

共载阿霉素与小干扰RNA的脂质介孔硅纳米粒的制备表征及抗多药耐药肿瘤细胞研究^Δ

张梦玮^{1,2*}, 杨硕晔^{1,2#}, 杨亚南^{1,2}, 王振威^{1,2}, 屈凌波^{1,3} (1. 河南工业大学生物工程学院, 郑州 450001; 2. 郑州市生物医药功能分子重点实验室, 郑州 450001; 3. 郑州大学化学与分子工程学院, 郑州 450001)

中图分类号 R944.9;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)23-2880-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.23.12



摘要 目的 制备共载阿霉素(DOX)与小干扰RNA(siRNA)的脂质介孔硅纳米粒(CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA),并对其表征及抗多药耐药肿瘤细胞研究。方法 先以介孔硅纳米粒(MSNs)为基础制备MSN₂-SS-NH₂@DOX,并以阳离子脂质体(CLs)对其包覆制得CLMSNs-SS-NH₂@DOX,进一步负载siRNA即得CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA。测定该制剂粒径及Zeta电位,观察其微观形态并进行差示扫描量热分析、X射线衍射分析、红外光谱分析、物理吸附分析;测定该制剂在不同pH条件下(pH5.0、pH7.4)及不同谷胱甘肽浓度下(0、2、5、10 mmol/L)DOX的体外释放度;考察该制剂对耐DOX型乳腺癌细胞MCF-7/ADR摄取、迁移、凋亡、周期及P-糖蛋白(P-gp)表达的影响。结果 CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA结构清晰,表面脂膜层明显,粒径为(197.63±3.75)nm,Zeta电位为(20.64±0.98)mV,理化性质良好。体外释放结果显示,CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA具有良好的pH/还原双重响应释药特性。细胞实验结果显示,经CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA干预后,MCF-7/ADR细胞的药物摄取显著增强,迁移率和P-gp表达水平均显著降低,总凋亡比例和G₀/G₁期所占比例均显著升高($P<0.05$)。结论 本研究成功制备同时负载DOX和siRNA的CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA;该制剂理化性质良好,具有pH/还原双重响应释药特性,且可通过下调P-gp表达逆转MCF-7/ADR细胞多药耐药。

关键词 介孔硅;小干扰RNA;阿霉素;抗肿瘤;多药耐药

Preparation and characterization of doxorubicin and siRNA co-loaded CLMSNs and study on anti-multidrug-resistant tumor cells

ZHANG Mengwei^{1,2}, YANG Shuoye^{1,2}, YANG Yanan^{1,2}, WANG Zhenwei^{1,2}, QU Lingbo^{1,3} (1. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2. Zhengzhou Key Lab of Biomedical Functional Molecules, Zhengzhou 450001, China; 3. College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare lipid-coated mesoporous silica nanoparticles (CLMSNs) co-loaded with doxorubicin (DOX) and siRNA (CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA), and to characterize it and study anti-multidrug-resistant tumor cells. **METHODS** MSN₂-SS-NH₂@DOX was prepared on the basis of mesoporous silica (MSN₂), covered with cationic liposomes (CLs) to synthesize CLMSNs-SS-NH₂@DOX, and then obtain CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA by co-loading with siRNA. The particle size and Zeta potential of the preparation were determined, and its micromorphology was observed; differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, infrared spectroscopy and physical adsorption analysis were conducted. The *in vitro* release of DOX from the preparation was determined under different pH conditions (pH5.0, pH7.4) and different glutathione concentrations (0, 2, 5, 10 mmol/L). The effects of this preparation on the uptake, migration, apoptosis, cycle and P-glycoprotein (P-gp) expression of MCF-7/ADR in DOX-resistant breast cancer cells were investigated. **RESULTS** CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA had a clear core-shell structure, obvious lipid membrane layer, particle size of (197.63±3.75) nm, Zeta potential of (20.64±0.98) mV, and with good physical and chemical properties. *In vitro* release results showed that CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA possessed good pH/reduction double-response. The results of cell experiment showed that after intervened with CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA, the fluorescence intensity of MCF-7/ADR cells was significantly enhanced, the migration rate and P-gp expression level were significantly reduced, while total proportion of apoptosis and that of G₀/G₁ phase were significantly increased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** In this study,

DOX and siRNA co-loaded CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA is prepared successfully, which has good physical and chemical properties, pH/reduction double-response properties. It can reverse the multidrug resistance of MCF-7/ADR cells by down-regulation of P-gp expression.

KEYWORDS mesoporous silica; siRNA; doxorubicin; anti-tumor; multidrug resistance

^Δ 基金项目 河南省高等学校青年骨干教师培养计划(No. 2020GGJS090);河南工业大学青年骨干教师培育计划(No.21420075)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:新型抗肿瘤复合纳米药物递送系统。E-mail:zmv15649858235@163.com

通信作者 副教授,硕士生导师。研究方向:功能性纳米材料与药物递送系统。E-mail:yangshuoyecpu@163.com

对于乳腺癌等恶性肿瘤,以阿霉素(doxorubicin, DOX)为代表的化学药治疗仍是目前临床上常用的治疗手段,但随着药物的反复使用,多药耐药(multiple drug resistance, MDR)已成为化疗失败的一个重要诱因。MDR1基因过表达是引发MDR的主要原因,其编码的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)介导的药物外排是经典的耐药机制^[1-2]。纳米载体可通过高渗透滞留效应积聚于肿瘤部位,且具有功能化程度高、生物相容性好等优点^[3]。根据肿瘤微环境特性开发出的刺激响应型纳米载药系统,当其受到如微酸性、高水平谷胱甘肽(glutathione, GSH)等微环境刺激时会迅速进入活化状态,载体结构发生改变,可在抑制MDR型肿瘤P-gp表达的同时,实现化疗药物的持续控释,从而协同增强对MDR型肿瘤的治疗效果^[4-5]。

肿瘤细胞内通常呈现微酸性,且GSH水平为正常组织细胞的3倍以上^[6],故可利用还原性差异设计出对高水平GSH敏感的还原响应型纳米载体。氧化还原反应会促进纳米载体的降解,有效降低材料对细胞的毒性,常见的还原敏感键主要有二硫键(-SS-)、二硒键等,其中-SS-和GSH会发生氧化还原反应,从而导致自身被还原为巯基,使载体降解而释放化疗药物,进而在肿瘤组织部位的靶向控释^[7-8]。基于此,本文以介孔硅纳米粒(mesoporous silica nanoparticles, MSNs)为基础制备MSNs-SS-NH₂@DOX,并以阳离子脂质体(cationic liposomes, CLs)对其包覆制得CLMSNs-SS-NH₂@DOX,进一步负载小干扰RNA(siRNA,可下调耐药细胞中P-gp的表达,有效逆转肿瘤MDR,提高抗肿瘤效果^[9])得到CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA复合载药系统;再以耐DOX型乳腺癌细胞MCF-7/ADR为研究对象,考察该制剂抗MDR型肿瘤细胞的作用,以期为其开发及后续临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有JEM-2100F型透射电子显微镜(日本Hitachi公司),Nano ZS90s型纳米粒度仪(英国Malvern公司),ASAP 2460型物理吸附仪(美国麦克公司),Nicolet IS10型傅里叶红外光谱仪、Attune NxT型流式细胞仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),Axio observer3型荧光显微镜(德国Zeiss公司),DSC214型差示扫描量热仪(德国耐驰公司),D8型X射线衍射仪(德国布鲁克公司)。

1.2 主要药品与试剂

DOX原料药(批号N1111A,含量>98%)、DOX对照品(批号N1111AS,含量>99%)购自大连美仑生物技术有限公司;十六烷基三甲基溴化铵、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、乙二酸酐、二乙醇胺、硅酸四乙酯、异硫氰酸荧光素(FITC)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;二油酰基三甲胺丙烷甲基硫酸盐

(DOTAP)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)均购自美国Avanti公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司;兔源P-gp一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗购自美国LI-COR公司;siRNA由宁波康贝生化有限公司合成。

1.3 细胞

耐DOX型乳腺癌MCF-7/ADR细胞由河南工业大学生物工程学院细胞功能调控创新实验室提供。

2 方法与结果

2.1 CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的制备

采用模板剂法^[10]制备MSNs。取100 mg MSNs置于10 mL无水乙醇中,超声(功率50 W,频率40 kHz,下同)20 min后加入2 mL APTES,并于60 °C反应20 h,离心收集沉淀,真空干燥即得MSNs-NH₂。向100 mg MSNs-NH₂中加入10 mL丙酮,30 min后逐滴加入5 mL含有1.5 mol/L乙二酸酐的丙酮溶液,室温下搅拌24 h,所得沉淀即为MSNs-COOH。向100 mg MSNs-COOH中加入20 mL磷酸盐缓冲液(pH5.0)、75 mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐、75 mg N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌活化2 h后,向其中加入1 g半胱氨酸盐酸盐,在氮气保护条件下于35 °C搅拌24 h,离心收集沉淀即得MSNs-SS-NH₂。取MSNs-SS-NH₂与DOX适量(两者质量比为2:1),搅拌24 h后即得MSNs-SS-NH₂@DOX。

取100 mg DOTAP、50 mg胆固醇、30 mg DPPG、30 mg DSPC、8 mL氯仿,超声溶解后缓慢旋蒸成膜,即得CLs。取CLs与DOX适量(两者质量比为2:1)超声融合5 min,即得CLs@DOX。将CLs分别与上述所得MSNs-SS-NH₂、MSNs-SS-NH₂@DOX溶液混合并超声后,即得CLMSNs-SS-NH₂、CLMSNs-SS-NH₂@DOX。将干粉状siRNA离心10 min后溶于375 μL DEPC水中,然后与CLMSNs-SS-NH₂@DOX涡旋混匀,即得CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA(现用现配),并以50 nmol为siRNA的最佳负载量。

2.2 CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的表征

2.2.1 粒径及Zeta电位分析 将适量MSNs-SS-NH₂@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH₂@DOX和CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA分散于去离子水中超声均匀,测定其粒径和Zeta电位。结果显示,MSNs-SS-NH₂@DOX的粒径为(153.73±15.6) nm, Zeta电位为(35.13±0.73) mV,多分散性指数(polydispersity index, PDI)良好。因CLs@DOX表面存在大量正电荷且粒径[(168.77±3.84) nm]较MSNs-SS-NH₂@DOX有所增大,故经CLs包埋后CLMSNs-SS-NH₂@DOX的粒径[(160.03±7.13) nm]增大且Zeta电位增大至(104.83±1.86) mV,这说明CLs可有效包覆于MSNs-SS-NH₂表面。进一步负载siRNA后,CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的粒径[(197.63±3.75) nm]增大,且由于核酸呈

负电性,故使其Zeta电位略有降低,这提示CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA可与静息状态下呈负电性的细胞相互吸引,以提高细胞摄取效率。

2.2.2 微观形态分析 分别取MSNs-SS-NH₂@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH₂@DOX和CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA适量分散于95%乙醇中,然后分别滴于铜网上,经充分干燥后,采用透射电子显微镜进行观察。结果显示,MSNs-SS-NH₂@DOX的介孔结构清晰,粒径均一,分散性较好;其经CLs包覆后,所得CLMSNs-SS-NH₂@DOX表面出现一层透明脂膜;进一步负载siRNA后,CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA结构清晰,表面脂膜层明显,这说明该纳米载体构建成功。结果见图1。

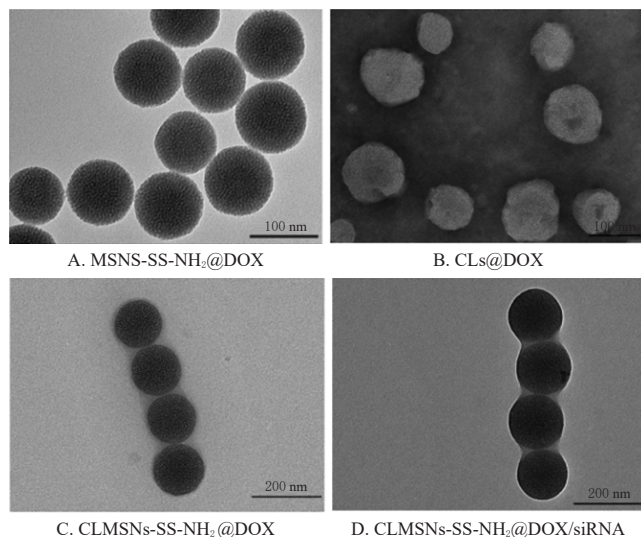
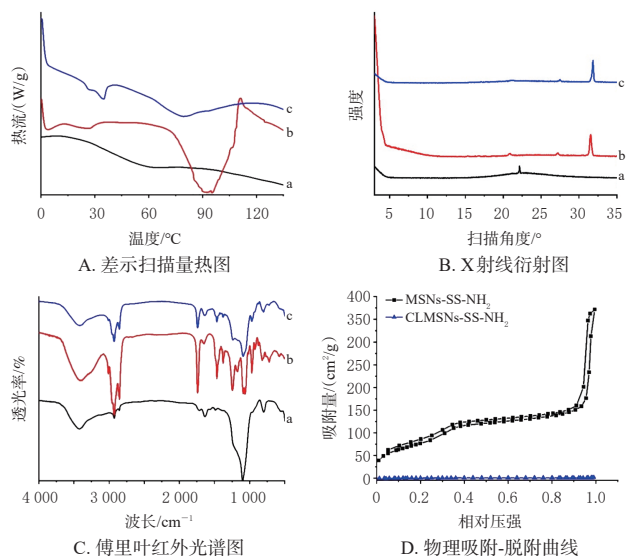


图1 不同修饰型纳米载体的透射电子显微镜

2.2.3 差示扫描量热分析 分别取MSNs-SS-NH₂@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA适量置于差示扫描量热仪中,设置升温速率为7 °C/min,在N₂保护条件下检测各样品在-50~300 °C范围内的吸放热峰形。结果显示,MSNs-SS-NH₂@DOX在60 °C处有一明显吸热峰,表明其在该温度下可由不定形状态转变为结晶态。CLs@DOX在90 °C处有一明显吸热峰,表明其可由固态转变为凝胶态。MSNs-SS-NH₂@DOX经CLs包埋后相变温度约为75 °C,相较于原始相变温度有所提高,表明以CLs包埋可提高MSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的热稳定性。结果见图2A。

2.2.4 X射线衍射分析 分别取MSNs-SS-NH₂@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的干燥粉末适量,置于X射线衍射光谱仪中检测。结果显示,MSNs-SS-NH₂@DOX在22°处有一个特征吸收峰,CLs@DOX在32°处有一个特征吸收峰,CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA在22°和32°处均有特征吸收峰,这表明CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA已成功构建。结果见图2B。

2.2.5 红外光谱分析 分别取MSNs-SS-NH₂@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的干燥粉



a: MSNs-SS-NH₂@DOX; b: CLs@DOX; c: CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA

DOX/siRNA

图2 不同修饰型纳米载体的差示扫描量热图、X射线衍射图、傅里叶红外光谱图及物理吸附-脱附曲线

末适量与溴化钾粉末混合,充分研磨均匀后,置于傅里叶红外光谱仪上检测。结果显示,MSNs-SS-NH₂@DOX在1 680 cm⁻¹处出现一SS-特征吸收峰,这表明一SS-成功连接至MSNs表面。CLs在2 930、2 850 cm⁻¹处均出现长链脂肪酸C-H伸缩振动峰。经CLs包埋后,CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA在1 240 cm⁻¹处的P=O伸缩振动峰变宽,且位于3 500 cm⁻¹处的硅醇基团的伸缩峰有所减弱,这表明CLs可包覆于MSNs-SS-NH₂@DOX表面。结果见图2C。

2.2.6 物理吸附分析 分别取MSNs-SS-NH₂、CLMSNs-SS-NH₂的干燥粉末适量,于氮气环境中置于物理吸附仪上进行检测。结果显示,MSNs-SS-NH₂的物理吸附-脱附曲线下面积最大。经CLs包覆后,CLMSNs-SS-NH₂的物理吸附-脱附曲线下面积减小,这表明CLs已成功包裹于MSNs-SS-NH₂表面。结果见图2D。

2.3 CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的体外释放度测定

采用高效液相色谱法^[11]测定CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA在不同pH条件下(pH5.0、pH7.4)及不同GSH浓度下(0、2、5、10 mmol/L)DOX的体外释放度。结果显示,在同一pH条件下,CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA中DOX的释放度与GSH的浓度成正比,且在pH5.0条件下DOX的释放度均高于pH7.4条件下,这表明CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA具有良好的pH/还原双重响应释药特性。结果见图3。

2.4 CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的细胞实验考察

2.4.1 细胞摄取的考察 将对数生长期的MCF-7/ADR细胞以1×10⁴个/孔接种于12孔板中,于37 °C、5%CO₂条件下培养24 h后,弃去培养基,然后分为DOX组、MSNs-SS-NH₂@DOX组、CLs@DOX组、CLMSNs-SS-NH₂@DOX组和CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组,各

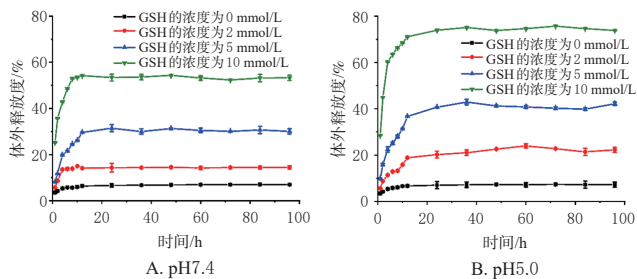


图3 不同pH条件下CLMSNs-SS-NH₂@DOX中DOX的体外释放度

组DOX的含量均为5 μg/mL(浓度根据前期预实验结果设置)。每组设3个复孔。各组加入相应含药培养基避光孵育12 h,以10 μg/mL Hoechst33342染色30 min,再以磷酸盐缓冲液洗涤2~3次后,于倒置荧光显微镜下观察细胞的摄取情况,并采用Image J 1.48v软件对DOX的荧光强度进行定量分析。采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。结果显示,与DOX组(荧光强度为0)比较,其余各组细胞荧光强度(分别为 27.7 ± 1.7 、 31.2 ± 1.8 、 $159.7 \pm$

10.3、 193.7 ± 7.6)均显著增强($P < 0.05$),且CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组细胞荧光强度最强,这提示CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA的介导入胞能力最强。结果见图4。

2.4.2 细胞迁移的考察 将MCF-7/ADR细胞以 5×10^3 个/孔接种于24孔板中,分为对照组、DOX组、MSNs-SS-NH₂@DOX组、CLs@DOX组、CLMSNs-SS-NH₂@DOX组、CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组,各组DOX的含量均为5 μg/mL。每组设3个复孔。各组加入相应含药培养基后,用200 μL移液管尖划过各孔孔底形成垂直伤口,采用显微镜观察培养0 h和24 h时的细胞迁移情况。结果显示,培养24 h后,对照组划痕明显变窄,MCF-7/ADR细胞的迁移率为 $(35.0 \pm 0.56)\%$,表明MCF-7/ADR细胞具有较强的迁移能力,其余各组MCF-7/ADR细胞的迁移率[分别为 $(20.0 \pm 0.45)\%$ 、 $(21.30 \pm 0.72)\%$ 、 $(18.00 \pm 0.23)\%$ 、 $(15.80 \pm 0.42)\%$ 、 $(8.00 \pm 0.34)\%$]较对照组均显著降低($P < 0.05$),且CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组细胞迁移率最低,表明CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA可显著抑制MCF-7/ADR细胞迁移。结果见图5。

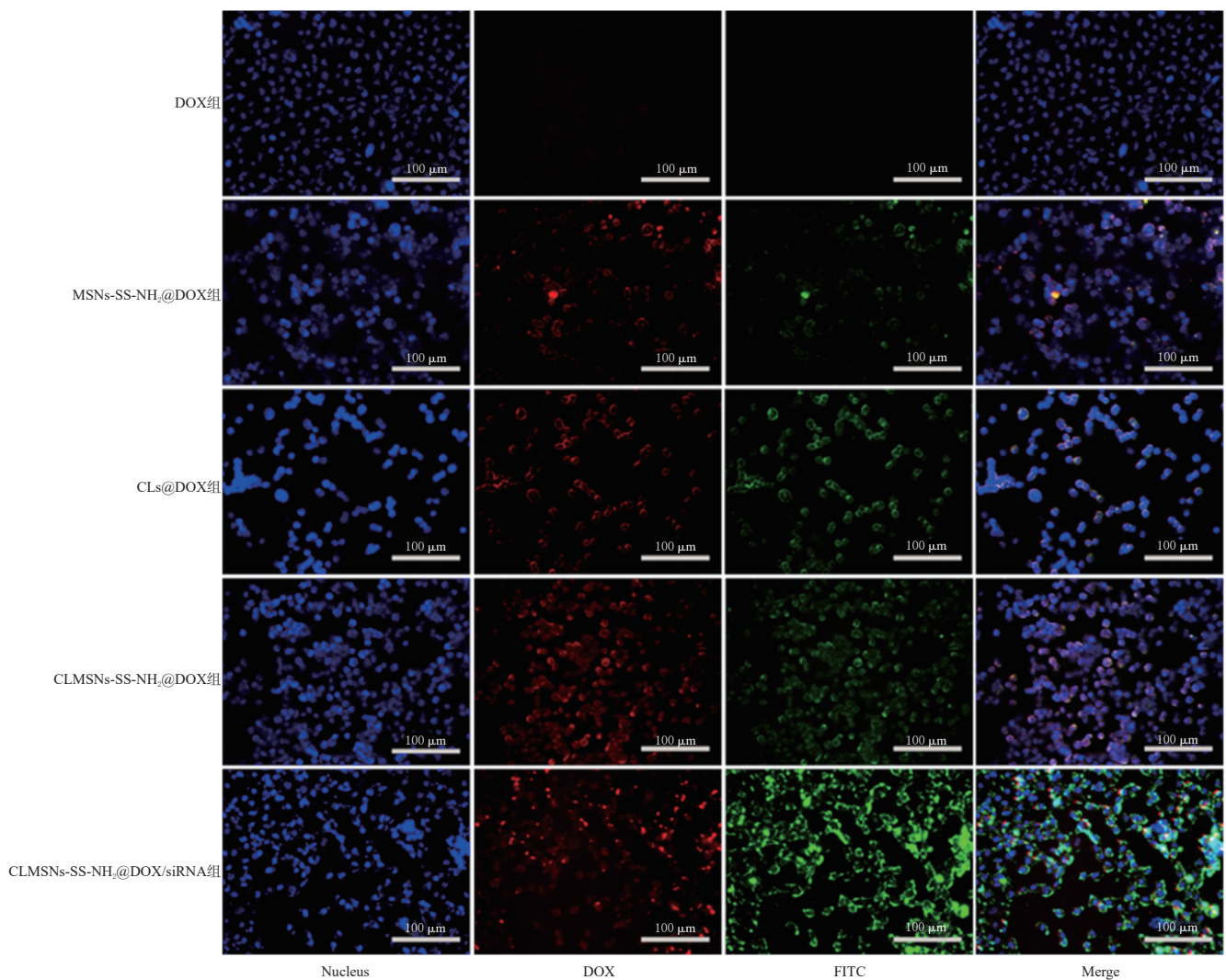


图4 各组MCF-7/ADR细胞摄取情况的荧光显微镜图

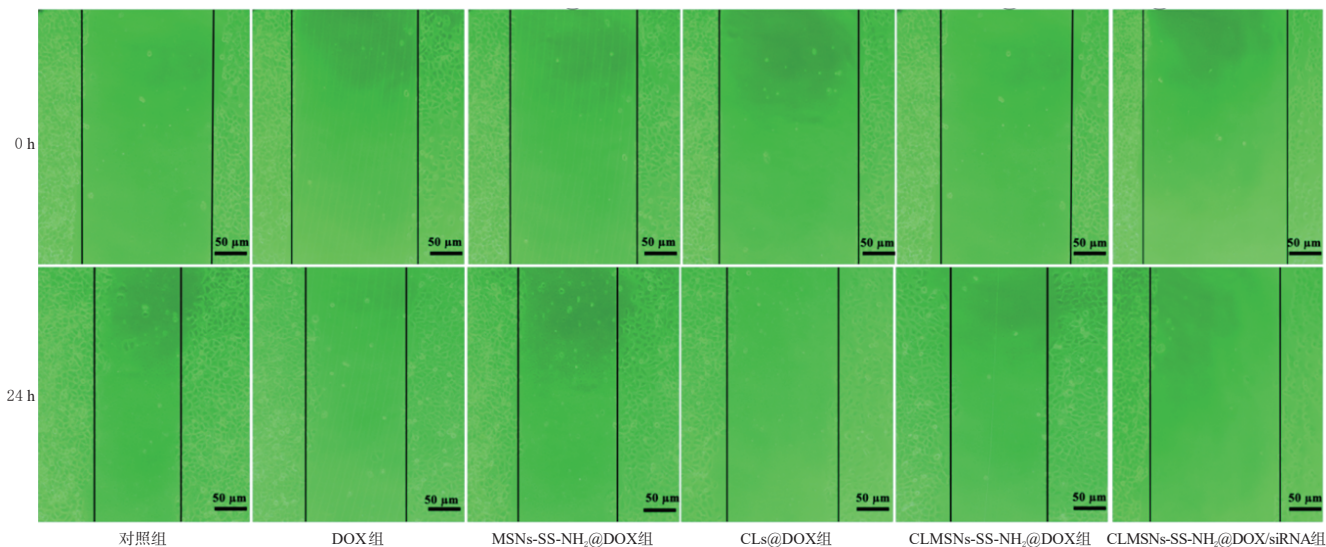


图5 各组MCF-7/ADR细胞的迁移情况

2.4.3 细胞凋亡的考察 将MCF-7/ADR细胞以 2×10^4 个/孔接种于6孔板,按“2.4.2”项下方法分组与给药,每组设3个复孔。继续培养24 h后收集细胞沉淀,加入500 μ L结合液重悬均匀,分别加入5 μ L Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI)染色液,室温孵育10 min后,采用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。结果显示,培养24 h后,对照组MCF-7/ADR细胞的总凋亡比例为 $(10.19 \pm 0.56)\%$,其余各组MCF-7/ADR细胞的总凋亡比例[分别为 $(18.84 \pm 0.25)\%$ 、 $(18.84 \pm 0.45)\%$ 、 $(24.86 \pm 0.75)\%$ 、 $(30.55 \pm 1.08)\%$ 、 $(40.90 \pm 0.78)\%$]较对照组均显著升高($P < 0.05$),且CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组细胞总凋亡比例最高,表明CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA可促进MCF-7/ADR细胞凋亡。结果见图6。

2.4.4 细胞周期的考察 将MCF-7/ADR细胞以 2×10^4 个/孔接种于6孔板中,按“2.4.2”项下方法分组与给药,每组设3个复孔。继续培养24 h后收集细胞沉淀,以磷酸盐缓冲液洗涤1~2次后,于4 $^{\circ}$ C条件下以1 mL 75%乙醇固定过夜;离心弃上清液,以磷酸盐缓冲液洗涤2次,加入500 μ L PI染色液,于37 $^{\circ}$ C避光培养30 min后,采用流式细胞仪检测各组细胞周期。结果显示,培养24 h后,对照组MCF-7/ADR细胞G₀/G₁期所占比例为 $(21.00 \pm 0.65)\%$,其余各组MCF-7/ADR细胞G₀/G₁期所占比例[分别为 $(35.40 \pm 1.12)\%$ 、 $(37.85 \pm 0.95)\%$ 、 $(42.33 \pm 1.37)\%$ 、 $(45.50 \pm 0.57)\%$ 、 $(63.90 \pm 2.37)\%$]较对照组均显著升高($P < 0.05$),且CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组细胞G₀/G₁期所占比例最高,表明CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA可将MCF-7/ADR细胞的生长周期明显阻滞于G₀/G₁期,以增强逆转肿瘤细胞MDR的效果。

2.4.5 细胞中P-gp表达的考察 将MCF-7/ADR细胞以 2×10^4 个/孔接种于6孔板中,按“2.4.2”项下方法分组与给药,每组设3个复孔。继续培养24 h后收集细胞沉淀,

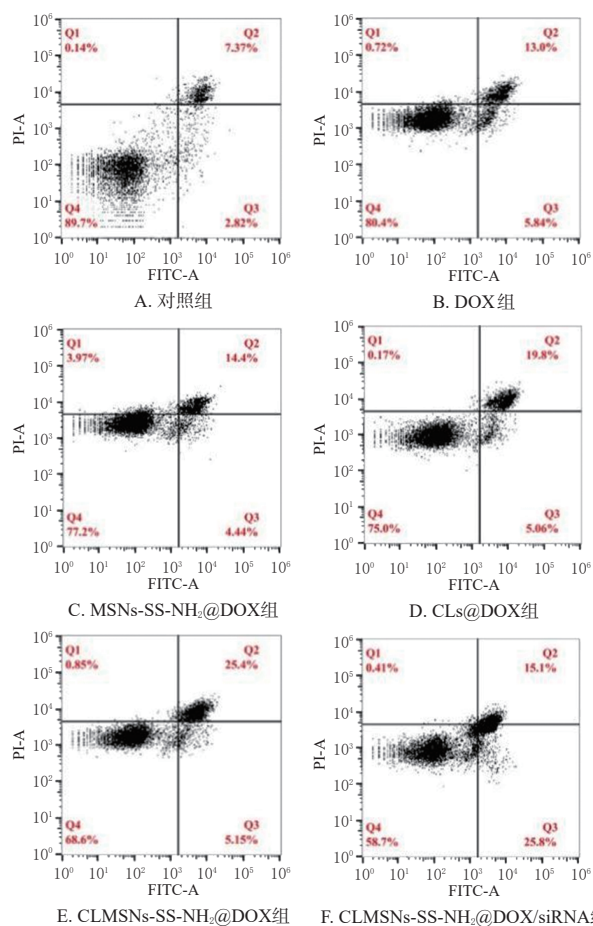
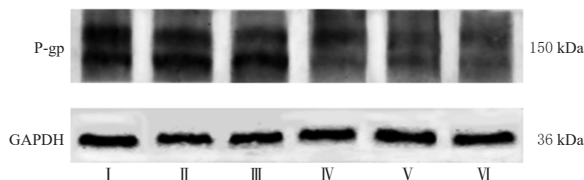


图6 各组MCF-7/ADR细胞的凋亡流式细胞图

置于冰上裂解15 min,提取总蛋白。蛋白经变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,室温封闭,加入P-gp抗体(稀释度为1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育18 h;常温闭光孵育二抗(稀释度为1:15 000)1 h,洗膜;采用双色红外激光成像系统显色,以GAPDH作为内参,采用Image J 1.48v软件分析目的蛋白灰度值,以目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达

水平。结果显示,与对照组(灰度值比值为1)和DOX组(灰度值比值为 0.93 ± 0.08)比较,其余各组MCF-7/ADR细胞中P-gp表达水平(灰度值分别为 0.82 ± 0.03 、 0.75 ± 0.05 、 0.45 ± 0.03 、 0.39 ± 0.02)均显著降低($P < 0.05$),且CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组MCF-7/ADR细胞中P-gp表达水平最低,表明该制剂递送的外源siRNA可被有效内化,从而下调P-gp的表达,逆转MCF-7/ADR细胞MDR。结果见图7。



I : 对照组; II : DOX组; III : MSNs-SS-NH₂@DOX组; IV : CLs@DOX组; V : CLMSNs-SS-NH₂@DOX组; VI : CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA组

图7 各组MCF-7/ADR细胞中P-gp蛋白表达的电泳图

3 讨论

MSNs-SS-NH₂具有中空介孔结构及较大的比表面积,以CLs对其包覆后,制得的CLMSNs-SS-NH₂复合载体具有更好的生物相容性,可提高药物装载量,并使药物积聚于肿瘤部位释放。另外,由于CLs带正电荷可有效将呈弱负电性的siRNA以静电吸附方式荷载^[12-13],从而制得同时负载DOX和siRNA的CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA,该制剂理化性质良好,且具有良好的pH/还原双重响应释药特性。这可能是由于在酸性环境中该制剂脂膜层更容易被破坏,进一步在肿瘤微环境中促使-SS-断裂,进而使DOX在肿瘤细胞内积聚释放^[14-16]。细胞实验结果显示,CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA可将DOX和siRNA有效递送至MCF-7/ADR细胞内,进而抑制细胞迁移增殖,促进细胞凋亡,阻滞细胞于G₀/G₁期,并下调P-gp的表达以逆转肿瘤细胞MDR。

综上所述,本研究成功制备同时负载DOX和siRNA的CLMSNs-SS-NH₂@DOX/siRNA;该制剂理化性质良好,具有pH/还原双重响应释药特性,且可通过下调P-gp表达逆转MCF-7/ADR细胞MDR。

参考文献

[1] 张滨旋,于涛. 纳米药物递送系统协同光热疗法治疗肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 肿瘤, 2020, 40(4): 299-304.
 [2] YUAN Y, LIU J, YU X N, et al. Tumor-targeting pH/redox dual-responsive nanosystem epigenetically reverses cancer drug resistance by co-delivering doxorubicin and GCN₅ siRNA[J]. Acta Biomater, 2021, 135: 556-566.
 [3] TORCHILIN V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(3): 131-135.
 [4] 王诚溟,王鹤樵,马梦超,等. 刺激响应型纳米载体用于

克服肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 中国药师, 2021, 24(9): 1712-1716.

[5] ZHANG M, LIU E G, CUI Y N, et al. Nanotechnology-based combination therapy for overcoming multidrug-resistant cancer[J]. Cancer Biol Med, 2017, 14(3): 212-227.
 [6] GUO X S, CHENG Y, ZHAO X T, et al. Advances in redox-responsive drug delivery systems of tumor microenvironment[J]. J Nanobiotechnol, 2018, 16(1): 74.
 [7] PARIS J L, VALLET-REGÍ M. Mesoporous silica nanoparticles for co-delivery of drugs and nucleic acids in oncology: a review[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(6): E526.
 [8] YANG S Y, SONG S B, HAN K S, et al. Characterization, *in vitro* evaluation and comparative study on the cellular internalization of mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers[J]. Microporous Mesoporous Mater, 2019, 284: 212-224.
 [9] GUO N N, GAO C, LIU J, et al. Reversal of ovarian cancer multidrug resistance by a combination of LAH4-L1-siMDR1 nano complexes with chemotherapeutics[J]. Mol Pharm, 2018, 15(5): 1853-1861.
 [10] 魏亚青,吕江维,任君刚,等. 介孔硅纳米材料的制备及其在药物缓控释中的应用进展[J]. 化学与生物工程, 2019, 36(11): 1-7.
 [11] CHEN C, SUN W, WANG X L, et al. pH-responsive nanoreservoirs based on hyaluronic acid end-capped mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 1106-1115.
 [12] WEN C J, SUNG C T, ALJUFFALI I A, et al. Nanocomposite liposomes containing quantum dots and anticancer drugs for bioimaging and therapeutic delivery: a comparison of cationic, PEGylated and deformable liposomes[J]. Nanotechnology, 2013, 24(32): 325101.
 [13] LIU X S, SITU A, KANG Y N, et al. Irinotecan delivery by lipid-coated mesoporous silica nanoparticles shows improved efficacy and safety over liposomes for pancreatic cancer[J]. ACS Nano, 2016, 10(2): 2702-2715.
 [14] JEONG U H, GARRIPELLI V K, JO S, et al. Potential of pH-sensitive polymer-anchored cationic liposomes for combinatorial anticancer therapy with doxorubicin and siRNA[J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2014, 24(1): 27-32.
 [15] PAN Q S, CHEN T T, NIE C P, et al. *In situ* synthesis of ultrathin ZIF-8 film-coated MSNs for codelivering bcl 2 siRNA and doxorubicin to enhance chemotherapeutic efficacy in drug-resistant cancer cells[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(39): 33070-33077.
 [16] 全瑶. 透明质酸和叶酸双靶头修饰阳离子脂质体递送siRNA-Bcl-2治疗宫颈癌的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
 (收稿日期: 2022-06-11 修回日期: 2022-10-17)
 (编辑: 唐晓莲)