysis of the management effect of community pharmacy outpatient service on patients with type 2 diabetes mellitus

药学实践与服务. 2025, 43(7): 357–361 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202407002

虾青素通过激活Nrf2/HO-1通路抑制瓣膜间质细胞钙化

The inhibition effect of astaxanthin on calcification of aortic valve interstitial cells by activating the Nrf2/HO-1 pathway

药学实践与服务. 2025, 43(6): 283–287 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202412057

高血压对大鼠心血管纤维化及sFRP2表达的影响

Effect of hypertension on cardiovascular fibrosis and sFRP2 expression in rats

药学实践与服务. 2025, 43(4): 180–184 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202409055

Keap1-Nrf2通路在炎症疾病中的研究进展

Research progresses on Keap1-Nrf2 pathway in inflammatory diseases

药学实践与服务. 2025, 43(3): 97–108, 116 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202405013



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

Angiopep-2 修饰的细菌外囊泡载药系统治疗胶质母细胞瘤效果研究

孙 波^{1,2}, 吕宗强^{1,3}, 罗 宁¹, 李 荣¹, 王洪祥¹, 陈菊祥¹ (1. 海军军医大学第一附属医院神经外科, 上海 200433; 2. 中国人民解放军中部战区总医院神经外科, 湖北 武汉 430070; 3. 联勤保障部队第九〇一医院神经外科, 安徽 合肥 230031)

[摘要] 目的 为克服胶质母细胞瘤(GBM)化疗中面临的血脑屏障(BBB)穿透障碍及全身毒性问题, 构建 Angiopep-2 肽修饰的细菌外囊泡(BEVs)负载多柔比星(Dox)的靶向递送系统(Ang-BEVs@Dox), 旨在提升药物对脑肿瘤的靶向性并降低其毒副作用。方法 采用超高速离心法提取大肠杆菌来源的 BEVs, 并将靶向 LRP-1 受体的 Angiopep-2 肽修饰至 BEVs 表面, 构建靶向载体(Ang-BEVs)。利用低频超声法将 Dox 载入 Ang-BEVs, 形成 Ang-BEVs@Dox。通过透射电镜和动态光散射表征载体形态与粒径等理化性质; 通过细胞摄取实验、三维肿瘤球模型及原位荷瘤小鼠模型评估该系统的跨 BBB 递送能力、体外/体内抗肿瘤效果及生物安全性。结果 ①载体表征与体外效果: Ang-BEVs@Dox 粒径约为 100 nm, 负载 Dox 后结构保持稳定。其可显著增强 U87MG 细胞的摄取效率, 并在三维肿瘤球中实现深度渗透。细胞毒性实验表明, Ang-BEVs@Dox 中 BEVs 与 Dox 具有协同抗肿瘤作用。②体内靶向性与抗肿瘤效果: 在原位荷瘤小鼠模型中, Ang-BEVs@Dox 能有效穿透 BBB 并显著抑制肿瘤生长, 将 GBM 荷瘤小鼠的中位生存期延长至 33.5 d(空白对照组为 23.5 d, $P < 0.001$)。免疫组化分析显示其显著抑制肿瘤细胞增殖标志物 Ki-67 表达, 并增强凋亡标志物 TUNEL 信号。③生物安全性: Ang-BEVs@Dox 治疗组小鼠的主要器官未观察到明显病理损伤, 表明其具有良好的生物安全性。结论 成功构建的 Ang-BEVs@Dox 靶向递药系统, 能够有效克服 BBB, 协同发挥 BEVs 与 Dox 的抗肿瘤作用, 显著提升药物在 GBM 部位的富集和治疗效果, 为克服 GBM 的治疗瓶颈提供了一种创新性解决方案。

[关键词] 胶质母细胞瘤; 血脑屏障; 细菌外囊泡; Angiopep-2 肽; 多柔比星

[文章编号] 2097-2024(2025)10-0481-10

[DOI] [10.12206/j.issn.2097-2024.202506017](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202506017)

Effect of Angiopep-2-functionalized bacterial extracellular vesicles system on glioblastoma

SUN Bo^{1,2}, LYU Zongqiang^{1,3}, LUO Ning¹, LI Rong¹, WANG Hongxiang¹, CHEN Juxiang¹ (1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Neurosurgery, General Hospital of Central Theater Command, PLA, Wuhan 430070, China; 3. Department of Neurosurgery, No. 901 Hospital of The Joint Service Support Force, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective** To construct a targeted drug delivery system, Ang-BEVs@Dox, based on Angiopep-2 peptide-modified bacterial extracellular vesicles (BEVs) loaded with doxorubicin (Dox), overcome the challenges of blood-brain barrier (BBB) penetration and systemic toxicity in chemotherapy for glioblastoma (GBM), enhance drug targeting to brain tumors and reduce its toxic side effects. **Methods** BEVs derived from *Escherichia coli* were isolated using ultracentrifugation. The targeting ligand Angiopep-2, specific for the LRP-1 receptor, was conjugated onto the surface of BEVs to construct the targeted carrier (Ang-BEVs). Dox was loaded into Ang-BEVs using low-frequency sonication to form Ang-BEVs@Dox. The physicochemical properties (morphology and size) of the carriers were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). The BBB-penetrating capability, *in vitro/in vivo* anti-tumor efficacy, and biosafety of the system were evaluated using cellular uptake assays, 3D tumor spheroid models, and orthotopic tumor-bearing mouse models. **Results** ① Carrier characterization and *in vitro* efficacy: Ang-BEVs@Dox exhibited a particle size of approximately 100 nm and maintained structural stability after Dox loading. It significantly enhanced cellular uptake efficiency in U87MG cells and achieved deep penetration within 3D tumor spheroids. Cytotoxicity assays demonstrated synergistic anti-tumor effects between the BEVs and Dox in the Ang-

[基金项目] 国家自然科学基金(82272715、82272904); 上海市科学技术委员会科研计划项目(19JC1415000)

[作者简介] 孙 波, 博士研究生, 研究方向: 脑靶向药物递送, Email: symbol0426@smmu.edu.cn

[通信作者] 陈菊祥, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 胶质瘤治疗、脑靶向药物递送、颅脑创伤, Tel: (021)31873288, Email: juxiangchen@smmu.edu.cn

BEVs@Dox系统。② *In vivo* targeting and anti-tumor efficacy: In orthotopic tumor-bearing mouse models, Ang-BEVs@Dox effectively penetrated the BBB and significantly inhibited tumor growth, extending the median survival time of tumor-bearing mice to 33.5 days (compared to 23.5 days in the blank control group, $P<0.001$)。Immunohistochemical analysis revealed significant suppression of the tumor cell proliferation marker Ki-67 and enhancement of the apoptosis marker TUNEL staining signals。③ Biosafety: Major organs from mice in the Ang-BEVs@Dox treatment group showed no observable pathological damage, indicating good biosafety。Conclusion This study successfully constructed an Angiopep-2 peptide-modified engineered BEVs delivery system (Ang-BEVs@Dox)。Through Angiopep-2-mediated BBB penetration and tumor targeting, it significantly enhanced the accumulation and therapeutic efficacy of BEVs at the GBM site。This method combined efficient delivery, low systemic toxicity, and clinical translation potential, which provided an innovative solution to overcome the therapeutic bottleneck in GBM treatment。

【Key words】 glioblastoma; blood brain barrier; bacterial extracellular vesicles; Angiopep-2; Dox

胶质母细胞瘤(GBM)是中枢神经系统中最具侵袭性和致命性的肿瘤之一,预后极差,5年生存率仅5%^[1]。临床常规的治疗手段是最大范围的切除肿瘤组织,术后辅助替莫唑胺化疗以及放疗。这些治疗方式虽在一定程度上控制肿瘤,但面对血脑屏障(BBB)、肿瘤耐药性、免疫微环境抑制等难题,神经外科医生与肿瘤学家仍在探索更有效的解决方案^[2-3]。因此,迫切需要研发出能够穿透 BBB、有效递送药物的治疗方式。

多柔比星(Dox)是一种效力强大的蒽环类化疗药物,被广泛应用于肿瘤治疗。它主要通过插入DNA双螺旋结构、抑制拓扑异构酶Ⅱ的活性以及产生活性氧,在快速增殖的癌细胞中诱导DNA损伤和细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用^[4]。虽然 Dox 对多种恶性肿瘤(如乳腺癌、白血病和淋巴瘤)具有良好疗效,但由于 BBB 的穿透能力较差,以及剂量依赖性的全身毒性(尤其是心脏毒性和骨髓抑制),其在脑肿瘤中的临床应用受到限制^[5]。

细胞外囊泡(EVs)是细胞之间通讯的重要工具,具有天然的纳米级尺寸、良好的生物相容性和低免疫原性等优势,是一种良好的药物递送平台^[6]。而细菌外囊泡(BEVs)是细菌分泌的天然囊泡,已经被证明是细菌和宿主之间传递通讯信号的

通信介质,具有独特的性质和功能^[7]。与哺乳动物来源的 EVs 相比, BEVs 具有来源广泛、易于工程化改造、可以大规模生产等优点,在中枢神经系统疾病以及 GBM 的治疗应用中具有巨大潜力^[8]。此外, BEVs 中还具有许多免疫刺激因子,能抑制改变肿瘤的微环境并抑制肿瘤细胞的生长^[4]。*E. coli Nissle 1917*(ECN)是一种肠道益生菌,不携带致病因子,其分泌的 BEVs 常被应用于药物递送的载体^[9-10]。

Angiopep-2 肽是一种能与 BBB 和 GBM 上高表达的低密度脂蛋白受体相关蛋白-1(LRP-1)相结合的多肽,常用于药物递送载体的修饰^[11]。本研究基于 ECN 分泌的 BEVs,开发了一种 Angiopep-2 肽修饰、负载 Dox 的药物递送平台(图 1)。该平台利用 BEVs 表面的 Angiopep-2 肽与 BBB 及 GBM 细胞膜表面高表达的 LRP-1 结合,从而介导药物载体穿透 BBB 并靶向肿瘤,实现对 GBM 的有效治疗。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验耗材: BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: P0010)、DAPI 细胞核染料(批号: G1407)、细胞膜红色荧光探针(DiL)(批号: C1036)、细胞膜远红外探针 DiD(批号: C1039)[碧云天生物(上海)]; Cy5-NHs

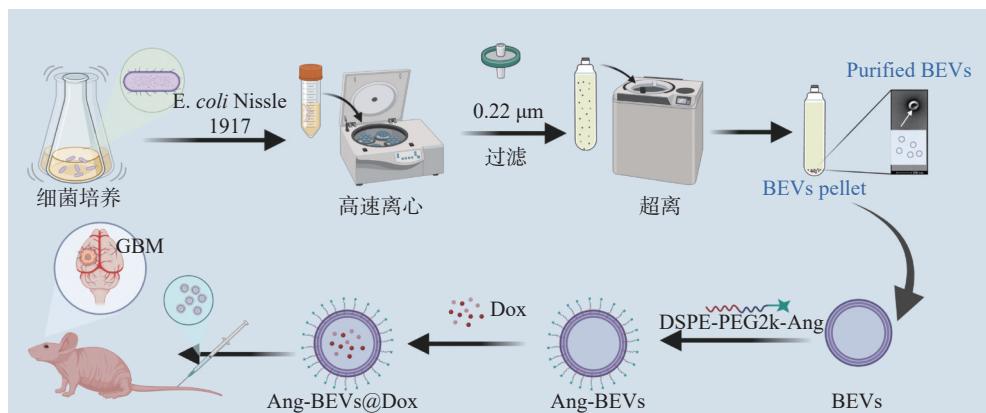


图 1 Ang-BEVs@Dox 治疗 GBM 示意图

(批号: MB12193)、细胞膜荧光探针 DiR(批号: MB12482)[美仑生物(大连)]; DMEM 生长培养基(批号: 11995)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)(批号: T1320)和磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS, pH 7.2)(批号: 1020)[索莱宝生命科学(北京)]; 胎牛血清(FBS)(批号: A5256701)、1% 青霉素-链霉素(批号: 15140122)[Gibco 公司(美国)]; Dox(批号: 41701I)、D-荧光素钾盐(批号: 15547C)[探索平台(上海)]; Annexin V-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒(批号: 40311ES20)[翌圣生物(上海)]; LB 培养基(批号: O.A507002)[生工生物(上海)]; DSPE-PEG2k-Angiopep-2(Ang, TFFYGGSRGKRNNFKT EEYC)[强耀生物(上海)]; 针式过滤器(批号: SLGPR33RS)、超滤管(批号: UFC9100)[Millipore 公司(美国)]。

实验仪器: 超高速低温离心机(型号: CP80NX, HITACHI 公司); 透射电镜(TEM)(型号: Tecnai Spirit, FEI 公司); 动态光散射(DLS)(型号: Nano ZS90Zetasizer, Malvern 公司); 多功能酶标仪(型号: Cytation5, BioTek 公司); 激光共聚焦显微镜(型号: FV3000, Olympus 公司); 流式细胞仪(型号: CytoFLEX, Beckman 公司)。

细胞与实验动物: U87MG(批号: CL-0238)、U87MG-Luc(批号: CL-0935)和 bEnd.3(批号: CL-0598)细胞购自普诺赛生命科技有限公司(武汉), 并在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37°C、5% CO₂ 条件下培养。4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠由卡文斯生物(常州)提供。所有涉及动物的实验均按照海军军医大学第一附属医院伦理委员会评估并批准的指南进行。

1.2 Ang-BEVs@Dox 的构建

1.2.1 BEVs 的提取和表征

以大肠杆菌 *E. coli* Nissle 1917 为母菌株。将活化后的菌株接种于 LB 液体培养基(10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl), 在 37°C、220 r/min 条件下进行两阶段扩增培养(初级培养 12 h 后以 1% 接种量转接二级培养 12 h)。收集菌液后, 首先通过 5 000×g 离心 10 min 去除菌体。上清液经 0.22 μm 针式过滤器预过滤后, 使用超滤管浓缩 10 倍。浓缩的液体通过超速离心(150 000×g, 4°C, 2 h)富集 BEVs 沉淀。沉淀用预冷 PBS 重悬后, 再次超离洗涤纯化, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 分装后保存于-80°C 冰箱备用。

1.2.2 BEVs 的表征和标记

提取的 BEVs 用 TEM 电镜检测。将 BEVs 滴

加到铜网格上, 并用 1% 醋酸铀染液在 4°C 下负染。通过 DLS 测量 Zeta 电位和平均粒径。按照生产商说明书的要求使用 DiL、DiR 以及 Cy5 对 BEVs 进行标记。纯化的 BEVs 与荧光染料在 37°C、避光条件下孵育 30 min, 超速离心(150 000×g, 4°C, 2 h)去除游离的染料, PBS 洗 1 次。

1.2.3 BEVs 的修饰

将 100 μg 的 DSPE-PEG2k-Angiopep-2 混于 1 ml BEVs 溶液(1 mg/ml), 吹打混匀后 37°C 孵育 4 h, 通过超滤管离心去除未结合配体, 制得 Angiopep-2 修饰的 BEVs(Ang-BEVs)。对照组 BEVs 采用相同的工艺以避免实验操作造成的影响。

1.2.4 药物装载及定量

基于文献 [12] 报道的超声载药法, 将 1 ml 的 Ang-BEVs(1×10¹¹/ml)与 1 mg Dox 混匀, 在 37°C 条件下预孵育 30 min, 采用脉冲式超声处理(100 W 功率, 30 s 超声/10 s 间歇占空比, 4°C 冰浴控温)进行 6 次循环加载, 每循环间冰浴静置 2 min 以维持囊泡稳定性。随后经 37°C 再孵育 30 min 完成膜结构恢复, 通过超高速离心(参数同前)去除未包封 Dox, 最终获得 Ang-BEVs@Dox。未修饰 BEVs 对照组采用相同流程制备。载药 BEVs 经纯化后, 采用 1% Triton X-100/DMSO 混合溶液重悬并孵育过夜以裂解囊泡膜释放药物, Dox 的载药量通过多功能酶标仪进行定量(Ex/Em=480/590 nm)。

1.3 细胞靶向、毒性实验

1.3.1 细胞摄取实验

首先将灭菌处理的圆形盖玻片预置于 12 孔板(100 μl PBS 预润湿), 接种对数生长期 U87MG GBM 细胞或 bEnd.3 小鼠脑血脑内皮细胞(5×10⁴/孔)培养过夜贴壁。待细胞融合度达 80% 时, 分别与等剂量(5 μg/ml)的 DiL 荧光标记 BEVs、Ang-BEVs、Ang-BEVs@Dox 共孵育 4 h。移除培养基后经预冷 PBS 轻柔洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min(4°C 避光)。采用 DAPI 进行核复染。通过共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)同步采集 DiL 红色荧光(Ex/Em=549/565 nm)与 DAPI 蓝色荧光信号, 对比不同组 BEVs 在肿瘤细胞内的荧光强度及分布特征, 评估其靶向摄取效率。

1.3.2 三维肿瘤球实验

在 48 孔的超低吸附培养板中, 每个孔接种 200 个 U87MG 细胞, 每 3 d 换液一次, 约 3 周后肿瘤球直径约为 500 μm。更换含有等量 Cy5 标记的 BEVs、Ang-BEVs、Ang-BEVs@Dox 共同培养

6 h。使用 PBS 洗涤 3 次后转移到共聚焦小皿中。使用 CLSM 从球的底部到中部, 间隔 40 μm 进行 z 轴层扫描检测 Cy5 荧光信号的强度。

1.3.3 细胞毒性实验

将处于对数生长期的 U87MG 细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 12 孔板, 放置于孵箱中继续培养 24 h。对照组为 PBS, 给药组分别为 Free Dox 组、BEVs 组、BEVs@Dox 组、Ang-BEVs@Dox 组, 临用前用 DMEM 培养基将 Dox 的浓度稀释到 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每组 3 个复孔。24 h 后收集细胞培养液, 以及胰酶消化后的细胞悬液, 离心 (500 $\times g$, 4°C, 5 min), 再用 PBS 洗涤 2 次, 收集细胞沉淀。按凋亡试剂盒的方法, 先加入 100 μl 1×Binding Buffer 重悬细胞, 然后加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 和 10 μl 的 7-AAD, 轻轻吹打混匀。避光条件下, 室温反应 15 min, 再加入 400 μl 1×Binding Buffer, 轻轻吹打混匀, 置于冰盒中, 1 h 内完成流式检测。

1.4 体内靶向分布、药效学验证及安全性分析

1.4.1 GBM 原位异种移植模型

BALB/c 裸鼠, 雌性, 4~6 周龄, 体质量 18~22 g, 小鼠在 12 h 光暗周期、20°C~24°C 以及 45%~65% 相对湿度的条件下饲养。通过立体定向注射方法利用 U87-Luc 细胞构建 GBM 原位异种移植模型 (PDX 模型) (2×10^5 个细胞重悬于 8 μl PBS 中)。注射细胞的位置为前囟点前方 1 mm、从头骨中线向侧面偏移 1.5 mm 处, 注射深度为 2.5 mm (先插入 3.0 mm, 再缓慢退出 0.5 mm), 注射完成后间歇 5 min 拔出针头。1 周后, 腹腔注射 D-荧光素钾盐 (15 mg/ml, 150 mg/kg), 异氟烷麻醉后通过生物发光成像系统评估 GBM 的生长状况。

1.4.2 体内分布实验

GBM 建模 10 d 后, 将构建的模型随机分为 3 组 ($n=3$), 分别为: DiR 标记的 BEVs 组、Ang-BEVs 组、Ang-BEVs@Dox 组。各组通过尾静脉注射 200 μl 等量 DiR 标记 BEVs。在注射后在第 2、4、6、8、12、24 h, 异氟烷麻醉, 使用荧光成像系统捕捉 DiR 荧光图像, 评估 BEVs 在脑部的分布情况。24 h 后, 收集小鼠的器官 (包括脑、心脏、肺、肝脏、脾脏和肾脏), 并利用相同的方法对 BEVs 分布进行体外荧光成像及荧光定量分析。

1.4.3 药效学验证

将造模成功的小鼠, 随机分为 5 组 ($n=9$, 6 只做生存分析和药效学评价, 3 只做组织切片), 分别设置 PBS 对照组、Free Dox 组、BEVs@Dox 组以及 Ang-BEVs 组、Ang-BEVs@Dox 组。从第 10 天

开始, 按照等效 5 mg/kg 的 Dox 剂量, 采用尾静脉注射的方式进行给药, 每 3 d 给药一次, 共给药 4 次。在整个治疗过程中, 定期使用小动物活体成像仪, 检测荧光发光情况, 以此反映肿瘤的生长或抑制情况。在第 22 天, 给药终止, 每组随机选择 3 只老鼠取脑和各重要器官进行组织病理学分析。最后记录各组小鼠存活时间, 绘制生存分析曲线。

1.4.4 H&E 染色

收集的脑、心、肺、肝、脾和肾, 使用 4% 的多聚甲醛固定 24 h 后, 石蜡包埋并制成 4 μm 厚的切片, 进行 H&E 染色后, 使用显微镜进行观察。

1.4.5 免疫荧光染色

石蜡包埋的脑组织, 4 μm 厚的脑切片贴附在载玻片上。在脱蜡与水化步骤中, 通过梯度酒精和蒸馏水处理来除去石蜡, 使样本重新水化。接着, 样本在高温缓冲液中进行抗原修复, 以揭示抗原位点。为减少非特异性结合, 切片用 3% BSA 封闭液处理 30 min。随后样本加入抗体孵育: ① LRP-1 免疫荧光染色: 加入针对 LRP-1 的特异性一抗 (anti-LRP-1, rab, 塞维尔); ② Ki67 免疫荧光染色: 加入针对 Ki67 的特异性一抗 (anti-Ki67 抗体, rab, 塞维尔)。加入抗体后, 4°C 孵育过夜, 并用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 以去除未结合的一抗。加入对应的二抗 (FITC 标记山羊抗兔 IgG, 塞维尔)。使用 DAPI 复染细胞核, 抗荧光淬灭封片剂封片, 然后在荧光显微镜下观察染色结果。

1.4.6 TUNEL 染色

石蜡切片按流程脱水后, 脑组织区滴加 1:9 稀释的蛋白酶 K 工作液, 37°C 温育 20 min, PBS 震荡清洗 3 次 (5 min/次)。使用 0.1% Triton X-100 覆盖组织, 室温处理 20 min, 同法 PBS 清洗。甩去残留液滴加平衡缓冲液, 室温静置 10 min。按 1:5:50 比例现配 TDT 酶混合液, 置于湿盒中在 37°C 条件下反应 1 h (保持湿度)。PBS 清洗后 DAPI 避光复染, 同前清洗 3 次。抗淬灭封片剂封固, 在荧光显微镜下观察。

1.5 统计学处理

对多组数据进行统计分析, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 随后进行 corresponding Tukey's multiple comparisons 比较多组数据之间的差异。所有数据均以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。为评估组间生存差异, 采用 log-rank 检验比较 Kaplan-Meier 生存曲线。统计学显著性标准设定为: $P < 0.05$, 即差异有统计学意义。

2 结果

2.1 材料的表征

本研究采用超速离心法提取 BEVs: 首先以 $5\,000\times g$ 离心去除菌液中的细菌及残骸, 菌液过滤后在 $150\,000\times g$ 下离心收集沉淀的 BEVs。

DSPE-PEG2k-Angiopep-2 由磷脂 DSPE(1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、聚乙二醇(PEG2k)和 Angiopep-2 多肽通过共价连接而成。DSPE 作为亲脂性磷脂可嵌入 BEVs 膜表面; PEG2k 常用作生物材料连接臂, 在本结构中连接 DSPE 与 Angiopep-2。这种磷脂-聚乙二醇-多肽复合物是修饰 EVs 或脂质体表面功能多肽的常用策略。本研究通过将 DSPE-PEG2k-Angiopep-2 与 BEVs 共孵

育, 将其修饰至 BEVs 表面, 构建了穿透 BBB 并靶向 GBM 的药物载体。最后, 采用超声法将 Dox 装载入 BEVs 中。

如图 2A 所示, TEM 观察结果显示, 提取的 BEVs 具有典型的囊泡状结构(可见清晰的双层膜)。Angiopep-2 修饰及 Dox 负载后, 其形貌结构未发生明显改变。SDS-PAGE 分析显示(图 2B), 提取的 BEVs 蛋白图谱与 ECN 菌株基本一致。DLS 分析显示 BEVs、Ang-BEVs 及 Ang-BEVs@Dox 均呈现良好的单分散性, 粒径分布均匀, 平均粒径约为 100 nm (图 2C), 与 TEM 观测结果基本一致, 且 Zeta 电位未发生显著变化(图 2D), 表明工程化 BEVs 在 Angiopep-2 多肽修饰及 Dox 负载过程中能够保持稳定。

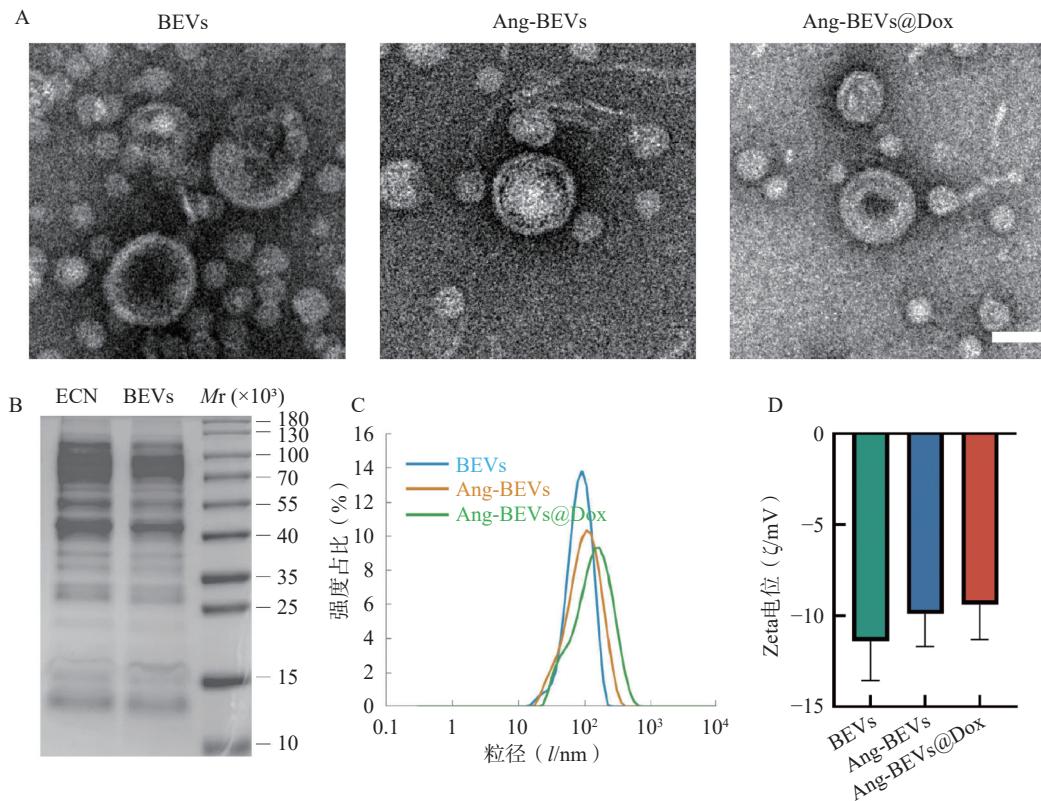


图 2 Ang-BEVs@Dox 的表征

A. 不同组 BEVs 的电镜图像(标尺=100 nm); B. BEVs 与 ECN 裂解产物 SDS 凝胶电泳蛋白图谱; C. DLS 检测粒径分布; D. Zeta 电位变化

2.2 细胞摄取与体外抗肿瘤效果

细胞摄取是增强药物生物活性的关键环节。为评估靶向修饰对摄取效率的影响, 将 DiL 标记的 BEVs、Ang-BEVs 及 Ang-BEVs@Dox 分别与 U87MG 细胞共孵育, 并通过 CLSM 观察。如图 3A 所示, Ang-BEVs 和 Ang-BEVs@Dox 组均展现出比未修饰 BEVs 组更强的 DiL 荧光信号, 表明 Angiopep-2 多肽修饰显著提升了 BEVs 被 GBM 细胞摄取的效率。该效应主要归因于 Angiopep-2

肽特异性靶向 GBM 细胞和 BBB 内皮细胞表面高表达的 LRP-1 受体, 通过受体介导的内吞作用实现高效靶向递送, 为后续的细胞毒性及体内抗肿瘤效应奠定了细胞学基础^[11]。

2.2.1 肿瘤球穿透能力评估

采用 U87MG 细胞构建的 GBM 三维肿瘤球模型(该模型能有效模拟肿瘤微环境的关键特征^[13]), 评估 Ang-BEVs@Dox 的穿透能力。在共聚焦显微镜 Z 轴扫描至 $240\text{ }\mu\text{m}$ 深度时, 未修饰 BEVs 组荧

光信号微弱且主要局限于肿瘤球外周,未能有效渗透(图3B)。相比之下,Ang-BEVs 和 Ang-BEVs@Dox 处理组则显示出显著的荧光信号向肿瘤球内部渗透,进一步证实了 Ang-BEVs 体系的靶向穿透能力。

2.2.2 体外抗肿瘤活性

流式细胞术检测细胞毒性结果显示(图3C),Ang-BEVs@Dox 展现出比游离 Dox、BEVs 及 Ang-BEVs 更强的抗肿瘤活性。值得注意的是,未

修饰的 BEVs 也表现出一定的细胞毒性,这可能与其携带的细菌源性生物活性成分(如 RNA、蛋白质)有关。Ang-BEVs 的细胞毒性则显著高于 BEVs。该增强的细胞毒性效应主要源于 Angiopoep-2 修饰大幅提升的细胞摄取效率,使得更多 BEVs 载体及其装载的 Dox 能够高效递送至肿瘤细胞内,发挥双重抗肿瘤作用。此外,BEVs 载体可能通过保护 Dox 免受降解并改善其胞内释放行为,进一步协同增强抗肿瘤活性^[14]。

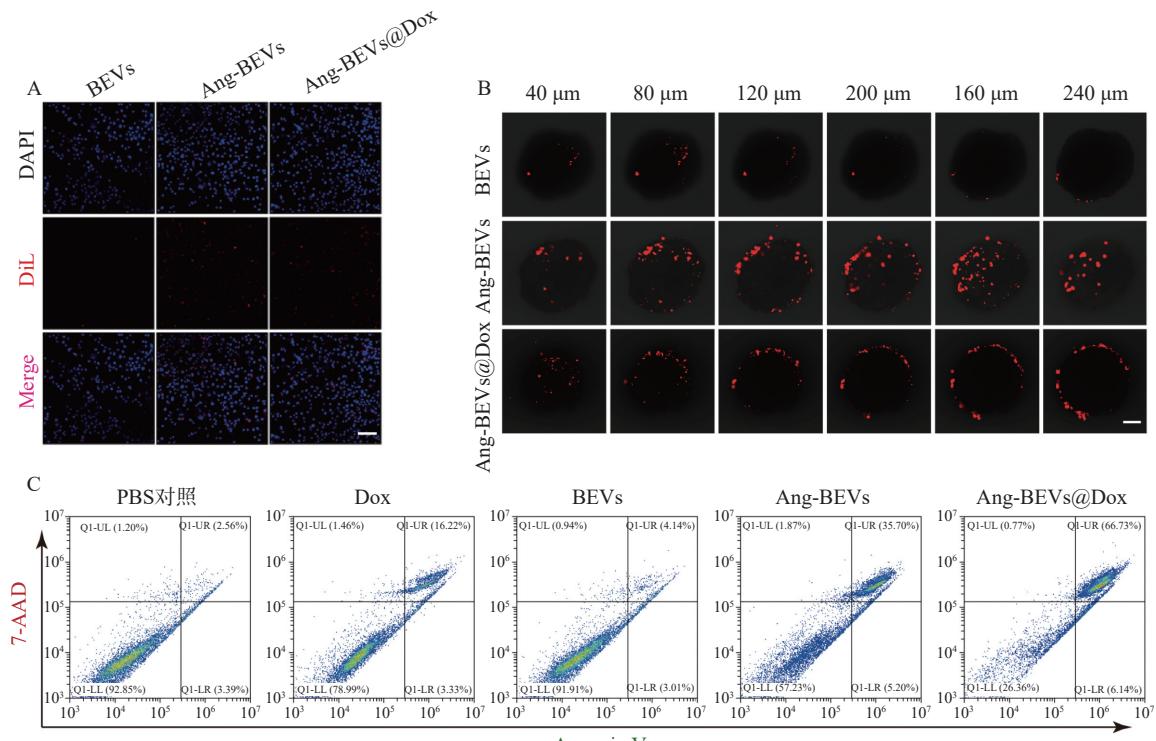


图3 Ang-BEVs@Dox 的细胞学实验

A. U87MG 细胞摄取 BEVs 的 CLSM 图(标尺=100 μm);B. 三维肿瘤球渗透实验(标尺=100 μm);C. 流式检测 Ang-BEVs@Dox 细胞毒性
注:Annexin-V(膜联蛋白-V),能与凋亡早期细胞的胞膜结合;7-AAD 是一种核酸染料,可穿透晚期凋亡细胞或者坏死细胞并与之内的
DNA 结合;晚期凋亡细胞和坏死细胞可同时被 Annexin V-FITC 和 7-AAD 结合染色呈现双阳性。

2.3 体内的分布

为进一步评估 Ang-BEVs 穿越 BBB 并靶向 GBM 组织的能力,利用 U87MG-Luc 细胞系构建了 GBM 原位异种移植模型(PDX 模型)。造模 1 周后,经腹腔注射 D-荧光素钾盐溶液,观察到小鼠脑部出现明显的荧光信号(图4B),表明 PDX 模型构建成功。随后,取一只造模成功小鼠的脑组织切片并进行 LRP-1 免疫荧光切片染色,结果显示肿瘤组织区域的荧光信号强度高于周围脑组织(图4A),与研究报道的结果一致^[15]。

进一步通过尾静脉注射亲脂性膜染料 DiR 标记的不同 BEVs 制剂(BEVs、Ang-BEVs、Ang-BEVs@Dox)。DiR 是一种近红外染料(Ex/Em=745/780 nm),与其他膜染料(如 DiL、DiD、DiO)相

比,能够更好地穿透组织,并反映 BEVs 在体内的分布情况。给药后,使用小动物活体成像系统监测各组小鼠脑部的荧光信号强度随着时间的变化。结果显示(图4B),Ang-BEVs 和 Ang-BEVs@Dox 组在脑部的荧光信号随着时间的推移明显增加,并在 12 h 后达到峰值,相较于未修饰的 BEVs 组有显著富集。

为全面评估 BEVs 在体内的生物分布,对小鼠的脑组织及主要器官进行了离体成像分析。结果表明,Ang-BEVs 组在荷瘤小鼠脑部显示出更强的荧光信号(图4C)。荧光定量结果显示,小鼠脑部 Ang-BEVs 和 Ang-BEVs@Dox 组与 BEVs 组之间存在显著差异($P<0.01$),而在各主要器官组织中的荧光信号定量无统计学差异(图4D, $P>0.05$)。

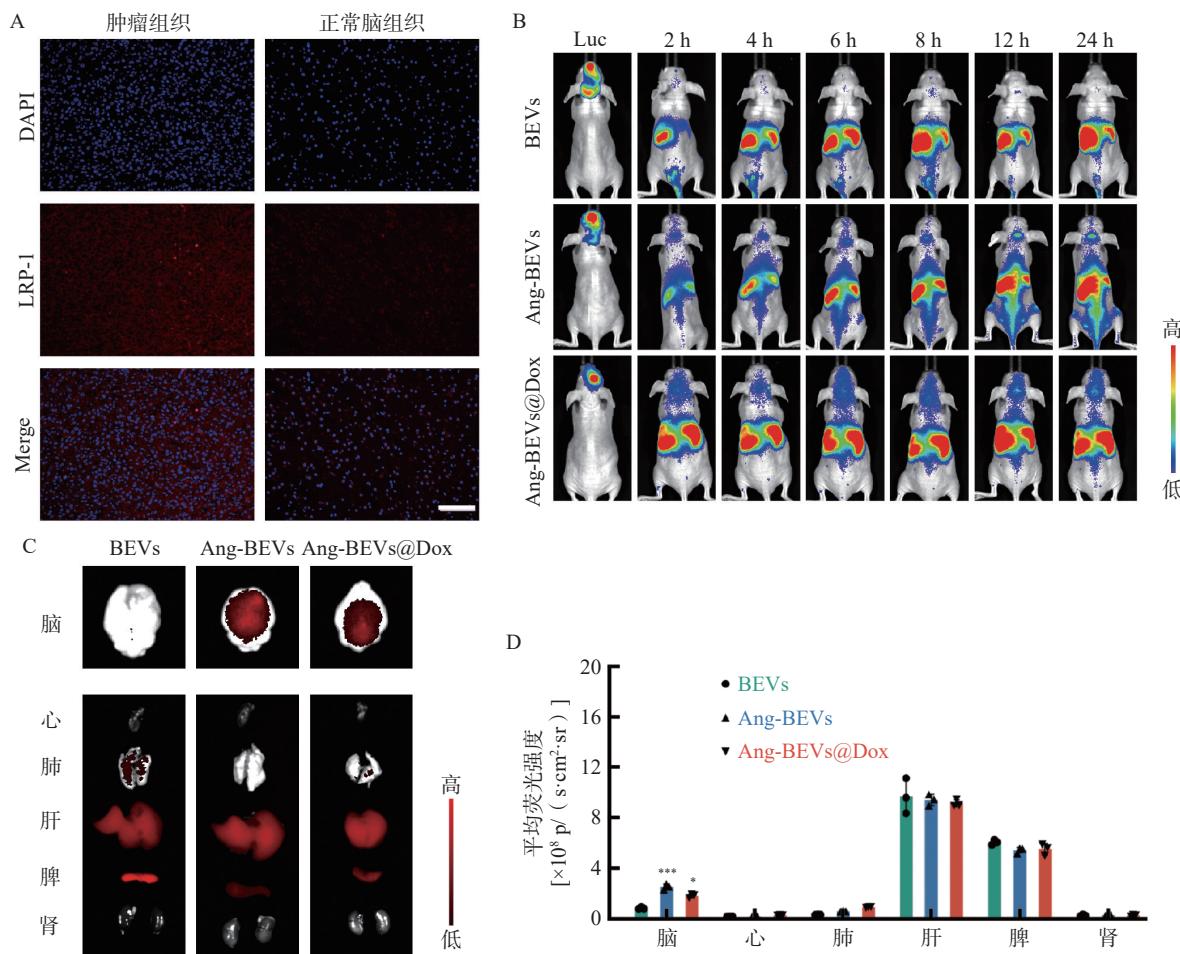


图4 Ang-BEVs@Dox的体内靶向

A. 原位PDX小鼠脑切片中的LRP-1免疫荧光(标尺=100 μm);B. 不同时间点DiR标记的BEVs脑部的荧光信号变化(Luc, 荧光素钾盐腹腔注射后荧光成像, $n=3$);C. 各器官组织的离体荧光成像($n=3$);D. 各器官荧光定量分析($n=3$)

$^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, 与BEVs组比较。

注: $\text{p}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr})$ 为信号强度单位, 表示每秒每平方厘米每球面度光子数, 用于定量表征特定区域、特定方向上探测到的荧光信号强度, 数值越高代表荧光信号越强。

2.4 药效学验证

为系统评估Ang-BEVs@Dox对GBM的治疗效果, 本研究采用PDX小鼠模型进行系列实验。通过活体成像系统定时监测小鼠脑部荧光变化, 动态反应肿瘤生长状况(图5A)。PDX模型构建后第10天, 将荷瘤小鼠随机分为5组($n=9$): PBS对照组、游离多柔比星(Free Dox)组、BEVs组、Ang-BEVs组以及Ang-BEVs@Dox组(除BEVs组外, 均给予等量Dox, 5 mg/kg), 经尾静脉每3 d给药一次, 共给药4次。

活体成像结果显示, Ang-BEVs@Dox组和Ang-BEVs组相较于PBS组、Free Dox组以及BEVs组, 显著抑制了肿瘤增殖(图5A、5B)。这一结果表明, 单纯的Dox以及未经修饰的BEVs难以有效穿透BBB。生存分析显示(图5C), Ang-BEVs@Dox组和Ang-BEVs组的中位生存期分别达到33.5 d

和28.5 d, 显著优于PBS组(23.5 d)、Free Dox组(24.0 d)及BEVs组(25.5 d)(图5C, $P<0.001$)。这突显了经Angiopep-2修饰的BEVs负载Dox后, 在靶向抑制肿瘤生长方面具有协同增强优势。

治疗结束后, 每组随机选取3只小鼠进行组织切片和染色。病理学分析进一步验证了Ang-BEVs@Dox的治疗优势(图6)。H&E染色示, Ang-BEVs@Dox组的肿瘤面积相较于PBS组、Free Dox组、BEVs组、Ang-BEVs组及Ang-BEVs@Dox组显著缩小。TUNEL检测揭示该组细胞凋亡显著增加, 其荧光信号强度明显强于PBS组、Free Dox组及BEVs组。Ki-67染色则呈相反趋势, 表明Ang-BEVs@Dox组的细胞增殖水平显著降低。

以上结果充分证明了Ang-BEVs@Dox递送系统在克服BBB障碍、实现靶向递送化疗药物并有效抑制GBM生长方面的优越性。

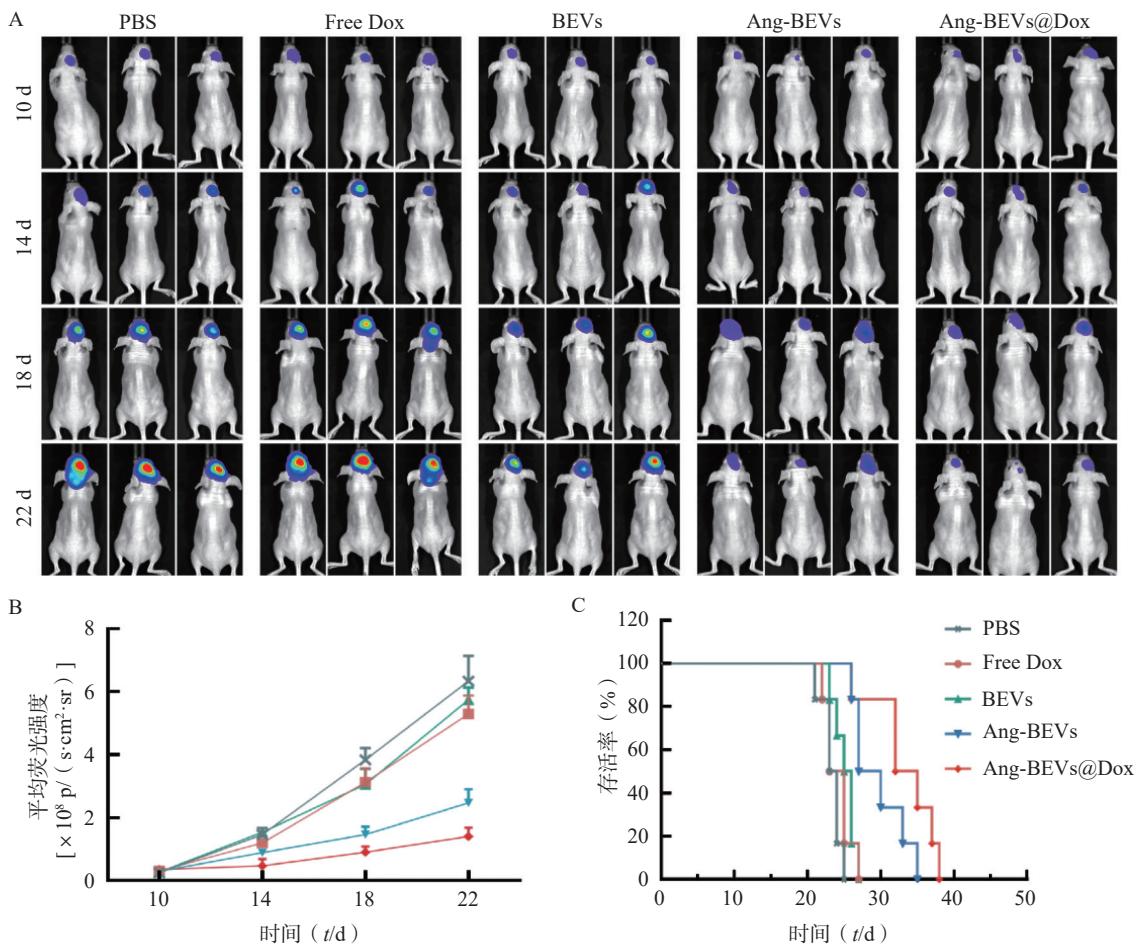


图 5 Ang-BEVs@Dox 靶向治疗原位 GBM 小鼠模型

A. 在造模后第 10、14、18、22 天, 通过小动物生物发光成像设备监测肿瘤生长; B. 肿瘤荧光成像定量分析 (Mean \pm SD, n=3); C. 不同治疗组原位 GBM 模型小鼠 Kaplan-Meier 生存曲线 (n=6)

注: $p/(s \cdot cm^2 \cdot sr)$ 为信号强度单位, 表示每秒每平方厘米每球面度光子数, 用于定量表征特定区域、特定方向上探测到的荧光信号强度, 数值越高代表荧光信号越强, 肿瘤体积越大。

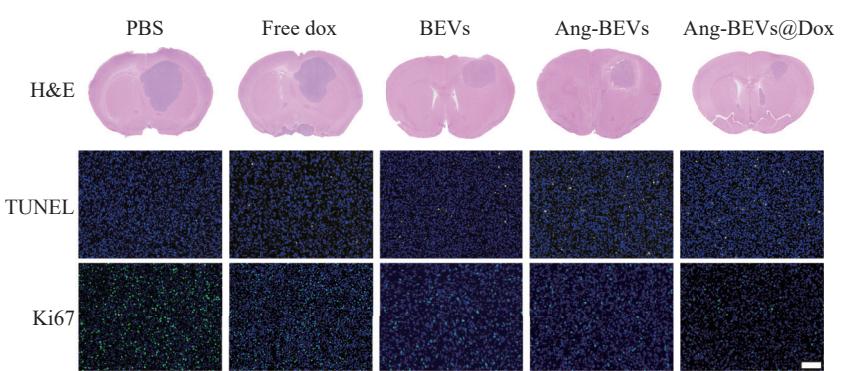


图 6 不同治疗组肿瘤组织病理学评价 (标尺=100 μm)

注: H&E, 原位 GBM 模型小鼠脑切片反应肿瘤面积大小; TUNEL 表示肿瘤凋亡的指标; Ki67 表示肿瘤增殖的指标。

2.5 药物安全性

初步的药物安全性评估表明, Ang-BEVs@Dox 递送系统治疗周期内具有较好的安全性。如图 7 所示, 心脏、肝脏和肾脏等主要器官的没有明显的组织病理学损伤。空白 Ang-BEVs 组未观察到明显的毒性反应, 表明载体本身具有良好的生物

相容性。

3 讨论

本研究证实, Angiopep-2 修饰的 BEVs (Ang-BEVs) 作为 Dox 递送载体, 通过三重协同机制显著提升 GBM 治疗效果。Angiopep-2 肽介导的

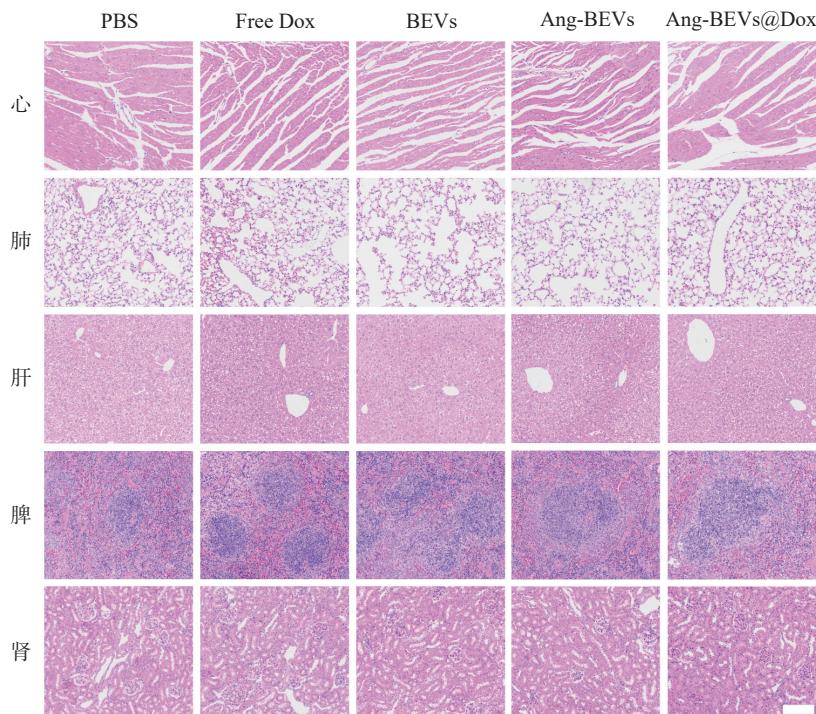


图 7 不同治疗组处理后主要器官的 H&E 切片 (标尺=100 μ m)

LRP-1 受体靶向使 BEVs 在 GBM 组织的蓄积量显著提升, 成功突破 BBB 限制; 同时, BEVs 的天然纳米结构有效保护药物在循环中的稳定性, 并且其中细菌衍生的物质能够协同 Dox 发挥双重的抗肿瘤作用。在一定程度上, 该载体可通过定向递送特性显著降低心脏等关键器官的药物暴露, 实现了“增效减毒”的协同效应。这一策略为 GBM 的靶向化疗提供了新范式。

BEVs 的纳米级脂质双分子层结构赋予其不可替代的载体优势。其天然膜蛋白成分可促进 BBB 穿透, 而 Angiopep-2 等靶向肽的修饰能进一步优化肿瘤富集效率^[16-17]。值得注意的是, BEVs 具有内在免疫调节潜能——来源于特定菌株(如 *E. coli* BL 21)的囊泡携带免疫刺激分子, 可逆转胶质瘤微环境的免疫抑制状态, 为化疗-免疫联合治疗提供理想平台^[18]。此外, BEVs 的多功能载药特性支持同时负载化疗药物、基因治疗组件(如靶向 MGMT 的 siRNA)或基因编辑工具, 实现多机制协同抗肿瘤, 这是传统合成载体难以实现的^[12]。

基于本研究构建的 Ang-BEVs@Dox 系统, BEVs 的临床转化可沿 3 条路径拓展: ①开发双重靶向系统(如 Angiopep-2/TAT 肽复合修饰)以应对肿瘤异质性^[19]; ②通过亲本菌株基因编辑实现治疗性蛋白的原位表达^[20]; ③利用患者特异性肿瘤抗原修饰 BEVs 开发个体化疫苗^[21]。然而, 临床转化仍面临关键挑战: ①在生产工艺方面, 亟需建立符合

临床标准的 BEVs 发酵、纯化及载药流程; ②在安全性方面, 需通过构建 LPS 缺陷菌株或采用仿生涂层技术精准调控免疫原性; ③此外, 必须阐明 BEVs 在脑组织内的长期代谢机制, 建议采用放射性同位素标记结合多模态影像技术实时追踪体内动力学行为。

BEVs 凭借其独特的生物学特性与可工程化优势, 已展现出突破 GBM 治疗壁垒的巨大潜力^[4-5, 22]。本研究不仅验证了“受体靶向-天然载体”协同策略的可行性, 更开辟了 BEVs 作为多功能神经肿瘤治疗平台的新方向。未来研究需聚焦于大型动物模型疗效验证、符合临床规范的生产工艺开发以及载体-宿主相互作用的长期安全性评价^[23]。通过跨学科协作推动 BEVs 从基础研究向临床转化, 有望为 GBM 患者提供兼具精准靶向性、高效穿透性和优异安全性的新一代治疗方案。

【参考文献】

- [1] LONG G V, SHKLOVSKAYA E, SATGUNASEELAN L, et al. Neoadjuvant triplet immune checkpoint blockade in newly diagnosed glioblastoma[J]. *Nat Med*, 2025, 31(5): 1557-1566.
- [2] TERSTAPPEN G C, MEYER A H, BELL R D, et al. Strategies for delivering therapeutics across the blood-brain barrier[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(5): 362-383.
- [3] MATHUR R, WANG Q X, SCHUPP P G, et al. Glioblastoma evolution and heterogeneity from a 3D whole-tumor perspective[J]. *Cell*, 2024, 187(2): 446-463. e16.
- [4] YOU H Y, ZHANG S L, ZHANG Y W, et al. Engineered bacterial outer membrane vesicles-based doxorubicin and CD47-siRNA

- co-delivery nanoplatform overcomes immune resistance to potentiate the immunotherapy of glioblastoma[J]. *Adv Mater*, 2025, 37(15): e2418053.
- [5] MI Z, YAO Q, QI Y, et al. *Salmonella*-mediated blood-brain barrier penetration, tumor homing and tumor microenvironment regulation for enhanced chemo/bacterial glioma therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(2): 819-833.
- [6] HERRMANN I K, WOOD M J A, FUHRMANN G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform[J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(7): 748-759.
- [7] TOYOFUKU M, SCHILD S, KAPARAKIS-LIASKOS M, et al. Composition and functions of bacterial membrane vesicles[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(7): 415-430.
- [8] JI N, WANG F X, WANG M M, et al. Engineered bacterial extracellular vesicles for central nervous system diseases[J]. *J Control Release*, 2023, 364: 46-60.
- [9] LIU H, ZHANG H, WANG S C, et al. Bone-targeted bioengineered bacterial extracellular vesicles delivering siRNA to ameliorate osteoporosis[J]. *Compos Part B Eng*, 2023, 255: 110610.
- [10] YAN X, LIU X Y, ZHANG D, et al. Construction of a sustainable 3-hydroxybutyrate-producing probiotic *Escherichia coli* for treatment of colitis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(10): 2344-2357.
- [11] XU X X, ZHANG Z Q, DU J W, et al. Recruiting T-cells toward the brain for enhanced glioblastoma immunotherapeutic efficacy by co-delivery of cytokines and immune checkpoint antibodies with macrophage-membrane-camouflaged nanovesicles[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(25): e2209785.
- [12] REHMAN F U, LIU Y, YANG Q S, et al. Heme Oxygenase-1 targeting exosomes for temozolomide resistant glioblastoma synergistic therapy[J]. *J Control Release*, 2022, 345: 696-708.
- [13] PÉREZ-LÓPEZ A, TORRES-SUÁREZ A I, MARTÍN-SABROSO C, et al. An overview of *in vitro* 3D models of the blood-brain barrier as a tool to predict the *in vivo* permeability of nanomedicines[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, 196: 114816.
- [14] ZHU Z C, ZHAI Y X, HAO Y, et al. Specific anti-glioma targeted-delivery strategy of engineered small extracellular vesicles dual-functionalised by Angiopep-2 and TAT peptides[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(8): e12255.
- [15] JIANG Y, YANG W J, ZHANG J, et al. Protein toxin chaperoned by LRP-1-targeted virus-mimicking vesicles induces high-efficiency glioblastoma therapy *in vivo*[J]. *Adv Mater*, 2018, 30(30): e1800316.
- [16] ZHAO Y, QIN J, YU D H, et al. Polymer-locking fusogenic liposomes for glioblastoma-targeted siRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing[J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(12): 1869-1879.
- [17] RICHTER R, KAMAL M A M, KOCH M, et al. An outer membrane vesicle-based permeation assay(OMPA)for assessing bacterial bioavailability[J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(5): e2101180.
- [18] PAN J M, LI X L, SHAO B F, et al. Self-blockade of PD-L1 with bacteria-derived outer-membrane vesicle for enhanced cancer immunotherapy[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(7): e2106307.
- [19] TIAN T, LIANG R Y, EREL-AKBABA G, et al. Immune checkpoint inhibition in GBM primed with radiation by engineered extracellular vesicles[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(2): 1940-1953.
- [20] YUE Y L, XU J Q, LI Y, et al. Antigen-bearing outer membrane vesicles as tumour vaccines produced *in situ* by ingested genetically engineered bacteria[J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(7): 898-909.
- [21] LI Y, ZHAO R F, CHENG K M, et al. Bacterial outer membrane vesicles presenting programmed death 1 for improved cancer immunotherapy *via* immune activation and checkpoint inhibition[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(12): 16698-16711.
- [22] ZHANG H Y, LI Z S, GAO C Y, et al. Dual-responsive biohybrid neutrobots for active target delivery[J]. *Sci Robot*, 2021, 6(52): eaaz9519.
- [23] SUN B, LI R, JI N, et al. Brain-targeting drug delivery systems: the state of the art in treatment of glioblastoma[J]. *Mater Today Bio*, 2025, 30: 101443.

[收稿日期] 2025-06-17 [修回日期] 2025-07-24

[本文编辑] 崔俐俊

投审稿系统网址变更声明

《药学实践与服务》杂志原投审稿网站 <http://yxsjzz.smmu.edu.cn> 已于 2025 年 9 月 3 日正式停用, 此后该域名与本编辑部无任何关联。

请投稿作者、审稿专家前往 <http://yxsj.smmu.edu.cn> 进行后续操作。谢谢配合!

《药学实践与服务》杂志编辑部

2025 年 9 月 4 日