

MiRNA-126硬脂胺阳离子脂质体递送系统的构建及细胞摄取考察

唐永瑜¹, 邵诗蝶², 吴兴杰², 陈英², 冯发进³, 沈祥春², 邹弢^{4*}, 陶玲^{2*}

1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州医科大学药学院, 贵州省特色天然药物资源高效利用工程中心, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价重点实验室, 贵州医科大学-贵阳市联合重点实验室, 天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州省生物技术研究开发基地有限公司, 贵州 贵阳 551400

4. 北京积水潭医院贵州医院, 贵州 贵阳 550007

摘要: 目的 基于阳离子脂质体制备血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 单克隆抗体 (VCAM-1 mAb) 修饰的负载微小RNA-126 (miR-126) 的靶向递送系统, 并初步评价其稳定性、细胞毒性及细胞摄取。方法 采用薄膜分散-挤出法制备硬脂胺阳离子脂质体 (SCL), 以脂质体粒径、电位为指标, 单因素法考察大豆磷脂与胆固醇质量比、硬脂胺用量、无水乙醇的用量、成膜温度、水合介质用量、水合制备温度、水合制备时间; 并考察其稀释稳定性及储存稳定性。采用琼脂糖凝胶阻滞实验考察SCL对miR-126的负载能力以及对酶解的保护效果。利用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) /N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 交联法制备VCAM-1 mAb修饰的SCL (Va-SCL), 并通过SDS-PAGE法考察VCAM-1 mAb与SCL的偶联效率。MTT法考察其对内皮细胞 (HUVECs) 的毒性, 流式细胞术和荧光显微镜考察正常HUVECs及LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激后HUVECs对miR-126、SCL/miR-126、Va-SCL/miR-126的摄取情况。结果 精密称量大豆磷脂 120 mg、胆固醇 40 mg、硬脂胺 10 mg于茄形瓶中, 加入 5 mL 无水乙醇, 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声 (功率 300 W、频率 40 kHz) 使其充分溶解, 肉眼观察无可见颗粒物或者不溶物, 水浴减压蒸发除去有机溶剂, 在瓶壁上形成均匀透明的脂质薄膜; 加入 12 mL DEPC水作为水合介质, 水浴超声 30 min, 挤出器过孔径为 200 nm 聚碳酸酯膜 7 次, 取续滤液, 得 SCL, 稳定性良好。当氮磷比为 10:1 时, SCL 能够有效负载 miR-126; miR-126 通过静电吸附于 SCL 表面, SCL 一定程度上保护 miR-126 不被酶解。SDS-PAGE 结果显示, VCAM-1 mAb 与 SCL 成功偶联, 接枝率为 (53.2 $\pm$ 7.6) %。MTT 结果显示, Va-SCL、Va-SCL/miR-126 对 HUVECs 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 17.38、71.61 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, SCL、SCL/miR-126 的 IC_{50} 值分别为 81.03、97.79 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。荧光显微镜及流式结果均显示 Va-SCL/miR-126 的细胞摄取效果更为明显。结论 成功制备了 Va-SCL/miR-126, 能明显增加 miR-126 的细胞摄取。

关键词: 阳离子脂质体; miR-126; 薄膜分散法; EDC/NHS法; 血管细胞黏附分子-1 单克隆抗体修饰

中图分类号: R943.42; R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 09-2006-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.007

Construction of miRNA-126 stearylamine cationic liposome delivery system and cellular uptake investigation

TANG Yongyu¹, TAI Shidie², WU Xingjie², CHEN Ying², FENG Fajin³, SHEN Xiangchun², ZOU Tao⁴, TAO Ling²

1. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guizhou Province Specialized Natural Medicine Resource Efficient Utilization Engineering Center, Key Laboratory of Pharmacology and Pharmacological Evaluation of Natural Medicines in Guizhou Higher Education Institutions, Guizhou Medical University-Guiyang Joint Key Laboratory, Key Laboratory of Utilization of Natural Medicine Resources, Guiyang 550025, China

收稿日期: 2024-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82260827 和 U1812403-4-4); 贵州省自然科学基金会 ([2020]1Z069); 贵州医科大学国家自然科学基金培育项目 (No.20NSP050); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2020]4Y240 号); 贵州省高层次人才十层次人才黔科合平台人才 (GCC [2023]048); 黔科合中引地 ([2023]003)

第一作者: 唐永瑜, 硕士, 主要从事药物递送系统研究, 医院药学。E-mail: tangyy980926@163.com

***共同通信作者:** 陶玲, 硕士, 教授, 主要从事药物递送系统研究。E-mail: 649511230@qq.com

邹弢, 硕士, 药剂师, 副主任药师, 主要从事医院药学、临床药学研究。E-mail: liyangfly@sohu.com

3. Guizhou Biotechnology Research and Development Base Co., Ltd., Guiyang 551400, China

4. Beijing Jishui Tan Hospital Guizhou Hospital, Guiyang 550007, China.

Abstract: Objective To prepare a VCAM-1 monoclonal antibody (VCAM-1 mAb) modified miR-126 targeted delivery system based on cationic liposomes, and to preliminarily evaluate its stability, cytotoxicity and cellular uptake. **Methods** SCL was prepared by a thin film dispersion-extrusion method. With liposome size and zeta potential as the indicators, single factor method was used to investigate the effects of soybean phospholipid to cholesterol ratio, amount of stearic amine, amount of ethanol, film-forming temperature, amount of hydration medium, hydration preparation temperature, and hydration preparation time on the liposome. The dilution stability and storage stability were also examined. The loading capacity of miR-126 by SCL and the protection effect of SCL on the enzymatic hydrolysis were investigated by agarose gel retardation assay. The coupling efficiency of VCAM-1 mAb with SCL was examined by SDS-PAGE. The toxicity of Va-SCL, Va-SCL/miR-126 to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was investigated by MTT assay, and the uptake of miR-126, SCL/miR-126, and Va-SCL/miR-126 by normal HUVECs and LPS-stimulated HUVECs was examined by flow cytometry and fluorescence microscopy. **Results** Weigh out 120 mg of soybean phospholipids, 40 mg of cholesterol, and 10 mg of stearic amine into a funnel-shaped bottle, and add 5 mL of anhydrous ethanol. Ultrasonicate at 50 °C (power 300 W, frequency 40 kHz) to dissolve the ingredients completely, and visually inspect for any visible particles or insoluble substances. Remove the organic solvent by rotary evaporation at 50 °C under a vacuum, forming a uniform, transparent lipid film on the bottle wall. Add 12 mL of DEPC-treated water as a hydration medium, and ultrasonicate at 50°C for 30 min. Pass the mixture through a 200 nm polycarbonate membrane using a syringe pump 7 times, collect the filtrate, and obtain SCL. The stability is good. When the nitrogen-to-phosphorus ratio is 10:1, SCL can effectively load miR-126. miR-126 adheres to the surface of SCL via electrostatic attraction, and SCL to some extent protects miR-126 from enzymatic degradation. The SDS-PAGE results show that the Va-SCL and Va-SCL/miR-126 antibodies successfully coupled to SCL, with an attachment rate of $(53.2 \pm 7.6)\%$. The MTT results show that the IC_{50} values of Va-SCL, Va-SCL/miR-126, SCL, and SCL/miR-126 for inhibiting HUVECs are 17.38, 71.61, 81.03, and 97.79 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The fluorescence microscope and flow cytometry results show that Va-SCL/miR-126 has a more pronounced cell uptake effect. **Conclusion** Va-SCL/miR-126 was successfully prepared with a high safety profile and significantly increased the cellular uptake of miR-126.

Key words: cationic liposome; miR-126; film dispersion method; EDC/NHS method; modified by monoclonal antibody to vascular cell adhesion molecule-1

心血管疾病是指累及心脏和血管等器官和组织的1大类疾病。我国心血管疾病患病率为47.85%,死亡率长期高居首位,占我国居民死亡率的40%以上^[1-2]。现有常见治疗心血管疾病的小分子药物繁多,如丹参酮II_A、他汀类药物、阿司匹林及硝苯地平等,但仍然存在口服吸收差,生物利用度低,不良反应多等缺点,使其应用受到限制^[3-6]。微小RNA(miRNAs)是一类长度为21~25 nt的单链非编码RNA,可以调控人体约30%的基因表达,参与细胞的增殖和凋亡,被称为基因转录后的调节器^[7],相对于小分子药物具有靶向性高、疗效确切、不良反应小等优势^[10-11],随着科学技术的发展与进步,逐渐成为各种疾病治疗的研究热点。大量研究表明,miRNAs在心血管疾病的治疗和诊断、包括血管生成、心律失常等多种病理过程中具有重要的意义^[8-9],miR-126作为内皮祖细胞特异高表达的miRNA^[19],参与维持血管正常内皮功能,对血管生成具有显著的调控作用^[20]。

但由于miRNA是带负电荷的亲水性物质,而细胞膜表面也带有负电荷,使得miRNA难以进入细胞内发挥作用,同时易酶解等不稳定因素限制了其在临床的应用。因此,选择适宜的载体尤为重要。阳离子脂质体具有制备简单、高转染效率等优势,不仅能够包载脂溶性药物,还能包载水溶性药物;作为核酸药物载体具有提高药物稳定性、较好的细胞亲和性与组织兼容性、体内可降解性等特点^[12-14],使其在基因递送方面被广泛研究。

在纳米医学领域,具有主动靶向功能的药物递送系统可以克服低选择性,使药物富集于病灶部位,减少对健康组织的影响,从而达到治疗效果更好及不良反应更低的重要策略^[15-16]。研究显示,心血管疾病的发生伴随着血管内皮损伤,而炎症反应则贯穿于血管内皮损伤的始终^[17-18]。血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)是血管内皮损伤中最有标志性的跨膜炎症蛋白之一,使其成为炎症治疗的理想靶点;同时VCAM-1 mRNA是miR-126的靶基因。

本研究拟制备硬脂胺阳离子脂质体,并以粒径、粒径范围及电位为指标,考察其最佳制备处方和工艺以及对miR-126的负载能力。以VCAM-1单克隆抗体(mAb)作为主动靶头,制备VCAM-1 mAb修饰的阳离子脂质体(VCAM-1 mAb modified stearic amine cationic liposome, Va-SCL),以增加miR-126的稳定性、靶向性及细胞摄取,从而为靶向递送核酸药物至心血管炎症部位提供载体选择。

1 材料

1.1 细胞

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)CRL-1730为ATCC公司产品。

1.2 主要试剂

大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,批号201908012,质量分数90%);胆固醇(上海源叶生物科技有限公司,批号57885,质量分数95%);硬脂胺(批号F2001126,质量分数97%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC,批号K2010210,质量分数98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,批号B1722036)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;VCAM-1 mAb(批号#42j9286)购自江苏亲科生物研究中心有限公司(Affinity);无水乙醇(批号20210101)、二甲基亚砜(批号20200302)均购自重庆万盛川东化工有限公司;无酶无菌水(DEPC,批号R1600)、50×TAE缓冲液(批号T1060)、绿色荧光核酸染料(批号G8140)均购自北京索莱宝科技有限公司;miR-126 minics(上海吉玛制药技术有限公司,批号63896);琼脂糖(批号111860);RPMI 1640培养基(批号8122130)、0.25%胰酶(批号2403077)均购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司;脂多糖(LPS, Sigma公司,批号0000135218)。

1.3 主要仪器

Nano-brook 90Plus PALS型Zeta电位及粒度分析仪(美国Brookhaven Instruments公司);UPW-UP-10型纯水仪(四川成都天莘宁科技有限公司);ME104/02型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);HB ECO S096型旋转蒸发仪(德国IKA公司);KQ-300DE型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);BR15021型水平电泳系统、721BR11445型凝胶成像系统仪(美国Bio-rad公司);Cvarioskan LUX型多功能酶标仪(美国Thermo scientific公司)。

2 方法

2.1 SCL的制备

精密称量大豆磷脂120 mg、胆固醇40 mg、硬脂胺10 mg于茄形瓶中,加入5 mL无水乙醇,50℃超声(功率300 W,频率40 kHz)使其充分溶解,肉眼观察无可见颗粒物或者不溶物,于50℃旋转蒸发仪上水浴减压蒸发除去有机溶剂,在瓶壁上形成均匀透明的脂质薄膜。加入12 mL DEPC水作为水合介质,50℃水浴超声30 min,挤出器过孔径为200 nm聚碳酸酯膜7次,取续滤液,得SCL。

2.1.1 大豆磷脂与胆固醇质量比的考察 固定硬脂胺、无水乙醇、水合介质的用量,成膜温度,水合制备温度,水合制备时间等因素,按“2.1”项下制备工艺,采用Nano-brook 90Plus PALS型Zeta电位及粒度分析仪考察大豆磷脂与胆固醇质量比2:1、3:1、4:1对脂质体粒径、电位的影响。表1结果表明,大豆磷脂与胆固醇的质量比为3:1时,所得脂质体的粒径及粒径范围较小,故大豆磷脂与胆固醇的质量比选择3:1。

2.1.2 硬脂胺用量的考察 固定其他因素,按“2.1”项下制备工艺,考察硬脂胺的用量分别为3、5、10 mg时对脂质体粒径、电位的影响。表2结果表明,硬脂胺的用量为5 mg时,所得脂质体的粒径及粒径范围较小,故硬脂胺的用量选择5 mg。

表1 大豆磷脂与胆固醇质量比考察

Table 1 Study on mass ratio of soybean phospholipid to cholesterol

大豆磷脂: 胆固醇	平均粒 径/nm	粒径范围/nm	PDI	电位/ mV
2:1	178.61	22.71~1 322.81	0.274	16.06
3:1	164.94	19.18~1 407.83	0.309	14.68
4:1	184.20	19.34~1 676.10	0.333	11.50

表2 硬脂胺的用量考察

Table 2 Study on dosage of stearic amine

硬脂胺用 量/mg	平均粒 径/nm	粒径范围/nm	PDI	电位/mV
3	215.18	26.97~1 660.82	0.282	20.27
5	165.53	19.14~1 311.10	0.297	17.46
10	234.44	30.40~1 698.65	0.265	13.31

2.1.3 无水乙醇的用量的考察 固定其他因素,按“2.1”项下制备工艺,考察无水乙醇的用量分别为5、8、10 mL时对脂质体粒径、电位的影响。表3结果表明,无水乙醇的用量为5 mL时,所得脂质体的粒径

及粒径范围较小,且较稳定,故无水乙醇的用量选择 5 mL。

2.1.4 成膜温度的考察 固定其他因素,按“2.1”项下制备工艺,考察成膜温度分别为 40、50、60 °C 时对脂质体粒径、电位的影响。表 4 结果表明,成膜温度为 50 °C 时,所得脂质体的粒径及粒径范围较小,故成膜温度选择 50 °C。

2.1.5 水合介质用量的考察 固定其他因素,按“2.1”项下制备工艺,考察水合介质的用量分别为 10、12、15 mL 时对脂质体粒径、电位的影响。表 5 结果表明,水合介质的用量为 12 mL 时,所得脂质体的粒径及粒径范围较小,故水合介质的用量选择 12 mL。

表 3 无水乙醇的用量考察

Table 3 Study on dosage of anhydrous ethanol

无水乙醇 用量/mg	平均粒径/ nm	粒径范围/nm	PDI	电位/ mV
5	148.90	17.81~1 267.99	0.304	19.63
8	179.71	19.53~1 580.72	0.326	18.59
10	217.78	24.39~1 847.56	0.312	14.11

表 4 成膜温度考察

Table 4 Study on the film forming temperature

成膜温 度/°C	平均粒径/ nm	粒径范围/nm	PDI	电位/ mV
40	208.46	11.66~424.37	0.265	24.84
50	132.01	3.45~258.04	0.335	26.00
60	193.00	7.44~404.31	0.279	20.56

表 5 水合介质用量考察

Table 5 Study on dosage of hydration solution

水合介质 用量/mL	平均粒 径/nm	粒径范围/nm	PDI	电位/mV
10	160.66	18.27~1 328.71	0.312	28.13
12	135.53	14.76~1 231.72	0.327	31.06
15	177.78	20.63~1 458.07	0.303	31.75

2.1.6 水合制备温度的考察 固定其他因素,按“2.1”项下制备工艺,考察水合制备温度分别为 40、50、60 °C 时对脂质体粒径、电位的影响。表 6 结果表明,水合制备温度为 50 °C 时,所得脂质体的粒径及粒径范围较小,故水合制备温度选择 50 °C。

2.1.7 水合制备时间的考察 固定其他因素,按“2.1”项下制备工艺,考察水合制备时间分别为 15、30、45 min 时对脂质体粒径、电位的影响。表 7 结果表明,水合制备时间为 30 min 时,所得

表 6 水合制备温度考察

Table 6 Study on temperature of hydration preparation

水合温 度/°C	平均粒 径/nm	粒径范围/nm	PDI	电位/mV
40	199.79	24.33~1 654.53	0.295	24.18
50	154.07	17.90~1 356.99	0.315	19.65
60	192.67	20.87~1 634.08	0.315	25.68

表 7 水合制备时间考察

Table 7 Study on hydration preparation time

水合时 间/min	平均粒 径/nm	粒径范围/nm	PDI	电位/mV
15	176.96	23.07~1 421.08	0.283	29.74
30	144.72	15.75~1 229.32	0.316	28.08
45	161.42	16.97~1 465.90	0.336	26.67

脂质体的粒径及粒径范围较小,故水合制备时间选择 30 min。

按照筛选出来的方法制得的 SCL 呈淡蓝色乳光,无沉淀,透光性良好;经 3 次独立平行实验所得 SCL 平均粒径为 (142.96 ± 1.44) nm, PDI 为 0.310 ± 0.019 ,电位为 (22.45 ± 1.43) mV。经压力 50 MPa 均质 5 min 后所的平均粒径为 (96.32 ± 2.15) nm, PDI 为 0.293 ± 0.019 ,电位为 (23.52 ± 2.16) mV,结果见图 1、2。

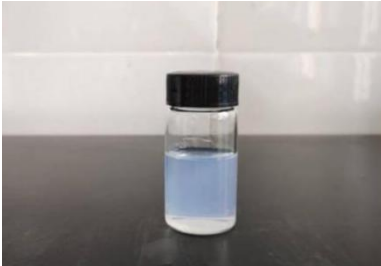


图 1 SCL 的外观图

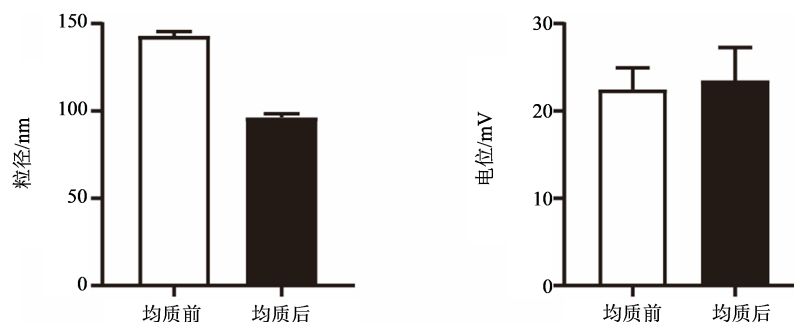
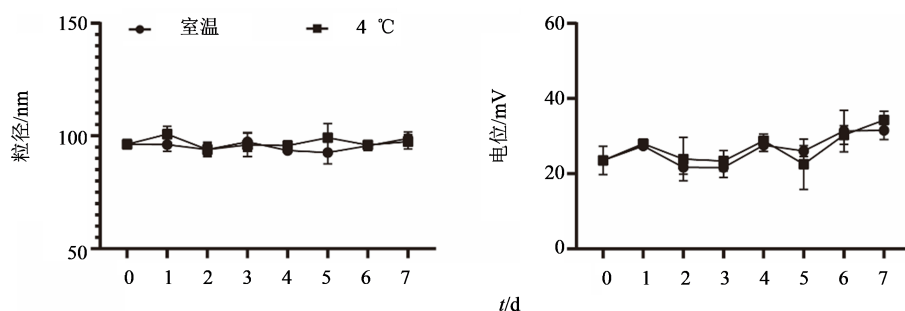
Fig. 1 Appearance of SCL

2.2 储存稳定性

将临用前制备的 SCL 分别于室温及 4 °C 保存 1 周,观察 SCL 外观并测定其粒径及电位,以考察 SCL 1 周内的储存稳定性。图 3 结果表明,SCL 的粒径在 1 周内室温及 4 °C 下均具有良好的稳定性,其 1 周内粒径的 SD 值分别为 2.09 和 2.16;但其电位在第 6 天均略微升高,其 1 周内电位的 SD 值为 3.90。

2.3 稀释稳定性

取临用前制备的 SCL 适量,分别稀释 5、25、50、75、100 倍,并分别在 0、12、24 h 时测其粒径及电位,

图2 SCL均质前后粒径及电位比较 ($n=3$)Fig. 2 Comparison of particle size and potential before and after SCL homogenization ($n=3$)图3 SCL储存稳定性 ($n=3$)Fig. 3 Storage stability of SCL ($n=3$)

以考察24 h内的稀释稳定性。图4结果表明, SCL分别稀释5、25、50、75、100倍后, 粒径及电位在24 h内均具有良好的稳定性。

2.4 琼脂糖凝胶阻滞实验

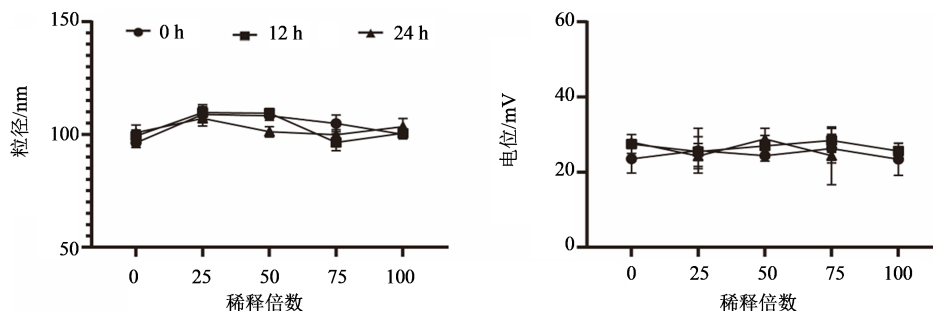
称取0.5 g琼脂糖, 加入50 mL TAE缓冲液, 放入微波炉中加热直至溶解完全, 稍冷后加入5 μ L绿色荧光核酸染料, 混匀后倒入插好梳齿的制胶槽即可得1%琼脂糖凝胶, 电泳液为TAE缓冲液。根据最佳处方和工艺制备SCL, 分别按氮磷比(N:P, SCL提供N, miR-126提供P)为5:1、10:1、20:1、30:1、40:1配制, 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床孵育30 min, 得SCL/miR-126。取10 μ L甘油与10 μ L不同氮磷比SCL/miR-126混匀后上样, 130 V、52 mA电泳20 min, 置于凝胶成像仪中, 观察并拍照, 确定SCL/miR-126最

佳氮磷比。

图5结果表明, 游离miR-126可在电场作用下向正极移动, 形成明显的条带, 当N:P为5:1时, 在miR-126对应位置出现条带, 提示还有部分miR-126未负载, 当N:P为10:1~40:1时, miR-126已完全与脂质体形成复合物, 虽然N:P越大则该制剂能够负载miR-126的能力也越强, 但N:P较大时其载药量会减小, 且制剂中的硬脂胺作为阳离子材料, 硬脂胺的含量增加, 该制剂的毒性也会增加, 综合考虑故选择N:P为10:1作为其最佳处方氮磷比。

2.5 SCL/miR-126酶稳定性研究

取20 μ L SCL、最佳氮磷比SCL/miR-126及游离miR-126, 分别设置对照组、RNase A酶组、破

图4 SCL稀释稳定性 ($n=3$)Fig. 4 Dilution stability of SCL ($n=3$)

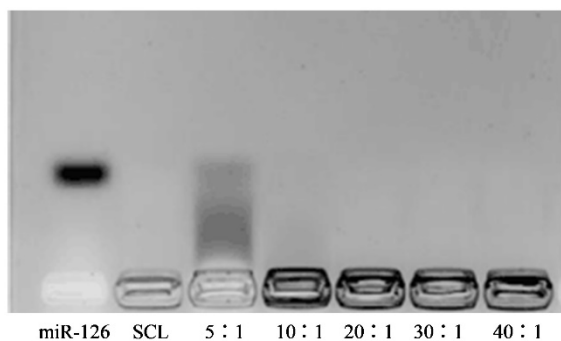


图5 琼脂糖凝胶实验考察不同N:P条件下SCL与miR-126的复合效率

Fig. 5 Agarose gel experiment to investigate effect of SCL and miR-126 composite efficiency under different N:P conditions

乳剂组、破乳剂+RNase A酶组。RNase A酶组：SCL/miR-126及游离miR-126分别加入2 μ L RNase A酶(10 mg·mL⁻¹)，置于37 $^{\circ}$ C孵育30 min，取出并快速放入-80 $^{\circ}$ C冰箱中终止反应；破乳剂组：加入5 μ L 1% TritonX-100处理5 min破坏脂质膜；破乳剂+RNase A酶：先加入RNase A酶再破乳；对照组直接上样检测。按“2.4”项进行电泳并拍照。

RNase A酶解实验结果显示，加入的RNase A酶能够使裸miR-126完全酶解。SCL组中，在加入1% Triton X-100和RNase A酶后，上样孔处和miR-126对应位置均没有出现明显条带。SCL/miR-126组，仅加入1% Triton X-100组，在上样孔处，与SCL/miR-126对照组灰度值相当，提示miR-126可能是通过静电吸附于SCL上；加入1% Triton X-100和RNase A酶后，上样孔处的条带灰度值有所降低，提示还有部分miR-126未被酶解，该递送系统能够在一定程度上保护miR-126的酶解，结果见图6。

2.6 Va-SCL/miR-126的制备及验证

分别将0.5 g EDC和0.5 g NHS溶于0.5 mL MES缓冲液(0.1 mol·L⁻¹, pH值为6)中，取1.5 μ L

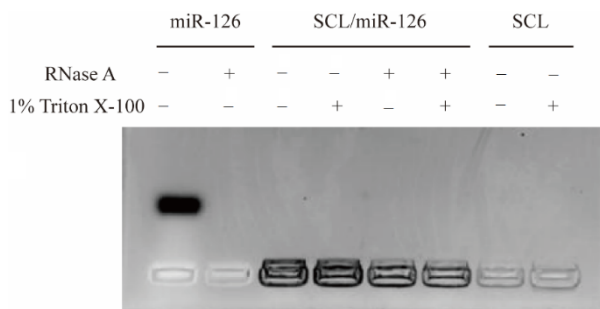


图6 SCL对miR-126酶保护实验

Fig. 6 SCL enzyme protection assay against miR-126

VCAM-1 mAb(1 mg·mL⁻¹)，分别加入上述溶液各100 μ L，室温反应15 min，加入SCL/miR-126最佳氮磷比处方500 μ L，反应2 h，透析去除多余的EDC及NHS，得到Va-SCL/miR-126。将样品与5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合后，于100 $^{\circ}$ C煮沸5 min，使用8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，150 V电泳90 min，考马斯亮蓝染色40 min，去离子水洗净后于凝胶成像系统成像，检测VCAM-1 mAb与SCL/miR-126结合情况及耦联率(接枝率=耦联物灰度值/单独VCAM-1 mAb灰度值)。耦联原理见图7。

图8结果表明，Va-SCL/miR-126组中，与VCAM-1 mAb对应位置出现相应条带，提示VCAM-1 mAb耦联至SCL/miR-126上。通过Image J对蛋白条带灰度值进行相对定量，计算出2~3各泳道的条带灰度值，接枝率为(53.2 $\pm$ 7.6)%。经测定其粒径及电位分别为(92.38 $\pm$ 0.98) nm、(15.76 $\pm$ 1.43) mV，PDI值为0.217 $\pm$ 0.019，结果见图9。

2.7 透射电镜

将5 μ L稀释的SCLs/miR-126和Va-Va-SCL/miR-126分别滴在铜网上，静置5 min，用滤纸将多余的滤干，干燥，滴5 μ L磷钨酸在载网上，染色30 s后，用滤纸吸净并在透射电子显微镜下观察和拍摄

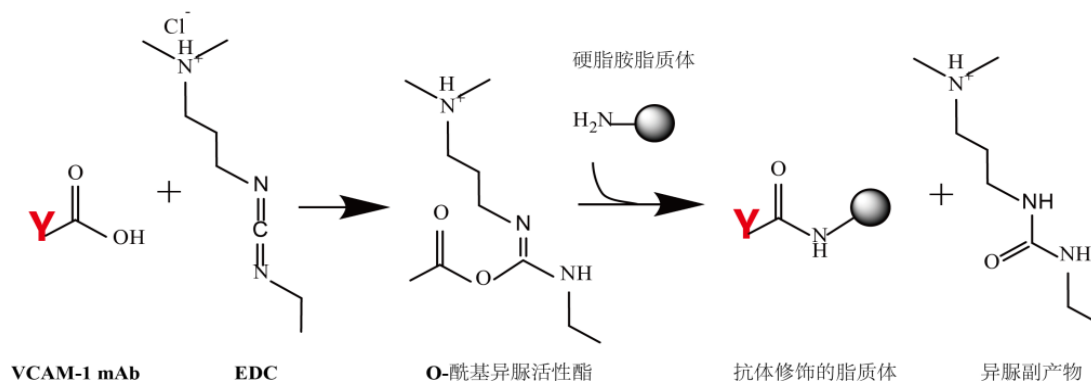
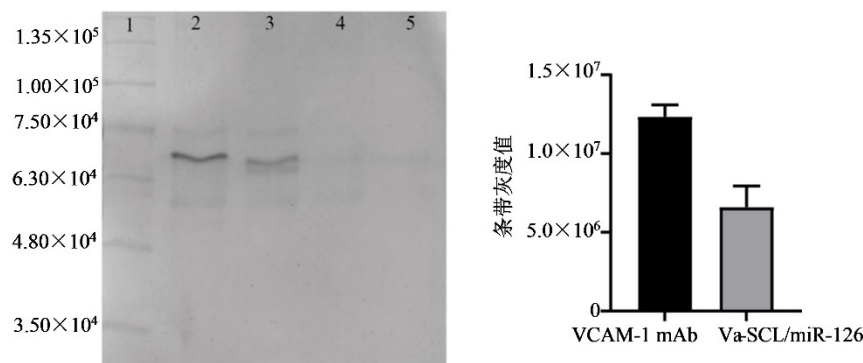


图7 EDC进行的VCAM-1 mAb与硬脂胺脂质体的交联反应式

Fig. 7 Cross linking reaction formula between VCAM-1 mAb and stearamine liposomes via EDC



1-Marker;2-VCAM-1 mAb;3-SCL/miR-126 和 VCAM-1 mAb 偶联物;4-SCL/miR-126 和 VCAM-1 mAb 物理混合物(不加 EDC、NHS, VCAM-1 mAb 被透析掉);5-SCL/miR-126。

1-Marker;2-VCAM-1 mAb;3-SCL/miR-126 and VCAM-1 mAb coupling compounds;4-SCL/miR-126 and VCAM-1 mAb physical mixtures (without EDC or NHS, VCAM-1 mAb was dialyzed off); 5-SCL/miR-126.

图 8 SDS-PAGE 检测 SCL/miR-126 与 VCAM-1 mAb 偶联效果

Fig. 8 SDS-PAGE detection of coupling effect between SCL/miR-126 and VCAM-1 mAb

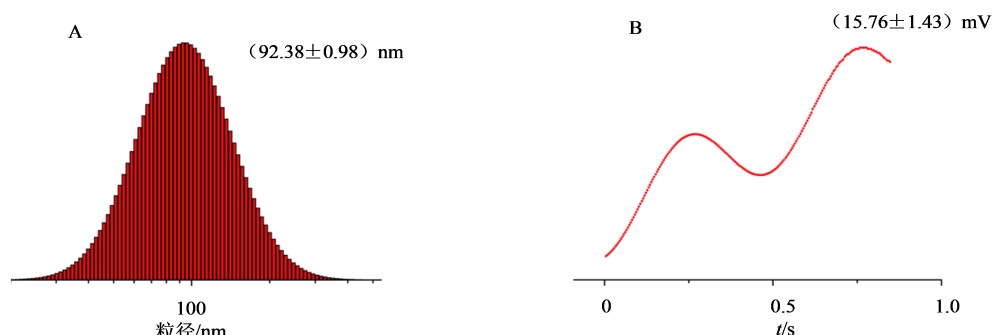


图 9 Va-SCL 的粒径(A)、电位(B)

Fig. 9 Particle size (A) and potential (B) of Va-SCL

形态学,并测定其粒径及电位。

所制备 Va-CLs/miR-126 外观形态圆整呈类球形,大小均一,透射电镜图像见图 10。

2.8 细胞培养

将 HUVECs 培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养基中培养。

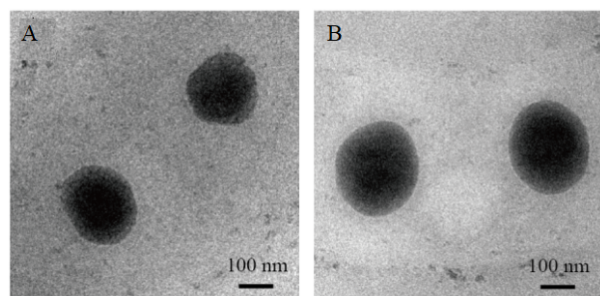


图 10 SCLs/miR-126 (A)和 Va-SCL/miR-126 (B)透射电子显微镜

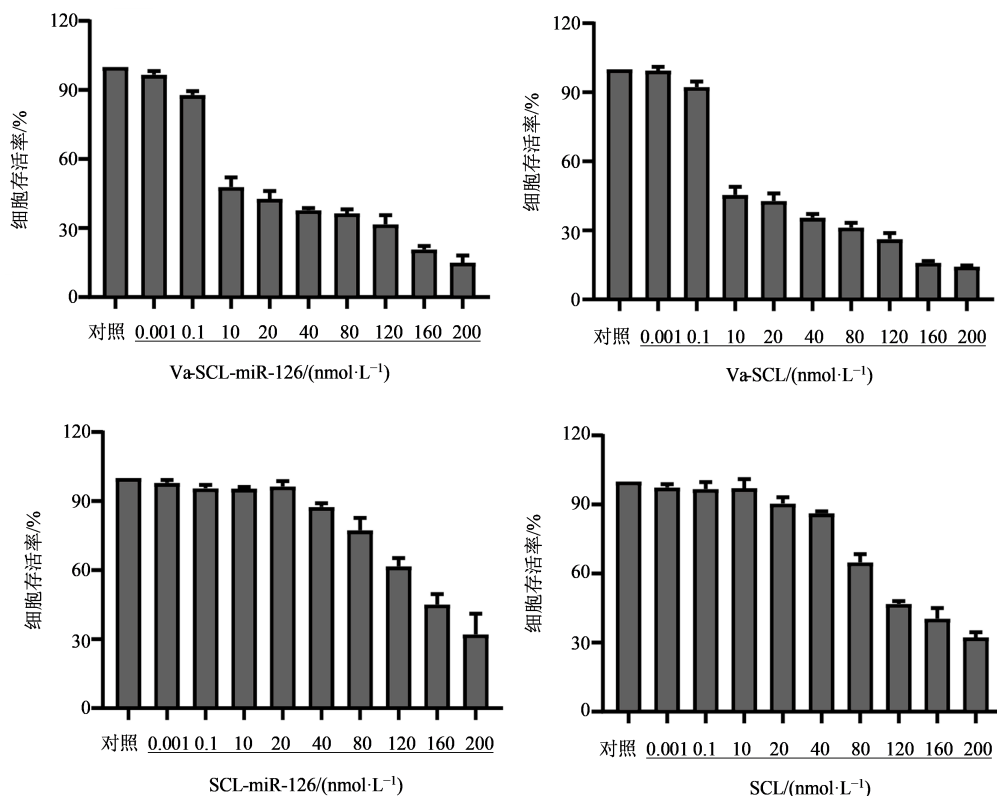
Fig. 10 Transmission electron microscopy image of SCLs/miR-126 (A) and Va-SCL/miR-126 (B)

2.8.1 细胞毒性 将处于对数生长期的 HUVECs 按每孔 6×10^3 个细胞加入 96 孔板,每组设 3 个复孔,置于 CO₂ 培养箱培养 24 h 后弃去培养液,对照组加入等体积的基础培养基,其余各组分别加入浓度为 0.001~200.000 nmol·L⁻¹ (以 miR-126 计)的 SCL、SCL/miR-126、Va-SCL、Va-SCL/miR-126。24 h 后每孔加入 20 μL 的 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT,置于 CO₂ 培养箱孵育 4 h 后弃上清液,并加入 150 μL 的 DMSO 溶解甲臢沉淀,完全溶解后于 490 nm 处用多功能酶标仪检测其吸光度(A)值,计算其相对存活率。

$$\text{相对存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

结果表明, Va-SCL、Va-SCL/miR-126 的半数抑制浓度(IC₅₀)值分别为 17.38、71.61 nmol·L⁻¹; SCL、SCL/miR-126 的 IC₅₀ 值分别为 81.03、97.79 nmol·L⁻¹, 结果见图 11。

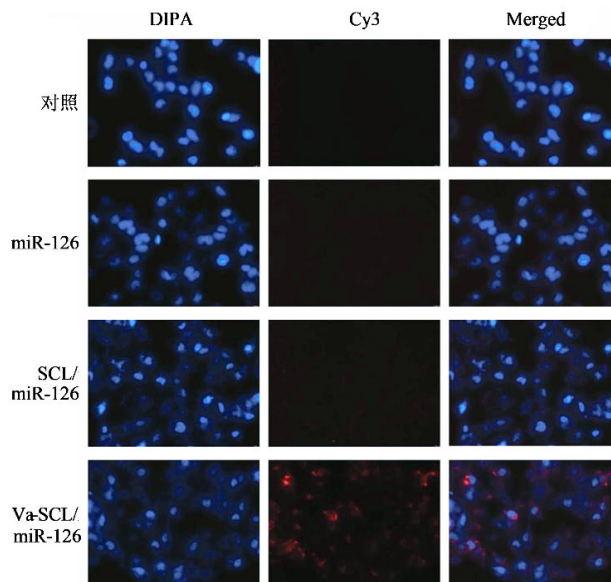
2.8.2 荧光显微镜观察摄取情况 取对数生长期的 HUVECs 以每孔 1 mL、 8×10^4 个的密度接种于 12 孔板中,培养 24 h,弃上层培养基,用 1 μg·mL⁻¹ LPS 处理细胞 8 h,分别取 50 nmol·L⁻¹ Cy. 3-miR-126、

图11 细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Fig. 11 Cytotoxicity ($\bar{x} \pm s, n=4$)

SCL/Cy.3-miR-126、Va-SCL/Cy.3-miR-126 以及基础培养基与细胞共孵育 2 h。用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 4% 多聚甲醛避光固定 20 min,弃固定液,PBS 洗涤细胞 2 次,加入 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI 染色液,室温避光染色 10 min,弃染色液,PBS 洗涤细胞 3 次,于倒置荧光显微镜下,相同条件下观察并拍摄图像。

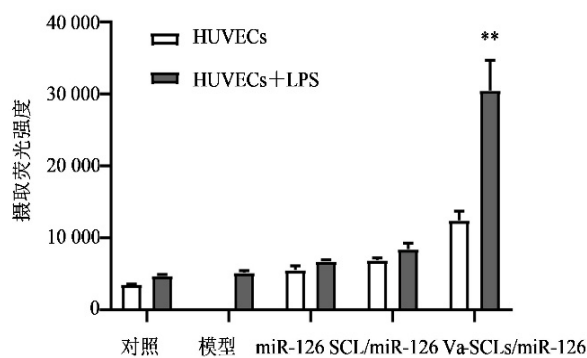
图 12 结果显示,游离 miR-126 组在炎症细胞中未检测到红色荧光,表明 miR-126 被 HUVECs 摄取较少。而在 SCL/miR-126 组的炎症细胞检测到微弱红色荧光,表明 SCL 能够促进 miR-126 的细胞摄取,可能是因为脂质体具有与细胞膜相似的组成,生物相容性较好。经 Va-SCL/miR-126 处理的炎症 HUVECs 中红色荧光强度更明显,可能是由于 VCAM-1 抗体能够靶向炎症细胞表面的 VCAM-1,因而在细胞表面富集的 Va-SCL/miR-126 较多,从而促进了更多的 miR-126 内化。

2.8.3 流式细胞术检测细胞摄取情况 将细胞密度调整为每孔 1×10^5 个接种于 12 孔板中,培养 24 h,弃去上层培养基,除对照组外, $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 处理细胞 8 h,分别取 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cy.3-miR-126、SCL/Cy.3-miR-126、Va-SCL/Cy.3-miR-126 以及空白细胞培养基(模型组)与细胞共孵育 2 h。去除培养基,

图12 HUVECs对Va-SCL/miR-126和SCL/miR-126的摄取
Fig. 12 Uptake of Va-SCL/miR-126 and SCL/miR-126 by HUVECs

PBS 洗涤,胰酶消化,中和胰酶,收集细胞悬液, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,PBS 重悬后于流式细胞仪检测细胞摄取 miR-126 的情况。另取正常 HUVECs 不造模进行平行实验。

图 13 结果表明,相同浓度 miR-126、SCL/miR-



与正常HUVECs同一样品组比较:** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs same sample group in normal HUVECs.

图13 正常HUVECs及炎症HUVECs对Va-SCL/miR-126和SCL/miR-126的摄取($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 13 Uptake of Va-SCL/miR-126 and SCL/miR-126 by normal and inflammatory HUVECs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

126、Va-SCL/miR-126处理正常HUVECs后，Va-SCL/miR-126、SCL/miR-126较miR-126荧光摄取量大，其中Va-SCL/miR-126的摄取量更大，提示miR-126负载于抗体脂质体递送系统后，可以增加HUVECs对miR-126的摄取量。而对于LPS所致炎症损伤的VCAM-1高表达HUVECs，Va-SCL/miR-126组的荧光摄取量远远大于SCL/miR-126组和miR-126组；另外Va-SCL/miR-126在模型细胞中的摄取量远远大于在正常细胞中的摄取量，具有显著性差异($P < 0.01$)，提示VCAM-1抗体修饰的阳离子脂质体可以显著促进细胞对miR-126的摄取，与荧光显微镜下观察结果一致。

3 讨论

有效的细胞内化是RNA发挥基因治疗作用的先决条件。由于带负电荷的RNA和细胞膜之间的排斥阻碍了RNA的有效细胞摄取，因此研究者们一直尝试不同的策略来增强细胞内化^[21-22]。阳离子脂质体作为非病毒基因载体被广泛用于基因治疗^[23-24]。脂质体与抗体的偶联方法有抗体衍生法、吸附法和交联法等，交联法成本相对较低。本研究采用EDC/NHS交联法偶联VCAM-1 mAb与SCL，EDC是一种羧基和胺反应的零长度交联剂。EDC首先与VCAM-1 mAb上的羧基反应，生成氨基反应的O-酰基脲中间体，O-酰基脲中间体快速与SCL上的氨基反应，形成酰胺键并释放异脲产物。中间体在水溶液中是不稳定的，因此，两步共轭过程需要在MES缓冲液中进行并需要加入NHS来稳定^[25]，并通过透析除去多余的EDC和NHS。

由于炎症伴随着大量炎症因子，炎症反应中VCAM-1通过介导单核细胞牢固地黏附于血管内

皮损伤部位并进入内膜下^[26]，是造成血管内皮损伤恶化的关键环节，并促进血小板的聚集和各种心血管恶性事件的进一步发生和发展。因此，VCAM-1在炎症部位的高表达为靶向炎症递送药物提供了有利条件。有研究报道，阳离子脂质体到达体内后，可以通过静电相互作用和富含阴离子脂质的内体膜相互作用，随后融合脂质使脂质相转化成倒六方构象^[27]，使融合脂质插入内体膜中，实现膜融合过程^[28]。另外，有研究报道^[29-30]阳离子的加入会使脂质体的细胞毒性增加，其原因是阳离子脂质体表面所带电荷会对细胞膜有一定的损伤作用，故在细胞毒性实验中随着各组浓度的升高，细胞存活率逐渐降低。荧光显微镜研究结果显示，miR-126聚集在细胞质中，这与miRNA作用的位置一致。细胞对游离miR-126的摄取较弱，表明游离miR-126因带负电荷而难以进入细胞，SCL具有良好的生物相容性，可以被带负电荷的细胞膜吸附，通过膜融合或内吞作用将miR-126输送到细胞内。Va-SCL中的抗体具有特异性和靶向性，可以选择性地促进核酸药物向靶位点的输送并在作用位点富集，解决了RNA入胞困难的问题。但该递送系统对miR-126的转染效率及药效验证等还有待进一步研究。本研究为心血管疾病治疗提供更多药物和递送系统参考，对提高心血管疾病治疗效果具有一定意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴俊平, 王璐, 谢赫男. 老年人群心血管疾病患病现状及影响因素[J]. 中国卫生工程学, 2021, 20(4): 599-600.
Wu J P, Wang L, Xie H N. Prevalence and influencing factors of cardiovascular diseases in the elderly population [J]. Chin J Public Health Eng, 2021, 20(4): 599-600.
- [2] 牛瑞虹, 李丰, 姜静. 老年高血压病诊断与治疗研究进展[J]. 人民军医, 2017, 60(5): 507-511, 514.
Niu R H, Li F, Jiang J. Research progress in diagnosis and treatment of hypertension in the elderly [J]. People's Mil Surg, 2017, 60(5): 507-511, 514.
- [3] 侯文书, 张力. 丹参酮IIA对心血管系统的药理作用及剂型研究进展[J]. 神经药理学报, 2016, 6(4): 24-30.
Hou W S, Zhang L. Research progress on pharmacological action and dosage form of tanshinone IIA on cardiovascular system [J]. Acta Neuropharmacol, 2016, 6(4): 24-30.
- [4] Kubo M, Egashira K, Inoue T, et al. Therapeutic neovascularization by nanotechnology-mediated cell-

- selective delivery of pitavastatin into the vascular endothelium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (6): 796-801.
- [5] Oda S, Nagahama R, Nakano K, et al. Nanoparticle-mediated endothelial cell-selective delivery of pitavastatin induces functional collateral arteries (therapeutic arteriogenesis) in a rabbit model of chronic hind limb ischemia [J]. *J Vasc Surg*, 2010, 52(2): 412-420.
- [6] 孙宇姣, 齐国先. 纳米粒子包裹的他汀类药物在心血管疾病应用的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2014, 35 (1): 28-31.
- Sun Y J, Qi G X. Research progress of nanoparticle-coated statins in cardiovascular diseases [J]. *Adv Card*, 2014, 35(1): 28-31.
- [7] 谭宏伟, 许春容, 王刚, 等. 微小RNA对血管重塑的调节作用及研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27 (12): 1094-1100.
- Tan H W, Xu C R, Wang G, et al. Regulation of microRNA on vascular remodeling and its research progress [J]. *Chin J Arterioscler*, 2019, 27(12): 1094-1100.
- [8] 李文慧, 张洪亮, 王越, 等. MicroRNA在心血管疾病中的研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2021, 11(17): 55-57.
- Li W H, Zhang H L, Wang Y, et al. Research progress of microRNA in cardiovascular diseases [J]. *China Med Pharm*, 2021, 11(17): 55-57.
- [9] 吴浩亮, 浦湧, 孟祥平, 等. 基于microRNA的心脏疾病临床治疗展望 [J]. *广州医科大学学报*, 2021, 49(6): 130-136.
- Wu H L, Pu Y, Meng X P, et al. Prospect of clinical treatment of heart diseases based on microRNA [J]. *Acad J Guangzhou Med Univ*, 2021, 49(6): 130-136.
- [10] 刘揭, 缪明星, 郝琨. 包载生物大分子的纳米药物递送系统研究进展 [J]. *中南药学*, 2019, 17(3): 441-446.
- Liu J, Miao M X, Hao K. Research progress in nano-drug delivery systems loaded with biomacromolecules [J]. *Cent South Pharm*, 2019, 17(3): 441-446.
- [11] 张志荣, 董尔丹, 吴镭, 等. 生物大分子药物递送系统研究现状与前沿方向 [J]. *中国基础科学*, 2014, 16(5): 3-8.
- Zhang Z R, Dong E D, Wu L, et al. Progress and future development on efficient *in vivo* delivery system of biomacromolecular drugs [J]. *China Basic Sci*, 2014, 16 (5): 3-8.
- [12] 曹咏梅. 用于基因转染的阳离子脂质体研究进展 [J]. *化学试剂*, 2015, 37(6): 515-518.
- Cao Y M. Advance of cationic liposomes for gene delivery [J]. *Chem Reag*, 2015, 37(6): 515-518.
- [13] 杨硕晔, 陈西敬. 阳离子脂质体用做基因传递载体的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(20): 1866-1870.
- Yang S Y, Chen X J. Advance in the research of cationic liposome carriers for gene delivery [J]. *Chin J N Drugs*, 2010, 19(20): 1866-1870.
- [14] 钱亚芳, 谷满仓. 阳离子脂质体在基因转染载体中的研究进展 [J]. *中国药师*, 2008, 11(9): 1041-1043.
- Qian Y F, Gu M C. Research progress of cationic liposome in gene transfection vector [J]. *Trans Nonferrous Met Soc China*, 2008, 11(9): 1041-1043.
- [15] Torchilin V P, Trubetskoy V S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16(2/3): 141-155.
- [16] Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(17): 3752-3756.
- [17] 刘君宇, 张敏, 彭建强. 白介素-37在心血管疾病中的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2022, 43(2): 120-123.
- Liu J Y, Zhang M, Peng J Q. Interleukin-37 in cardiovascular diseases [J]. *Adv Cardiovasc Dis*, 2022, 43 (2): 120-123.
- [18] 邢敬慈, 揭伟. 甲基转移酶SET结构域家族及其在心血管发育和疾病中的作用 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2022, 51(2): 251-260.
- Xing J C, Jie W. Methyltransferase SET domain family and its relationship with cardiovascular development and diseases [J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2022, 51(2): 251-260.
- [19] 汪俊军. microRNA与心血管疾病 [A]// 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议论文汇编 [C]. 北京: 中华中医药学会, 北京中医药学会, 2012.
- Wang J J. microRNA and cardiovascular diseases [A]// *Compilation of papers of the 7th National Laboratory Medicine Conference of Chinese Medical Association* [C]. Beijing: Chinese Association of Chinese Medicine, Beijing Association of Chinese Medicine, 2012.
- [20] Xie H, Wang F, Chen X, et al. MiR-126 is essential for endothelial phenotype expression during endothelial differentiation in adipose-derived stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 442-446.
- [21] Charbe N B, Amnerkar N D, Ramesh B, et al. Small interfering RNA for cancer treatment: Overcoming hurdles in delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(11): 2075-2109.
- [22] Aldosari B N, Alfagih I M, Almurshedi A S. Lipid nanoparticles as delivery systems for RNA-based vaccines [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 206.
- [23] Alzharni R, Alsaab H O, Petrovici A, et al. Improving the therapeutic efficiency of noncoding RNAs in cancers using targeted drug delivery systems [J]. *Drug Discov*

- Today, 2020, 25(4): 718-730.
- [24] Tang Y Y, Chen Y, Guo Q Q, et al. MiR-126-loaded immunoliposomes against vascular endothelial inflammation *in vitro* and *vivo* evaluation [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(5): 1379.
- [25] 柳帅, 刘洁, 杨亚妮, 等. 抗体修饰纳米载体表面构建主动靶向制剂常用偶联方法 [J]. *中国医药工业杂志*, 2015, 46(4): 404-411.
- Liu S, Liu J, Yang Y N, et al. Surface modification strategies of nanocarriers with antibody as targeting agents [J]. *Chin J Pharm*, 2015, 46(4): 404-411.
- [26] 李红蓉, 位庚, 孙颖, 等. 通络药物对血管内皮细胞与单核细胞黏附作用的影响 [J]. *中国循环杂志*, 2016, 2(5): 480-483.
- Li H R, Wei G, Sun Y, et al. Effect of dredging collateral drug on ox-LDL injured THP-1 cells adhesion to human umbilical vein endothelial cells *in vitro* [J]. *Chin Circ J*, 2016, 2(5): 480-483.
- [27] Mundra V, Mahato R I. Design of nanocarriers for efficient cellular uptake and endosomal release of small molecule and nucleic acid drugs: Learning from virus [J]. *Front Chem Sci Eng*, 2014, 8(4): 387-404.
- [28] Yan Y, Liu X Y, Lu A, et al. Non-viral vectors for RNA delivery [J]. *J Control Release*, 2022, 342: 241-279.
- [29] 林泉, 崔韶晖, 赵轶男, 等. 阳离子脂质体的细胞毒性 [J]. *生命的化学*, 2016, 36(1): 50-56.
- Lin X, Cui S H, Zhao Y N, et al. The cytotoxicity of cationic liposomes [J]. *China Ind Econ*, 2016, 36(1): 50-56.
- [30] 何孔方. 共递送氯诺昔康和microRNA-140阳离子脂质体复合物的制备及在骨关节炎中的应用研究 [D]. 济南: 山东大学, 2021.
- He K F. Preparation and application of co-delivery lornoxicam and microRNA-140 cationic liposome complex in osteoarthritis [D]. Jinan: Shandong University, 2021.

[责任编辑 兰新新]