

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230353

· 论 著 ·

## SP94 和 CD47 双修饰外泌体靶向递送 PLK1 siRNA 治疗肝癌

贺 维<sup>1,2</sup>, 刘梦梦<sup>1,2</sup>, 张延琴<sup>3</sup>, 潘鹭翔<sup>2</sup>, 何 磊<sup>2</sup>, 顾锦涛<sup>2</sup>, 高 源<sup>2</sup>, 周月媛<sup>2</sup>, 张 阔<sup>2</sup>, 张英起<sup>2</sup>, 郝 强<sup>2\*</sup>

1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069

2. 空军军医大学药理学系生物制药学教研室, 西安 710032

3. 空军军医大学西京医院核医学科, 西安 710032

**[摘要]** **目的** 设计一种基于外泌体高效递送的方法, 将治疗性核酸递送到肝癌组织治疗原发性肝癌。**方法** 构建靶向肝癌的融合表达 SP94 和 CD47 的质粒, 转染至 HEK293T 细胞后提取分离外泌体。通过透射电子显微镜及纳米颗粒跟踪分析、蛋白质印迹法等方法对外泌体进行鉴定。小鼠经尾静脉分别注射 200 μg DiD 标记的未修饰外泌体和 SP94 修饰的外泌体, 采用小动物活体成像仪检测并分析外泌体对肝癌组织的靶向作用。将未修饰外泌体和 CD47 修饰的外泌体分别与巨噬细胞 RAW264.7、小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 共孵育, 验证细胞对修饰后外泌体的吞噬情况。通过电穿孔法将 Polo 样激酶 1 (PLK1) siRNA 加载到不同修饰的外泌体中, 再与 Hepa1-6 细胞共孵育, 采用流式细胞术检测细胞凋亡水平。原发性肝癌模型小鼠经尾静脉注射加载 PLK1 siRNA 的修饰外泌体, 系统研究并分析其对原发性肝癌的治疗效果。**结果** SP94 修饰增强了外泌体对肝癌组织的靶向作用, CD47 修饰减少了外泌体被巨噬细胞吞噬。SP94 和 CD47 双修饰外泌体递送 PLK1 siRNA 促进了肝癌细胞凋亡。在原发性肝癌模型小鼠中, SP94 和 CD47 双修饰外泌体加载 PLK1 siRNA 能有效抑制小鼠肝癌结节的生长, 延长小鼠生存期。**结论** SP94 和 CD47 双修饰外泌体可以高效靶向肝癌递送治疗性核酸 PLK1 siRNA, 有效抑制肝癌的生长。

**[关键词]** 原发性肝癌; 外泌体; 靶向递送; SP94; CD47; Polo 样激酶 1; 细胞凋亡

**[引用本文]** 贺维, 刘梦梦, 张延琴, 等. SP94 和 CD47 双修饰外泌体靶向递送 PLK1 siRNA 治疗肝癌[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(12): 1421-1428. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230353.

### Targeted delivery of PLK1 siRNA by SP94 and CD47 double-modified exosomes for liver cancer

HE Wei<sup>1,2</sup>, LIU Mengmeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Yanqin<sup>3</sup>, PAN Luxiang<sup>2</sup>, HE Lei<sup>2</sup>, GU Jintao<sup>2</sup>, GAO Yuan<sup>2</sup>, ZHOU Yueyuan<sup>2</sup>, ZHANG Kuo<sup>2</sup>, ZHANG Yingqi<sup>2</sup>, HAO Qiang<sup>2\*</sup>

1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

2. Department of Bio-pharmaceuticals, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

3. Department of Nuclear Medicine, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To develop an efficient exosome-based delivery method to effectively transport therapeutic nucleic acid to liver cancer tissue for the treatment of primary hepatic cancer. **Methods** HEK293T cells were transfected with a recombinant plasmid expressing SP94 and CD47, and the exosomes were extracted and isolated. Exosomes were identified by transmission electron microscope, nanometer particle tracking analysis, and Western blotting. The mice were injected with 200 μg DiD labeled unmodified exosomes and SP94 modified exosomes via tail vein, and the targeting effect of exosomes on liver cancer tissue was detected and analyzed using small animal *in vivo* imaging. The unmodified exosomes and CD47 modified exosomes were incubated with macrophages (RAW264.7) and mouse hepatoma cells (Hepa1-6) to verify the phagocytosis of the modified exosomes by the cells. Polo-like kinase 1 (PLK1) small interfering RNA (siRNA) was loaded into different modified exosomes by electroporation and then the exosomes were co-incubated with Hepa1-6 cells, and the cell apoptosis was detected by flow cytometry. The modified exosomes loaded with PLK1 siRNA were injected into the tail vein to systematically study and analyze the therapeutic effect of PLK1 siRNA on primary hepatic cancer in mice. **Results** SP94 modification enhanced the targeting effect of exosomes on liver cancer tissue, and CD47 modification reduced the phagocytosis of exosomes by macrophages. PLK1 siRNA delivered by SP94 and CD47 double-modified exosomes increased the apoptosis of hepatoma cells. In the primary hepatic cancer mice, SP94 and CD47 double-modified exosomes loaded with PLK1 siRNA could effectively inhibit the growth of liver cancer nodules and prolong the survival time of tumor-

[收稿日期] 2023-06-24 [接受日期] 2023-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金(82072658). Supported by National Natural Science Foundation of China (82072658).

[作者简介] 贺 维, 硕士生. E-mail: 2486880469@qq.com

\*通信作者( Corresponding author ). Tel: 029-84773259, E-mail: haosuoq@fmmu.edu.cn

bearing mice. **Conclusion** SP94 and CD47 double-modified exosomes can efficiently deliver therapeutic nucleic acid PLK1 siRNA to target liver cancer and effectively inhibit the growth of liver cancer.

[ **Key words** ] primary hepatic carcinoma; exosomes; targeted delivery; SP94; CD47; Polo-like kinase 1; apoptosis

[ **Citation** ] HE W, LIU M, ZHANG Y, et al. Targeted delivery of PLK1 siRNA by SP94 and CD47 double-modified exosomes for liver cancer[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(12): 1421-1428. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230353.

原发性肝癌 (primary hepatic cancer, PHC) 是目前世界上发病率最高的癌症,也是我国常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>。其恶性程度较高,多数患者初诊时已为晚期,且治疗效果较差、生存率低。目前手术及术后放、化疗依然是肝癌的主要治疗手段,其疗效受到多种因素的限制,且放、化疗在杀伤癌细胞的同时也会给正常细胞和组织带来损伤<sup>[3]</sup>。因此,开发高效、低毒的靶向治疗和药物递送方法是治疗 PHC 的重要发展方向<sup>[4]</sup>。

近年来,工程化外泌体作为药物载体成为研究热点<sup>[5]</sup>。外泌体可以通过携带蛋白质、miRNA、siRNA 等其他治疗性物质在肿瘤的治疗中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。外泌体作为核酸药物递送载体的独特优势在于:(1)相较于病毒、脂质体等人工载体,外泌体具有更低的毒性和免疫原性;(2)外泌体可以有效包裹药物,使其完好无损地到达受体细胞,延长药物在体内的半衰期;(3)外泌体具有优异的生物分布和生物相容性,更容易到达某些靶细胞或靶器官。然而,外泌体药物递送的靶向性差且容易被单核吞噬细胞系统 (mononuclear phagocyte system, MPS) 吞噬等问题导致递送效率低,是其应用的主要障碍,提高靶向性和递送效率是外泌体工程化改造研究的主要方向。

研究发现,肝癌特异性靶向肽 SP94 能特异性靶向肝癌细胞但不能被肝细胞识别<sup>[7]</sup>。CD47 是抑制吞噬作用的“不吃我”信号,作为信号调节蛋白  $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ , SIRP $\alpha$ ) 的配体发挥作用<sup>[8-9]</sup>,那么,在外泌体上表达 CD47 和 SP94 是否可以既保护外泌体不被巨噬细胞吞噬又提高肝癌靶向性,进而提高递送效率呢?在本研究中,我们设计了联合表达 SP94 和 CD47 的外泌体,通过工程化外泌体靶向递送潜在的肝癌治疗性核酸 Polo 样激酶 1 (Polo-like kinase 1, PLK1) siRNA,并考察了其对 PHC 的治疗效果。

## 1 材料和方法

1.1 细胞系及主要试剂 小鼠肝癌细胞系 Hepal-6、

巨噬细胞系 RAW264.7 和人胚肾细胞系 HEK293T 均由空军军医大学药理学系生物制药学教研室保存。青霉素-链霉素混合液、DMEM 高糖培养基及 FBS 均购于美国 Gibco 公司。培养皿、6 孔板及共聚焦小皿购于美国 CORNING 公司。GAPDH、CD9、肿瘤易感性基因 101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101)、高尔基体基质蛋白 130 (Golgi matrix protein 130, GM130)、CD47、溶酶体相关膜蛋白 2b (lysosomal associated membrane protein 2b, Lamp2b) 抗体和相应二抗,以及超敏 ECL 化学发光试剂盒均购于西安壮志生物科技有限公司。

1.2 质粒与修饰外泌体的构建 将编码 SP94 与 Lamp2b 和 / 或 CD47 的 cDNA 片段插入 pcDNA3.1 载体中人巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子的下游,同时在 Lamp2b 序列的末尾添加人流感血凝素 (hemagglutinin, HA) 标签,分别组装成 SP94-Lamp2b-HA 质粒,CD47 质粒、融合表达 SP94 和 CD47 的 SP94-CD47-Lamp2b-HA 质粒。将 SP94-Lamp2b-HA 质粒、CD47 质粒、SP94-CD47-Lamp2b-HA 质粒分别转染进 HEK293T 细胞,收集细胞上清后提取 SP94 修饰的外泌体、CD47 修饰的外泌体、SP94 和 CD47 双修饰外泌体。

### 1.3 外泌体分离及鉴定

1.3.1 外泌体收集与提取 将 HEK293T 细胞在 DMEM 完全培养基中培养至汇合度为 80%,用无血清 DMEM 培养基培养 48 h 后收集细胞上清,4 °C 2 000×g 离心 30 min 去除残留细胞及碎片,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤并收集过滤液。将过滤液于 4 °C 100 000×g 超速离心 1 h 获得外泌体沉淀,用 PBS 重悬后于 -80 °C 保存备用。

1.3.2 外泌体粒径分析 送样至和元生物技术 (上海) 股份有限公司,采用纳米颗粒跟踪分析系统测量外泌体粒径大小。

1.3.3 透射电子显微镜检测 送样至和元生物技术 (上海) 股份有限公司,用透射电子显微镜观察外泌体形态。首先吸取样品 10  $\mu$ L 滴加于铜网上沉淀 1 min,用滤纸吸去浮液。取醋酸双氧铀 10  $\mu$ L 滴

加于銅網上沉淀 1 min, 用濾紙吸去浮液。常溫干燥數分鐘, 在 100 kV 下進行透射電子顯微鏡檢測。

1.3.4 蛋白質印迹法檢測外泌體標志物 採用蛋白質印迹法檢測 HEK293T 細胞及其分泌的外泌體中 CD9、TSG101 及高爾基體標志物 GM130 的蛋白表達水平, 以確定提取外泌體的純度, 同時檢測外泌體表面 CD47 和 Lamp2b 的蛋白表達水平。

1.4 SP94 修飾的外泌體、CD47 修飾的外泌體、SP94 和 CD47 雙修飾外泌體電穿孔加載 PLK1 siRNA 從 HEK293T 細胞上清中提取的 SP94 修飾的外泌體、CD47 修飾的外泌體、SP94 和 CD47 雙修飾外泌體, 經 BCA 法定量後, 分別取 200  $\mu\text{g}$  外泌體用 PBS 重懸並轉移至 1.5 mL EP 管中。PLK1 siRNA 粉末經離心後加入 DEPC 水溶解混勻。將外泌體與 PLK1 siRNA 混勻後轉移至預冷電轉杯中, 體系為 50  $\mu\text{L}$ 。使用日本 BEX 公司 CUY21 EDIT II 超級電轉化儀設置電轉參數 (110 V, 4 ms, 循環次數 10, 電阻 80  $\Omega$  左右) 並進行電穿孔, 隨後置於冰上 30 min 即可使用。

1.5 小鼠 PHC 模型構建 6~8 周齡 C57BL/6 小鼠購於空軍軍醫大學實驗動物中心 [動物生產許可證號為 SCXK (軍) 2017-0020]。在小鼠體內過表達 *N-Ras* 和 *Akt* 並使 2 種基因相互作用, 誘導小鼠肝癌的發生和發展。通過給小鼠尾靜脈高壓注射 *myrAkt-Luc*、*pT3-N-RasV12* 質粒及 *pCMV-sleeping beauty7* 轉座子構建小鼠 PHC 模型。

1.6 外泌體體內靶向效率驗證 將構建的 PHC 模型小鼠隨機分成 2 組 (每組 5 只), 分別將 200  $\mu\text{g}$  未修飾外泌體 ( $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$  組) 和 SP94 修飾的外泌體 ( $\text{Exos}^{\text{SP94}}$  組) 經 DiD 標記 [DiD : 外泌體 = 1 : 300 (體積比)] 後, 通過尾靜脈注射進小鼠體內。在注射後 0、3、6、9、12 h 時使用美國 Perkin Elmer 公司 IVIS lumina II 小動物活體成像儀成像, 並剝離小鼠肝臟進行成像, 通過熒光強度分析外泌體在小鼠體內的分布情況及靶向情況。

1.7 MPS 和肝癌細胞對修飾外泌體的吞噬作用檢測 RAW264.7、Hepal-6 細胞進行常規消化後制成單細胞懸液, 按照合適的密度接種於共聚焦小皿中, 待細胞完全貼壁後即可進行相應處理並染色。首先吸棄培養基, 加入 1 mL 4% 多聚甲醛溶液室溫固定 20 min; 然後加入 200  $\mu\text{L}$  0.05% Triton, 室溫破膜處理細胞 20 min; 再滴加 200  $\mu\text{L}$  DAPI 染色工作液,

室溫避光孵育 1 min。每步之後在搖床上用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。隨後用激光共聚焦顯微鏡 (日本 Nikon 公司) 觀察和拍照。

1.8 加載 PLK1 siRNA 的外泌體的體外抗肝癌作用檢測 Hepal-6 細胞進行常規消化後制成單細胞懸液, 按照合適的密度接種於 6 孔板中, 待細胞完全貼壁後分為 6 組並進行相應處理: 未修飾外泌體空載組 ( $\text{Exos}^{\text{Ctrl-siNC}}$  組)、SP94 和 CD47 雙修飾外泌體空載組 ( $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47-siNC}}$  組)、未修飾外泌體加載 PLK1 siRNA 組 ( $\text{Exos}^{\text{Ctrl-siPLK1}}$  組)、SP94 修飾的外泌體加載 PLK1 siRNA 組 ( $\text{Exos}^{\text{SP94-siPLK1}}$  組)、CD47 修飾的外泌體加載 PLK1 siRNA 組 ( $\text{Exos}^{\text{CD47-siPLK1}}$  組)、SP94 和 CD47 雙修飾外泌體加載 PLK1 siRNA 組 ( $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47-siPLK1}}$  組)。處理完成後吸棄培養基, 用 PBS 洗 1 次, 用不含 EDTA 的胰酶消化細胞, 加完全培養基終止消化, 收集細胞沉淀。用預冷 PBS 清洗 1 次, 加入 200  $\mu\text{L}$  結合緩沖液清洗細胞, 重懸於 200  $\mu\text{L}$  含有 5  $\mu\text{L}$  膜聯蛋白 V 的結合緩沖液中, 室溫避光孵育 10 min。用 200  $\mu\text{L}$  結合緩沖液清洗細胞, 重懸於 190  $\mu\text{L}$  結合緩沖液中, 加入 10  $\mu\text{L}$  PI 重懸細胞, 採用流式細胞儀檢測。

1.9 加載 PLK1 siRNA 的外泌體的體內抗肝癌作用檢測 實驗動物分為 2 部分, 分別用於肝癌生長情況的觀察和生存期的統計。將 PHC 模型小鼠分為 4 組 (每組 5 只): 未修飾外泌體組 ( $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$  組)、SP94 修飾的外泌體加載 PLK1 siRNA 組 ( $\text{Exos}^{\text{SP94-siPLK1}}$  組)、CD47 修飾的外泌體加載 PLK1 siRNA 組 ( $\text{Exos}^{\text{CD47-siPLK1}}$  組)、SP94 和 CD47 雙修飾外泌體加載 PLK1 siRNA 組 ( $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47-siPLK1}}$  組)。每 3 d 以尾靜脈注射方式治療 1 次, 按 10  $\mu\text{L/g}$  的劑量腹腔注射 1.5 mg D- 螢光素, 10~15 min 後進行小動物活體成像, 根據平均熒光強度觀察小鼠 PHC 的生長情況。用作生存期統計的各组小鼠 (每組 5 只) 治療後飼養至死亡為止。

1.10 統計學處理 應用 GraphPad Prism 8.0 軟件進行統計學分析和生存曲線繪制。數據以  $\bar{x} \pm s$  表示, 任意兩組間比較採用獨立樣本 *t* 檢驗。檢驗水準 ( $\alpha$ ) 為 0.05。

## 2 結果

2.1 SP94 和 CD47 雙修飾外泌體的鑑定 將融合表達 SP94 和 CD47 的質粒轉染進 HEK293T 細胞,

48 h后收集修饰外泌体(图 1A)。纳米粒径测量结果显示SP94和CD47双修饰外泌体( $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$ )与未修饰外泌体( $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$ )大小均匀,峰值在120 nm左右,大小没有显著差异(图 1B),透射电子显微镜证实修饰不会影响外泌体的形态(图 1C)。用蛋白质印迹法检测外泌体特征性标志物TSG101、CD9及高尔基体标志物GM130的

表达水平,结果显示SP94和CD47修饰未影响外泌体的标志物特征(图 1D)。通过蛋白质印迹法检测了外泌体表面CD47和Lamp2b的表达水平,结果显示与 $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$ 相比,CD47修饰的外泌体( $\text{Exos}^{\text{CD47}}$ )、 $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$ 表面CD47表达增加,SP94修饰的外泌体( $\text{Exos}^{\text{SP94}}$ )、 $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$ 表面Lamp2b的表达增加(图 1E)。

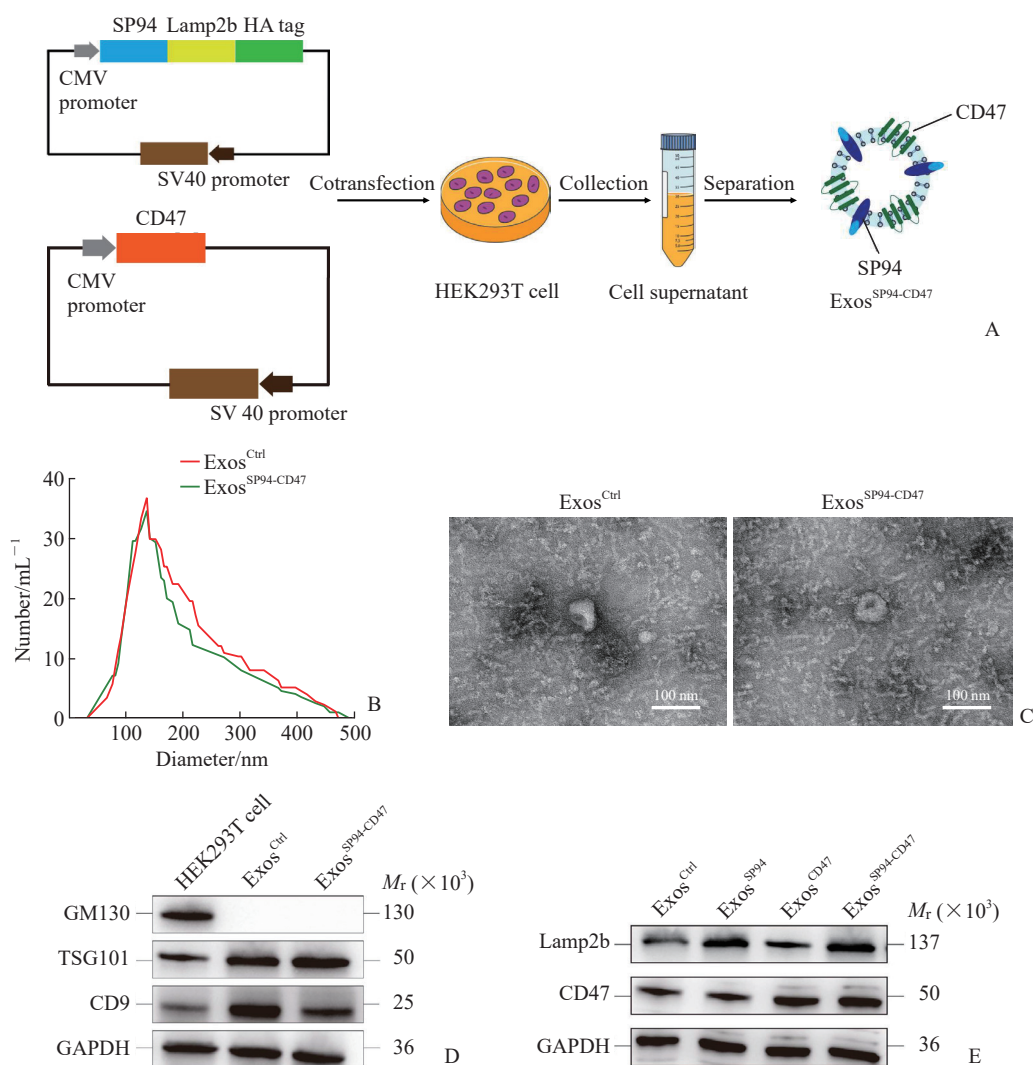


图 1  $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$  的构建与鉴定

Fig 1 Construction and identification of  $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$

A: Preparation and separation diagram of SP94 and CD47 double-modified exosomes ( $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$ ). B: Particle size distribution of exosomes. The particle sizes of unmodified exosomes ( $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$ ) and  $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$  were measured by nanoparticle tracking analysis. C: Representative images of  $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$  and  $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$  under transmission electron microscope. D: The exosome markers CD9 and TSG101 and Golgi body marker GM130 were detected by Western blotting. E: The CD47 and Lamp2b on  $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$ , SP94 modified exosomes ( $\text{Exos}^{\text{SP94}}$ ), CD47 modified exosomes ( $\text{Exos}^{\text{CD47}}$ ), and  $\text{Exos}^{\text{SP94-CD47}}$  were detected by Western blotting. Lamp2b: Lysosomal associated membrane protein 2b; HA: Hemagglutinin; CMV: Cytomegalovirus; SV40: Simian virus 40; GM130: Golgi matrix protein 130; TSG101: Tumor susceptibility gene 101; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.2 SP94 修饰增强了外泌体对小鼠肝癌组织的靶向作用 通过尾静脉注射的方式给小鼠分别注射

DiD 标记的未修饰外泌体 ( $\text{Exos}^{\text{Ctrl}}$ ) 和 SP94 修饰的外泌体 ( $\text{Exos}^{\text{SP94}}$ )，通过小动物活体成像观察

荧光强度。结果显示,相较于 Exos<sup>Ctrl</sup> 组, Exos<sup>SP94</sup> 组 PHC 组织中的荧光强度较高 ( $1.320 \pm 0.080$  vs  $0.788 \pm 0.039$ ,  $P < 0.05$ , 图 2A), 在肝癌组织中

富集度高 (图 2B)。体内实验结果表明, SP94 修饰增强了外泌体在肝癌组织的富集。

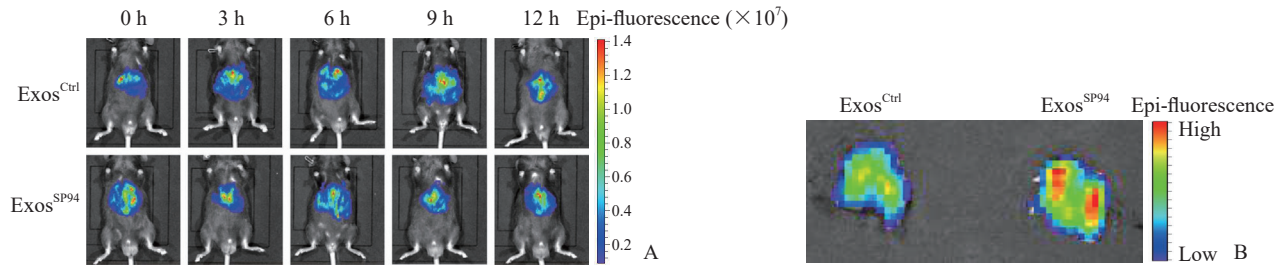


图 2 原发性肝癌模型小鼠中外泌体的肿瘤靶向能力

Fig 2 Tumor targeting ability of exosomes in primary hepatic cancer model mice

A: *In vivo* fluorescence images of primary hepatic cancer mice 0, 3, 6, 9, and 12 h after injection of 200  $\mu$ g DiD-labeled unmodified exosomes (Exos<sup>Ctrl</sup>) or SP94 modified exosomes (Exos<sup>SP94</sup>) via tail vein; B: Fluorescence images of isolated primary hepatic cancer after injection of DiD-labeled exosomes via tail vein.

2.3 CD47 修饰减少了巨噬细胞 RAW264.7 对外泌体的吞噬 将 DiD 标记的未修饰外泌体 (Exos<sup>Ctrl</sup>) 和 CD47 修饰的外泌体 (Exos<sup>CD47</sup>) 分别与巨噬细胞 RAW264.7、肝癌细胞 Hepa1-6 共孵育。免疫荧光结果显示, 在巨噬细胞 RAW264.7 中, Exos<sup>CD47</sup> 组细胞对外泌体的吞噬效率低于 Exos<sup>Ctrl</sup> 组

( $0.600 \pm 0.115$  vs  $1.333 \pm 0.088$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 3A)。在肝癌细胞 Hepa1-6 中, Exos<sup>Ctrl</sup> 组和 Exos<sup>CD47</sup> 组细胞对外泌体的吞噬效率 ( $1.320 \pm 0.029$  vs  $1.440 \pm 0.038$ ) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3B)。以上结果表明 CD47 修饰减少了外泌体被巨噬细胞 RAW264.7 吞噬。

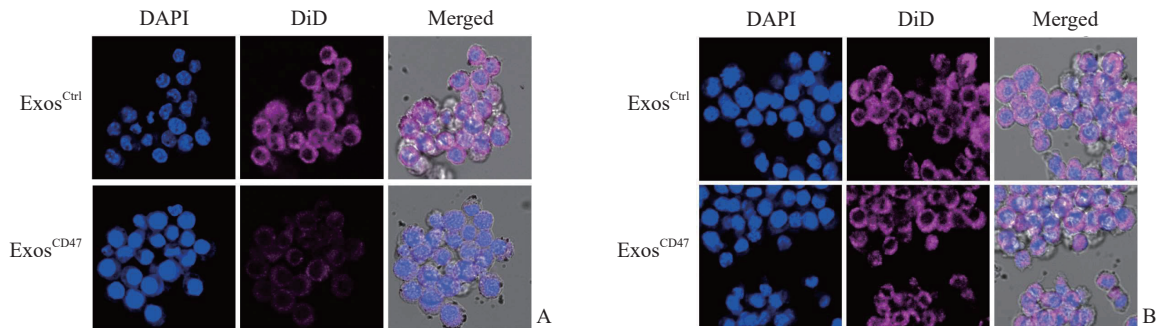


图 3 Exos<sup>CD47</sup> 可以逃脱单核吞噬系统的吞噬作用 (100 $\times$ )

Fig 3 Exos<sup>CD47</sup> can escape phagocytosis of mononuclear phagocyte system (100 $\times$ )

A: Representative images of DiD-labeled unmodified exosomes (Exos<sup>Ctrl</sup>) and CD47 modified exosomes (Exos<sup>CD47</sup>) in RAW264.7 cells; B: Representative images of DiD-labeled Exos<sup>Ctrl</sup> and Exos<sup>CD47</sup> in Hepa1-6 cells. Exosomes were stained with DiD and nuclei were stained with DAPI. The images of fluorescence were collected under confocal laser scanning microscope. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.4 修饰外泌体加载 PLK1 siRNA 促进了肝癌细胞 Hepa1-6 凋亡 将不同修饰的外泌体加载 PLK1 siRNA 至肝癌细胞 Hepa1-6 中, 48 h 后收集细胞, 用流式细胞术检测肝癌细胞 Hepa1-6 凋亡水平。结果 (图 4) 显示, Exos<sup>Ctrl-siNC</sup>、Exos<sup>SP94-CD47-siNC</sup>、Exos<sup>Ctrl-siPLK1</sup>、Exos<sup>SP94-siPLK1</sup>、Exos<sup>CD47-siPLK1</sup>、Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> 组肝癌细胞凋亡率分别为 ( $0.763 \pm$

$0.064$ )%、( $0.847 \pm 0.047$ )%、( $7.873 \pm 0.107$ )%、( $14.830 \pm 0.215$ )%、( $7.677 \pm 0.355$ )%、( $14.930 \pm 0.080$ )%, 治疗性核酸 PLK1 siRNA 加载后肝癌细胞凋亡率相较于对照组增加 ( $P < 0.01$ )。其中 Exos<sup>SP94-siPLK1</sup> 组和 Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> 组的细胞凋亡率高于 Exos<sup>Ctrl-siPLK1</sup> 组 ( $P < 0.01$ ), 说明靶向肽 SP94 修饰后外泌体的肝癌靶向性提高, 致使 PLK1

siRNA 递送效率提高、肝癌细胞凋亡率增加。由于缺少 MPS 的因素, Exos<sup>CD47-siPLK1</sup> 组并未显示出对肝

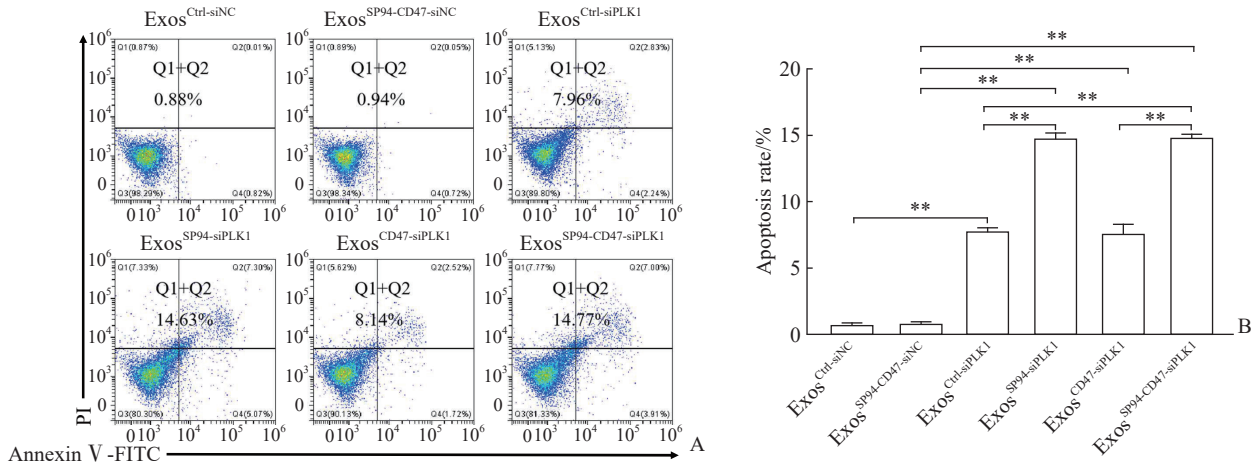


图4 不同修饰的外泌体加载 PLK1 siRNA 促进肝癌细胞 Hepa1-6 凋亡

Fig 4 Different modified exosomes loaded with PLK1 siRNA promote apoptosis of Hepa1-6 hepatoma cells

A: Flow cytometry detection of the cell apoptosis in Exos<sup>Ctrl-siNC</sup> group (unmodified exosome negative control group), Exos<sup>SP94-CD47-siNC</sup> group (SP94 and CD47 double-modified exosome negative control group), Exos<sup>Ctrl-siPLK1</sup> group (unmodified exosomes loaded with PLK1 siRNA group), Exos<sup>SP94-siPLK1</sup> group (SP94 modified exosomes loaded with PLK1 siRNA group), Exos<sup>CD47-siPLK1</sup> group (CD47 modified exosomes loaded with PLK1 siRNA group), and Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> group (SP94 and CD47 double-modified exosomes loaded with PLK1 siRNA group); B: Statistical analysis of the cell apoptosis rates in the 6 groups. \*\**P*<0.01. *n*=3,  $\bar{x} \pm s$ . PLK1: Polo-like kinase 1; siRNA: Small interfering RNA; PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate.

2.5 修饰外泌体加载 PLK1 siRNA 对小鼠 PHC 的治疗作用 小动物活体成像结果 (图 5A) 表明, 与 Exos<sup>Ctrl</sup> 组 (1.581±0.032) 相比, Exos<sup>SP94-siPLK1</sup> 组 (0.541±0.015) 和 Exos<sup>CD47-siPLK1</sup> 组 (0.346±0.037) 的荧光强度均降低, Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> 组 (0.131±0.005) 荧光强度降低更明显 (*P*<0.01)。离体移植瘤标本测定结果 (图 5B) 显示, 与 Exos<sup>Ctrl</sup> 组相比, Exos<sup>SP94-siPLK1</sup> 组和 Exos<sup>CD47-siPLK1</sup> 组小鼠肝癌结节的增长减缓, 且 Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> 组减缓更为明显。生存分析显示, Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> 组荷瘤鼠的生存时间延长 (图 5C)。以上结果显示, SP94 和 CD47 双修饰外泌体可以更好地提高治疗性核酸的靶向性和递送效率, 有效抑制小鼠肝癌结节的生长, 提高对 PHC 的治疗效果。

### 3 讨论

PHC 是我国常见的恶性肿瘤之一, 目前除了手术之外缺乏有效的药物治疗手段及递送方法。外泌体是细胞通过胞吐作用分泌的、具有双层膜结构的细胞外囊泡, 是细胞自然分泌的低免疫原性载体, 可以向动物输送药物或基因<sup>[10]</sup>, 外泌体还有天然嗜肝细胞效应, 具有成为良好肝脏药物递送

载体的潜力<sup>[11]</sup>。然而, 外泌体并不能在肝脏中区分癌细胞和正常细胞, 如何提高其对癌细胞的靶向性、尽可能在杀伤癌细胞的同时避免对正常细胞造成不良影响已成为外泌体工程化改造研究的重要内容。SP94 是一种肝癌特异性靶向肽, 可与肝癌细胞特异性结合<sup>[12]</sup>, SP94 修饰的工程外泌体能使外泌体具有更强的肝癌靶向能力, 可以很好地解决药物精准递送问题, 增强药物疗效<sup>[13]</sup>。Zheng 等<sup>[14]</sup>研究设计了一种靶向肝癌可注射纳米颗粒, 可通过 SP94 表面修饰降低药物使用剂量, 有效治疗肝癌。

此外, 基于外泌体的疗法主要障碍是 MPS 的吞噬作用限制了其临床应用。本研究设计 Exos<sup>CD47</sup> 作为核酸药物的递送载体。CD47 主要表达于循环造血干细胞<sup>[15]</sup>、正常红细胞<sup>[16]</sup>和大多数类型肿瘤细胞<sup>[17]</sup>的表面, 它是一种跨膜分子, 与巨噬细胞表面的 SIRP $\alpha$  结合产生“不要吃我”信号, 以防止吞噬作用<sup>[18]</sup>。本研究成功构建了 Exos<sup>CD47</sup>, 并且通过实验验证 CD47 修饰减少了外泌体被巨噬细胞 RAW264.7 吞噬, 提高了核酸递送的有效性, 体内分布实验也验证了它可以逃避 MPS 的吞噬、增加在肿瘤中的分布。

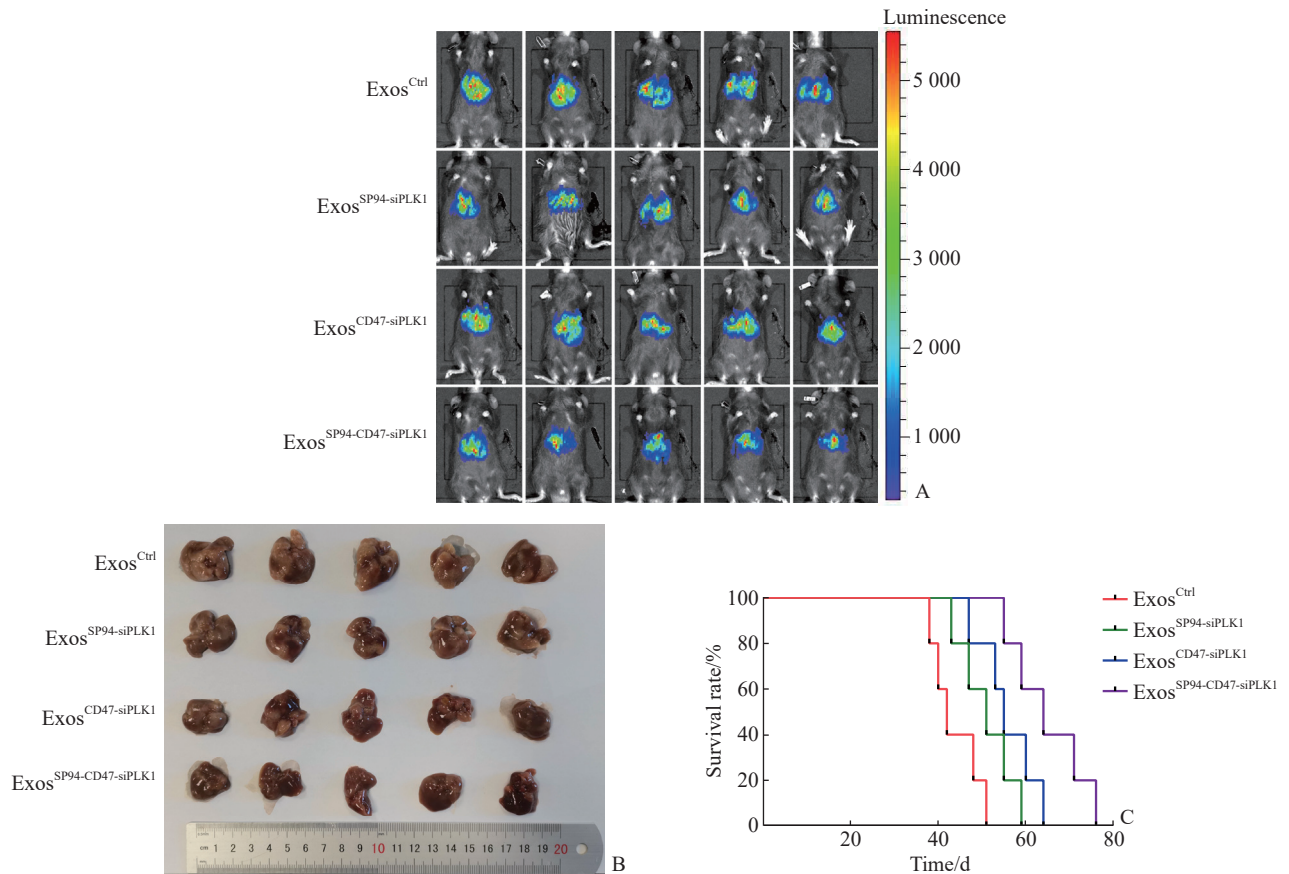


图5 修饰外泌体对小鼠原发性肝癌的治疗效果

Fig 5 Therapeutic effect of modified exosomes on primary hepatic cancer in mice

A: Live imaging of mice with primary hepatic cancer in Exos<sup>Ctrl</sup> group (unmodified exosome group), Exos<sup>SP94-siPLK1</sup> group (SP94 modified exosomes loaded with PLK1 siRNA group), Exos<sup>CD47-siPLK1</sup> group (CD47 modified exosomes loaded with PLK1 siRNA group), and Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> group (SP94 and CD47 double-modified exosomes loaded with PLK1 siRNA group) ( $n=5$ ); B: Representative liver macroscopic views of the primary hepatic cancer mice in the 4 groups ( $n=5$ ); C: Survival curves of primary hepatic cancer mice in the 4 groups ( $n=5$ ). PLK1: Polo-like kinase 1; siRNA: Small interfering RNA.

PLK1 与肿瘤的发生、发展有密切关系,在多种癌症如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等组织中高表达<sup>[19]</sup>。He 等<sup>[20]</sup>研究发现,let-7b 靶向 PLK1 通过减弱 PLK1 介导的存活蛋白磷酸化抑制肝细胞癌生长并诱导其凋亡。Cheng 等<sup>[21]</sup>发现,上调的 Setd3 促进了小鼠肝癌发生,但敲低小鼠 PLK1 减少了 Setd3 促进的肿瘤发生,表明抑制 PLK1 的表达可以有效治疗肝癌。Wang 等<sup>[22]</sup>发现,用纳米颗粒将 PLK1 siRNA 递送到肝细胞癌细胞和组织中,可以降低 HepG2 细胞在体内的致瘤性。综上,PLK1 被认为是潜在的治疗肝癌的新靶点。

本研究以肝癌细胞 Hepa1-6 为细胞模型,以不同修饰的外泌体加载 PLK1 siRNA 后处理细胞,检测细胞凋亡水平的变化。流式细胞术实验结果显示,不同修饰的外泌体递送 PLK1 siRNA 至肝癌

细胞都能不同程度地抑制 PLK1 的表达,促进肝癌细胞 Hepa1-6 凋亡,表明抑制 PLK1 的表达可以促进细胞凋亡。修饰后外泌体 Exos<sup>SP94-siPLK1</sup> 组和 Exos<sup>SP94-CD47-siPLK1</sup> 组的细胞凋亡率高于对照组,说明靶向肽 SP94 修饰后外泌体的肝癌靶向性提高,致使 PLK1 siRNA 递送效率提高、肝癌细胞凋亡率增加。CD47 修饰的外泌体可以有效避免被巨噬细胞所吞噬,从而提高了核酸递送的有效性。但本研究以肝癌细胞 Hepa1-6 作为模型,缺少 MPS 的因素,所以在体外细胞学实验中 CD47 修饰外泌体递送核酸与未修饰外泌体递送核酸在检测肝癌细胞凋亡水平上没有明显差异。本研究通过在小鼠体内过表达 *N-Ras* 和 *Akt* 基因并使 2 种基因相互作用,成功诱导了小鼠 PHC。本研究结果证实 SP94 和 CD47 双修饰外泌体在体内可以更好地提高治疗性核酸

PLK1 siRNA 的靶向性和递送效率,有效抑制小鼠结节的生长,提高对肝癌的治疗效果。但目前仍然缺少大规模量产外泌体的技术,探索产生足够量外泌体的新技术将是我们未来的主要研究方向。

综上所述,本研究构建了可以增强肝癌细胞靶向性、降低单核巨噬细胞吞噬作用的工程化外泌体,通过靶向肽 SP94 修饰可以使外泌体精准靶向肝癌细胞,通过 CD47 修饰可以防止外泌体被巨噬细胞吞噬,SP94 和 CD47 双修饰外泌体加载 PLK1 siRNA 对小鼠 PHC 具有良好的治疗效果。此设计可以更好地发挥 2 种修饰方法组合的叠加效果,为肝癌的精准治疗及增强药物疗效提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] 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(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188314. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188314.
- [3] 范芯伽,刘铭佳,王庆,等.原发性肝癌的发病机制及治疗进展[J]. *肝脏*, 2023, 28(4): 391-392. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1704.2023.04.001.
- [4] 曹正聪,王炜中,贾博,等.靶向脑胶质瘤的 Ang 外泌体递送系统的构建[J]. *山西医科大学学报*, 2023, 54(1): 24-31. DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2023.01.004.
- [5] BARILE L, VASSALLI G. Exosomes: therapy delivery tools and biomarkers of diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 63-78. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.020.
- [6] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.
- [7] TOITA R, MURATA M, ABE K, et al. A nanocarrier based on a genetically engineered protein cage to deliver doxorubicin to human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(67): 7442-7444. DOI: 10.1039/C3CC44508A.
- [8] JIANG Z, SUN H, YU J, et al. Targeting CD47 for cancer immunotherapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 180. DOI: 10.1186/s13045-021-01197-w.
- [9] ZHAO H, SONG S, MA J, et al. CD47 as a promising therapeutic target in oncology[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 757480. DOI: 10.3389/fimmu.2022.757480.
- [10] LIANG Y, DUAN L, LU J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-3195. DOI: 10.7150/thno.52570.
- [11] CHEN R, XU X, TAO Y, et al. Exosomes in hepatocellular carcinoma: a new horizon[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 1. DOI: 10.1186/s12964-018-0315-1.
- [12] NIE X, LIU Y, LI M, et al. SP94 peptide-functionalized PEG-PLGA nanoparticle loading with cryptotanshinone for targeting therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21(4): 124. DOI: 10.1208/s12249-020-01655-7.
- [13] 冯东林,曹正聪,何柳,等.外泌体包裹GDF15 siRNA 靶向治疗肝癌的研究[J]. *山西医科大学学报*, 2023, 54(5): 565-572. DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2023.05.001.
- [14] ZHENG Y, JIA R, LI J, et al. Curcumin- and resveratrol-co-loaded nanoparticles in synergistic treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 339. DOI: 10.1186/s12951-022-01554-y.
- [15] JAISWAL S, JAMIESON C H M, PANG W W, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis[J]. *Cell*, 2009, 138(2): 271-285. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046.
- [16] OLDENBORG P A, ZHELEZNYAK A, FANG Y F, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells[J]. *Science*, 2000, 288(5473): 2051-2054. DOI: 10.1126/science.288.5473.2051.
- [17] MATLUNG H L, SZILAGYI K, BARCLAY N A, et al. The CD47-SIRP $\alpha$  signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer[J]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 145-164. DOI: 10.1111/imr.12527.
- [18] DU J, WAN Z, WANG C, et al. Designer exosomes for targeted and efficient ferroptosis induction in cancer via chemo-photodynamic therapy[J]. *Theranostics*, 2021, 11(17): 8185-8196. DOI: 10.7150/thno.59121.
- [19] ILMA S, NEHA B, MUSTAFA H G, et al. Polo-like kinase 1 as an emerging drug target: structure, function and therapeutic implications[J]. *J Drug Target*, 2021, 29(2): 168-184. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1818760.
- [20] HE Z, DENG W, JIANG B, et al. Hsa-let-7b inhibits cell proliferation by targeting PLK1 in HCC[J]. *Gene*, 2018, 673: 46-55. DOI: 10.1016/j.gene.2018.06.047.
- [21] CHENG M, YANG Q, LIU Y, et al. SETD3 methyltransferase regulates PLK1 expression to promote *in situ* hepatic carcinogenesis[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 882202. DOI: 10.3389/fonc.2022.882202.
- [22] WANG D, CHANG R, WANG G, et al. Polo-like kinase 1-targeting chitosan nanoparticles suppress the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(7): 948-954. DOI: 10.2174/1871520616666160926111911.