

## 智能型荧光纳米递送系统用于乳腺癌细胞的示踪和增殖抑制研究

张贝贝\*, 黄维兰, 梅玉影, 邵悦馨, 张璐, 李瑞芳\*

(河南工业大学, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 本研究旨在构建一种智能型荧光纳米载体用于肿瘤细胞的示踪, 同时通过物理吸附和静电吸附作用, 完成模型药物多柔比星 (DOX) 和小分子干扰RNA (siBcl-2) 的负载, 实现对肿瘤细胞的协同抑制。本文采用溶胶凝胶法制备介孔硅纳米粒 (MSN), 共价修饰乙醛化胱氨酸 (AC) 及聚乙烯亚胺 (PEI), 所制备的纳米载体 MSN-AC-PEI 分散均匀, 粒径为 235.53 nm, 电位为 14.63 mV; 载体材料对 siRNA 负载比例可达到 60:1 (质量比), 且载体材料可保护 siRNA 不受 RNA 酶降解; 为模拟肿瘤微环境, DOX 在 pH 5、10 mmol·L<sup>-1</sup> 谷胱甘肽 (GSH) 中的释放行为被研究, 结果证明, DOX 在 120 h 的累积释放率为正常生理环境的 35 倍, 为其在肿瘤细胞内的智能释放奠定了基础。细胞实验结果表明: MSN-AC-PEI 载体材料具有显著绿色荧光, 被肿瘤细胞 (MCF-7) 摄取后, 24 h 仍具有示踪能力。纳米递药系统 MSN-AC-PEI@DOX/siBcl-2 给药 24 h 后, 对肿瘤细胞增殖抑制率可达到 40.91%, 晚期凋亡率为 60.84%。Western blot 实验结果表明: 与单独 DOX 及 siBcl-2 相比, 纳米递药系统能显著降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 从而提升其抗肿瘤能力。

**关键词:** 荧光; 纳米粒; 多柔比星; 小分子干扰RNA; 肿瘤

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)06-1123-09

## Smart fluorescent nano-delivery system for breast cancer cell tracing and growth inhibition

ZHANG Bei-bei\*, HUANG Wei-lan, MEI Yu-ying, SHAO Yue-xin, ZHANG Lu, LI Rui-fang\*

(Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** This study aimed to construct an intelligent fluorescent nanocarrier for tumor cell tracing. Doxorubicin (DOX) was used as a model drug, and the gene targeting siBcl-2 was loaded to achieve synergistic inhibition of tumor cells. Mesoporous silicon nanoparticles (MSN) were prepared by a sol-gel method, and acetaldehyde cystine (AC) and polyethyleneimine (PEI) were covalently modified. The prepared nanocarrier MSN-AC-PEI was uniformly dispersed, with a particle size of 235.53 nm and a potential of 14.63 mV. The carrier material MSN-AC-PEI could load siRNA with the mass ratio of 60:1 ( $W_{\text{vectors}}:W_{\text{siRNA}}$ ) and protect siRNA from RNase I degradation. To simulate the microenvironment of tumor, DOX release in phosphate buffer (pH 5) including 10 mmol·L<sup>-1</sup> glutathione (GSH) was investigated. The cumulative release rate of DOX at 120 h is 35 times that of the normal physiological environment, which lays the foundation for the intelligent release of DOX in tumor cells. The results of cell experiments showed that the carrier material MSN-AC-PEI had significant green fluorescence, and the traceability can be maintained for 24 h after taken up by MCF-7 cells. After 24 hours of administration of the nano drug delivery system MSN-AC-PEI@DOX/siBcl-2, the inhibition rate of tumor cell proliferation reached 40.91%, and the late apoptosis rate was 60.84%. The Western blot results showed that compared with free DOX and siBcl-2,

收稿日期: 2019-01-23; 修回日期: 2019-03-29.

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (17A350005); 河南省科技攻关项目资助 (182102310245); 河南工业大学博士基金项目资助 (2015BS012); 河南省高校科技创新团队支持计划 (19IRTSTHN008).

\*通讯作者 Tel: 86-371-67756253, E-mail: zhangbb058@163.com; ruifangli2006@yahoo.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0074

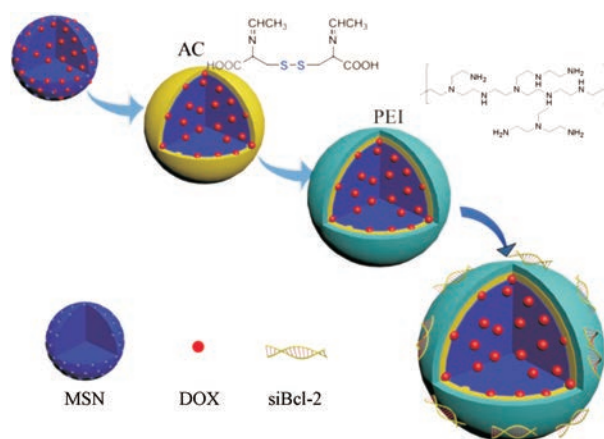
the nano-delivery system MSN-AC-PEI@DOX/siBcl-2 can significantly reduce the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, thereby enhancing its anti-tumor ability.

**Key words:** fluorescence; nanoparticles; doxorubicin; siRNA; tumor

介孔硅纳米材料由于比表面积大、生物相容性好、表面易于改性及低毒等特性,成为一种新型的药物基因纳米储存器<sup>[1]</sup>。自从本世纪初科学家提出 MCM-41 型 (mobil composition of matters N. 41) 介孔硅可用于药物释放体系以来,介孔硅纳米材料在药物缓释、控释及靶向输送等方面得到了长足发展<sup>[2,3]</sup>。研究发现,直径小于 200 nm 的介孔硅纳米粒 (MSN), 可通过增强的渗透性和保留效应进入肿瘤组织<sup>[4,5]</sup>。为了增强药物进入靶细胞的效率,应避免其到达靶部位之前过早释放,同时增强其在靶部位的精准释放<sup>[6]</sup>。利用肿瘤微环境的一些独特性质,如缺氧<sup>[7]</sup>、低 pH 值<sup>[8]</sup>、高还原性<sup>[9]</sup>等,可以开发和设计智能纳米递送系统,以提高治疗效果<sup>[10-12]</sup>。

近年来,随着癌症病例的急剧增加<sup>[13]</sup>,越来越多研究者把注意力放在了个性化癌症治疗及可追踪癌症治疗方面<sup>[14]</sup>。基于多种成像技术引导的癌症治疗,如核磁共振成像<sup>[15]</sup>、PET/CT 成像<sup>[16,17]</sup>、光声成像<sup>[18,19]</sup>和荧光共振能量转移成像<sup>[20]</sup>等有大量报道。其中,得益于商品化荧光试剂的多样性及荧光成像技术的日趋精湛,荧光成像技术已成为不可或缺的示踪手段<sup>[21]</sup>。然而,商品化试剂的研发重点在于试剂的荧光效率,不能满足肿瘤治疗过程中的多功能需求。乙醛化胱氨酸 (AC) 含有两个席夫碱,其自发荧光是由席夫碱中两个 C=N 键的  $n-\pi^*$  跃迁而诱导产生的<sup>[22,23]</sup>。另外,AC 具有二硫键,癌细胞内高浓度谷胱甘肽可以使其断裂,从而使得其功能多样化。

本研究构建了一种对肿瘤微环境敏感的智能荧光纳米复合物 MSN-AC-PEI (图 1), 用于共同递送化疗药物多柔比星 (DOX) 和基因药物 siBcl-2。AC 含有两个席夫碱和 -S-S- 键, 赋予 MSN 优异的可示踪性和生物降解性。此外,聚乙烯亚胺 (PEI) 的包覆不仅实现了堵孔作用,而且可以负载 siRNA。通过观察纳米载体材料在细胞质中的荧光,可以实时捕获药物释放过程,并明确药物作用的亚细胞位点。进一步研究表明,MSN-AC-PEI@DOX/siBcl-2 可以被有效地递送到乳腺癌细胞 MCF-7 中以抑制 Bcl-2 表达,促进细胞凋亡并抑制肿瘤细胞增殖。本研究通过引入具有自发荧光的化合物来修饰载体,从而将药物载体递送过程的可视化和肿瘤治疗过程有机联系起来,提高载体材料在杀伤癌症细胞过程中精准递送的能力。



**Figure 1** The representation of the formation of mesoporous silica-acetaldehyde modified cystine-polyethyleneimine (MSN-AC-PEI) nanocarriers for the co-delivery of small interfering RNA (siBcl-2) and doxorubicin (DOX)

## 材料与方法

**材料与试剂** 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, 98%, 国药集团化学试剂有限公司); 正硅酸乙酯 (TEOS, 98%), 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES, 98%), 二乙醇胺 (DEA)、肝素钠 ( $\geq 185 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$ , USP)、5,5'-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB, 98%)、还原型谷胱甘肽 (GSH, 98%)、支链聚乙烯亚胺 (PEI<sub>1.8</sub>, 1.8 kDa) (阿拉丁化学试剂有限公司); 支链聚乙烯亚胺 [PEI<sub>25</sub>, 25 kDa, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司]; 核糖核酸酶 A [ $>50 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; 多柔比星 (DOX, 98%, 大连美仑生物科技有限公司); Bcl-2 siRNA 的序列为: CCGGGAGAUAGUGAUGAA GdTdT (正义链)、CUUCAUCACUAUCUCCGGdTdT (反义链)、FAM-siBcl-2 (上海吉玛制药技术有限公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、DMEM 培养基 (索莱宝科技有限公司); 胰蛋白酶-EDTA、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天生物技术公司); 胎牛血清 (FBS, 泽塔生命公司); 超纯水 (MiliQ 公司); 所有其他化学品和试剂均为分析级。

**主要仪器** 透射电子显微镜 HT7700 (日立公司); 激光散射粒度仪 Nano-ZS90 (英国马尔文公司); 荧光分光光度计 Cary Eclipse (美国安捷伦公司); 酶标仪 FLx800 (美国伯腾仪器有限公司); 热重分析仪 Q50 (美国 TA 仪器); 激光共聚焦显微镜 FLUOVIEW FV3000

(日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 FACSCalibur (美国 BD 公司); 冷冻干燥机 BenchTop Pro (美国 Virtis 公司)。

**细胞模型** 人乳腺癌细胞 MCF-7 由郑州大学药学院惠赠, 培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每 1~2 天更换 1 次培养液。待细胞融合至 80% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶作为消化液进行消化传代。

**AC 的合成** 取胱氨酸 1 g, 加去离子水 50 mL, 超声搅拌均匀, 充分溶解。使用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液调 pH 值至 10。快速滴加 2 mL 乙醛到胱氨酸溶液中, 然后室温搅拌 24 h。再用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液调 pH 值至 7, 静置过夜。取上清液, 经 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后弃去沉淀, 冷冻干燥得到 AC 粉末。

**MSN-AC-PEI 的制备** ① 称取 2 g CTAB, 加去离子水 200 mL, 95 °C 搅拌均匀后, 加 DEA 320 μL, 接着滴加 TEOS 16 mL, 95 °C 回流反应 3 h, 用甲醇和去离子水交替洗涤 6 次, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心弃去上清, 60 °C 真空干燥 12 h, 得白色 MSN 粉末; ② 向 0.5 g MSN 中加无水乙醇 50 mL, 搅拌使其分散, 然后滴加 APTes 4 mL, 36 °C 搅拌冷凝回流 24 h。反应完毕, 用去离子水和乙醇交替洗涤 6 次, 按上述方法干燥; ③ 称量 AC 320 mg, 加入 400 mg EDC 和 NHS, 用 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4) 溶解, 室温下搅拌 30 min, 加入 NH<sub>2</sub>-MSN 240 mg, 室温搅拌 12 h。反应结束后, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 用上述 PBS 溶液反复洗涤 3 次后冷冻干燥得到 NH<sub>2</sub>-MSN-AC; ④ 称取 NH<sub>2</sub>-MSN-AC 10 mg, 加入 20 mg NHS 和 EDC, 使用 10 mL PBS 溶液 (10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4) 分散, 室温下搅拌 30 min, 加入 PEI, 室温下继续搅拌 8 h。反应结束后, 再用 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PBS 溶液 (pH 7.4) 反复离心洗涤 3 次后冷冻干燥, 得 MSN-AC-PEI。

**DOX 的包载** 称取 NH<sub>2</sub>-MSN 15 mg, 加 PBS (0.2 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4) 10 mL, 再加入 DOX (母液质量浓度 5 mg·mL<sup>-1</sup>) 1.5 mL, 室温搅拌 24 h 后, DOX 以物理吸附的方式进入 NH<sub>2</sub>-MSN 的介孔, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 收集上清液, 于 480 nm 测吸光度 (A) 值, 带入标准曲线  $A = 0.0116C + 0.0471$ , 求得上清中 DOX 的浓度 (C)。计算包载率 = (DOX<sub>总</sub> - DOX<sub>上清</sub>)/纳米材料总重。参照 MSN-AC-PEI 的制备方法再进行 AC 和 PEI 的修饰。

**透射电镜的表征** 取 MSN 及 MSN-AC-PEI 各 3 mg, 分散于 3 mL 无水乙醇中, 制备成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液。超声分散 20 min 后, 取 1 滴样品滴覆在碳支持膜的铜网上, 等待其自然干燥后用透射电镜进行表征。

**载体材料的粒径与电位** 分别取 MSN、NH<sub>2</sub>-MSN、NH<sub>2</sub>-MSN-AC 和 MSN-AC-PEI 各 2 mg 分散在 2 mL 水中, 超声分散后, 用马尔文 Nanosizer 测定材料的粒径和电位。

**材料的热重分析** 分别取 MSN、NH<sub>2</sub>-MSN、NH<sub>2</sub>-MSN-AC 和 MSN-AC-PEI 各 12 mg 于试管中, 将试样填充紧密并轻敲以形成均匀薄层, 使试样间接触良好 (有利于其热传导), 待机器预热结束, 把样品依次放入, 采用热重分析仪来对材料的性质进行表征。

**MSN-AC-PEI 的 GSH 消耗实验** 为了研究 MSN-AC-PEI 对 GSH 消耗能力, 首先将 0.5 mL 各质量浓度的 MSN-AC-PEI (0、62.5、125、187.5 或 250 μg·mL<sup>-1</sup>) 溶液与等体积 300 μmol·L<sup>-1</sup> 还原型 GSH 溶液混合, 于 25 °C 反应 2 h, 再使用 0.22 μm 滤膜过滤, 加入 DTNB 试剂 (终浓度 150 μmol·L<sup>-1</sup>) 作用 10 min, 测定溶液在 412 nm 处 A 值。标准曲线的制作按上述方法进行。

**空载体材料中 PEI 分子质量选择** 为了探究 PEI<sub>1.8</sub> 与 PEI<sub>25</sub> 对 siRNA 的负载能力, 分别制备 MSN-AC:PEI<sub>1.8</sub> = 1:0.1 和 MSN-AC:PEI<sub>25</sub> = 1:0.1 两种载体材料。并设置载体材料与 siRNA 的质量比分别为 0:1、10:1、20:1、40:1、60:1 和 80:1, 置于金属浴中 (温度: 37 °C, 转速: 300 r·min<sup>-1</sup>) 孵育 30 min, 取 5 μL 样品与 1 μL 上样缓冲液混合, 点样于 1% 的琼脂糖凝胶板。为了保证实验的统一性, 各个点样孔中 siRNA 质量固定为 0.2 μg, 于 110 V 电泳 20 min 后, 进行凝胶成像。

**RNA 酶保护实验** 为了验证载体材料对 siRNA 的保护能力, RNA 酶被用于降解未被保护的 siRNA, 肝素钠被用于置换结合在材料上的 siRNA。设置了 4 组实验, 每组实验有 4 个样品, 分别为载体材料与 siRNA 的质量比分别为 0:1、60:1、70:1 和 80:1。第 1 组实验未加 RNA 酶和肝素钠; 第 2 组实验中只加 RNA 酶; 第 3 组实验中只加肝素钠; 第 4 组实验中分别加入 RNA 酶和肝素钠。具体来说, 37 °C 孵育 30 min, 完成载体材料对 siRNA 的负载; 每 5 μL 样品中加入 RNA 酶 2.5 ng, 37 °C 孵育 30 min 进行酶解反应, 再通过 80 °C 加热 30 min 终止 RNA 酶的活性; 每 5 μL 样品中加入肝素钠 5 μg, 50 °C 孵育 30 min, 置换已被结合的 siRNA。再点样于 1% 的琼脂糖凝胶板, 进行电泳实验。

**DOX 释放行为研究** 为了研究 DOX 的响应性释放行为, 分别称取氨基化介孔硅 15 mg, 用 4 种不同缓冲液分别为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 5.0)、0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4)、含有 10 mol·L<sup>-1</sup> GSH 的 PBS (pH 5.0 或 7.4) 各 1.2 mL 进行分散。然后将材料混悬液置于透析袋

(MWCO = 3 500) 中, 再将透析袋浸入对应的 PBS (40 mL) 中, 37 °C、100 r·min<sup>-1</sup> 避光振荡。于预先设定的时间点, 取样 1 mL 并于 480 nm 处测 A 值, 代入标准曲线得各时间点的释放量。为了保证溶液总体积恒定, 取样同时补充新鲜 PBS 缓冲液 1 mL。

**体外细胞毒性实验** 将细胞以每孔 1×10<sup>4</sup> 个铺于 96 孔板, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下孵育过夜。待细胞贴壁后, 加入药液, 37 °C 条件下进行孵育 (每隔一天细胞换液 1 次)。药物作用规定的时间后, 弃去旧的培养基, 加入 MTT 溶液 (终质量浓度 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) 200 μL, 继续培养 4 h。小心弃去 MTT 残液, 每孔加入二甲基亚砜 100 μL, 置于摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。于 490 nm 处测量各孔 A 值, 并计算细胞存活率。

**细胞摄取实验** 将细胞铺于激光共聚焦专用培养板, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下孵育过夜, 待细胞贴壁后给药, 药物作用规定时间后, 吸去残液, 用 PBS 清洗 3 次后, 置于激光共聚焦荧光显微镜下进行拍照。

**细胞凋亡实验** 将细胞以每孔 3×10<sup>5</sup> 个铺于 6 孔板, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下孵育过夜, 待细胞贴壁后给药, 药物作用 48 h 后, 弃去药物残液。使用胰酶消化细胞, 加入培养基 1~2 mL, 充分吹打细胞至单个分散, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后, 收集细胞。分别用预冷的 PBS 2 mL 和 binding buffer 1 mL 洗涤细胞沉淀 1 次。加入 binding buffer 100 μL, 重悬细胞。按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒, 加 FITC 5 μL, 涡旋; 再加 PI 5 μL, 涡旋; 25 °C 水浴 5 min; 最后按细胞密度加入 PBS 100~500 μL, 采用流式细胞仪进行检测。

**Western blot 检测蛋白表达** 将细胞以每孔 3×10<sup>5</sup> 个铺于 6 孔板, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下孵育过夜, 细胞贴壁后, 加入配制好的药液, 继续培养 8 h, 换为完全培养基再培养 64 h 后, 提取各组的细胞总蛋白。根据蛋白浓度进行调整, 100 °C 煮沸 5 min, 4 °C 冰箱保存, 备用。通过 Western blot 方法进行实验, 恒压 120 V 条件下电泳 2.5 h, 恒流 200 mA 条件下转膜 2 h, 4 °C 条件下孵育抗体, 再通过曝光显影分析药物作用 72 h 后肿瘤细胞中 Bcl-2 蛋白的表达情况。

**统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Origin 进行统计学分析, 不同组别之间进行双侧 *t* 检验, 统计学的显著、非常显著和极非常显著差异分别表示为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  和  $P < 0.001$ 。

## 结果

### 1 纳米载体的制备与表征

本文设计的载体材料 MSN-AC-PEI 是以 MSN 为

中心, 通过共价键进行逐层修饰而获得的 (图 1)。因 MSN 具有高度有序的介孔结构, 且在外层结合有阳离子聚电解质 PEI, 因而该纳米载体材料可用作化疗药物和基因药物的载体。从图 2A、B 的 TEM 图像中可以看出, 本研究合成了大小平均为 58 nm、介孔大小一致、高度有序且分散均匀的 MSN。图 3A 为 AC 的荧光光谱, 其最大激发波长为 465 nm, 最大发射波长为 484 nm。随着 AC 和 PEI 的成功接枝, 使得纳米颗粒尺寸变大, 介孔变得模糊。AC 和 PEI 在 MSNs 上的沉积过程也可以通过 zeta 电位的连续变化来监测。如图 3B, MSN 的  $\zeta$  电位为 -21.27 mV, 氨基化后为 26.97 mV。连接上 AC 后,  $\zeta$  电位降至 -18.13 mV, 聚电解质 PEI 的沉积使  $\zeta$  电位增加至 14.63 mV。另外, 通过动态光散射纳米激光粒度仪的测定数据, 可以反映纳米粒的直径随修饰物涂覆而发生变化的过程。MSN 的水合粒径为 96.27 nm, NH<sub>2</sub>-MSN 为 134.53 nm (图 3C)。在成功修饰 AC 并接枝 PEI 后, 纳米粒的水合直径分别增加至 200.3 和 235.53 nm。从热重分析数据 (图 3D) 也可以看出, 当加热至 600 °C 时, NH<sub>2</sub>-MSN、NH<sub>2</sub>-MSN-AC 和 MSN-AC-PEI 的总重量损失分别为 13.32%、16.13% 和 18.52%。因此, AC 和 PEI 在 MSN 上的修饰量约为 2.81% 和 2.39%。

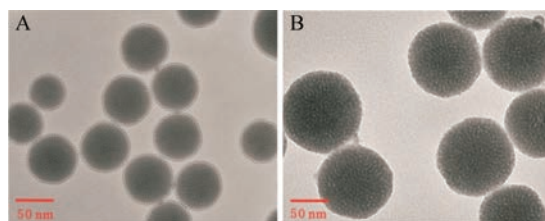
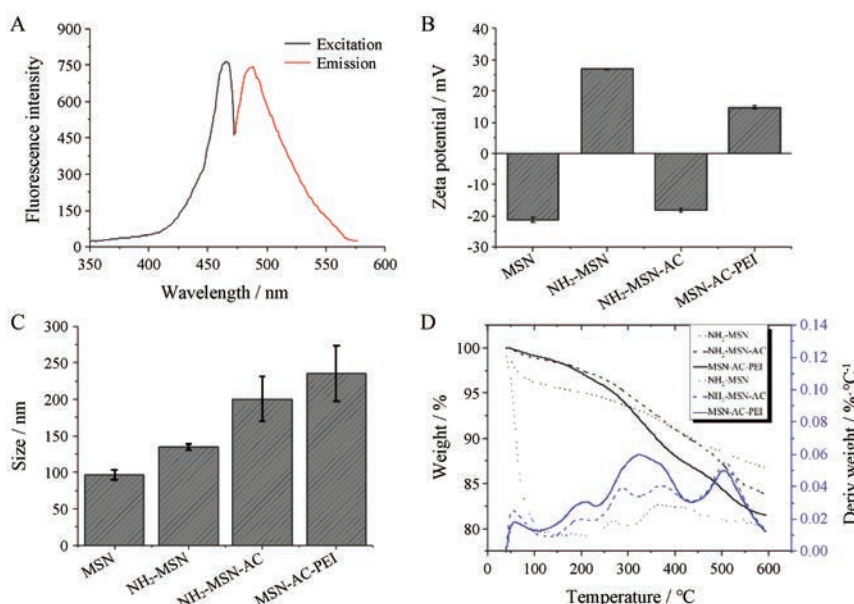


Figure 2 TEM characterization of mesoporous silicon nanoparticles (MSN) (A) and MSN-AC-PEI nano-carriers (B)

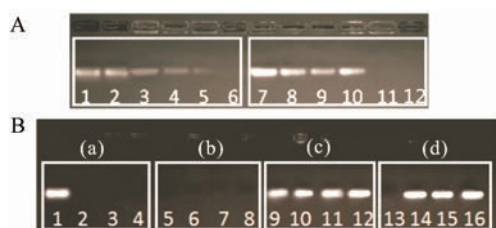
### 2 MSN-AC-PEI 对 siRNA 的负载能力及酶保护能力

siRNA 的转染效率取决于纳米载体材料对 siRNA 的负载效率及 MSN-AC-PEI@siBcl-2 纳米复合物的稳定性。如图 4A 所示, 为了提高 siRNA 的负载能力, 对不同分子质量 PEI 的负载水平进行了研究, 当使用 PEI<sub>18</sub> 时, 载体材料对 siRNA 的负载质量比可达到 80:1, 而选择 PEI<sub>25</sub> 时, 载体材料对 siRNA 的负载质量比可以达到 60:1。因而高分子量的 PEI<sub>25</sub> 对 siRNA 负载能力更好。

众所周知, 裸 siRNA 在生理条件下不稳定, 容易受到体内 RNA 酶的降解, 而失去活性。因而为了提高基因沉默的效率, 纳米材料对 siRNA 的保护能力是极为重要的。如图 4B 所示, 由于裸 siRNA 可以自由电泳, 且被 Red plus 染色, 故出现明亮条带 (泳道 1); 合成的



**Figure 3** The fluorescence spectra of acetaldehyde cystine (AC) in aqueous suspension (A). The representative zeta potential (B), hydrodynamic diameters (C) and thermogravimetric analysis-differential thermal analysis (TG-DTA) of MSN, NH<sub>2</sub>-MSN, NH<sub>2</sub>-MSN-AC and MSN-AC-PEI (D).  $n = 3, \bar{x} \pm s$



**Figure 4** Agarose gel electrophoresis retardation assay of MSN-AC-PEI@siRNA complexes under various vector/siRNA mass ratios (0:1, 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 and 80:1 from left to right). PEI<sub>1.8</sub> was used for lane 1-6, and PEI<sub>25</sub> was used for lane 7-12 (A). RNase protection assay of nanocomplexes (B): a: The MSN-AC-PEI@siRNA complexes with various vector/siRNA mass ratios (0:1, 60:1, 70:1, 80:1 from left to right); b: 5 ng · μL<sup>-1</sup> RNase was added; c: 2 Heparin sodium (2 mg · mL<sup>-1</sup>) was added; d: 5 ng · μL<sup>-1</sup> RNase and 2 mg · mL<sup>-1</sup> heparin sodium were added

载体材料表面带正电荷, siRNA 带有负电荷, 通过正负电荷吸引, siRNA 被负载不能自由电泳, 不出现明亮条带 (泳道 2~4); 加入 RNA 酶可降解裸 siRNA, 条带消失 (泳道 5), 而泳道 6~8 亦未出现条带, 猜测是由于 siRNA 被载体负载, 不受酶降解作用; 裸 siRNA 被 Red plus 染色亦出现亮条带 (泳道 9), 加入肝素钠用于置换 siRNA, 材料负载的 siRNA 被置换出来, 出现条带 (泳道 10~12); 同时加入 RNA 酶和肝素钠, 没有材料保护时 RNA 酶降解 siRNA, 条带消失 (泳道 13), 由于材料的保护作用, RNA 酶不能降解材料表面的 siRNA, 肝素钠将材料表面吸附的 siRNA 置换出来 (泳道 14~

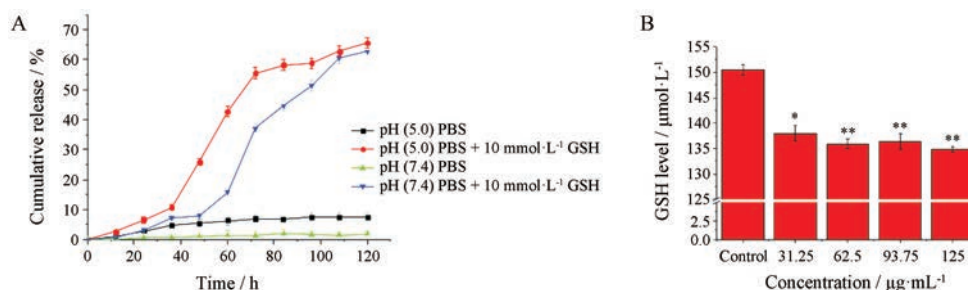
16)。结果证实, 本文制备的纳米载体材料可以有效保护 siRNA 免受 RNA 酶降解。

### 3 DOX 的刺激响应性释放

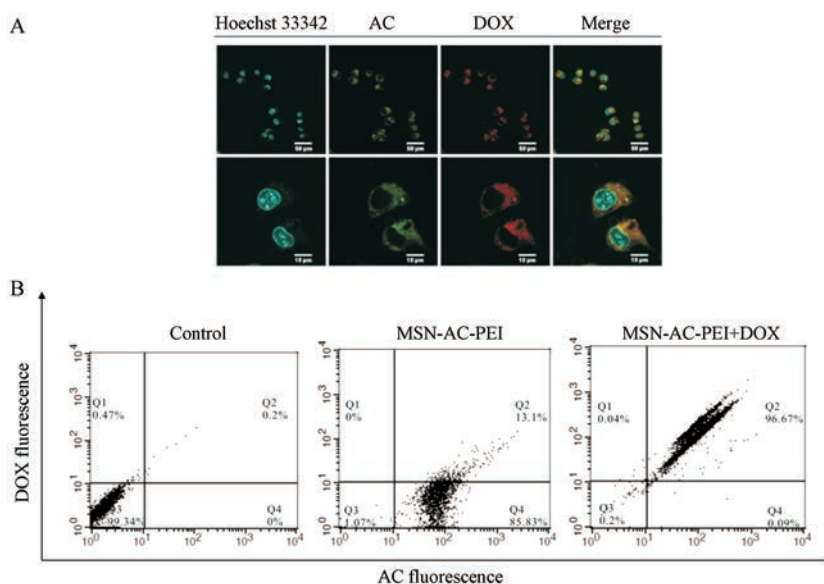
在不同的释放介质中 DOX 累积释放曲线如图 5A 所示。由于 AC 结构的不稳定性, 在酸性条件和高浓度的 GSH 作用下, 酰胺键及二硫键会发生断裂, 从而引起介孔内部以物理吸附形式结合的 DOX 释放。在 pH 7.4 PBS 中, DOX 在 120 h 的释放率仅 1.87%, 这也保证了纳米载药系统在到达作用位点之前, 在生理环境下的“零释放”; 在 pH 5 的酸性环境下, 药物释放率增加至 7.65%, 这体现了药物的 pH 值依赖型释放行为。当遇到 10 mmol · L<sup>-1</sup> GSH 时, 药物释放可迅速上升至 62.73%, 这表明 AC 结构内的二硫键可以在肿瘤微环境中裂解, 为药物的释放提供可能; 当同时存在低 pH 值、高 GSH 时, 累积释放进一步提高至 65.57%, 这一点可以被 AC 消耗 GSH 的事实佐证。如图 5B 所示, MSN-AC-PEI 与 GSH 作用 2 h 后离心, 检测上清中 GSH 发现, 纳米载体以剂量依赖性方式导致 GSH 水平显著降低, 为 DOX 在肿瘤高浓度 GSH 微环境中的响应性释放提供保证。

### 4 纳米药物在细胞内分布和示踪能力验证

本课题构建的 MSN-AC-PEI 纳米载药体系是一个具有示踪能力的纳米载体。其示踪能力来源于 AC 发射的荧光, 其最大激发波长为 465 nm, 最大发射波长为 484 nm。如图 6A 所示, 给药 6 h 后, 具有绿色荧光的纳米载体材料进入细胞, 同时包埋在介孔中的具有



**Figure 5** *In vitro* DOX release profiles of MSN-AC-PEI@DOX complexes in phosphate buffer saline (pH 5 or 7.4) with or without 10 mmol · L<sup>-1</sup> glutathione (GSH) (A). GSH depletion by MSN-AC-PEI. The reduced GSH (150 μmol · L<sup>-1</sup>) was incubated with different concentrations of MSN-AC-PEI for 2 h and the free GSH was determined (B). *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs control

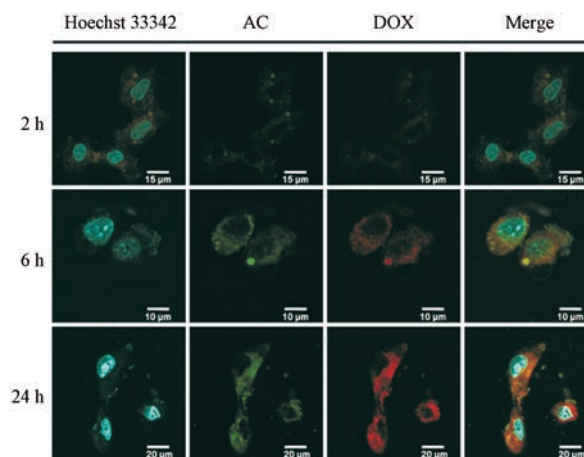


**Figure 6** CLSM images of MCF-7 cells after incubation with MSN-AC-PEI@DOX complexes for 6 h (A). Scale bar: 50 μm (upper), 15 μm (bottom). Cellular uptake of different nanoparticles in MCF-7 cells for 6 h was determined by flow cytometry (B)

红色荧光的DOX也一同被细胞摄取, 然后均匀分布在细胞质中。为了进一步验证纳米材料进入细胞的荧光强度, 将给药6 h后细胞进行了消化处理, 流式结果表明(图6B), 对照组99.34%的细胞分布在第三象限, 表明没有药物处理的情况下, 细胞既不具有AC的绿色荧光, 也不具有DOX的红色荧光。当细胞摄取了具有绿色荧光的空载体MSN-AC-PEI后, 其绿色荧光强度比对照组增强了100倍。当载体材料携带DOX进入细胞后, 细胞同时具有AC的绿色荧光和DOX的红色荧光。图7的激光共聚焦结果显示, 荧光纳米载体材料的示踪能力至少可持续24 h。给药24 h后, 仍可以清晰看到其在胞内的分布情况。

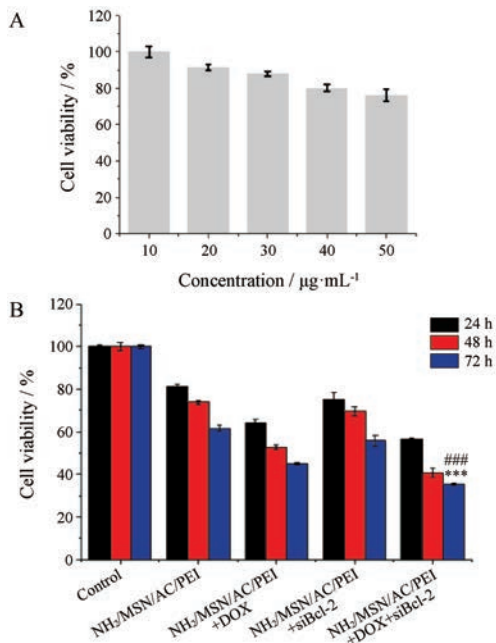
### 5 纳米载药体系的细胞毒性研究

通过MTT法测定了裸纳米载体, DOX或siBcl-2复合物及DOX和siBcl-2共递送纳米系统的细胞毒性。如图8A所示, 随着空载体MSN-AC-PEI的给药浓度增大, 细胞对空载体的毒性显示出浓度依赖性。考



**Figure 7** CLSM images of MCF-7 cells after incubation with MSN-AC-PEI@DOX complexes for 2, 6 and 24 h

虑到提高纳米载体浓度, 可以提高载药量, 并结合凝胶阻滞实验结果, 决定采用25 μg · mL<sup>-1</sup>空载体来进行下一步实验。如图8B所示, 在与MCF-7细胞共培养24、

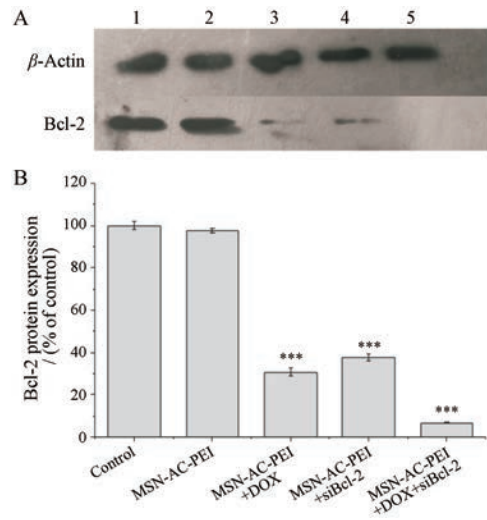


**Figure 8** Cell viabilities of MCF-7 cells treated with different concentration of MSN-AC-PEI (A) and different formulations of DOX/ siBcl-2 for 24, 48 and 72 h (B).  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs MSN-AC-PEI+DOX group, ### $P < 0.001$  vs MSN-AC-PEI+siBcl-2 group

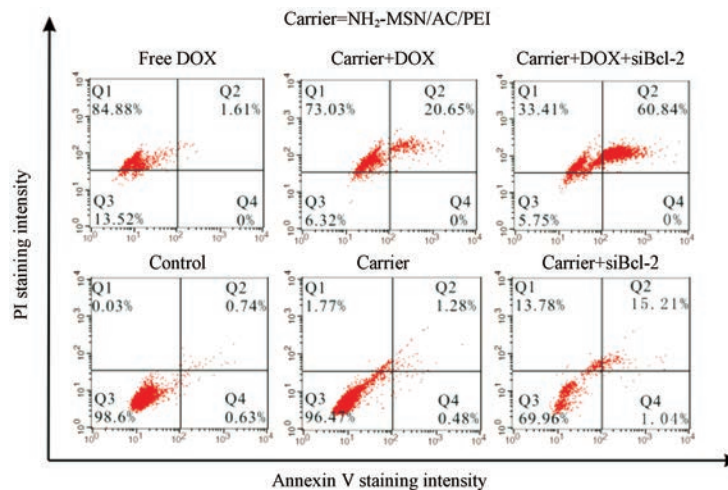
48 和 72 h 后, MCF-7 细胞的细胞活力随培养时间的延长逐渐降低, 表明裸纳米载体材料 MSN-AC-PEI 具有时间依赖的细胞毒性。与裸纳米载体组相比, DOX 或 siBcl-2 复合纳米系统的细胞活力, 在 72 h 分别降低至 45.01% 和 55.90%。然而, DOX 和 siBcl-2 共递送纳米系统显示出最佳的细胞毒性, 细胞存活率显著下降至 35.32%。这些结果表明, 与单一 DOX 递送相比, siBcl-2 和 DOX 的共递送可以增强化学治疗效果。

## 6 细胞凋亡实验

为了进一步研究不同纳米递送系统对 MCF-7 细胞的促凋亡作用, 采用膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒测定凋亡效率。结果如图 9 所示, DOX 和 siBcl-2 共递送纳米系统导致晚期凋亡细胞百分比为 60.84%, 显著高于单独 DOX (20.65%) 或 siBcl-2 (15.21%) 递送系统的晚期凋亡率, 这可归因于基因/化学协同治疗对乳腺癌的影响。另外, 如图 10 所示, 与对照组相比, MSN-AC-PEI@DOX 和 MSN-AC-PEI@siBcl-2 均可显著抑制 Bcl-2 表达, 其抑制率分别达到 69.33% 和 62.49%, 而化疗药物和基因药物的共递送系统 MSN-AC-PEI@



**Figure 10** The expression level of Bcl-2 for control (1), naked carrier MSN-AC-PEI (2), MSN-AC-PEI@DOX nano system (3), MSN-AC-PEI@siBcl-2 nano system (4) and DOX/siBcl-2 co-delivery nano system (5) was evaluated by Western blot (A). Semi-quantitative analysis of immunoblotting assay (B).  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs control



**Figure 9** Annexin V-FITC apoptosis assay for the determination of apoptotic/necrotic cells in MCF-7 cells treated with different formulations for 48 h was detected by flow cytometry. Untreated cells were used as a control

DOX/siBcl-2 对 Bcl-2 表达的抑制率可以达到 93.46%，综上所述，纳米递药系统对肿瘤细胞增殖抑制能力与 Bcl-2 表达水平降低直接相关。

## 讨论

介孔硅纳米粒具有有序的介孔结构，且表面易于被修饰，为其在可控释放领域的发展奠定了基础<sup>[24]</sup>。从 DOX 释放行为可以看出，纳米药物在正常生理条件下 (pH 7.4 PBS) 的释放极低，仅有 1.874%，主要原因在于介孔硅外层有高分子聚合物包覆，作为门控元素，对介孔进行堵孔，可有效阻碍 DOX 到达作用位点前释放。在偏酸环境下 (pH 5)，DOX 释放升高至 7.65%，这可能与 AC 结构中酸敏感的化学键“C=N”有关。而当遇到高浓度 GSH 时，DOX 释放迅速升高至 65.57%，这是由于 AC 具有二硫键，其可被谷胱甘肽消耗，使 DOX 得到迅速释放。总之，纳米材料具有酸性敏感性和 GSH 敏感性，为 DOX 在细胞内的大量集聚奠定了基础。

本研究构建的荧光纳米载体 MSN-AC-PEI，可用于肿瘤细胞的示踪。由于纳米载体具有强烈的绿色荧光，其在细胞内的分布可以被追溯至 24 h，这是由于 AC 的结构中含有席夫碱结构，赋予材料良好的示踪能力。其荧光强度稳定，且不易受复杂的细胞微环境影响，具有一定的示踪优势。另外，载体材料中 PEI 可提高 siRNA 的负载效率，每微克纳米材料的 siRNA 负载率可以达到 0.016  $\mu\text{g}$ ，且该材料具有保护 siBcl-2 不受酶降解的作用，这使得纳米材料基因药物复合体在细胞内可以实现基因沉默作用，并抑制 Bcl-2 抗凋亡蛋白的表达，进而促进肿瘤细胞的凋亡。

综上所述，本文构建的载药体系 MSN-AC-PEI 是一种多功能的荧光标记的硅基纳米载体，以 MSN 为本体材料，并对此进行功能化修饰，借助于荧光物质 AC 的标记，完成对抗癌药物 DOX 的包埋和 siBcl-2 的负载，从而实现对抗癌细胞的示踪，并能显著抑制肿瘤细胞增殖作用。

## References

- [1] Zhou Y, Quan G, Wu Q, et al. Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 165-177.
- [2] Baeza A, Colilla M, Vallet-Regi M. Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Del*, 2015, 12: 319-337.
- [3] Song Y, Li Y, Xu Q, et al. Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: advances, challenges, and outlook [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 87-110.
- [4] Zhong Y, Meng F, Deng C, et al. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 1955-1969.
- [5] Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? [J]. *Theranostics*, 2014, 4: 81-89.
- [6] Du J, Lane LA, Nie S. Stimuli-responsive nanoparticles for targeting the tumor microenvironment [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 205-214.
- [7] Semenza GL. The hypoxic tumor microenvironment: a driving force for breast cancer progression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863: 382-391.
- [8] Liu J, Huang Y, Kumar A, et al. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32: 693-710.
- [9] Quinn JF, Whittaker MR, Davis TP. Glutathione responsive polymers and their application in drug delivery systems [J]. *Polym Chem*, 2017, 8: 97-126.
- [10] Wen J, Yang K, Liu F, et al. Diverse gatekeepers for mesoporous silica nanoparticle based drug delivery systems [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 6024-6045.
- [11] Dai Y, Xu C, Sun X, et al. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 3830-3852.
- [12] Li R, He Y, Zhang S, et al. Cell membrane-based nanoparticles: a new biomimetic platform for tumor diagnosis and treatment [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 14-22.
- [13] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [14] Li X, Kim J, Yoon J, et al. Cancer-associated, stimuli-driven, turn on theranostics for multimodality imaging and therapy [J]. *Adv Mater*, 2017, 29: 1606857.
- [15] Abdalla MO, Karna P, Sajja HK, et al. Enhanced nescapine delivery using uPAR-targeted optical-MR imaging trackable nanoparticles for prostate cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2011, 149: 314-322.
- [16] Garrigue P, Tang J, Ding L, et al. Self-assembling supramolecular dendrimer nanosystem for PET imaging of tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 11454-11459.
- [17] Zhou M, Zhang R, Huang M, et al. A chelator-free multifunctional Cu-64 CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PET/CT imaging and photothermal ablation therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 15351-15358.
- [18] Zhong J, Wen L, Yang S, et al. Imaging-guided high-efficient photoacoustic tumor therapy with targeting gold nanorods [J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2015, 11: 1499-1509.
- [19] Qin H, Zhou T, Yang S, et al. Fluorescence quenching nanoprobes dedicated to *in vivo* photoacoustic imaging and high-

- efficient tumor therapy in deep-seated tissue [J]. *Small*, 2015, 11: 2675-2686.
- [20] Yang J, Zhang R, Radford DC, et al. FRET-trackable biodegradable HPMA copolymer-epirubicin conjugates for ovarian carcinoma therapy [J]. *J Control Release*, 2015, 218: 36-44.
- [21] Zhao J, Chen J, Ma S, et al. Recent developments in multimodality fluorescence imaging probes [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 320-338.
- [22] Du X, Shi B, Tang Y, et al. Label-free dendrimer-like silica nanohybrids for traceable and controlled gene delivery [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 5580-5590.
- [23] Hu LL, Meng J, Zhang DD, et al. Functionalization of mesoporous organosilica nanocarrier for pH/glutathione dual-responsive drug delivery and imaging of cancer therapy process [J]. *Talanta*, 2018, 177: 203-211.
- [24] Yang B, Chen Y, Shi J. Exogenous/endogenous-triggered mesoporous silica cancer nanomedicine [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7: 1800268.