

GGI/MDR1 siRNA 逆转 A549/DDP 细胞多药耐药的研究

王子瑞, 白 凤, 张小英, 吴佳敏, 郭 羚, 利 智, 冯 敏*

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 通过 RNA 干扰 (RNAi) 技术靶向耐药性人肺腺癌细胞内的 MDR1 基因实现多药耐药性的逆转作用。构建聚乙二醇-聚谷氨酸-聚乙烯亚胺 (PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs, GGI) 阳离子聚合物载体, 通过 ¹H NMR 表征确认结构, 动态光散射法测定 GGI/siRNA 的粒径及电位, 并以 A549 敏感株和 A549/DDP 耐药株细胞系为模型, 采用 MTT 法考察 GGI 的细胞毒性, 以流式细胞术评价新型聚合物载体 GGI 递送 siRNA 的效率和强度, RT-PCR 法考察 GGI 转染 A549 和 A549/DDP (cisplatin) 后 MDR1 mRNA 水平的表达; Western blot 法测定 A549/DDP 细胞中 P-gp 的表达。同时, 以 MTT 法和 Annexin V-FITC/PI 双染法考察 siRNA 干扰后抗肿瘤药物对药物敏感性的变化。结果显示, GGI/siRNA 复合物粒径为 150~200 nm, 电位稳定在 16~28 mV。GGI 细胞毒性远低于 PEI 25K, 且具有更高运载 siRNA 至细胞内的效率, 并能极大降低 A549/DDP 细胞内 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达, 能更大程度地增强耐药细胞株对顺铂的敏感性, 说明 GGI 有望在基因传递系统中成为一种新型的聚合物载体并广泛应用。

关键词: 基因传递系统; RNA 干扰; 多药耐药性; MDR1 siRNA; A549/DDP 细胞

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0309-09

GGI as a gene carrier delivering MDR1 siRNA to A549/DDP cells for reversal of multidrug resistance

WANG Zi-ru, BAI Feng, ZHANG Xiao-ying, WU Jia-min, GUO Ling, LI Zhi, FENG Min*

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This study was designed to reverse multidrug resistance of lung cancer cells by downregulating MDR1 genes through RNA interference (RNAi) technology. A novel biodegradable cationic polymer (PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs, GGI) was synthesized and characterized by ¹H NMR. The particle size and zeta potential were measured by dynamic light scattering (DLS). The cell viability profile of GGI was tested by MTT method with both A549 and A549/DDP cell lines. Flow cytometry (FCM) technology was used to investigate the efficiency and intensity of delivering siRNA to cells by GGI polymer. RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and P-gp expression after GGI/MDR1 siRNA transfection assay. The sensitivity of cisplatin administration after transfecting GGI/MDR1 siRNA polyplexes was performed with MTT and Annexin V-FITC/PI methods. The results suggest that the particle size and zeta potential of GGI/siRNA were 150–200 nm and 16–28 mV. GGI exhibited a lower cell cytotoxicity than PEI 25K and higher efficiency of delivering siRNA, which dramatically decreased the expression of MDR1 mRNA and P-gp of A549/DDP cells and increased much sensitivity to cisplatin in A549/DDP cells. GGI holds a great potential in gene delivery as a novel cationic polymer for further investigation.

Key words: gene delivery system; RNA interference; multidrug resistance; MDR1 siRNA; A549/DDP cell

收稿日期: 2016-10-24; 修回日期: 2016-12-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373332); 广东省自然科学基金资助项目 (2014A030313155).

*通讯作者 Tel: 86-20-39943119, Fax: 86-20-39943004, E-mail: fengmin@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1033

肿瘤细胞多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)^[1-4]是临床上导致患者化疗失败的主要原因之一。多药耐药性是指肿瘤细胞对多种结构和作用机制完全不同的化疗药物产生交叉耐药性的现象。多药耐药的产生是个错综复杂的过程,但是肿瘤细胞中由MDR1基因编码的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)^[5-9]的过表达被认为是重要的原因之一。P-gp是一种分子质量为170 kDa的跨膜糖蛋白,属于ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白超家族,可以转运多种结构与功能不同的化疗药物。其耐药机制主要是含有外排泵将药物泵出胞外,降低化疗药物在耐药肿瘤细胞中的蓄积。目前,随着基因治疗的深入研究,RNA干扰技术^[10-13](RNA interference, RNAi)为逆转肿瘤的多药耐药性提供了一个更加高效、特异和低毒的方法。

RNA干扰是将与目的基因同源的含21~23个核苷酸的小分子干扰RNA片段(small interfering RNAs, siRNA)转染至靶细胞,与细胞内的内切酶形成诱导沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC),引起特定mRNA的降解,从而在mRNA水平抑制靶蛋白的表达,实现特定基因沉默的技术。但是由于siRNA分子携带负电荷,不易通过细胞膜,且易被核酸酶降解等,使其难以到达靶细胞发挥基因沉默作用,因此需要安全稳定高效的基因传递载体以保护siRNA在体内稳定传递并高效地作用于靶细胞^[14,15]。

聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)^[16]是目前应用广泛的一类聚阳离子载体。一般来说,随着PEI分子量的增加,其进入细胞的转染能力也增强,但是同时PEI毒性也随之提高。当分子质量达到25 kDa时,转染效率最高,但毒性也增大;而分子质量较低时(<2 kDa),虽然毒性较低,但不能有效结合和压缩DNA而导致转染效率降低,这在很大程度上限制了PEI的应用和发展。

聚谷氨酸^[17]是一种人体生物酶降解的多聚肽类化合物,在体内可降解为内源性物质谷氨酸,具有生物相容性、低毒性和低免疫原性的特点。其已广泛应用于缓控释药物载体、基因载体及组织工程的研究。

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)^[18-20]属无毒、无免疫原性的材料,由于其自身的特殊结构性质,可与水形成氢键,形成水化“晕”层,且具有一定的流动性,可有效降低与体内蛋白的吸附作用,不容易被网状内皮系统(RES)识别,具有长循环效应,是一种应用广泛前景良好的生物材料。目前PEG修饰大多采用单甲氧基聚乙二醇(mPEG),其性能与PEG相似,且可避免在修饰其他化合物过程中发生交联

或团聚。

本文设计并构建低毒高效的PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs(GGI)聚合物载体,其结构主要是以生物可降解的聚乙二醇-聚谷氨酰胺两嵌段共聚物为骨架,利用低分子量的聚乙烯亚胺PEI 800表面伯胺基通过氨解反应接枝于谷氨酰胺侧链上,以期得到一个高转染效率、低细胞毒性和可生物降解的基因载体,且以MDR1基因为靶基因,试图下调P-gp表达,逆转肺癌细胞的多药耐药性,降低抗肿瘤药物的给药量。

材料与方法

材料 L-谷氨酸(L-glutamic acid, L-Glu, 国药集团化学试剂有限公司); 甲氧基聚乙二醇胺(mPEG-NH₂, $M_w = 2$ kDa), 聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI 800, $M_w = 25$ kDa), 四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyletrazolium bromide, MTT], DDP(Aldrich-Sigma公司); 人肺癌细胞系A549和A549/DDP购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; FAM-siRNA(5-carboxyfluorescein siRNA), MDR1 siRNA(上海吉玛生物科技有限公司); MDR1一抗, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(Cell Signalling, 美国), Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG(H+L)(碧云天生物技术研究所以)。

聚合物GGI的合成

聚乙二醇-*b*-谷氨酸苄酯(PEG-*b*-PBLG)的合成以L-谷氨酸为原料,采用苯甲醇对其 γ -羧酸进行酯化保护,再通过三光气法合成中间产物L-谷氨酸 γ 苄酯-N羧酸酐(BLG-NCA)。称取BLG-NCA单体6 g于无水氯仿中(20:1, w/v),按单体BLG与引发剂甲氧基聚乙二醇胺为50:1比例,室温搅拌反应72 h。反应结束后用无水乙醚沉淀反应液,过滤,真空干燥,得淡黄色半透明固体PEG-*b*-PBLG。

聚合物PEG-*b*-PLG-PEIs(GGI)的合成 称取上述合成的PEG-*b*-PBLG嵌段聚合物1 g,溶解于无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(20:1, w/v),按一定比例加入PEI 800($Mol_{PEI\ 800}/Mol_{BLG} = 10:1$)和催化剂2-羟基吡啶(2-HP)($Mol_{2-HP}/Mol_{BLG} = 5:1$),于40℃搅拌反应48 h。反应结束后,用大量冰冷乙醚沉淀反应物,透析,冻干,得白色疏松粉末GGI。

聚合物GGI的¹H NMR表征 以D₂O或CDCl₃为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标,温度为25℃,在核磁共振谱仪上(Varian INOVA500NB,美国Varian公司)对所得样品mPEG-NH₂、PEI 800、PEG-*b*-PBLG

及 GGI 进行测定。通过 $^1\text{H NMR}$, 可以根据 PEG 特征峰 a 的峰面积与苜基 e 峰的峰面积, 估算 PEG-b-PBLG 的聚合度 (DP_{PBLG}) 及 GGI 的分子质量。公式如下:

$$\text{DP}_{\text{PBLG}} = \frac{2000}{44} \times \frac{2e}{a}$$

GGI/siRNA 复合物的制备与粒径电位的测定 以水为介质, 将 GGI 和 siRNA 分别在去离子水和无核酶水中配成一定浓度的溶液, 按照不同的 N/P 比 ($n_{\text{GGI 中氨基基团}}/n_{\text{DNA 中磷酸基团}}$), 将两者等体积混合, 涡旋 30 s, 室温静置 30 min, 即得 GGI/DNA 复合物纳米粒, 终体积为 1 mL。采用动态光散射粒度分析仪 (Zetasizer Nano Series90, 英国 Malvern 公司) 对复合物粒径和电位进行测定。设定自动扫描模式, 测试温度为 25 °C, 每个样品测定 3 次。

细胞毒性实验 采用 MTT 法检测聚合物载体 GGI 的细胞毒性。以细胞数 5×10^3 个/孔将 A549、A549/DDP 细胞接种于 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO_2 条件下生长 24 h 后, 吸弃培养液, 分别加入 200 μL 不同浓度的 GGI 溶液 (以不含血清培养基溶解), 4 h 后更换为含 10% 血清培养基继续培养 44 h, 加入 MTT 处理, 于 570 nm 和 630 nm 波长下检测各孔吸光度 (OD) 值, 计算细胞的存活率, 公式如下:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{OD}_{570(\text{样品})} - \text{OD}_{630(\text{样品})}}{\text{OD}_{570(\text{空白})} - \text{OD}_{630(\text{空白})}} \times 100\%$$

GGI/FAM-siRNA 纳米粒的细胞摄取 采用流式细胞术评价 GGI/FAM-siRNA 的细胞摄取情况。取对数生长期的 A549、A549/DDP 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 12 孔板中, 在 37 °C、5% CO_2 条件下生长 24 h 后, 吸弃培养液, 加入不同 N/P 比的 GGI/FAM-siRNA 复合物, 继续孵育 4 h 后, 通过倒置荧光显微镜观察结果, 并消化收集细胞, 用 PBS 清洗 3 次以除去背景, 于流式细胞仪上测定细胞摄取率及其荧光强度。实验中以 PEI 25K 和 Lipofectamine 2000 为对照。

GGI/MDR1 siRNA 复合物的细胞转染 将 A549、A549/DDP 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板中, 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h 后弃去培养基, 加入不同 N/P 的 GGI/MDR1 siRNA 复合物, 在无血清培养基条件下于 37 °C 孵箱中孵育 4 h, 换含 10% 完全培养基继续培养 48 h。同时设置 GGI/siRNA_{NC}、PEI/MDR siRNA、Lipofectamine 2000/MDR siRNA、裸 MDR1 siRNA 和空白对照组。

实时定量 PCR (RT-PCR) 采用 TRIZOL 试剂法提取细胞转染后各组细胞的总 RNA, 按 Promega 反

转录试剂盒操作合成 cDNA, 以 GAPDH 基因为检测的内参照, PCR 反应引物由 Invitrogen 公司合成, MDR1 序列如下: 上游: 5'-GGUAUUAGGACCAUAAAUTT-3'; 下游: 5'-AUUUUAUGGUCCUAAUAUCCTG-3'。GAPDH 序列: 上游 5'-GAACGGGAAGCTCACTGG-3'; 下游: 5'-GCCTGCTTACCACCTTCT-3'。设置 PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 之后 94 °C 1 min、58 °C 1 min、72 °C 1.5 min, 循环 33 次, 72 °C 15 min 终止反应。于琼脂糖凝胶电泳上检测 PCR 产物, 条件为: 电压 100 V, 时间 10 min。于凝胶成像系统扫描, 以 Image J 软件分析。公式如下: 目的基因 mRNA 表达量 = 每例标本目的基因平均荧光强度值 / 同一标本 GAPDH 平均荧光强度值。

Western blot 法检测 P-gp 蛋白的表达 转染实验结束后, 用 RIPA 裂解液充分裂解细胞提取总蛋白, 运用 BCA 蛋白检测试剂盒测定总蛋白含量。采用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳分离蛋白, 按一定比例的 MDR1 一抗孵育过夜, Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔二抗孵育, 曝光, 显影, 凝胶成像, Image J 软件分析 P-gp 与 GAPDH 条件的灰度比。

MDR1 siRNA 干扰后对顺铂的敏感性 采用 MTT 法检测转染前后 A549 和 A549/DDP 细胞的顺铂敏感性。以细胞数 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 加入各组载体/MDR1 siRNA 复合物转染 48 h 后, 加入一定浓度的顺铂溶液 (A549 和 A549/DDP 细胞给药质量浓度分别为 7、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 于 37 °C、5% CO_2 条件下继续培养 24 h, 在 570 nm 和 630 nm 处测定各孔 OD 值, 并计算顺铂对 A549 及 A549/DDP 细胞的生长抑制率, 以顺铂浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制曲线图。

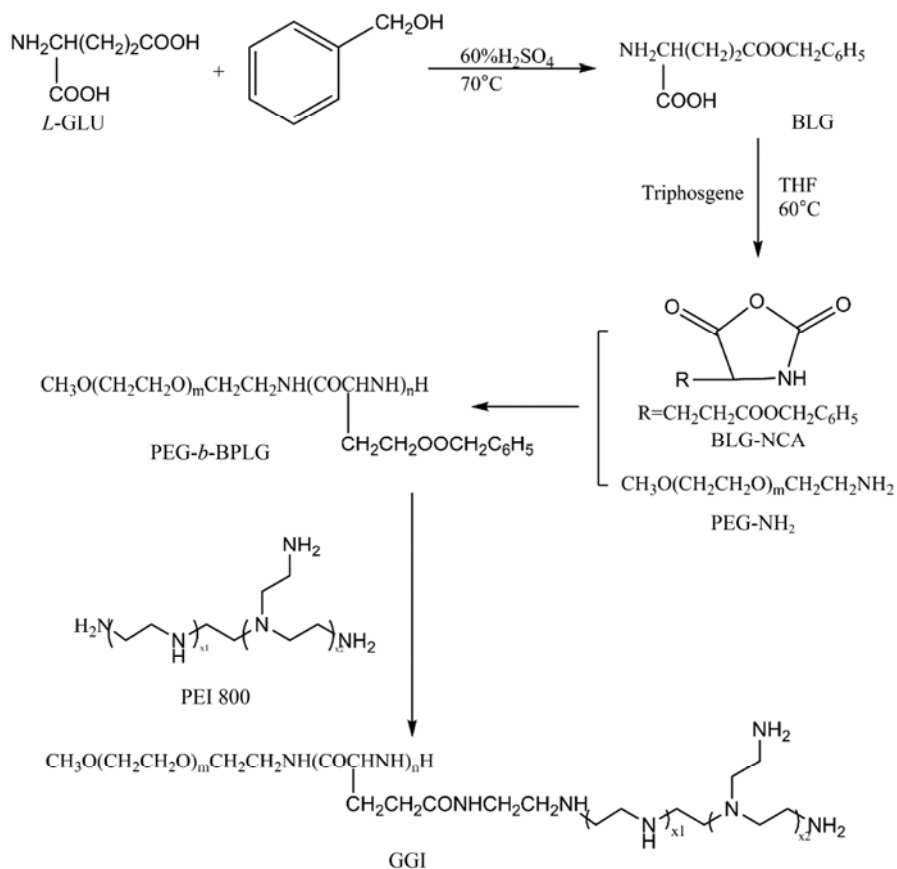
Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 A549 和 A549/DDP 经各组载体/MDR1 siRNA 复合物转染 48 h 后, 胰酶消化收集细胞, 并用 PBS 清洗 3 次, 重悬于 Binding Buffer, 加入 Annexin V-FITC 5 μL 避光孵育 15 min 后, 加入 PI 溶液 10 μL , 避光孵育 5 min, 于流式细胞仪上检测, 激发波长 488 nm。

统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件处理数据, 对以上结果均进行 *t* 检验与方差分析, $P < 0.05$ 说明具有统计学差异。

结果与讨论

1 聚合物 GGI 的 $^1\text{H NMR}$ 分析

聚合物 GGI 的合成见反应路线图 1。氢核磁谱见



Scheme 1 Synthesis pathway of PEG-*b*-PLG-*g*-PEI (GGI) polymer

图 1, A 和 C 为原料 mPEG-NH₂ 和 PEI 800 的 ¹H NMR 谱图, 其中 PEG 嵌段为特征峰 (-CH₂CH₂-) a 的化学位移为 3.65, PEI 800 中有乙撑基 (-CH₂CH₂NH-, 2.12~2.96) 的吸收峰, B 为中间产物 PEG-*b*-PBLG, BLG-NCA 开环后形成聚合物, 出现聚谷酰胺骨架上 (-CH-, 3.91) 的 e 峰, 其次还有侧链上谷氨酸一端羧基保护后的苯基 (-CH₂Ph-, 5.024) e 峰和苯环 (-C₆H₅-, 7.24) f 峰。证明 PEG-*b*-PBLG 聚合成功。而在 GGI (D) 中, 该 e 和 f 峰消失, 出现新的酰胺键 j 峰 (-CONH-, 7.094) 以及小分子 PEI 800 的乙撑基特征峰 i 和 h, 说明经过 PEI 800 氨解反应, 侧链上苯基脱去, 成功接枝上了 PEI 800, 形成 GGI 聚合物。同理可得 GGI 各组分分子质量的估算值, PEG 为 2000, PLG 为 10 160, 而 PEI 为 46 626, 由此可知, 聚合物 GGI 的相对分子质量为 58 786。

2 GGI/siRNA 复合物的粒径电位

GGI/siRNA 纳米复合物在不同的 N/P 值下粒径均保持在 150~200 nm, 随 N/P 比的增大, 复合物粒径变化不大 (图 2A), 说明 GGI/siRNA 复合物在适当 N/P 比范围内能保持适合细胞转染的粒径, 如图 2B 所示, 不同 N/P 的 PEI 25K/siRNA 纳米复合物的电位

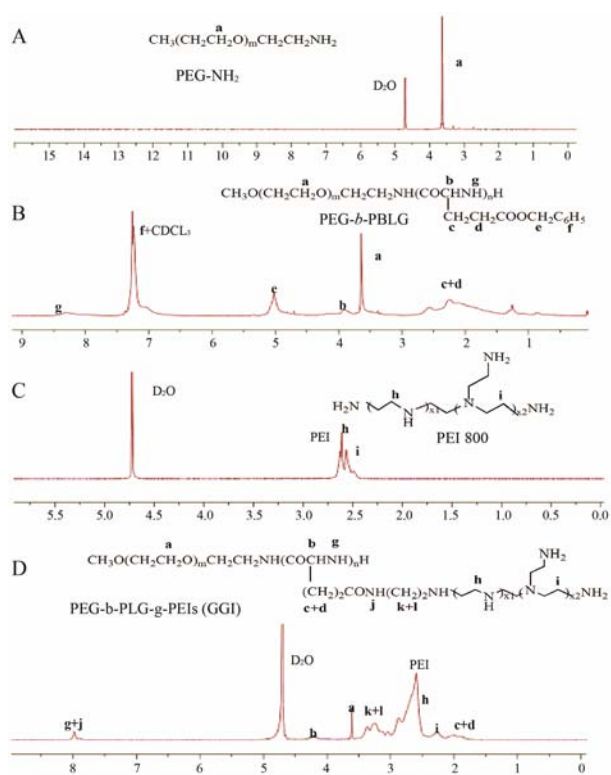


Figure 1 The ¹H NMR spectra of polymers and molecular formula. A: mPEG-NH₂ (D₂O); B: PEG-*b*-PBLG (CDCl₃); C: PEI 800 (D₂O); D: GGI (D₂O)

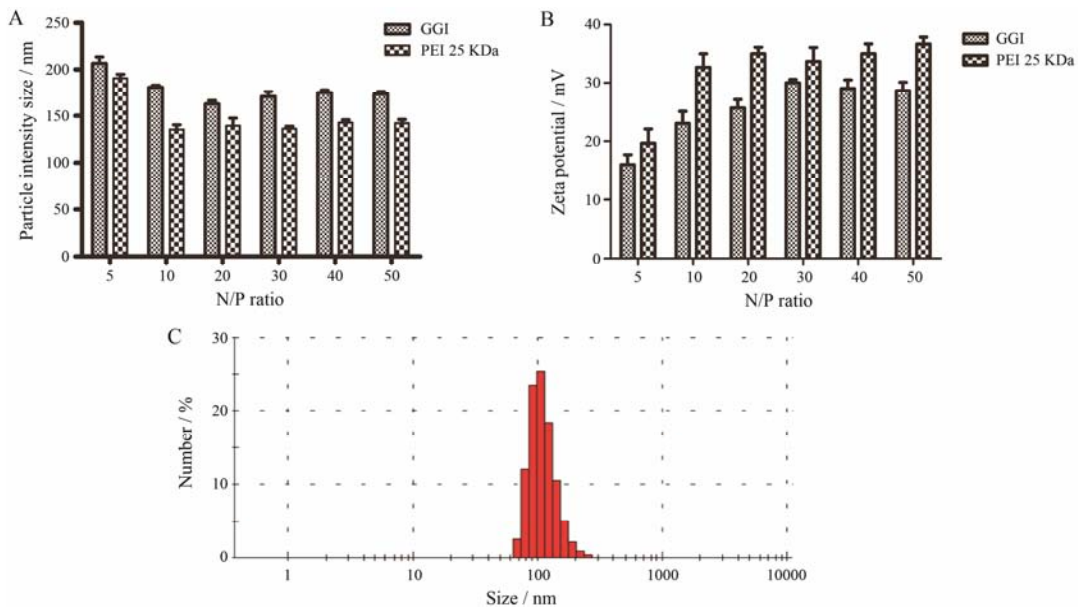


Figure 2 Particle intensity size (A) and zeta potential (B) of GGI/siRNA and PEI/siRNA nanoparticles at various N/P ratios, intensity number of N/P = 20 (C)

值维持在+19.7~36.7 mV, 具有较高的正电荷密度, 而 GGI/siRNA 复合物电位在各 N/P 比例下的电位值均低于 PEI 组, 维持在+16~28.6 mV, 有利于细胞内吞作用的同时降低对细胞的毒性。且在 N/P = 20 时, GGI/siRNA 复合物呈正态分布, 多分散系数 (PDI) 小, 分布集中 (图 2C)。阳离子聚合物的电荷密度对进入细胞的效率有重要的影响。正电荷过高, 易与带负电的细胞膜相互作用内吞进入细胞, 同时也会造成严重的细胞毒性; 而密度过低, 则会极大影响其进入细胞的效率。GGI/siRNA 复合物在 N/P=20 时的电位在 25 mV 左右, 既能保持进入细胞的效率又不会造成严重的细胞毒性。

3 细胞毒性

采用 MTT 法考察聚合物 GGI 在不含血清条件下对 A549 和 A549/DDP 细胞的毒性。由图 3 可知, 在质量浓度范围为 10~125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 聚合物 GGI 在 A549 和 A549/DDP 细胞毒性均低于 PEI 25K。聚合物 GGI 相比 PEI 25K 具有更好的生物相容性及更

广泛的应用前景。

4 GGI/MDR1 siRNA 复合物对 A549 和 A549/DDP 细胞的摄取情况

从荧光显微镜结果图和流式定量分析结果 (图 4) 可以看出, 在转染相同浓度的 FAM-siRNA 的条件下, 未经任何处理的空白对照组无荧光; 其余 3 组的平均荧光强度 (MFI) 顺序是 GGI (339.3) > PEI (283.4) > Lipofectamine 2000 (189.6), 且 GGI 不同 N/P 比的平均荧光强度顺序为 N/P=20 > N/P=30 > N/P=10, 说明 N/P 最优比例为 20 时 GGI/siRNA 复合物的转染能力强于 PEI 25K 和 Lipofectamine 2000, 更容易内吞进入细胞。

5 MDR1 mRNA 表达水平

以 GAPDH 为内参, 采用 RT-PCR 法检测 MDR1 mRNA 的表达水平。在空白对照组中, A549/DDP 细胞系中的 MDR1 mRNA 表达水平较 A549 细胞系更显著, 表明其耐药性与 MDR1 表达量的差异相关。GGI_{siNC} 组与裸 siRNA 组的 MDR1 表达水平与空白对

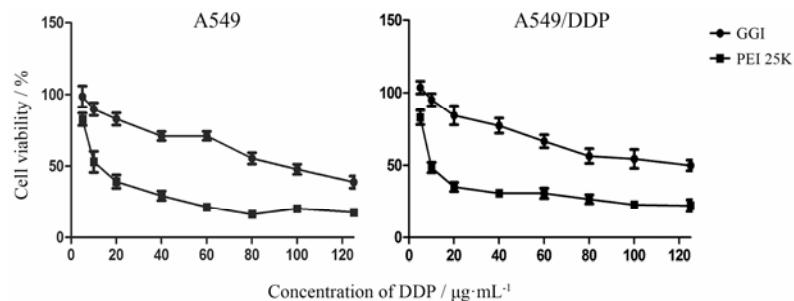


Figure 3 The cell cytotoxicity of GGI polymer to A549 and A549/DDP cells. PEI 25K as the positive control

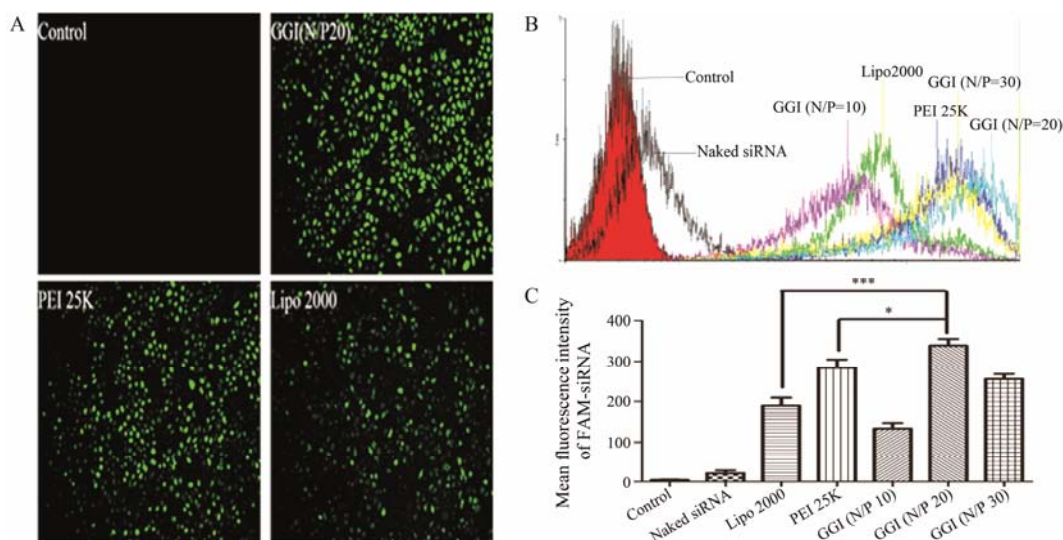


Figure 4 Cellular uptake of various FAM-siRNA nanoparticle formulations. A: Fluorescent images; B: Flow cytometric histogram profiles; C: Its quantitative results. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, *** $P<0.001$

照相当, 而相对 siMDR1 转染的实验组, Lipo_{siMDR1} 组、PEI 25K_{siMDR1} 组 MDR1 mRNA 的相对表达量都有明显的降低, 分别为 50%和 25.4%, 而如图 5 所示, GGI_{siMDR1} 组 MDR1 mRNA 的相对表达量降低最为明显 (14.1%), 表明裸 siRNA 并不能下调 MDR1 mRNA 水平, 而经过 GGI 复合的 siMDR1 则具有很强的抑制效果。

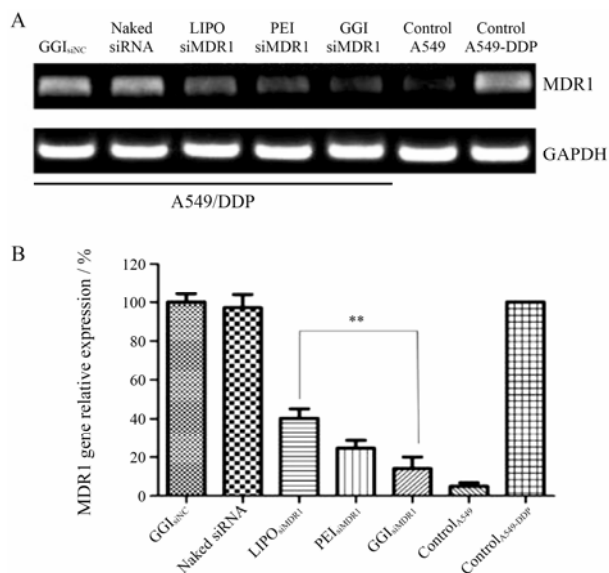


Figure 5 The relative quantity of MDR1 mRNA expression of A549 and A549/DDP cells. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P<0.01$

6 MDR 基因干扰后 P-gp 的表达水平

以 Western blot 法检测各组复合物经转染后对肺癌细胞 P-gp 蛋白表达的影响。由图 6 可知, P-gp 蛋白在 A549/DDP 细胞系的表达水平显著高于敏感株

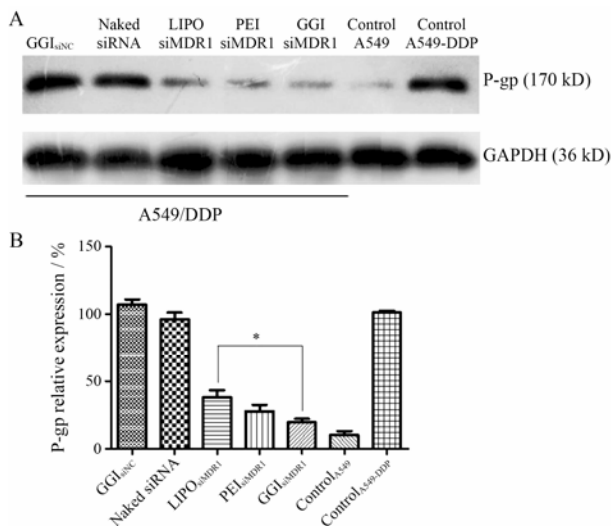


Figure 6 Expression levels of P-gp protein in A549 and A549/DDP cells treated with various formulations after 48 h. GAPDH as the control protein. A: Western bolt result ; B: Its half-quantitative result. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$

A549 细胞系, 与 mRNA 表达结果一致, 表明 P-gp 高表达与肺癌细胞的耐药有关。同时, 相对于空白对照组, PEI 25K 组、Lipo 组和 GGI 组的 P-gp 表达水平顺序如下: GGI (19.54%)<PEI (27.6%)<Lipo (38%), 说明 GGI/siMDR1 复合物可以有效下调 P-gp 的表达。

7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测载体对细胞凋亡的影响

与 PEI 25K (6.64%)、Lipofectamine 2000 (7.12%) 对照组相比, GGI 诱导 A549/DDP 凋亡效果较弱, 凋亡率为 4.83% (图 7), 说明 GGI/MDR1 siRNA 纳米粒不会产生显著的细胞凋亡。

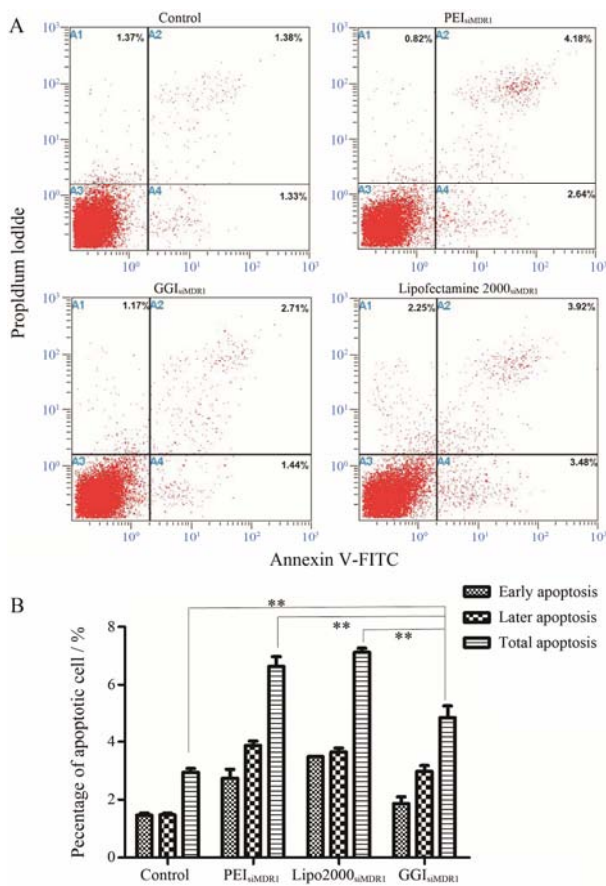


Figure 7 Flow cytometry analysis (A) of cell apoptosis with polymer/MDR1 siRNA formulations and the percentage of different phase of apoptotic cells (B). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P<0.01$

8 MDR1 siRNA 干扰后对顺铂的敏感性

8.1 MTT 法考察

根据顺铂处理及复合物转染后再用顺铂处理细胞的存活率计算各组的半数抑制率 (IC_{50}), 如图 8 所示。对于 A549 细胞而言, 单独给予顺铂 ($IC_{50}=13.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和经转染 GGI/MDR1 siRNA 组 ($IC_{50}=9.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 并没有明显差别, 而在 A549/DDP 细胞系, 经转染后给予顺铂药物组的细胞存活率大大降低, IC_{50} 为 $19.77 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 较游离顺铂给药组 ($IC_{50} =$

$42.89 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 敏感性增加, 证明在耐药株中经 GGI/MDR1 siRNA 复合物转染能有效抑制 P-gp 的表达, 从而在一定程度上增加顺铂在细胞内的积累, 提高对顺铂的敏感性。

8.2 流式细胞术考察细胞凋亡

8.2.1 敏感株 A549 细胞系的凋亡检测 经 GGI/si_{NC} (negative control siRNA) 转染组凋亡率与阴性对照组无明显差异, 说明在体外转染的最佳用量下, GGI 对细胞并不会诱导细胞凋亡。同时, GGI/si_{MDR1} 转染后加顺铂处理组与游离顺铂给药处理组的细胞凋亡亦无显著差异, 分别为 21.94% 和 25.16%, 说明转染后并不能增加 A549 细胞对顺铂的敏感性, 与 MTT 法检测结果一致。

8.2.2 耐药株 A549/DDP 细胞系的凋亡检测 游离顺铂给药组细胞总凋亡率为 23.97%, 转染 GGI/si_{NC} 后加顺铂处理组为 22.59%, 转染 GGI/si_{MDR1} 加顺铂处理组则达到 52.07%, 为单独顺铂给药组的 2.17 倍, 具有统计学差异 (图 9), 说明在耐药株 A549/DDP 细胞系中, 由于 si_{MDR1} 基因的干扰作用导致 P-gp 蛋白下调, 从而有效地增加了其对顺铂的敏感性。

结论

本研究创新构建并合成载体 GGI (PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs) 聚合物, 以聚谷氨酰胺为骨架, 并在侧链接枝低分子量的聚乙烯亚胺, 通过酯键及酰胺键聚合连接成稳定的高分子聚合物, 以期得到生物可降解的、低毒高效的基因传递载体, 使其有效地包裹 siRNA, 形成稳定的 GGI/siRNA 复合物, 且证明 GGI 聚合物的细胞毒性显著低于 PEI 25K (阳离子金标准), 实现低毒的目的。同时由 GGI/siRNA 复合物的细胞摄取及转染结果可知, GGI 可高效地运载 siRNA 进入 A549 和 A549/DDP 细胞, 其转染效果远高于 PEI 和 Lipofectamine 2000, 低分子量 PEI 的聚合可显著下

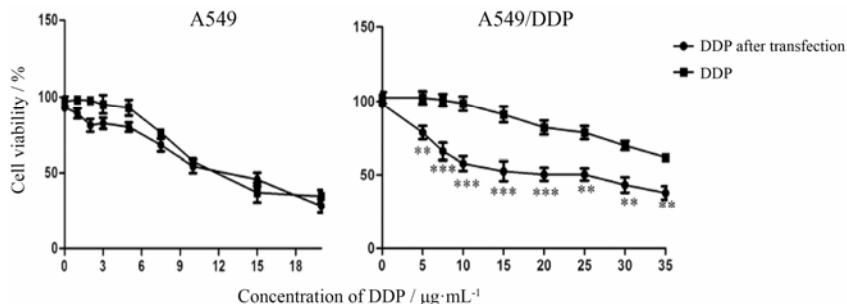


Figure 8 Cell viability of A549 and A549/DDP cells treated with DDP after transfection or without any treatment. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs DDP

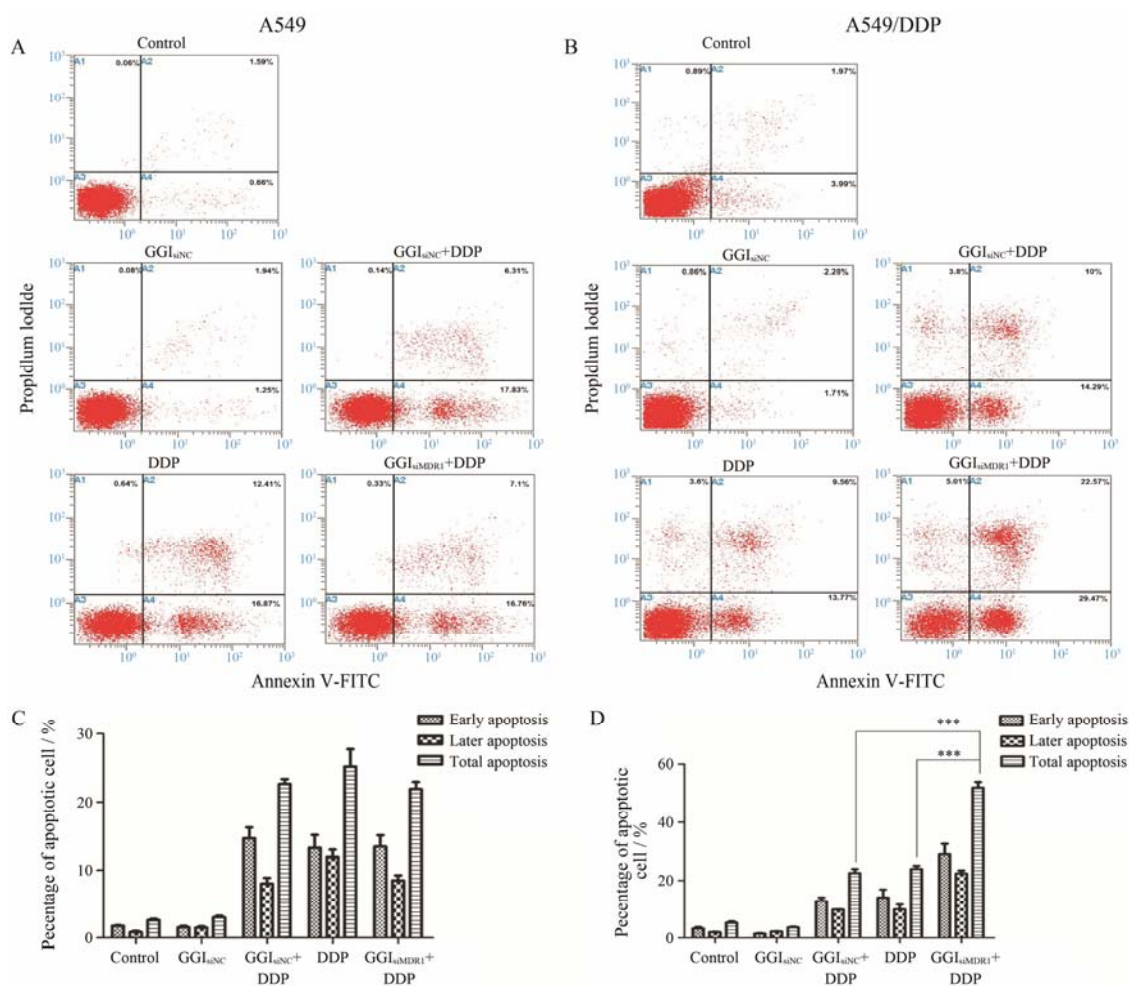


Figure 9 Flow cytometry analysis of cell apoptosis (A, B) and percentage of different phase of apoptotic cells with different formulations of polymer/MDR1 siRNA polyplexes by Annexin V-FITC/PI methods. A, C: A549 cells; B, D: A549/DDP cells. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P<0.001$

调 A549/DDP 中 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达量, 并可增强其对顺铂的敏感性, 使得 GGI 有望成为一种前景良好的阳离子载体。

References

[1] Yuan Y, Cai T, Xia X, et al. Nanoparticle delivery of anticancer drugs overcomes multidrug resistance in breast cancer [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23: 3350–3357.

[2] Shen Y, Wang Q, Tian Y. Reversal effect of ouabain on multidrug resistance in esophageal carcinoma EC109/CDDP cells by inhibiting the translocation of Wnt/ β -catenin into the nucleus [J]. *Tumour Biol*, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-5437-8.

[3] Hasanabady MH, Kalalinia F. ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer [J]. *J Biosci*, 2016, 41: 313–324.

[4] Ahmad J, Akhter S, Khan MA, et al. Engineered nanoparticles against MDR in cancer: the state of the art and its prospective

[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22: 4360–4373.

[5] Yang X, Liu K. P-gp inhibition-based strategies for modulating pharmacokinetics of anticancer drugs: an update [J]. *Curr Drug Metabol*, 2016, 17: 806–826.

[6] Senarathna SM, Page-Sharp M, Crowe A. The interactions of P-glycoprotein with antimalarial drugs, including substrate affinity, inhibition and regulation [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0152677.

[7] Li W, Zhang H, Assaraf YG, et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies [J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 27: 14–29.

[8] Chung FS, Santiago JS, Jesus MF, et al. Disrupting P-glycoprotein function in clinical settings: what can we learn from the fundamental aspects of this transporter? [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6: 1583–1598.

[9] Cantore M, Leopoldo M, Berardi F, et al. Design and synthesis of new selective P-gp substrates and inhibitors [J]. *Curr*

- Pharm Des, 2016. DOI: 10.2174/1381612822666160810114008.
- [10] Tan YL, Yin JQ. Application of RNAi to cancer therapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 193-198.
- [11] Dernburg AF, Karpen GH. A chromosome RNAissance [J]. Cell, 2002, 111: 159-162.
- [12] Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications [J]. Postdoc J, 2016, 4: 35-50.
- [13] Borkhardt A. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment [J]. Cancer Cell, 2002, 2: 167-168.
- [14] Yang FF, Huang W, Li YF, et al. Current status of non-viral vectors for siRNA delivery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 1436-1443.
- [15] Gao Y, Liu XL, Li XR. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers [J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6: 1017-1025.
- [16] Demeneix B, Behr JP. Polyethylenimine (PEI) [J]. Adv Genet, 2005, 53: 215-230.
- [17] Yu H, Tang Z, Li M, et al. Cisplatin loaded poly(L-glutamic acid)-g-methoxy poly(ethylene glycol) complex nanoparticles for potential cancer therapy: preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. J Biomed Nanotechnol, 2016, 12: 69-78.
- [18] Peng KT, Hsieh MY, Lin CT, et al. Treatment of critically sized femoral defects with recombinant BMP-2 delivered by a modified mPEG-PLGA biodegradable thermosensitive hydrogel [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17: 286.
- [19] Nag M, Gajbhiye V, Kesharwani P, et al. Transferrin functionalized chitosan-PEG nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel to cancer cells [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 148: 363-370.
- [20] Dong K, Yan Y, Wang P, et al. Biodegradable mixed MPEG-SS-2SA/TPGS micelles for triggered intracellular release of paclitaxel and reversing multidrug resistance [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 5109-5123.

正大天晴药业集团股份有限公司为国内肝健康药物研发和生产基地之一,是国家重点高新技术企业、国家火炬计划连云港新医药产业基地重点骨干企业、“国内最佳研发生产线”十佳工业企业(第2名)、江苏省创新型企业。企业效益连续多年增长30%以上并连续多年位居全国医药行业百强之列,且逐年上升,工信部发布的2012年度中国制药工业百强榜中,正大天晴排名第28位。

公司现有员工2750人,拥有5个全资子公司、6个控股子公司,在连云港、南京、盐城和淮安分别建有研发和生产基地。正大天晴药业产品治疗涉及肝病、肿瘤、糖尿病、呼吸、心脑血管、感染等多个疾病领域,在肝病药物研发领域具备突出优势,2013年肝病药物产品在国内医院市场占有率已达到19%(IMS)。

正大天晴一贯重视研发创新工作,始终把技术创新视为企业生命的源泉,经过40多年的发展和探索,逐步形成了完善的创新体系。目前拥有研发人员500余名,高级工程师23名,博士17名,硕士200余名,博士、硕士及具有高级技术职称的人员占40%以上,逐渐形成了以国家“千人计划”等高端人才组成的海归团队、博士项目创新团队、高工经验技术团队和专家学术支持团队几大人才梯队,承担着正大天晴药业的新药研发、工艺改造等一系列重要的科研任务。公司先后成功地研制了具有自主知识产权的肝病治疗药物,并成功完成了数十个科研成果的产业化。

“十五”以来,公司先后承担了国家、省重点科技项目30多个,通过这些重点项目的实施及产业化,加大了企业与科研院所之间学术交流、产品研究、技术支持、成果转让等方面的合作力度,使得企业创新能力及科技管理水平得到了明显提高,为公司的快速发展提供了有力的支持。