

共载 siRNA 与多西他赛的透明质酸修饰的还原敏感型纳米粒质量评价

李亚楠¹, 王 珏², 李 霁³, 沈 雁^{1*}, 涂家生¹

(¹中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; ²中国食品药品检定研究院, 北京 100050;

³中国药科大学药理学教研室, 南京 210009)

摘 要 研究和评价共载特异性抑制环氧化酶(COX-2)表达的小干扰 RNA(siRNA)和多西他赛(DTX)的透明质酸修饰二硫键交联的聚乙酰亚胺(PEIs)与聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)形成的还原敏感型肿瘤靶向纳米粒(DTX/siCOX-2/HRPSP NPs)的体外质量。首先,通过溶剂挥发法制备 DTX/siCOX-2/HRPSP NPs,同时制备不含二硫键交联的透明质酸修饰的 PEI-PLGA 纳米粒(DTX/siCOX-2/HPP NPs)作为对照。结果显示,两者 NPs 呈核壳圆形,粒径处于 150~200 nm 之间,体外释放实验表明,DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 中的 DTX 在 24 h 内呈现缓释行为,且 HRPSP NPs 在 pH 5.0 中 8 h 时的累积释药量较 pH 7.4 中释药量高 10%~25%,证明酸性条件更有利于纳米粒中 DTX 的释放,具有肿瘤微环境敏感性。体外细胞摄取实验表明,当 N/P 比为 40/1,孵育时间在 14~16 h 时,纳米粒的摄取量最高,受体靶向抑制试验显示,HRPSP NPs 能特异性结合 CD44 受体,具有肿瘤细胞靶向性。最后,通过 Western blot 方法测定不同纳米粒对细胞内 Bcl-2, bax, caspase-3 和 COX-2 蛋白的相对表达效率。结果显示,实验组与对照组相比,促凋亡蛋白 bax 和 caspase-3 显著增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著下降,COX-2 蛋白的表达也相应降低,尤其以 DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 组最为明显($P < 0.01$),实现了小分子药物和 siRNA 协同特异性治疗的目的。

关键词 COX-2; 小分子干扰 RNA; 多西他赛; 纳米粒; 还原敏感; 凋亡; 聚乙酰亚胺; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)04-0429-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160407

引用本文 李亚楠,王珏,李霁,等. 共载 siRNA 与多西他赛的透明质酸修饰的还原敏感型纳米粒质量评价[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4): 429–436.

Cite this article as: LI Yanan, WANG Jue, LI Ji, et al. Co-delivery of siRNA and docetaxel by hyaluronic acid modified redox-sensitive disulfide-crosslinked nanoparticles[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(4): 429–436.

Co-delivery of siRNA and docetaxel by hyaluronic acid modified redox-sensitive disulfide-crosslinked nanoparticles

LI Yanan¹, WANG Jue², LI Ji³, SHEN Yan^{1*}, TU Jiasheng¹

¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050; ³Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The aims of this research were to constitute and evaluate one targeting anticancer co-delivery system for both micro-molecular chemotherapeutic drugs (docetaxel, DTX) and small interfering RNA (siRNA) expressed by COX-2. The nanoparticles composed of poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) bearing disulfide-linked reducible polyethyleneimine (PEIs) covered by hyaluronic acid (HA). Meanwhile, HA-PEI-PLGA nanoparticles were prepared as control. Firstly, the solvent evaporation was used to the particles which exhibited a core-shell structure with a uniform size of 150-200 nm. The cumulative drug release in two kinds of PBS media (pH 7.4 and

收稿日期 2015-07-10 *** 通信作者** Tel: 025-83271305 E-mail: shenyan19820801@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 812001182) 教育部新教师基金资助项目(No. 20130096120003); 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. JKPZ2013006)

pH 5.0) during 72 hours indicated that DTX-loaded nanoparticles had sustained-release effect within 24 hours. The cumulative release of DTX of HRPSP NPs in PBS pH 5.0 was 10%-25% more than that in PBS pH 7.4, which demonstrated that favored release of DTX from nanoparticles could be achieved in acidic tumor microenvironment. Then, the highest transfection efficiency was observed after 14-16 h incubation at N/P ratio of 40/1. Following the saturation of CD44 receptor, the mean fluorescence intensity of HRPSP NPs from the cells decreased drastically in the case of saturation with free HA before. However, there existed no significance in the fluorescence of RPSP NPs between the cells with and without saturation with free HA, which indicated the nanoparticles' targeting potential toward tumor cells. In the Western blot, the relative silencing efficiency of Bcl-2, bax, caspase-3 and COX-2 mRNA/protein was calculated. In comparison to the control group, the silence efficiencies of bax and caspase-3 were both significantly increased while that of Bcl-2 was evidently reduced, particularly in si-COX-2/HRPSP NPs group ($P < 0.01$). The similar results were obtained in the silence efficiency of COX-2 protein in which the COX-2 quantity on mRNA and protein decreased. The results suggest that the nanoparticles could achieve the synergistic effect on the combinatorial delivery of siRNA and lipophilic anti-tumor drugs.

Key words COX-2; small interfering RNA; docetaxel; nanoparticles; redox-sensitive; apoptosis; polyethyleneimine; poly (D, L-lactide-co-glycolide)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81201182); the Doctoral Fund of Youth Scholars of Ministry of Education of China (No. 20130096120003); and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKPZ2013006)

近年来,抗肿瘤药物的研究已从传统的细胞毒小分子药物延伸至特异性基因治疗、免疫治疗以及针对新靶点药物^[1]。与传统的小分子药物相比,小干扰 RNA (siRNA) 具有更高的特异性、高效性以及更短的研发周期而展示出巨大潜力^[2]。研究表明:COX-2 蛋白在多种肿瘤中呈现高表达^[3];且这种高表达状态始于肿瘤形成的早期阶段。此后 COX-2 通过促血管生成、加速肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡等在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用^[4-5]。因此,本课题选择 COX-2 siRNA (siCOX-2) 作为基因药物,将之与传统的小分子化疗药物多西他赛 (DTX) 相结合,利用二者不同的抗肿瘤机制和作用靶点达到协同治疗的目的。

纳米粒是粒径在 10 ~ 1 000 nm 之间的固体胶体颗粒,与其他给药系统相比,纳米粒通常有较高的包封率和载药量以及较好的稳定性^[6-7]。本实验组已构建了透明质酸 (HA) 修饰二硫键交联的聚乙酰亚胺 (PEI_{ss}) 与聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 形成的还原敏感肿瘤靶向纳米粒 (HRPSP NPs) 共载基因联合小分子药物抗肿瘤靶向传递系统^[8]。其中采用内源性物质透明质酸 (HA) 作为靶向基团,生物可降解且刺激性小,纳米粒中间层结构由 siRNA 和 PEI_{ss} 组成,PEI_{ss} 在保证了 siRNA 高转染效率的同时可解决高相对分子质量的 PEI 细胞毒性大且在体内无法生物降解的问题。研究

发现在很多肿瘤细胞中谷胱甘肽 (GSH) 明显升高^[9],肿瘤细胞内部的高 GSH 水平可以有效断裂二硫键从而控制 siRNA 在胞内的释放,提高基因沉默效果。疏水性内核为生物可降解材料 PLGA,生物相容性高,可包裹疏水性小分子药物,达到基因协同药物增效治疗的目的。本研究就共载 siCOX-2 和 DTX 的纳米粒进行了体外物理化学性质的评价,并对肿瘤细胞的凋亡机制进行探讨,针对肿瘤细胞凋亡中的重要蛋白进行检测,为今后的应用研究提供科学依据。

1 材料

1.1 药品和试剂

聚乙烯醇 (PVA, 日本可乐丽公司);聚(乳酸-乙醇酸)共聚物 (PLGA, M_n 1×10^4 , 50/50, 济南岱罡生物工程有限公司);多西他赛 (DTX, 西安天丰生物科技有限公司);PEI_{ss} (自制,批号 20131107);透明质酸钠 (M_n 11 kD, 山东福瑞达生物医药有限公司);非特异性 FAM-siRNA、Cy3-siRNA (南通百奥生物科技有限公司);siCOX-2 (南通百奥生物科技有限公司);DAPI 染色剂 (江苏凯基生物技术股份有限公司);胰酶 (0.25% Trypsin-EDTA) (加拿大 Gibco 公司);RPMI 1640 培养基;DMEM 培养基 (上海立菲生物技术有限公司);TRNzol Plus 裂解液 (南京铂优生物技术有限公司);2 × Taq PCR Master Mix [天根生

化科技(北京)有限公司];RAN 酶抑制剂(RNasin, 50 U/ μ L)、逆转录酶 M-mLV、DL 100 Marker(日本 Takara 公司)、Ultra SYBR Mixture(康为世纪公司)、焦碳酸二乙酯(DEPC,美国 Sigma 公司)。

1.2 仪器

ZetaPlus 激光粒度仪(美国 Brookhaven Instruments 公司);H-7650 型粒子电荷测定仪(德国 Mutek 公司);LC-20AT 泵、SPD-20A 检测器、LC Solution 工作站(日本 Shimadzu 公司);N2000 色谱工作站(浙江大学信息工程有限公司);酶标仪 Mode-1680(美国 Bio-Rad 公司);荧光倒置显微镜(德国 Zeiss 公司);流式细胞仪(德国 BD 公司)。

2 方法

2.1 DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 的制备

本实验室之前合成了二硫键交联的 PEI (PEIss, 25 kD)^[6],精密称取 PLGA (M_r 1×10^4 , 50/50) 0.2 g,加入 CH_2Cl_2 2.5 mL,丙酮 6.5 mL,室温充分溶解,另加入精密称定好的 DTX 0.2 mg,室温下静置使溶解。精密称取 PEIss 0.02 g,于丙酮 1 mL 中溶解后,加入到上述油相溶液中。配制 3% PVA 溶液和 5% 泊洛沙姆溶液各 5 mL,均匀混合形成 10 mL 水相溶液。搅拌条件下将水相溶液逐滴加入油相溶液中,混合均匀。使用超声波细胞粉碎仪将混合溶液超声 30 min。使用旋转蒸发仪(37 $^{\circ}\text{C}$)缓慢蒸发掉有机溶剂,得 PEIss-PLGA 纳米粒(RPSP NPs),将纳米粒用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。按照不同的 N/P 加入 siRNA,混匀,室温孵育 20 min,得 DTX/siRNA/RPSP NPs;再按照不同的 N/P/COOH(N/P)加入透明质酸钠,混合均匀,室温孵育 20 min,得到 DTX/siRNA/HRPSP NPs。

同法可制备空白纳米粒 RPSP NPs、HRPSP NPs;单载 siCOX-2 的纳米粒 siCOX-2/HRPSP NPs;单载 DTX 的纳米粒 DTX/HRPSP NPs。同法,用市售支链 PEI(M_r 25 kD)分别制备非二硫键交联的 PEI-PLGA 纳米粒(PP NPs)和透明质酸修饰 PEI-PLGA 纳米粒(HPP NPs)作为对照。

2.2 形态、粒径、Zeta 电位

2.2.1 形态观察 使用透射电镜(TEM)观察纳米粒的结构并拍照。

2.2.2 粒径大小、分布与 Zeta 电位 将制备好的纳米粒加适量 Hepes 溶液稀释,用动态光散射法

(DLS)测定纳米粒的粒径及其分布以及 Zeta 电位,测定波长为 657 nm,温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 包封率与载药量的测定

按照“2.1”项下方法制备 DTX/RPSP NPs 和 DTX/PP NPs,分别取 100 μL ,精密称定其质量,再分别加入乙腈 600 μL ,涡旋 2 min 混匀,15 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取少量续滤液于进样小瓶中,进样 20 μL 。液相条件如下:流动相为乙腈-水(55:45);流速为 0.8 mL/min;检测波长为 230 nm;柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$,记录色谱峰面积,用外标法计算 DTX 的包封率与载药量。方法属性良好,回收率和精密度符合要求。

2.4 载 DTX 纳米粒在不同释放介质中的释放行为

按照“2.1”项下方法制备 DTX/HRPSP NPs 和 DTX/HPP NPs。分别取 0.2 mg/mL DTX 制剂溶液 0.5 mL 于透析袋(截留相对分子质量 3.5 kD)内,两端用棉线扎紧,置于 10 mL 离心管内,各加入释放介质(pH 7.4, pH 5.0, pH 5.0 + 2.0 mmol/L GSH)4.5 mL,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器中,转速为 110 r/min,分别于 1,4,8,12,24,36,48,72 h 取释放介质 0.5 mL 于离心管中,加乙腈 0.5 mL,涡旋 5 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,过 0.22 μm 有机滤膜,弃初滤液,取续滤液于进样小瓶,于高效液相色谱仪进样,进样体积为 20 μL ,照“2.3”项下方法分别测定 8 个时间点上清液中 DTX 的浓度 c_n ($n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$),计算各时间点百分数。释放介质选取 PBS(pH 7.4)和 PBS(pH 5.0)以及 PBS(pH 5.0 + 2.0 mmol/L GSH),以研究不同释放介质对 DTX 释放行为的影响。为保证漏槽条件,释放介质加 Tween 80 增溶,每取一次样后更换一次释放介质。计算各时间点的累积释放百分数。

2.5 siRNA/HRPSP NPs 细胞转染

2.5.1 细胞的培养 SGC7901 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱饱和湿度下培养,培养基为 RPMI 1640,10% 胎牛血清,1% 双抗,传代比例 1:3。

2.5.2 纳米粒的细胞转染 转染前一天,将每孔 $4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个 SGC7901 细胞接种于 24 孔板,培养 24 h 后,吸去培养基,用 PBS(pH 7.4)洗 3 次,每孔中加入无血清 RPMI 1640 培养基 500 μL 。按照 N/P = 20/1, 40/1, 60/1, 制备 Cy3-siRNA/

HRPSP NPs, 置于 37 ℃ 细胞培养箱中转染 8, 16, 24 h。取出细胞后, 避光条件下每孔加入 PBS (pH 7.4) 适量, 洗 3 次。每孔加入 4% 多聚甲醛固定液 300 μ L, 将细胞培养板置 4 ℃ 冰箱中静置 20 min。取出后, 用 PBS (pH 7.4) 洗 3 次, 每孔加入 DAPI 染色液 (1 μ g/mL) 200 μ L 室温放置 10 min, 再加入 PBS (pH 7.4) 洗 3 次。用市售 PEI (M_r 25 kD) 水溶液及市售转染试剂 siRNA-mate 作为对照, 荧光倒置显微镜下观察并拍照。DAPI 激发波长为 340 nm (紫外), Cy3 激发波长约为 550 nm (红光)。

2.5.3 受体抑制实验纳米粒的靶向性 为验证 HA 修饰后的纳米粒在细胞水平上具有 CD44 受体靶向性, 按照“2.5.1”项下细胞培养, 先加入透明质酸钠溶液 (10 mg/mL) 与细胞在 37 ℃、5% CO₂ 条件下共孵育 1 h, 使细胞表面的 CD44 受体充分饱和。配制 RPSP NPs 和 HRPSP NPs, 加入到 CD44 过度表达的 SGC-7901 细胞中, 孵育 16 h。用不加预处理的细胞同法操作。消化收集细胞, 用流式细胞仪检测细胞内平均荧光强度, 细胞采集数为 1 万个, 以不加入药物溶液的细胞作为对照。

2.6 RT-PCR 法定量测定细胞内 COX-2 mRNA 含量

细胞总 RNA 按试剂说明常规提取, 酶标仪测定 RNA 浓度, 各取总 RNA 5 μ g, 按 RevertAid™ H. Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明合成 cDNA。根据 Real-time PCR 试剂盒说明准备反应混合物, 每孔加入样本 cDNA 1 μ L, 设置 3 孔重复。预设循环参数为: 95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 复性 20 s, 60 ℃ 延伸 1 min, 重复 60 个循环; 60 ℃ 恒温 5 min 进行 PCR 扩增。根据 Real time PCR 检测系统给出的反应管内的荧光信号达到设定域值时所经历的循环数 (Ct 值) 计算目的基因相对内参基因的比值。

2.7 Western blot 法定量测定细胞内 Bcl-2, bax, caspase-3 及 COX-2 蛋白含量

收集 SGC7901 对数生长期细胞, 提取细胞内总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。按每孔 50 μ g 的等蛋白含量上样, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分

离, 然后恒流湿转至 PVDF 膜上。TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入按比例稀释的一抗, 4 ℃ 冰箱过夜。TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。ECL 发光试剂盒暗室显色, X 线胶片压片后进行显影、定影。对条带进行扫描保存, 用 Image J 分析软件对条带进行灰度分析。

2.8 统计学处理

使用 SPSS 12.0 软件对结果进行分析, 每组实验重复 3 次, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 平均值之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异, $P < 0.01$ 为显著性差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 纳米粒的表征

由透射电镜图片 (图 1) 可知, DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 呈典型的核壳圆形结构, HRPSP NPs 的粒径约为 50 ~ 100 nm 且粒径较为均匀。而用动态激光散射法 (DLS) (图 2) 可知, 粒径为 110 ~ 220 nm, 与 HPP NPs 相比粒径稍大, 但多分散指数 (PDI) 不超过 0.12, 当按照 N/P 比 40/1 加入少量 siRNA 后, 纳米粒的粒径略增大, 电位略减小; 之后随着 HA 加入比例的增大, 纳米粒的粒径呈现先增大后减小的趋势, 而电位则出现由正到负的翻转。当电位降至 0 mV 左右时, 纳米粒的粒径也增至最大。载 DTX 的 HPP 纳米粒包封率约为 87.5%, 载药量约为 18.9%, 而 HRPSP 纳米粒的包封率为 79.5%, 载药量为 16.88%, 结果均表明其对 DTX 具有较好的包载能力。

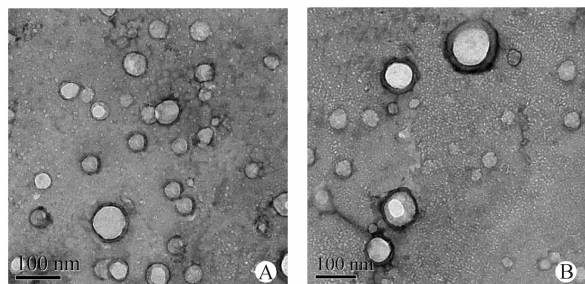


Figure 1 TEM images of nanoparticles (NPs)

A: siRNA/RPSP NPs; B: siRNA/HRPSP NPs

RPSP: PEI_{ss}-PLGA NPs; HRPSP: HA-PEI_{ss}-PLGA NPs

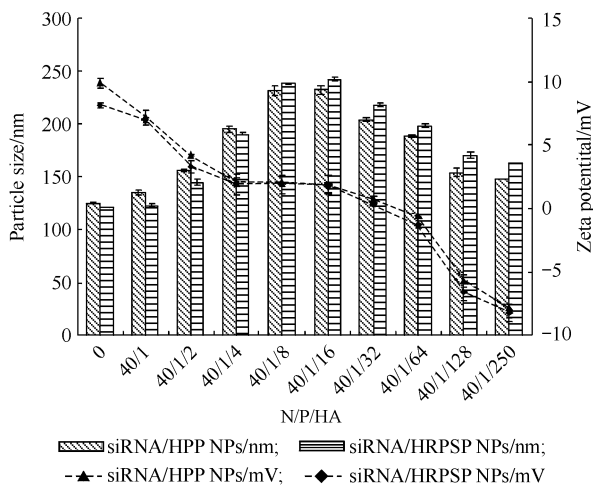


Figure 2 Particle size and Zeta potential changes of nanocomplexes with increasing hyaluronic acid (HA)

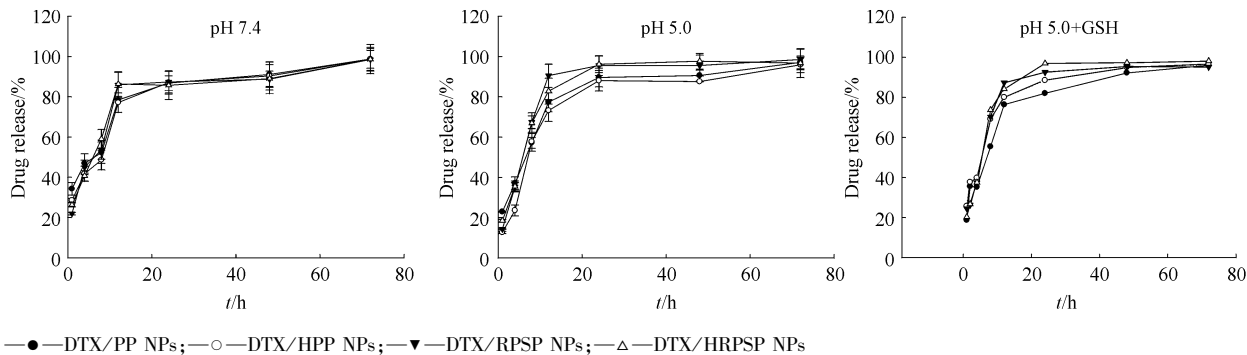


Figure 3 *In vitro* release profile of docetaxel (DTX) from DTX/PP NPs,DTX/HPP NPs,DTX/RPSP NPs,DTX/HRPSP NPs in phosphate-buffered saline (0.5% of Tween 80,pH 7.4), phosphate-buffered saline(0.5% of Tween 80,pH 5.0) and phosphate-buffered saline(0.5% of Tween 80,pH 5.0) with GSH at 37 °C
PP:PEI-PLGA NPs;HPP:HA-PEI-PLGA NPs

3.3 纳米粒的细胞转染评价

由荧光倒置显微镜图片可以看出,随着 N/P 的增大,胞内的 Cy3-siRNA 荧光强度越强,说明摄取入胞的 Cy3-siRNA 的量越多,但是当 N/P = 60/1 时,显微镜下明场视野中观察到细胞状态已受到影响,故选择 N/P = 40/1 的纳米粒为最佳载体浓度(图 4)。随着时间的延长,摄取入胞的 Cy3-siRNA 的荧光强度在 16 h 时达到最大。这是由于细胞对纳米粒的摄取需要一定的时间,转染 8 h 时 Cy3-siRNA 并未被细胞完全摄取,因而荧光较弱,而当时时间延长至 24 h 时,Cy3-siRNA 已在细胞内降解或荧光逐渐猝灭,因此观察到的荧光强度有所减弱(图 5)。HRPSP NPs 在 N/P = 40/1,16 h 的条件下转染率最高,作为细胞实验的最佳浓度和时间,呈现出较高的细胞转染效率。

受体抑制靶向性实验表明(图 6),对于加 HA

3.2 载 DTX 纳米粒在不同释放介质中的释放行为

从 4 组制剂在 2 种不同释放介质中的累积释放百分数曲线(图 3)可以看出:纳米粒中的 DTX 在 24 h 内呈现缓释释放。在 pH 7.4 的释放介质中 4 组制剂 0 ~ 8 h 时内的累积释放率在 50% ~ 60% 左右,且 HA 的修饰并未对 DTX 的释放造成显著性影响;在 pH 5.0 的释放介质中,4 组制剂在 8 h 时的累积释放率分别比 pH 7.4 介质中 8 h 内的累积释放率高出约 10% ~ 25%,组内比较后发现,HA 的加入会使释放呈现一定程度的减缓,这可能是由于外层的 HA 对内核 PLGA 具有一定的保护作用,加入 GSH 后,RPSP NPs 和 HRPSP NPs 在 pH 5.0 时释放比 PP NPs 和 RPSP NPs 快,24 h 时累积释放量高出 15%。

预先饱和后的细胞,HA 修饰的 HRPSP NPs 细胞内平均荧光强度显著下降 50%;而非 HA 修饰的 RPSP NPs 转染的细胞内平均荧光强度在 HA 饱和前后并无明显改变。

3.4 COX-2 在 mRNA 和蛋白质水平上的定量测定

由图 7-A 可以看出,市售对照组 Lipofectamine 2000/siRNA,siRNA/HPP NPs,siRNA/HRPSP NPs,对 SGC-7901 细胞转染 24 h 后胞内 COX-2 mRNA 的相对沉默率分别为 40.06%,55% 和 69.58%,因此实验组与对照组相比在 $P < 0.001$ 水平上有显著性差异,而 siRNA/HRPSP NPs 组表现出最为明显的 mRNA 下调结果。Western blot 结果显示(图 7-B),各实验组和对照组中,作为内参 β -actin 蛋白的表达未受影响。从 COX-2 蛋白抑制效果可见:DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 大于 siCOX-2/HRPSP NPs 远远大于 DTX/HRPSP NPs。从以上结果可

得:PCR 和 Western blot 法表明纳米粒转染后 COX-2 的在 mRNA 和蛋白质定量表达基本吻合一致。

3.5 Western blot 法测定纳米粒对肿瘤细胞内 Bcl-2,bax,caspase-3 表达的影响

由图 8 可见,经纳米粒转染后的 SGC-7901 细胞中 Bcl-2 蛋白的相对量均呈现不同程度的下调,同时 bax 蛋白与 caspase-3 蛋白的相对表达量均呈

现不同程度的上调,表明经纳米粒转染后具有加速肿瘤细胞凋亡的作用。这种变化在以 DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 组中表现最为明显,尤其是 bax 促凋亡蛋白有高于其余组的上调;其次为 siCOX-2/HRPSP NPs 组,再次为 DTX/HRPSP NPs。其余实验组 3 种蛋白的表现并无显著性差别。

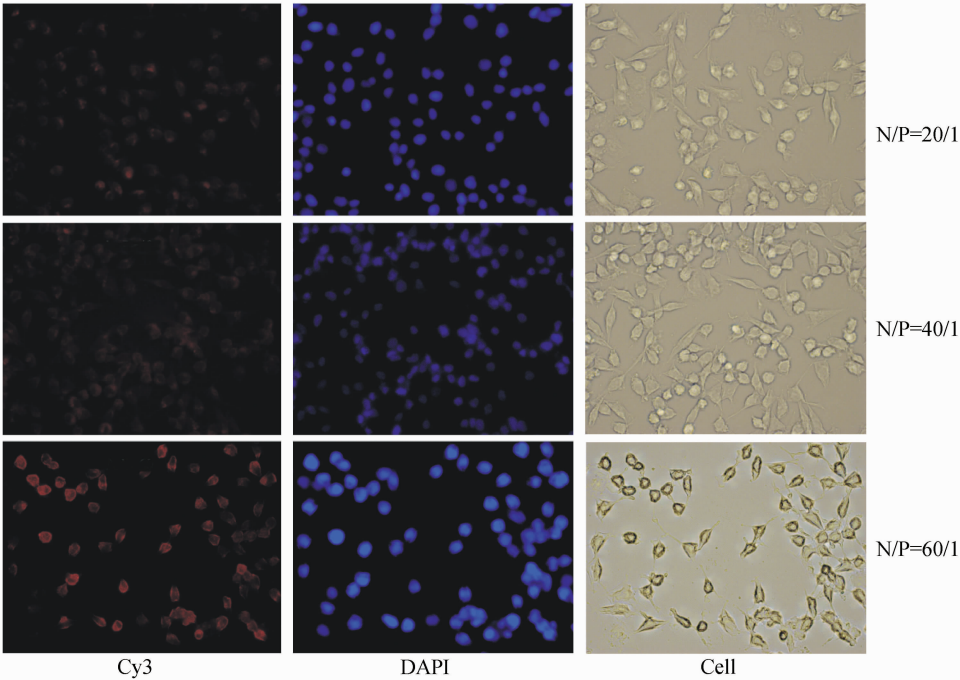


Figure 4 Cellular uptake of Cy3-siRNA from HRPSP NPs into SGC-7901 cells with increased N/P ratio

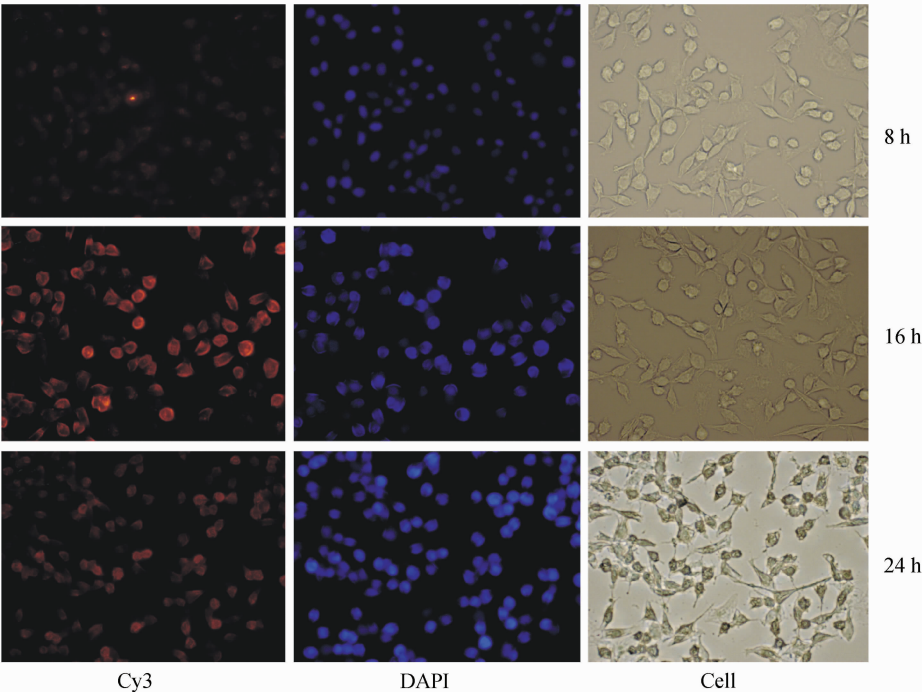


Figure 5 Cellular uptake of Cy3-siRNA from HRPSP NPs into SGC-7901 cells with N/P = 40/1 at different time

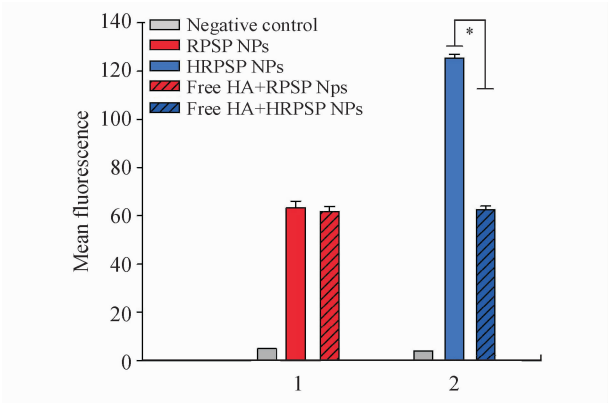


Figure 6 Comparative mean fluorescence intensity of nanoarticles by flow cytometry(* $P < 0.05$)
1: Negative control, RPSP NPs, Free HA + RPSP NPs; 2: Negative control, HRPSP NPs, Free HA + HRPSP NPs

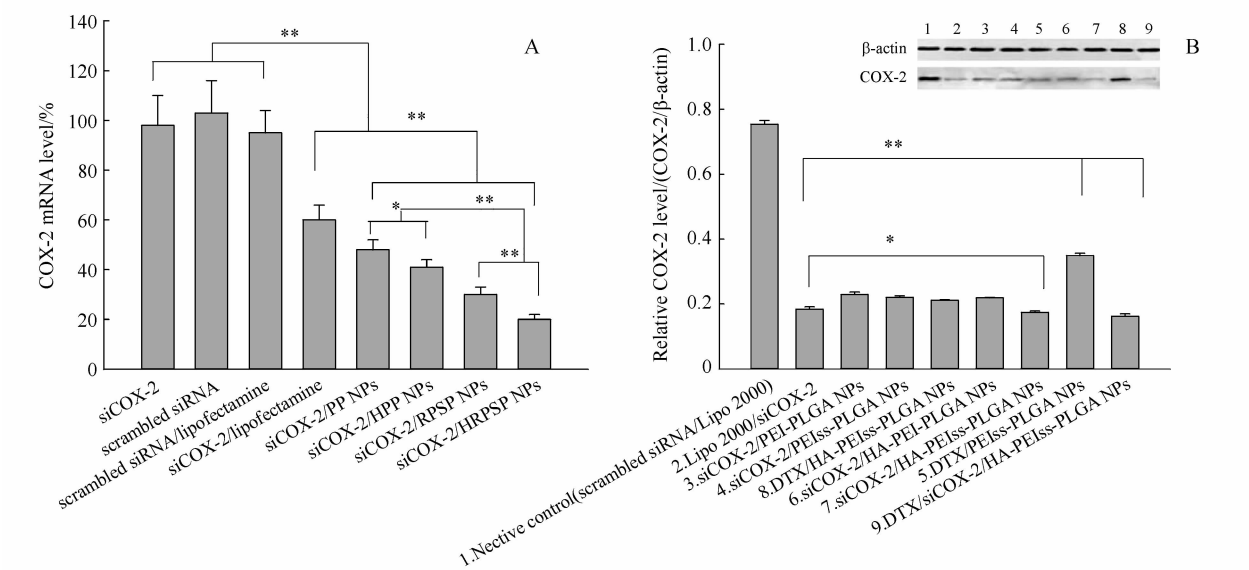


Figure 7 (A) Expression of COX-2 mRNA determined by RT-PCR. (B) Densitometry analysis of Western blots following COX-2 knockdown. The upper right corner in (B) showed the analysis of light intensities of COX-2 protein expression from Western blot results. Lane 1: Negative Control NPs (NC-NPs); Lane 2: siRNA/Lipo 2000; Lane 3: siRNA/PP NPs; Lane 4: siRNA/RPSP NPs; Lane 5: DTX/RPSP NPs; Lane 6: siRNA/HPP NPs; Lane 7: siRNA/HRPSP NPs; Lane 8: DTX/HRPSP NPs; Lane 9: siRNA/DTX/HRPSP NPs; SGC-7901 cells were transfected with siRNA/NPs at N/P of 40/1 and N/P/COOH of 40/1/2. The concentrations of siCOX-2 with Lipo 2000 (siRNA/Lipo 2000®) and NC were 100 nmol/L ($\bar{x} \pm s, n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs control group

4 讨论

通过旋转蒸发法制备的 DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 粒径在 200 nm 左右,能够通过 EPR 效应被动靶向聚集在肿瘤组织内部。HA 加入时粒径先逐渐增大主要由于形成了纳米粒的外壳,而继续增大 HA 含量,粒径却逐渐减小的原因可能是 HA 与 PEI 之间的电荷吸引力增大使纳米粒变得更加紧凑^[10]。电位为 0 mV 时粒径最大,可能是由于纳米粒表面电荷的减少从而使结构不稳定,粒径增大。此外,HA 修饰的纳米粒呈负电性能够有效地防止体内 RES 系统吞噬和脂蛋白的结合,实现在体循

环中的稳定性。

体外释放实验结果表明:在酸性条件下,DTX/HRPSP NPs 在 8 h 累积释药量可超过 80%,持续释药时间为 90 h,且前 1 h 释放 20%,具有缓释效果,但也存在明显的突释现象,比 pH 为 7.4 的情况下 8 h 累积释药量高出 10% ~ 25%,这可能是由于 PLGA 在肿瘤微环境酸性条件下的降解导致。而且在 GSH 的存在下,同一时间 HRPSP NPs 的释放高于 PP NPs,表明 GSH 对二硫键具有还原敏感性,使 PEI_{ss} 裂解释药,从而证明了该载体具有肿瘤微环境敏感性。

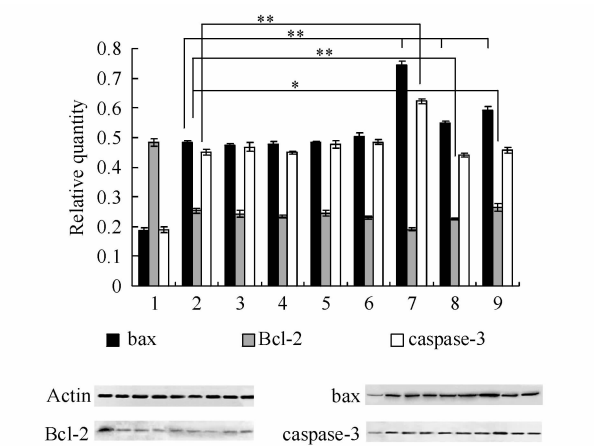


Figure 8 Relative quantity of bax, Bcl-2 and caspase-3 in SGC-7901 cells transfected by complexes for 24 h
1: Negative control (scrambled siRNA); 2: siCOX-2/Lipo 2000; 3: siCOX-2/PP NPs; 4: siCOX-2/RPSP NPs; 5: DTX/RPSP NPs; 6: siCOX-2/HPP NPs; 7: DTX/siCOX-2/HRPSP NPs; 8: DTX/HRPSP NPs; 9: siCOX-2/HRPSP NPs

细胞转染实验显示,HRPSP NPs 能有效进入细胞,具有较高的转染率,而受体靶向抑制试验显示 SGC-7901 对 HA 修饰后的 HRPSP NPs 的摄取与 CD44 受体介导有关,表明 HRPSP NPs 能通过受体信号通路选择性的与 CD44 高表达的肿瘤细胞结合实现有效转染。RT-PCR 实验结果表明 HRPSP NPs 能有效实现 COX-2 在 mRNA 水平上的降低,而 Western blot 实验表明 DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 组相比于 siCOX-2/HRPSP NPs 组在 COX-2 蛋白的表达上只有略微降低,但相比其他实验组都有明显程度的降低,从而证明该载体共载药能实现 siCOX-2 在 mRNA 和蛋白水平上的表达的干扰作用。

有研究表明,多西他赛可以加强促进肿瘤细胞凋亡,其促凋亡机制可能与上调 p53 和 p21/waf-1 基因表达以及下调 bcl-2 基因的表达有关,其对肿瘤细胞的杀伤作用主要包括诱导凋亡、坏死或其他方式的细胞死亡^[11]。但纳米粒在肿瘤细胞内 Bcl-2, bax, caspase-3 的定量测定实验结果表明, bax 蛋白与 caspase-3 蛋白的相对量均呈现不同程度的上调,而 Bcl-2 有明显的下调,尤其以 DTX/siCOX-2/HRPSP NPs 最明显,与之前的摄取和 RT-PCR 结果吻合,表明 DTX 和 siCOX-2 的共载药具有协同促进细胞凋亡的作用。

5 结 论

本研究成功构建了共载 siRNA 和多西他赛的

纳米载体,该载体内部为疏水性内核 PLGA,为疏水性药物提供疏水空间,外层为 PEIss 和 HA,使内部结构稳定,增加了肿瘤靶向能力,此系统能实现 DTX 的缓释,并有效地将基因和化疗药转染入细胞并实现 COX-2 在 mRNA 和蛋白水平上的降低,通过调节蛋白表达并加速肿瘤细胞的凋亡。

参 考 文 献

[1] Li J, Wang Y, Zhu Y, *et al.* Recent advances in delivery of drug-nucleic acid combinations for cancer treatment [J]. *J Control Release*, 2013, **172** (2) : 589 - 600.

[2] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs [J]. *Genes Deliv*, 2001, **15** (2) : 188 - 200.

[3] Foster J, Black J, LeVea C, *et al.* COX-2 expression in hepatocellular carcinoma is an initiation event; while EGF receptor expression with down-stream pathway activation is a prognostic predictor of survival [J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, **14** (2) : 752 - 758.

[4] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, *et al.* RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, **101** (1) : 25 - 33.

[5] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, *et al.* PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications [J]. *J Control Release*, 2012, **161** (2) : 505 - 522.

[6] Shen Y, Wang J, Li YN, *et al.* Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by hyaluronic acid modified redox-sensitive disulfide-crosslinked PLGA-PEI nanoparticles [J]. *RSC Adv*, 2015, **5** : 46464 - 46479. DOI: 10. 1039/C5RA03085D.

[7] Huang L, Tu JS. Advances of the graft copolymers of pullulan as pharmaceutical carriers [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46** (5) : 488 - 492.

[8] Gupta A, Srivastava S, Prasad R, *et al.* Oxidative stress in non-small cell lung cancer patients after chemotherapy: association with treatment response [J]. *Respirology*, 2010, **15** (2) : 349 - 356.

[9] Wang Y, Xu Z, Zhang R, *et al.* A facile approach to construct hyaluronic acid shielding polyplexes with improved stability and reduced cytotoxicity [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, **84** (1) : 259 - 266.

[10] Chan MW, Wong CY, Cheng AS, *et al.* Targeted inhibition of COX-2 expression by RNA interference suppresses tumor growth and potentiates chemosensitivity to cisplatin in human gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2007, **18** (6) : 1557 - 1562.

[11] Avramis VI, Nandy P, Kwock R, *et al.* Increased p21/WAF-1 and p53 protein levels following sequential three drug combination regimen of fludarabine, cytarabine and docetaxel induces apoptosis in human leukemia cells [J]. *Anticancer Res*, 1998, **18** (4A) : 2327 - 2338.