

# PEG 可脱除材料修饰 miRNA 纳米粒的制备以及 体内外性质的考察

曾叶, 周子煊, 孙逊\*

(四川大学华西药学院, 成都 610041)

**摘要** 制备 PEG 可脱除材料修饰 miRNA 纳米粒, 考察其细胞摄取以及体内分布情况。采用酰胺键缩合的方法合成可被  $\beta$ -环糊精包含的金刚烷修饰的 PEG 材料, 通过静电作用与 miR-34a 复合制得纳米粒, 加入与  $\beta$ -环糊精亲和力更高的布洛芬后可置换脱除纳米粒的 PEG 壳, 测定该 PEG 可脱除纳米粒的粒径和 Zeta 电位; 考察其在 4T1 细胞上的摄取能力以及在荷有 4T1 细胞的 BALB/c 小鼠体内的分布情况。结果显示, 可被  $\beta$ -环糊精包含的金刚烷修饰的 PEG 材料合成成功; 通过静电作用与 miR-34a 复合后制得的 PEG 可脱除纳米粒, 粒径为 107.7 nm, Zeta 电位为 15.8 mV; 相比于 PEG 未脱除的纳米粒, 被 4T1 细胞摄取的能力与在小鼠体内肿瘤部位的浓度都有显著提高, 该体系在肿瘤治疗领域的应用具有很大的潜力。

**关键词** PEG 可脱除; 基因载体; 纳米粒; MiR-34a; 4T1 细胞; 乳腺癌

**中图分类号** R944    **文献标志码** A    **文章编号** 1000-5048(2016)06-0702-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160612

**引用本文** 曾叶, 周子煊, 孙逊. PEG 可脱除材料修饰 miRNA 纳米粒的制备以及体内外性质的考察[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6): 702–707.

**Cite this article as:** ZENG Ye, ZHOU Zixuan, SUN Xun. Preparation of sheddable PEG modified miRNA-complexing nanoparticles and its preliminary *in vitro* and *in vivo* study[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(6): 702–707.

## Preparation of sheddable PEG modified miRNA-complexing nanoparticles and its preliminary *in vitro* and *in vivo* study

ZENG Ye, ZHOU Zixuan, SUN Xun\*

West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**Abstract** This study was aimed to prepare sheddable PEG modified miRNA-complexing nanoparticles and investigate *in vitro* cellular uptake effect and *in vivo* distribution profile. The sheddable PEG material was synthesized through condensation. The sheddable PEG modified miRNA-complexing nanoparticles were successfully prepared by electrostatic interaction between gene vector and miRNA, and then ibuprofen was added to deshield PEG layer. The *in vitro* cellular uptake effect and *in vivo* distribution profile of nanoparticles were investigated on 4T1 model cells. As a result, the particle size of nanoparticles was 107.7 nm and Zeta potential was 15.8 mV. Compared to unsheddable PEG group, the cellular uptake effect by 4T1 tumor cells as well as the concentration on tumor regions was significantly improved in the sheddable PEG group. Results showed that this system has a great potential application in the field of tumor treatment.

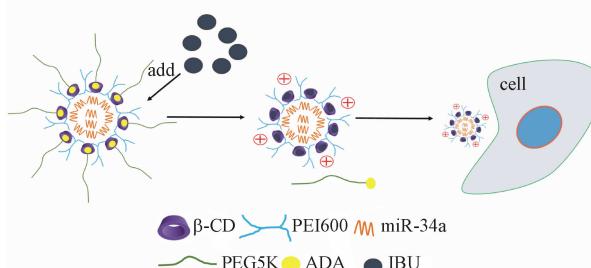
**Key words** sheddable PEG; gene vector; nanoparticles; MiR-34a; 4T1 cells; breast cancer

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81422044)

Micro-RNAs (miRNAs) 是一种内源性的、非编码的、19~25 个核苷酸的单链 RNAs, 它们要经历

以下过程: 先转录为 pre-mRNAs, 经过内切酶的切割, 细胞核转运, 最终发展成为单链成熟 miRNAs。

它们在基因表达中扮演着十分重要的角色,参与细胞的分化、增殖、凋亡以及应激反应<sup>[1]</sup>。MiR-34a是miR-34家族的一员,调控p53基因的表达,是重要的抑癌基因<sup>[2]</sup>。阳离子载体如聚乙烯亚胺(PEI)等通过静电作用能够压缩DNA,miRNAs等基因药物,制成纳米规格的粒子后能轻易通过内吞,膜融合或两者结合的方式被细胞摄取<sup>[3-4]</sup>。但当它们与负电性的血清蛋白结合后进而促进聚集作用甚至免疫细胞的吞噬作用,导致体内的不稳定性,肿瘤部位的低浓度或者炎症因子的刺激表达反应,使得它们的应用受到很大的阻碍<sup>[5-7]</sup>。将亲水性的成分例如PEGs接载到载体材料上后,能减少蛋白质的非特异性吸附,进而改善它们的药物动力学性质<sup>[8]</sup>。但是PEG化又会阻碍细胞对其的摄取<sup>[9]</sup>。因此,PEG的体内脱除尤其是肿瘤部位的去PEG化是非常必要的。利用β-环糊精(β-CD)的包合物形成原理,现合成可被β环糊精-聚乙烯亚胺(β-CD-PEI)的β-CD空腔物理包合的金刚烷-PEG(ADA-PEG),其中PEI静电复合miR-34a后形成纳米粒,PEG层暴露在外,当引入与β-CD亲和力更高的布洛芬(IBU)后可将ADA-PEG置换出来,从而暴露更多正电荷,促进肿瘤细胞对纳米粒的摄取,继而发挥更好的药效,这种PEG可脱除策略在肿瘤治疗领域是十分具有潜力的。



**Figure 1** Sheddable PEG modified miRNA-complexing nanoparticles. (β-CD: β-cyclodextrin; PEI600: Polyethylenimine MW600; miR-34a: MicroRNA-34a; PEG5K: Polyethylene glycol MW5000; ADA: Amantadine acetic acid; IBU: Ibuprofen)

## 1 材料

### 1.1 试剂

MiR-34a (5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUU-GU-3')、FITC-miR-34a、CY5-miR-34a(广州锐博生物科技有限公司);DMEM培养基(上海Hyclone公司);FBS、胰酶(上海复蒙基因生物科技有限公司);金刚烷、乙酸、ADA(美国Sigma公司);NH<sub>2</sub>-

PEG5000(北京键凯科技有限公司);布洛芬(IBU)、二环己基碳二亚胺(DCC)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

Unity Inova-400型核磁共振分析仪(美国瓦里安公司);CPA225D微量分析天平(德国赛多利斯公司);Sizer Nano ZS90型激光粒度及Zeta电位分析仪(英国Malvern公司);H-600型透射电子显微镜(日本日立公司);MCO-17AC型CO<sub>2</sub>培养箱(日本三洋公司);3K15-台式冷冻离心机(德国Sigma Laborzentrifugen公司);Canto<sup>TM</sup> FC 500流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);IVIS活体成像仪(美国Caliper Life Sciences公司);CM1950型冰冻切片机(德国Leica公司);LSM-710型共聚焦荧光显微镜(德国Zeiss公司)。

### 1.3 细胞与动物

小鼠乳腺癌(4T1)细胞购自上海ATCC;BALB/c小鼠,雌性,4~6周龄,由成都达硕动物繁殖中心提供。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

## 2 方法

### 2.1 金刚烷修饰的PEG材料的合成

β-CD修饰的PEI材料(CD-PEI600)为本课题组前期研究中合成所得<sup>[10]</sup>。精密称取金刚烷乙酸(ADA)10.2 mg,氨基末端聚乙二醇(NH<sub>2</sub>-PEG5000)25.3 mg,催化剂二环己基碳二亚胺(DCC)20.7 mg和4-二甲氨基吡啶(DMAP)14.9 mg,溶于二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)15 mL中,25℃水浴12 h。反应结束后悬干除去溶剂,再将产物溶于水中,过滤掉不溶于水的缩合剂以及副产物,于截留相对分子质量1 000的透析袋中透析2 d,再冻干,溶于CDCl<sub>3</sub>中,核磁验证(600 MHz)。

### 2.2 纳米粒的制备和粒径、电位的测定以及形态观察

称取CD-PEI600(CP600)13.1 mg,ADA-PEG15.2 mg(摩尔比为2:1),分别溶解于水5 mL中,将CP600溶液缓慢滴加于ADA-PEG溶液中,室温搅拌12 h,冻干得到ADA-PEG-CD-PEI600(APCD)。称取CP600和APCD粉末,配制成PEI部分浓度为1 mg/mL的DEPC H<sub>2</sub>O溶液,再与miRNA(miR-34a)按质量比PEI-miRNA(4:1)等体积涡旋30 s后静置0.5 h(每个样品含miRNA 10 μg),制备得到纳

米粒 CP600np (CD-PEI600/miRNA), APCDnp (APCD/miRNA), APCDnp + IBU (APCD/miRNA + IBU), 其中 APCDnp + IBU 是在制备好的 APCDnp 中加入了  $\beta$ -CD 10 倍量的布洛芬, 测量前加入 DEPC 水溶液 800  $\mu$ L 稀释后, 加入比色皿中, 调节光强度、介质参数和温度, 平衡时间 30 s 后, 重复测定 3 次。同样将稀释后的样品加入电位测定皿中, 确定无气泡后调节介质参数、温度, 平衡时间 30 s 后重复测定 3 次。纳米粒形态通过透射电镜进行考察, 将各组纳米粒放置于铜网上, 用磷钨酸染色 30 s, 用滤纸吸出多余染液, 自然风干后在 200 kV 下进行观察。

## 2.3 摄取实验

按纳米粒制备方法制备包载了 FITC-miRNA (FITC-miR-34a, FAM) 纳米粒。将生长状态良好的 4T1 细胞消化后, 按每孔  $1.0 \times 10^5$  个细胞接种于 12 孔板中, 用含 10% 胎牛血清和双抗的 DMEM 培养基于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养过夜, 至细胞融合达 85% 以上, 弃去培养基, 用灭菌后的 PBS 洗涤 3 遍, 加入无血清培养基 500 μL 和各纳米粒 50 μL (miR-34a, 2 μg)。放于孵箱中培养 2 h, 弃去培养基后, 用含 0.02% EDTA 的胰酶消化细胞, 离心 (2 000 r/min, 3 min), 用 PBS 洗涤 3 遍, 除去吸附在细胞表面的纳米粒后, 用 PBS 重悬进行流式细胞术检测。

## 2.4 体内分布

将生长状态良好并处于对数期的 4T1 细胞消化后, 按每只  $1.0 \times 10^6$  的细胞数接种于雌性 BALB/c 小鼠的腋下, 14 d 后待肿瘤长至肉眼可见。将小鼠随机分成 4 组, 每组 3 只, 分别为空白, CP600np, APCDnp, APCDnp + IBU, 其中 APCDnp + IBU 组为在给药前 30 min 内, 在小鼠瘤内注射  $\beta$ -CD 100 倍量的 IBU(每只 0.7 mg), 将 CY5-miNA(CY5-miR-34a)与 APCD 材料复合按纳米粒制备方法制备得到纳米粒。尾部静脉注射纳米粒 200  $\mu\text{L}$ (miR-34a, 每只 10  $\mu\text{g}$ ), 2 h 后处死小鼠, 解剖各脏器。在 IVIS 活体成像仪下观察。

## 2.5 纳米粒在肿瘤部位的荧光切片

将取出的肿瘤组织,用 PBS 洗涤 3 遍,吸去多余水分后用 CM1950 型冰冻切片机进行切片(每张  $8 \mu\text{m}$ ),立即用 4% 多聚甲醛避光固定 15 min。小心吸去多聚甲醛后,用 PBS 洗涤 3 次。弃去 PBS 后,滴加 FITC-鬼笔环肽染液 200  $\mu\text{L}$ (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),进行细胞骨架染色,室温染色 30 min,再用 PBS 洗

涤3次,用DAPI染液200 μL(2 μg/mL)覆盖切片,室温避光孵育5 min。小心吸去溶液,再用PBS小心洗涤切片3次后,于共聚焦荧光显微镜下观察CY5荧光的分布。

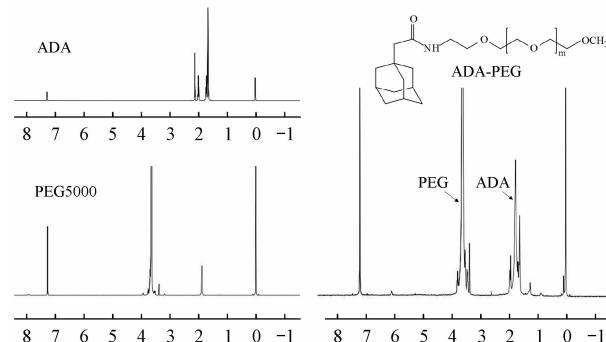
## 2.6 结果分析

数据采用 Prism 6.0 软件的 One-Way ANOVA 检验各组间差异,  $P < 0.05$  代表具有显著性差异,  $P < 0.01$  代表具有统计学极显著差异。

### 3 结果与讨论

### 3.1 金刚烷修饰的 PEG 材料的合成验证

金刚烷修饰的 PEG(ADA-PEG)材料的核磁图如图2所示,产生了3.6~3.8和1.7~1.9的信号峰,分别是PEG( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ )和ADA( $\text{CH}_2\text{CH}$ )的特征峰,证实了合成产物ADA-PEG材料的正确性。



**Figure 2**  $^1\text{H}$  NMR analysis of ADA-PEG

### 3.2 粒径、电位以及电镜图

依靠静电复合得到的纳米粒的各粒径如下: CP600np 为  $(90.8 \pm 2.9)$  nm, 小于 PEG 未脱除的粒径为  $(128.0 \pm 3.7)$  nm 的 APCDnp, 而 APCDnp + IBU 的粒径为  $(107.7 \pm 1.5)$  nm, 大于 CP600np 且小于 APCDnp, 这是因为 PEG 的引入使得纳米粒的水合半径增大, 所以 APCDnp 的粒径最大, 而加入了  $\beta$ -CD 10 倍量的布洛芬(IBU)后的纳米粒 APCDnp + IBU, IBU 可以竞争  $\beta$ -CD 的空腔 (IBU,  $\beta$ -CD 包合物形成常数 M-1(越大表示越容易形成包合物): IBU > 2 500, ADA: 501)<sup>[11]</sup>, 所以当 PEG 脱除后粒径逐渐恢复到 CP600np 的大小, 但是 PEG 的不完全脱除导致 APCDnp + IBU 略大于 CP600np。纳米粒的电镜图与激光粒度仪测得的结果相一致(图 3)。从 Zeta 来看也有相同的趋势, 未 PEG 化的 CP600np 所带的正电荷最多, Zeta 电位为  $(18.3 \pm 2.4)$  mV, 而 PEG 化后, PEG 屏蔽了部分正电荷, 所以 APCDnp 的 Zeta 电位为  $(10.7 \pm 1.8)$  mV, PEG 不完全脱除

的APCDnp+IBU的Zeta电位为( $15.8 \pm 3.2$ )mV,介于CP600np和APCDnp间。

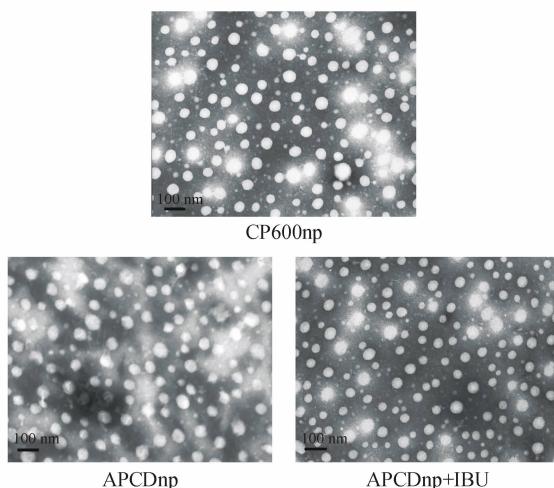


Figure 3 Transmission electron micrographs of different nanoparticles

Table 1 Size and Zeta potential of different nanoparticles

Nanoparticle	Size/nm	PDI	Zeta-potential/mV
CP600np	$90.8 \pm 2.9$	0.280	$18.3 \pm 2.4$
APCDnp	$128.0 \pm 3.7$	0.213	$10.7 \pm 1.8$
APCDnp+IBU	$107.7 \pm 1.5$	0.181	$15.8 \pm 3.2$

### 3.3 纳米粒的细胞摄取

由流式细胞仪测得的4T1细胞摄取结果如图

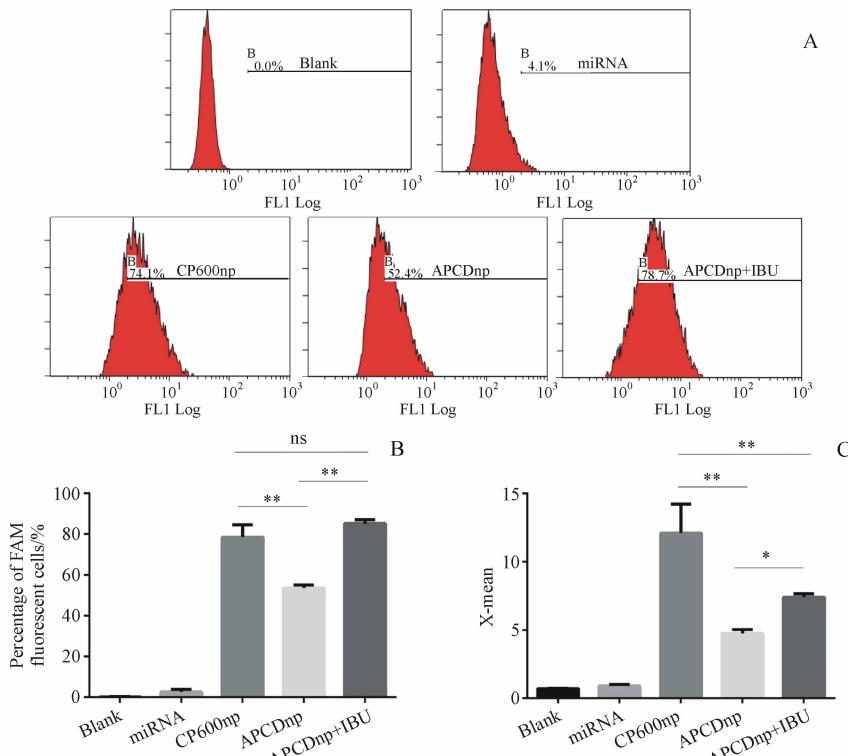


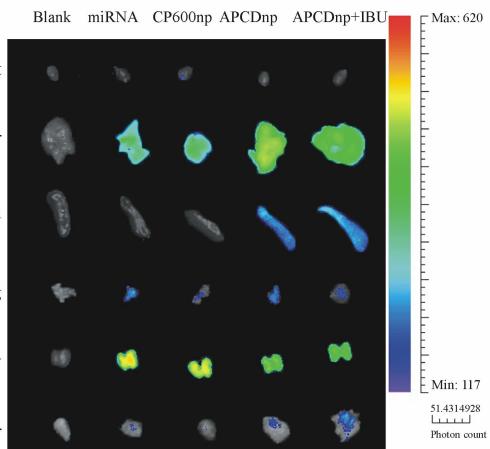
Figure 4 Percentage of fluorescent cells (A and B) and the fluorescence intensity (C) of CP600np, APCDnp, and APCDnp+IBU uptake by 4T1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

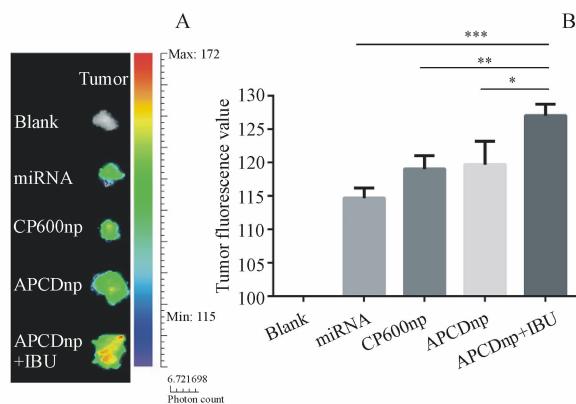
所示:APCDnp+IBU的摄取阳性率基本与CP600np相当,但显著高于APCDnp组,说明加入与 $\beta$ -CD包含物形成常数更高的IBU后,IBU竞争性的亲和 $\beta$ -CD空腔,将包含物形成常数较低的ADA-PEG置换下来,暴露出更多的正电荷,结构类似于CP600np,因此其摄取进入细胞的纳米粒与CP600np相当。在表示荧光强度的X-mean值的比较中,CP600np最高,因为其所带的正电荷最多,与带负电的细胞膜作用程度更高;APCDnp+IBU组的X-mean值则低于阳离子的CP600np,但是却明显高于APCDnp组,说明PEG可脱除的纳米粒有助于肿瘤细胞的摄取。

### 3.4 纳米粒的体内分布

体内分布结果如图5所示,总体来看纳米粒主要分布在肝、肾等代谢器官,肿瘤部位相对较低,但当对肿瘤组织进行荧光拍摄可见(图6),荧光强度排序为APCDnp+IBU组最高,APCDnp基本与CP600np,miRNA溶液相接近,说明当加入了包含物形成常数更高的IBU后,可以有效脱除PEG,从而暴露更多的正电荷,摄取进入细胞的纳米粒的数量亦更多。



**Figure 5** *Ex vivo* imaging of the tumor and organs excised from mice bearing 4T1 xenografts at 2 h after injection of nanoparticles



**Figure 6** A: *Ex vivo* imaging of the tumor excised from mice bearing 4T1 xenografts at 2 h after injection of nanoparticles; B: Semi-quantification of CY5-miRNA fluorescence in the tumor as performed with 4T1 bearing mice by the fluorescence value ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

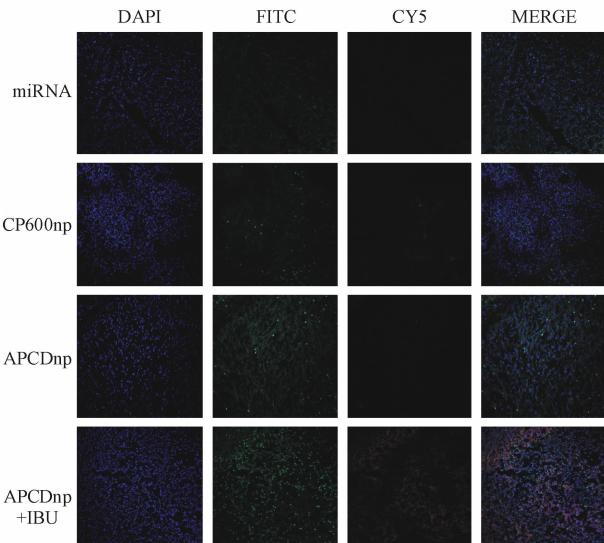
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

### 3.5 纳米粒的肿瘤荧光切片

进一步对纳米粒在肿瘤部位的分布进行荧光显微镜考察,从图7可以看出,APCDnp + IBU组的荧光强度最高,miRNA最弱,APCDnp荧光强度基本与CP600np相当且荧光较弱。说明了PEG的脱除有助于纳米粒摄取进入细胞内,这与流式细胞术的结果相一致,再次说明该PEG脱除策略可以增加药物在肿瘤部位的浓度。

## 4 结论

采用静电复合制备的可脱除PEG的miRNA纳米粒APCDnp + IBU,粒径在纳米级别,PDI较小,适合静脉给药。在纳米粒的表面引入PEG后



**Figure 7** Tumor section observed under confocal microscopy. Fluorescence micrographs of tumor tissue sections taken from mice bearing 4T1 xenografts at 2 h after intravenous injection of CP600, APCDnp, and APCDnp + IBU. The cell nuclei were stained with DAPI (blue) and red fluorescence represent CY5-miRNA ( $\times 100$ )

可以减少非特异性吸附,同时在肿瘤部位脱除PEG壳从而增加肿瘤细胞对纳米粒的摄取,继而发挥更好的抗肿瘤效应。从流式细胞术检测肿瘤细胞对纳米粒的摄取情况来看,PEG可脱除的纳米粒APCDnp + IBU组基本能达到与未PEG化的阳离子纳米粒CP600np的摄取水平,显著高于PEG未脱除的APCDnp组,且在体内分布实验可看出APCDnp + IBU的肿瘤分布也是要高于阳离子CP600np和PEG未脱除的APCDnp组,说明肿瘤部位PEG可脱除的设计能达到提高肿瘤部位药物浓度的目的,接下来将进一步考察其体内外药效学。

## 参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, **136**(2): 215–233.
- [2] Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way [J]. *Cell*, 2009, **136**(4): 586–591.
- [3] Zhu L, Mahato RI. Targeted delivery of siRNA to hepatocytes and hepatic stellate cells by bioconjugation [J]. *Bioconjug Chem*, 2010, **21**(11): 2119–2127.
- [4] Li FY, Zhou JP, Wu XM, et al. Formula optimization and transfection efficiency of polyethyleneimine/DNA complexes [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2010, **41**(1): 40–44.

- [5] Dash PR, Read ML, Barrett LB, et al. Factors affecting blood clearance and *in vivo* distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(4):643–650.
- [6] Caplen NJ. Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression:the impact of RNA interference [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(16):1241–1248.
- [7] Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. Cancer gene therapy:hard lessons and new courses [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(7):2–8.
- [8] Li YH, Zong L, Zhu JB, et al. Formulation optimization of PEGylated cationic liposomes as siRNA delivery system [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2011, 42(5):412–417.
- [9] Mishra S, Webster P, Davis ME, et al. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles [J]. *Eur J Cell Biol*, 2004, 83(3):97–111.
- [10] Pun SH, Bellocq NC, Liu A, et al. Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery [J]. *Bioconjug Chem*, 2004, 15(4):831–840.
- [11] Larsen KL, Endo T, Ueda H, et al. Inclusion complex formation constants of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\varepsilon$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - and  $\theta$ -cyclodextrins determined with capillary zone electrophoresis [J]. *Carbohydr Res*, 1998, 309(309):153–159.

· 新药信息 ·

2015年中国公立医疗机构抗肿瘤药品种 TOP20

排名	产品名称	企业名称	2015年销售额(万元)	2015年增长率(%)
1	注射用紫杉醇脂质体	南京绿叶思科药业	215081	22.19
2	替吉奥胶囊	山东新时代药业	204 579	15.38
3	利妥昔单抗注射液	罗氏	195 064	12.87
4	卡培他滨片	罗氏	175 824	2.33
5	多西他赛注射液	江苏恒瑞医药	170 877	5.71
6	注射用曲妥珠单抗	罗氏	163 572	22.65
7	注射用培美曲塞二钠	江苏豪森药业集团	150 527	6.45
8	注射用盐酸吉西他滨	江苏豪森药业集团	144 993	6.13
9	甲磺酸伊马替尼片	诺华	136 936	8.46
10	注射用培美曲塞二钠	齐鲁制药	125 899	3.27
11	吉非替尼片	阿斯利康	125 388	9.82
12	注射用奥沙利铂	赛诺菲	117 116	8.91
13	注射用奥沙利铂	江苏恒瑞医药	95 441	3.72
14	多西他赛注射液	齐鲁制药	90 421	16.41
15	贝伐珠单抗注射液	罗氏	89 005	17.35
16	注射用盐酸伊立替康	江苏恒瑞医药	84 394	13.08
17	斑蝥酸钠维生素B6注射液	贵州柏强制药	80 915	9.94
18	乌苯美司胶囊	浙江普洛康裕制药	75 961	18.84
18	多西他赛注射液	赛诺菲	75 254	11.51
20	注射用盐酸吡柔比星	深圳万乐药业	68 621	3.38

(数据来源:米内网)