

脂质-中空介孔硅联合递送盐酸多柔比星及 miR-375 治疗肝癌的研究

喻兆阳^{1,2#}, 薛慧颖^{1#}, 裘琳¹, 刘异¹, 李娟^{1*}

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院药理学部, 2. 药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要: 本文旨在构建一种全新的脂质-中空介孔硅纳米载体 (lipid bilayer coated hollow mesoporous silica nanoparticles, LHMSN) 以联合递送基因药物与化疗药物, 从而增强抗肿瘤药物对肝癌细胞的抑制活性。以盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, DOX) 为模型药物, 改良 StÖber 法合成中空介孔硅空载体, 利用脂质体融合原理, 制备共载 DOX 和 miR-375 的脂质-中空介孔硅纳米载体 (lipid bilayer coated mesoporous silica nanoparticles loaded with DOX and miR-375, LHMSN-DOX/miR-375), 并对纳米粒的形态、粒径、表面电位、载药量和体外释放度进行表征。同时考察纳米载体在人肝癌细胞 (HepG2) 中的摄取效率并进一步考察其对细胞活性和细胞迁移侵袭的抑制作用。结果表明, LHMSN-DOX/miR-375 核壳结构清晰, 外层脂质膜完整, 内部 HMSN 介孔结构有序, 平均粒径为 (262 ± 13.4) nm, 具有一定的 pH 响应性, 且 LHMSN 可有效将 DOX 和 miR-375 同时携带入胞。LHMSN-DOX/miR-375 可显著抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭并促进细胞凋亡。

关键词: 多柔比星; miR-375; 药物递送系统; 中空介孔硅; 纳米载体

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0151-08

Delivery of miR-375 and doxorubicin hydrochloride by lipid bilayer coated hollow mesoporous silica nanoparticles for liver cancer therapy

YU Zhao-yang^{1,2#}, XUE Hui-ying^{1#}, QIU Lin¹, LIU Yi¹, LI Juan^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Tongji Hospital, 2. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: This study was designed to prepare a novel lipid bilayer coated hollow mesoporous silica nanocarrier for co-delivery of gene drugs and chemotherapeutic drugs to enhance the inhibitory activity of antitumor drugs in hepatoma cells. Hollow mesoporous silica was synthesized by modified StÖber method. Lipid-fusion principle was used to prepare lipid-hollow co-loaded doxorubicin (DOX) and miR-375 (LHMSN-DOX/miR-375). Meanwhile, the morphology, particle size, surface potential, drug loading and release were characterized *in vitro*. The inhibition of cell proliferation, cell migration and invasion was then evaluated. The results indicated that the core-shell structure of LHMSN-DOX/miR-375 was clear with an intact outer lipid membrane and an ordered internal HMSN mesoporous structure. The drug release amount was pH responsive while the drug was rapidly released under simulated intracellular acidic conditions relative to normal physiological environment. Compared with free DOX, LHMSN-DOX/miR-375 can deliver DOX and miR-375 to liver cancer cells and inhibit the proliferation, migration and invasion of cells more effectively.

Key words: doxorubicin; miR-375; drug delivery system; hollow mesoporous silicon; nanocarrier

收稿日期: 2018-08-16; 修回日期: 2018-09-10.

基金项目: 湖北省卫生计生委科研项目 (WJ2017M077).

*共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-27-69378114, E-mail: lijuan@tjh.tjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0747

肝癌是一种高度恶性肿瘤疾病。据统计, 2015 年我国约有 46.61 万例新发肝癌病例和 42.21 万例死亡病例, 其发病率排名前五, 是一种死亡率较高的常见肿瘤疾病^[1]。纵观肿瘤治疗领域, 最主要的最有效手段依

然是化学药物治疗。然而,大部分化疗药物的静脉给药极易造成肿瘤细胞的多药耐药性,更加不幸的是,肿瘤外包被的紧密细胞基质在药物递送的血管灌注中起到了重要的屏障作用^[2,3]。因此,如何减轻肿瘤化疗药物的毒副作用,提高肿瘤药物的靶向性,增加其抗肿瘤的疗效已成为临床上亟待解决的问题。

另一方面,微小非编码RNA (microRNA, miRNA)的发现为基因治疗领域开启了一扇新的大门。它可以作为基因表达的主调控因子,在许多癌症中的启动和进展中扮演着关键的角色。在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中, miR-375 的异常调节也涉及多种肿瘤发生的各个方面,包括肝腺瘤、肝硬化和肝癌发展的不同阶段^[4,5]。本课题组及其他已报道相关研究表明, miR-375 主要通过抑制下游 YAP-1、AEG-1、ATG7 等基因的表达而抑制肿瘤的进一步发生^[6,7]。因此, miR-375 对于肝癌的替代治疗是一个较理想的靶点。然而, miR-375 作为一种基因药物需要借助合适的载体才能进入细胞发挥抗肿瘤效应。

近年来,基于纳米载体的药物治疗优势不断凸显,科学家们已经研究出不同种类的递送系统,为此纳米材料的选择尤为重要。通过化学合成的介孔材料被认为是一种十分有前景的智能纳米药物载体^[8,9]。功能性的中空介孔硅由于其独特的结构特点,如高度均匀可控的介孔孔道、稳定的化学性质、良好的结构耐用性和优良的热稳定性,使其成为理想的功能性容纳药物的载体材料^[10-13]。鉴于肿瘤的发生发展是多因素影响的结果,因此联合不同作用机制的化疗药物与具有特异性的基因药物进而达到最佳治疗效果,成为肿瘤治疗的新理念。现已有多项研究成功制备了低毒、可控、稳定和靶向的共载药纳米给药体系^[14]。本文以抗肿瘤药物盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, DOX) 为模型药物,设计了一种全新的脂质体包被的中空介孔硅纳米材料 (LHMSN),为化疗药物与基因药物在肝癌治疗中的联合应用提供一定的研究基础。

材料与方法

药品和仪器 JEM-2100型透射电镜(日本JEOL公司); UV 160U紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司); Zeta Plus光动力散射仪(美国Brookhaven Instruments公司); BD FACS C6型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司); Multiskan GO全波长酶标仪(美国Termo Scientific公司); 荧光倒置显微镜(日本Olympus公司); Western blot及转膜设备(美国BioRad公司); Micromeritics ASAP2010比表面孔径分布测定仪(美国Boynnton Beach公司)。

DOX原料药(>99.8%,商水生物科技有限公司); 正硅酸四乙酯(tetraethyl orthosilicate, TEOS, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氯化十六烷基三甲铵(cetyltrimethylammonium chloride, CTAC, 25 wt%)、胆固醇(cholesterol, CHOL)(美国Sigma Aldrich公司); 二油酰基三甲胺丙烷甲基硫酸盐(DOTAP, 美国Alabaster公司); DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司); 碘化丙啶(propidium iodine, PI)、MTT、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术公司); miR-375按照5'-CCC GCGACGAGCCCCUCGCACAA AACGC-3'和5'-GCGUUUUGUUCGUUVGGCUCGC GUGAGG-3'序列由广州锐博公司合成,其他试剂均为分析纯。

细胞模型 人肝癌HepG2细胞株、Hep3B细胞株和Huh7细胞株均来自中国典型培养物保藏中心。所有人肝癌细胞株培养于含10%胎牛血清DMEM培养液中,在37℃、5% CO₂孵箱中孵育,每1~2天更换1次培养液。

中空介孔硅(HMSN)的合成 本研究对介孔硅经典Stöber合成法^[6]进行改良从而合成中空介孔硅,其方法主要分为3个步骤。①合成模板dSiO₂:将TEOS 1 mL、超纯水5 mL、氨水0.8 mL加入至35.7 mL乙醇中搅拌1.5 h形成乳白色dSiO₂,洗涤并用水重悬备用。②合成SiO₂@MSN:取2 g CTAC(8 mL)、TEA 20 mg、dSiO₂ 10 mL溶解于20 mL超纯水室温搅拌1 h后降温至80℃,再加入TEOS 0.15 mL继续搅拌1 h。③合成HMSN:上述混合液加入Na₂CO₃ 636 mg,50℃反应1.5 h。离心收集沉淀,用1 wt% HCl室温洗涤除去CTAC并用水重悬。

HMSN-DOX的制备 精密量取1 mg·mL⁻¹ HMSN纳米粒水溶液9 mL,在剧烈搅拌中加入10 mg·mL⁻¹ DOX水溶液1 mL,超声2 min,继续搅拌24 h。制备HMSN-DOX纳米粒离心去除上清,加入超纯水1 mL离心洗涤至上清无色,最后加超纯水1 mL重悬。

LHMSN-DOX/miR-375的制备 DOTAP 61.92 mg、CHOL 42.6 mg、DSPE-PEG 28 mg于茄型瓶中,用10 mL氯仿溶解,45℃水浴旋蒸成膜30 min,水化挤压得清透均一的脂质体溶液。将制备的HMSN和脂质体(5 mg·mL⁻¹)等体积混合再吹打,室温下伴随震荡混合1 h,离心除去额外的脂质体并分散在磷酸盐缓冲液(PBS)中即得LHMSN^[15]。制备的LHMSN-DOX按照所需浓度与miR-375涡旋混合即得LHMSN-DOX/miR-375,使用前现配现用。

水合粒径及zeta电位的测定 取HMSN及LHMSN适量,采用Zeta Plus粒度电位测定仪于25℃测定样

品颗粒水合粒径大小、zeta 电位值、各自多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 SD 值并记录。

表面形态观察 分别取 HMSN、LHMSN-DOX 样品 10 μL 轻轻滴到铜网吸附 30 min。用干净的滤纸将多余的液体吸弃, 置于透射电镜下观察纳米粒形态 (华中科技大学分析测试中心检测)。

载药量的测定 采用紫外分光光度法。取上述制备好的 HMSN-DOX 100 μL 于 5 mL EP 管中, 加入 4% 氢氟酸 100 μL 混合均匀, 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜, 将 HMSN 中 DOX 完全释放, 采用紫外 480 nm 处测定吸光度 (A), 从而得到 100 μL 中 DOX 载药量 (DL)。DL = $W_{\text{DOX}} / (W_{\text{DOX}} + W_{\text{HMSN}})$, 其中 W_{DOX} 为 DOX 含量; W_{HMSN} 为 HMSN 总量。

体外释放度实验 体外 DOX 释放实验采用透析法, 将 LHMSN 和 HMSN 溶液 (相当于 DOX 2 mg) 放入具有 1/3 气隙的预处理的透析袋中密封, 然后将透析袋分散在 pH 7.4 和 5.0 的 10 mmol \cdot L $^{-1}$ PBS 30 mL 中, 并在黑暗环境中持续搅拌。采用 UV 分光光度计于 1、3、5、6、8、12、20、24、30、48 和 72 h 检测 PBS 中 DOX 的浓度。

琼脂糖凝胶电泳实验 配制含有 Goldview 染色试剂浓度为 1% TAE 缓冲液的琼脂糖凝胶, 将 miR-375 或 LHMSN-DOX/miR-375 (miRNA 剂量为 50 pmol) 上样, 以电压 160 V 电泳 50 min。使用 UV 透射仪和数字成像系统 (Life Science Technologies, USA) 拍照。

细胞荧光摄取实验 将 HepG2 细胞接种于 12 孔板中, 培养 24 h, 分别加入 LHMSN-DOX/miR-375 溶液和游离 DOX 水溶液 1 μL (DOX 质量浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 继续培养 0.5 h 或 8 h, 除去培养基, 洗涤。用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, 以 DAPI 染核并用 PBS 清洗, 于荧光倒置显微镜下观察 HepG2 细胞的摄取情况。

溶血实验 收集新鲜的血液样本 10 mL, 离心 (1 500 r \cdot min $^{-1}$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 洗净, 以 Dulbecco 的磷酸缓冲盐水 (DPBS) 重悬得 25×10^8 的红细胞 5 mL。将 4 mL 的 HMSN、LHMSN 和 25 kDa 聚乙烯亚胺 (PEI 25K) 分别与同体积红细胞 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。1% 的 Triton X-100 和 DPBS 分别为阳性和阴性对照。离心分离后 (1 500 r \cdot min $^{-1}$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 使用酶标仪于 541 nm 下检测 A 值, 并计算溶血率 (HL), 公式如下: HL = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性组}}) / (A_{\text{阳性组}} - A_{\text{阴性组}})$ 。

体外抗肿瘤活性检测 采用 MTT 法检测制剂体外抗肿瘤活性。将 HepG2 细胞接种在 96 孔板中, 密度为 5×10^3 个/孔, 待细胞贴壁后, 分别加入含 DOX 终质量浓度为 0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DOX、LHMSN-DOX 和 LHMSN-DOX/

miR-375 培养基各 1 μL , 培养 36 h, 加入 MTT 检测液, 用酶标仪测定 490 nm 波长处的 A 值。

流式细胞分析 在 6 孔板中, 每孔接种 4×10^5 个 HepG2 细胞。贴壁后加入 DOX 终质量浓度为 50 ng \cdot mL $^{-1}$ 、miR-375 为 100 nmol \cdot L $^{-1}$ 的游离 DOX、LHMSN/miR-375、LHMSN-DOX 和 LHMSN-DOX/miR-375, 进行培养, 36 h 后收集细胞并离心, 用生理盐水冲洗细胞 2 次, 加入结合缓冲液 100 μL , FITC Annexin V 和 PI 各 5 μL , 在室温 (约 25 $^{\circ}\text{C}$) 条件下孵育 30 min, 最后用 BD Accuri C6 流式细胞仪检测。

肿瘤细胞划痕实验 将 HepG2 细胞接种于 24 孔板中, 每孔密度为 5×10^5 个细胞。在无菌环境中, 用 200 μL 移液管尖划过孔底造成垂直伤口。分别加入含 DOX、HMSN-DOX、LHMSN-DOX 和 LHMSN-DOX/miR-375 的新鲜培养基分别在 0 和 24 h 于显微镜下观察^[5]。

细胞 transwell 侵袭实验 采用 transwell 小室 (直径 6.5 mm, 孔径 8 μm , 美国康宁公司) 进行迁移侵袭实验。在迁移实验中, 将 5×10^4 个 HepG2 细胞接种于含有 DOX、HMSN-DOX、LHMSN-DOX 和 LHMSN-DOX/miR-375 的上层无血清培养基中。含 10% 血清和相同浓度药物的培养基加入上下层小室。培养 24 h 后, 用棉签擦去上腔的非移行细胞, 其余用 4% PFA 固定 15 h, 然后用 1% 结晶紫溶液染色, 用显微镜观察计数^[5]。

蛋白免疫印记实验 培养 6 孔板中上述的细胞至 70%~80% 铺满状态, 按照 DOX 质量浓度为 200 ng \cdot mL $^{-1}$, miR-375 为 100 nmol \cdot L $^{-1}$ 给予 4 种不同的制剂 (DOX 水溶液、HMSN-DOX、LHMSN-DOX 和 LHMSN-DOX/miR-375) 培养 36 h, 刮下 6 孔板中的 HepG2 细胞加入细胞裂解液置于冰上裂解, 离心, 取上清液。在 10% 丙烯酰胺凝胶中细胞裂解物电泳分离后转移到 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液封闭 1 h, 分别孵育 Bax、cleaved caspase-3、Bcl2、AEG-1 和 YAP-1 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。然后将膜在含有 0.1% Tween 20 PBST 中洗涤 3 次, 孵育二抗 1 h, 将膜洗涤 4 次, 并通过 ECL 发光底物曝光显影, 以 β -actin 作为内参。

统计学方法 使用 Graphpad Prism 6.0 软件对所有数据进行统计学分析, 实验所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计方法采用双侧 *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异。如果数据不符合正态分布, 则采用 *F* 检验。

结果

1 纳米载体的制备与表征

共载 miR-375 与 DOX 脂质-中空介孔硅纳米粒

(LHMSN-DOX/miR-375) 的制备与结构示意图见图1。水合粒径及 zeta 电位测量结果见表1。每个样品检测5次算其平均值, 水合粒径为 192 nm, PDI 指数 0.005, 且 zeta 电位值在 -32 mV 附近, 说明合成的 HMSN 纳米粒具有高度的均一性和稳定性。脂包被后纳米粒径显著上升, 初步证明 HMSN 表面成功包裹了磷脂, 同时 PDI 的上升是由于溶液中可能还有一小部分表面没有包上磷脂的 HMSN, 但 PDI 在此小范围内上升并不会影响纳米粒的稳定性。而电位的翻转是由于表面的阳离子磷脂带正电荷, 包裹之后即掩盖了 HMSN 本身的电荷属性, 这也进一步验证了 HMSN 表面成功包裹上磷脂, 而这一正电荷值依旧维持在稳定的电位范围内, 即显示 LHMSN 为稳定的纳米粒。在偶联 miR-375 后, 由于核酸的负电性, 电位值呈现微弱的降低, 表明该纳米粒表面的磷脂能够很好地偶联核酸药物。

透射电镜结果见图2A, 在 200 kV 的 TEM 拍摄下, 可见 HMSN 呈现球形, 有很好的均一性和分散性, 表面可见明显的中空及介孔结构, 平均粒径在 60 nm 左右。脂包被后能看到纳米粒表面一层明显的 5 nm 左右的脂质层结构, 说明此法能够稳定地制备出脂质-HMSN (LHMSN)。而将制备出的纳米粒 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后发现上清液清透色浅, 而超声后又能很

好地均匀分散, 说明制备的脂质 HMSN 纳米粒能高效地将 DOX 包载进空腔内部, 体现了制备的 LHMSN-DOX 系统纳米粒的优良载药特性。

2 LHMSN-DOX 体外释放体现出 pH 敏感性

鉴于肿瘤的微酸环境 (pH 5.0~6.5), 本实验在体外模拟了生理环境 (pH 7.4) 和肿瘤的微环境 (pH 5.0) 条件以考察 DOX 的释放特征。如图2B, 相比于 pH 7.4 时, 在 pH 5.0 条件下, LHMSN-DOX 中 DOX 的释放速度明显增大, 并且同等酸性条件下, 没有脂包被结构的 HMSN-DOX 释放速率低于 LHMSN-DOX, 这提示 LHMSN-DOX 存在一定的酸依赖性, 在肿瘤组织中有较快释放。尽管该释药系统并没有特意设计 pH 敏感这一特性, 但是脂质材料在酸性条件下更易降解, 这与已报道的文献^[10]中脂包被纳米粒中脂质层本身即具有一定的 pH 响应性一致。因此, 一方面脂质膜可以有效保护包载的药物, 减少制剂到达肿瘤前的泄漏; 另一方面, 脂质核/壳纳米粒的 pH 敏感性使得药物实现在胞内的迅速释药, 发挥药效。

3 LHMSN-DOX 能够有效地偶联 miR-375

该实验用来验证 miR-375 是否成功载到纳米粒表面, 如图3所示。游离的 miR-375 全部从上样孔迁移至正极, 且背景很干净。而当质量比为 200:1

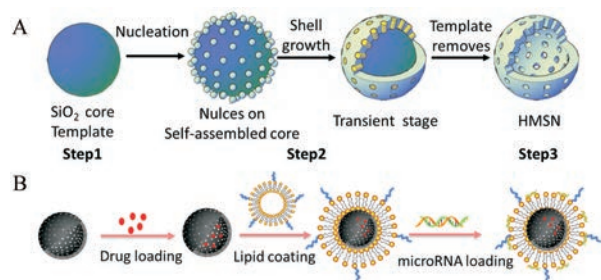


Figure 1 Schematic illustration of synthesis of hollow mesoporous silica nanoparticles (HMSN) (A). The SiO_2 cores were synthesized by stirring cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and tetraethyl orthosilicate (TEOS) in water, and then CTAC was extracted with methanol-hydrochloric. The synthesis of lipid bilayer coated mesoporous silica nanoparticles loaded with doxorubicin (DOX) and miR-375 (LHMSN-DOX/miR375) (B). After HMSN loading DOX, lipid bilayer composed of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP, chloride salt) was then fused to the DOX-loaded cores through film-hydration method. MiR-375 was then loaded by vortex

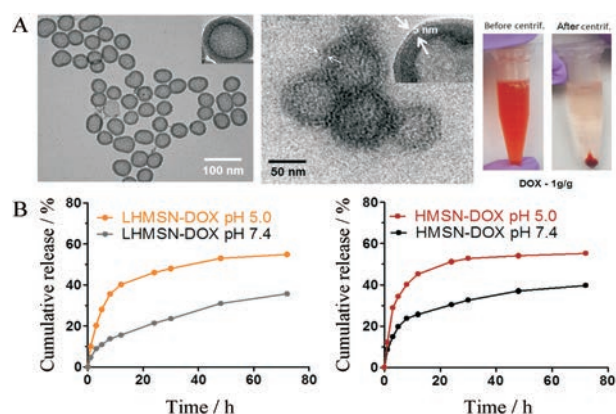


Figure 2 Transmission electron microscope (TEM) images of HMSN and LHMSN/miR-375 and the pictures of LHMSN-DOX solution before and after centrifugation were illustrated (A). The release profiles of LHMSN-DOX and HMSN-DOX *in vitro* (B). The release of DOX in simulated body fluid pH 7.4 and a pH 5.0 acid fluid at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 72 h. Each data represented as the mean \pm SD ($n = 3$)

Table 1 The characterization of HMSN, LHMSN-DOX, LHMSN-DOX/miR-375 in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

Group	Particles size/nm	Polydispersity	Zeta potential/mV	Drug loading/%
HMSN	192 ± 2.6	0.005 ± 0	-32 ± 5.7	-
LHMSN-DOX	210 ± 1.3	0.071 ± 0.048	$+27 \pm 8.1$	43.5
LHMSN-DOX/miR-375	262 ± 13.4	0.254 ± 0.03	$+12 \pm 9.3$	-

(miR-375:LHMSN-DOX) 时, 条带上只能看到微弱的亮度而大部分残留在上样孔, 但是随着质量比的降低, 残留量明显减小, 说明 LHMSN-DOX 能够有效地将 miR-375 偶联并在 200:1 时达到最大载药比。

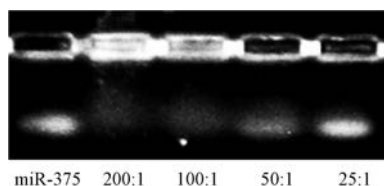


Figure 3 Detection of mir-375 loading efficiency by agarose gel electrophoresis at LHMSN-DOX/miR-375 ratios from 25:1 to 200:1 (w/w)

4 LHMSN-DOX/miR-375 可以携带两种药物进入肿瘤细胞

在 HepG2 细胞中观察其对药物的摄取情况, 使用荧光显微镜在 200 倍放大的条件下对其进行观察。紫光激发下发出蓝色的 DAPI 光, 绿光激发下发出 FAM 标记的 miR-375 的绿色光, 蓝光激发下发出 DOX 的红色光, 同一个颜色激发下不同时间点选用同样的曝光时间, 这样确保在分析时间依赖性摄取差异的过程中避免人为因素的影响。拍摄的图片使用 Photoshop 进行分析并 merge 组图, 在 0.5 h 时 DOX 和 miR-375 就能够达到比较好的摄取量, 且随着时间延长 (8 h), 摄取量呈显著上升趋势 (图 4)。说明该纳米粒在摄取方面有很强的能力并且能够达到比较高的携带效率。此外, 叠加后的图片也显示出很好的一致性。表明制备的 LHMSN-DOX/miR-375 可以成功携带两种药物进入肿瘤细胞。

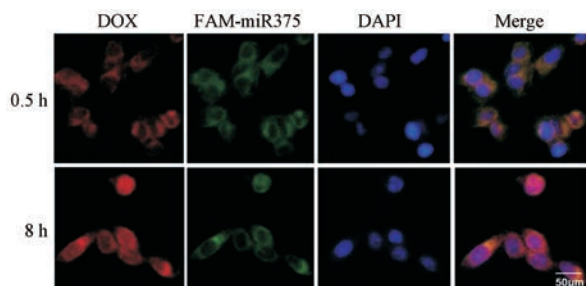


Figure 4 Cellular uptake of LHMSN-DOX/miR-375 and intracellular distribution of DOX and miR-375 in HepG2 cells after 0.5 h or 8 h incubation. MiR-375 was labeled with FITC (green) and DOX were red

5 纳米载药体系具有良好的生物相容性

静脉注射药物应对其生物相容性进行评估以确保对红细胞没有毒性。通过使用不同浓度的载体与红细

胞共孵育, 然后测量血红蛋白释放到上清液中的量以评价载体的溶血率。PBS 和 Triton X-100 作为阴性 (0% 血红蛋白释放) 和阳性对照 (100% 血红蛋白释放)。PEI 25K 为已知的具有显著溶血性的阳离子聚合物。由图 5A 表明, 在不同浓度下 HMSN 和 LHMSN 的血红蛋白释放极低, 提示该纳米载药体系具有良好的安全性, 无不良反应。

6 纳米药物的体外抗肿瘤活性及流式细胞分析

检测游离 DOX、LHMSN、LHMSN-DOX/miR-375 对 HepG2、Huh7 和 Hep3B 细胞增殖的抑制作用。如图 5B 所示, 处理 48 h 后, 空白载体在高浓度时不会对细胞产生毒性, LHMSN 与 DOX 对 HepG2、Hep3B 和 Huh7 细胞的细胞毒性相当, 但与 LHMSN-DOX 或 DOX 相比, LHMSN-DOX/miR-375 的细胞毒性更高。这表明, 负载于 LHMSN 内部后并未降低 DOX 本身的增殖抑制效果, 而由于 miR-375 的加入, 这一抑制效果显著提高, 并且随着浓度增大抑制增强。即将 miR-375 与 DOX 共载入 LHMSN 显著增强了抗肿瘤活性, 证明 DOX 与 miR-375 之间具有协同效应。

采用 Annexin V/PI 双染法标记细胞, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 细胞被分为 4 个区域 (图 5C): Q1、Q2、Q3 和 Q4, 分别代表坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞和活细胞。结果显示: 处理细胞 36 h 后, 游离 DOX 凋亡率为 19.31% (Q2+Q3), LHMSN-DOX 的凋亡率为 18.47%, 说明药物进入载体后完全释放, 同样能够很好地发挥抗肿瘤的目的。而在联合使用 miR-375 后, LHMSN-DOX/miR-375 载体诱导细胞的早期凋亡率为 28.89%, 细胞凋亡率明显增高。进一步表明, miR-375 和 LHMSN-DOX 具有协同效应, 与 MTT 结果一致。

7 LHMSN-DOX/miR-375 对 HepG2 迁移和侵袭能力的影响

划痕实验结果如图 6 显示, DOX、LHMSN-DOX 和 LHMSN-DOX/miR-375 处理后迁移率分别为 22%、20% 和 9%。与对照组相比, LHMSN-DOX/miR-375 能显著降低 HepG2 细胞迁移。在 Transwell 实验中, DOX、LHMSN-DOX 和 LHMSN-DOX/miR-375 对 HepG2 细胞侵袭结果如图 6 所示, 与 DOX (44%) 相比, LHMSN-DOX (37%) 显著降低 HepG2 细胞侵袭, 而 LHMSN-DOX/miR-375 (22%) 对 HepG2 细胞侵袭进一步降低。表明纳米化的 DOX 载药系统能够降低细胞的迁移和侵袭力, 在 miR-375 协同下抑制效果显著增强。

8 蛋白水平检测 LHMSN-DOX/miR-375 对 HepG2 的影响

Western blot 实验表明 (图 7), 在 HepG2 细胞中,

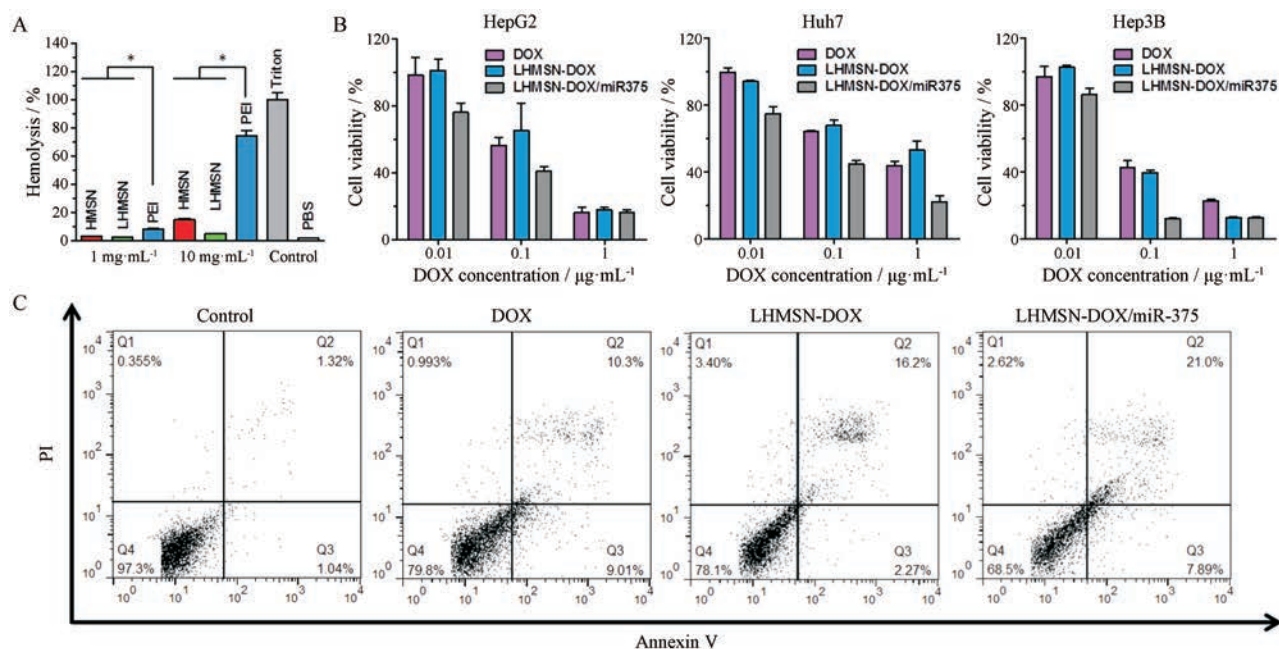


Figure 5 Hemolysis of LHMSN with red blood cells (RBCs) (A). The positive and negative controls were 1% Triton X-100 in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) and pure DPBS, respectively. Cell viability with different HCC cells (B). Cells were treated with drugs at indicated concentrations of DOX for 48 h. Cell viability was determined by MTT. Viabilities of untreated cells after 48 h culture were used as control and normalized as 100%. Data represented as the mean ± SD ($n = 5, \bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$. Cell apoptosis in HepG2 cells after 36 h treatment followed by flow cytometry analysis (C)

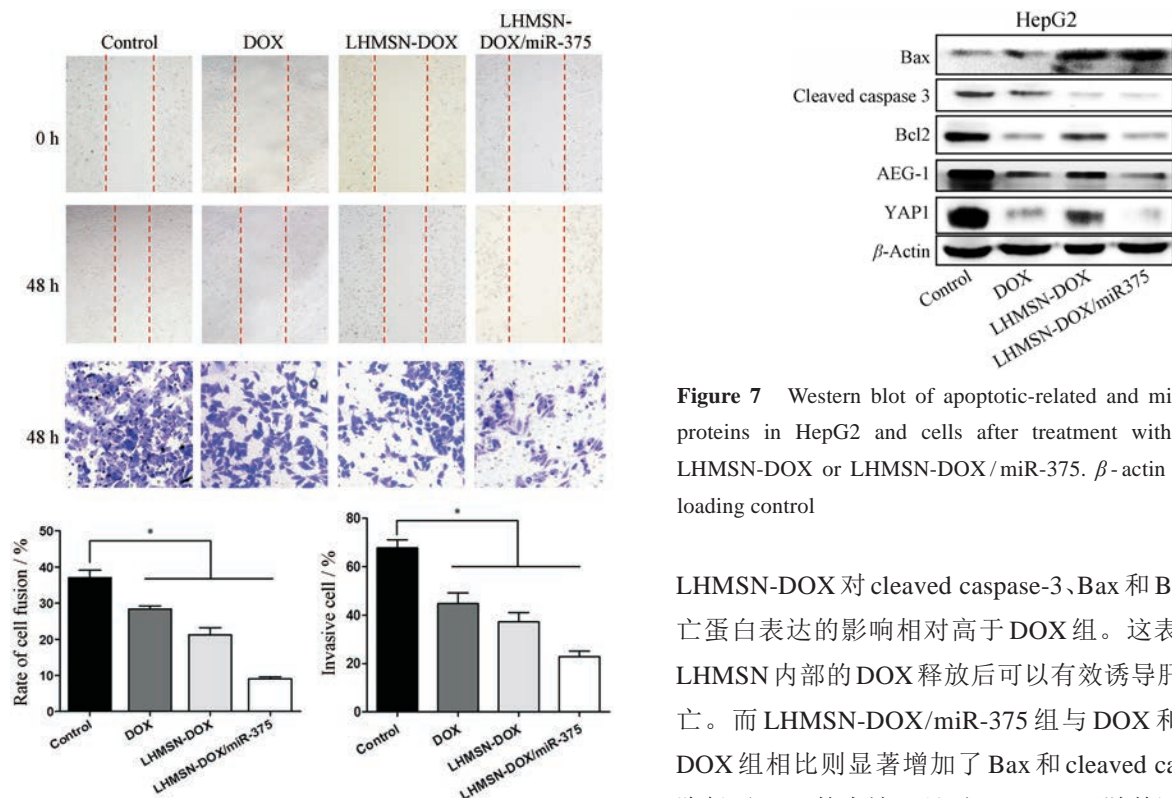


Figure 6 Wound-healing and transwell assay of HepG2 cells were treated with drugs at a concentration of DOX for IC₂₀ for 48 h. All data are shown as mean ± SEM of 3 independent experiments. * $P < 0.05$

Figure 7 Western blot of apoptotic-related and miR-375 target proteins in HepG2 and cells after treatment with free DOX, LHMSN-DOX or LHMSN-DOX/miR-375. β-actin was used as loading control

LHMSN-DOX 对 cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl2 三种凋亡蛋白表达的影响相对高于 DOX 组。这表明负载于 LHMSN 内部的 DOX 释放后可以有效诱导肝癌细胞凋亡。而 LHMSN-DOX/miR-375 组与 DOX 和 LHMSN-DOX 组相比则显著增加了 Bax 和 cleaved caspase-3 并降低了 Bcl2 的表达。且对 miR-375 下游基因 AEG-1 和 YAP1 产生了显著的抑制作用。这表明由 LHMSN-DOX/miR-375 递送的 DOX 可以有效递送外源 miR-375 发挥内源性 miR-375 作用,且由于 DOX 的存在发挥协同作

用使凋亡进程大大增强。

讨论

本研究制备了脂包被中空硅纳米粒共载 DOX 和 miR-375 系统, 中空介孔硅表面具有密集分布的介孔、内部空隙巨大及独特的释放药物性质的优点, 同时还兼具有脂质体良好的生物相容性的优势^[16]。相比普通介孔材料, 脂质-中空介孔硅纳米粒可以达到很高的载药量, 减少药物的泄漏, 使药物在肿瘤部位聚集。介孔硅表面的脂质材料可以轻松地将基因药物 miR-375 通过静电吸附作用荷载上去, 进而达到共载药的目的。

本研究中, 同等条件下脂包被后的纳米粒 LHMSN 释药速度显著降低, 这可能是由于脂质双分子层作为纳米粒的控制阀, 为药物泄露增加了一道屏障。同时, 脂质双分子层由于介孔氧化硅的支撑, 提高了其物理稳定性, 减少制剂到达肿瘤前的泄漏。脂包被纳米粒在低 pH 条件下释放速度加快, 体现出一定的酸敏感性, 由于酸性条件下脂质层更容易被破坏进而释放出 DOX, 这与肿瘤的微酸环境相适应, 使得药物实现在肿瘤细胞内的集中释放, 发挥药效^[10]。这一特性可以有效提高治疗效率且降低组织毒性。

电泳结果显示, 在达到合适比例时脂包被纳米粒可以最大限度地将 miR-375 吸附于纳米粒表面。进一步荧光摄取图片证实共载药纳米系统能同时将 DOX 和 miR-375 递送入胞且随时间延长摄取量显著增加。MTT 结果证实共载药纳米系统对肿瘤细胞增殖的抑制作用呈浓度依赖性。同一条件下, 与游离的 DOX 相比, LHMSN-DOX/miR-375 呈现出更高的细胞增殖抑制率, 可以推测 LHMSN-DOX/miR-375 可能通过分子水平的双重作用增加了细胞增殖抑制效应。

肿瘤细胞的迁移和侵袭与肿瘤不良的预后、极高死亡率密切相关。因此, 开发新型药物递送系统降低其转移与死亡率迫在眉睫。而本研究中设计的纳米药物递送系统 LHMSN-DOX/miR-375 被证实能够有效降低 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力, 具体的作用机制还有待于进一步研究^[17]。

Western blot 实验表明, 共载药系统对 DOX 下游凋亡信号 Bax、cleaved caspase-3、Bcl2 和 miR-375 下游基因 *AEG-1* 的表达均存在一定的抑制作用, 且 LHMSN-DOX/miR-375 组显著高于其他组。表明共载药系统在蛋白表达水平的抑制作用使两种药物发挥协同抗肿瘤效应。

已知 Bax、cleaved caspase-3 和 Bcl2 为 DOX 作用靶点^[18], 同时 cleaved caspase-3 和 Bcl2 为 miR-375 下游基因 *AEG-1* 的靶点。故研究中推测 DOX 和 miR-375

同时作用可引起细胞凋亡的发生。流式细胞实验也证实, LHMSN-DOX/miR-375 通过协同引起肝癌细胞凋亡。

本研究表明, LHMSN-DOX/miR-375 作为抗肿瘤药物的智能药物传递系统具有一定的应用前景。然而, 该阶段仅限于体外初步实验, 其体内抗肿瘤活性还有待进一步探索, 同时其肿瘤组织靶向性及对耐药细胞的作用也值得研究与探索。

References

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-132.
- [2] Wang S, Xu Y, Chan HF, et al. Nanoparticle-mediated inhibition of survivin to overcome drug resistance in cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2016, 240: 454-464.
- [3] Oda K, Uto H, Mawatari S, et al. Clinical features of hepatocellular carcinoma associated with nonalcoholic fatty liver disease: a review of human studies [J]. *Clin J Gastroenterol*, 2015, 8: 1-9.
- [4] Tao J, Ji J, Li X, et al. Distinct anti-oncogenic effect of various microRNAs in different mouse models of liver cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 6977-6988.
- [5] Xue HY, Liu Y, Liao JZ, et al. Gold nanoparticles delivered miR-375 for treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 86675-86686.
- [6] He XX, Chang Y, Meng FY, et al. MicroRNA-375 targets *AEG-1* in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2012, 31: 3357-3369.
- [7] Wang Y, Lieberman R, Pan J, et al. miR-375 induces docetaxel resistance in prostate cancer by targeting *SEC23A* and *YAP1* [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 70.
- [8] Chen F, Hong H, Shi S, et al. Engineering of hollow mesoporous silica nanoparticles for remarkably enhanced tumor active targeting efficacy [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5080.
- [9] Chen Y, Chen H, Guo L, et al. Hollow/rattle-type mesoporous nanostructures by a structural difference-based selective etching strategy [J]. *ACS Nano*, 2010, 4: 529-539.
- [10] Li FF, Zhang XX, Guo SY, et al. Preliminary study on pH-sensitive lipid bilayer-coated mesoporous silica nanoparticles as a novel drug carrier for antitumor drug [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 291-297.
- [11] Fei WD, Tao JY, Song QQ, et al. Advance in research of biodegradable mesoporous silica nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 716-726.
- [12] Deng Li, Su TT, Huang XL, et al. Co-delivery of paclitaxel and cyclosporine by a novel liposome-silica hybrid nano-carrier for anti-tumor therapy *via* oral route [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 106-114.
- [13] Yu Y, Tao C, Yang H, et al. Preparation of mesoporous silica

- nanoparticles in different pore size and its use in the solidification of sirolimus loaded self-microemulsifying drug delivery system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 985-991.
- [14] Su CW, Chiang CS, Li WM, et al. Multifunctional nanocarriers for simultaneous encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs in cancer treatment [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2014, 9: 1499-1515.
- [15] Liu J, Stace-Naughton A, Brinker CJ. Silica nanoparticle supported lipid bilayers for gene delivery [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2009, 34: 5100-5102.
- [16] Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, 24: 1504-1534.
- [17] Wang B, Chen D, Guo W, et al. Silica nanoparticles suppress fibronectin-mediated adhesion and migration in normal human keratinocytes [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012, 12: 293-299.
- [18] Bao Y, Yin M, Hu X, et al. A safe, simple and efficient doxorubicin prodrug hybrid micelle for overcoming tumor multidrug resistance and targeting delivery [J]. *J Control Release*, 2016, 235: 182-194.