载反义寡核苷酸 G3139 脂质纳米粒的制备及药效学初步评价

孙慧萍，徐 凯，张国喜，陈文忠，程 光*
（南京绿叶制药有限公司，江苏南京 211800）

摘要：反义寡核苷酸 G3139（**1**）可下调 B 淋巴细胞瘤 -2（Bcl-2）蛋白和 mRNA 的表达，从而促进肿瘤细胞凋亡。本研究拟通过基于微流体的两步混合法将 **1** 包载于阳离子脂质纳米粒中，从而促进人大细胞肺癌细胞株（NCI-H460）对 **1** 的摄取，并且通过加入聚乙二醇化脂质来增加阳离子脂质纳米粒的体内稳定性。结果表明，所得长循环阳离子脂质纳米粒（GLNPs）粒径为（89.6±3.2）nm，ζ 电位为（20.9±2.4）mV；琼脂糖凝胶电泳试验和包封率测定结果［（93.6±2.5）%］均显示该脂质纳米粒成功包载了 **1**。GLNPs 在 NCI-H460 细胞中的细胞毒性和细胞摄取均显著优于游离 **1**。在荷 NCI-H460 肿瘤裸鼠模型中，GLNPs 对肿瘤生长的抑制效果也显著优于游离 **1**；并且将 GLNPs 与紫杉醇注射液联合用药后，抑瘤率为（73.1±10.3）%，显著高于其余单独或联合给药组。体内药效试验中，各组裸鼠的体质量无显著差异，表示本品毒性较低。因此，通过这种两步混合方法制备的 GLNPs 有望成为一种有应用前景的核酸输送系统。

关键词：反义寡核苷酸 G3139；阳离子脂质纳米粒；长循环；抗肿瘤活性；细胞摄取；药效学
中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2022）06-0849-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.06.012

Preparation and Preliminary Efficacy Evaluation of Lipid Nanoparticles Loaded with Antisense Oligonucleotide G3139

SUN Huiping, XU Kai, ZHANG Guoxi, CHEN Wenzhong, CHENG Guang*
（*Nanjing Luye Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 211800*）

ABSTRACT: G3139（**1**）, an antisense oligonucleotide, can downregulate the expression of B-cell lymphoma-2（Bcl-2）protein and mRNA expression so as to promote the apoptosis of tumor cells. In this study, **1** was encapsulated in the cationic lipid nanoparticles by a two-step hybrid method within microfluidic devices to enhance the uptake of **1** in human large cell lung cancer cell line（NCI-H460）, and the *in vivo* stability of the cationic lipid nanoparticles was enhanced by incorporating of the PEGylation lipid. The long-circulating cationic lipid nanoparticles loaded with **1**（GLNPs）exhibited the averaged size of（89.6±3.2）nm and ζ potential of（20.9±2.4）mV. The results of agarose gel electrophoresis and the calculated encapsulation efficiency［（93.6±2.5）%］showed that **1** was successfully encapsulated by the lipid nanoparticles. The cytotoxicity and cellular uptake of GLNPs were significantly higher than those of the free **1**. In the NCI-H460 tumor-bearing nude mouse models, GLNPs inhibited a more significant inhibitory effect on tumor growth, compared with the free **1**. Moreover, the tumor inhibitory rate of the combinational group of GLNPs and paclitaxel injection was（73.1±10.3）%, which was significantly higher than that of other single or combined administration groups. In pharmacodynamics test, there was no significant difference in the body weight of tumor-bearing nude mouse in each group, suggesting the low toxicity of this product. In conclusion, GLNPs prepared by this two-step hybrid method could be a promising nucleic acid delivery system in clinical application.

Key Words: antisense oligonucleotide G3139; cationic lipid nanoparticle; long-circulating; antitumor activity; cellular uptake; pharmacodynamics

恶性肿瘤是危害人类生命健康的重大疾病之一[1]，目前临床上主要以手术及放化疗治疗为主[2]，但仍未取得重大突破，因此需要开发新型治疗策略。随着人类基因组学研究的发展，人们认识到产生肿瘤的根本原因是由于肿瘤基因或肿瘤抑制基因发生了突变[3]。因此，近年来肿瘤基因治疗成为人们研究的热点[4]，其中反义寡核苷酸因具备高特异性、结构简单、易于合成且低毒性等优点成为基因治疗的主要手段之一[5]，它可通过与 mRNA 的特异性互补结合来抑制靶 mRNA 的翻译等，从而治疗疾病[6]。

反义寡核苷酸 G3139（antisense oligonucleotide G3139，**1**）是含 18 个全硫代磷酸的核苷酸，可与 B 淋巴细胞瘤 -2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）mRNA 的前 6 个密码子互补结合，从而抑制 Bcl-2 家族蛋白的表达。Bcl-2 基因通常在肿瘤细胞中过表达，可导致肿瘤细胞耐药、抑制肿瘤细胞凋亡[7]。因此，**1** 通过下调 Bcl-2 基因的表达可促进肿瘤细胞凋亡，从而抑制肿瘤发展进程。但目前反义寡核苷酸存在进入体内后易被血液及细胞内核苷酶降解、不易被细胞摄取等缺点，限制了其在肿瘤治疗中的应用[8—9]。阳离子脂质纳米粒由于具备正电性、可与带负电的核酸形成复合物、提高核酸进入体内的稳定性并可促进细胞摄取等优点，逐渐受到人们的关注[10—12]。但由于阳离子脂质纳米粒表面带有正电荷，进入体内后易与血浆蛋白结合形成聚集体而被网状内皮系统（RES）清除[13]，因此需要开发一种既能高效负载核酸又能增加阳离子脂质纳米粒体内稳定性的核酸递送载体。

据此，本课题组采用了一种基于微流体的两步混合技术将 **1** 通过两步混合法载入阳离子脂质纳米粒中，利用阳离子脂质（2,3- 二油酰基丙基）- 三甲基氯化铵（DOTAP）的正电性促进其在肿瘤细胞中摄取；同时在此载体中还掺入了长循环脂质二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 - 聚乙二醇 2000（DSPE-PEG2000），以避免阳离子脂质纳米粒被 RES 清除，增加其在血液中的稳定性[13]，从而提高 **1** 的肿瘤治疗效果。此外，利用 **1** 可促进肿瘤细胞凋亡从而增加化疗药物抗肿瘤效果的特点[14]，将其与化疗药物紫杉醇（paclitaxel，**2**）联合给药，实现基因治疗与化疗药联合治疗肿瘤的目的。本研究考察了阳离子脂质包载的 **1** 长循环脂质纳米粒（GLNPs）的粒径、ζ 电位、稳定性、细胞毒性、细胞摄取及在荷人大细胞肺癌（NCI-H460）裸鼠模型中的抑瘤效果，期望 **1** 可更有效地抑制肿瘤生长，同时能达到与化疗药 **2** 协同抑制肿瘤生长效果的目的。

1　仪器与试药

NanoDrop 型分光光度计（美国 Thermo Fisher 公司）；Byz-810TU 型注射泵（湖南比扬医疗科技有限公司）；Ultra™ Small Bore Bifurcated Extension Set 型小口径分叉扩展件（美国 Smiths Medical 有限公司）；无菌注射器（江苏客乐医用器械有限公司）；KR2i 型切向流过滤（tangential flow filtration，TFF）装置 （美国 Spectrum 有限公司）；Zetasizer Nano-ZS 型粒度仪（英国 Malvern 公司）；Sigma 3K15 型冷冻离心机［曦玛离心机（扬州）有限公司］；EPS-300 型电泳仪和 Tanon-1600 数码凝胶图像分析系统（上海天能科技有限公司）；Enspire 型多功能酶标仪（美国 PerkinElmer 公司）；FACSCalibur 流式细胞仪（美国 BD Biosciences 公司）。

1（序列为 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'，全序列均进行了硫代磷酸酯修饰）和 5- 羧基荧光素（5-carboxy-fluorescein，5-FAM）修饰的 **1** 均由广州锐博生物科技有限公司提供；**2** 注射液（美国百时美施贵宝公司，商品名为泰素，批号为 7G04451，规格 5 ml ∶ 30 mg）；DOTAP 和 DSPE-PEG2000（德国 Lipoid 公司）；卵磷脂（EPC）和胆固醇（南京绿叶制药有限公司）；*N*-2- 羟乙基哌嗪 -*N*'-2- 乙磺酸（HEPES，美国 Invitrogen 公司）；CCK-8 细胞检测试剂盒（上海吉满生物科技有限公司）；RPMI 1640 培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）和胰蛋白酶 -EDTA 消化液（美国 Gibco 公司）；核酸染料 GelGreen（美国 Biotium 公司）；DNA Marker（上海天能科技有限公司）。

NCI-H460 细胞株 （中国科学院上海生命科学研究院

收稿日期：2021-04-29

作者简介：孙慧萍（1991—），女，博士，从事纳米药物输送研究。

通信作者：程　光（1960—），男，正高级工程师，从事纳米药物输送研究。

E-mail：cheng@luye.com

细胞资源中心）。

BALB/c-nude 裸鼠（雌性，18 ～ 22 g），购自上海斯莱克实验动物有限公司，动物合格证编号为 20170005038637，于 25 ℃、12 h 光 - 暗交替环境下饲养，可自由饮水及取食。

2 方法与结果

2.1 GLNPs 的制备

照物质的量比为 50 ∶ 29.5 ∶ 20 ∶ 0.5 称取阳离子磷脂 DOTAP、EPC、胆固醇及 DSPE-PEG2000，分别用乙醇溶解后合并得到脂相；取 pH 7.0 的 HEPES 缓冲液作为水相。使用由注射泵通过小口径分叉扩展件连接 2 根 10 ml 注射器而组成的微流体混合装置制备脂质纳米粒，其中混合速度为水相 300 ml/h、脂相 200 ml/h，将水、脂两相照体积比为 3 ∶ 2 进行双相混合，得到空白脂质纳米粒。然后，称取占脂质总质量 1/10 的 **1**，用 pH 7.0 的 HEPES 缓冲液溶解，使用上述微流体混合装置将其与空白脂质纳米粒照体积比 1 ∶ 1 进行混合，混合速度为水相 300 ml/h、脂相 300 ml/h，得到具有乳光的溶液。最后在超滤装置中利用中空纤维素过滤柱（截留分子量 300 000）超滤去除游离核酸及乙醇，最终得 GLNPs。

2.2 理化性质评价

2.2.1 粒径及 ζ 电位测定

将 GLNPs 用超纯水稀释至 0.1 mg/ml，混匀后通过动态光散射（DLS）技术使用粒径仪测定（工作参数为：溶剂 水；溶剂折射率 1.330；溶剂黏度 0.887 2×10^{-3} Pa·s；温度 25 ℃）粒径和 ζ 电位，结果见图 1。可见 GLNPs 的粒径呈现正态分布，平均粒径为（89.6±3.2）nm，多分散性指数（PDI）为 0.181±0.023，ζ 电位为（20.9±2.4）mV。

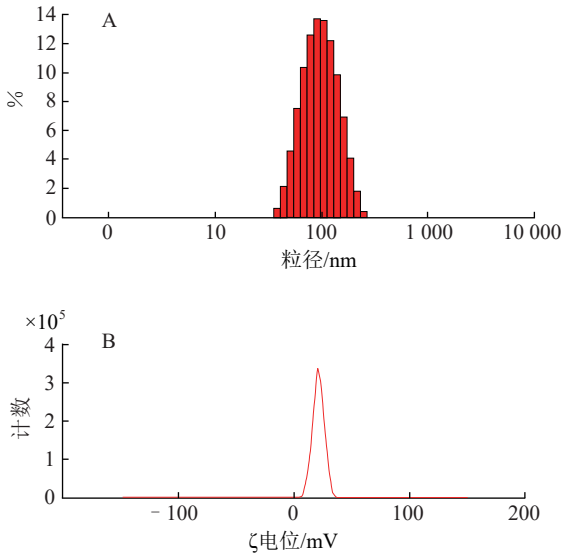


图 1 GLNPs 粒度（A）及 ζ 电位（B）分布图

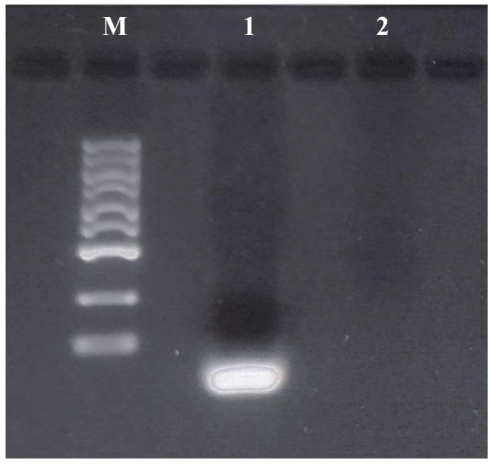
Fig.1 Particle Size（A）and ζ Potential（B）Distributions of GLNPs

2.2.2 琼脂糖凝胶电泳试验

首先采用琼脂糖凝胶电泳方法初步判断 **1** 是否被包裹进脂质纳米粒中。配制浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶，加入显色剂 GelGreen 后倒入胶板中，待其凝固后上样。分别加入 DNA Marker 2.5 μl、游离 **1** 20 μl、GLNPs 20 μl，其中 **1** 质量浓度均为 0.5 mg/ml，然后于 125 V 条件下电泳约 30 min，停止电泳后在凝胶成像仪下观察并拍照，分别测定 DNA Marker、游离 **1** 及 GLNPs 的电泳情况。结果见图 2，可见游离 **1** 在电泳图底端处呈现出一条白色条带，而 GLNPs 在电泳图中无亮色条带显示。这是由于游离 **1** 带负电，在电场中随着电流从负极流向正极，且由于相对分子质量较小，所以最终条带位于离加样孔最远的底端，而 GLNPs 由于将 **1** 包裹在内，所以无显色。因此，琼脂糖凝胶电泳试验结果可初步表明 **1** 被成功包裹入脂质纳米粒中。

2.2.3 包封率测定

采用葡聚糖凝胶柱色谱法进一步定量测定 GLNPs 的包封率。使用葡聚糖凝胶 Sephadex G50 填充色谱柱（1 cm×30 cm），采用湿法装柱，装柱过程中不能有气泡或条纹；填充完后用 0.9% 氯化钠溶液平衡约 2 h。精密移取 GLNPs 溶液 0.2 ml 上样，当上样液完全进入凝胶柱后开始用 0.9% 氯化钠溶液洗柱并收集洗脱液，每管接收 1 ml，共接收 15 管。其中，第 1 ～ 5 管为脂质纳米粒，剩余 10 管为洗脱下来的游离药物。前 5 管均分别用 1% 十二烷基硫酸钠（SDS）稀释 10 倍，破乳后于 260 nm 处测定吸光度，以 **1** 作为对照、采用外标法计算药物浓度；剩余 10 管分别直接于 260 nm 处测定吸光度，同法计算。所得洗脱曲线如图 3 所示。



M－DNA Marker；1－游离 **1**；2－GLNPs

图 2　琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2　The Results of Agarose Gel Electrophoresis

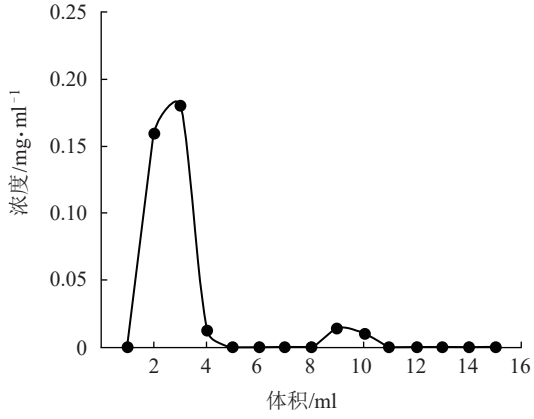


图 3　GLNPs 的洗脱曲线

Fig.3　Elution Curve of GLNPs

包封率测定：取 GLNPs 溶液 0.2 ml 上样，当上样液完全进入凝胶柱后开始用 0.9%氯化钠溶液洗柱并收集洗脱液，收集被包封药物部分 5 ml，采用 1% SDS 溶液稀释 10 倍，破乳后于 260 nm 处测定吸光度，得到被包封药物量；随后收集游离 **1** 部分 10 ml，直接于 260 nm 处测定吸光度，计算游离药物量。另外取 GLNPs 溶液 0.2 ml，用 1% SDS 溶液稀释 50 倍破乳，然后于 260 nm 处测定吸光度，计算得到药物总量。由此，计算得到 GLNPs 的包封率为 (93.6±2.5) %（n=3），进一步说明 **1** 被成功包裹进入脂质纳米粒中。

2.2.4　稳定性评价

为考察 GLNPs 在血清中的稳定性，首先照“**2.1**”项下方法制备不含 DSPE-PEG2000 的载 **1** 脂质纳米粒（NGLNPs），将 GLNPs 溶液及 NGLNPs 分别加入 10% FBS 的培养基中，于 37 ℃下保存，分别于 0、1、3、5 和 7 d 时考察粒径随着时间的变化情况，结果见图 4A。可见，GLNPs 在 7 d 内粒径变化不大，且无沉淀出现；而 NGLNPs 组放置 7 d 时的粒径与起始粒径相比变化较大，说明长循环脂质的加入有助于提高 GLNPs 在血清中的稳定性。

此外，为了确定孵育 7 d 后 **1** 是否会从纳米粒中游离出来，取保存 7 d 时的 GLNPs 和 NGLNPs 样品以及 **1** 进行琼脂糖凝胶电泳试验（方法同“**2.2.2**”项），结果见图 4B。可见，游离 **1** 条带最亮，位于离加样孔最远的底端，NGLNPs 组在泳道中可以观察出较亮的条带，说明有部分 **1** 游离出来，而 GLNPs 组条带亮度显著弱于 NGLNPs 组，表明游离药物量少于 NGLNPs，进一步表明长循环脂质的加入提高了 GLNPs 在血清中的稳定性。

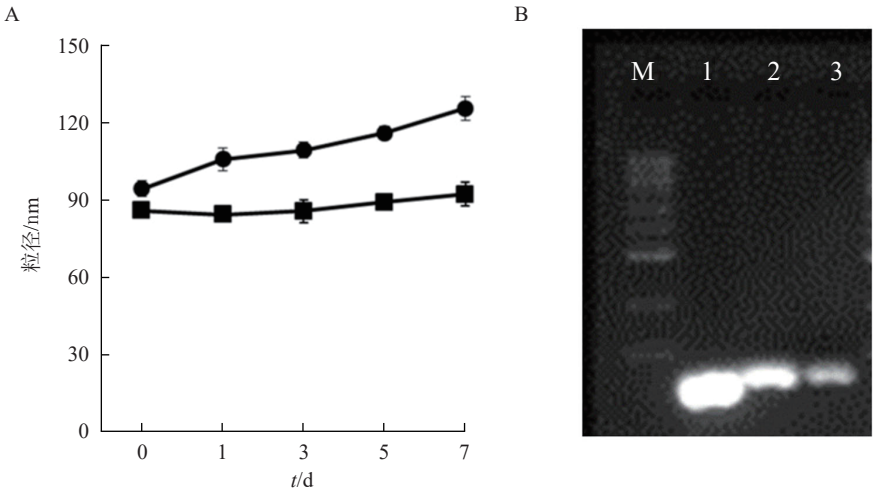
2.3　体外细胞毒性评价

将 NCI-H460 细胞以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔培养板中，十字摇匀后放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，然后更换培养基为新鲜的完全培养基，分别加入配制的游离 **1** 和 GLNPs，使试验组中 **1** 的终浓度均分别为 3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 和 102.4 μmol/L；另一方面，为了检测空白载体的细胞毒性，向接种好 NCI-H460 细胞的 96 孔培养板中加入不含 **1** 的空白脂质纳米粒（BLNPs）并使其终浓度分别为 0.5、1、2、5 和 10 mg/ml；另以加入同体积无菌水作为对照组，不含细胞组作为空白组。加毕各组分别继续孵育 48 和 72 h，随后向每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl，将培养板置培养箱内继续孵育 2.5 h，再用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度值（OD），照下式计算细胞存活率。细胞毒性试验结果见图 5，显著性差异分析采用 Student's t 检验，P<0.05 时具有显著性差异（下同）。

细胞存活率=[($OD_{试验组}$ - $OD_{空白}$)/($OD_{对照组}$ - $OD_{空白}$)]×100%

对空白载体的评价结果表明，当BLNPs的质量浓度在低于1 mg/ml时，细胞存活率大于90%，细胞毒性较小；随着浓度增加至2 mg/ml，细胞毒性明显增加。这可能是由于阳离子脂质较强的正电荷及其自身结构等特性，导致其进入细胞后也会引起细胞凋亡或坏死，从而产生细胞毒性[15]。

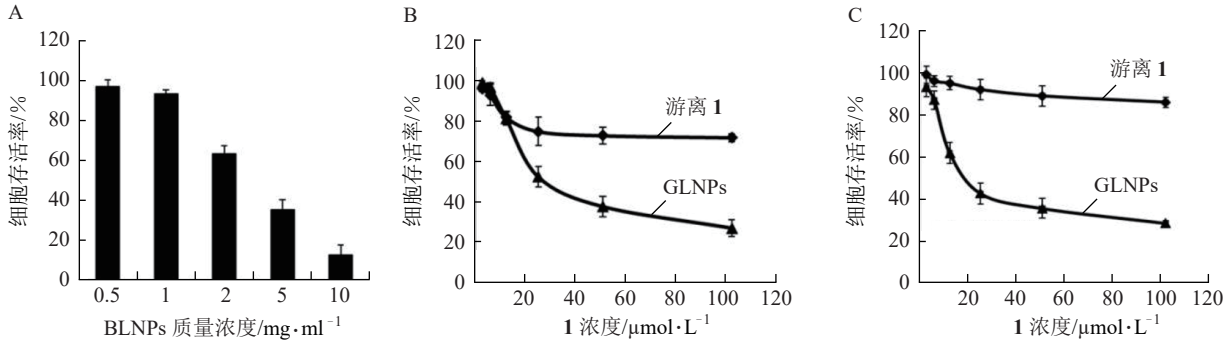
在试验范围内，游离**1**组与GLNPs组的细胞存活率均存在明显的浓度依赖性。此外，在**1**的浓度为3.2～12.8 μmol/L时，游离**1**组与GLNPs组的细胞存活率无显著性区别；但在25.6～102.4 μmol/L时，同等药物浓度下GLNPs组的细胞存活率显著低于游离**1**组（*P*约为0.01），这表明GLNPs组抑制肿瘤细胞生长的效果显著优于游离**1**组，**1**被载入脂质纳米粒中明显增强了**1**抑制肿瘤细胞生长的活性。而孵育72 h的细胞毒性结果与孵育48 h时基本一致，进一步表明GLNPs与游离**1**相比，具



A：GLNPs（■）和NGLNPs（●）在血清中粒径的稳定性（*n*=3），
B：琼脂糖凝胶电泳检测脂质纳米粒的稳定性（M－DNA Marker；1－游离**1**；2－NGLNPs；3－GLNPs）

图4 GLNPs在血清中的稳定性

Fig.4 Stability of GLNPs in Serum



A：BLNPs（空白载体）的细胞毒性，B：孵育48 h的细胞毒性，C：孵育72 h的细胞毒性

图5 空白载体、游离1和GLNPs对NCI-H460细胞的体外细胞毒性作用（*n*=3）

Fig.5 *In vitro* Cytotoxicities of Blank Carrier, Free **1** and GLNPs against NCI-H460 Cells（*n*=3）

有显著抑制肿瘤细胞生长的优势。

2.4 体外细胞摄取试验

照每孔 2×10^4 个细胞的密度将 NCI-H460 细胞接种于 24 孔板中，培养 24 h 后更换新鲜培养液，然后分别加入 5-FAM 修饰的游离 **1** 和 GLNPs，使其终浓度均为 200 nmol/L，放入培养箱中继续孵育至对应时间（2、4、6 及 8 h）后，用胰酶进行消化，随后离心（360×*g*）5 min 收集细胞。所得细胞用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）洗涤 2 次，每次均离心（360×*g*）5 min，最后将收集的细胞用 PBS 500 μl 重悬，进行流式细胞分析。结果见图 6。

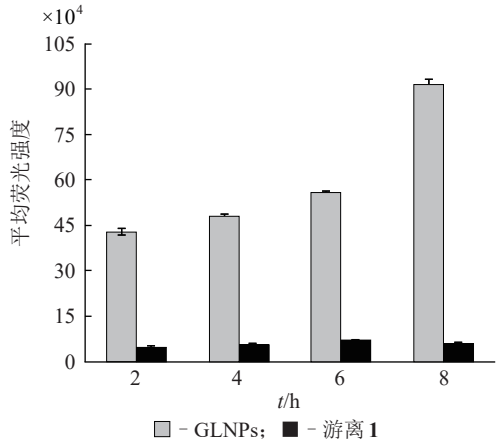


图 6　孵育时间对 NCI-H460 细胞摄取游离 1 或 GLNPs 的影响（*n*=3）

Fig.6　Effect of Incubation Time on Intracellular Uptake of Free **1** or GLNPs by NCI-H460 Cells（*n*=3）

流式细胞术结果显示，在孵育 2 ～ 8 h 期间，GLNPs 组的细胞内核酸荧光强度随着孵育时间的延长而呈现增长的趋势，说明 GLNPs 在此肿瘤细胞中的摄取呈现时效关系。而游离 **1** 组的细胞内荧光强度随着孵育时间的延长并无显著增加。最终孵育 8 h 时，GLNPs 组的荧光强度约为游离 **1** 组的 16 倍，且在各个孵育时间点，GLNPs 组的摄取量均显著高于游离 **1** 组，这主要是由于阳离子脂质纳米粒的包载使其具备正电性，从而促进肿瘤细胞的摄取[16]。

2.5 体内药效学评价

取 BALB/c 裸鼠于右侧皮下接种 NCI-H460 细胞悬液，每只 5×10^6 个细胞。待肿瘤生长至体积为 100 mm^3 时，将荷瘤裸鼠随机分成 6 组，每组 8 只，分别尾静脉给予生理盐水、**2** 注射液、游离 **1**、GLNPs、游离 **1** 与 **2** 注射液组合、GLNPs 与 **2** 注射液组合。各组中，**1**、**2** 的给药剂量为 5 和 10 mg/kg，均每周给药 2 次，连续 3 周，共给药 6 次。开始给药后，每周分别称量体质量及测定瘤体积各 2 次。试验结束后，窒息处死裸鼠，解剖取出肿瘤，用生理盐水洗净，滤纸擦干，称量肿瘤质量并记录。结果见图 7 ～ 9。

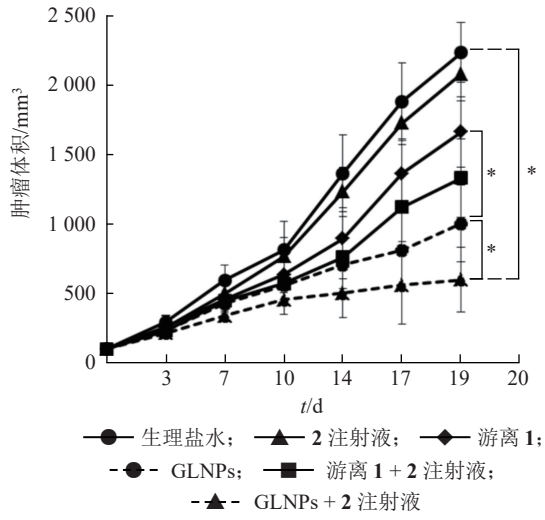


图 7　不同制剂给药后 NCI-H460 荷瘤裸鼠的肿瘤生长情况（* 表示 $P<0.05$；*n*=8）

Fig.7　Tumor Growth Profiles of NCI-H460 Tumor-bearing Nude Mice after Administration of Different Preparations (* Represents $P<0.05$; *n*=8)

图 7 显示，生理盐水组小鼠的肿瘤体积增长迅速，市售 **2** 注射液组的肿瘤生长趋势与生理盐水组相比无明显区别，最终抑瘤率为（7.0±8.6）%，表明在此肿瘤模型中，**2** 注射液抑制肿瘤生长的效果较弱；游离 **1** 组的肿瘤体积生长趋势与生理盐水组相比明显变缓，其抑瘤率达到（25.6±11.4）%，而 GLNPs 组的抑瘤效果显著高于游离 **1** 组，抑瘤率达到（55.0±12.4）%，这表明将 **1** 包裹进脂质纳米粒可显著提高 **1** 的抑瘤效果，一方面可能由于脂质纳米粒的包裹增加了 **1** 在体内的稳定性，避免被核酸酶等降解[6]，并且由于长循环脂质的加入，使纳米粒的体内稳定性增加[13]，从而使 **1** 在肿瘤部位蓄

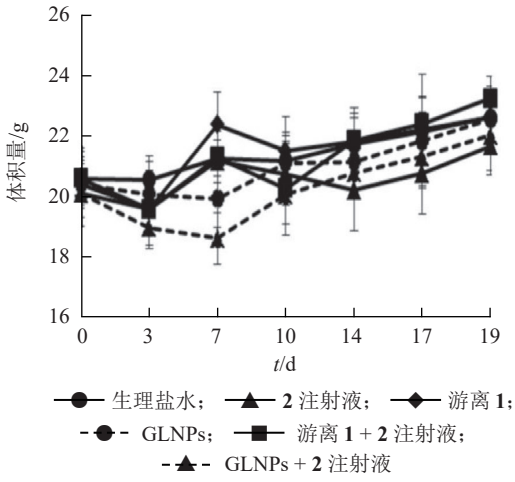


图 8 不同制剂给药后 NCI-H460 荷瘤裸鼠的体质量变化（*n*=8）

Fig.8 Body Weight Changes of NCI-H460 Tumor-bearing Nude Mice after Administration of Different Preparations (*n*=8)

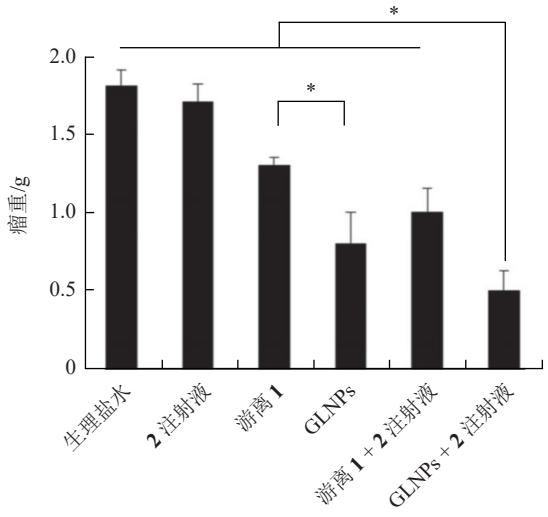


图 9 不同制剂给药后 NCI-H460 荷瘤裸鼠中肿瘤的最终质量（* 表示 *P*<0.05；*n*=8）

Fig.9 Final Tumor Weights in NCI-H460 Tumor-bearing Nude Mice after Administration of Different Preparations (* Represents *P*<0.05; *n*=8)

积增加；另一方面阳离子脂质的正电性促进了肿瘤细胞对 **1** 的摄取，最终使得 GLNPs 的抑瘤效果显著优于游离 **1**，该结果也与体外细胞毒性结果一致。此外，游离 **1**+**2** 注射液联合组抑瘤率（40.4±12.7）% 也显著低于 GLNPs+**2** 注射液联合组（73.1±10.3）%（*P*<0.05）。由图 7 可见，与单用 GLNPs 或 **2** 注射液以及游离 **1**+**2** 注射液联用相比，GLNPs+**2** 注射液联合组抑制肿瘤生长的效果显著提高。这主要是因为 **1** 主要通过下调 Bcl-2 基因的表达、减弱 Bcl-2 对肿瘤细胞凋亡的抑制作用而促进肿瘤细胞凋亡并增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 [14,16]。因此，将 GLNPs 与 **2** 注射液联用，可达到协同抑制肿瘤生长的效果。

各给药组的裸鼠体质量变化如图 8 所示，GLNPs 与 **2** 注射液联合给药组裸鼠的体质量略微下降但仍处于正常水平，随后又逐渐上升，其余各组裸鼠体质量均没有显著变化，说明各制剂组的体内毒性较小。

图 9 显示，与游离 **1** 组相比，GLNPs 组的肿瘤质量较低，说明脂质纳米粒的包裹可以增加 **1** 的抑瘤效果；此外 GLNPs 与 **2** 注射液联合给药组的肿瘤质量显著低于其余各组（*P*<0.05），进一步表明二者联合给药可发挥协同抑制肿瘤生长的作用，从而达到最佳的抑瘤效果，该结果也与肿瘤体积测定结果一致。

3 结论

本研究通过两步两相快速混合的制备方法，制备了粒径均一且稳定的 GLNPs，琼脂糖凝胶电泳试验初步定性表明了 **1** 被成功载入脂质纳米粒中，随后采用葡聚糖凝胶柱色谱法定量测定了 GLNPs 的包封率，较高的包封率（>90%）结果也进一步表明成功制备了 GLNPs。血清稳定性试验结果显示了长循环脂质的加入有助于提高载核酸脂质纳米粒在血清中的稳定性。体外细胞毒性试验中，GLNPs 对 NCI-H460 细胞的毒性作用显著强于游离 **1** 组；体外摄取试验中也显示 GLNPs 被 NCI-H460 细胞摄取的量显著高于游离 **1** 组。在荷 NCI-H460 肿瘤裸鼠模型的药效研究中，GLNPs 组的肿瘤体积和肿瘤质量均显著低于游离 **1** 组；并且当其与 **2** 联用后，裸鼠的肿瘤体积和肿瘤质量也显著低于游离 **1** 与 **2** 联用组，进一步表明脂质纳米粒增强了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，可协同发挥抑制肿瘤生长的作用。

综上所述，本试验制备的GLNPs有潜力成为一种有应用前景的核酸输送系统，为反义寡核苷酸在肿瘤治疗中的应用提供新的可能性。

参考文献：

[1] WU C C, LI M N, MENG H B, *et al*. Analysis of status and countermeasures of cancer incidence and mortality in China [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, **62**(5): 640-647.

[2] GEBAUER J, HIGHAM C, LANGER T, *et al*. Long-term endocrine and metabolic consequences of cancer treatment: a systematic review [J]. *Endocr Rev*, 2019, **40**(3): 711-767.

[3] THANDAPANI P. Super-enhancers in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, **199**: 129-138.

[4] WU J Y, CHEN J, FENG Y J, *et al*. Tumor microenvironment as the "regulator" and "target" for gene therapy [J]. *J Gene Med*, 2019, **21**(7): e3088.

[5] KUESPERT S, HEYDN R, PETERS S, *et al*. Antisense oligonucleotide in LNA-gapmer design targeting TGFBR2-A key single gene target for safe and effective inhibition of TGFβ signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(6): 1952.

[6] CHENG X W, LIU Q B, LI H, *et al*. Lipid nanoparticles loaded with an antisense oligonucleotide gapmer against Bcl-2 for treatment of lung cancer [J]. *Pharm Res*, 2017, **34**(2): 310-320.

[7] KIRAZ Y, ADAN A, KARTAL YANDIM M, *et al*. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis [J]. *Tumour Biol*, 2016, **37**(7): 8471-8486.

[8] YANG S, WANG D, SUN Y, *et al*. Delivery of antisense oligonucleotide using polyethylenimine-based lipid nanoparticle modified with cell penetrating peptide [J]. *Drug Deliv*, 2019, **26**(1): 965-974.

[9] ZHENG B, YANG S, TIAN Q, *et al*. Delivery of antisense oligonucleotide LOR-2501 using transferrin-conjugated polyethylenimine-based lipid nanoparticle [J]. *Anticaner Res*, 2019, **39**(4): 1785-1793.

[10] BULBAKE U, KOMMINENI N, IONOV M, *et al*. Comparison of cationic liposome and PAMAM dendrimer for delivery of anti-Plk1 siRNA in breast cancer treatment [J]. *Pharm Dev Technol*, 2020, **25**(1): 9-19.

[11] MAJZOUB R N, EWERT K K, SAFINYA C R, *et al*. Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing [J]. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2016, **374**(2072): 20150129.

[12] YUNG B, LI J, ZHANG M, *et al*. Lipid nanoparticles composed of quaternary amine-tertiary amine cationic lipid combination(QTsome) for therapeutic delivery of AntimiR-21 for lung cancer [J]. *Mol Pharm*, 2016, **13**(2): 653-662.

[13] MIGNET N, SCHERMAN D. Anionic pH-sensitive lipoplexes [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, **1522**: 227-236.

[14] MARSHALL J, CHEN H, YANG D, *et al*. A phase Ⅰ trial of a Bcl-2 antisense(G3139) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors [J]. *Ann Oncol*, 2004, **15**(8): 1274-1283.

[15] LONEZ C, VANDENBRANDEN M, RUYSSCHAERT J M. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways [J]. *Adv Drug Deliv Rev,* 2012, **64**(15): 1749-1758.

[16] ZHEN S, LI X. Liposomal delivery of CRISPR/Cas9 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2020, **27**(7/8): 515-527.