



聚多肽纳米载体用于口服靶向胰腺癌 嵌合抗原受体基因递送的研究*

辛 峰^{1,2)} 任 健^{1,2)} 李照珍^{1,2)} 方 全^{1,2)} 梁锐晶^{1,2)**} 刘兰兰^{1,2)**} 蔡林涛^{1,2)**}

(¹⁾ 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055; (²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 **目的** 胰腺导管腺癌 (PDAC) 因高度纤维化的基质及免疫抑制性肿瘤微环境, 常对现有治疗方法反应不佳。近年来, 嵌合抗原受体巨噬细胞 (CAR-M) 疗法为胰腺癌治疗开辟了新路径。为进一步提升原位 CAR-M 疗法的靶向递送效率, 本研究致力于开发一种可口服的纳米基因递送系统, 以实现嵌合抗原受体 (CAR) 基因在胰腺肿瘤部位的高效递送。**方法** 采用阳离子聚多肽负载编码 CAR 的质粒 DNA (pCAR), 构建纳米基因颗粒 (PNP/pCAR), 并利用 β 葡聚糖对其进行表面修饰, 制备靶向型纳米颗粒 (β Glus-PNP/pCAR)。对 PNP/pCAR 的粒径、电位、稳定性及负载效率进行表征; 通过细胞实验评估其被巨噬细胞摄取、溶酶体逃逸及转染的能力; 通过口服给药 β Glus-PNP/pCAR, 在原位胰腺癌模型小鼠体内验证其肿瘤靶向富集效果及基因转染能力。**结果** 制备的 PNP/pCAR 纳米颗粒具备适宜的粒径和电位、高负载效率和良好稳定性。细胞实验表明, PNP/pCAR 纳米颗粒能被巨噬细胞高效摄取, 并有效逃逸溶酶体, 实现 pCAR 的成功转染。体内实验表明, 与未修饰的 PNP/pCAR 相比, β Glus-PNP/pCAR 在口服后表现出更强的原位胰腺肿瘤靶向和基因转染能力。**结论** 本研究成功构建并验证了一种可口服、能靶向胰腺癌的聚多肽纳米基因递送系统, 为后续开发基于原位 CAR-M 的胰腺癌治疗策略奠定了重要的递送技术基础与实验依据。

关键词 CAR-巨噬细胞, 基因递送, 聚多肽载体, β 葡聚糖, 胰腺癌

中图分类号 Q78, R730.51, R735.9

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0508

CSTR: 32369.14.pibb.20250508

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是一种高度恶性的实体肿瘤, 其特征性的致密纤维化基质和高度免疫抑制的肿瘤微环境严重阻碍了传统化疗、放疗乃至新兴免疫检查点抑制剂的疗效^[1-2]。近年来, 细胞免疫疗法, 尤其是嵌合抗原受体巨噬细胞 (chimeric antigen receptor macrophage, CAR-M) 疗法, 为胰腺癌治疗带来了新的希望^[3]。CAR-M 不仅能够直接吞噬肿瘤细胞, 更具备重塑肿瘤免疫微环境、激发持久抗肿瘤免疫反应的独特潜力^[4]。然而, 现行的 CAR-M 制备依赖于体外分离、基因改造与再回输的复杂流程。开发能够实现原位生成 CAR-M 的新策略, 成为突破当前细胞治疗技术瓶颈的关键^[5-6]。

为实现 CAR-M 的原位转化, 高效、安全的体内基因递送系统至关重要^[7-8]。其中, 聚多肽递送载体因其多重优势在肿瘤基因治疗领域展现出广阔

的应用前景。该类载体由天然氨基酸聚合而成, 具有优异的生物相容性和生物可降解性, 在体内可被安全代谢, 不会产生长期毒性积累, 能够满足长期或重复给药的需求^[9-10]。此外, 聚多肽载体的主链与侧链可通过化学修饰实现功能化改造: 一方面, 可引入靶向配体以实现肿瘤细胞的特异性识别与递送; 另一方面, 可接入环境响应性基团, 实现核酸药物在肿瘤部位的精准释放^[11-12]。同时, 聚多肽载体能通过静电作用、疏水相互作用等多种机制与核酸分子形成稳定复合物, 有效保护核酸免受体

* 广东省自然科学基金 (2024A1515011595) 和深圳市科创委基础研究项目 (JCYJ20240813155711015) 资助。

** 通讯联系人。

梁锐晶 Tel: 0755-86585217, E-mail: rj.liang@siat.ac.cn

刘兰兰 Tel: 0755-86585217, E-mail: ll.liu@siat.ac.cn

蔡林涛 Tel: 0755-86392210, E-mail: lt.cai@siat.ac.cn

收稿日期: 2025-11-14, 接受日期: 2026-01-13

内核酸酶的降解,从而提高基因递送效率^[13-14]。

口服给药是临床治疗中患者依从性最高的给药方式之一,其无需侵入性操作,能显著提高患者生活质量,因此在药物研发领域备受关注^[15-16]。然而,肠道生理屏障的存在使得基因编辑系统难以穿过肠上皮并到达胰腺肿瘤部位,严重制约了口服基因药物在PDAC治疗中的应用^[17-18]。采用 β 葡聚糖修饰可以有效地解决这个问题,该多糖不仅能通过其高分子链结构保护基因免受胃肠道核酸酶的降解^[19],还能通过靶向微褶皱细胞表面特异性受体Dectin-1,激活依赖于肌动蛋白的胞吞途径,进而跨越肠上皮屏障并主动归巢至肿瘤部位,最终实现PDAC的靶向治疗^[20-22]。

基于此,本研究选用生物相容性与可降解性优良的阳离子聚多肽作为载体核心,通过自组装包裹编码嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的质粒DNA(pCAR),形成纳米基因颗粒(PNP/pCAR),并在体外探究其在巨噬细胞中的转染效率。同时,为赋予其口服后靶向胰腺肿瘤的能力,引入 β 葡聚糖对纳米颗粒进行表面修饰,并在小鼠原位胰腺癌模型中探究其靶向递送效率及基因转染能力。本研究为实现高效、非侵入性的CAR-M原位基因递送提供了一种有潜力的技术工具与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

去内毒素质粒浓缩试剂盒和去内毒素质粒大提试剂盒购自广州美基生物有限公司;CCK-8细胞增殖与毒性检测试剂盒和琼脂糖及50×TAE电泳缓冲液均购自翌圣生物科技股份有限公司;高糖DMEM细胞培养基、特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素双抗溶液、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)和胰蛋白酶-EDTA均购自美国Gibco公司。核酸标记试剂盒(Cy5 MIR 7021)购自Mirus公司。Hoechst33342细胞核荧光染料试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。细胞膜荧光染料DiO和荧光染料Cy5购自上海懋康生物科技有限公司。 β 葡聚糖粉末购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。DH5 α 感受态细胞购自深圳康体生命科技有限公司。鼠源胰腺癌细胞系Panc02和鼠源巨噬细胞系Raw 264.7均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。6周龄雌性BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物中

心,小鼠体重为18~22 g,饲养于无特定病原体动物(special pathogen free animal, SPF)房(温度22~25℃,湿度45%~55%,12 h光暗循环),自由摄食饮水。所有动物实验操作均严格遵循中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理管理协议(编号:SIAT-IACUC-250213-YYs-LLL-A2909)的要求,确保实验动物福利。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的转化与提取纯化

感受态细胞转化:从-80℃冰箱中取出DH5 α 感受态细胞,冰浴10 min使其融化。取100 μ L溶化的感受态细胞,加入5 μ L pCAR质粒或pCAR-GFP质粒(浓度为100 μ g/L),轻轻吹打混匀后冰浴30 min。随后在42℃水浴中热激60 s,迅速转移至冰浴中静置2 min,避免晃动。向离心管中加入700 μ L无抗生素LB液体培养基,置于37℃、200 r/min摇床中培养45 min,使细胞复苏并表达抗性基因。

单克隆筛选与扩大培养:取30 μ L复苏菌液,均匀涂布于含氨苄青霉素(终浓度100 mg/L)的LB固体培养基平板,用无菌涂布棒轻柔涂开(避免划破培养基)。将平板倒置,37℃恒温培养箱过夜培养16 h。在超净工作台中挑取形态饱满、边缘清晰的单克隆菌落,接种至含3 mL氨苄青霉素LB液体培养基的离心管中,于37℃、200 r/min摇床培养16 h。取10 μ L菌液做琼脂糖凝胶电泳鉴定,确认质粒成功转入后,取50 μ L阳性菌液接种至含200 mL氨苄青霉素LB液体培养基的三角烧瓶,37℃、200 r/min摇床扩大培养12 h。

质粒提取纯化:按照去内毒素质粒大提试剂盒说明书操作获取质粒DNA,使用超微量紫外可见分光光度计(NanoDrop One/OneC)测定浓度(A_{260}/A_{280} 比值1.8~2.0为纯度合格),将合格质粒置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 聚多肽纳米基因递送系统的理化性质表征

PNP/pCAR基因递送系统的制备:实验室前期已合成获得聚多肽载体PNP粉末^[23],其合成方法为:首先将N6-苄氧羰基-L-赖氨酸在50℃下与三光气反应3 h,经四氢呋喃/正己烷(1:2)63℃重结晶、真空干燥制得N6-苄氧羰基-L-赖氨酸环内酸酐。同理,以L-亮氨酸替代N6-苄氧羰基-L-赖氨酸,重结晶的溶液比例调整为四氢呋喃/正己烷(1:10)制得L-亮氨酸环内酸酐。接着用氨基聚乙二醇作为引发剂,通过开环聚合依次开环N6-苄

氧羰基-L-赖氨酸环内酸酐和L-亮氨酸环内酸酐, 得到聚乙二醇-聚N6-苄氧羰基-L-赖氨酸-聚L-亮氨酸 (PEG₄₄-PLLZ₁₀₀-PLLeu₃₅)。接着将 PEG₄₄-PLLZ₁₀₀-PLLeu₃₅溶于三氟乙酸, 加入33%氢溴酸/醋酸溶液室温反应4 h, 进行脱保护。随后将反应产物通过冷乙醚沉淀、二甲基亚砜复溶后, 经分子质量为3.5 ku的透析袋透析3 d, 最后经冷冻干燥, 即得到聚多肽载体PNP粉末。将聚多肽载体PNP粉末溶于水与PBS (体积比3:7)的混合溶液, 磁力搅拌30 min至完全溶解, 配制为1 g/L的PNP母液。取PNP母液与pCAR质粒溶液, 按不同氮/磷比 (氨基基团数与磷酸基团数之比) 混合, 室温轻轻振荡2 min, 使二者通过静电作用形成稳定复合物, 制备得到不同氮/磷比的PNP/pCAR纳米颗粒。

琼脂糖凝胶电泳检测聚多肽纳米载体对pCAR质粒的负载能力: 按氮/磷比 (0:1、0.5:1、1:1、2:1、4:1、8:1、16:1) 分别混合PNP母液与pCAR质粒溶液, 制备PNP/pCAR纳米颗粒。称取2 g琼脂糖粉末, 加100 ml 1×TAE电泳缓冲液, 微波炉中高火加热1 min (中途摇匀) 至完全溶解。冷却至50~60℃时加5 μl核酸染料 (终浓度1 mg/L), 摇匀后倒入插有10孔梳子的凝胶模具, 室温静置30 min至凝胶凝固, 拔出梳子后将凝胶放入电泳槽。向不同氮/磷比的PNP/pCAR纳米颗粒溶液中加入6×上样缓冲液混匀, 向电泳槽加1×TAE缓冲液至没过凝胶1 mm, 随后将20 μl上样体系加入各样品孔。120 V恒压电泳15 min, 电泳结束后将凝胶转移至凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS+) 的紫外光下观察拍摄, 分析质粒阻滞效果 (质粒完全阻滞在加样孔表明负载能力良好)。

纳米颗粒粒径与ζ电位测定: 用pH 7.4的PBS缓冲液将纳米颗粒溶液稀释至1 g/L, 超声处理5 min (功率300 W, 超声3 s, 间隔5 s)。使用马尔文粒度仪 (Zetasizer Nano ZS90) 检测纳米颗粒的粒径与ζ电位。每个样品平行检测3次, 取平均值。为评估PNP/pCAR纳米颗粒的稳定性, 用pH 7.4的PBS缓冲液将其稀释至1 g/L, 置于4℃冰箱保存。分别在第0、1、2、3、4、5、6、7天时取样, 采用马尔文粒度仪检测粒径变化。

扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察纳米颗粒形态: 取10 μl 1g/L PNP/pCAR纳米颗粒溶液, 均匀滴加至经乙醇超声清洗3次、氮气吹干的硅片表面, 室温下自然

干燥24 h以避免灰尘污染。将硅片置于SEM (Phenom ProX) 中, 在10 kV加速电压条件下观察颗粒形态并拍摄图像。

1.2.3 细胞培养与传代

Raw 264.7巨噬细胞与稳定表达荧光素酶的Panc02胰腺癌细胞 (Panc02-Luc), 均采用含10% FBS、1%青霉素-链霉素双抗 (青霉素10⁵ U/L, 链霉素100 mg/L) 的高糖DMEM完全培养基培养。Hela-Gal8-mCherry细胞培养条件与上述一致, 传代操作中需避免过度消化, 胰蛋白酶-EDTA孵育时间控制在2 min内, 传代比例设定为1:4, 以维持报告基因表达的稳定性的。

1.2.4 细胞毒性实验

取对数生长期的Raw 264.7细胞, 用完全培养基调整至1×10⁷个/L, 100 μl/孔 (约1×10³个细胞) 接种至96孔板, 置于37℃、5% CO₂培养箱中过夜孵育以实现细胞贴壁。次日更换新鲜完全培养基, 分别加入不同浓度的PNP载体或PNP/pCAR纳米颗粒 (PNP浓度梯度为0、5、10、15、20 mg/L), 每组设3个复孔, 同时设空白对照组 (仅完全培养基) 和细胞对照组 (细胞+完全培养基)。继续孵育48 h后, 弃去孔内培养基, 每孔加入100 μl含10% CCK-8试剂的完全培养基 (试剂与培养基体积比1:9), 孵育2 h后, 使用多功能酶标仪 (Thermo Scientific Varioskan Flash) 测定450 nm波长下的吸光度值 (A)。

1.2.5 细胞摄取效率检测

激光共聚焦扫描显微镜观察: 将Raw 264.7细胞以1×10⁷/L细胞密度接种至8孔细胞爬片小室, 置于培养箱中过夜孵育以实现细胞贴壁。用核酸标记试剂盒给pCAR质粒标记上Cy5 (pCAR^{Cy5}), 按氮/磷比为4:1制备PNP/pCAR^{Cy5}纳米颗粒, 向每孔加入该颗粒溶液 (PNP浓度为10 mg/L, pCAR浓度为3 mg/L), 同时设立PBS处理组和pCAR^{Cy5} (3 mg/L) 处理组作为对照, 共同孵育4 h。孵育结束后, 用PBS洗涤3次 (5 min/次), 加入含5 mg/L DiO细胞膜染料和10 mg/L Hoechst33342细胞核染料的PBS溶液, 37℃孵育10 min, 再次洗涤后加500 μl PBS, 激光共聚焦扫描显微镜 (Leica STELLARIS 5) 下观察。

流式细胞术检测: 将Raw 264.7细胞以8×10⁷/L细胞密度, 按1 ml/孔接种至12孔板, 过夜孵育使细胞贴壁。更换新鲜完全培养基后, 加入PNP/pCAR^{Cy5}颗粒溶液 (PNP浓度为10 mg/L, pCAR浓

度为 3 mg/L), 并设立 PBS 处理组和 pCAR^{Cy5} (3 mg/L) 处理组作为对照。孵育 4 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加 500 μ l 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化 2 min, 随后用完全培养基中止消化, 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, PBS 洗涤 3 次后用 400 μ l PBS 重悬, 通过流式细胞仪 (Beckman Cytoflex) 检测 Cy5 荧光强度。

1.2.6 溶酶体逃逸能力的测定

Hela-Gal8-mCherry 报告细胞为实验室前期构建, 将 Hela-Gal8-mCherry 细胞以 1×10^7 /L 细胞密度, 按 500 μ l/孔接种至 8 孔细胞爬片小室, 置于培养箱中过夜孵育以实现细胞贴壁。弃去孔内旧培养基, 分别加入含 pCAR (浓度 3 mg/L) 或 PNP/pCAR 纳米颗粒 (PNP 浓度为 10 mg/L, pCAR 浓度为 3 mg/L) 的完全培养基 (500 μ l/孔), 共同孵育 4 h。孵育结束后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 500 μ l PBS, 通过激光共聚焦扫描显微镜观察细胞状态, 后续采用 ImageJ 软件对荧光信号进行统计分析。

1.2.7 细胞转染效率的测定

按氮/磷比为 4 : 1 混合 PNP 载体与 pCAR-GFP 质粒, 制备得到 PNP/pCAR-GFP 纳米颗粒。将 Raw 264.7 细胞按 1×10^5 /孔接种至 12 孔板, 过夜培养后更换为无血清培养基, 向每孔加入 PNP/pCAR-GFP 纳米颗粒 (PNP 浓度为 10 mg/L, pCAR-GFP 浓度为 3 mg/L)。另外设置商业化转染试剂 Lipofectamine 2000 负载 pCAR-GFP (Lipo/pCAR-GFP) 处理组为对照。转染 8 h 后, 换用含 10% FBS 的完全培养基继续孵育 48 h。孵育结束后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 经胰蛋白酶-EDTA 消化后, 以 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 再用 200 μ l PBS 重悬细胞, 通过流式细胞仪检测 GFP 荧光强度。

1.2.8 β 葡聚糖功能化基因递送系统原位胰腺癌靶向及基因转染效率评估

小鼠原位胰腺癌模型的构建: 取 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 禁食 12 h 后通过腹腔注射 1.25% 阿佛丁进行麻醉, 将小鼠侧卧固定并进行腹部消毒后, 于左侧肋下线作 0.8~1 cm 切口以暴露胰腺; 用 10 μ l 胰岛素针吸取 50 μ l 含 5×10^5 个 Panc02-Luc 细胞的悬液, 缓慢注入胰腺中部实质, 停留 30 s 后拔针, 复位肠道并逐层缝合、消毒。术后 7 d 起, 通过小动物活体成像仪 (Caliper IVIS Spectrum) 检测胰腺区域的荧光信号, 以此确定原位胰腺肿瘤的形成情况。

β 葡聚糖功能化基因递送系统 (β Glus-PNP/pCAR) 的制备: 先采用 Cy7 荧光分子标记 PNP/pCAR, 构建得到 PNP/pCAR^{Cy7}; 取 β 葡聚糖粉末溶于无菌超纯水, 37°C 磁力搅拌 2 h 至完全溶解, 配制 0.5 g/L β 葡聚糖溶液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。按 β 葡聚糖与 PNP 质量比 1 : 2, 将 β 葡聚糖溶液缓慢滴加至 PNP/pCAR^{Cy7} 溶液, 室温下磁力搅拌 1 h, 使 β 葡聚糖修饰于纳米颗粒表面。反应结束后, 将混合溶液于 4°C 环境下, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液透析 24 h (每 8 h 换一次透析液), 以去除游离 β 葡聚糖。收集透析袋内溶液, 即为 β Glus-PNP/pCAR^{Cy7} 纳米颗粒溶液, 于 4°C 保存备用。

评估纳米颗粒体内靶向性: 以小鼠原位胰腺癌模型为研究对象, 分别向小鼠口服灌胃 100 μ l PNP/pCAR^{Cy7} 或 β Glus-PNP/pCAR^{Cy7} 纳米颗粒 (每只小鼠 pCAR 使用量为 30 μ g), 采用小动物活体成像系统动态追踪给药后 1、2、4、8、16 h 小鼠体内荧光信号分布; 给药 48 h 后处死小鼠, 再通过小动物活体成像系统对胰腺肿瘤进行荧光成像及荧光统计分析。在本次研究中, 每个实验组均使用了 3 只小鼠。

评估纳米颗粒体内基因转染效率: 以小鼠原位胰腺癌模型为研究对象, 分别向小鼠口服灌胃 100 μ l PNP/pCAR-GFP 或 β Glus-PNP/pCAR-GFP 纳米颗粒 (每只小鼠 pCAR-GFP 使用量为 30 μ g)。给药 48 h 后处死小鼠, 取出胰腺肿瘤组织, 经液氮速冻后制备冰冻切片。切片经 DAPI 染色标记细胞核后, 使用荧光显微镜观察并分析 GFP 蛋白的表达情况。

1.2.9 统计分析

本研究的实验数据采用 GraphPad Prism 10 软件进行处理与分析, 所有实验结果均以“平均值 $\pm$ 标准差”的形式呈现, 每组实验至少重复 3 次 ($n \geq 3$)。组间差异分析方法如下: 两组间比较采用 Student's *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 Tukey 检验; 其中, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$, 均提示组间存在显著统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 PNP/pCAR 基因递送系统的表征

本文通过调整 PNP 载体与 pCAR 的用量, 采用琼脂糖凝胶电泳技术分析不同氮/磷比值 (0 : 1、0.5 : 1、1 : 1、2 : 1、4 : 1、8 : 1) 下, PNP 载体

对pCAR的负载效率。当氮/磷比值达到4时, PNP载体实现了对pCAR的完全负载, 凝胶电泳中无游离pCAR条带出现(图1a)。因此, 后续PNP/pCAR纳米颗粒均采用氮/磷=4:1的比例进行样品制备。SEM图像(图1b)显示, PNP/pCAR纳米颗粒呈规则球形; 马尔文粒度仪检测结果显示, PNP/pCAR纳米颗粒的水合粒径约为 (120 ± 10) nm(图1b)。单纯PNP载体的 ζ 位为 $+(25\pm 2)$ mV, pCAR的 ζ 电位为 $-(29\pm 2)$ mV, 二者按氮/磷为4结

合形成PNP/pCAR纳米颗粒的 ζ 电位降至 $+(6\pm 1)$ mV(图1c)。证明PNP载体成功包裹pCAR质粒, 同时, 弱正电位确保与细胞膜表面负电基团的静电相互作用, 在提高细胞摄取效率的同时避免过高电位导致的体内毒性, 可实现“结合稳定性”与“细胞亲和性”平衡。PNP/pCAR纳米颗粒在PBS缓冲液中孵育7 d, 水合粒径始终维持在120~130 nm范围内且无显著波动(图1d), 表明其在生理模拟环境中具有良好结构稳定性。

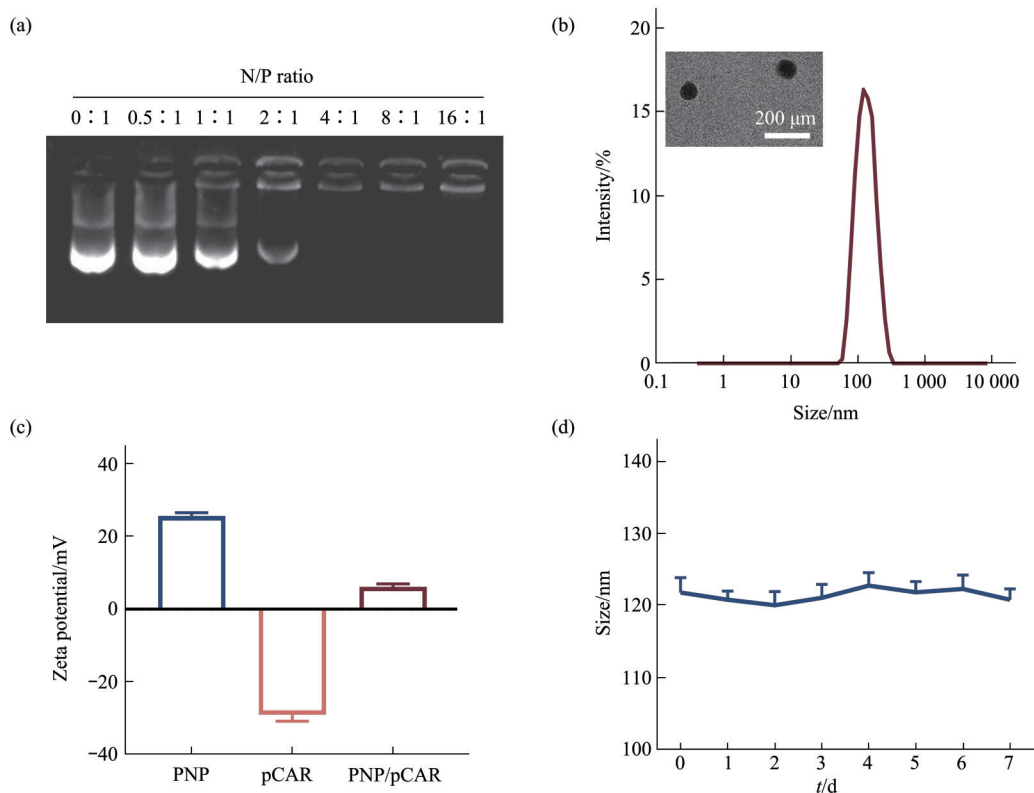


Fig. 1 Physicochemical characterization of polypeptide-based nanogene delivery systems

(a) Agarose gel retardation assay used to determine the ability of PNP to bind to pCAR. (b) Particle size and SEM images of PNP/pCAR. (c) Zeta potential changes of nanoparticles before and after pCAR loading. (d) Monitoring of the size variation of PNP/pCAR in PBS over time.

2.2 PNP/pCAR 基因递送系统的安全性、细胞摄取和溶酶体逃逸评价

首先对PNP载体及PNP/pCAR纳米颗粒的细胞安全性进行评估, CCK-8检测结果显示(图2a), 在一定浓度范围内, PNP载体和PNP/pCAR纳米颗粒均未在Raw 264.7细胞中表现出细胞毒性, 为后续基因递送相关实验奠定了安全基础。为了评估PNP载体对Raw 264.7细胞摄取pCAR效率的影响, 将pCAR质粒标记上Cy5, 构建PNP/pCAR^{Cy5}纳米颗粒, 与Raw 264.7细胞共同孵育4 h

后, 通过激光共聚焦扫描显微镜与流式细胞术进行检测。流式细胞术检测结果显示(图2b), 经PNP/pCAR^{Cy5}纳米颗粒处理的Raw 264.7细胞, 其Cy5平均荧光强度为 8×10^5 以上, 而pCAR^{Cy5}处理组细胞平均荧光强度只有 2×10^5 ; 激光共聚焦扫描显微镜图像(图2c)显示, pCAR^{Cy5}处理组细胞内几乎无红色荧光信号, PNP/pCAR^{Cy5}处理组细胞内红色荧光信号则显著增强。通过对激光共聚焦扫描显微镜图像中的pCAR^{Cy5}荧光信号进行统计, PNP/pCAR^{Cy5}处理组的信号强度是pCAR^{Cy5}处理组的3.7

倍 (图2d)。以上结果提示, PNP载体可高效介导pCAR质粒递送至巨噬细胞内。

溶酶体逃逸是基因递送系统发挥作用的关键环节^[24], 该研究选用表达Gal8-mCherry融合蛋白的HeLa细胞 (HeLa-Gal8-mCherry) 来评估PNP/pCAR纳米颗粒的溶酶体逃逸能力。当溶酶体膜受损时, Gal8-mCherry会释放至细胞质并聚集形成点状红色荧光, 荧光分布及强度可直观反映逃逸效果。将PNP/pCAR纳米颗粒与HeLa-Gal8-mCherry

细胞共同孵育4 h后, 通过激光共聚焦扫描显微镜观察分析。共聚焦图像 (图2e) 及荧光统计结果 (图2f) 显示, PNP/pCAR处理组细胞中的Gal8斑点数是单纯pCAR处理组的25倍。这些结果表明, PNP/pCAR纳米颗粒引发了较强的溶酶体膜损伤, 提示PNP/pCAR纳米颗粒具有较强的溶酶体逃逸能力, 可有效避免pCAR质粒在溶酶体内降解, 为后续基因进入细胞核表达、提升基因转染效率提供了有力保障。

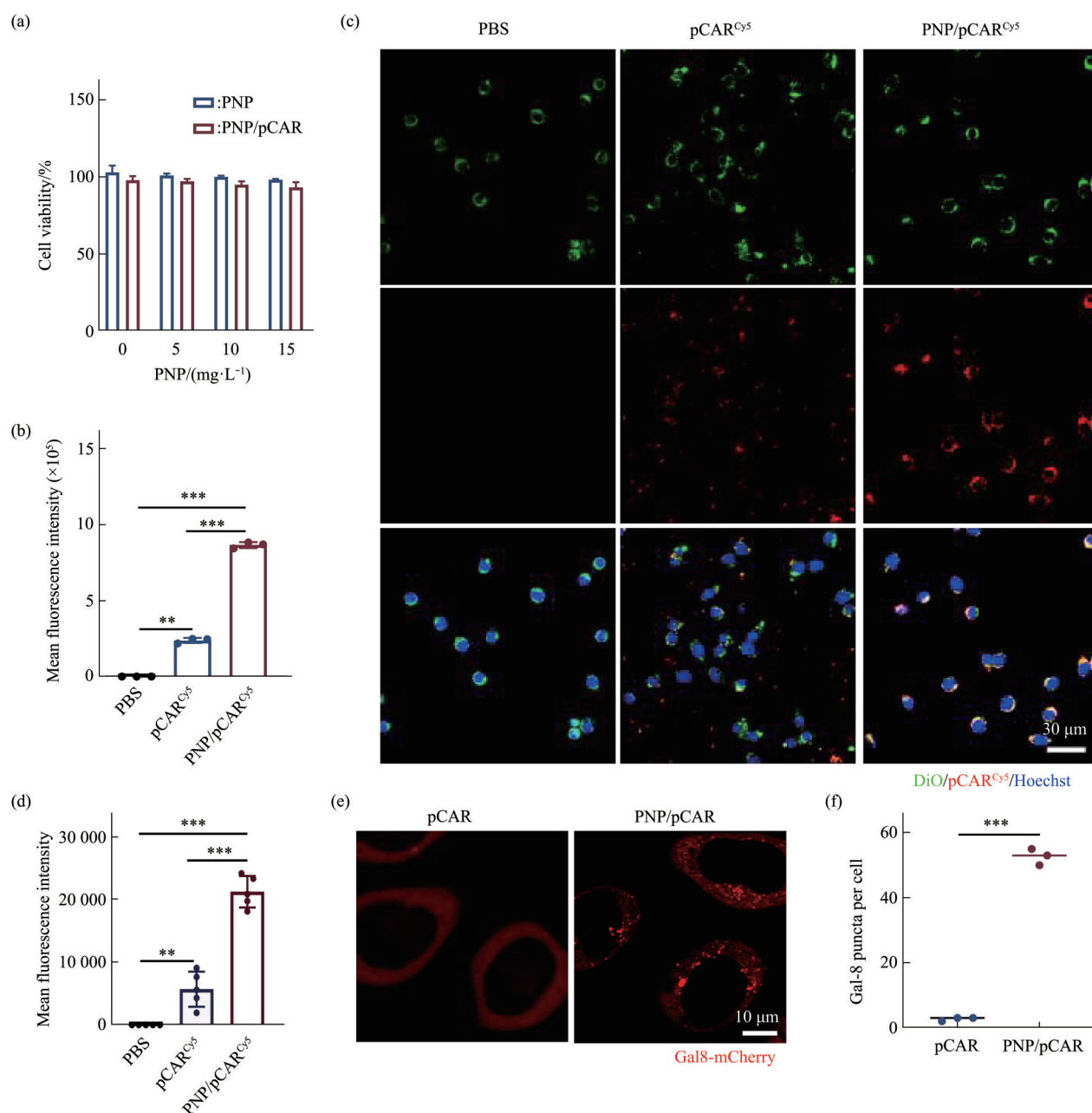


Fig. 2 Evaluation of cytotoxicity, cellular uptake, and lysosomal escape of the PNP/pCAR gene delivery system

(a) Evaluation of the cytotoxicity of nanoparticles by CCK-8 assay. (b) Detection of cellular uptake by flow cytometry. (c) Detection of cellular uptake by confocal laser scanning microscopy. (d) Mean fluorescence intensity analysis of pCAR^{Cy5}. (e) Detection of lysosomal escape by confocal laser scanning microscopy. (f) Statistical analysis of Gal8 spot count. $n=3-5$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.3 PNP/pCAR基因递送系统的细胞转染效率评估

通过流式细胞术检测 PNP/pCAR-GFP 纳米颗粒在 Raw 264.7 细胞中的转染效果。结果显示 (图 3a, b), PNP/pCAR-GFP 纳米颗粒处理组的 GFP 阳性细胞率达到 $(25 \pm 1)\%$, 显著高于单独 pCAR-GFP 处理组 ($<1\%$), 作为对照, 采用商业化转染试剂 Lipofectamine 2000 负载 pCAR-GFP (Lipo/pCAR-GFP) 组, 其转染效率为 $(20 \pm 1)\%$ 。进一步对平均荧光强度进行统计分析, 结果表明,

PNP/pCAR-GFP 组和 Lipo/pCAR-GFP 组的平均荧光强度分别为 pCAR-GFP 单独组的 28 倍和 21 倍 (图 3c)。以上结果证明, PNP 载体在 Raw 264.7 细胞中表现出优于 Lipofectamine 2000 的转染性能。上述结果综合表明, PNP 载体可通过提升细胞摄取效率促进 pCAR 质粒进入细胞质, 并凭借较强的溶酶体逃逸能力减少 pCAR 质粒在溶酶体中的降解损失, 最终实现 pCAR 质粒在 Raw 264.7 细胞内的高效递送与表达。

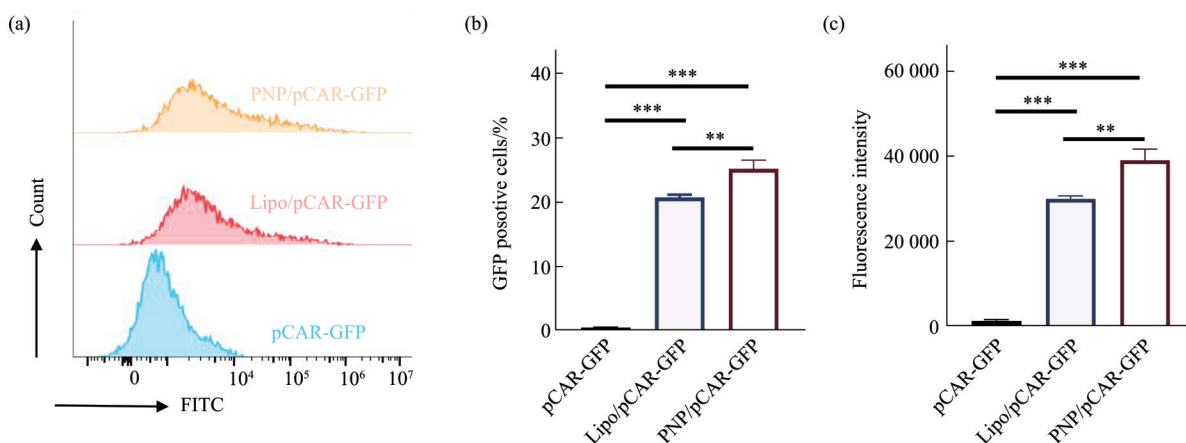


Fig. 3 Evaluation of cell transfection efficiency of the PNP/pCAR gene delivery system

(a) Detection of cell transfection efficiency by flow cytometry. (b) Statistical analysis of the percentage of GFP-positive cells in different treatment groups. (c) Statistical analysis of fluorescence intensity in different treatment groups. $n=3$, $**P<0.01$; $***P<0.001$.

2.4 β 葡聚糖包覆的聚多肽纳米基因颗粒对原位胰腺肿瘤的靶向评估

β 葡聚糖修饰不仅能保护基因在胃肠道中免于降解, 还可通过靶向微皱褶细胞并利用其胞吞作用, 为纳米基因颗粒突破肠上皮屏障、实现 PDAC 的口服靶向治疗奠定基础^[19-22]。该研究构建了小鼠原位胰腺癌模型, 采用 Cy7 标记的 PNP/pCAR 纳米颗粒 (PNP/pCAR^{Cy7}), 并用 β 葡聚糖包覆 PNP/pCAR^{Cy7} (β Glus-PNP/pCAR^{Cy7}), 通过口服灌胃的方式分别给予原位荷瘤小鼠 PNP/pCAR^{Cy7} 和 β Glus-PNP/pCAR^{Cy7}。通过小动物活体成像系统动态监测不同时间点 (1、2、4、8 和 16 h) 小鼠体内的荧光信号分布情况。小鼠荧光图像 (图 4a) 显示, 口服给药 16 h 后, β Glus-PNP/pCAR^{Cy7} 处理组小鼠胰腺部位的荧光信号强度明显高于 PNP/pCAR^{Cy7} 处理组, 初步表明 β 葡聚糖显著增强了纳米颗粒在胰腺区域的富集。

待口服灌胃 48 h 后, 处死小鼠并取出胰腺肿瘤组织, 通过小动物活体成像系统进一步分析肿瘤组织内的荧光信号。结果显示, β Glus-PNP/pCAR^{Cy7} 处理组的胰腺肿瘤组织内的荧光信号强度显著高于 PNP/pCAR^{Cy7} 处理组 (图 4b, c), 表明 β 葡聚糖包覆显著增强了聚多肽纳米颗粒的口服胰腺肿瘤靶向能力。

2.5 β 葡聚糖包覆的聚多肽纳米基因颗粒在原位胰腺肿瘤中的转染效率评估

构建小鼠原位胰腺癌模型, 通过口服灌胃的方式分别给予小鼠 PNP/pCAR-GFP 和 β Glus-PNP/pCAR-GFP, 并于 48 h 后取瘤组织制备冰冻切片, 经 DAPI 染色后, 通过荧光显微镜观察 GFP 表达。结果显示 (图 5a), β Glus-PNP/pCAR-GFP 处理组的胰腺肿瘤组织内的 GFP 荧光信号强度显著高于 PNP/pCAR-GFP 处理组。荧光统计结果 (图 5b) 显示, β Glus-PNP/pCAR-GFP 处理组的荧光信号强

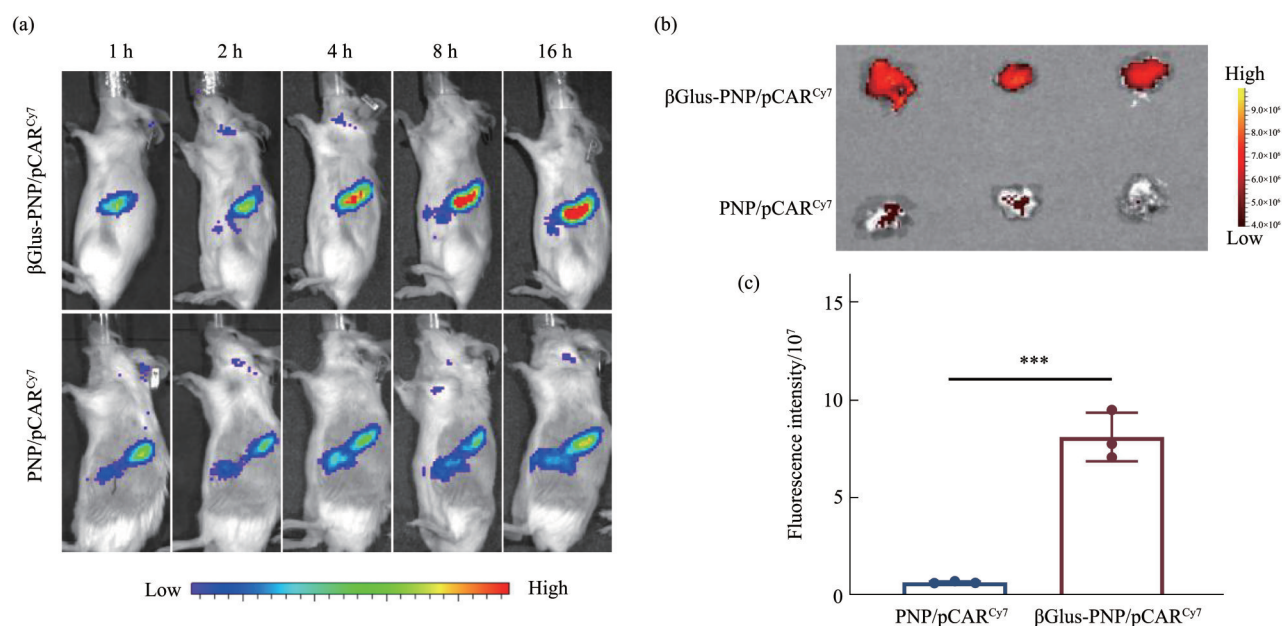


Fig. 4 Evaluation of the targeting ability of β -Glucan-coated polypeptide nanogene particles to orthotopic pancreatic tumors

(a) Dynamic fluorescence monitoring of mice in different treatment groups. (b) Fluorescence imaging of pancreatic tumors in mice at 48 h post-treatment across different groups. (c) Statistical analysis of pancreatic tumor fluorescence intensity in mice at 48 h post-treatment across different groups. $n=3$, $***P < 0.001$.

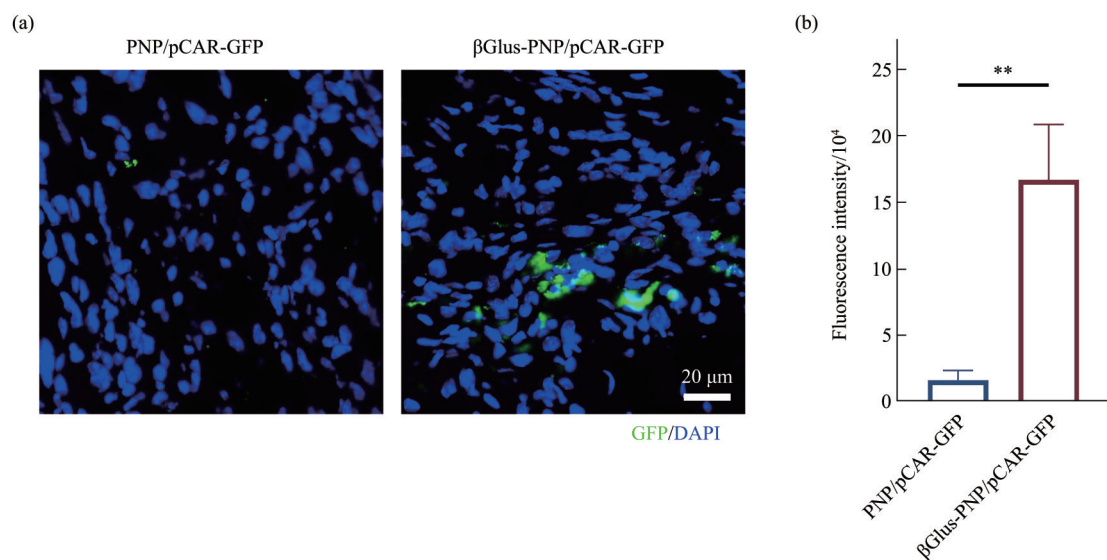


Fig. 5 Evaluation of transfection efficiency of the polypeptide nanogene particles in orthotopic pancreatic tumors

(a) Fluorescence imaging of GFP signals in orthotopic pancreatic tumor tissues at 48 h post-injection of $\beta\text{Glus-PNP/pCAR-GFP}$. (b) Mean fluorescence intensity analysis of GFP signals in (a) using ImageJ. $n=3$, $**P < 0.01$.

度是 PNP/pCAR-GFP 处理组的 8 倍。综合上述结果表明, β 葡聚糖包覆的聚多肽纳米基因颗粒因其具有更优的胰腺肿瘤靶向能力, 进而提高了在原位胰腺肿瘤中的基因转染效率。

成功的靶向递送是基因治疗发挥作用的先决条

件。本研究验证的优异靶向性和转染能力, 为 $\beta\text{Glus-PNP/pCAR}$ 系统作为原位 CAR-M 疗法的候选递送工具提供了核心的体内证据。然而必须指出, 靶向递送是评估递送系统潜力的关键指标, 但并非治疗效果的充分保证。从基因递送到 CAR-M

的功能性生成及其抗肿瘤效应的实现, 是一个复杂的多步骤过程。因此, 本研究聚焦于证实该系统的靶向递送能力, 其完整的治疗潜力, 有待未来通过该系统的体内疗效研究予以充分揭示。

3 结 论

本研究成功构建了基于阳离子聚多肽的纳米基因颗粒 (PNP/pCAR)。在氮/磷比为 4 : 1 的条件下, PNP/pCAR 可组装形成平均粒径为 (120 ± 10) nm、 ζ 电位为 $+(6 \pm 1)$ mV 的规则球形颗粒, 并在 PBS 中 7 d 内保持良好稳定性。细胞实验表明, PNP/pCAR 无明显细胞毒性, 且 PNP 载体能显著提高 Raw 264.7 细胞对 pCAR 质粒的摄取效率。进一步研究表明, PNP/pCAR 具有良好的溶酶体逃逸能力, 在 Raw 264.7 细胞中实现高效的基因转染, 转染阳性率达 $(25 \pm 1)\%$ 。体内实验结果显示, 与未包覆 β 葡聚糖的 PNP/pCAR 相比, 经 β 葡聚糖包覆的聚多肽纳米基因颗粒 (β Glus-PNP/pCAR) 口服后, 在 16 h 活体小鼠胰腺部位的荧光信号强度及 48 h 离体胰腺肿瘤组织内的信号强度均更强。组织切片分析进一步显示, 相较于 PNP/pCAR-GFP 处理组, β Glus-PNP/pCAR-GFP 处理组的胰腺肿瘤组织中 GFP 表达强度显著增强。综上, 本研究成功开发并验证了一种基于聚多肽和 β 葡聚糖的口服纳米基因递送系统。该系统具备良好的生物相容性、稳定性、高效的体外基因递送能力, 以及较好的体内胰腺肿瘤靶向及基因转染能力, 为开发非侵入性原位 CAR-M 疗法提供了一种有潜力的递送工具。

参 考 文 献

- [1] Liu X, Shao Y, Li Y, *et al.* Extensive review of nanomedicine strategies targeting the tumor microenvironment in PDAC. *Int J Nanomed*, 2026, **20**: 3379-3406
- [2] Ho W J, Jaffee E M, Zheng L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer—clinical challenges and opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, **17**(9): 527-540
- [3] Hadiloo K, Taremi S, Heidari M, *et al.* The CAR macrophage cells, a novel generation of chimeric antigen-based approach against solid tumors. *Biomark Res*, 2023, **11**(1): 103
- [4] Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, *et al.* Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(8): 947-953
- [5] Li N, Geng S, Dong Z Z, *et al.* A new era of cancer immunotherapy: combining revolutionary technologies for enhanced CAR-M therapy. *Mol Cancer*, 2024, **23**(1): 117
- [6] Nie S, Qin Y, Ou L, *et al.* *In situ* reprogramming of immune cells using synthetic nanomaterials. *Adv Mater*, 2024, **36**(15): 2310168
- [7] Zhang W, Huang X. *In vivo* gene editing and *in situ* generation of chimeric antigen receptor cells for next-generation cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*, 2024, **17**(1): 110
- [8] Zhou J E, Zhou Z, Wang Z, *et al.* Lipid nanoparticles produce chimeric antigen receptor macrophages (CAR-M) *in situ* for the treatment of solid tumors. *Nano Today*, 2025, **61**: 102610
- [9] Yang J, Luo G F. Peptide-based vectors for gene delivery. *Chemistry*, 2023, **5**(3): 1696-1718
- [10] Xia W, Tao Z, Zhu B, *et al.* Targeted delivery of drugs and genes using polymer nanocarriers for cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(17): 9118
- [11] Callmann C E, Thompson M P, Gianneschi N C. Poly(peptide): synthesis, structure, and function of peptide-polymer amphiphiles and protein-like polymers. *Acc Chem Res*, 2020, **53**(2): 400-413
- [12] Lü S, Sylvestre M, Prossnitz A N, *et al.* Design of polymeric carriers for intracellular peptide delivery in oncology applications. *Chem Rev*, 2021, **121**(18): 11653-11698
- [13] Mendes B B, Connot J, Avital A, *et al.* Nanodelivery of nucleic acids. *Nat Rev Meth Primers*, 2022, **2**: 24
- [14] Zhang H, Vandesompele J, Braeckmans K, *et al.* Nucleic acid degradation as barrier to gene delivery: a guide to understand and overcome nuclease activity. *Chem Soc Rev*, 2024, **53**(1): 317-360
- [15] Baryakova T H, Pogostin B H, Langer R, *et al.* Overcoming barriers to patient adherence: the case for developing innovative drug delivery systems. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, **22**(5): 387-409
- [16] Geraili A, Xing M, Mequanint K. Design and fabrication of drug-delivery systems toward adjustable release profiles for personalized treatment. *VIEW*, 2021, **2**(5): 20200126
- [17] Yue N N, Xu H M, Xu J, *et al.* Therapeutic potential of gene therapy for gastrointestinal diseases: advancements and future perspectives. *Mol Ther Oncolytics*, 2023, **30**: 193-215
- [18] Miao Y B, Xu T, Gong Y, *et al.* Cracking the intestinal lymphatic system window utilizing oral delivery vehicles for precise therapy. *J Nanobiotechnol*, 2023, **21**(1): 263
- [19] Xu B W, Li S S, Ding W L, *et al.* From structure to function: a comprehensive overview of polysaccharide roles and applications. *Food Front*, 2025, **6**(1): 15-39
- [20] Zhao Y, Chu X, Chen J, *et al.* Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumor immunity through the induction of Th9 cells. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12368
- [21] Chen K H, Nguyen N, Huang T Y, *et al.* Macrophage-hitchhiked orally administered β -glucans-functionalized nanoparticles as “precision-guided stealth missiles” for targeted pancreatic cancer therapy. *Adv Mater*, 2023, **35**(40): 2304735
- [22] Zhang B, Pan H, Chen Z, *et al.* Twin-bioengine self-adaptive micro/nanorobots using enzyme actuation and macrophage relay for gastrointestinal inflammation therapy. *Sci Adv*, 2023, **9**(8): ead8978
- [23] Zhu D, Ren J, Li Z, *et al.* Cyanobacteria-intelligent biohybrid system enables light-guided tumor-associated macrophage-specific siRNA delivery. *Cell Rep Phys Sci*, 2024, **5**(12): 102301
- [24] Degors I, Wang C, Rehman Z U, *et al.* Carriers break barriers in drug delivery: endocytosis and endosomal escape of gene delivery vectors. *Acc Chem Res*, 2019, **52**(7): 1750-1760

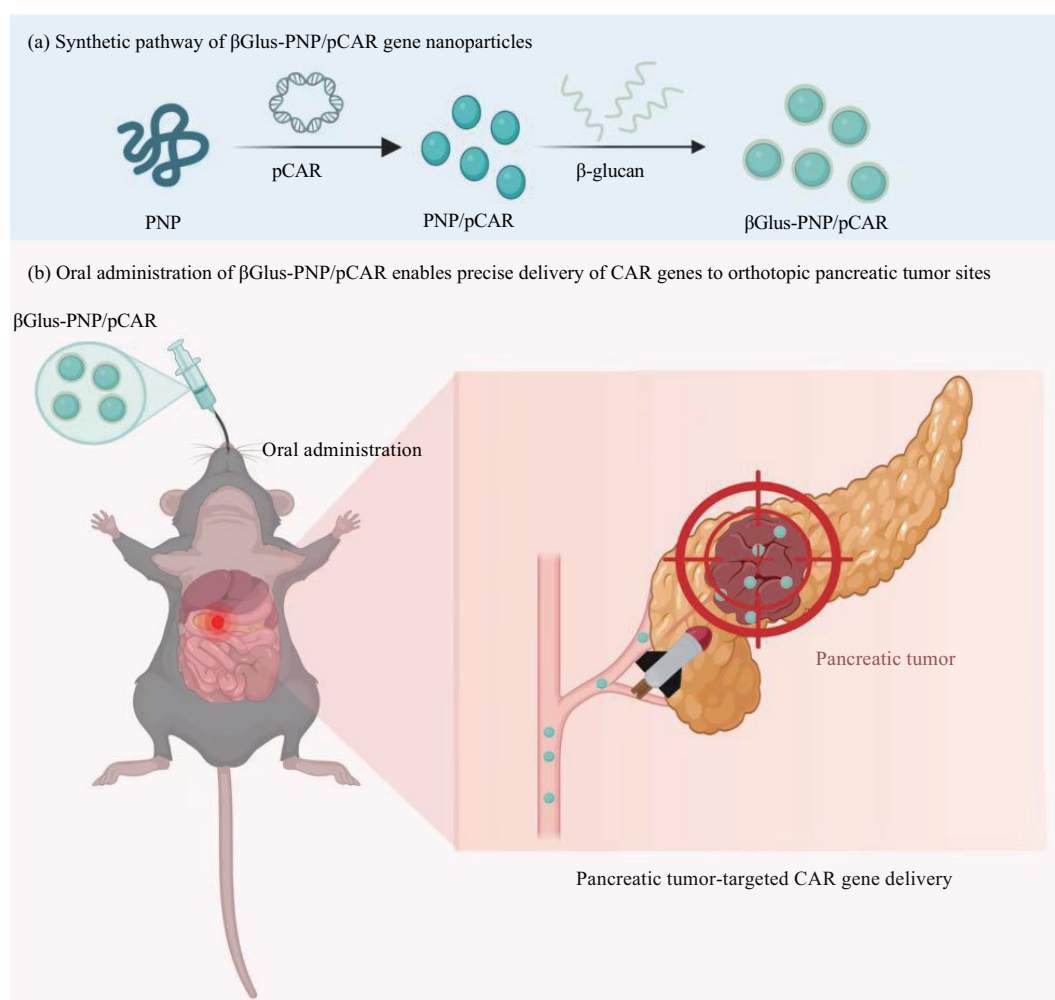
Polypeptide-based Nanocarriers for Oral Targeted Delivery of CAR Genes to Pancreatic Cancer*

XIN Feng^{1,2)}, REN Jian^{1,2)}, LI Zhao-Zhen^{1,2)}, FANG Quan^{1,2)}, LIANG Rui-Jing^{1,2)}**,
LIU Lan-Lan^{1,2)}**, CAI Lin-Tao^{1,2)}**

(¹⁾Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;

(²⁾University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2024A1515011595) and Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20240813155711015).

** Corresponding author.

LIANG Rui-Jing. Tel: 86-755-86585217, E-mail: rj.liang@siat.ac.cn

LIU Lan-Lan. Tel: 86-755-86585217, E-mail: ll.liu@siat.ac.cn

CAI Lin-Tao. Tel: 86-755-86392210, E-mail: lt.cai@siat.ac.cn

Received: November 14, 2025 Accepted: January 13, 2026

Abstract Objective Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) exhibits a limited response to current treatments due to its dense fibrotic stroma and highly immunosuppressive tumor microenvironment. In recent years, advancements in cellular immunotherapy, particularly chimeric antigen receptor macrophage (CAR-M) therapy, have offered new hope for pancreatic cancer treatment. Although CAR-M therapy demonstrates dual potential in directly killing tumor cells and remodeling the immune microenvironment, it still faces challenges such as complex *in vitro* preparation processes and low *in vivo* targeting and delivery efficiency. Therefore, developing strategies for efficient and targeted *in vivo* delivery of CAR genes has become crucial for overcoming current therapeutic limitations. This study aims to develop an orally administrable nano-gene delivery system for the targeted delivery of CAR genes to pancreatic tumor sites. **Methods** Core nano-gene particles (PNP/pCAR) were constructed by loading plasmid DNA encoding CAR (pCAR) with cationic polypeptides (PNP). Subsequently, PNP/pCAR was surface-modified with β -glucan to prepare the targeted nanoparticles (β Glus-PNP/pCAR). The loading efficiency of PNP for pCAR was quantitatively assessed by gel retardation assay. The particle size, Zeta potential, morphology, and storage stability of PNP/pCAR were characterized using a Malvern particle size analyzer and transmission electron microscopy. At the cellular level, RAW 264.7 macrophages were selected. The cytotoxicity of PNP/pCAR was evaluated using the CCK-8 assay. The cellular uptake efficiency and lysosomal escape ability of the nanoparticles were assessed *via* flow cytometry and confocal microscopy. Transfection efficiency was quantitatively evaluated by detecting the expression of the reporter gene GFP using flow cytometry. At the *in vivo* level, an orthotopic pancreatic cancer mouse model was established. Cy7-labeled β Glus-PNP/pCAR nanoparticles were administered orally, and the fluorescence distribution in mice was dynamically monitored at 1, 2, 4, 8, and 16 h post-administration using a small animal *in vivo* imaging system. Forty-eight hours after oral gavage, the mice were euthanized, and pancreatic tumor tissues were collected for further analysis of intratumoral fluorescence signals using the imaging system. Additionally, β Glus-PNP/pCAR-GFP nanoparticles loaded with the reporter gene (GFP) were administered orally. Forty-eight hours post-administration, pancreatic tumor tissues were harvested to prepare frozen sections, and GFP expression was observed and analyzed under a fluorescence microscope. **Results** The PNP carrier exhibited a high loading capacity for pCAR. The successfully prepared PNP/pCAR nanoparticles were regular spheres with a hydrodynamic diameter of approximately (120 ± 10) nm and a Zeta potential of about $+(6 \pm 1)$ mV. They maintained good structural stability after incubation in PBS buffer for 7 d. Cell experiments demonstrated that PNP/pCAR exhibited no significant cytotoxicity in RAW 264.7 cells while being efficiently internalized and effectively escaping lysosomal degradation. The transfection positive rate of PNP/pCAR-GFP in RAW 264.7 cells reached $(25 \pm 3)\%$, surpassing that of Lipofectamine 2000-loaded pCAR-GFP (Lipo/pCAR-GFP), which was $(20 \pm 1)\%$. *In vivo* experiments revealed that, compared to unmodified PNP/pCAR, β Glus-PNP/pCAR exhibited stronger *in situ* pancreatic tumor targeting ability after oral administration. Furthermore, oral administration of β Glus-PNP/pCAR-GFP resulted in significant GFP protein expression detectable within pancreatic tumor tissues. **Conclusion** This study successfully constructed and validated an orally administrable, pancreatic cancer-targeting polypeptide-based nano-gene delivery system. It provides an important technological foundation in delivery systems and experimental basis for the subsequent development of *in situ* CAR-M-based therapeutic strategies for pancreatic cancer.

Key words CAR-macrophage, gene delivery, polypeptide vector, β -glucan, pancreatic cancer

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0508

CSTR: 32369.14.pibb.20250508