**重庆市自然科学基金面上项目自评估报告**

**—、项目概述**

项目的基本信息，包括来源及立项依据，承担人，研究目的、用途，主要研究内容，技术方案、方法和技术路线的选择等。

项目基本信息：

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称** | 释放-自报告型一氧化氮供体的模块化构建及应用研究 |
| **项目编号** | CSTB2022NSCQ-MSX0474 |
| **承担单位** | 重庆大学 |
| **项目负责人** | 伍雯 |
| **通讯地址** | 重庆市沙坪坝沙正街174号 |
| **联系电话** | 18581036696 |
| **起止年限** | 2022-8-1至2024-7-31 |

项目参与人信息：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **姓名** | **专业** | **工作单位** | **职称** |
| 项目负责人 | 伍雯 | 药物制剂，药理学 | 重庆大学 | 中级 |
| 项目参与人 | 徐磊 | 药物化学 | 重庆大学 | 其他 |
| 项目参与人 | 罗婷容 | 药物制剂 | 重庆大学 | 其他 |
| 项目参与人 | 徐悦 | 药物化学 | 重庆大学 | 其他 |

一氧化氮（NO），作为一种至关重要的信号分子，参与调节心血管、神经、免疫系统等多个生物过程，并与炎症、肿瘤等多种疾病的发生和发展密切相关。近年来，随着对NO在生物体中作用的深入了解，科学家们开始研究外源NO在生物医学领域的应用，开发出多种能释放NO的供体化合物，如有机硝酸酯类、*S*-亚硝基硫醇类等。然而，这些低分子量的外源NO供体常常面临着稳定性差、易突释、缺乏靶向性和潜在的毒副作用等挑战。

为了克服这些挑战，科学家们提出了基于生物材料的NO递送策略，例如通过将NO或NO供体直接包裹在生物材料中，或者将NO化学键结合到生物材料上，从而构建高分子量的外源NO供体。这些策略显著提高了NO供体的稳定性、靶向性和生物活性，但精确监测外源NO在体内的“时-空”浓度依然是一个挑战。这一监测对于理解外源NO的具体生物功能至关重要，因为同一浓度的外源NO在不同部位可能具有不同的功能，而在同一部位不同浓度的外源NO也可能产生相反的效应。

传统的NO检测技术，如基于氟硼二吡咯和罗丹明的小分子荧光探针，虽然能指示体内NO含量，但通常无法排除内源性NO的干扰，且检测过程中会消耗NO。最近，一些研究团队开发了基于香豆素的外源NO供体，这些供体能在释放NO的同时产生荧光信号，实现对外源NO释放的定性指示。然而，这些技术在高浓度NO需求的疾病模型中存在荧光猝灭的问题，限制了其应用。

针对这一问题，本项目提出了一种新的策略，即利用释放-自报告型NO供体，来特异性地示踪和精准定量外源NO。这一策略将使“外源NO检测”与“发挥生物活性”由并联转为串联，允许先检测后发挥生物活性。我们构建的NO供体将结合近荧光报告团和亲水性多肽骨架，以实现在体内对外源NO的可视化和定量化。此外，这种方法的荧光信号穿透力强，有助于在体内成像。**我们的研究工作为后续外源性NO在体内的量效关系研究提供了有力的技术支撑，也为后期阐明NO逆转肿瘤耐药性机制提供研究方法。**

**本项目开展了以下几方面的研究：**

1. 具有释放-自报告特性的NO供体的合成与表征
2. 特异性示踪与精准定量外源NO的研究
3. 外源NO逆转肿瘤耐药性的活性研究

申请人伍雯，重庆大学药学院讲师、硕士生导师，法国洛林大学药学院博士。申请人专注于药物给药系统的研究，能够全面把握NO递送系统研究领域的最新进展。申请人成功开发了一种具有释放-自报告特性的新型生物荧光材料TPE-RSNO。该材料在水溶液中通过自组装形成胶束，并展示出独特的荧光性质。这种荧光性质不仅与一氧化氮（NO）的释放密切相关，而且还能自报告其释放状态，因为荧光强度的变化直接指示了NO的释放量。同时，TPE-RSNO对活性氧物种（ROS）有响应性，使其在监测药物释放和细胞状态方面有重要价值。已在Acta Biomater., Chem. Commun., Chin. Chem. Lett., Drug Discov. Today等国际权威期刊上发表19篇具有重要学术影响力的研究论文。

二、**项目研究进程与主要工作**

项目研究过程中的工作开展情况（包括工作过程的描述，遇 到的问题，采取的措施、方法，取得的结果）；所完成项目的核心 内容、技术特征、技术方法和难点；项目研究的技术路线和实现 途径，技术成果先进性、成熟性。

**具体开展工作情况如下：**

1. **释放-自报告型NO供体（TPE-RSNO）的构建**

### 1.1 4-氨基四苯乙烯 (TPE-NH2) 的合成

在氩气保护下将锌粉和无水四氢呋喃 (THF) 添加到三颈烧瓶中，在冰浴中将反应液冷却至-10°C。边搅拌边使用注射器将TiCl4 缓慢加入上述反应液中。室温反应1小时后回流3小时。然后，在-10 °C下注入吡啶。搅拌10分钟后，将二苯甲酮和4-氨基二苯甲酮的THF溶液加入烧瓶中，继续回流反应3小时。然后加入10% K2CO3 溶液以淬灭反应。将反应液过滤并用乙酸乙酯萃取得有机层，最终得到淡黄色固体4-羟基四乙烯粗产物，再将其通过硅胶色谱进一步纯化，使用乙酸乙酯/石油醚作为洗脱剂，得到所需产物。

### 1.2 TPE-RSH的合成及表征

TPE-RSH的合成是应用多肽固相合成 (SPPS) 的方法，以Rink AM树脂为固相载体，采用Fmoc正交保护策略和HOBT/HBTU为缩合试剂，首先用20%哌啶/DMF脱去树脂上面的Fmoc保护基团，再将Fmoc-Lys(Boc)-OH与树脂偶联，继续用20%哌啶/DMF脱去Fmoc保护后依次偶联上Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH。再以20%哌啶/DMF脱去Fmoc保护后与TPE-NH2，三光气进行反应，即可在树脂上得到连接上TPE的多肽链。随后使用切割试剂 (95% TFA, 2.5% DTT, 2.5%TIS) 将其从树脂上分开得到目标产物TPE-RSH的粗产品。再经过反相制备色谱分离分离纯化，经过质谱进一步确证，确证后的TPE-RSH进行冻干即得纯品，合成路线示意图如图2.2所示。

### 1.3 TPE-RSNO的合成及表征

称取一定量的TPE-RSH溶解在0.625 M盐酸缓冲液中，再加入相同当量的亚硝酸钠，在氩气保护下进行冰浴，搅拌反应30分钟，加入氢氧化钠调节pH至中性终止反应，即得TPE-RSNO，合成路线示意图如图1所示。利用质谱对TPE-RSNO进行鉴定，TPENO的浓度通过Griess-Saville方法进行检测，具体操作为称取2.3 mg TPE-RSNO溶于500 μL醋酸buffer中，再取50 μL 样品进行Griess-Saville检测。









图1 TPE-RSNO的合成路线图

图2所示[M+H]+=1111.26的分子离子峰，即为TPE-RSNO (m/z=1111.28) ，通过Griess-Saville检测可得NO的载量为每摩尔产物中所含TPE-RSNO的量约为0.3 摩尔。因此通过质谱分析和高效液相分析结果，可以证明我们成功地完成了亚硝化，得到了TPE-RSNO。



图2 TPE-RSNO的质谱分析

### 1.3.1 TPE-RSNO光学测定

将TPE-RSNO溶解在PBS (pH = 7.4, 10 mM) 中，配制终浓度为100 μM的TPE-RSNO样品。先在紫外分光光度计下确定TPE-RSNO的最大吸收峰，随后在荧光分光光度计下利用最大吸收峰处的波长激发，检测TPE-RSNO的最大发射。并且在DMSO/PBS混合液 (1/99, v/v)中分别检测TPE-NH2和TPE-RSNO的荧光，样品终浓度为100 μM。

图3 TPE-RSNO的激发和发射图谱

图3为TPE-RSNO的激发和发射图谱，结果表明TPE-RSNO最大激发在320 nm处，最大发射为460 nm处，为后续实验提供激发和发射波长的参考。

### 1.3.2 TPE-RSNO对ROS的响应

①TPE-RSNO在过氧化氢下的荧光变化

用PBS (pH = 7.4, 10 mM) 配制终浓度为100 μM的TPE-RSNO样品。随后将100 μM TPE-RSNO与100 mM H2O2在 37℃ 下孵育，于0、0.5、1、2、4、6和12 h在荧光分光光度计下检测荧光强度的变化。将不同浓度（10、50、100、200和400 μM）TPE-RSNO与100 mM H2O2在 37℃ 下孵育10小时，在荧光分光光度计下检测荧光强度的变化，检测条件为在320 nm处激发，在380 至 620 nm检测发射峰。

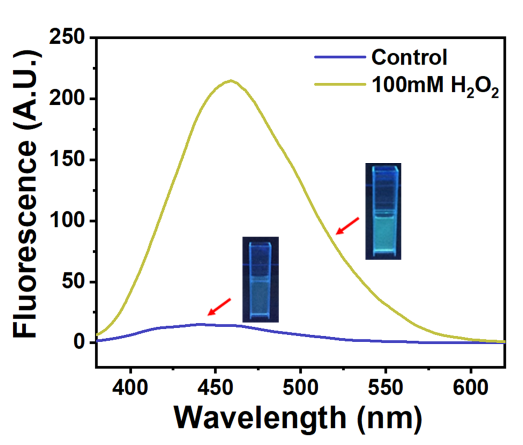
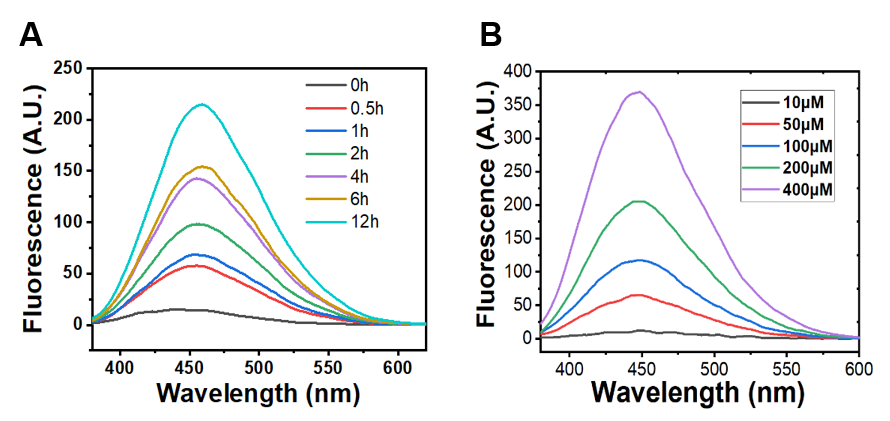
图4 H2O2促进TPE-RSNO的荧光增强

图4为TPE-RSNO与H2O2孵育前后的荧光变化，在H2O2作用下，TPE-RSNO的荧光强度增强了约13倍，这表明TPE-RSNO具有ROS响应性，H2O2可以促进TPE-RSNO的荧光增强。接着我们还探究了TPE-RSNO对ROS的响应速度，结果如图5 (A)，从初始0小时开始至12小时，随着时间的延长，TPE-RSNO在H2O2下荧光逐渐增强，这表明TPE-RSNO对ROS的响应是持续进行，具有时间依赖性。除此之外，我们也进一步考察了TPE-RSNO浓度对反应的影响，如图5 (B)，随着TPE-RSNO浓度的增加，荧光也随之逐渐增加，这表明了TPE-RSNO对ROS响应的浓度依赖性，并且对于浓度的探索，TPE-RSNO浓度过低时荧光强度不够，浓度过高则会造成化合物浪费，因此我们选择了浓度比较适中的100 μM TPE-RSNO用于我们的后续实验探究。

图5 H2O2 下TPE-RSNO的 (A) 时间依赖与 (B) 浓度依赖荧光发射谱

②TPE-RSNO在过氧化氢下的形态变化

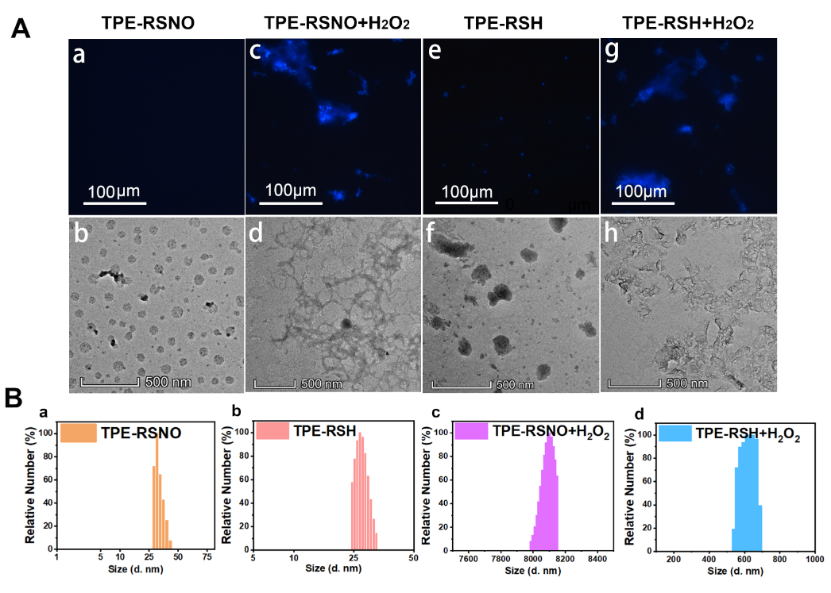
用PBS (pH = 7.4, 10 mM) 配制终浓度为100 μM TPE-RSH和TPE-RSNO样品，立即在纳米粒度仪动态光散射 (DLS) 下检测其纳米粒径，再将样品继续与100 mM H2O2在37℃下孵育12 h，再次检测纳米的粒径变化。用于DLS 测量的样品也同时取样在荧光倒置显微镜下观察纳米荧光变化。具体操作为样品在经过DLS 测量后，立即在载玻片上加入5 μL样品，然后盖上盖玻片后在电子倒置显微镜下观察，激发光为340 nm。同时，DLS测量前后的样品也用于电子透射电镜 (TEM) 的检测。经过DLS测量后，立即将5 μL样品加入到铜网中，待溶剂蒸发后进行磷钨酸染色，染色自然风干后，在TEM下观察样品粒径变化。

图6 (A) TPE-RSH和TPE-RSNO与H2O2孵育前后荧光显微镜以及电镜图，(B) TPE-RSH和TPE-RSNO与H2O2孵育前 (a, b) 后 (c, d) 的水合粒径

在对TPE-RSNO与H2O2反应机制的深入研究中，我们使用荧光显微镜和电子显微镜观察到了TPE-RSH和TPE-RSNO孵育前后的显著形态变化。如图6所示，DLS和TEM分析显示，这两种材料在水溶液中原始为纳米粒（TPE-RSNO为33.61 ± 2.72 nm，TPE-RSH为28.41 ± 1.88 nm），但在H2O2处理后，粒径显著增大至微米级（TPE-RSNO为7499.01 ± 456.15 nm，TPE-RSH为630.31 ± 61.64 nm），并由球形转变为片状。

荧光增强和形态变化的一致性表明，H2O2促使两种材料从弱荧光的纳米粒子状态转变为强荧光的不规则聚集体。这一现象与TPE-RSH中巯基的交联以及释放NO后的TPE-RSNO暴露巯基的行为一致，均导致了聚集诱导发光现象的发生。这些结果不仅验证了我们的初步假设，还提示NO释放与荧光变化可能存在关联，为我们后续研究提供了重要方向。

1. **TPE-RSNO释放一氧化氮与荧光变化的量效关系**

用PBS (pH = 7.4, 10 mM) 配制终浓度为100 μM TPE-RSNO样品，将 100 μM TPE-RSNO在 37℃ 下孵育，于0、0.5、1、2、4、6和12 h在荧光分光光度计下检测荧光强度的变化，同时使用Griess-Saville方法检测一氧化氮的释放浓度。检测条件为在320 nm处激发，在380至620 nm检测发射峰。

图7展现了TPE-RSNO的荧光强度与一氧化氮（NO）释放之间的关联性。实验数据表明，在0.5小时内，TPE-RSNO已释放超过50%的NO，而至4小时时则完成了完全释放。相应地，荧光变化曲线显示，随着时间的推移，荧光强度逐渐增加，至4小时时，相较于初始值，荧光增强了7倍。两者之间的Pearson相关系数为0.764，这显著表明了NO释放行为与荧光强度变化之间存在强相关性。

NO的释放导致TPE-RSNO上巯基的暴露，进而促使分子间发生交联，形成聚集体并触发聚集诱导发光现象，导致系统荧光显著增强。这一发现具有重要意义：它指出，TPE-RSNO荧光的增强不仅反映了NO的释放，而且提供了一种通过荧光强度变化实时指示外源性NO释放的新方法。尽管DAF-2 DA荧光探针能够用于NO的定量检测，但其无法区分外源性与内源性NO，限制了其在精准给药方面的应用。相比之下，TPE-RSNO的这一特性不仅为NO精准定量给药提供了新的解决方案，而且在开发用于监测NO释放的荧光探针方面开辟了新路径。



图7 TPE-RSNO的荧光与NO释放的关系，实验数据表示为mean ± SD，每组*n*=3

1. **TPE-RSNO在细胞水平的活性探究**

### 3.1 TPE-RSNO细胞安全性

探究了TPE-RSNO的物化性质之后，我们进一步在细胞水平对其进行研究，首先我们验证了它的生物安全性，如图8所示，TPE-RSH与TPE-RSNO的浓度小于10 μM时，对293细胞几乎无影响，随着给药浓度的增加，20 μM时，两者可以抑制约30%细胞的增殖，当浓度达到100 μM时，细胞毒性增强，有接近50%的抑制，因此这提醒在TPE-RSNO使用中需要注意平衡浓度之间的安全与有效性。并且在TPE-RSNO细胞安全性的评价中，我们所考察的浓度范围为5-100 μM，这覆盖了我们将在耐药肿瘤细胞上使用的浓度。由于一氧化氮在机体中具有双重效果，其作用与浓度高度相关，低浓度 (100–500 nM) 的NO能够诱导血管生成、促进创伤愈合和免疫应答，同时也促进癌细胞增殖。而较高浓度 (>500 nM) 的NO则具有细胞毒性。因此20 μM TPE-RSNO产生的细胞毒性主要是针对肿瘤细胞，TPE-RSNO在其他生物应用中，我们则会参考低浓度 (100–500 nM) NO的使用情况，由于10 μM TPE-RSNO在图8中几乎无细胞毒性，所以TPE-RSNO在其他生物应用中将不受毒性作用的影响。



图8 TPE-RSH 和 TPE-RSNO 在 293细胞上的细胞活力，实验数据表示为mean ± SD，每组*n*=3

### 3.2 TPE-RSNO细胞水平上ROS响应性

众多研究表明肿瘤微环境具有比正常组织更高水平的ROS，并且耐药肿瘤中ROS水平更高，因此我们首先检测不同细胞株中ROS的含量以确保所选择的不同细胞株之间ROS水平不同，以便TPE-RSH与TPE-RSNO能够在细胞水平上更好地表现出ROS的响应与鉴别指示的情况。如图9(A)和(B)中所示，293细胞上ROS水平最低，Hepg2中ROS水平是293细胞里的4.8倍，Hepg2/ADR中ROS水平是293细胞里的12倍，这验证了正常细胞，普通肿瘤细胞与耐药肿瘤细胞中ROS水平具有差异性。将TPE-RSNO与三种细胞孵育后，在共聚焦显微镜下检测TPE-RSNO的成像效果，如图9(C)中所示，TPE-RSNO在293细胞中几乎无明显荧光，但是在Hepg2与Hepg2/ADR上都呈现荧光，在Hepg2/ADR上面尤其明显，并且还可观察得到，TPE-RSNO能够成功地进入到细胞内。结合体外TPE-RSNO与释放-荧光变化，这些结果都表明了ROS的作用可以加速TPE-RSNO释放NO，从而加快巯基暴露的过程，产生聚集性发光体。因此TPE-RSNO具有可以根据细胞内ROS水平的差别实现区别细胞的功能，这在耐药与非耐药细胞的鉴别作用中尤为重要，并且还为药物选择性递送提供了基础，但是想要实现精确地鉴别耐药与非耐药细胞，TPE-RSNO仍有需要改进和继续探索的地方。

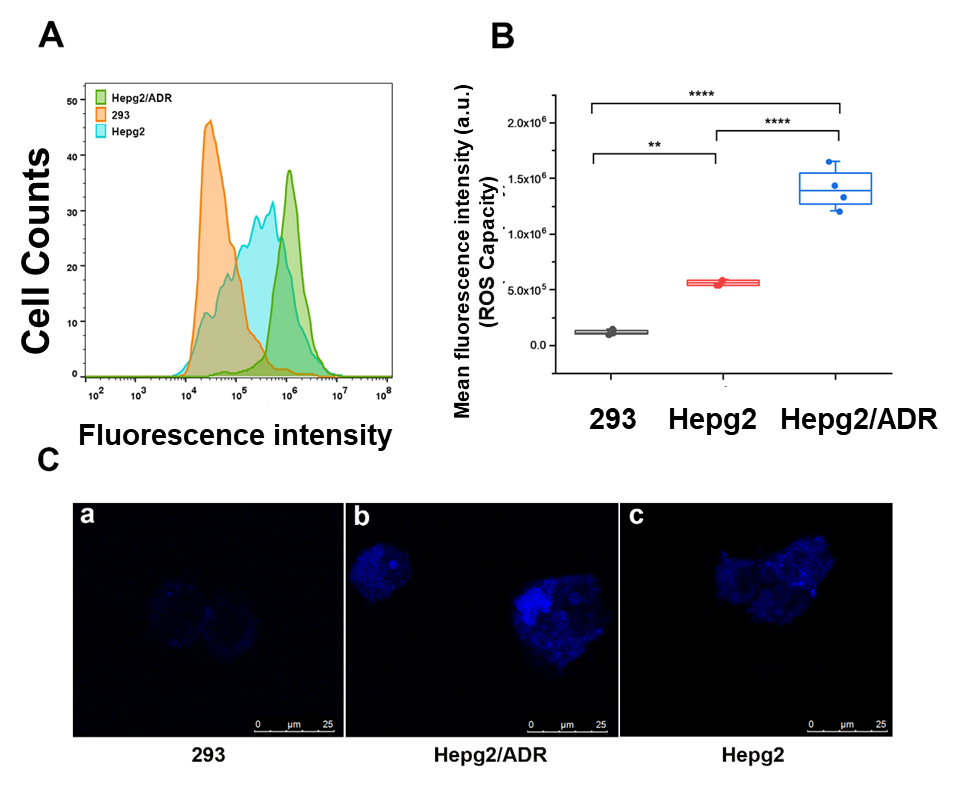


图9 (A) 293, Hepg2和Hepg2/ADR细胞中ROS水平与 (B) 载量。(C) TPE-RSNO 在不同细胞中共聚焦成像 (a) 293, (b) Hepg2, (c) Hepg2/ ADR实验数据表示为mean ± SEM, 每组*n* = 3, \*\**p* < 0.01, \*\*\*\* *p* < 0.0001

### 3.3 TPE-RSNO与阿霉素联合应用逆转Hepg2/ADR的耐药性

图10为阿霉素 (DOX) 与TPE-RSNO联合使用和单独使用时在Hepg2/ADR上的IC50。TPE-RSNO与阿霉素联合应用时对Hepg2/ADR的IC50约为6.75 μg/mL, 阿霉素单独使用时IC50约为95.4 μg/mL，是联合应用时的14倍。结果表明TPE-RSNO与阿霉素的联合应用显著地抑制了Hepg2/ADR的增殖，这证明了TPE-RSNO在Hepg2/ADR上可以逆转其对阿霉素的耐药性。与此前的研究相比，Wu等人设计了一种ROS与GSH响应的NO递送系统，她们合成了PEG-PPS负载NO的高分子材料，再利用制剂的手段将阿霉素包封在NO材料中，这种联合NO、药物递送系统与抗肿瘤药物的治疗方案在对阿霉素耐药的肝癌细胞上表现出了很好的治疗效果，显著改善了阿霉素在耐药细胞上面的IC50，她们的研究中单独使用阿霉素处理Hepg2/ADR的IC50为13 ± 1 μg/mL，联合用药IC50为4 ± 1。而我们治疗中阿霉素单独处理是联合用药的14倍，这充分说明TPE-RSNO与阿霉素联合用药达到了良好的化疗增敏与联合抗肿瘤效果。



图10 TPE-RSNO对DOX的IC50的影响

实验结果表示为means ± SD, 每组*n* = 3, \**p* < 0.05

由于TPE-RSNO在Hepg2/ADR上表现出了良好的逆转多药耐药的效果，我们进一步探究其逆转多药耐药的机制，首先细胞经过不同给药处理，然后在共聚焦下面观察TPE-RSNO在细胞中的作用位置以及细胞内NO和P-糖蛋白 (P-gp) 水平，同时也监测进入细胞内阿霉素与TPE-RSNO的量。如图11所示，与单独给予阿霉素组相比，给予TPE-RSNO处理后，进入细胞内的阿霉素水平显著增加，同时细胞上P-gp水平也有明显降低，并且细胞内部有大量NO的信号，这些结果都表明了TPE-RSNO可以通过递送NO到耐药肿瘤细胞内，降低细胞膜上P-gp的表达，从而使更多的阿霉素可以进入到耐药肿瘤细胞中，达到逆转耐药的效果，实现更好抑制肿瘤的目的。除此之外，从图11还可以观察得到，给予过TPE-RSH和TPE-RSNO处理的细胞上，能看到TPE-RSH与TPE-RSNO可以有效地进入到细胞内，这也体现出了阳离子多肽可以帮助穿透细胞膜的作用；只给予TPE-RSNO处理的细胞内也能观察到NO递送的细胞内，对应的细胞膜上P-gp的水平也降低了，而单独给予TPE-RSH的却无法显示降低P-gp的效果，这也表明了在这个体系中，主要是释放NO来降低P-gp的水平。因此，我们在Hepg2/ADR上成功地验证了TPE-RSNO可以有效地进入细胞内，通过释放NO来降低P-gp的表达，使得更多阿霉素可以进入到细胞内部，并且TPE-RSNO在耐药肿瘤细胞内由于高水平ROS的作用加速NO的快速释放，快速蓄积的NO也会与ROS反应产生RNS具有细胞毒性，从而联合阿霉素抑制肿瘤，逆转耐药肿瘤的耐药性。所以我们继续将TPE-RSNO应用到荷瘤小鼠体内，探究在小鼠体内的抑癌效果。

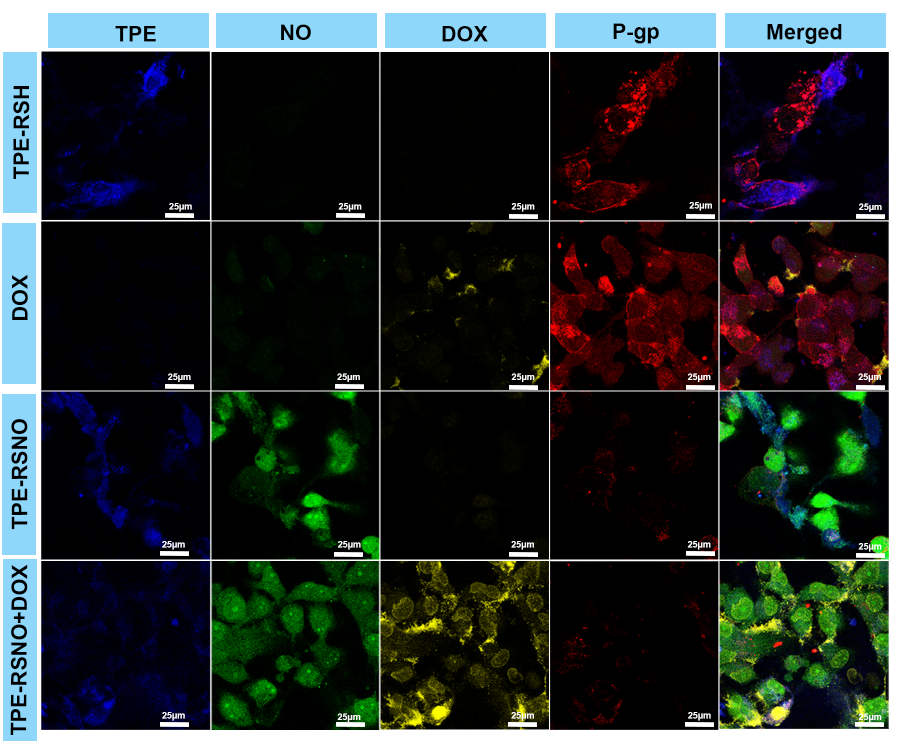


图11 TPE-RSH, Free DOX, TPE-RSNO和TPE-RSNO+DOX 在Hepg2/ADR中的共聚焦成像分布

1. **TPE-RSNO在体内逆转多药耐药**

将200 μL Hepg2/ADR（按每20 g小鼠体重注射107个细胞悬浮液）细胞注射到小鼠右侧腋下。每天观察肿瘤生长情况，待肿瘤发育至合适大小后，进行体内抑瘤实验，考察不同处理下对小鼠的毒性和抗肿瘤作用。将接种肿瘤成功的小鼠进行分组给予治疗，TPE-RSNO组：注射TPE-RSNO (400 μM，50 μL) 12小时后注射PBS；TPE-RSNO联合DOX：注射TPE-RSNO (400 μM，50 μL) 12小时后注射游离 DOX (2 mg/kg) ；游离DOX：注射50 μL PBS的12小时后注射游离 DOX (2 mg/kg) ；PBS对照组：注射50 μL PBS的12小时后继续注射PBS，给药方式都为原位注射。给予处理的这天记录为第一天。之后每天同时记录小鼠体重和肿瘤大小。通过游标卡尺测量肿瘤大小，肿瘤体积通过公式 (L × W2)/2 计算。L是最长的肿瘤直径 (mm)，W是最短的肿瘤直径 (mm)。第21天处死小鼠，并采集肿瘤组织拍照称重和保存用于后续实验。

进一步探究各组处理后肿瘤处P-糖蛋白的表达水平，具体操作如下，在组织冷冻切片机中切下6 μm的肿瘤组织薄片置于载玻片上，然后与抗 P-糖蛋白抗体在4°C一起孵育12小时。孵育完成后使用PBS 洗涤组织切片，加入Dy649荧光分子孵育1 h，PBS洗涤3次，每次10 min，最后加入抗猝灭剂封片后在电子荧光显微镜下观察。

从图12 (B) 中关于小鼠肿瘤体积的变化可以观察到，与只给予PBS溶液的对照组相比，给予TPE-RSNO联合DOX的治疗方案可以显著抑制小鼠体内耐药肿瘤的生长；只给予TPE-RSNO或者只给予DOX治疗，两者都对小鼠肿瘤都有抑制效果，但是效果不如联合使用有效。从图12 (E) 小鼠肿瘤抑制率中可知，TPE-RSNO联合DOX在小鼠肿瘤部位具有较好的抑制效果，与其他组别相比，具有显著性差异；单独给予TPE-RSNO和单独给予DOX两者无显著性差异，但与对照组相比，具有抑制肿瘤的效果。图12 (C) 是小鼠治疗结束后采集的离体肿瘤组织，图12 (D) 是离体肿瘤组织的重量，都离体重量的结果中也能非常直观地看到TPE-RSNO联合DOX治疗之后，有效地逆转了小鼠体内肿瘤的耐药性，在对照组肿瘤组织大小还很大的时候，TPE-RSNO联合DOX组的肿瘤组织几乎只有米粒大小，这比初始第一天相比更小，这充分说明了联合用药的良好抑癌效果，图13中小鼠在治疗过程中小鼠的表观图也与这一结论一致。同时在肿瘤的治疗过程中，也通过记录体重考察各种治疗方案的安全性，从12(F) 中可以观察得到，各组之间的体重波动都比较平稳，这也说明了TPE-RSNO联合DOX组的方案是安全可行的。TPE-RSNO联合DOX在小鼠体内有较好的抑癌效果，因此治疗后的肿瘤组织也用于进一步免疫组化分析，继续探索作用机制，如图12 (G) 所示，对照组和只给予DOX组的肿瘤组织部位仍有较高水平的P-糖蛋白，而给予TPE-RSNO和TPE-RSNO联合DOX治疗之后，可以显著降低肿瘤组织部位P-糖蛋白的表达。因此，TPE-RSNO在小鼠的体内可以通过释放NO有效降低肿瘤组织P-糖蛋白的表达，TPE-RSNO单独使用时也有抑制肿瘤的效果，原因是TPE-RSNO可以在肿瘤内ROS刺激下快速释放NO，部分NO与ROS反应生成RNS，因此具有肿瘤细胞毒性。同时TPE-RSNO结构中阳离子氨基酸也可以起到破坏肿瘤细胞膜的作用，协同抑制肿瘤的增殖。但TPE-RSNO单独抑制肿瘤效果不如与DOX联合应用有较，因为联合使用在P-糖蛋白被降低之后，更多地DOX进入到肿瘤组织，充分发挥治疗效果。



图12 (A) 治疗多药耐药小鼠的示意图。(B) 治疗过程中小鼠肿瘤体积的变化曲线。(C) 离体肿瘤组织的图片。(D) 离体肿瘤组织的重量。(E) 肿瘤抑制率。(F) 小鼠的体重变化曲线。(G) 肿瘤组织中P糖蛋白的表达水平 (a) TPE-RSH, (b) Free DOX (c) TPE-RSNO 和 (d) TPE-RSNO+DOX。实验结果表示为 means ± SD, 每组*n* = 4，\**p* < 0.05

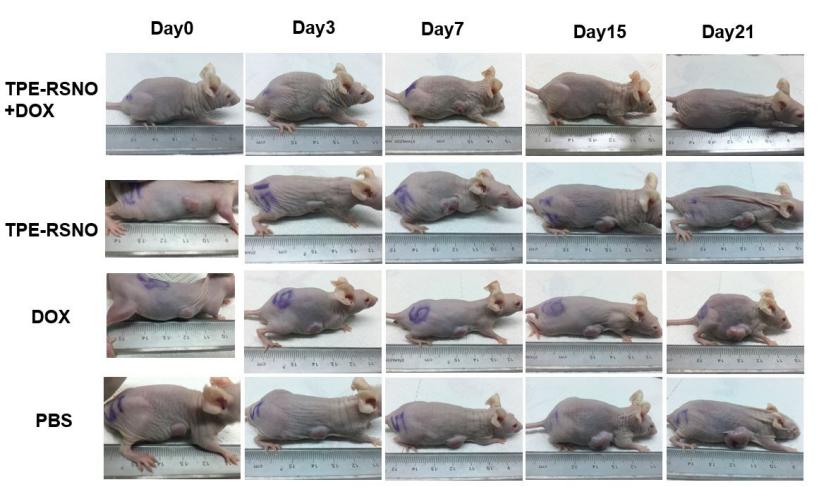


图13 Hepg2/ADR荷瘤小鼠在治疗期间的表观图

因此我们所使用的TPE-RSNO与阿霉素联合用药的策略在体内外逆转肿瘤耐药中都取得了较好的效果。此前的研究中，Yang等人也使用了NO递送系统与阿霉素联合应用来逆转MCF-7/ ADR，这种联合应用的策略同样在他们的应用中取得了较好的效果。他们将光热剂和热敏 NO 供体整合到纳米递送系统中，制备出可以用于治疗耐药癌症的近红外 (NIR) 激光触发 NO 释放的智能系统。与他们的研究相比，我们除了具有逆转多药耐药的治疗作用外，还具有实时监测外源性NO的功能，这对于NO在疾病中的治疗十分重要。之前的研究中，其他荧光探针如DAF-2-DA也可以用于体内NO的检测，但这类探针只能检测给药部位NO含量的总和，而无法特异性地识别内源性与外源性NO，外源性NO的作用含量更能指导NO的治疗情况，因此特异性地检测外源性NO对于疾病治疗至关重要，这也是我们NO递送系统的一大创新之处。在但我们目前的研究也存在可以继续改进的地方，TPE-RSNO中由于荧光基团TPE使用的波长较短，仍限制了其在临床中的应用，所以我们可以参考已经报道的其他近红外荧光基团，与其结合来继续拓展TPE-RSNO的体内应用。综上，NO递送系统与药物的联合应用在肿瘤的治疗中存在较大的潜力，如何智能化给药系统，以及个性化联合用药方案仍需我们继续努力探索，在后续的研究中，我们可以继续与其他药物以及光热动力疗法联合应用，以达到更好的治疗效果。

**三、任务书指标完成情况及成效**

对应项目任务书约定的具体研究内容，技术指标、效益指标 及工作指标的实际完成情况，以及项目研究对学科建设、行业技 术进步、新兴产业培育及社会进步、自主创新等方面的意义；获 得的经济、社会效益，通过项目研究产生的变化。

在本项目支持下，任务书中的研究任务基本完成。我们采用模块化构建策略，完成了具有释放-自报告特性的NO供体TPE-RSNO的合成与表征。此外，探索了外源性NO量效关系研究研究的新方法。同时，我们还对合成的NO供体进行了逆转肿瘤耐药性的评价，发现TPE-RSNO能提高耐药肿瘤对阿霉素的敏感性。这些研究工作为后续新型NO供体的开发奠定了基础。

考核指标也全部完成，申请人以主要通讯作者在国际重要学术期刊发表研究论文3篇，申请中国发明专利1项，获批重庆医药高等专科学校人才引进项目1项，合作培养了硕士研究生2名。论文及专利详细信息如下：

1. Pei S, Lai L, Sun W, Lu Z, Hao J, Liu Y, **Wu W\***, Guan S\*, Su X. *Bioorg. Chem.* 2024,142,106932.
2. Xiong L, Li X, Lu X, Zhang Z, Zhang Y, **Wu W\***, Wang CH\*, *Chin Chem Lett*, 2023,109384. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2023.109384>
3. Li X, Su Z, Wang C, **Wu W\***, Zhang Y\*, Wang C.\* *Drug Discov Today*. 2024,29(2),103864.
4. **伍雯**, 张焱.范颖，张久盟 中国：CN 202410331056.9
5. 重庆医高专人才引进项目，构建NO供体仿生纳米递送系统用于NO体内量效关系的研究，ygzrc2023103。

**四、项目创新点和取得的突破**

项目的主要创新点和取得的成果突破等。

本项目着力开发了一种新型的一氧化氮（NO）生物荧光材料TPE-RSNO，用作探索外源性NO在体内量效关系的工具。此举旨在提供新思路，助力突破限制外源NO疗法临床转化的技术瓶颈。项目的创新之处在于，通过释放-自报告型NO供体，实现了在体内对外源性NO的稳定而精准定量，从而阐明其量效关系，为基于外源NO递送系统的设计和构建提供了科学依据。此外，TPE-RSNO的研究成果，如其独特的荧光特性和对活性氧物种（ROS）的响应性，为肿瘤细胞中特异性地释放NO、提高药效和降低毒副作用提供了可能。尤其在与阿霉素联合应用时，它显示出逆转多药耐药肿瘤的显著潜力，这不仅提升了肿瘤治疗的精准性，也为NO递送系统的机制研究和未来荧光探针的开发提供了重要的方向。因此，该项目的研究成果不仅为外源NO疗法的发展提供了新的策略和思路，也对生物医学领域的广泛应用展示了巨大潜力。

**五、需要重点说明的内容或其他需要说明的内容**

无