

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.06.0720

• 专题报道 •

主被动双靶向纳米凝胶递送 RRM2-siRNA 的体外抗肿瘤效应

张莉, 王颖, 金崇, 董霞, 李威*

第二军医大学国际合作肿瘤研究所, 上海 200433

[摘要] **目的** 制备靶向输送针对核糖核苷酸还原酶 RR 小亚基 M2 (RRM2) 的 siRNA (RRM2-siRNA) 的聚 N-异丙基丙烯酰胺/聚乙烯亚胺(PNIPAM/PEI)纳米凝胶, 通过研究其体外的抗肿瘤效应, 以期构建新型靶向纳米凝胶递送基因系统。 **方法** 采用自由基接枝共聚 (radical graft copolymerization) 反应制备具有“核-壳”结构的 PNIPAM/PEI 聚阳离子温度敏感型纳米凝胶, 评价其粒径、zeta 电位等理化性质; 根据电荷相互作用原理, 并通过偶联抗人表皮生长因子受体 2 (Her2) 抗体, 形成包裹 RRM2-siRNA 的靶向性 PNIPAM/PEI-siRNA 纳米凝胶复合体。利用凝胶电泳确定 PNIPAM/PEI-siRNA 纳米凝胶复合体包裹 siRNA 效果, 通过荧光显微镜定性观察和流式细胞术定量检测人胃癌细胞 NCI-N87 对该纳米凝胶复合体的摄取情况, 利用 qPCR 法检测该纳米凝胶递送 siRNA 后靶基因 RRM2 的表达情况, 用 Transwell 法检测该纳米凝胶复合体对 NCI-N87 细胞迁移的影响。 **结果** 本研究合成具有“核-壳”结构的温度敏感型 PNIPAM/PEI 纳米凝胶, 颗粒均匀, 粒径为 359.8 nm, zeta 电位为 21.4 mV。在此基础上, 我们制备出靶向凝胶包裹 RRM2-siRNA 的纳米凝胶复合体, 确定最佳包裹比例为 N/P=60 (N/P: 聚阳离子纳米凝胶中氨基与质粒 DNA 中磷酸基的摩尔比)。不同温度下 (37 °C、42 °C) 细胞内吞实验证实, 该纳米凝胶复合体具有良好的靶向性和温度响应性, 且可以下调靶基因 RRM2 的表达, 抑制 NCI-N87 细胞的迁移。 **结论** 成功制备抗体靶向的 PNIPAM/PEI 聚阳离子温度敏感型纳米凝胶, 其可以结合并投递 siRNA 进入靶细胞, 该纳米复合体可以作为新型抗肿瘤基因治疗的给药系统。

[关键词] 纳米凝胶; 抗体靶向; 温度响应性; 药物递送系统; 小分子干扰 RNA**[中图分类号]** R 943.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)06-0720-07

In vitro anti-tumor effect of RRM2-siRNA based on active and passive dual targeted nanogel

ZHANG Li, WANG Ying, JIN Chong, DONG Xia, LI Wei*

International Joint Cancer Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To prepare antibody-targeting temperature-sensitive poly(lysed N-isopropylacrylamide)/poly(ethyleneimine) (PNIPAM/PEI) nanogel for delivering siRNA against ribonucleotide reductase (RR) subunit M2 (RRM2, RRM2-siRNA) and to establish a new targeted nano-gel delivery system for anti-tumor therapy by studying its anti-tumor ability *in vitro*. **Methods** We synthesized the core-shell temperature-sensitive PNIPAM/PEI nanogel by radical graft copolymerization and evaluated its chemo-physical properties (such as, size and zeta potential) using transmission electron microscopy (TEM). According to the principle of charge interaction, the PNIPAM/PEI-siRNA nanogel encapsulated RRM2-siRNA was prepared by conjugating anti-human epidermal growth factor receptor 2 (Her2) antibody. The effect of PNIPAM/PEI-siRNA nanogel complex encapsulated siRNA was determined by agarose gel electrophoresis. The *in vitro* uptake of NCI-N87 cells by nanogel complex was quantitatively observed by fluorescence microscopy and flow cytometry (FCM). The expression of RRM2 after RRM2 interference using nanogel-siRNA complex in NCI-N87 cells was tested by realtime PCR. The tumor migration suppressing effect of the nanogel complex on Her2-positive tumor cells was determined by Transwell assay. **Results** The core-shell temperature-responsive PNIPAM/PEI nanogel was synthesized by radical graft copolymerization, with homogeneous size of 359.8 nm, and zeta

[收稿日期] 2017-05-10 **[接受日期]** 2017-06-02**[基金项目]** 国家自然科学基金(31470964, 81171450). Supported by National Natural Science Foundation of China (31470964, 81171450).**[作者简介]** 张莉, 硕士, 研究实习员. E-mail: lyleechang@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870804, E-mail: liwei@smmu.edu.cn

potential of 21.4 mV. Furthermore, the nanogel complexes encapsulated RRM2-siRNA with different ratios of N/P (N/P ratio: the molar ratio of nitrogen-from-polyethylenimine to phosphate-from-RNA) were prepared and the electrophoresis results showed that the optimal N/P ratio was 60. The cellular uptake experiment showed that the nanogel had good temperature sensitivity and tumor targeting ability at different temperatures (37 ℃, 42 ℃); and the nanogel complex down-regulated the expression of RRM2 and inhibited the migration of NCI-N87 cells. **Conclusion** The antibody-targeting temperature-sensitive PNIPAM/PEI nanogel is successfully prepared, and it can bind and deliver siRNA into target cells and can be used as a new drug delivery system for anti-tumor therapy.

[Key words] nanogel; antibody-targeting; temperature-response; drug delivery system; small interfering RNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(6): 720-726]

肿瘤的基因治疗正日益受到科学家的普遍关注和重视,如何将基因精准高效地投递到靶细胞进行靶向基因修改就成为制约其应用的关键瓶颈之一^[1-3]。传统的方法转染效率较高,但是对技术和设备要求很高,并且只能在皮肤、肌肉等有限的组织中应用,对靶细胞或靶组织也有一定损害,无法在体内进行;病毒载体也存在靶向性差、高免疫原性等缺陷,而且病毒载体的安全性问题也备受争议;以阳离子脂质体(liposome)为代表的非病毒载体克服了病毒载体安全性等问题,但是其血清稳定性差、载体体系组成复杂、结构尺寸分布宽,导致其转染效率偏低,也降低了其临床应用价值。随着近年来纳米技术与生物医学的结合和发展,设计并制备结构简单、形态可控、体内外稳定、转染效率高、特异性靶向的新型非病毒纳米载体投递基因有望实现基因治疗的精准靶向给药^[4-6]。

针对肿瘤微环境局部温度偏高的特点^[7-8],我们参考文献[9]的方法设计了以温度敏感型高分子聚N-异丙基丙烯酰胺[poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAM]为材料,通过与聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)反应形成侧链生长出温敏聚合物的接枝共聚物,然后聚合物在高温条件下自组装为具有“核-壳”结构的PNIPAM/PEI聚阳离子温度敏感型纳米凝胶。纳米凝胶是一类直径为1 nm~1 μm的水凝胶纳米粒子,由于纳米凝胶粒径小、高渗透和滞留(enhanced permeability and retention, EPR)效应强,可以有效地逃避脾滤过,并且可穿过生物膜屏障到达传统药物无法到达的部位;纳米凝胶药物递送系统还可以延长血液循环时间、增加靶组织的累积,从而实现基因的有效递送,并可根据在生物体中所处的环境实现可控释放。同时由于纳米凝胶表面效应大,可通过装载目的基因实现基因的靶向传送与表达。

利用肿瘤细胞表面的特异性高表达分子,通过

抗体特异识别抗原的原理,将抗体偶联到纳米载体上是提高肿瘤靶向治疗的一个很好的策略。考虑到人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, Her2)基因可在约15%~30%的乳腺癌和10%~30%的胃/食管癌扩增或过表达^[10-11],且Her2过度表达还可见于卵巢癌、子宫内膜癌、膀胱癌、肺癌、结肠癌等^[12-14],我们拟设计在上述温度敏感性的纳米凝胶偶联上针对Her2的抗体,以实现Her2阳性表达的肿瘤细胞进行主动靶向识别。

本研究中我们利用制备的纳米凝胶作为药物递送系统,递送的目的基因是核糖核苷酸还原酶小亚基M2(ribonucleotide reductase subunit M2, RRM2)的siRNA(RRM2-siRNA)。RRM2参与调控DNA合成和修复,对细胞分裂、增殖及分化具有重要作用,为肿瘤细胞增殖所必需^[15]。肿瘤大数据库分析和临床样本检测表明,RRM2在多种肿瘤中高表达^[16],且RRM2表达水平与患者预后呈负相关^[17]。因此,RRM2是治疗肿瘤的一个重要靶点。本实验将具有“核-壳”结构的PNIPAM/PEI聚阳离子温度敏感型纳米凝胶通过电荷相互作用与RRM2-siRNA形成PNIPAM/PEI-siRNA纳米凝胶复合体,进一步通过偶联抗-Her2抗体,借助抗体的主动靶向作用和温度敏感性的被动靶向,实现对Her2阳性肿瘤细胞的精准双靶向给药,以提供一种增强抗肿瘤基因治疗效果的纳米靶向治疗策略。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和细胞株 聚乙烯亚胺(PEI, 相对分子质量 25 000, 美国 Sigma-Aldrich 公司); N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、叔丁基过氧化氢(TBHP)和 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺[BIS; 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司]; 正己烷(上海安谱科学仪器有限公司); 甲醇、盐酸等(国药集团化学试剂有限公

司);异硫氰酸荧光素(FITC,美国 Sigma-Aldrich 公司);胎牛血清和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);CCK-8 试剂盒(日本 Dojin 化学研究所);巯基化的抗-Her2 抗体本研究所自制。人胃癌细胞株 NCI-N87 购自美国 ATCC。

1.2 主要仪器 IKA®C-MAG MS7 搅拌器(德国 IKA 公司);精密天平(日本 SHIMADZU 公司);Confocal(德国 Leica 公司);Zeta sizer 3000HS 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);Olympus IX71 荧光显微镜(日本 Olympus 公司);IVIS®Lumina II 小动物活体成像仪(美国 Caliper 公司);Leica CM1850 冷冻切片机(德国 Leica 公司)。

1.3 纳米凝胶的制备 PNIPAM/PEI 聚阳离子温度敏感型纳米凝胶的制备工艺采用活性自由基聚合(RAFT)和开环聚合(ROP)法。精密称取 0.8 g PEI 和 0.6 g NIPAM 晶体溶解到 50 mL PBS,用盐酸调 pH 至 7 并搅拌混匀;向体系中加入 TBHP 封闭环境下继续反应 4 h;收集制备的凝胶,于 37 °C 用高速冷冻离心机纯化凝胶,15 000×g 离心 15 min;取 30 mL MilliQ-water 重新溶解凝胶沉淀,即得 PNIPAM/PEI 聚阳离子纳米凝胶。

1.4 纳米凝胶表征的测定

1.4.1 凝胶的形态分析 采用透射电子显微镜(TEM)观察纳米凝胶的形态。TEM 样品准备:在铜网上面滴 1 滴纳米凝胶溶液,然后用 2%磷钨酸(PTA)染色,待干。用 Hitachi H-600 TEM(加压到 75 kV)检测并拍照。

1.4.2 粒径分布及电位测定 采用激光粒度分析仪考察纳米凝胶的粒径分布及电位大小。将新制备的纳米凝胶溶液加入适量的水稀释。由于纳米凝胶的浓度对粒径的测定结果有一定影响,稀释倍数以 1 mg/mL 为准计算,稀释后取 80 μ L 置于样品池中进行粒径分布及电位测定。

1.4.3 纳米凝胶的生物相容性 用 CCK-8 试剂盒检测 PNIPAM/PEI 纳米凝胶对细胞增殖的影响,评价纳米凝胶载体的生物相容性。选取对数生长期的 NCI-N87 细胞株以每孔 5 000 个细胞在 96 孔板铺板过夜培养,用含 10 %胎牛血清的细胞培养液分别稀释 PNIPAM/PEI 纳米凝胶、PNIPAM、PEI 至不同浓度,然后每孔 100 μ L 加入 96 孔板,继续培养 24 h 后吸弃原培养液,PBS 洗 2 次,加入新配制的 CCK-8 检测液,孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm 处分别读取样品孔和对照孔的光密度(D)值,计算细

胞存活率。

1.5 PNIPAM/PEI-siRNA 纳米凝胶复合体的制备

1.5.1 PNIPAM/PEI 纳米凝胶包裹 siRNA 形成凝胶复合体 将 PNIPAM/PEI 纳米凝胶用去离子水稀释,分别与 RRM2-siRNA 按 N/P(聚阳离子纳米凝胶中氨基与质粒 DNA 中磷酸基的摩尔比)为 5、15、30、60、75 和 120 混合均匀,室温静置 4 h,得到 PNIPAM/PEI-siRNA 纳米凝胶复合体。

1.5.2 电泳分析 PNIPAM/PEI-siRNA 纳米凝胶复合体 用琼脂糖凝胶电泳阻滞实验对制备出的不同 N/P(5、15、30、60、75、120)的 PNIPAM/PEI-siRNA 纳米凝胶复合体,点样电泳,确定最佳包裹比例。然后根据最佳的包裹比例,进行 RNase 诱导的解聚稳定性测试:取凝胶复合体 N/P 为 75、60、30 的样品,加入 RNase 37 °C 酶切 5 min,70 °C 终止酶切,将样品均分为 2 份,一份为 RNase 酶切样品,另外一份加入肝素钠解聚,点样电泳。

1.6 纳米凝胶复合体的靶向抗体修饰 将 PNIPAM/PEI-siRNA 纳米凝胶复合体与巯基化的抗-Her2 抗体混匀,室温静置 6 h 后,将溶液置于相对分子质量为 300 000 的透析膜透析以除去游离抗体,实现纳米凝胶复合体靶向抗体的修饰。同时制备用小牛血清白蛋白(BSA)修饰包裹 siRNA 的非靶向纳米凝胶复合体,方法同上。

1.7 靶向纳米凝胶复合体的细胞内吞实验 用包裹荧光素 FAM 标记 siRNA(FAM-siRNA)的靶向纳米凝胶复合体转染 NCI-N87 细胞,用荧光显微镜定性观察转染情况;流式细胞术定量检测细胞对纳米凝胶内吞情况,并验证其温度敏感性。以每孔为 5×10^4 个 NCI-N87 细胞在 48 孔板铺板过夜培养。然后用包裹 500 nmol/L FAM-siRNA 的靶向纳米凝胶复合体(FAB-nanogel 组)转染细胞 24 h,分别置于 37 °C、42 °C 孵箱孵育。设置对照组为连接 BSA 的包裹 FAM-siRNA 的非靶向纳米凝胶复合体(BSA-nanogel 组)。然后吸弃细胞培养液,用胰酶消化,流式洗脱液处理后,用流式细胞术定量检测平均荧光强度。

1.8 qPCR 检测靶向纳米凝胶复合体对 RRM2 基因沉默的影响 选取对数生长期的 NCI-N87 细胞株以每孔 1×10^5 个细胞在 24 孔板铺板过夜培养,分别用包裹 RRM2-siRNA 的靶向纳米凝胶复合体(FAB-nanogel-RRM2-siRNA 组)、包裹有随机阴性对照 siRNA 序列(Neg-siRNA)的靶向纳米凝胶复合体(FAB-nanogel-neg-siRNA 组)、连接 BSA 蛋白

的包裹 RRM2-siRNA 的非靶向纳米凝胶复合体 (BSA-nanogel-RRM2-siRNA 组)、连接 BSA 蛋白的包裹 Neg-siRNA 的非靶向纳米凝胶复合体 (BSA-nanogel-neg-siRNA 组) 转染细胞, 分别置于 37 ℃、42 ℃ 孵箱孵育。用 TRIzol 法提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 进行 qPCR 反应, 并以 GAPDH 基因作为内参, 检测 RRM2 基因的表达情况。引物序列: RRM2 Forward 5'-GAU UUA GCC AAG AAG UUC AGA-3'、Reverse 5'-UGA ACU UCU UGG CUA AAU CGC-3', GAPDH Forward 5'-AAG GTG AAT CGG AGT CAA-3'、Reverse 5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3'。

1.9 Transwell 实验观察靶向纳米凝胶复合体对肿瘤细胞迁移的影响 选取对数生长期的 NCI-N87 细胞株, 消化重悬。在 24 孔板下室加入 600 μL 的细胞培养液。Transwell 小室加入 250 μL 含细胞培养液稀释的包裹有 50 nmol/L RRM2-siRNA 的靶向纳米凝胶复合体 (FAB-nanogel-RRM2-siRNA 组) 或连接 BSA 蛋白的包裹 FAM-siRNA 的非靶向纳米凝胶复合体 (BSA-nanogel 组) 的细胞悬液, 分

别置于 37 ℃、42 ℃ 孵箱培养。转染 24 h 后, 取出 Transwell 小室, 弃去孔中培养液, 用 PBS 洗 2 次, 甲醇固定 30 min, 将小室适当风干。用龙胆紫染色, 并轻轻用棉签擦去上层未迁移的细胞, 再用 PBS 洗 2 次。用显微镜观察细胞迁移的情况。

1.10 统计学处理 采用 Excel 进行数据处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结 果

2.1 纳米凝胶的表征

2.1.1 纳米凝胶的形态分析及生物相容性 如图 1A TEM 图片所示, 本实验制备的 PNIPAM/PEI 聚阳离子纳米凝胶为“核-壳”结构, 呈规整的球形, 无粘连, 分散性好, 分布均一, 大小较为均匀。由图 1B 可见, PNIPAM/PEI 聚阳离子纳米凝胶具有良好的生物相容性, 低毒, 具备良好载体的特征。图 1C 所示为 PNIPAM/PEI 聚阳离子纳米凝胶示意图: PNIPAM 为内核、PEI 为壳的“核-壳”结构。

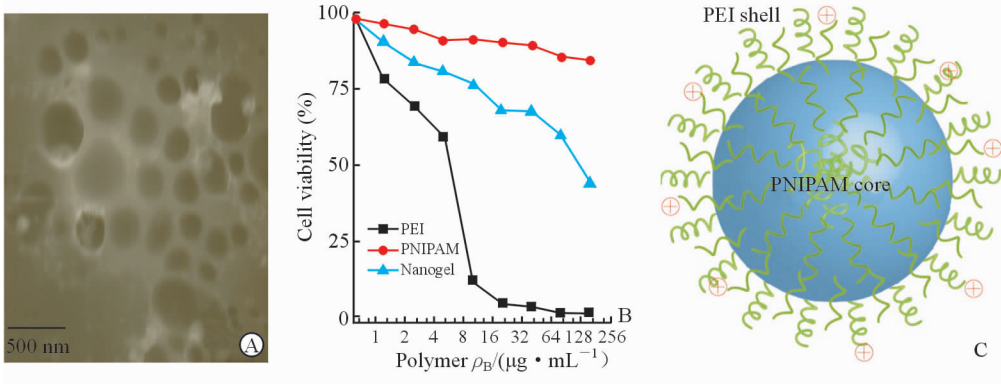


图 1 纳米凝胶透射电镜图 (A)、生物相容性 (B) 和“核-壳”结构示意图 (C)

Fig 1 Transmission electron microscope image (A), biocompatibility (B) and core-shell structure diagram (C) of nanogel
A: Morphology of temperature-responsive and polycationic PNIPAM/PEI nanogel by transmission electron microscope (TEM); B: Viability of NCI-N87 cells cultured with PNIPAM/PEI nanogel; C: Schematic diagram of the core-shell structure. PEI: Polyethyleneimine; PNIPAM: Poly (N-isopropyl acrylamide)

2.1.2 粒径分布及电位 如图 2A 所示, 采用纳米粒度仪测得粒径为 359.8 nm, 粒径较小, 分散性良好, 有助于以纳米级别在体内通过 EPR 效应在肿瘤部位富集。图 2B 为采用纳米粒度仪测得的纳米粒子的 zeta 电位呈正电, 为 21.4 mV, 利于与 siRNA 结合形成稳定的“凝胶-siRNA”复合体, 更好地保护 siRNA 不受机体血浆或组织细胞中各种补体或其他酶类的攻击而被降解, 从而有利于目的基因进入靶细胞后能更高效、更稳定地发挥作用。

2.2 纳米凝胶 PNIPAM/PEI 包裹 siRNA 形成

PNIPAM/PEI-siRNA 复合体 如图 3A 所示, 不同 N/P (5、15、30、60、75、120) 纳米凝胶 PNIPAM/PEI-siRNA 复合体对 siRNA 的包裹效果不同, 随着 N/P 的增加凝胶结合 siRNA 的比例也相应增加, 当 N/P 达 60 时, siRNA 几乎完全结合到纳米凝胶上。如图 3B 所示, 取凝胶复合体 N/P 为 75、60 的样品加入 RNase 酶切, 由于纳米凝胶对 siRNA 有保护作用, 故 1a、2a 泳道未见 siRNA 的渗漏, 仍保持完整性; 在肝素钠解聚后, 则在 1s、2s 泳道重新出现条带, 说明该纳米载体能够较好地释放。

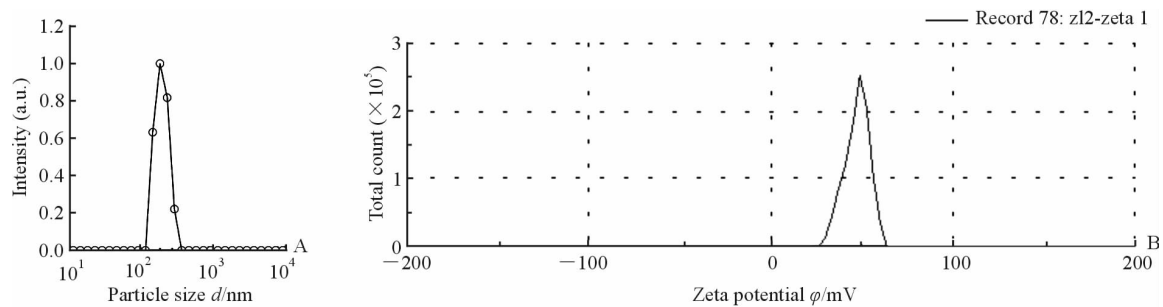


图 2 纳米凝胶的粒径分布(A)及电位大小(B)

Fig 2 Particle size distribution (A) and zeta potential (B) of nanogel

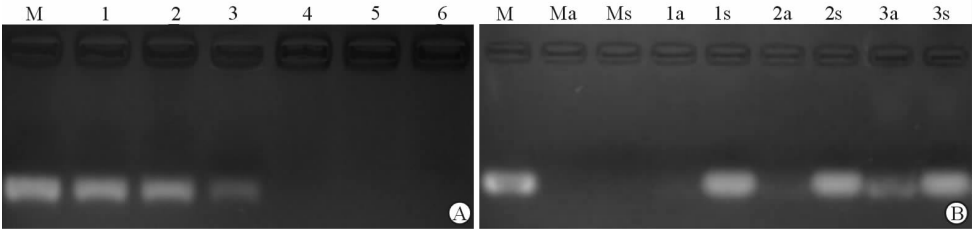


图 3 不同 N/P 的包裹 siRNA 聚阳离子纳米凝胶的电泳结果(A)和酶切保护与释放结果(B)

Fig 3 Electrophoresis (A) and protection and release (B) results of siRNAs packed in nanogels with different N/P ratios

In Fig 3A, M; Naked siRNA control; 1; N/P=5; 2; N/P=15; 3; N/P=30; 4; N/P=60; 5; N/P=75; 6; N/P=120. In Fig 3B, M; Naked siRNA control; 1; N/P=75; 2; N/P=60; 3; N/P=30; a; Samples treated with RNase; s; Samples treated with heparin. N/P; Ratio of nitrogen-from-polycationic nanogel to phosphate-from-DNA of plasmid

2.3 靶向纳米凝胶复合体的细胞内吞结果 采用定性和定量的方法研究纳米粒子的体外细胞摄取,图 4A 为荧光显微镜观察 NCI-N87 细胞对靶向纳米凝胶复合体的内吞结果,由图可见,FAB-nanogel 组随着培养温度的增加细胞内吞的靶向纳米凝胶复合

体的荧光增强,高于 BSA-nanogel 组。图 4B 为用流式细胞仪定量研究 NCI-N87 细胞对纳米粒子的摄取,结果与上述定性分析保持一致,这说明抗-Her2 介导的主动靶向性促进了肿瘤细胞的内吞,而且纳米凝胶呈现较好的温度响应性。

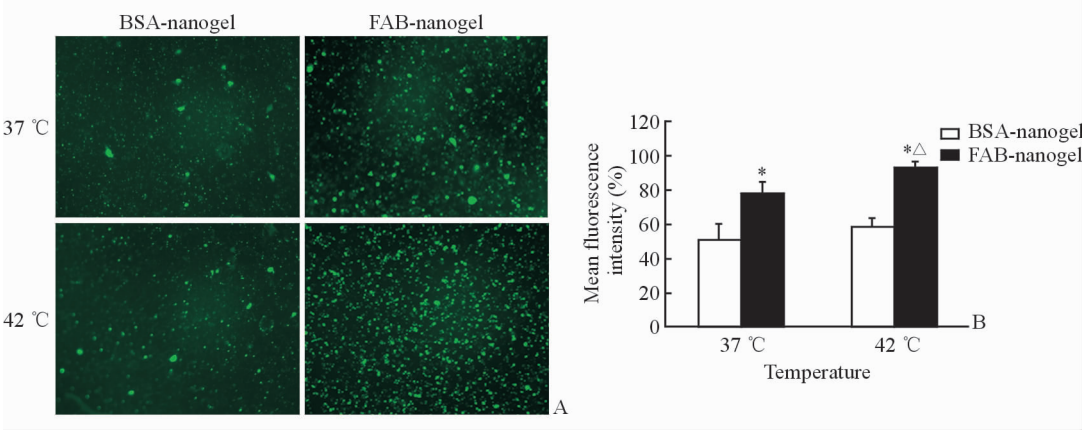


图 4 靶向纳米凝胶复合体转染细胞具有抗体靶向性及温度敏感性

Fig 4 Antibody targeting and temperature sensitive transfection of siRNA by our designed nanogel

A; Immunofluorescence pictures, siRNAs were labeled by FAM; B; Statistical results of transfection efficiency by cytoflowmetry. * $P<0.05$ vs BSA-nanogel group at the same temperature; $\triangle P<0.05$ vs FAB-nanogel group at 37 °C. Original magnification: $\times 200$ (A). $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.4 靶向纳米凝胶复合体对靶基因 RRM2 表达的影响 以 GAPDH 基因作为内参,采用 qPCR 方法检测 RRM2 基因的表达。由图 5 可以看出,包裹 RRM2-siRNA 的非靶向纳米凝胶复合体 (BSA-nanogel-RRM2-siRNA 组) 在 37 °C 使 RRM2 基因表达下调到 BSA-nanogel-neg-siRNA 组的 79.45%,

42 °C 下调到该组的 52.89%,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);包裹 RRM2-siRNA 的靶向组纳米凝胶复合体 (FAB-nanogel-RRM2-siRNA 组) 在 37 °C 使 RRM2 基因表达下调到 FAB-nanogel-neg-siRNA 组的 45.72%,42 °C 下调到该组的 27.63%,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。由此可见,包裹 RRM2-

siRNA 的靶向纳米凝胶复合体可以使 *RRM2* 基因表达降低,且具有温度响应性(在 42 ℃ 时下调较 37 ℃ 更明显, $P<0.05$)。

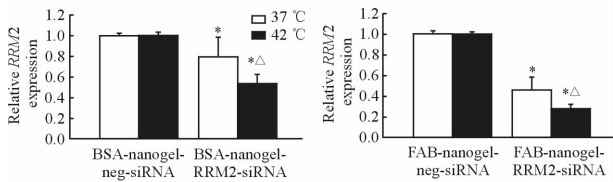


图 5 体外实验检测 *RRM2* 沉默效率

Fig 5 Efficiency of *RRM2* interference by nanogel-siRNA complex in NCI-N87 cells

RRM2: Ribonucleotide reductase subunit M2. * $P<0.05$ vs neg-siRNA group; $\Delta P<0.05$ vs 37 ℃. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.5 靶向纳米凝胶复合体对 NCI-N87 细胞迁移的影响 如图 6 所示,包裹 siRNA 的靶向纳米凝胶复合体可以降低肿瘤细胞的迁移能力,且相对于正常体温环境的 37 ℃,在 42 ℃ 肿瘤模拟环境中纳米凝胶复合体对 NCI-N87 细胞迁移的抑制作用更加明显,说明该复合体具有温度响应性。同时该纳米凝胶复合体的抗肿瘤迁移效应也具有抗体靶向性,因为相对于没有偶联抗体的纳米凝胶(偶联 BSA, BSA-nanogel),偶联了抗体的纳米凝胶复合体(FAB-nanogel-*RRM2*-siRNA)更有效地抑制了 NCI-N87 细胞的迁移。

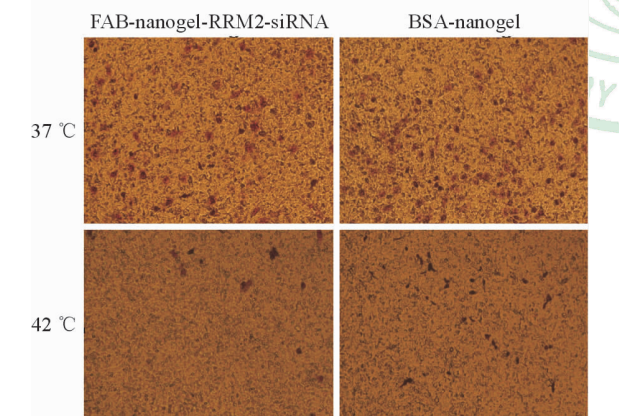


图 6 包裹 *RRM2*-siRNA 纳米凝胶对 NCI-N87 细胞迁移的抑制作用

Fig 6 Tumor migration suppressing effect of the nanogel complex by *RRM2* interference in NCI-N87 cells

RRM2: Ribonucleotide reductase subunit M2. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

本研究采用自由基接枝共聚合反应的方法制备具有“核-壳”结构的 PNIPAM/PEI 聚阳离子温度敏感型纳米凝胶,并测得粒径为 359.8 nm,粒径较小,

有助于在纳米级别通过 EPR 效应在肿瘤部位富集,具备良好的生物相容性,可以作为递送载体;zeta 电位 21.4 mV,呈正电,利于与 siRNA 结合,通过电荷作用可以包裹 *RRM2*-siRNA,形成稳定的“凝胶-siRNA”复合体,更好地保护 siRNA 不受机体血浆或组织细胞中各种补体以及其他酶类的攻击而降解,从而有利于目的基因进入靶细胞后能更高效、更稳定地发挥作用。细胞膜表面呈负电,带正电的纳米凝胶的细胞内吞明显加快,表现出纳米凝胶良好的被动靶向性。该纳米凝胶通过抗体的主动靶向修饰,形成具有抗体主动靶向性的纳米凝胶复合体;通过定性和定量分析了该复合体不同温度下(37 ℃ 和 42 ℃)的细胞内吞,可见该纳米凝胶复合体具有良好的抗体主动靶向性和温度响应性。并且该靶向性的纳米凝胶复合体还可以通过 siRNA 发挥基因治疗的作用,通过体外实验发现其可以下调靶基因 *RRM2* 的表达和抑制 Her2 表达阳性的肿瘤细胞(NCI-N87 细胞)的迁移。在后续实验中,我们将对其体内抗肿瘤活性进一步的探究。

纳米凝胶复合体由于 EPR 效应在肿瘤部位富集,并通过抗体介导的内吞作用靶向性地进入肿瘤细胞,到达溶酶体后,由于胞内溶酶体的 pH 低于 6,强酸性条件引起了纳米凝胶复合体表面 PEI 的质子化,导致链伸展。质子化后的 PEI 外壳对核酸药物的物理包覆能力减弱,并促使溶酶体膜破裂,释放包裹的 siRNA 发挥靶向基因治疗作用。其具体的作用机制如图 7 所示,通过主、被动靶向协同作用的纳米凝胶递送系统可以有效地提高药物运输效率并增强治疗效果。所以,基于纳米颗粒的药物投递系统可以提高肿瘤治疗的效率^[18],有如下几个方面优势:(1)位点特异性地投递药物或基因等;(2)具有更好的体外和体内稳定性;(3)减少不良反应及具有对药物释放的可控性。而且,随着纳米载体工程技术的发展,纳米载体的结构可被很好地修饰,如抗体修饰纳米颗粒可以实现主动靶向的目的。综上所述,本研究所制备的具有温度响应性和抗体靶向的“核-壳”结构纳米凝胶具有主、被动协同靶向性能,可以通过包裹、共价连接或吸附化疗药物或者核酸药物,实现靶向特异输送核酸药物到达肿瘤细胞和肿瘤组织,减少不良反应的发生,是良好的肿瘤基因治疗给药递送载体,具有良好的临床基因治疗应用价值。

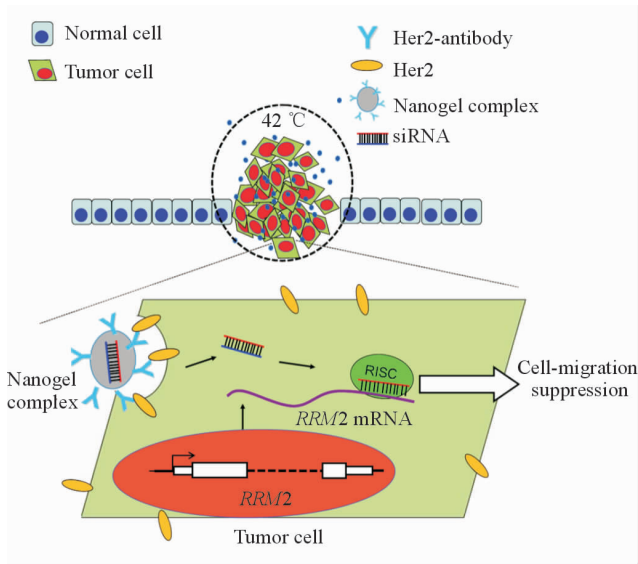


图 7 纳米凝胶复合体作用机制示意图

Fig 7 Schematic diagram of mechanism of nanogel complex

Her2: Human epidermal growth factor receptor-2; RRM2: Ribonucleotide reductase subunit M2; RISC: RNA-induced silencing complex

【参考文献】

[1] NALDINI L. Gene therapy returns to centre stage[J]. Nature, 2015, 526: 351-360.

[2] BRENNER M K, GOTTSCHALK S, LEEN A M, VERA J F. Is cancer gene therapy an empty suit? [J]. Lancet Oncol, 2013, 14: 447-456.

[3] CONG L, ZHANG F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system[M]//Chromosomal mutagenesis. Springer New York, 2015: 197-217.

[4] ROY P, NOAD R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts[J]. Adv Exp Med Biol, 2009, 655: 145-158.

[5] LI W, ZHANG L, ZHANG G, WEI H, ZHAO M, LI H, et al. The finely regulating well-defined functional polymeric nanocarriers for anti-tumor immunotherapy[J]. Mini Rev Med Chem, 2013, 13: 643-652.

[6] LI W, GUO Q, ZHAO H, ZHANG L, LI J, GAO J, et al. Novel dual-control poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-chlorophyllin) nanogels for improving drug release [J]. Nanomedicine (Lond), 2012, 7: 383-392.

[7] ZHANG C, NI D, LIU Y, YAO H, BU W, SHI J. Magnesium silicide nanoparticles as a deoxygenation agent for cancer starvation therapy [J]. Nat Nanotechnol, 2017, 12: 378-386.

[8] AL-AHMADY Z, KOSTARELOS K. Chemical components for the design of temperature-responsive vesicles as cancer therapeutics[J]. Chem Rev, 2016,

116: 3883-3918.

[9] MA M, ZHANG Q, DOU J, ZHANG H, GENG W, YIN D, et al. Fabrication of 1D Fe₃O₄/P(NIPAM-MBA) thermosensitive nanochains by magnetic-field-induced precipitation polymerization[J]. Colloid Polym Sci, 2012, 290: 1207-1213.

[10] HARPER K L, SOSA M S, ENTENBERG D, HOSSEINI H, CHEUNG J F, NOBRE R, et al. Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2⁺ mammary cancer[J/OL]. Nature, 2016. doi: 10.1038/nature20609. [Epub ahead of print].

[11] BARTLEY A N, WASHINGTON M K, COLASACCO C, VENTURA C B, ISMAILA N, BENSON A B 3rd, et al. HER2 testing and clinical decision making in gastroesophageal adenocarcinoma: guideline from the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and the American Society of Clinical Oncology [J]. J Clin Oncol, 2017, 35: 446-464.

[12] SANOFF H K. Targeting HER2 beyond progression in gastroesophageal cancer[J]. Lancet Oncol, 2017, 18: 562-564.

[13] BOKU N. HER2-positive gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2014, 17: 1-12.

[14] LEEHOEFLICH S T, CROCKER L, YAO E, PHAM T, MUNROE X, HOEFLICH K P, et al. A central role for HER3 in *HER2*-amplified breast cancer: implications for targeted therapy [J]. Cancer Res, 2008, 68: 5878-5887.

[15] PFISTER S X, MARKKANEN E, JIANG Y, SARKAR S, WOODCOCK M, ORLANDO G, et al. Inhibiting WEE1 selectively kills histone H3K36me3-deficient cancers by dNTP starvation[J]. Cancer Cell, 2015, 28: 557-568.

[16] DUXBURY M S, WHANG E E. RRM2 induces NF- κ B-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354: 190-196.

[17] RASMUSSEN R D, GAJJAR M K, TUCKOVA L, JENSEN K E, MAYA-MENDOZA A, HOLST C B, et al. BRCA1-regulated RRM2 expression protects glioblastoma cells from endogenous replication stress and promotes tumorigenicity[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13398.

[18] ZOLNIK B S, GONZAÁLEZ-FERNAÁNDEZ Á, SADRIEH N, DOBROVOLSKAIA M A. Nanoparticles and the immune system [J]. Endocrinology, 2010, 151: 458-465.

【本文编辑】 杨亚红