

共载多柔比星和 siRNA 的还原敏感性纳米粒的体外靶向性评价

王丹丹, 刘 瑞, 王 钰, 李 芳, 陈维良, 张学农*

(苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 本研究构建了一种透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 修饰的共载多柔比星 (doxorubicin, DOX) 和 siRNA 的还原敏感性纳米粒 (nanoparticles, NPs), 并对其体外肺癌靶向性进行评价。经酰胺化反应合成载体材料多聚 L-赖氨酸-硫辛酸聚合物 (PLA) 并进行核磁表征。通过透析法和静电吸附法制备共载 DOX 与 siRNA 的 NPs 并以 HA 对其修饰, 得到 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs; 以粒径和 zeta 电位为指标, 考察 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 的肿瘤微环境响应性; 以源性非小细胞肺癌细胞 (A549) 为体外模型, 通过 CLSM 考察 HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 的细胞摄取与 siRNA 的内涵体逃逸。¹H NMR 结果显示, 载体材料 PLA 成功合成, LA 的接枝率为 25.1%; 体外表征结果显示, HA-PLA/DOX-NPs 的包封率和载药量分别为 (86.93 ± 8.91) % 和 (4.17 ± 0.68) %, 在载体中氮磷比 (N/P) 为 6 : 1 时能完全吸附 siRNA; HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 的粒径为 (167.3 ± 9.9) nm, 电荷为 (-15.5 ± 1.4) mV; 在透明质酸酶 (HAase) 环境中 zeta 电位由负转正, 而在 10 mmol·L⁻¹ 谷胱甘肽 (GSH) 环境中粒径分布变乱; 体外释放结果表明, HA-PLA/DOX-NPs 在 pH 7.4 下释药缓慢, 而在 10 mmol·L⁻¹ GSH 环境中能够快速释药。细胞摄取及分布实验表明, HA 的包覆能够增强 NPs 的细胞亲和性和靶向性, 且采用 HAase 处理后, HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 组的细胞摄取增强; 且摄入后能有效从内涵体逃逸, 快速释放药物和 siRNA 至其各自的靶点。结果提示: HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 对 DOX 和 siRNA 均具有较高的包载效率, 能显著提高其肿瘤细胞靶向性, 并具有肿瘤微环境响应特征, 有作为基因与药物共递送体系的潜能。

关键词: 多聚赖氨酸; 透明质酸; 纳米粒; 还原敏感性; 肺癌; 靶向性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2104-09

In vitro targeting efficiency evaluation of reduction-responsive co-loaded doxorubicin/siRNA nanoparticles

WANG Dan-dan, LIU Rui, WANG Yu, LI Fang, CHEN Wei-liang, ZHANG Xue-nong*

(College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: In this study a reduction-responsive nanoparticles (NPs) modified with hyaluronic acid (HA) was prepared for the co-delivery of doxorubicin (DOX) and siRNA and then evaluated as a lung cancer targeting delivery system *in vitro*. The amphiphilic polymer of poly-L-lysine-lipoic acid (PLA) based on poly-L-lysine (PLL) with lipoic acid (LA) was synthesized *via* amidation reaction and characterized by ¹H NMR. The DOX loaded PLA NPs were prepared *via* dialysis method, and siRNA was loaded *via* electrostatic attraction to prepare the co-delivery NPs system (PLA/DOX-siRNA-NPs). Then PLA/DOX-siRNA-NPs were coated with HA to obtain HA-PLA/DOX-siRNA-NPs. The tumor microenvironment-responsive properties under different pH or reduction condition of HA-PLA/DOX-siRNA-NPs were evaluated by investigating the particle size and zeta potential. Cellular uptake of HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs by A549 cells and endosomal escape of siRNA

收稿日期: 2018-06-22; 修回日期: 2018-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81571788, 81773183); 江苏省大学生创新创业训练项目 (201610285096X).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-512-65880030, E-mail: zhangxuenong@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0576

were studied using confocal laser scanning microscope (CLSM). ^1H NMR spectrum demonstrated that PLA was successfully synthesized with LA grafting rate of 25.1%. The encapsulation efficiency (EE) and drug loading (DL) of HA-PLA/DOX-NPs was $(86.93 \pm 8.91) \%$ and $(4.17 \pm 0.68) \%$, respectively, and siRNA was loaded at an N/P of 6 : 1 in carrier. HA-PLA/DOX-siRNA-NPs exhibited a suitable size of $(167.3 \pm 9.9) \text{ nm}$ and negative charge of $(-15.5 \pm 1.4) \text{ mV}$ with the optimal ratio of PLA and HA of 1 : 3. Additionally, the zeta potential of HA-PLA/DOX-siRNA-NPs significantly increased with charge reversal from negative to positive after the treatment with HAase, and the particle size of HA-PLA/DOX-siRNA-NPs changed significantly under the condition of $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glutathione (GSH). The release profiles *in vitro* demonstrated that HA-PLA/DOX-NPs exhibited a maintained release behavior at pH 7.4 and the adding of GSH ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) led to rapid release of DOX from NPs. *In vitro* cellular uptake and subcellular distribution study demonstrated that the modification of HA enhanced the affinity of NPs to A549 cells and targeting ability, and the cellular uptake of HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs significantly increased after the treatment with HAase. It was observed that HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs could escape from endo-lysosomes followed by sharp payloads release to their relative targets. All these results demonstrated that the co-loaded NPs have a high entrapment efficiency of DOX and siRNA. And they also exhibited an active tumor targeting efficiency and tumor microenvironment-responsive properties, which were beneficial to cellular uptake and intracellular release of DOX and siRNA. In conclusion, these reduction-responsive NPs modified with HA have great potential as co-delivery systems for antitumor agents and siRNA.

Key words: poly-L-lysine; hyaluronic acid; nanoparticle; reduction-sensitive; lung cancer; targeting efficiency

据报道, 全球每年约有 820 万人死于癌症。国家癌症中心发布的数据显示, 我国癌症患者人数呈现上升趋势, 每年癌症死亡人数达 250 万人, 其中以肺癌患者居多^[1]。目前癌症的治疗方法包括手术、化疗和放疗等^[2]。然而, 当前大部分抗肿瘤药物都有选择性较差、毒副作用大等缺点^[3]。例如广谱抗肿瘤药物多柔比星 (doxorubicin, DOX) 可用于治疗乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌和非小细胞型肺癌等多种癌症, 其作用机制是嵌入 DNA 从而抑制核酸的合成^[4], 但 DOX·HCl 具有明显的不良反应尤其是心脏毒性, 极大地限制了临床应用。

相比于传统化疗药物, 纳米给药系统具有诸多优势, 包括可以增加难溶性药物溶解度, 延长体内半衰期等而倍受重视, 尤其是粒径位于 20~200 nm 纳米粒 (nanoparticles, NPs) 可通过增强渗透滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应实现肿瘤组织的被动靶向^[5]; 此外, 通过对 NPs 进行靶向配体的修饰, 可进一步赋予其主动靶向特征, 利用受配体相互作用使更多 NPs 蓄积于靶部位, 实现增效减毒的功效。如以聚 L-赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL) 为基础的载体材料, 易与带负电荷的细胞膜相互作用而被摄取, 且具较高的基因转染效率, 可以作为 DNA 和 RNA 的特异性递送载体^[6,7]。但由于正电荷的 NPs 易与血清蛋白结合发生非特异性反应, 血液稳定性差, 易被网状内皮吞噬系统捕捉并快速清除; 同时其生物相容性差, 具有一定的细胞毒性, 使其应

用受到限制。透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是一种天然聚阴离子线性多糖, 具有良好的生物相容性和生物可降解性; HA 在中性 pH 条件下呈负电荷, 可包覆在阳离子 NPs 的表面以屏蔽其正电荷; 同时, HA 自身也是主动靶向配体, 可被非小细胞肺癌 (如 A549) 等恶性肿瘤细胞表面过表达的 CD44 受体特异性识别^[8], 可用于药物与基因的主动靶向递送。此外, 肿瘤细胞外酸性基质中广泛分布的透明质酸酶 (hyaluronidase, HAase) 可降解 NPs 表面修饰的 HA, 以暴露 NPs 正电内核^[9], 促进细胞摄取, 为环境敏感型递送系统的构建提供了可能。

近年来, 以 siRNA 为代表的 RNA 干扰技术为肿瘤的精确定疗提供了新的思路。当 siRNA 进入细胞后, 可特异性地与相关 mRNA 结合, 下调特定的蛋白表达^[10], 如通过 siRNA 下调肿瘤细胞 VEGF 表达可抑制肿瘤新生血管生成^[11]。但 siRNA 在体内呈负电荷并且易被酶解, 需要安全高效的基因载体运载, 而基因载体 (如 PLL) 等有着血液稳定性差、安全性不佳等缺点^[12]。因此, 设计一种安全、高效的递送体系尤为重要, 可为基因与药物联合增效应用提供参考, 对肿瘤治疗具有一定的指导意义, 期望在新型纳米剂型技术的理论、方法和技术等方面取得一定进展。

因此, 本研究以 PLL 接枝还原敏感性材料硫辛酸 (lipoic acid, LA), 合成两性亲聚合物 PLA, 以 LA 作为还原性疏水嵌段包载 DOX, 同时利用 PLL 的阳离子吸附带负电荷的 siRNA^[13], 制得共载 DOX/siRNA

的 NPs, 再通过静电吸附作用将 HA 包覆于 NPs 表面, 得到具有主动靶向效应的还原敏感型 NPs, 即 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs。该 NPs 的体内靶向递送历经了 3 个过程: ① 通过 EPR 效应实现肿瘤组织被动靶向蓄积; ② HA 介导的主动靶向作用与 HAase 降解 HA 暴露的正电荷增强细胞摄取; ③ 胞内实现内涵体逃逸后^[14], NPs 进入胞浆, 在胞浆中 NPs 内部的二硫键响应谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 而断裂, NPs 结构改变而解体, 释放 DOX 和 siRNA, 分别作用于细胞核和 mRNA, 同时发挥诱导细胞凋亡和下调相应目的蛋白表达的作用, 从而抑制肿瘤增殖与转移, 实现药物与基因的联合抗肿瘤疗效^[15] (图 1)。

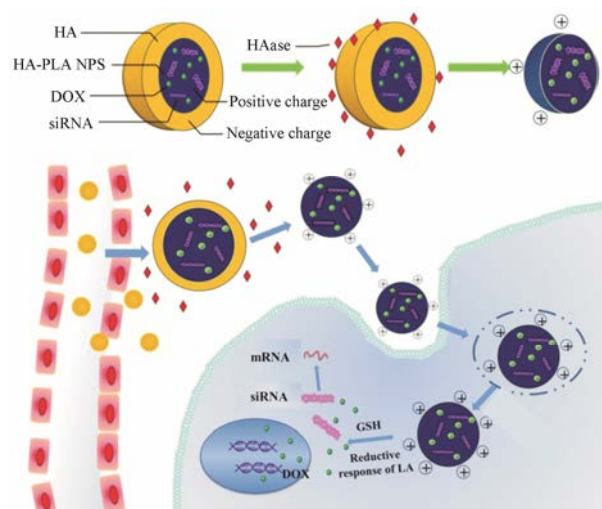


Figure 1 Co-delivery of doxorubicin (DOX) and siRNA via reduction-responsive nanoparticles (NPs) modified with hyaluronic acid (HA)

材料与方法

主要仪器 全波长多功能微孔板检测仪 (Infinite M1000 Pro, 瑞士 Tecan 公司); Unity Inova 400 超导核磁共振谱仪 (美国瓦里安公司); HPP 5001 激光粒度分析仪 (英国 Malvern 公司); H-600 透射电子显微镜 (日本日立公司); 凝胶成像仪 (美国 Bio-rad 公司); LSM 710 共聚焦激光扫描显微镜 (德国 Zeiss 公司); ELx808 酶联免疫检测仪 (英国 Bio-Tek 公司)。

试剂 DOX·HCl (99.97%, 大连美仑生物试剂有限公司); PLL (上海麦克林生化科技有限公司); LA、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC·HCl]、*N*-羟基丁二酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS) (阿达玛斯试剂有限公司); HA (华熙福瑞达生物医药有限公司); GSH (上海源叶生

物科技有限公司); 透明质酸酶 (HAase, 西格玛奥德里奇上海贸易有限公司); 细胞胎牛血清 (FBS, 浙江天杭生物科技有限公司); RPMI-1640 培养基 (Hyclone 生物科技有限公司); siRNA^{FAM}、Lysotracker-red (Beyotime 生物技术有限公司); Hoechst 33258 (美国 Sigma 公司); 其他试剂均为分析纯。

非小细胞肺癌细胞 A549 的培养 非小细胞肺癌细胞株 A549 由苏州大学药理学教研室提供。A549 细胞培养条件为 RPMI-1640 培养基 (含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液), 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

PLA 聚合物的合成 称取 LA 250 mg, 以 *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF) 30 mL 溶解后, 加入 EDC·HCl 233 mg 和 NHS 139 mg, 在 50 °C 搅拌条件下反应 45 min, 以活化 LA 的羧基^[16]。称取 PLL 500 mg, 用 30 mL 去离子水溶解, 在搅拌条件下将 PLL 溶液缓慢滴加至 LA 溶液中, 混合均匀后在 50 °C 下反应 24 h。将溶液装入透析袋 (MWCO 3500 Da) 中, 去离子水透析 48 h, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 冷冻干燥后得到白色粉末。

聚合物的结构表征 取适量 PLL 和 PLA 分别置于两只核磁管中, 以 0.55 mL D₂O 完全溶解; 取适量 LA 至核磁管中, 加入 0.6 mL CDCl₃ 完全溶解。用核磁共振氢谱仪测得 LA、PLL 和 PLA 化合物的 ¹H NMR 图。

PLA/DOX-NPs 的制备 称取 PLA 20 mg 溶于去离子水中, 搅拌至其完全溶解, 配成 2 mg·mL⁻¹ 溶液, 加入 DOX·HCl (10 mg·mL⁻¹) 1 mL 和三乙胺 500 μL, 磁力搅拌 5 min 后加至透析袋 (MWCO 3500 Da) 中, 去离子水透析, 以除去三乙胺和未包入的 DOX, 再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得到 PLA/DOX-NPs^[17]。

PLA/DOX-siRNA-NPs 的制备及优化 通过静电吸附作用包载 siRNA 制备 PLA/DOX-siRNA-NPs。取 siRNA (100 nmol, DEPC 水溶解) 溶液与 PLA/DOX-NPs 溶液以不同 N/P 比 (0、2、4、6、8 和 10) 混合搅拌 15 min 后, 静置即得 PLA/DOX-siRNA-NPs^[18]。通过琼脂糖凝胶电泳^[19]来考察包载 siRNA 最佳 N/P 比。具体过程如下: 配制浓度为 3% 琼脂糖凝胶, 加热使完全溶解, 待溶液冷却到 50~60 °C 时, 加入适量 GelRed 并充分混匀, 倒入胶板中, 插入上样梳, 室温下待其冷却凝固; 取不同 N/P 比 PLA/DOX-siRNA-NPs 溶液与上样缓冲液混匀, 电泳并通过凝胶成像仪观察凝胶条带的亮度及位置, 从而确定包载 siRNA 的最佳 N/P 比。

HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 的制备及处方优化 称取适量 HA, 以去离子水完全溶解, 使其质量终浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 振荡条件下将 PLA/DOX-siRNA-NPs 溶液按照 PLA/HA 为 1:1、1:2、1:3 和 1:4 的质量比逐滴加入 HA 溶液中, 得到 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs, 并以粒径和 zeta 电位为指标对其进行处方筛选。

HA-PLA/DOX-NPs 的质量评价 以包封率 (encapsulation efficiency, EE) 和载药量 (drug loading, DL) 为参数, 对载 DOX NPs 进行质量评价。取适量 HA-PLA/DOX-NPs 溶液用乙醇破乳并稀释, 通过全波长酶标仪测定其荧光强度 ($E_x = 480 \text{ nm}$, $E_m = 590 \text{ nm}$), 计算溶液中的总药物浓度。另取适量 HA-PLA/DOX-NPs 溶液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $25\,000 \times g$ 高速离心 30 min, 测定上清液的荧光强度, 得到溶液中的游离药物浓度^[20]。同法测定 PLA/DOX-NPs 的 EE 和 DL。按式 (1) 和 (2) 计算载 DOX NPs 溶液 EE 和 DL。

$$EE = W_0 / W_1 \times 100\% \quad (1)$$

$$DL = W_0 / W \times 100\% \quad (2)$$

式中, W_0 代表纳米粒中封装的药量, W_1 代表纳米粒溶液中总药物量, W 代表载药纳米粒总质量。

HA-PLA/DOX-NPs 的体外释药特性 采用透析袋法考察 HA-PLA/DOX-NPs 和 PLA/DOX-NPs 在不同 pH 和还原环境下的释放情况^[21]。将 3 mL PLA/DOX-NPs 和 HA-PLA/DOX-NPs 分别装入透析袋 (MWCO 3500 Da) 中, 置于装有 100 mL 不同条件透析外液 (pH 7.4、pH 7.4 + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH、pH 5.3、pH 5.3 + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH) 的广口瓶中 (模拟血液循环和肿瘤细胞内环境), 放入 $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱中以 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡, 在 0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 h 时间点分别吸取透析外液 1 mL, 同时分别补充等体积、等温度下的相应新鲜释放介质。采用多功能酶标仪测定不同时间点释放外液的 DOX 浓度, 按照公式 (3) 计算相应时间下的累积释放率 (cumulative release, CR) 并绘制时间-累积释放百分数曲线。

$$CR = C_t \times n / C \times 100\% \quad (3)$$

式中, C_t 代表 t 时间所测得的释放外液的 DOX 浓度, n 为稀释倍数, C 代表纳米粒溶液中总药物浓度。

HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 的环境响应性验证 取 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 溶液分为 3 组: ① 不作处理; ② 加入 HAase ($4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 6.5 PBS); ③ 加入 GSH ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。摇匀并孵育 2 h, 用马尔文粒径测定仪检测 3 组 NPs 的粒径和 zeta 电位。另取后两组溶液 1~2 滴置碳支持膜上, 干燥, 透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 NPs 的

形态。

细胞摄取实验 将 A549 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h。分别加入 DOX 终质量浓度均为 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs、HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 和 HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs (HAase) 各 1 mL。孵育 2 h 后分别吸去药物, 以 pH 7.4 PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液 1 mL 固定细胞, PBS 清洗 3 次后, 再加入 Hoechst 33258 ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL, 孵育 15 min, 对细胞核进行染色。借助共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 考察细胞对 HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs (HAase +/-) 和 PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 的摄取情况。

为证明 PLA 及单独 HA 的包覆增强 PLA/DOX-NPs 和 HA-PLA/DOX-NPs 细胞摄取的作用, 通过酶标仪对其细胞摄取进行了定量分析。收集对数生长期的 4T1 细胞, 胰蛋白酶消化后, 离心 5 min 并以培养基稀释成每毫升 3×10^5 个细胞混悬液, 吹打使细胞分散成单个状态, 置于细胞培养箱中培养 24 h。分别加入 DOX 终质量浓度均为 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DOX·HCl、PLA/DOX-NPs 和 HA-PLA/DOX-NPs, 孵育 2 h 后吸去药物, 以 pH 7.4 PBS 洗涤 3 次, 胰蛋白酶消化、计数并超声粉碎, 为避免干扰, 以乙醇和甲醇 (5:1, v/v) 萃取 DOX 并离心, 通过酶标仪测定上清液中 DOX 的荧光强度 (激发波长为 480 nm, 发射波长为 590 nm), 得到 2 h 的药物摄取量。

siRNA^{FAM} 细胞内分布 以上述方法接种 A549 细胞于 6 孔板中, 与 HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs 共孵育 2 或 6 h 后, 吸去培养基, PBS 清洗 3 次, 加入 LysoTracker Red 溶液 1 mL 对溶酶体进行染色; 45 min 后, PBS 清洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定细胞; PBS 清洗 2 次后, 再加入 Hoechst 33258 ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL 孵育 15 min, 对细胞核进行染色。通过 CLSM 考察不同时间点 siRNA^{FAM} 的胞内分布情况。

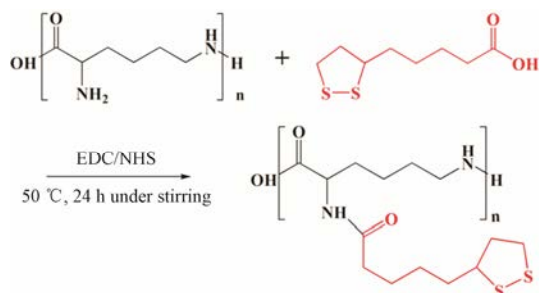
统计学分析 实验数据采用方差分析和 t -检验进行统计学分析。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料的比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 PLA 聚合物的合成与表征

PLA 聚合物的合成见合成路线图 1。在 EDC/NHS 的催化条件下, 通过酰胺化反应将 LA 接枝于 PLL 上, 合成载体材料 PLA 聚合物。由图 2 中 ¹H NMR 表征结果可得, 与 PLL 相比, PLA 在 δ 1.75、1.51、1.36、

2.45、2.36 和 3.75 处出现特征峰，分别为 LA 结构中 C-b、C-c、C-d、C-e、C-f 和 C-g 的氢质子特征峰，说明载体材料 PLA 已成功合成。以 ^1H NMR 图中特征峰积分面积计算 LA 的接枝率为 25.1%。



Scheme 1 Synthetic route of poly-*L*-lysine-lipoic acid (PLA) via amidation reaction

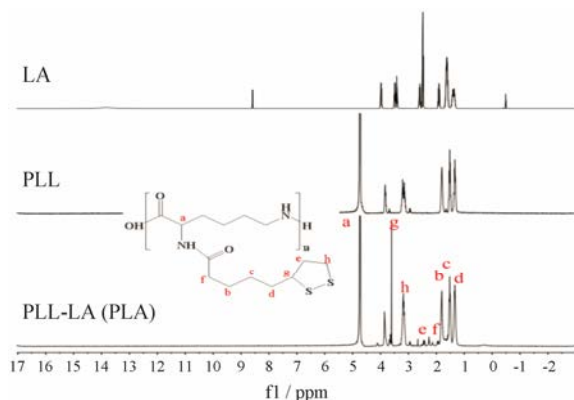


Figure 2 ^1H NMR spectra of lipoic acid (LA), poly-*L*-lysine (PLL) and poly-*L*-lysine-lipoic acid (PLA) in D_2O

2 PLA/DOX-siRNA-NPs 的优化

通过琼脂糖凝胶电泳来研究包载 siRNA 的最佳 N/P 比，凝胶成像结果 (图 3) 显示，裸露的 siRNA 可随电泳跑出，随着 N/P 比例增大，跑出的电泳条带亮度逐渐减弱。N/P 比高于 6 : 1 后，siRNA 主要位于上样孔，几乎没有泄露，说明 siRNA 已被完全包载。因此，后续体外实验将 N/P 设为 6 : 1。

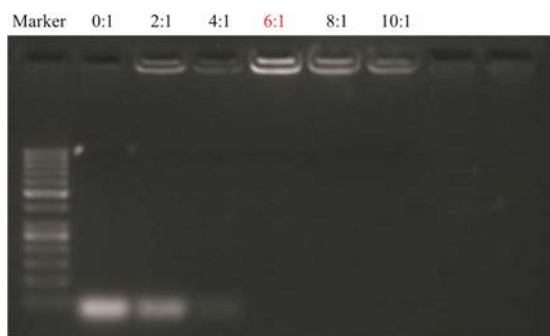


Figure 3 The result of optimal N/P ratio via agarose gel electrophoresis

3 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 的制备及处方优化

以 PLA 为载体材料，分别通过透析法和静电吸附法包载 DOX 与 siRNA，得到 PLA/DOX-siRNA-NPs；以一定比例的 HA 对其进行包覆得到 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs。如图 4 所示，通过对 NPs 粒径与 zeta 电位的测定，发现当 PLA 与 HA 的质量比为 1 : 3 (w/w) 时，NPs 的粒径最小，为 (167.3 ± 9.9) nm，并且 zeta 电位呈负值，为 (-15.5 ± 1.4) mV，说明 HA 已完全包覆住 NPs。因此，确定最佳处方为 PLA/HA 为 1 : 3 比例时制备的 NPs。

4 HA-PLA/DOX-NPs 的载药特性及其体外释放

通过荧光法测定 NPs 中 DOX 总浓度及游离药物浓度并计算载药 NPs 的 EE 和 DL，得到 PLA/DOX-NPs 分别为 $(90.04 \pm 9.13)\%$ 和 $(14.82 \pm 2.72)\%$ ；HA-PLA/DOX-NPs 分别为 $(86.93 \pm 8.91)\%$ 和 $(4.17 \pm 0.68)\%$ 。包覆前后 NPs 的 EE 无明显变化，说明在 HA 对 NPs 的包覆过程中不会导致药物的泄露。

通过透析袋法考察 HA-PLA/DOX-NPs 和 PLA/DOX-NPs 中 DOX 在不同条件下的释放情况，结果见图 5。从图中可见，HA-PLA/DOX-NPs 在 pH 7.4 条件下释药缓慢，累积释放率最低，24 h 时累积释放率约为 17%，这将有助于减少 DOX 在体液循环中的释放，降低其系统毒性；HA-PLA/DOX-NPs 在 pH 7.4

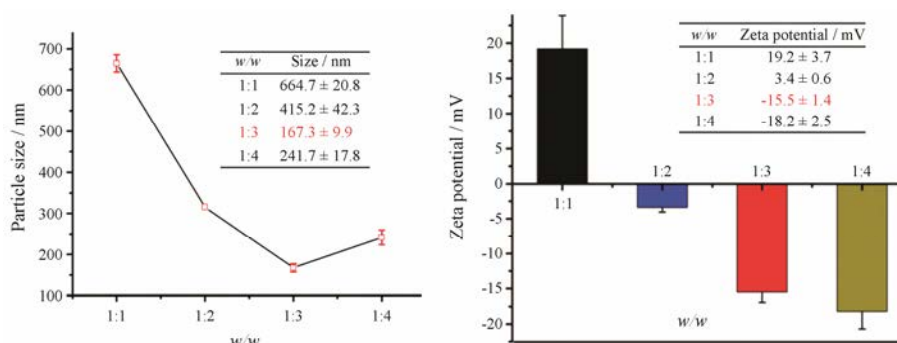


Figure 4 Optimization of HA-PLA/DOX-siRNA-NPs formulations. Particle size of HA-PLA/DOX-siRNA-NPs (left); zeta potential of HA-PLA/DOX-siRNA-NPs (right). w/w: Mass ratio of PLA and HA

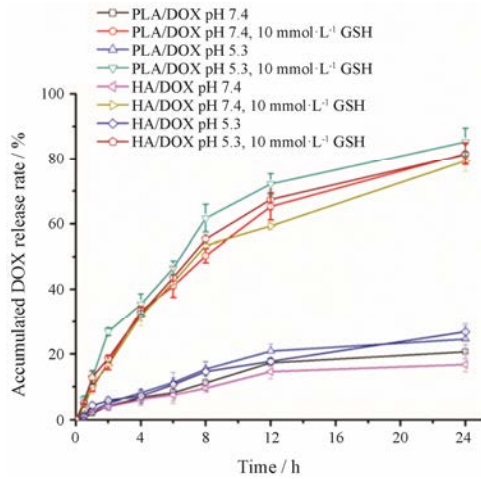


Figure 5 Release of DOX from HA-PLA/DOX-NPs or PLA/DOX-NPs under different conditions *in vitro*. GSH: Glutathione

下的累积释放率略低于 PLA/DOX-NPs, 说明 HA 包覆能进一步减少 NPs 在血液循环中 DOX 泄露。而在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 条件下, PLA/DOX-NPs 和 HA-PLA/DOX-NPs 在 pH 5.3 和 7.4 下均能实现快速释放, 24 h 累积释放率超过 70%, 说明两组 NPs 在肿瘤细胞内还原环境下能够实现药物的快速释放, 有利于提高细胞内药物浓度, 增强疗效。

5 HA-PLA-NPs (HA-PLA/DOX-siRNA-NPs) 的环境响应性

通过测定粒径与 zeta 电位对 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 的肿瘤微环境响应性进行考察。图 6 为 HA-PLA-NPs 在正常条件下和 HAase 存在条件下的 zeta 电位。图 7 为 HA-PLA-NPs 在正常条件下和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 条件下的粒径分布与 TEM 图。从图 6 可以看出, HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 在生理 pH 下 zeta 电位为负值, 但在 HAase 的作用下, NPs 发生电荷翻转, zeta 电位由负转为正, 说明在酶的作用下 NPs 带负电荷的 HA 外壳部分降解, 暴露出正电内核。从图 7 中可以看到, HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 的粒径呈

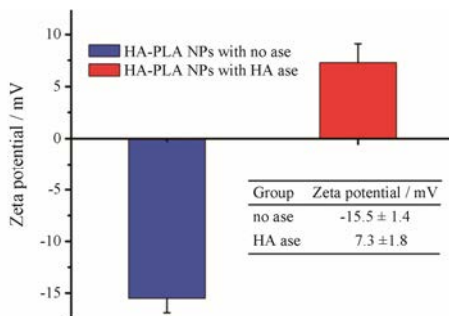


Figure 6 Zeta potential of HA-PLA-NPs (HA-PLA/DOX-siRNA-NPs) with or without HAase

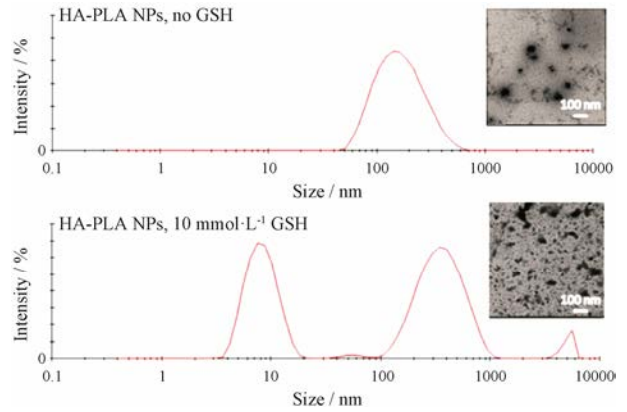


Figure 7 Particle size distribution and transmission electron microscope (TEM) of HA-PLA-NPs (HA-PLA/DOX-siRNA-NPs) with or without GSH

单峰, 且分布均匀, 粒径约为 167.3 nm; 加入 GSH 后, 粒径分布散乱, 呈多峰; 在 TEM 图中也能看出 GSH 处理后 NPs 形态明显改变, 出现聚集现象, 推测可能是 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 中的二硫键响应高浓度 GSH 而断裂, 致使 NPs 结构改变从而解体。

6 细胞摄取

通过 CLSM 考察 A549 细胞对 HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs (HAase +/-) 和 PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 的摄取情况, 结果见图 8。由图可见, 3 组 NPs 的摄取均呈时间依赖性, 随着共孵育时间延长, 红色 DOX 荧光与绿色 siRNA 均有所增强, 提示其细胞摄取量增加; PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 组的摄取略高于 HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 组, 推测可能是由于 HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 在生理 pH 条件呈负电

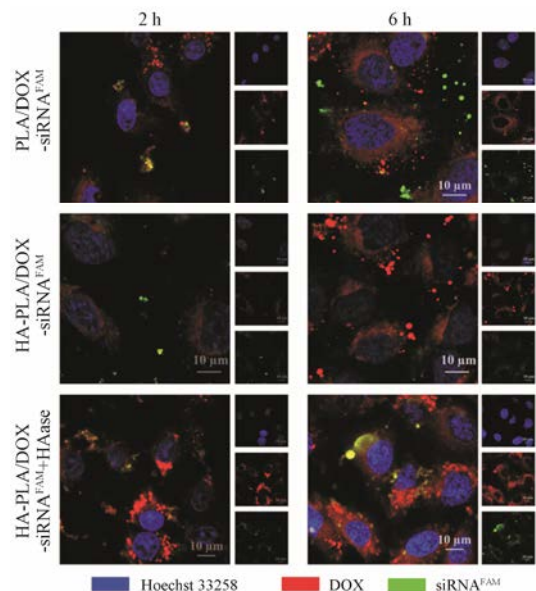


Figure 8 Confocal laser scanning microscope (CLSM) images of A549 cells treated with co-loaded NPs at different time points

荷, 而 PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 呈正电荷, 且 HA 受体介导的细胞摄取弱于正负电荷介导的细胞摄取; HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs (HAase) 的摄取在 2 和 6 h 均高于 HA-PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 组和 PLA/DOX-siRNA^{FAM}-NPs 组, 推测可能是由于酶降解部分 HA 外壳而暴露正电荷内核, 加之未被降解的 HA 介导的受配体结合增强摄取, 联合作用使得摄取量增加。

为进一步考察 HA 及 PLA 包覆的 NPs 对 A549 细胞的体外靶向性, 通过酶标仪定量分析 A549 细胞对 HA-PLA/DOX-NPs 组和 PLA/DOX-NPs 组的细胞摄取情况。结果见图 9。由图可见, PLA/DOX-NPs 和 HA-PLA/DOX-NPs 两组被细胞摄取量都明显高于 DOX·HCl 组, 提示 PLA 及 HA 的包覆提高了 NPs 的靶向性及细胞亲和性, 从而增强了 A549 细胞对 NPs 的摄取, 这可能是由于 PLA/DOX-NPs 通过正负电荷介导增强 HA-PLA/DOX-NPs 与 A549 细胞表面高表达的 CD44+ 受体结合所致, 而 DOX·HCl 由于不具有靶向性因而摄取量较低, 摄取效率不佳。NPs 摄取量的增加有望充分发挥 DOX 在 A549 细胞中的作用从

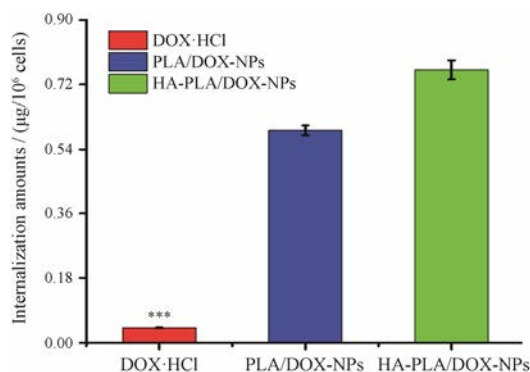


Figure 9 Quantitative analysis of cellular uptake on A549 cells treated with DOX-loaded NPs for 2 h using a full wavelength microplate reader. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs PLA/DOX-NPs group or HA-PLA/DOX-NPs group

而增强细胞毒性。

7 siRNA^{FAM} 细胞内分布

将 A549 细胞与 HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs 共孵育 2 或 6 h 后, 通过 CLSM 观察不同时间点 siRNA^{FAM} 的胞内分布情况, 结果见图 10。由图可见, HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs 的摄取呈时间依赖性, 随着共孵育时间延长, 绿色荧光强度增强, 提示摄取量增加; 2 h 时, HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs 的 siRNA^{FAM} 绿色荧光与溶酶体的红色荧光呈强共定位, 而孵育时间延长至 6 h 时, siRNA^{FAM} 的绿色荧光与溶酶体的红色荧光几乎不呈共定位, 说明载体材料能有效帮助 siRNA^{FAM} 实现内涵体逃逸, 避免其被溶酶体酶降解, 提高细胞内基因的浓度, 以增强疗效。

讨论

肿瘤细胞有不同于正常细胞的特殊环境。肿瘤组织内由于血管丰富、血管壁间隙较宽和结构完整性差, 淋巴回流缺失, 因而 20~200 nm 的 NPs 可通过 EPR 效应实现肿瘤组织的被动靶向; 其次, 肿瘤细胞表面高表达某些特异性受体, 如非小细胞肺癌表面高表达 CD44 受体, 因此以 HA 作为主动靶向配体对 NPs 进行修饰, 可进一步赋予其主动靶向特征, 通过受体-配体相互作用使更多 NPs 被肿瘤细胞摄取。此外, 肿瘤细胞内呈还原环境, 胞浆中 GSH 的浓度 (约为 2~10 mmol·L⁻¹) 是细胞外的浓度 (约为 2~20 µmol·L⁻¹) 的 10~1 000 倍^[22]。肿瘤细胞外基质中具有丰富的 HAase, 远远高于正常组织, 这些都为环境敏感性载体的设计提供了良好条件^[23]。

因此, 基于肿瘤内部特殊的微环境, 以 PLL 为基础接枝 LA, 成功合成了具还原敏感性的两亲性载体材料 PLA, 以 LA 作为还原敏感材料接枝于 PLL 具有以下优势: ① LA 是人体天然存在的天然氧化剂, 生

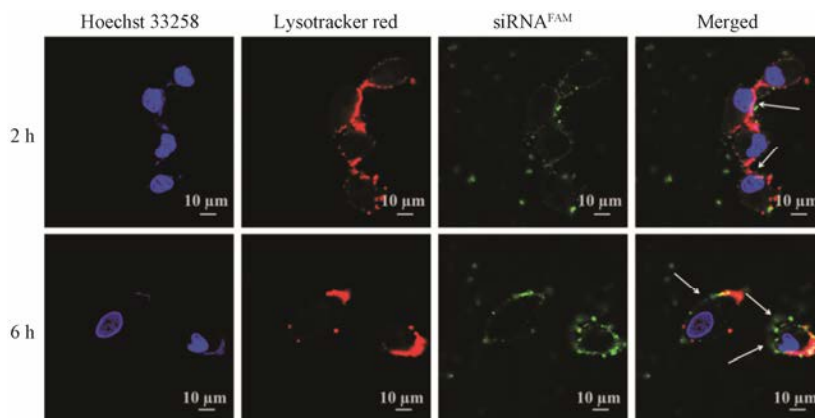


Figure 10 Endosomal escape of siRNA^{FAM} in A549 cells treated with HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs at different time points

物相容性好, 毒性小; ② LA 分子中有 1 个含二硫键的五元环, 可在 GSH 作用下开环, 形成线状结构; ③ 具有一定的疏水性, 能够作为还原性疏水内核包载 DOX; ④ 在体内循环稳定, 能很好地抑制药物泄露; 在胞内可响应 GSH, 二硫键被打开后疏水性下降, 因而能够快速释放药物, 产生高抗肿瘤活性^[24]。因此, 合成的 PLA 一方面可作为 DOX 的储库, 另一方面表面氨基带来的正电荷可有效吸附 siRNA, 从而构建了一种共载 DOX 和 siRNA 的还原敏感性 PLA/DOX-siRNA-NPs。此外, 为增强肿瘤靶向作用, 并降低 PLA 的强正电荷性带来的不良反应, 通过静电作用以 HA 对 PLA/DOX-siRNA-NPs 表面进行修饰, 构建了 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs, 用特异性配体和还原敏感嵌段特性从而实现其主动靶向及环境响应性的递送模式, 达到增加细胞摄取和细胞内药物有效释放的效果。

通过粒径和电位测定对不同包覆质量比 (PLA : HA 分别为 1 : 1、1 : 2、1 : 3 和 1 : 4) 的 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 进行处方优化, 发现在包覆比为 1 : 1 时, 粒径最大, 为 (664.7 ± 20.8) nm, 可能会导致 NPs 的聚集, 且电位为正电荷, 不利于其稳定性和其体内循环。随着 HA 比例增加, NPs 的粒径逐渐减小, 电位下降, 在 PLA : HA 为 1 : 3 (w/w) 时, NPs 的粒径最小, 为 (167.3 ± 9.9) nm, 可能是由于 HA 和 PLL 之间的电荷吸引力增大而使 NPs 内部变得紧凑^[25], 并且 zeta 电位呈负值, 为 (-15.5 ± 1.4) mV, 说明 HA 已完全包覆了 NPs, 因此通过此包覆比例合成的载体材料更有利于 NPs 稳定性, 且 zeta 电位结果表明 HA 修饰后得到的 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs (PLA : HA 为 1 : 3) 相比于 PLA/DOX-siRNA-NPs 表面呈负电荷, 这有助于减少在血液循环中对血浆蛋白的非特异性吸附, 提高其血液稳定性^[26]。通过对 HAase 的响应, HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 发生电荷反转, 由负转正, 但 zeta 电位低于 PLA/DOX-siRNA-NPs, 推测有部分 HA 被 HAase 降解。细胞摄取实验也表明, 在生理条件下 HA-PLA/DOX-NPs 摄取较低, 有助于降低其对正常细胞的毒性; 而在 HAase 存在的条件下, HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs 的细胞摄取明显增强, 这可能是 HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs 在此条件下暴露正电荷内核及剩余 HA 的主动靶向联合作用所致。酶标仪定量结果表明, PLA 及 HA 包覆的 NPs 相比于 DOX·HCl 的细胞摄取量显著增加, 提示这两种材料的包覆可增加 NPs 的细胞亲和性及靶向性。因此, 这种具有 HAase 响应及 CD44 主动靶向的 NPs 有望增强体内肿

瘤靶向作用。

通过对粒径的考察, 可知 HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 在生理条件下呈较为适宜的粒径且分布窄。经 GSH 刺激后, HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 粒径显著变大, 分布变宽, 且出现双峰。推测这种粒径的变化来源于 PLA 结构中 LA 片段的二硫键可在 GSH 作用下还原成巯基, 亲水性上升, 导致 PLA 聚合物整体亲水性平衡打破, NPs 发生解聚, 将有助于胞内还原条件下药物的释放。通过模拟血液及肿瘤细胞内环境, 考察 HA-PLA/DOX-NPs 的体外释放情况, 可知 HA-PLA/DOX-NPs 在生理条件下释药缓慢, 有助于避免或减少血液循环中 DOX 释放; 而在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 存在的条件下, 则迅速且彻底地释放包载的 DOX, 利于胞内药物释放^[27]。这种肿瘤微环境刺激下的药物释放特征有利于 NPs 在增强肿瘤细胞毒性的同时, 降低 DOX 的系统毒副作用。细胞内 siRNA 和 DOX 分布的结果也显示, 随着孵育时间的延长, DOX 可有效释放且逐渐扩散至细胞核, 而 siRNA 则主要位于细胞浆中。鉴于 DOX 与 siRNA 的最终作用靶点分别是细胞核与 mRNA, 这种胞内分布特征有助于两者药效的发挥。

siRNA 可被溶酶体中的酶降解, 因此作为 siRNA 的载体材料, 需要具备内涵体逃逸功能。通过对内涵体/溶酶体染色发现, HA-PLA/siRNA^{FAM}-NPs 经过 6 h 孵育后, 与溶酶体几乎不呈共定位, 提示其已经从内涵体逃逸, 这将有利于提高 siRNA 转染效率。一般而言, PEI 或 PLL 等富含氨基的载体材料在内涵体弱酸性条件下可发生质子化, 引起 H^+ 、 Cl^- 及 H_2O 内流, 将内涵体胀破, 即通过“质子海绵效应”实现内涵体逃逸^[28]。

综上, HA-PLA/DOX-siRNA-NPs 能有效改善 PLL 阳离子聚合物作为递送载体的缺陷, 提高共递送体系在血液循环中的稳定性; 同时, 通过 HA 的主动靶向作用及 HAase 刺激下的电荷反转, 增强细胞摄取; 摄取后可成功实现内涵体逃逸并响应胞浆中还原环境, 迅速释放包载的药物, 为更好地发挥药物与基因协同抑制肿瘤增殖和转移的能力提供基础条件, 可作为潜在的靶向非小细胞肺癌的药物递送系统。

References

- [1] Ye X, Fan W, Wang H, et al. Expert consensus for thermal ablation of primary and metastatic lung tumors (2017 Edition) [J]. Chin J Lung Cancer (中国肺癌杂志), 2017, 20: 433-445.
- [2] Gu JR, Cao XT. Conceptual consideration of cancer, chal-

- allenges and opportunities for cancer biotherapy [J]. *Chin J Cancer Biotherapy (中国肿瘤生物治疗杂志)*, 2008, 15: 2–7.
- [3] Omelyanenko V, Kopečková P, Gentry C, et al. Targetable HEMA copolymer-adriamycin conjugates. Recognition, internalization, and subcellular fate [J]. *J Control Release*, 1998, 53: 25–37.
- [4] Mizutani H, Oikawa S, Hiraku Y, et al. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper (II) and NADPH-cytochrome P450 reductase [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94: 686–691.
- [5] Mitra S, Gaur U, Ghosh PC, et al. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier [J]. *J Control Release*, 2001, 74: 317–323.
- [6] Itaka K, Yamauchi K, Harada A, et al. Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 4495–4506.
- [7] Patil ML, Zhang M, Minko T. Multifunctional triblock nanocarrier (PAMAM-PEG-PLL) for the efficient intracellular siRNA delivery and gene silencing [J]. *ACS Nano*, 2011, 5: 1877–1887.
- [8] Ohashi R, Takahashi F, Cui R, et al. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252: 225–234.
- [9] Zhang W, Yan C. Hyaluronic acid and its derivatives as drug carriers [J]. *Prog Chem (化学进展)*, 2006, 18: 1684–1690.
- [10] Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48: 416–427.
- [11] Yang ZZ, Li JQ, Wang ZZ, et al. Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 5226–5239.
- [12] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2005, 109: 169–188.
- [13] Qi R, Hu X, Yan L, et al. Synthesis of biodegradable cationic triblock copolymer mPEG-PCL-PLL for siRNA delivery [J]. *J Control Release*, 2011, 152: e167–e168.
- [14] Liu P, Sun Y, Wang Q, et al. Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of mPEG-PLGA-PLL and mPEG-PLGA-PLL-Gal nanoparticles for targeted delivery to hepatomas [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 760–770.
- [15] Ryoo NK, Lee J, Lee H, et al. Therapeutic effects of a novel siRNA-based anti-VEGF (siVEGF) nanoball for the treatment of choroidal neovascularization [J]. *Nanoscale*, 2017, 9: 15461–15469.
- [16] Leijten J, Rouwkema J, Zhang YS, et al. Advancing tissue engineering: a tale of nano-, micro-, and macroscale integration [J]. *Small*, 2016, 12: 2130–2145.
- [17] Du YZ, Wang L, Yuan H, et al. Preparation and characteristics of linoleic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles as a carrier for doxorubicin [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 69: 257–263.
- [18] Cun D, Foged C, Yang M, et al. Preparation and characterization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Int J Pharm*, 2010, 390: 70–75.
- [19] Wang HY, Cai B, Cui CB, et al. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 27–31.
- [20] Tam YT, To KK, Chow AH. Fabrication of doxorubicin nanoparticles by controlled antisolvent precipitation for enhanced intracellular delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 139: 249–258.
- [21] Ko H, Son S, Jeon J, et al. Tumor microenvironment-specific nanoparticles activatable by stepwise transformation [J]. *J Control Release*, 2016, 234: 68–78.
- [22] Fan D, Yu JM, Huang H, et al. Research progress of environment-responsive delivery system in the application of co-delivery gene and drug [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 713–721.
- [23] Teo PY, Cheng W, Hedrick JL, et al. Co-delivery of drugs and plasmid DNA for cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 98: 41–63.
- [24] Deng C, Meng FH, Cheng R, et al. Multifunctional biodegradable polymeric nanocarriers: design, synthesis, and applications in targeted tumor therapy [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2015, 60: 1339–1351.
- [25] 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: 1557–1562.
- [26] Shen Y, Wang J, Li Y, 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.
- [27] Zhong Y, Zhang J, Cheng R, et al. Reversibly crosslinked hyaluronic acid nanoparticles for active targeting and intelligent delivery of doxorubicin to drug resistant CD44+ human breast tumor xenografts [J]. *J Control Release*, 2015, 205: 144–154.
- [28] Deng J, Gao N, Wang Y, et al. Self-assembled cationic micelles based on PEG-PLL-PLLeu hybrid polypeptides as highly effective gene vectors [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 3795–3804.