

生物矿化的白蛋白/siRNA 纳米粒的构建和胞质递送效率研究

邹志文, 吴锦慧*

(南京大学医学院, 南京 210093)

摘要 解决小干扰 RNA (siRNA) 载体在胞质递送效率与生物相容性之间的矛盾是推动 siRNA 疗法临床转化的关键。本研究使用牛血清白蛋白 (BSA) 和人体必需的金属离子, 构建了一种生物相容性高、可完全生物降解的 siRNA 递送载体 $\text{MnCO}_3\text{@BSA/Zn}^{2+}/\text{siRNA}$ (MRna)。该载体利用 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 与生物大分子 (BSA 和 siRNA) 的高亲和力, 通过水相“一锅法”自组装和生物矿化反应完成了对 siRNA 的荷载和保护, 实现了近 90% 的 siRNA 封装率。同时, MRna 能够在内体环境中快速崩解使 siRNA 释放约 55%, 并通过介导“质子海绵效应”促进 siRNA 内体逃逸, 使 siRNA 与溶酶体定位系数仅 0.18。最终, 荷载了 CD47 siRNA 的 MRna 可在 mRNA 和蛋白水平有效降低肿瘤细胞 CD47 表达, 基因沉默效率达到 52%, 转染效果与商业试剂 Lipo2000 相近。本研究为 siRNA 递送系统的设计提供了一种更加简单、高效的策略。

关键词 siRNA; Zn^{2+} ; Mn^{2+} ; BSA; 自组装; 生物矿化

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2025)03-0321-08

doi: [10.11665/j.issn.1000-5048.2024072202](https://doi.org/10.11665/j.issn.1000-5048.2024072202)

引用本文 邹志文, 吴锦慧. 生物矿化的白蛋白/siRNA 纳米粒的构建和胞质递送效率研究 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(3): 321–328.

Cite this article as: ZOU Zhiwen, WU Jinhui. Construction and cytosolic delivery efficiency study of biom mineralized albumin/siRNA nanoparticles[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(3): 321–328.

Construction and cytosolic delivery efficiency study of biom mineralized albumin/siRNA nanoparticles

ZOU Zhiwen, WU Jinhui*

Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract Resolving the conflict between cytoplasmic delivery efficiency and biocompatibility of small interfering RNA (siRNA) carriers is crucial for the clinical translation of siRNA therapies. In this study, we developed a highly biocompatible and fully biodegradable siRNA delivery system, $\text{MnCO}_3\text{@BSA/Zn}^{2+}/\text{siRNA}$ (MRna), using bovine serum albumin (BSA) and essential metal ions. This carrier leverages the high affinity of Zn^{2+} and Mn^{2+} for biomolecules (BSA and siRNA) to achieve siRNA loading and protection through a water-phase “one-pot” self-assembly and biom mineralization process, achieving a 90% siRNA encapsulation rate. Additionally, the nanoscale mineral particles allow rapid disintegration in the endosomal environment to release 55% of siRNA and facilitate its endosomal escape by mediating the “proton sponge effect”. Therefore, the colocalization coefficient of siRNA with the lysosome is only 0.18. Ultimately, MRna loaded with CD47 siRNA effectively reduces CD47 expression at both mRNA and protein levels in tumor cells to lower than 50% of the original, showing efficiency comparable to the commercial transfection reagent Lipo2000. Overall, this study provides a more convenient, efficient and biocompatible strategy for designing siRNA delivery systems.

Key words siRNA; Zn^{2+} ; Mn^{2+} ; BSA; self-assembly; biom mineralization

RNA 干扰(RNAi)疗法作为一种新兴的基因沉默技术,可直接降解靶蛋白的 mRNA,为遗传性疾病、癌症等重大疾病的治疗提供了高效且特异的解

决方案,展现出独特的临床应用潜力^[1]。相比于其他 RNAi 手段,小干扰 RNA(siRNA)因其高序列特异性、有效性和设计合成的便捷性,成为了基因沉

默研究和治疗应用中的重要工具。然而, siRNA 从给药到进入胞质发挥作用的过程中面临着胞外酶降解、跨膜困难以及胞内溶酶体降解等一系列挑战^[2]。这些障碍极大地限制了 siRNA 疗法的基因沉默效果及其临床应用的前景。

近年来, 研究人员开发了多种核酸载体以克服 siRNA 递送过程中的挑战, 主要包括脂质纳米载体^[3]、聚合物纳米载体^[4]以及无机纳米载体^[5]。为了荷载和保护 siRNA 并介导内体/溶酶体逃逸, 这些载体通常需使用 1,2-二油酰-3-三甲基氯化铵丙酮 (DOTAP)、聚乙烯亚胺 (PEI)、聚-L-赖氨酸 (PLL) 等阳离子材料^[6-7]。由于带有高密度的正电荷, 这些材料能够与血清蛋白、胞内蛋白以及生物膜中的磷脂等带负电荷的生物分子发生相互作用, 引发炎症反应^[8-9]。在临床试验中, 使用阳离子材料设计的 siRNA 递送载体如 CALAA-01 (聚合物载体)^[10] 和 TKM-ApoB (脂质纳米粒)^[11] 等大多因为严重免疫反应而失败。为了提高载体的生物相容性, 常常采用以下两种方法: 一是将阳离子材料与其他亲水性聚合物结合, 形成共嵌段聚合物^[12]; 二是将阳离子材料与其他阴离子材料组合使用以屏蔽其正电荷^[13-14]。然而, 这不仅会降低 siRNA 的内体逃逸效率, 也使得载体的组分更加复杂, 进而可能带来其他的免疫原性和代谢毒性问题。因此, 解决 siRNA 递送载体的胞质递送效率与生物相容性之间的矛盾对于促进 siRNA 疗法的临床转化具有重要意义。

本研究基于金属-大分子配位和生物矿化原理开发了一种兼具高效胞质递送能力和优良生物相容性的核酸递送系统 $\text{MnCO}_3@ \text{BSA}/\text{Zn}^{2+}/\text{siRNA}$ (MRna) (图 1)。该系统以牛血清白蛋白 (BSA) 为主要原料, 利用微量的 Zn^{2+} (1 mmol/L) 驱动 siRNA 和 BSA 发生自组装^[15-16], 进而实现 siRNA 的荷载。在

热力学上, BSA 蛋白和 siRNA 分子均含有多种电子供体基团 (如巯基、氨基、羟基、磷酸基), 且不同基团与 Zn^{2+} 的结合能力存在显著差异; 由于在 Zn^{2+} 的可配位空间范围内单个 BSA 或 siRNA 分子内通常不存在多个强结合位点, 因此 Zn^{2+} 倾向于作为“分子桥梁”连接不同生物大分子, 形成 3 种可能结构: $\text{BSA}-\text{Zn}^{2+}-\text{BSA}$ 、 $\text{BSA}-\text{Zn}^{2+}-\text{RNA}$ 、 $\text{RNA}-\text{Zn}^{2+}-\text{RNA}$ 。在动力学上, BSA 分子直径较大 (6~9 nm), 而 siRNA 尺寸较小 (直径 2 nm, 长度 6 nm), 后者具有更低的空间位阻, 使得 $\text{BSA}-\text{Zn}^{2+}-\text{RNA}$ 的桥联结构比 $\text{BSA}-\text{Zn}^{2+}-\text{BSA}$ 更容易形成 (尺寸效应); 同时, 体系中 BSA 的物质的量浓度显著高于 RNA, 因此 BSA 参与的桥联结构 $\text{BSA}-\text{Zn}^{2+}-\text{RNA}$ 的形成概率远高于 $\text{RNA}-\text{Zn}^{2+}-\text{RNA}$ 结构 (浓度优势)。综合上述因素, 经过长时间反应和平衡后, 体系中将主要形成优势“构象” $\text{BSA}-\text{Zn}^{2+}-\text{RNA}$ 。随着 BSA 不断螯合 Zn^{2+} , 其分子内氢键因 Zn^{2+} 竞争性结合而被破坏, 导致疏水残基暴露, 进而通过疏水自组装形成 $\text{Zn}^{2+}@ \text{BSA}/\text{siRNA}$ 纳米簇。随后, 利用 Mn^{2+} 与蛋白的高亲和力^[17] 对纳米簇进行矿化 (MnCO_3), 得到能够在体液环境中稳定分散并保护 siRNA 免于核酸酶降解的 MRna。理论上, 纳米级碳酸盐矿物组分能够在酸性条件下快速溶解, 释放 siRNA 的同时引发质子海绵效应, 协助 siRNA 内体逃逸^[18-19]。此外, 简单的组分和水相“一锅法”合成步骤最大限度地减少了载体制备过程中可能引入的免疫原性和细胞毒性风险。综上, 本研究对 MRna 的结构组成、理化性质和核酸包封及释放行为进行了全面的探究。同时, 也从细胞毒性、细胞摄取及胞内转运和转染效率等方面对 MRna 的核酸递送能力进行了多角度的评价, 为进行后续的体内应用研究提供了基础。

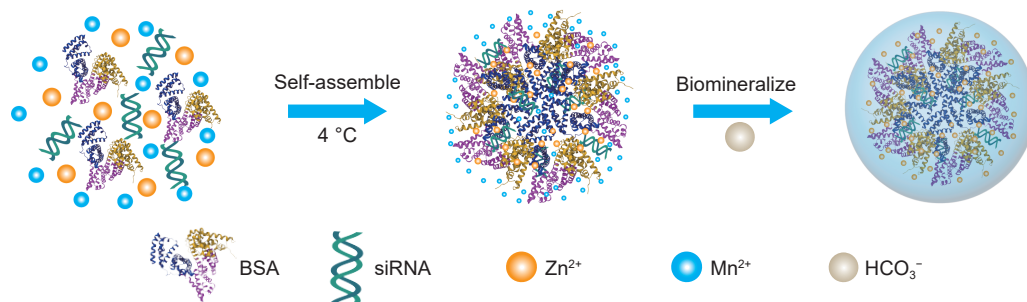


Figure 1 Scheme of the preparation procedure of $\text{MnCO}_3@ \text{BSA}/\text{Zn}^{2+}/\text{siRNA}$ (MRna) nanoparticle through self-assembly of Zn^{2+} with BSA/siRNA and subsequent biom mineralization via Mn^{2+} and HCO_3^- .

1 材 料

1.1 试 剂

异硫氰酸荧光素干粉(FITC, 阿拉丁生化科技有限公司); 牛血清白蛋白(BSA, 国药集团化学试剂有限公司); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, 国药集团化学试剂有限公司); 透析袋(MACO 3 kD, 深圳市益百顺科技有限公司); Cy3 荧光标记的 siRNA、CD47 siRNA、Lipofectamine[®] 2000 Reagent(上海吉玛生物制药有限公司); 胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基(上海臻诺生物科技有限公司); BCA 试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF 溶液、蛋白磷酸酶抑制剂、5×蛋白上样缓冲液、ECL 发光液(上海赛抑生物科技有限公司); 逆转录试剂盒 AB Script III RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover、qPCR 试剂盒 2X Universal SYBR Green Fast Mix(武汉爱博泰克生物科技有限公司); RNA 提取试剂盒 FreeZol Reagent(R711)、细胞凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司); 兔源 CD47 一抗、辣根过氧化物酶标记的 GAPDH 兔源一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、Hoechst 33342、溶酶体绿色荧光探针、钙黄绿素(上海碧云天生物技术有限公司); PE-Anti-mouse CD47 流式抗体(美国 BioLegend 公司)。本研究所用其余化学品及试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

Tecnai G2 Spirit 透射电镜(美国 FEI 公司); Synergy H1 酶标仪(美国 Biotek 有限公司); LSR Fortessa 流式细胞仪(美国 BD 公司); ChemiScope 5100 化学发光凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); Leica TCS SP8 STED 超高分辨激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); 凝胶电泳仪 Mini-PROTEAN Trtra(美国 Bio-Rad 有限公司); 粒度仪 ZetaSizer Nano ZS(英国 Malvern 有限公司)。

1.3 细 胞

研究所用的细胞 BALB/c 小鼠结直肠癌细胞 CT26 购自 ATCC 细胞库。细胞培养于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中, 培养液为含 1% 双抗灭菌液及 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

2 方 法

2.1 载体的制备

取透析袋(MWCO 3 kD)于去离子水中煮沸

20 min 活化。将 BSA 干粉 5 mg 和 siRNA 132 μg(4 OD) 溶于去离子水 5 mL 中, 转移至透析袋中, 在透析袋中加入磁力搅拌子, 以棉线封闭两端。将透析袋置于 250 mL 含 1 mmol/L 醋酸锌和 2 mmol/L 氯化锰的溶液中, 在 800 r/min 搅拌下室温反应 12 h。随后, 将液体转移至西林瓶中, 在冰水浴和剧烈搅拌(1000 r/min)下快速加入 HEPES (1 mol/L, pH8.5) 600 μL 后再缓慢滴加 NaHCO₃ 缓冲液(0.5 mmol/L, pH8.5) 200 μL, 反应 24 h。反应结束后, 液体经 11200 r/min 室温离心 15 min, 收集沉淀, 以去离子水洗涤沉淀 3 次, 最终以 1 mL 去离子水重悬分散, 于 4 °C 下保存。

为了验证载体的组成, 制备 FITC-BSA: 称取 FITC 粉末 2 mg 和 BSA 80 mg 溶解在 pH9.6 的 CBS 缓冲液 10 mL 中, 室温避光搅拌 24 h^[20]; 反应完成后, 以去离子水透析(MWCO 8 kD) 24 h, 冻干后备用。

2.2 透射电镜及能谱分析

透射电镜铜网亲水化处理后, 滴加载体(2 mg/mL) 10 μL 于铜网的碳面, 静置 2 min 后以滤纸吸去多余液体, 置于红外灯下烘烤 10 min。最后在 200 kV 透射电镜下观察载体的形态并透射电镜中的 EDS 功能模块分析其元素组装。

2.3 BSA 和 RNA 共定位

使用 Cy3-siRNA 和 FITC-BSA 制备 MRna。将载体(2 mg/mL) 10 μL 与 4% 黄原胶 10 μL 混合均匀后滴加于载玻片上, 盖上盖玻片, 吸干多余液体, 使用共聚焦显微镜的 STED 模块, 拍摄记录 FITC 和 Cy3 信号的定位情况。

2.4 制剂的粒径和电位测定

反应过程中, 分别在矿化反应前后取样, 使用粒度仪检测、收集粒径和电位数据。

2.5 核酸的稳定性检测

载体离心后, 弃去上清液, 以含 20%FBS 的 PBS 重悬至 1 mg/mL, 于 37 °C 下放置, 并在 0、6、12、24、48 h 时间点处取样。取游离的 siRNA 加入到 20%FBS 的 PBS 中, 使其 RNA 终浓度与载体溶液相同, 于相同时间点取样, 作为阴性对照。载体样品以 13000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 沉淀以 10 mmol/L EDTA(pH7.4) 溶液复悬以使载体崩解。各样品与核酸上样缓冲液混匀后, 使用琼脂糖凝胶电泳分离核酸, 利用凝胶成像系统观察核酸

条带。

2.6 核酸的释放检测

载体离心后分别以 pH7.4、pH6.5 和 pH5.5 的 PBS(10 mmol/L)缓冲溶液复悬并转移至透析袋(MWCO 3 kD)中,随后置于相同 pH 的 PBS(10 mmol/L)缓冲液 5 mL 中室温条件下透析 4 h。取等量载体离心后以 10 mmol/L EDTA 溶液崩解,作为阳性对照组(完全释放),取游离 siRNA 与 Lipo2000 混合后作为阴性对照,其游离 siRNA 溶解于无 RNA 的酶水中作为空白对照。取透析袋内样品和对照品取样各 10 μ L,使用琼脂糖凝胶电泳分离核酸,利用凝胶成像系统观察核酸条带。

2.7 细胞增殖毒性测定

CT26 细胞以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中,培养 24 h。MRna 溶液以完全培养基稀释,使其 RNA 终浓度分别为 0.25、50、100、200 nmol/L。以含制剂的培养基替换原有培养基,培养 24 h 后。随后,弃去培养基,加入含 10% CCK-8 的空白培养基,孵育 30 min 后使用酶标仪检测细胞活力。

2.8 细胞凋亡实验

CT26 细胞以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板中,培养 12 h。向各孔中加入 MRna 使 RNA 终浓度分别为 100、150、200 nmol/L,培养 24 h。弃去培养基,收集细胞并以预冷 PBS 洗涤 2 次。离心收集细胞加入结合缓冲液 100 μ L 重悬,加入 Annexin V-FITC 5 μ L 和 PI 染液 5 μ L,轻轻吹匀,室温避光孵育 10 min 后加入 1 \times 结合缓冲液 400 μ L,轻轻混匀。染色后的细胞在 1 h 内用流式细胞仪检测。

2.9 细胞摄取实验

CT26 细胞以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板中,培养 24 h。弃去原有的培养基,加入空白培养基饥饿处理 30 min 后,分别加入等体积的 PBS(空白对照)、游离 Cy3-siRNA(阴性对照)、MRna-Cy3、Cy3-siRNA+Lipo2000 混合液(阳性对照),RNA 终浓度均为 100 nmol/L。孵育 4 h 后,弃去细胞培养基,以 PBS 将细胞吹下后收集于 1.5 mL EP 管中,离心收集细胞,以预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,最终以 PBS 400 μ L 将细胞重悬,使用流式细胞仪检测细胞的 Cy3 荧光强度。

2.10 溶酶体逃逸实验

CT26 细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于

共聚焦小皿中,培养 24 h。细胞以“2.9”项中相同的方式给药、孵育后,弃去培养基,以 PBS 漂洗 3 次。随后,加入溶酶体绿色荧光探针工作液,于细胞培养箱中孵育 30 min。弃去工作液,以 PBS 漂洗细胞 3 次。加入细胞核染料 Hoechst 33342,室温避光放置 10 min,弃去染液,PBS 漂洗 3 次,加入适量完全培养基,使用激光共聚焦显微镜观察并拍摄。

2.11 细胞 CD47 表达检测实验

CT26 细胞以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 12 孔板中,培养 24 h。各孔依次加入等体积的 PBS(空白对照)、游离 siRNA(阴性对照)、MRna-NC(阴性对照)、MRna-CD47 和 CD47 siRNA-Lipo2000(阳性对照)混合液,siRNA 终浓度均为 100 nmol/L。培养 24 h 后,收集细胞,以预冷 PBS 洗涤细胞 2 次。离心收集细胞,以流式染色缓冲液 100 μ L 重悬,加入 PE-Anti-mouse CD47 流式抗体,吹匀后冰上避光孵育 20 min。孵育结束后,离心收集细胞以预冷的 PBS 洗涤 2 次,最后每孔加入 PBS 300 μ L 复悬,使用流式细胞仪分析各组的 PE 荧光强度。

对于 qPCR 实验,以上述中相同方法种板、给药和收集细胞。细胞使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。使用微量分光光度计测定 RNA 浓度,取 RNA 1 μ g 进行逆转录后使用荧光定量 PCR 系统进行扩增,检测 CD47 mRNA 的相对表达量。

对于 Western blot 实验,以上述中相同方法种板、给药和收集细胞。使用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。随后,利用 SDS-PAGE 进行电泳,将蛋白分离并转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜用封闭液封闭 1 h,并使用相应抗 CD47 抗体和抗 GADPH 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。使用辣根过氧化物酶标记的二抗处理 PVDF 膜 1 h 后,向膜上滴加 ECL 发光液,利用凝胶成像仪进行化学发光成像。

3 结果与讨论

3.1 MRna 的理化性质表征

3.1.1 MRna 的制备过程中的形貌变化 TEM 结果显示,BSA 和 siRNA 在 Zn^{2+} 作用下发生了多聚化,形成了约 80 nm 的不规则纳米簇,与 PBS 接触后快速崩解。这可能是由于 PO_4^{3-} 与 Zn^{2+} 的配位亲和力强于 BSA 和 siRNA 上的富电子基团,导致 Zn^{2+} 与两者的配位作用被 PO_4^{3-} 竞争性结合,使得

BSA 复性, 纳米簇崩解。矿化后, 制剂被矿物微晶所包裹, 呈现为直径约 130 nm 的小球, 可在 PBS 中稳定存在(图 2-A)。矿化前(图 2-B)和矿化后(图 2-C)载体水化动力学粒径由 93 nm 增大至 138 nm, 且 PDI 无较大变化($PDI < 0.2$), 表明载体粒径分布均一。这些结果进一步佐证了矿化反应的进行, 初步表明了 MRna 的成功合成。

3.1.2 制剂的组成和结构表征 通过 TEM-EDS 分

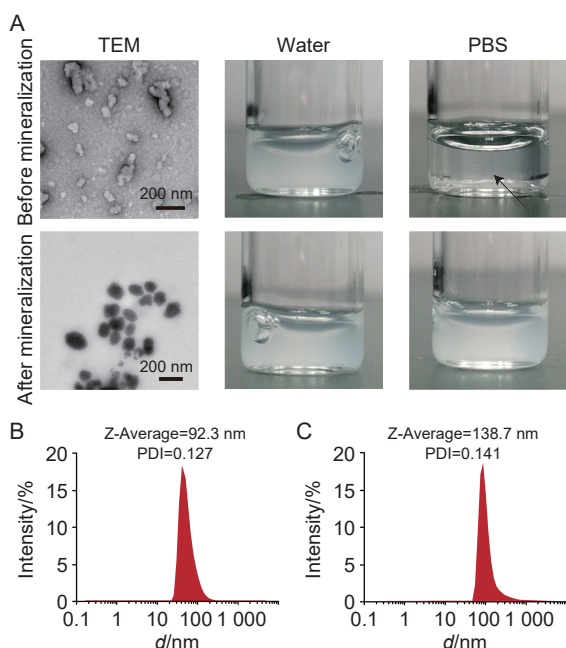


Figure 2 Morphology and particle size of MRna before and after mineralization

A: TEM image and photos of MRna; B: Hydration kinetics particle size before mineralization; C: Hydration kinetics particle size after mineralization

析 MRna 的元素组成和含量。结果显示, N、P、Mn、Zn 元素均匀分布于制剂中, 表明 RNA 被分散于 BSA 和矿物组分中(图 3-A)。其中 Zn 元素的质量分数约为 8%, Mn 元素约为 13%(图 3-B)。由于 RNA 和 BSA 中均含有 N 元素, 因此进一步使用 FITC-BSA 和 Cy3-RNA 制备了载体, 通过 CLSM 下观察了 BSA 和 RNA 的分布。结果显示, FITC 和 Cy3 荧光信号同时出现在载体中, 且两者的信号高度共定位(图 3-C)。TEM 和 CLSM 下所得结果可相互印证, 进一步表明了 MRna 的成功构建。

3.1.3 制剂的核酸包封率考察 为了明确 MRna 对核酸的包封效率, 测定了不同浓度的 Cy3-RNA 的荧光强度。结果显示, Cy3-RNA 的浓度与其荧光强度的线性关系为 $Y=88.14X-83.19$ ($R^2=0.9988$)。当 BSA 与 siRNA 的物质的量比在 60:1、30:1、20:1 和 15:1 时, siRNA 包封率在 89.3%~93.2% 之间浮动, 表明本矿物制剂具有灵活、可调节的核酸包封性能。

3.1.4 制剂的血清稳定性及其核酸释放行为 分别测定制剂在含 20% FBS 的 PBS 中放置 6 周后的粒径和 PDI 变化, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测了放置 0、6、12、24 和 48 h 后的 siRNA 含量变化。其中, 制剂样品经离心后使用高浓度的 EDTA (100 mmol/L) 崩解以释放其中的 siRNA 并使其作为 siRNA 释放的阳性对照。结果显示, 放置后制剂的粒径和 PDI 无显著变化, 表明其能够在体液环境中稳定存在和分散(图 4-A); 同时, 与游离的 siRNA (Free

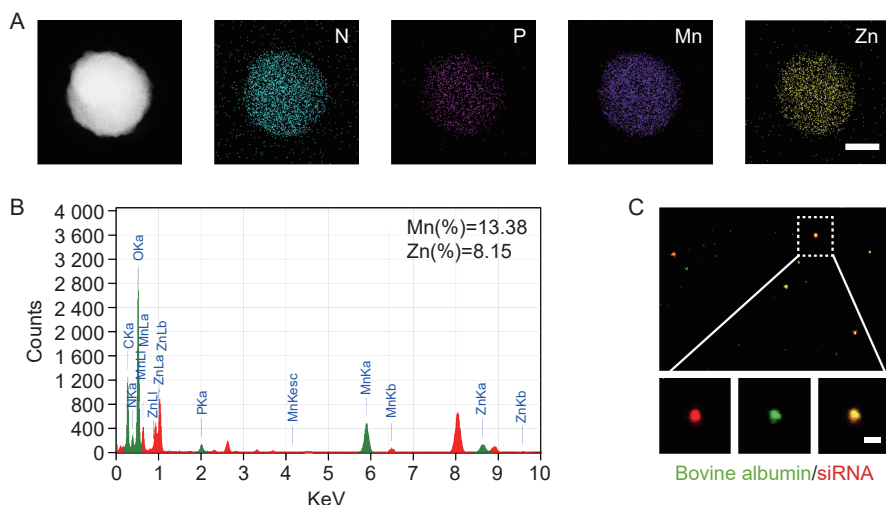


Figure 3 Composition of the MRna

A: Elemental composition of the MRna (bar=100 nm); B: Element content in the MRna; C: CLSM-STED image of fluoresce labeled MRna (bar=200 nm)

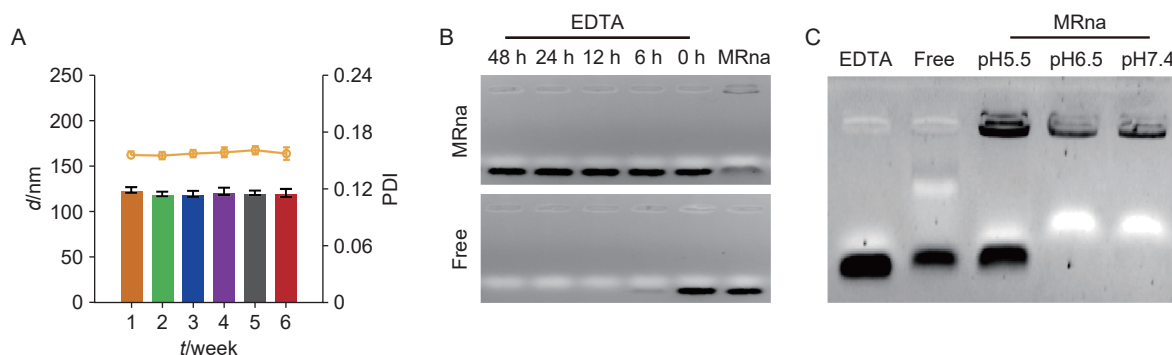


Figure 4 Stability and siRNA release behavior of the formulation

A: Changes in particle size of the MRna ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$); B: Stability of siRNA in FBS solution; C: Release behavior of siRNA in MRna under different pH

siRNA)相比,制剂中的 siRNA 即使 48 h 后也未受到血清中的核酸酶的影响,而前者在 12 h 后几乎被核酸酶完全降解(图 4-B)。

在胞内, siRNA 需要从载体中释放以发挥作用,因此进一步考察了制剂在不同酸碱度下的核酸释放能力。结果显示,制剂在 pH7.4 时 siRNA 完全停留在上样孔中,在 pH6.5 时出现少量的暴露但几乎观察不到释放,而在 pH5.5 时释放约 60%,说明载体具有良好的 pH 响应性释放能力(图 4-C)。由于载体致密的矿物组分阻碍了溴化乙锭核酸染料与载体内 siRNA 的结合和显色,这使得 pH7.4 和 pH6.5 时停留在孔内的 siRNA 信号强度显著弱于 pH5.5 时的显示的总信号强度。同时,当 pH5.5 时,由于表面矿物的降解, siRNA 释放约 55%,这使得孔内的 siRNA 信号明显增强,这进一步佐证了矿物组分对 siRNA 的保护作用。

3.2 制剂的细胞毒性

鉴于制剂中含有微量的 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} ,可能会对细胞产生毒性,因此本研究分别考察了制剂在 CT26 细胞中的增殖毒性和凋亡毒性。当 siRNA 终浓度在 0~200 nmol/L 时,制剂无显著的增殖毒

性(图 5-A);同时,不同浓度的制剂所引发的细胞凋亡与 PBS 组之间无显著性差异(图 5-B)。通常 siRNA 在细胞水平的给药浓度一般不超过 200 nmol/L,因此可认为 MRna 在递送 siRNA 时具有较高的安全性。

3.3 制剂的细胞摄取和胞内命运

理想的核酸递送载体应当能够有效被细胞摄取并协助核酸实现溶酶体逃逸。因此,通过以 Lipo2000 为对照,考察了制剂的细胞摄取效率及其 siRNA 与溶酶体的共定位情况。结果显示,在 6 h 内矿物制剂的细胞摄取效率仅为 Lipo2000 的 70%,这可能是由于两者的电性差异所致(图 6-A);但制剂的在摄取入胞后, RNA 与溶酶体的共定位系数仅为 0.18,是 Lipo2000 的 1/5(图 6-B)。这表明制剂具有较好的细胞摄取能力,并且能够将核酸有效递送至胞质。

随后,进一步探究了 MRna 介导 siRNA 内体逃逸的作用机制。根据先前的文献报道,矿物组分在内体/溶酶体中能够不断结合质子并生成矿物阴离子和阳离子,使内体中的渗透压升高,最终引发质子海绵效应。为了验证 MRna 能否介导这一现

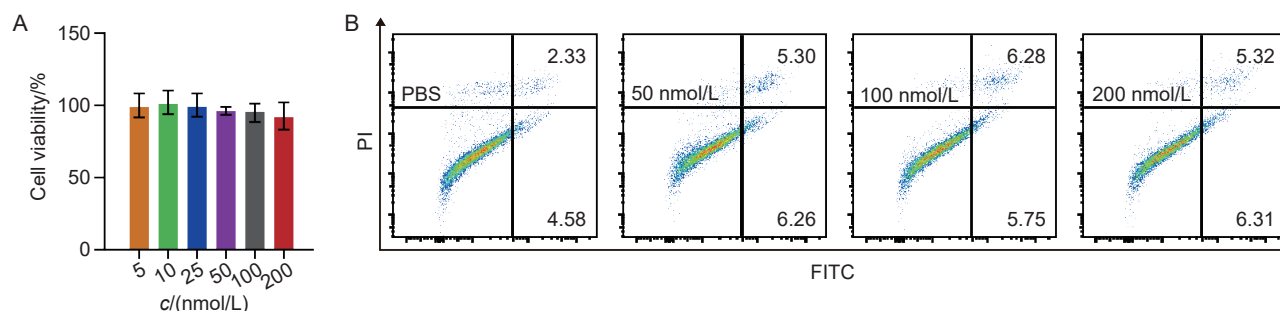


Figure 5 Proliferative toxicity and apoptotic toxicity of the MRna

A: Cell proliferation toxicity of MRna ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$); B: Cell apoptosis toxicity of MRna

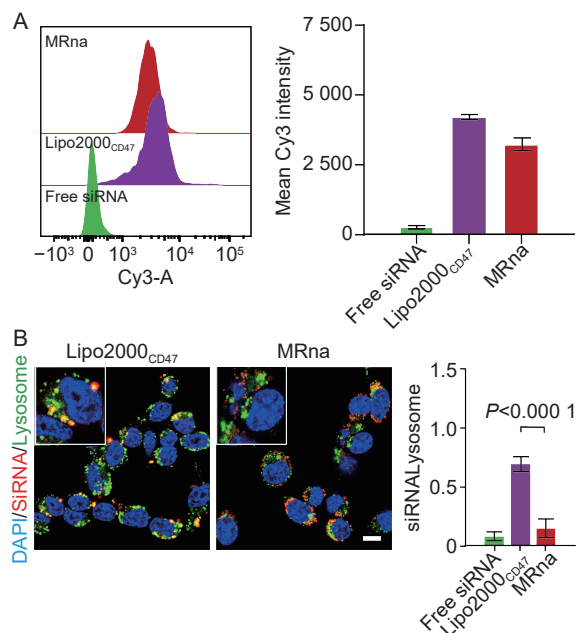


Figure 6 Cellular uptake and intracellular localization of siRNA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Flow cytometry analysis of cellular uptake; B: Co-localization of siRNA with lysosome, bar=5 μ m

象,实验使用钙黄绿素标记了肿瘤细胞。正常情况下,钙黄绿素进入细胞后集中分布在溶酶体中。当溶酶体发生渗漏时,这些染料则会进入胞质中。因此,通过观察钙黄绿素的分布可初步判断细胞摄取MRna后是否发生了溶酶体渗漏。如图所示,经MRna处理后,细胞内的钙黄绿素由原先的点状分布转变为弥散状分布,表明制剂的 siRNA 胞质递送机制很可能与矿物组分引发的质子海绵效应相关

(图 7)。

3.4 制剂的基因敲低效率

siRNA 通过在胞内形成 RISC 复合物以降解靶标 mRNA,进而降低靶蛋白表达。为了考察制剂的基因敲低效率,将 CD47 siRNA 装载于 MRna 中,通过 qPCR、Western blot 实验和流式细胞术检测了经制剂处理后肿瘤细胞 CD47 的表达水平。流式结果显示,与空白组相比,制剂将肿瘤细胞 CD47 敲低了约 52%,效果与 Lipo2000 转染试剂相当(图 8-A);同样,制剂使肿瘤细胞 CD47 mRNA 表达量降低了近 65%,且在总蛋白水平的敲低效果也与 Lipo2000 相近(图 8-B)。以上结果表明,制剂可有效发挥 siRNA 的靶基因敲低作用。

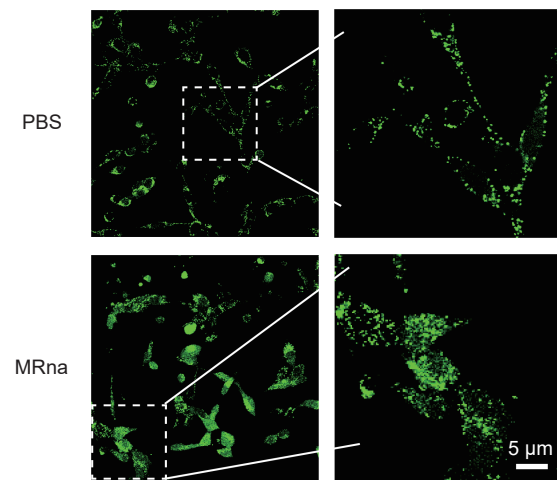


Figure 7 Lysosomal membrane integrity (bar=5 μ m)

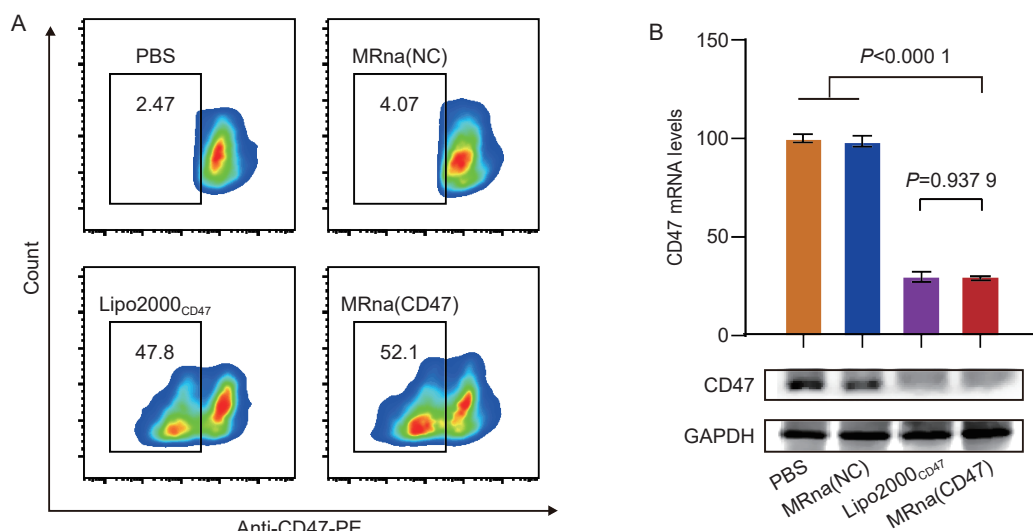


Figure 8 Efficiency of target gene knockdown by the MRna

A: Flow cytometry analysis of CD47 expression; B: qPCR analysis of CD47 mRNA and western blot analysis of the expression of CD47 protein ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 结 论

本研究基于金属离子与生物大分子的配位作用和生物矿化原理,成功构建了 $\text{MnCO}_3@ \text{BSA}/\text{Zn}^{2+}/\text{siRNA}$ (MRna) 以实现 siRNA 的胞质递送。MRna 具有均一的粒径分布,其中的 siRNA 均匀分散在 BSA 和矿物构成的骨架内。借助矿物组分的保护作用,MRna 在血清环境中能够长期稳定分散,使 siRNA 免于核酸酶降解。重要的是,MRna 具有优良的 pH 响应释药能力,可响应内体酸性环境下(约 pH5.5)快速释放 siRNA。在细胞水平,MRna 具有较高的细胞摄取效率以及可忽略的增殖和凋亡毒性;入胞后,能够通过介导质子海绵效应促进 siRNA 的内体逃逸,使 siRNA 均匀分散在胞质中。最后,在转染效率上,MRna 实现了与 Lipo2000 相近的基因沉默效果。这些结果表明 MRna 能够在保证生物相容性的前提下将 siRNA 有效递送至胞质中。尽管如此,本研究仍然存在其局限性。siRNA 递送载体在血液循环中稳定性和靶器官蓄积能力是 siRNA 疗法临床转化过程中的另一大关键问题。MRna 的表面为 MnCO_3 ,这可能使其在体内容易被网状内皮系统捕获且缺少组织器官特异性。MRna 中 MnCO_3 组分对 pH 的敏感性暗示其可能能够响应肿瘤酸性微环境发生部分的解离,或可利用这一特性进行进一步的肿瘤靶向设计。因此,在后续的研究中将进一步对 MRna 进行表面改性或配体修饰,增强其在循环系统中的稳定性和肿瘤组织的靶向性,以提高其在肿瘤治疗中的应用价值。

References

- [1] Kara G, Calin GA, Ozpolat B. RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, **182**: 114113.
- [2] Puri S, Mazza M, Roy G, et al. Evolution of nanomedicine formulations for targeted delivery and controlled release[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, **200**: 114962.
- [3] Yonezawa S, Koide H, Asai T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **154/155**: 64-78.
- [4] Uchida S, Lau CYJ, Oba M, et al. Polyplex designs for improving the stability and safety of RNA therapeutics[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, **199**: 114972.
- [5] Moazzam M, Zhang MJ, Hussain A, et al. The landscape of nanoparticle-based siRNA delivery and therapeutic development[J]. *Mol Ther*, 2024, **32**(2): 284-312.
- [6] Ball RL, Hajj KA, Vizelman J, et al. Lipid nanoparticle formulations for enhanced co-delivery of siRNA and mRNA[J]. *Nano Lett*, 2018, **18**(6): 3814-3822.
- [7] Cai GL, Chen Y, Lin ST, et al. Application of dendrimer-based siRNA delivery systems[J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, **50**(3): 274-288.
- [8] Ballarín-González B, Howard KA. Polycation-based nanoparticle delivery of RNAi therapeutics: adverse effects and solutions[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, **64**(15): 1717-1729.
- [9] Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, et al. RNA interference in the clinic: challenges and future directions[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, **11**(1): 59-67.
- [10] Zuckerman JE, Gritli I, Tolcher A, et al. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(31): 11449-11454.
- [11] Peer D, Lieberman J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs[J]. *Gene Ther*, 2011, **18**(12): 1127-1133.
- [12] Guo S, Li CH, Wang CR, et al. pH-Responsive polymer boosts cytosolic siRNA release for retinal neovascularization therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, **14**(2): 781-794.
- [13] Choi HY, Lee TJ, Yang GM, et al. Efficient mRNA delivery with graphene oxide-polyethylenimine for generation of footprint-free human induced pluripotent stem cells[J]. *J Control Release*, 2016, **235**: 222-235.
- [14] Karlsson J, Tzeng SY, Hemmati S, et al. Photocrosslinked bio-reducible polymeric nanoparticles for enhanced systemic siRNA delivery as cancer therapy[J]. *Adv Funct Mater*, 2021, **31**(17): 2009768.
- [15] Zou Z, He LB, Deng XX, et al. Zn^{2+} -coordination-driven RNA assembly with retained integrity and biological functions[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, **60**(42): 22970-22976.
- [16] Cen D, Ge QW, Xie CK, et al. $\text{ZnS}@ \text{BSA}$ nanoclusters potentiate efficacy of cancer immunotherapy[J]. *Adv Mater*, 2021, **33**(49): e2104037.
- [17] Huang SD, Gao Y, Li HY, et al. Manganese@Albumin nano complex and its assembled nanowire activate TLR4-dependent signaling cascades of macrophages[J]. *Adv Mater*, 2024, **36**(5): e2310979.
- [18] Fan N, Chen KP, Zhu R, et al. Manganese-coordinated mRNA vaccines with enhanced mRNA expression and immunogenicity induce robust immune responses against SARS-CoV-2 variants[J]. *Sci Adv*, 2022, **8**(51): eabq3500.
- [19] Gao ZL, Xu W, Zheng SJ, et al. Orchestrated cytosolic delivery of antigen and adjuvant by manganese ion-coordinated nanovaccine for enhanced cancer immunotherapy[J]. *Nano Lett*, 2023, **23**(5): 1904-1913.
- [20] Wen H, Yin YD, Huang C, et al. Encapsulation of RNA by negatively charged human serum albumin via physical interactions[J]. *Sci China Chem*, 2017, **60**(1): 130-135.