

携 siRNA 的丙交酯乙交酯共聚物-壳聚糖纳米载体的制备与表征

谭涛^{1,2}, 王梦洋³, 陈承瑜^{1,2}, 高进^{2,3}, 周毅生³, 曹晖^{1*}

1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

2. 粤澳中医药科技产业园开发有限公司, 广东 珠海 519000

3. 盈科瑞(横琴)药物研究院有限公司, 广东 珠海 519000

摘要: 目的 通过引入壳聚糖增加丙交酯乙交酯共聚物(PLGA)载体中小干扰RNA(siRNA)的包封率, 对制备的携 siRNA-壳聚糖(siRNA-CS)的 PLGA 纳米载体(siRNA-CPG)进行表征。方法 选用传统的乳化-溶剂挥发法制备 siRNA-CPG, 以粒径、Zeta 电位及包封率为指标, 对处方(siRNA 与壳聚糖质量比, PLGA 质量浓度, 内水相、二氯甲烷、外水相的体积比)进行单因素考察及星点设计-响应面法优化。对优化后制备的 siRNA-CPG 进行粒径、Zeta 电位、包封率质量评价; 根据粒径及包封率考察 siRNA-CPG 在生理盐水及血清中的稳定性; 制备荧光标记的 siRNA-CPG, 与 MCF-7 细胞孵育 4 h, 观察细胞摄取情况。结果 壳聚糖的引入可将 siRNA 包封率从 3.14% 提高到 90% 以上。优化后的处方中壳聚糖、siRNA、PLGA 质量浓度分别为 1、0.5、10 mg·mL⁻¹, 内水相、二氯甲烷、外水相的体积比为 1:10:100。制备 3 批 siRNA-CPG 冻干粉, 复溶后室温放置 48 h 及血清中 24 h 内粒径和包封率均无明显变化; siRNA-CPG 可被细胞摄取并从溶酶体中逃逸出来。结论 制备的 siRNA-CPG 包封率高、稳定性好, 可以实现 siRNA 的细胞质有效递送。

关键词: 小干扰 RNA (siRNA); 丙交酯乙交酯共聚物 (PLGA); 壳聚糖; 包封率; 星点设计-响应面法; siRNA 递送; 细胞摄取

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2022) 08-1558-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.013

Preparation and characterization of PLGA-chitosan nanoparticles carrying siRNA

TAN Tao^{1,2}, WANG Mengyang³, CHEN Chengyu^{1,2}, GAO Jin^{2,3}, ZHOU Yisheng³, CAO Hui¹

1. Jinan University College of Pharmacy, Guangzhou 510632, China

2. Guangdong-Macau Traditional Chinese Medicine Technology Industrial Park Development Co. Ltd., Zhuhai 519000, China

3. IncreasePharm (Hengqin) Institute, Zhuhai 519000, China

Abstract: Objective To increase the encapsulation efficiency of siRNA in PLGA nano particles by incorporating chitosan, to prepare and characterise the PLGA nanoparticles carrying siRNA (siRNA-CPG). **Methods** The traditional emulsification solvent volatilization method was used to prepare siRNA-CPG. The formulation (mass ratio of siRNA to chitosan, mass concentration of PLGA, volume ratio of internal water phase, dichloromethane and external water phase) was optimized with the particle size, Zeta potential, entrapment efficiency as the index by single factor experiment and central composite design-response surface method. The particle size, Zeta potential and encapsulation rate of the optimized siRNA-CPG were evaluated. The stability of siRNA-CPG in normal saline and serum was investigated according to particle size and encapsulation rate. Fluorescent-labeled siRNA-CPG was prepared and incubated with MCF-7 cells for 4 h to observe cell uptake. **Results** The addition of chitosan increased the entrapment efficiency of siRNA from 3.14% to more than 90% in the PLGA nanoparticles. The optimized formula was as follows: the concentrations of chitosan, siRNA and PLGA were 1, 0.5 and 10 mg·mL⁻¹ respectively. Three batches of siRNA-CPG had little change in particle size and entrapment efficiency after redissolution by normal saline at room temperature for 48 h, and it could be uptaken by cells and then escape from lysosomes. **Conclusion** The siRNA-CPG prepared in this study has high encapsulation efficiency and good stability, and can realize cytoplasmic delivery of siRNA.

收稿日期: 2022-02-09

基金项目: 中国博士后基金(2020M682926)

第一作者: 谭涛, 女, 博士, 研究方向为新型纳米药物递释系统抗肿瘤。Tel: 18721998265 E-mail: tantao2016@163.com

*通信作者: 曹晖, 男, 教授, 研究方向为中药现代化研究。Tel/Fax: (0756) 8135676 E-mail: kovhuicao@aliyun.com

Key words: siRNA; PLGA; chitosan; encapsulation efficiency; central composite design-response surface method; siRNA delivery; cellular uptake

siRNA 可以通过沉默细胞质中的目标 mRNA, 影响蛋白的正常合成, 从而影响细胞的生长, 达到治疗疾病的目的^[1]。siRNA 对于疾病的治疗具有巨大的潜在优势, 但由于未经修饰的 siRNA 易被核酸酶降解, 不易透膜, 不易从溶酶体逃逸, siRNA 药物的临床应用受到限制^[2-4]。实现 siRNA 有效稳定的递送是发挥其治疗作用的关键^[5]。近年来, 人们已经做了很多努力来开发一种有效的 siRNA 应用技术, 目前主要集中在递送系统设计或 siRNA 化学修饰 2 方面^[2]。实际应用中, 基于阳离子脂质体纳米递送系统的 siRNA 治疗已在 2018 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准上市^[6]。开启了 siRNA 药物市场化的大门, 也证实了纳米递送系统用于 siRNA 药物体内有效递送的可行性。

丙交酯乙交酯共聚物 (PLGA) 是目前研究最多的可生物降解材料之一, 已获美国 FDA 批准用作手术缝合线、注射用微囊、微球、埋植剂等的材料^[7]。PLGA 纳米载体无毒且具有生物相容性, 特别适合于体内 siRNA 递送。经细胞内吞之后, PLGA 纳米粒可以从溶酶体逃逸出来, 并缓慢地将 siRNA 释放到细胞质中^[8]。这些优势表明 PLGA 纳米粒在 siRNA 介导的治疗应用方面具有巨大潜力。但由于 siRNA 为阴离子聚合物, 水溶性好, PLGA 为中性疏水高分子聚合物, 无法有效包载 siRNA^[9-10]。通常 siRNA 的载药系统需要引入聚阳离子材料, 如聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、(2, 3-二油酰基-丙基)-三甲胺等, 以利用静电相互作用吸附 siRNA, 以减少 siRNA 的水溶性, 增加 siRNA 的包封率^[8]。这些聚阳离子材料的潜在毒性限制了 PLGA 纳米载体在 siRNA 药物开发中的使用^[8, 11]。壳聚糖是一种多聚阳离子多糖, 在体内可以降解, 是临床上术后防黏连材料之一^[12]。推测壳聚糖可以替代聚阳离子试剂, 加入到 PLGA 纳米载体中, 利用 siRNA 与壳聚糖的静电作用实现 siRNA 的有效包载^[9]。本研究以 PLGA 为主要载体材料, 引入生物相容性良好的壳聚糖以增加 siRNA 的包封率, 实现 siRNA 的细胞质有效递送。

1 材料

1.1 主要试剂及材料

siRNA (批号 YKR0101) 购自苏州贝信生物有限公司; PLGA (50:50, 末端为羧基, 相对分子质量为 $1.2 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$) 购自德国赢创工业集团; 壳

聚糖购自浙江金壳药业有限公司; 1, 1-二十八烷基-3, 3, 3, 3-四甲基吡啶三碳青苷碘化物 (DiR) 购自武汉艾美捷科技有限公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 双抗 (青霉素和链霉素)、RPMI 1640 不完全培养基购自大连美伦生物技术有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; RiboGreen 试剂、0.25% EDTA 胰酶和 LysoTracker Green DND-26 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Hoechst 33342、焦碳酸二乙酯处理 (DEPC) 水购自碧云天; 三乙胺 (TEA) 购自阿拉丁; 六氟异丙醇 (HFIP) 购自麦克林。

1.2 主要仪器

UV-2600 紫外分光光度仪 [岛津仪器 (苏州) 有限公司]; LGJ-100F 冷冻干燥机 (北京松源华兴科技发展有限公司); JX-950D 超声波粉碎机 (上海净信实业发展有限公司); Nicomp 380 Z3000 粒度仪 (PSS 公司, USA); RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); Forma Series II 二氧化碳培养箱 (Thermo-Fisher Scientific, USA); BJ-1CD 超净台 (上海博讯实业有限公司); TCS-SP8 Sted 激光共聚焦显微镜 (Leica 公司, Germany); H1M 酶标仪 (BioTek 公司, USA)。

1.3 细胞

MCF-7 肿瘤细胞, 来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2 方法与结果

2.1 siRNA-CPG 的制备

2.1.1 siRNA-壳聚糖复合物 (siRNA-CS) 的制备 取适量壳聚糖溶于醋酸缓冲液 (pH 5.5) 中制得 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的壳聚糖溶液, 在搅拌下将 $50 \mu\text{L}$ siRNA 溶液 ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 缓慢加入壳聚糖溶液中, 继续搅拌 20 min, 得到 siRNA-CS。制备过程用水均为 DEPC 水。

2.1.2 携 siRNA-CS 的 PLGA 纳米载体 (siRNA-CPG) 的制备 取适量 PLGA 溶于二氯甲烷中制得 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PLGA 二氯甲烷溶液。按 siRNA-CS 与 PLGA 溶液体积比 1:10 混合, 探头超声处理得油包水 (W/O) 型初乳。初乳与 0.15% 聚乙烯醇 (PVA) 溶液按体积比 1:10 混合, 再次探头超声处理得水包油包水 (W/O/W) 型复乳。再将复乳减压旋转蒸发除去二氯甲烷, 得 siRNA-CPG。加入 5%

的甘露糖作为冻干保护剂,冻干即得。不含壳聚糖制备的载体为 siRNA-PG。制备过程用水均为 DEPC 水。

2.2 siRNA 的纯度分析

siRNA 不稳定,容易被核酸酶降解^[2],利用紫外分光光度法对 siRNA 的纯度进行分析,以确定制备过程对 siRNA 的影响。siRNA-PG 与 siRNA-CPG 的制备过程一致,由于 siRNA-CPG 中存在壳聚糖会影响 siRNA 纯度的测定^[13-14],通过测定 siRNA-PG 冻干粉中 siRNA 的纯度,确定制备过程对 siRNA 的影响。

siRNA 粉末加入 DEPC 水溶解,得 siRNA 溶液。另取 siRNA-PG 冻干粉,DEPC 水复溶后,按体积比 1:1 加入二氯甲烷,摇匀,离心,取水层,得处理后 siRNA 溶液。分别于紫外分光光度仪下在波长为 230、260 及 280 nm 处测定吸光度(A)值,分别记为 A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} ,计算 A_{260}/A_{280} 与 A_{260}/A_{230} 的值。

siRNA 在波长 260 nm 处有最大吸收,蛋白在 280 nm 处有最大吸收,波长 230 nm 处有吸收则表明样品中存在一些污染物,如碳水化合物、盐(胍盐)等^[15-16]。纯 siRNA 的 A_{260}/A_{280} 为 2.0,比值小于 2.0 时,表明蛋白含量高,比值大于 2.0 时,表明 siRNA 有降解^[17]。纯 siRNA 的 A_{260}/A_{230} 为 1.8~2.2,比值降低往往是样品污染所致^[15]。结果表明,siRNA 处理前后的 A_{260}/A_{280} 接近 2.0, A_{260}/A_{230} 为 1.8~2.2,表明制备过程对 siRNA 基本没有影响,不会造成 siRNA 降解。

2.3 siRNA 的 UHPLC-MS 分析

利用安捷伦 1290 UHPLC 串联 6545 QTOF-MS 对双链 siRNA 的相对分子质量进行检测^[18],以判定制备过程对 siRNA 的影响。

取处理后 siRNA 溶液,色谱条件: Waters Acquity OST C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 检测波长 260 nm,进样量 1 μL,体积流量 0.2 mL·min⁻¹,柱温 60 °C,流动相 A 为含 15 mmol·L⁻¹ TEA 和 100 mmol·L⁻¹ HFIP 的水溶液,流动相 B 为含有 15 mmol·L⁻¹ TEA 和 100 mmol·L⁻¹ HFIP 的 50% 甲醇水溶液。梯度洗脱(0~1.5 min, 98% A; 1.5~8.3 min, 68% A; 8.3~16.5 min, 62% A; 16.5~20.0 min, 58% A)。离子源参数:气流温度保持在 320 °C,电压为 3.5 kV,鞘气体积流量为 12 L·min⁻¹,鞘气温度为 350 °C。对 siRNA 质谱信号进行解卷积,得到精确相对分子质量。

处理前 siRNA 两条链相对分子质量分别为

6 969、7 095,处理后质谱图中双链 siRNA 的相对分子质量分别为 6 969.34、7 095.43,结果见图 1,进一步表明 siRNA 没有发生降解。

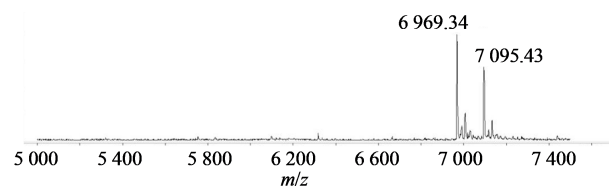


图1 处理后 siRNA 解卷积质谱图

Fig. 1 Deconvoluted mass spectrum of treated siRNA

2.4 siRNA 的定量分析方法建立

RiboGreen RNA 定量试剂是一种超灵敏的核酸荧光染料,使用该染料可以对溶液中游离的 RNA 进行简单快速的定量。常规定量 RNA 的方法是在 260 nm 处检测溶液的 A 值,但是这种定量方法灵敏度差,且易受溶液中寡核苷酸、蛋白、盐离子等的影响。使用 RiboGreen 荧光染料可避免上述问题^[17,19]。

先用 DEPC 水配制含 1 mmol·L⁻¹ EDTA、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 的 pH 7.5 的 Tris 缓冲液(其中 EDTA 及 Tris-HCl 均为新开试剂)。20 mg siRNA 粉末加入 4 mL DEPC 处理水溶解得到 siRNA 储备液。用 Tris 缓冲液作为稀释液,并加入一定体积的 RiboGreen RNA 定量试剂,将 siRNA 储备液稀释成质量浓度为 1 000、500、100、20 ng·mL⁻¹ 的 siRNA 标准液,室温静置 5 min 后,使用酶标仪在激发波长 500 nm、发射波长 525 nm 处检测样品的荧光值(FI),以 FI 对 siRNA 的质量浓度(C)进行回归分析。结果显示 $FI=6 \times 10^{-6} C - 0.011 4$ ($r=0.997 9$),表明在 0~1 μg·mL⁻¹ 内, FI 和 C 的线性关系良好。

2.5 siRNA-CPG 的封装率测定方法

当 RiboGreen 荧光染料加入 siRNA 溶液后,游离的 siRNA 与其结合,被包封的 siRNA 则不与其结合,不产生荧光,这种方法可以测定游离核酸药物的量^[17]。

制备的空白纳米载体、siRNA-PG 及 siRNA-CPG 用 Tris 缓冲液稀释后,按 RiboGreen 试剂盒说明书对样品中游离 siRNA 进行测定。用酶标仪设置激发波长 500 nm,发射波长 525 nm,测定并计算 siRNA-CPG 中游离 siRNA 的 FI : $FI = FI_{\text{siRNA-CPG 或 siRNA-PG}} - FI_{\text{空白纳米载体组}}$ 。通过“2.4”项下回归方程计算对应的样品中游离的 siRNA 的质量浓度(C_f),加入的 siRNA 的量为 siRNA 的总量(C_t),计算 siRNA 的封装率。

$$\text{包封率} = (C_i - C_f) / C_i$$

2.6 siRNA-CPG理化性质测定方法

取 siRNA-CPG 冻干粉适量用生理盐水复溶并稀释,用激光散射粒径仪在粒径测定模式下测定样品的粒径及多分散系数(PDI),在 Zeta 电位测定模式下测定样品的 Zeta 电位。

2.7 siRNA-CPG 的单因素处方优化

2.7.1 siRNA-CPG 的单因素处方优化方法 按照“2.1”项下方法制备 siRNA-CPG,以包封率、Zeta 电位及粒径为指标,对 siRNA 与壳聚糖质量比(其中 siRNA 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),PLGA 的质量浓度,内水相、二氯甲烷、外水相的体积比进行考察。根据这 3 个因素对处方影响大小依次进行优化,考察条件:PLGA 质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,内水相、二氯甲烷、外水相的体积比为 1:10:100 时,考察 siRNA 与壳聚糖质量比为 1:0、1:1、1:2、1:4 对 siRNA-CPG 的影响;内水相、二氯甲烷、外水相的体积比为 1:10:100,siRNA 与壳聚糖质量比为 1:2 时,考察 PLGA 的质量浓度为 5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 siRNA-CPG 的影响;PLGA 质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,siRNA 与壳聚糖质量比为 1:2 时,考察内水相、二氯甲烷、外水相的体积比为 1:10:80、1:10:100、1:10:200 对 siRNA-CPG 的影响。每个试验重复 3 次。

2.7.2 siRNA-CPG 的单因素处方优化结果 如表 1 所示,随着壳聚糖的量逐渐增加,制备的 siRNA-CPG 粒径相差不大。Zeta 电位结果显示,不加入壳聚糖时,siRNA-PG 带负电,而随着壳聚糖的浓度增大,Zeta 电位由负值变为正值且逐渐增大。包封率测定结果表明,当体系中不加入壳聚糖时,siRNA 的包封率仅为 $(3.14 \pm 0.26)\%$;当 siRNA 与壳聚糖质量比为 1:2、1:4 时,siRNA 与壳聚糖可以复合而不产生沉淀,且制备的 siRNA-CPG 中 siRNA 的包封率达到 95% 以上,这一结果与文献报道数据一致^[20]。考虑到制剂生产成本,确定 siRNA 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,壳聚糖质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

如表 2 所示,随着 PLGA 浓度增加,siRNA-CPG 的 Zeta 电位由正电位慢慢降低,又转为负电位,粒径缓慢增加,包封率均可达到 90% 以上。中性 Zeta 电位有利于延长载体在体内的循环时间。粒径越大,则越容易被网状内皮系统清除,体内循环时间就越短^[21]。结合粒径和 Zeta 电位的结果,以 PLGA 质量浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为中心点,进行进一步的处方优化与确证。

由表 3 可知,外水相比比例越大,制备的 siRNA-

表 1 不同 siRNA 与壳聚糖的质量比制备的 siRNA-CPG 的包封率及理化性质 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Encapsulation efficiency and physicochemical properties of siRNA-CPG prepared by different mass ratio of siRNA to chitosan ($\bar{x} \pm s, n=3$)

siRNA 与 壳聚糖 质量比	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/ mV	包封率/%
1:0	215.3±9.8	0.149±0.056	-22.25±1.74	3.14±0.26
1:1	/	/	/	/
1:2	227.7±4.5	0.124±0.052	1.74±0.78	95.50±1.60
1:4	232.8±1.3	0.123±0.026	12.41±0.45	95.14±3.34
“/”-由于产生沉淀,未测定				
“/”-sample produced precipitation and was not determined				

表 2 不同 PLGA 质量浓度制备的 siRNA-CPG 的包封率及理化性质 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Encapsulation efficiency and physicochemical properties of siRNA-CPG prepared by different PLGA concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

PLGA/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/ mV	包封率/%
20	248.5±2.8	0.145±0.071	-2.25±2.64	95.40±1.27
10	227.6±4.5	0.124±0.042	1.24±1.88	94.85±0.49
5	223.3±4.1	0.133±0.035	10.54±1.98	91.85±0.49

表 3 不同内水相、二氯甲烷、外水相的体积比制备 siRNA-CPG 的包封率及粒径 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Encapsulation efficiency and physicochemical properties of siRNA-CPG prepared by different volume ratio of internal water phase, dichloromethane and external water phase ($\bar{x} \pm s, n=3$)

内水相、二氯 甲烷、外水相 的体积比	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/ mV	包封率/%
1:10:80	274.4±2.8	0.196±0.070	-2.74±1.08	96.05±5.16
1:10:100	230.9±0.3	0.121±0.015	-0.74±1.78	95.30±1.98
1:10:200	201.7±0.8	0.100±0.059	1.74±2.18	93.90±0.70

CPG 的 Zeta 电位均接近电中性,包封率均在 90% 以上,但粒径有减小趋势,可能是由于外水相为连续相,连续相体积增大使得乳滴形成空间增大,减少彼此间的碰撞,乳滴间不易聚集,导致粒径减小^[22]。结合粒径和 Zeta 电位的结果,以外水相、内水相的体积比 100 为中心点,进行进一步的处方优化与确证。

2.8 星点设计-效应面法优化处方

2.8.1 实验设计 由于壳聚糖的加入是影响处方

包封率的最大因素,且考虑到成本,壳聚糖浓度越低越好。根据单因素考察结果,确定 siRNA 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,壳聚糖质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以粒径(R_1/nm)、Zeta 电位(R_2/mV)、包封率($R_3/\%$)为评价指标,对 PLGA 质量浓度(A)及外水相与内水相的体积比(B)做进一步优化,其考察范围分别为 A: $3 \sim 17 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; B: $72 \sim 128$ 。根据星点设计原理,每个因素设 5 个水平。各因素及水平设置见表 4。

2.8.2 siRNA-CPG 的星点设计-效应面法优化处方结果 星点设计-效应面法优化处方结果见表 5。

表 4 星点设计因素水平表

Table 4 Factors and levels of central composite design

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
A/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	3	5	10	15	17
B	72	80	100	120	128

表 5 星点设计试验方案及效应值

Table 5 Composite design and response

序号	A/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	B	R_1/nm	R_2/mV	$R_3/\%$
1	5	80	255.4	8.74	93.5
2	17	100	240.3	1.13	94.6
3	10	128	225.1	1.45	94.5
4	10	72	280.9	2.10	95.2
5	3	100	218.9	12.84	93.5
6	15	120	231.9	1.80	93.2
7	15	80	289.0	1.70	96.3
8	10	100	230.0	2.01	95.3
9	10	100	227.5	1.98	93.2
10	10	100	227.7	1.50	94.3
11	10	100	230.3	1.31	96.2
12	10	100	228.2	1.51	93.5
13	5	120	220.1	10.08	93.0

2.8.3 模型拟合和方差分析 以粒径(R_1/nm)、Zeta 电位(R_2/mV)、包封率($R_3/\%$)作为因变量,PLGA 质量浓度(A)及内水相与外水相的体积比(B)为自变量,应用 Design expert 12.0 软件进行多元线性回归和多项式方程拟合,采用复相关系数(r)对模型进行评价。采用 ANOVA 分析效应面的回归参数。

2.8.4 统计分析 采用 Design expert 12.0 进行效应面二次模型的方差分析,拟合方程如下: $R_1 = 228.74 + 9.46 A - 21.41 B - 5.45 AB + 2.38 A^2 + 14.08 B^2$, $P < 0.000 1$, $r^2 = 0.970 3$; $R_2 = 1.66 - 3.99$

$A + 0.065 1 B - 0.310 0 AB + 2.96 A^2 + 0.356 5 B^2$, $P < 0.000 1$, $r^2 = 0.978 4$; R_3 的模型中 $P > 0.05$, $r^2 = 0.335 8$ 。由 r^2 及 P 可知方程 R_1 和 R_2 的拟合效果良好,具有统计学意义; R_3 的拟合效果不好,没有统计学意义,不进行统计。表明 PLGA 质量浓度及内水相与外水相的体积比对载体粒径和 Zeta 电位有显著影响,对包封率无显著影响。

2.8.5 效应面优化 采用 Design expert 12.0 软件分析,绘制 2 个因变量与 2 个自变量的三维效应面和二维等高图,预测最佳条件。结果见图 2。

载体 Zeta 电位中性利于其体内循环,因此 Zeta 电位值应为 0 mV 左右,粒径越小越好^[23]。如图 2 中等高线重合图所示,将最优 Zeta 电位范围定为 $(0 \pm 2) \text{ mV}$,则载体粒径范围可定为小于 230 nm ,此时 $A > 9.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $B > 98$ 。综合考虑成本及操作容易的因素,将 PLGA 质量浓度定为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,内水相、二氯甲烷、外水相的体积比为 $1:10:100$,模型预测值为粒径 228.7 nm ,Zeta 电位 1.66 mV ,并对此处方进行验证。

2.9 处方验证

按上述最佳条件制备 3 批 siRNA-CPG,并对其粒径、电位、稳定性及细胞内递送进行测定。

2.9.1 siRNA-CPG 粒径及电位测定 如图 3 所示,由本研究筛选的处方制备 3 批 siRNA-CPG,粒径为 $(231.6 \pm 1.4) \text{ nm}$,PDI 为 0.089 ± 0.025 ,粒径分布均匀,Zeta 电位为 $(-0.66 \pm 2.14) \text{ mV}$,与预测值十分接近,表明上述模型合适有效。

2.9.2 siRNA-CPG 的稳定性 取 siRNA-CPG 冻干样品,用生理盐水复溶后,置于室温条件下,于 0、4、8、12、24、48 h 测定 siRNA-CPG 的粒径,用 RiboGreen 试剂对样品中游离的 siRNA 进行定量,并结合“2.4”项下的线性回归方程,用 RiboGreen 试剂对样品中游离的 siRNA 进行测定。用“2.5”项下包封率计算方法,计算各个时间点的包封率。

如图 4 所示,室温放置 48 h,3 批 siRNA-CPG 的粒径基本维持在 230 nm 左右,而包封率维持在 96% 左右,且各时间点与 0 h 的值间均无显著统计学差异($P > 0.01$)。表明 siRNA-CPG 复溶后室温放置 48 h 内药物不会发生泄漏,粒径也不发生变化。说明其复溶后室温放置 48 h 内稳定性良好。

取 siRNA-CPG 冻干样品,用生理盐水复溶后,在 37°C 下与 50% FBS 共同孵育 24 h,于 0、4、8、24 h 测定样品粒径,然后各个时间点样品离心,并用 DEPC 水清洗 3 遍,加入肝素钠水溶液将载体中

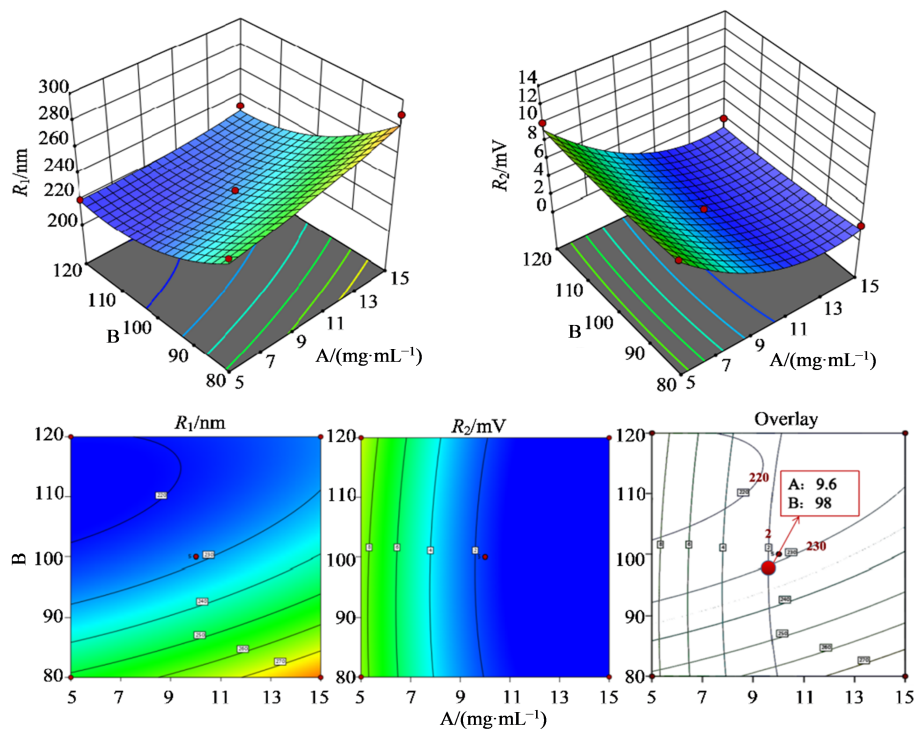
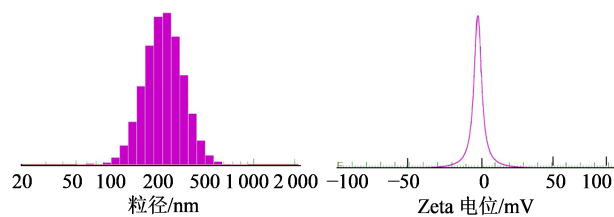
图2 R_1 和 R_2 的效应面图和等高线图Fig. 2 Effect surface diagram and two-dimensional plot of R_1 and R_2 

图3 siRNA-CPG的粒径分布和Zeta电位

Fig. 3 Particle size distribution and Zeta potential of siRNA-CPG

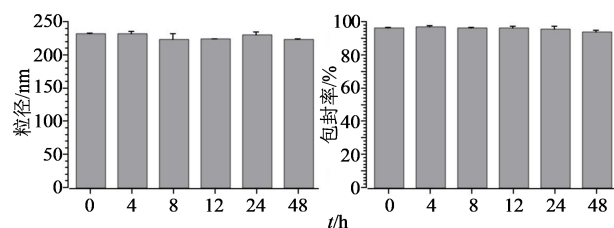


图4 siRNA-CPG生理盐水复溶后室温放置不同时间粒径及包封率变化

Fig. 4 Particle size and entrapment efficiency of siRNA-CPG at room temperature for different times after redissolution of normal saline

siRNA置换出来^[13-14],室温孵育1 h后,结合“2.4”项下的线性回归方程,用RiboGreen试剂对样品中游离的siRNA进行测定,并计算释放率(C_f/C_i)。如图5所示,37℃条件下siRNA-CPG与50% FBS共同孵育24 h,3批siRNA-CPG的粒径略有增加维持在240 nm左右,且各时间点与0 h的均值均无显著统计学差

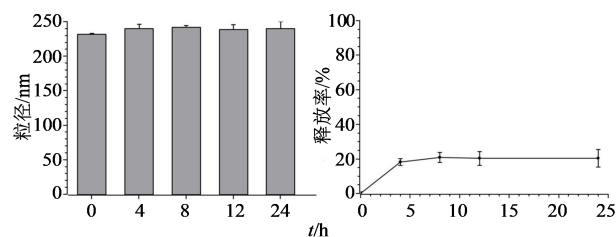


图5 37℃条件下siRNA-CPG与50% FBS共同孵育24 h内粒径变化及释放情况

Fig. 5 Particle size changes and release of siRNA-CPG in 50% FBS solution within 24 h at 37 °C

异($P>0.01$)。前4 h siRNA释放为20%左右,可能是由于吸附在载体外层的siRNA被血清中核酸酶降解导致^[4],而4 h后 siRNA基本上不再释放。表明 siRNA-CPG复溶后在血清中24 h内被包载进入载体的siRNA不会发生泄漏,且载体也不会发生聚集,稳定性良好。

2.10 siRNA-CPG细胞内递送

siRNA-CS制备过程中加入50 μL 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DiR乙醇溶液,其他制备过程与“2.1”项下 siRNA-CPG制备过程一致,制备成荧光标记的 siRNA-CPG(D-siRNA-CPG)。

MCF-7细胞复苏后,于含有10% FBS和1%双抗的RPMI 1640完全培养基中,在含有5% CO_2 的37℃恒温培养箱进行培养。以0.25% EDTA胰酶消化成单分散细胞,以每孔 6×10^4 的细胞密度铺于事

先加有爬片的24孔板中,培养过夜,用含D-siRNA-CPG(siRNA质量浓度为 $0.4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的新鲜培养液替换原孔中培养液继续培养4 h后,加入Hoechst 33342和LysoTracker Green DND-26,继续培养20 min,弃去培养基,磷酸缓冲液(PBS)洗3次,用4%多聚甲醛固定,盖到载玻片上,于激光共聚焦显微镜下观察(设置DiR的激发波长748 nm,发射波长780 nm)。

如图6中所示,红色为siRNA-CPG,绿色为溶酶体,蓝色为细胞核,红色围绕着蓝色表示siRNA-CPG被递送到细胞内并围绕在细胞核周围。图中所标圆圈内红色与绿色重合呈橙色表明siRNA-CPG被递送到溶酶体。红色与绿色不重合区域呈单独红色则说明siRNA-CPG被递送到了细胞质中^[23],有利于siRNA-CPG在细胞质发挥mRNA沉默作用。细胞摄取结果表明siRNA-CPG可将siRNA递送到细胞质中。这为siRNA发挥治疗作用奠定基础。

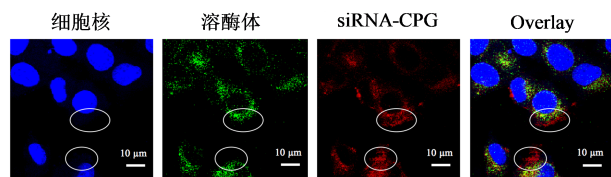


图6 siRNA-CPG体外细胞的摄取及分布情况

Fig. 6 In vitro uptake and distribution of siRNA-CPG

3 讨论

目前,临床上可用于siRNA递送的材料很少,实验室研究中用于的siRNA递送的材料众多,但多数都比较复杂。材料的免疫原性、长期安全性,简化从实验室到临床的过渡都是需要重点关注的问题^[24]。含有多种成分的复杂配方不仅难以扩大规模,而且从生产监管的角度来看,成本高昂且具有挑战性^[24]。本研究采用PLGA及壳聚糖安全且无免疫原性^[7,12],载体制备过程简单,利于siRNA药物的临床应用及产业化。

siRNA为水溶性的带负电大分子,带正电的材料将有利于siRNA在纳米粒中的包载^[25-26]。壳聚糖是天然多糖中唯一的碱性多糖,具有生物降解性和生物相容性^[26],与siRNA可以通过正负电荷相互作用形成复合物,但单独由siRNA与壳聚糖复合形成的纳米粒稳定性差,室温放置几小时,就会发生蓄积沉淀。PLGA材料在临床应用十分广泛,但其亲水性差^[7],显电中性,对siRNA对包封率极低。将两者混合使用,一方面可以增加siRNA的包封率,一

方面可以增加体系的稳定性。

本研究采用PLGA及壳聚糖作为材料制备携siRNA纳米载体,以克服siRNA药物临床应用的难题。本研究制备的PLGA纳米载体中加入壳聚糖,可将siRNA的包封率从3.14%增加到90%以上。由此可见,壳聚糖可以替代聚阳离子试剂加入到PLGA纳米载体中显著增加siRNA的包封率。所制备的siRNA-CPG冻干粉针用生理盐水复溶后,在室温48 h内及血清中24 h内包封率及粒径均无明显变化,表明引入壳聚糖制备的PLGA纳米粒稳定性良好。细胞摄取实验还证明siRNA-CPG可以被细胞摄取并从溶酶体中逃逸出来,确保siRNA在细胞质中发挥治疗作用。

本研究制备的siRNA-CPG纳米粒包封率高,稳定性好,为siRNA的有效包载及递送提供了一种新递送技术,对推进siRNA药物研发进程具有重大意义。但siRNA-CPG纳米粒中siRNA体外对细胞的干扰作用及体内的有效稳定递送尚待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Dong Y Z, Siegwart D J, Anderson D G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 144: 133-147.
- [3] Geary R S, Watanabe T A, Truong L, et al. Pharmacokinetic properties of 2'-O- (2-methoxyethyl) - modified oligonucleotide analogs in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 296(3): 890-897.
- [4] Watts J K, Delevey G F, Damha M J. Chemically modified siRNA: Tools and applications [J]. Drug Discov Today, 2008, 13(19/20): 842-855.
- [5] Choi H S, Liu W H, Liu F B, et al. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles [J]. Nat Nanotechnol, 2010, 5(1): 42-47.
- [6] Ledford H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait [J]. Nature, 2018, 560(7718): 291-292.
- [7] Makadia H K, Siegel S J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier [J]. Polymers, 2011, 3(3): 1377-1397.
- [8] Risnayanti C, Jang Y S, Lee J J, et al. PLGA

- nanoparticles co-delivering MDR1 and BCL2 siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 7498.
- [9] Subhan M A, Attia S A, Torchilin V P. Advances in siRNA delivery strategies for the treatment of MDR cancer [J]. *Life Sci*, 2021, 274: 119337.
- [10] Zhou J B, Patel T R, Fu M, et al. Octa-functional PLGA nanoparticles for targeted and efficient siRNA delivery to tumors [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(2): 583-591.
- [11] Gwak S J, Kim B S. Poly (lactic-co-glycolic acid) nanosphere as a vehicle for gene delivery to human cord blood-derived mesenchymal stem cells: Comparison with polyethylenimine [J]. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(7): 1177-1182.
- [12] Wang J C. Treatment of cervical cancer by siRNA-loaded chitosan-coated calcium phosphate nanoparticles [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2018, 27(8): 517-529.
- [13] Jia N, Ma J J, Gao Y, et al. HA-modified R8-based bola-amphiphile nano complexes for effective improvement of siRNA delivery efficiency [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(4): 2084-2093.
- [14] He C B, Yue H M, Xu L, et al. siRNA release kinetics from polymeric nanoparticles correlate with RNAi efficiency and inflammation therapy via oral delivery [J]. *Acta Biomater*, 2020, 103: 213-222.
- [15] Wilfinger W W, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity [J]. *Biotechniques*, 1997, 22(3): 474-6, 478.
- [16] Krebs S, Fischaleck M, Blum H. A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples [J]. *Anal Biochem*, 2009, 387(1): 136-138.
- [17] Kuhlman P, Duff H L, Galant A. A fluorescence-based assay for multisubunit DNA-dependent RNA polymerases [J]. *Anal Biochem*, 2004, 324(2): 183-190.
- [18] Capaldi D, Ackley K, Brooks D, et al. Quality aspects of oligonucleotide drug development: Specifications for active pharmaceutical ingredients [J]. *Ther Innov Regul Sci*, 2012, 46(5): 611-626.
- [19] Jones L J, Yue S T, Cheung C Y, et al. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization [J]. *Anal Biochem*, 1998, 265(2): 368-374.
- [20] 张德蒙, 娄茹云, 王雨, 等. 壳聚糖/siRNA纳米粒的制备与性能研究 [J]. *功能材料*, 2016, 47(2): 2188-2192.
- Zhang D M, Lou R Y, Wang Y, et al. Preparation and property characterization of chitosan/siRNA nanoparticles [J]. *J Funct Mater*, 2016, 47(2): 2188-2192.
- [21] Kayser O, Lemke A, Hernández-Trejo N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2005, 6 (1): 3-5.
- [22] 平其能. 现代药剂学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 107-109.
- Ping Q N. *Modern Pharmacy* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1998:107-109.
- [23] Cao H Q, Zou L L, He B, et al. Albumin biomimetic nanocorona improves tumor targeting and penetration for synergistic therapy of metastatic breast cancer [J]. *Adv Funct Mater*, 2017, 27(11): 1605679.
- [24] Saw P E, Song E W. siRNA therapeutics: A clinical reality [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(4): 485-500.
- [25] Byeon Y, Lee J W, Choi W S, et al. CD44-targeting PLGA nanoparticles incorporating paclitaxel and FAK siRNA overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(21): 6247-6256.
- [26] 马彩娟, 张伟爱, 白研. 壳聚糖定量分析方法的研究进展 [J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(6): 805-810.
- Ma C J, Zhang W A, Bai Y. Progress on the quantitative analysis of chitosan [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2016, 32(6): 805-810.

[责任编辑 兰新新]