

共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒的制备及其对乙型肝炎体外药效学研究

王 锐¹, 李娅兰¹, 李建月¹, 杨 婧^{2*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 利用脂质体可以共载水溶性物质和油溶性物质的特点, 制备共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒, 并进行制备工艺优化以及体外抑制乙型肝炎的药效学研究。方法 采用单因素考察和星点设计-效应面法, 优化共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒的制备工艺, 采用电位粒径仪测定其粒径和电位, 透射电子显微镜 (TEM) 观察其形态。通过 MTT 比色法、细胞划痕实验、细胞摄取实验、ELISA 法检测乙肝核心抗原 (HBeAg) 和乙肝表面抗原 (HBsAg) 表达水平等实验进行体外药效学研究。结果 确定最佳工艺为 (2,3-二油氧基-丙基)三甲基氯乙铵 (DOTAP) 与胆固醇的质量比为 3:1, 五味子油与脂质体的质量比为 1:5, 旋蒸温度 30 °C, 超声时间 70 min, 包封率可达 84.08%, 测得粒径为 (134.000±0.035) nm, Zeta 电位为 (44.000±0.027) mV, 形状呈不规则的圆形。体外药效学实验表明, 共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒体外抑制乙型肝炎的效果显著。结论 成功制备了新型脂质体纳米给药系统。体外药效学实验表明五味子油具有较好的协同 HBx-siRNA 抑制乙型肝炎的作用。

关键词: 小干扰 RNA; 五味子油; 阳离子脂质体; 纳米粒; 乙型肝炎; 星点设计-效应面法; MTT 法; ELISA 法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)15-4519-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.009

Pharmacodynamics of HBx-siRNA and *Schisandrae Chinensis Fructus* oil cationic liposome nanoparticles on hepatitis B *in vitro*

WANG Rui¹, LI Ya-lan¹, LI Jian-yue¹, YANG Jing²

1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Basic Medical College of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To make use of the characteristic that liposome can co-carry water-soluble substance and oil-soluble substance, the co-carried HBx-siRNA and Wuweizi (*Schisandra Chinensis Fructus*, SCF) oil cationic liposome nanoparticles were prepared, and the preparation process is optimized as well as the *in vitro* pharmacodynamic study on the inhibition of hepatitis B. **Methods** The single factor test and central composite design-response surface methodology were used to optimize the preparation process of cationic liposome nanoparticles co-loaded with HBx-siRNA and SCF oil. The particle size and potential were measured by a potential particle size analyzer, and the morphology was observed by a transmission electron microscope (TEM). *In vitro* pharmacodynamic studies were conducted through experiments such as MTT colorimetric method, cell scratch test, cell uptake test, and ELISA method for detecting the expression levels of hepatitis b core antigen (HBeAg) and hepatitis b surface antigen (HBsAg). **Results** The optimal conditions were determined as follows: The mass ratio of (2,3-dioleoyloxy-propyl)-trimethylam monium (DOTAP) to cholesterol was 3:1, the mass ratio of SCF oil to liposome was 1:5, steaming temperature was 30 °C, and ultrasonic time was 70 min. The encapsulation efficiency reached 84.08%, and the measured particle size was (134.000 ± 0.035) nm, Zeta potential was (44.000 ± 0.027) mV, and the shape was irregular and round. *In vitro* pharmacodynamics experiments showed that HBx-siRNA co-loaded with SCF oil group had the best efficacy. The co-carrier of HBx-siRNA and SCF oil cationic liposome nanoparticles had significant inhibitory effect on hepatitis B *in vitro*. **Conclusion** A new liposome nanometer drug delivery system

收稿日期: 2021-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603418)

作者简介: 王 锐, 教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为新药及新剂型。Tel: (0451)87266893 E-mail: wrdx@sina.com

*通信作者: 杨 婧, 教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为新药开发。Tel: (0451)82195940 E-mail: yangjingdx@sina.com

was successfully prepared. *In vitro* pharmacodynamic experiments showed that SCF oil had a good synergistic effect with HBx-siRNA for the inhibition of hepatitis B.

Key words: siRNA; *Schisandrae Chinensis Fructus* oil; cationic liposomes; nanoparticles; hepatitis B; effect surface method for star point design; MTT colorimetric method; ELISA method

乙型病毒性肝炎是由乙肝病毒诱发的以肝脏病变为主的传染性疾病。由世界卫生组织统计报道全球慢性乙肝病毒患者约有 2.57 亿,且 88.7 万人因感染乙肝病毒而死亡,中国乙肝病毒患者约 9300 万例,其中慢性乙型肝炎病患约 2000 万例^[1-2]。小干扰 RNA (siRNA) 技术广泛应用于乙肝病毒的治疗。但裸 siRNA 生物半衰期短,容易被胞浆、血液和组织中的酶类降解,生物利用度低。细胞膜表面带有负电荷,且 siRNA 是带有负电荷的亲水性物质,因此, siRNA 进入细胞需要载体介导。北五味子具备护肝的功能,目前对于木脂素的研究较为广泛,对于北五味子油的研究较少,牛莉萍^[3]研究发现北五味子油可通过增加 HepG2 细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS) 含量而达到使 HepG2 细胞凋亡的功能。脂质体作为一种非病毒载体具有无传染性、无载体容量制约、化学结构可操控,无致癌危险和抗原性^[4-7]。siRNA 为水溶性物质,利用阳离子脂质体可同时装载水溶性物质和脂溶性物质的特点,选取具有保肝作用的北五味子提取物五味子油^[8-9],将两者同时装载于阳离子脂质体内,探究五味子油是否可协同乙型肝炎型小干扰 RNA (HBx-siRNA),以达到更好的抑制乙肝病毒的功效。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

OSB-2200 旋转蒸发仪,日本 EYELA 株式会社;超声细胞破碎仪,美国 SONICS 公司;SYNERGY H1 酶联免疫检测仪,美国伯腾仪器有限公司;JEM-2100 透射电子显微镜 (TEM),日本电子株式会社;U-CTR30-2 荧光倒置显微镜,德国徕卡公司;粒径电位仪,北京普析通用仪器有限责任公司;CFX Connect™ 荧光定量 PCRA 仪,美国 BIO-RAD 公司;DW-86L386-80 °C 低温冰箱,美国 Thermo 公司;生物分光光度计、离心机, Eppendorf 公司;涡旋振荡仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 药品与试剂

五味子油,江西森海植物油有限公司,批号 20181022,检测报告:橙黄色透明油状液体,气清香,相对密度 0.972 0~0.992 0,折光率 1.492 0~1.568 0,酸值≤20 mg KOH/g,砷盐≤0.2 μg/kg,

重金属≤0.001 mg/kg,亚油酸≥10%,五味子甲素≥2.0%。(2,3-二油氧基-丙基)三甲基氯乙铵(*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride, DOTAP),上海斯信生物有限公司,批号 RD-01173;氯仿、异丙醇、无水乙醇,天津市永大化学试剂有限公司;胆固醇,国药集团化学试剂有限公司,批号 20130618;透明质酸(批号 H02N8J47121)、鱼精蛋白(批号 Z31O8H47046)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000,批号 P31M8S32960),上海源叶生物科技有限公司;siRNA (序列见表 1)、荧光标记的 siRNA (FAM-siRNA),苏州吉玛基因股份有限公司;经焦碳酸二乙酯处理过的高温消毒的水(DEPC),北京博奥拓达科技有限公司,批号 PM11649;二甲基亚砜,上海索莱宝生物科技有限公司,批号 D8418;MEM 培养基,HyClone 公司,批号 AE27142269;胰酶细胞消化液,碧云天生物技术有限公司,批号 C0201;无菌 PBS,北京博奥拓达科技有限公司,批号 180523;胎牛血清,赛澳美细胞技术有限公司,批号 20180522;双抗,美国 Gibco 公司,批号 J150038;MTT,赛国生物科技有限公司,批号 EZ3455C328。

表 1 siRNA 序列

Table 1 siRNA sequence

基因	引物	序列
HBx-siRNA	sense primer	5'-GAAUCCUCACAAUACCGCATT-3'
	anti-sense primer	5'-UGAGAGUCCAAGAGUCCUUTT-3'
NC siRNA	sense primer	5'-GAAUCCUCACAAUACCGCATT-3'
	anti-sense primer	5'-UGCGGUAUUGUGAGGAUUCTT-3'

1.3 细胞株与培养基

1.3.1 细胞株 HepG2.2.15 表达 HBV 病毒的人肝细胞,购于上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.3.2 培养基 α-MEM+10% FBS+1%双抗+1%丙酮酸钠,在 37 °C, 5% CO₂ 条件下进行培养。

2 方法与结果

2.1 共载 HBx-siRNA 和五味子油阳离子脂质体纳米粒的制备

称量 DOTAP 和胆固醇放置到圆底烧瓶内,量取适量的 CHCl₃ 溶解。置于旋转蒸发仪上除去

CHCl₃, 待烧瓶内壁形成一层脂质体薄膜即可。加入适量的 0.1% DEPC 水溶液洗下薄膜。超声处理 30 min, 加入五味子油, 细胞破碎仪下超声 60 s, 再缓慢多次通过 0.45 μm 滤膜, 即得五味子油阳离子脂质体^[10]。

量取处方量 0.1% DEPC 水溶液, 充分震荡使 HBx-siRNA 溶解均匀。将 siRNA 溶液与等体积的透明质酸混合, 震荡均匀, 加入适量的鱼精蛋白, 充分混合配制好的载五味子油的阳离子脂质体, 加入适量的 DSPE-PEG2000, 即制成共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒。

2.2 单因素实验优化脂质体纳米粒制备工艺

2.2.1 膜材比对包封率的影响 膜材比为阳离子脂质体的成膜成分 DOTAP 与胆固醇的质量比, 选择药脂比 1:5、超声时间 50 min、旋蒸温度 30 ℃, 使得膜材比为 5:1、4:1、3:1、2:1、1:1, 按照“2.1”项下方法制备五味子油阳离子脂质体, 考察包封率的变化, 结果包封率分别为 (64.45±0.28)%、(73.42±0.65)%、(79.54±0.44)%、(75.40±0.34)%、(70.38±0.46)% ($n=3$)。膜材比为 4:1、3:1、2:1 时脂质体的包封率较高, 故选取 4:1、3:1、2:1 为膜材比的 3 个水平, 进行后续考察。

2.2.2 药脂比对包封率的影响 选择膜材比 3:1、超声时间 50 min、旋蒸温度 30 ℃, 制备五味子油与脂质体的质量比为 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7 时, 按照“2.1”项下方法制备五味子油阳离子脂质体, 考察脂质体包封率的变化, 结果包封率分别为 (69.54±0.32)%、(75.32±0.45)%、(89.56±0.44)%、(91.12±0.43)%、(93.32±0.28)% ($n=3$)。脂质体与五味子油的质量比越大, 五味子油阳离子脂质体的包封率越大; 反之, 质量比越小, 包封率越小。综合考虑载药量以及包封率, 选择 1:4、1:5、1:6 为药脂比的 3 个水平。

2.2.3 超声时间对包封率的影响 选择膜材比 3:1、药脂比 1:5、旋蒸温度 30 ℃, 改变超声时间分别为 40、50、60、70、80 min, 按照“2.1”项下方法制备五味子油阳离子脂质体, 结果包封率分别为 (75.82±0.48)%、(80.93±0.25)%、(86.44±0.44)%、(83.72±0.56)%、(81.22±0.37)% ($n=3$)。超声时间为 50、60、70 min 时脂质体的包封率较高, 故选择 50、60、70 min 为超声时间 3 水平。

2.2.4 旋蒸温度对包封率的影响 固定膜材比 3:

1、药脂比 1:5、超声时间 50 min, 改变旋蒸温度分别为 20、30、40、50、60 ℃, 按照“2.1”项下方法制备五味子油阳离子脂质体, 结果包封率分别为 (81.32±0.47)%、(83.66±0.48)%、(83.12±0.72)%、(82.52±0.32)%、(80.47±0.43)% ($n=3$)。旋蒸温度为 20、30、40 ℃时包封率较高, 在 30 ℃时包封率最高, 因此, 选取 30 ℃为最优温度 (相比于其他单因素条件, 旋蒸温度影响包封率的范围很小, 故不必进一步优化)。

2.3 星点设计-效应面法优化五味子油阳离子脂质体处方工艺

2.3.1 实验设计与结果 根据单因素实验分析得出, 改变旋蒸温度, 得到的相邻包封率差值较小, 故旋蒸温度对五味子油阳离子脂质体的包封率影响不大, 因此, 以单因素考察实验为依据, 设定膜材比 (X_1)、药脂比 (X_2)、超声时间 (X_3) 为考察因素, 以五味子油包封率 (Y) 为评价指标, 每个因素设置 5 水平。分别用代码 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 $+1$ 、 $+\alpha$ 表示, 对于 3 因素的星点设计, $\alpha=1.682$ 。实验因素与水平安排及结果见表 2。

2.3.2 模型拟合 通过 Design Expert 8.0 软件分别对各因素的各水平进行二次多项式方程拟合。并根据方程通过 Design Expert 8.0 软件绘出三维效应面和二维等高线, 选取较优组合。二次多项式方程拟合结果为 $Y=-597.65636+51.56546X_1+59.73183X_2+12.21704X_3-3.05824X_1X_2+0.44088X_1X_3+0.78736X_2X_3-11.40424X_1^2-10.23924X_2^2-0.12149X_3^2$, $P<0.05$, $R^2=0.8765$, 回归方程关系显著, 符合要求。方差结果分析见表 3。

结果分析, Y 模型项 $P<0.05$, 证明所得回归方程效果显著。在 Y 模型方程中, X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 都是显著项, 是 Y 的显著影响因素。使用 Statistica 6.0 软件处理后得到二维等高线及三维效应面图, 确定最优方案为膜材比为 3:1, 药脂比为 1:5, 超声时间为 70 min。结果见图 1。

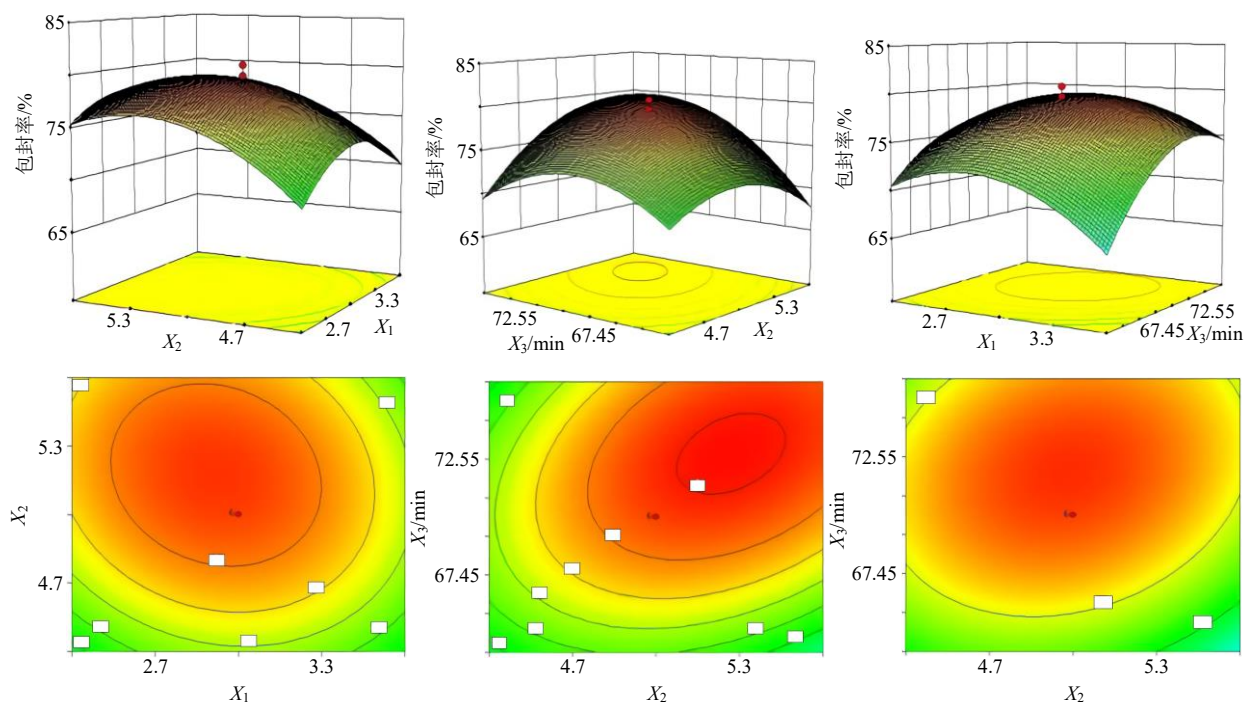
2.3.3 最佳工艺 采用薄膜分散法, 称取 DOTAP 和胆固醇的质量比为 3:1, 圆底烧瓶中加入适量的三氯甲烷, 30 ℃旋蒸成薄膜, 真空干燥 2 h 后超声处理 30 min, 称取五味子油与脂质体的比为 1:5, 超声 70 min, 取冻存的 HBx-siRNA, 4000 r/min 离心 1 min, 加入 0.1% DEPC 溶解。取含有 25 μg HBx-siRNA 的溶液加入等质量的透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 溶液混合形成 HA-siRNA。

表2 星点设计-效应面法实验因素水平安排及结果

Table 2 Horizontal arrangement and result of experimental factors in star point design-response surface method									
试验号	X_1	X_2	X_3/min	$Y/\%$	试验号	X_1	X_2	X_3/min	$Y/\%$
1	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	60 (0)	85.57	11	3.59 : 1 (+1)	1 : 5.59 (+1)	54.05 (-1)	65.05
2	2.41 : 1 (-1)	1 : 5.59 (+1)	65.95 (+1)	78.40	12	2 : 1 (-1.682)	1 : 5 (0)	60 (0)	81.24
3	3.59 : 1 (+1)	1 : 4.41 (-1)	54.05 (-1)	68.31	13	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	60 (0)	85.90
4	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	60 (0)	85.13	14	4 : 1 (+1.682)	1 : 5 (0)	60 (0)	70.45
5	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	60 (0)	84.82	15	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	70 (+1.682)	78.25
6	2.41 : 1 (-1)	1 : 4.41 (-1)	54.05 (-1)	67.21	16	3 : 1 (0)	1 : 4 (-1.682)	60 (0)	75.10
7	3 : 1 (0)	1 : 6 (+1.682)	60 (0)	79.10	17	3.59 : 1 (+1)	1 : 4.41 (-1)	65.95 (+1)	71.95
8	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	60 (0)	84.18	18	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	60 (0)	86.94
9	3.59 : 1 (+1)	1 : 5.59 (+1)	65.95 (+1)	81.56	19	2.41 : 1 (-1)	1 : 5.59 (+1)	54.05 (-1)	69.37
10	3 : 1 (0)	1 : 5 (0)	50 (-1.682)	70.83	20	2.41 : 1 (-1)	1 : 4.41 (-1)	65.95 (+1)	64.96

表3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis											
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值
模型	832.11	9	92.46	7.88	0.001 7	极显著	X_1^2	234.29	1	234.29	19.98
X_1	8.03	1	8.03	0.68	0.427 3		X_2^2	188.86	1	188.86	16.10
X_2	51.94	1	51.94	4.43	0.061 6		X_3^2	265.90	1	265.90	22.67
X_3	105.56	1	105.56	9.00	0.013 3	显著	残差	117.28	10	11.73	
X_1X_2	9.35	1	9.35	0.80	0.392 8		失拟项	113.12	5	22.62	27.14
X_1X_3	19.44	1	19.44	1.66	0.227 0		纯误差	4.17	5	0.83	
X_2X_3	61.99	1	61.99	5.29	0.044 3	显著	总和	949.39	19		

图1 膜材比 (X_1)、药脂比 (X_2)、超声时间 (X_3) 对包封率的三维效应面和二维等高线图Fig. 1 Three-dimensional effect surface and two-dimensional contour map of membrane material ratio (X_1), drug-lipid ratio (X_2) and ultrasonic time (X_3) on entrapment efficiency

以 HA-siRNA 与 PRTM 的质量比为 1 : 1 进行均匀混合, 得到 HA-siRNA-PRTM 复合物。在该复合物中加入 50 μ L 的载五味子油脂质体, 10 min 后加入 50 μ L DSPE-PEG2000, 在 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中静置 10 min。共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒制备完成。

2.3.4 最佳工艺验证 按照星点设计-效应面法筛选出最佳的载五味子油脂质体的制备工艺, 按照最佳工艺制备测定包封率, 并把实测值与预测值对比, 计算两数值之间的误差, 如表 4, 载五味子油阳离子脂质体包封率的预测值与实测值的相对偏差小于 5%, 证明该工艺准确可靠, 重复性良好, 星点设计实验所建立的数学模型预测性良好。课题组前期研究表明, HA-siRNA 与鱼精蛋白最佳质量比为 1.0 : 1.0 时, 复合物为带有负电荷的较小微粒。复合物 HBx-siRNA 的载药量为 25 μ g 时, 加入包和五味子油阳离子脂质体为 50 μ L 时, 制备工艺最佳。

表 4 实测值与预测值比较

序号	预测值/%	实测值/%	平均值/%	相对偏差/%
1	84.08	86.37	86.22	2.15
2		85.96		
3		86.25		
4		86.33		

2.4 脂质体纳米粒的表征

2.4.1 电位、粒径及形态的测定 按照“2.3.3”最佳工艺制备共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒样品, 分别取适量样品加到比色皿和样品池内, 用电位粒径仪检测粒径和 Zeta 电位^[11-12]。测得共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒的粒径为 (134.000 ± 0.035) nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.320 ± 0.022 , Zeta 电位为 (44.000 ± 0.027) mV。

2.4.2 透射电镜观察脂质体外观 按照“2.3.3”项下最佳工艺制备共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒样品, 取 5 μ L 滴加在铜网上, 室温静置至干燥, 将铜网置于 TEM 下观察脂质体的形态。并用 TEM 观察观察脂质体形态, 结果见图 2, 共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒呈不规则的类圆形。

2.5 脂质体纳米粒包封率的测定

2.5.1 标准曲线的建立 将荧光标记的 HBx-siRNA

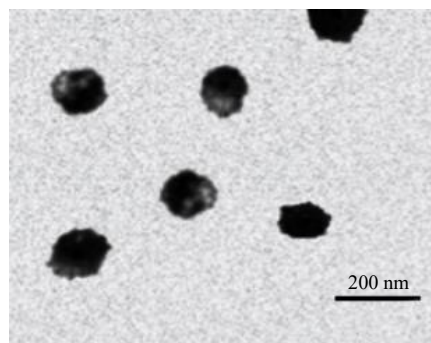


图 2 脂质体 TEM 图

Fig. 2 TEM of liposome

(FAM-HBx-siRNA) 溶解在适量的 0.1% DEPC 水中制备成 FAM-siRNA 储备溶液。取 0.1% DEPC 水将储备液分别稀释成 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 μ g/ μ L 质量浓度梯度的标准溶液。492 nm 波长下, 通过酶标仪测定每组吸光度 (A) 值。得到方程 $Y=1\ 005.4\ X+119.21$, $R^2=0.997\ 4$ 。由方程可知, A 值与 FAM-HBx-siRNA 质量浓度在 0.05~0.30 μ g/ μ L 具有良好的线性关系。

2.5.2 包封率和载药量的测定 按照最佳工艺制备共载 FAM-HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒。取适量的溶液进行离心 (4000 r/min), 取上清液, 在 492 nm 条件下, 采用多功能酶标仪测定 A 值, 根据标准曲线计算出游离 FAM-HBx-siRNA 质量浓度 (C), 计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (M - CI) / M$$

$$\text{载药量} = \text{微粒制剂中所含有的药物/微粒制剂的总量}$$

V 是样品体积, M 是溶液中的 FAM-HBx-siRNA 的总量

检测结果见表 5, 共载 FAM-HBx-siRNA 与五味子油脂质体纳米粒的包封率为 $(81.37 \pm 0.08)\%$, 载药量为 $(16.25 \pm 0.06)\%$, 证明 HBx-siRNA 和五味子油在脂质体中具有较好的包封率和载药量。

2.6 共载脂质体纳米粒对乙型肝炎病毒体外药效学研究

2.6.1 MTT 检测细胞增殖抑制实验 将 HepG2.2.15 细胞接种于 96 孔板内, 并使每孔含有细胞悬液 100 μ L。将 96 孔板放入细胞培养箱内放置 24 h, 至 HepG2.2.15 细胞单层平铺孔底, 弃去原培养基。加入制备好的浓度为 20、40、60、80、100 nmol/L 的共载 HBx-siRNA 与五味子油的阳离子脂质体纳米粒, 选取 0 nmol/L 浓度作为对照组, 每组设 3 个复孔。放入条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内, 放置 24、48 h。

表 5 载 HBx siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒封装率和载药量

Table 5 Encapsulation rate and drug loading of cationic liposome nanoparticles loaded with HBx siRNA and SCF oil

编号	V/ μ L	M/ μ g	A 值	封装率/%	平均封装率/%	载药量/%	平均载药量/%
1	100	25	166.23	81.28	81.37 $\pm$ 0.08	16.18	16.25 $\pm$ 0.06
2	100	25	165.83	81.44		16.29	
3	100	25	165.92	81.40		16.28	

同上分别加入载五味子油、载 HBx-siRNA、共载 HBx-siRNA 与五味子油的阳离子脂质体纳米粒 α -MEM 基本培养基 100 μ L。以 100 μ L 空白阳离子脂质体 α -MEM 基本培养基作为对照组，每一组设置 3 个复孔。放入条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内，放置 24、48 h。使用酶标仪，检测各孔 A 值，并记下各组数据。

如表 6 所示，在给药 24 h 后，20、40、60、80、100 nmol/L 浓度的共载 HBx-siRNA 与五味子油脂质体纳米粒对 HepG2.2.15 细胞抑制率分别是 7.97%、20.10%、37.98%、45.73%、54.63%。在给药 48 h 后，20、40、60、80、100 nmol/L 浓度的共载 HBx-siRNA 与五味子油脂质体纳米粒对 HepG2.2.15 细胞抑制率分别是 17.84%、33.33%、56.47%、68.87%、74.38%。说明共载 HBx-siRNA

与五味子油脂质体纳米粒对 HepG2.2.15 细胞增殖的抑制具有剂量相关性。通过细胞增殖抑制率计算公式（抑制率=1-A_{加药}/A_{对照}），计算得共载 HBx-siRNA 与五味子油脂质体纳米粒在 24、48 h 抑制 HepG2.2.15 细胞增殖 50% 时的药物浓度（IC₅₀）分别为 53.5、107.4 nmol/L。因此，在后续各实验时共载脂质体纳米粒的浓度选定为 100 nmol/L。

如表 7 所示，在给药后 24 h 时，载五味子油阳离子脂质体组的抑制率为 20.22%，载 HBx-siRNA 组的抑制率为 42.82%，共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体组的抑制率为 52.78%。在给药后 48 h 时，各组的抑制率明显增加，载五味子油阳离子脂质体组的抑制率为 25.10%，载 HBx-siRNA 组的抑制率为 59.26%，共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体组的抑制率为 73.59%。与阴性对照组

表 6 不同浓度阳离子脂质体纳米粒对 HepG2.2.15 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Inhibition of HepG2.2.15 cell proliferation by cationic liposome nanoparticles with different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ (nmol·L ⁻¹)	24 h		48 h	
		A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
对照	—	1.393 $\pm$ 0.025	—	1.452 $\pm$ 0.022	—
共载 HBx-siRNA 与	20	1.282 $\pm$ 0.031*	7.97	1.193 $\pm$ 0.035*	17.84
五味子油阳离子	40	1.113 $\pm$ 0.048*	20.10	0.968 $\pm$ 0.045*	33.33
脂质体纳米粒	60	0.864 $\pm$ 0.034*	37.98	0.632 $\pm$ 0.027*	56.47
	80	0.756 $\pm$ 0.051*	45.73	0.452 $\pm$ 0.023*	68.87
	100	0.632 $\pm$ 0.025*	54.63	0.372 $\pm$ 0.031*	74.38

与对照组比较：* $P < 0.05$ ，表 7~9 同

* $P < 0.05$ vs negative control group, same as table 7—9

表 7 阳离子脂质体纳米粒对 HepG2.2.15 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Inhibition of cationic liposome nanoparticles on the proliferation of HepG2.2.15 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

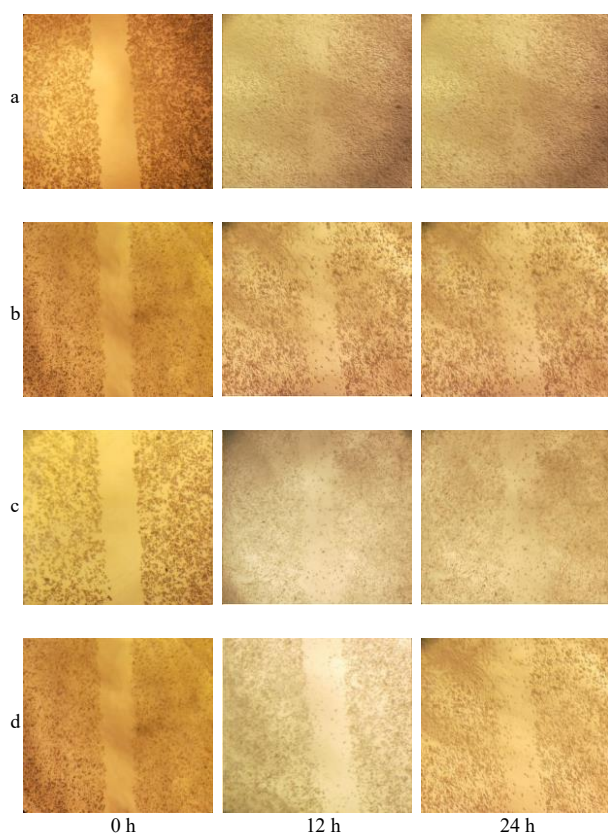
组别	24 h		48 h	
	A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
对照	1.385 $\pm$ 0.022	—	1.458 $\pm$ 0.032	—
载五味子油阳离子脂质体	1.105 $\pm$ 0.037*	20.22	1.092 $\pm$ 0.043*	25.10
载 HBx-siRNA	0.794 $\pm$ 0.026*	42.82	0.594 $\pm$ 0.027*	59.26
共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体	0.654 $\pm$ 0.018*	52.78	0.385 $\pm$ 0.028*	73.59

(空白阳离子脂质体组)进行对比,各组都具有统计学意义($P<0.05$)。由实验数据可知,在相同的给药时间内,共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体组的抑制率大于载 HBx-siRNA 组大于载五味子油阳离子脂质体组大于阴性对照组。共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒对 HepG2.2.15 细胞的增殖具有较好的抑制作用。

2.6.2 划痕实验检测细胞迁移能力 给药组分别加入载五味子油阳离子脂质体、载 HBx-siRNA、共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒含 1% FBS 的 α -MEM 培养基 2 mL。用含有 1% FBS 的 α -MEM 培养基作为对照。放置到 37 °C、5% CO₂ 培养箱内 12、24 h 后观察细胞划痕,测量划痕宽度,计算划痕愈合率。

划痕愈合率=(0 h 划痕宽度-12 h 划痕宽度/24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度

结果如图 3 和表 8 所示,在 12 h 时,阴性对照组、载五味子油阳离子脂质体组、载 HBx-siRNA



a-对照 b-载五味子油阳离子脂质体 c-载 HBx-siRNA 阳离子脂质体 d-共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体
a-control b-SCF oil cationic liposome c-HBx-siRNA cationic liposome d-HBx-siRNA and SCF oil cationic liposome

图 3 细胞划痕实验

Fig. 3 Cell scratch experiment

表 8 阳离子脂质体纳米粒对 HepG2.2.15 细胞迁移能力抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Inhibition of cationic liposome nanoparticle on migration of HepG2.2.15 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	划痕愈合率/%	
	12 h	24 h
对照	48.5±1.5	73.2±2.2
载五味子油阳离子脂质体	17.0±1.8*	26.9±1.9*
载 HBx-siRNA 阳离子脂质体	9.2±2.1*	19.5±2.1*
共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体	3.6±1.8*	15.2±1.8*

阳离子脂质体组、共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体组的划痕愈合率分别为(48.5±1.5)%、(17.0±1.8)%、(9.2±2.1)%、(3.6±1.8)%,在 24 h 后,阴性对照组的划痕基本愈合,而其他 3 组虽有愈合,但是愈合速度明显减慢,由以上数据可知,共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体组对 HepG2.2.15 细胞迁移能力的抑制作用大于载 HBx-siRNA 组大于载五味子油阳离子脂质体组大于阴性对照组。共载 HBx-siRNA 与五味子油组阳离子脂质体纳米粒具有较好的抑制 HepG2.2.15 细胞迁移的能力。

2.6.3 细胞摄取实验 将 HepG2.2.15 细胞接种到 6 孔细胞培养板上,将加入 α -MEM 完全培养液作为对照组,给药组加入载 FAM-HBx-siRNA 的阳离子脂质体纳米粒的 α -MEM 完全培养基。12、24 h 后弃去培养液,加入 2 mL 无菌 PBS 重复洗涤 2 次。荧光倒置显微镜下观察细胞的摄取效果。

结果如图 4 所示,将载 FAM-HBx-siRNA 阳离子脂质体纳米粒处理过的 HepG2.2.15 细胞,经给药 12、24 h 后,将细胞贴壁面向上,放置在荧光倒置显微镜下观察摄取效果,发现绿色荧光即为摄取了 FAM-HBx-siRNA 的细胞。将载 FAM-HBx-siRNA 组与阴性对照组经处理后,放置显微镜下观察,载 FAM-HBx-siRNA 组在给药 12 h 后,出现部分绿色荧光,而对照组无此现象。在给药 24 h 后,载 FAM-HBx-siRNA 组绿色荧光数量进一步增加,而阴性对照组仍无此现象。观察结果显示,HepG2.2.15 细胞对载 FAM-HBx-siRNA 阳离子脂质体纳米粒的摄取效果显著。

2.6.4 ELISA 法检测 HepG2.2.15 细胞上清液中乙肝表面抗原(HBsAg)和乙肝核心抗原(HBeAg)的水平 将 HepG2.2.15 细胞接种到 6 孔细胞培养板

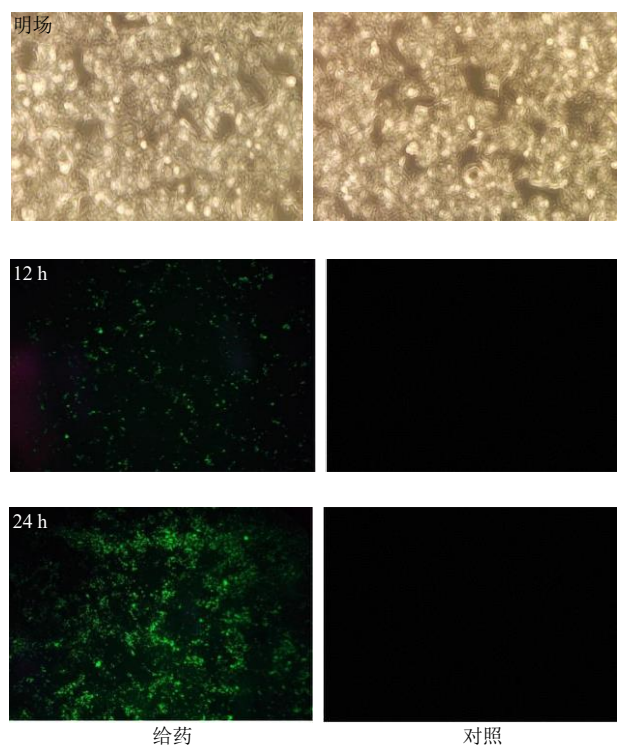


图4 HepG2.2.15 细胞摄取 FAM-siRNA 阳离子脂质体纳米粒效果

Fig. 4 Uptake effect of FAM-siRNA cationic liposome nanoparticles by HepG2.2.15 cells

上, 分别加入载五味子油、载 HBx-siRNA、共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒 α -MEM 培养基 2 mL。以加入 2 mL α -MEM 基本培养基作为对照组, 每组设 3 个复孔; 放置到培养条件为 37 °C、5% CO₂ 培养箱内, 放置 48 h; 48 h 后收取各组细胞上清液至灭菌后的离心管中, 2500 r/min 离心 20 min, 收集上清。实验过程参照酶联生物公司 HBeAg 及 HBsAg 试剂盒说明书。

结果如表 9 所示, 在给药 48 h 后, 载五味子油阳离子脂质体组、载 HBx-siRNA 组、共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体组对 HBsAg 和 HBeAg 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effects of cationic liposomes on HBsAg and HBeAg levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	A 值	
	HBsAg	HBeAg
对照	2.358 $\pm$ 0.148	1.832 $\pm$ 0.058
载五味子油阳离子脂质体	2.015 $\pm$ 0.132*	1.694 $\pm$ 0.055*
载 HBx-siRNA	1.325 $\pm$ 0.125*	1.028 $\pm$ 0.053*
共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体	0.645 $\pm$ 0.108*	0.452 $\pm$ 0.051*

siRNA 与五味子油阳离子脂质体组分别与阴性对照组相比细胞上清液中的 HBsAg 和 HBeAg 的水平均有下降, 并且对于抑制 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的水平共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体组大于载 HBx-siRNA 组大于载五味子油阳离子脂质体组大于阴性对照组, 与阴性对照组对比, 各组都具有统计学意义 ($P < 0.05$)。由数据可知, 共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒具有较好的抑制 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的作用。

3 讨论

慢性乙型肝炎是危害全球人民健康的严峻问题, 每年有好几十万人都因为感染 HBV 导致肝功能衰竭、肝硬化和肝癌而死亡^[13-14]。阳离子脂质体目前在医药界基因疗法研发中较为常用, 与细胞膜在电荷效应下具有较强的亲和力, 利于其进到细胞内进行药物运输^[15-16]。薄膜分散法是常用的制备脂质体的工艺, 此方法不仅制备工艺简单, 还可以得到较高的包封率^[17]。但是薄膜分散法所得到的脂质体粒径较大且不稳定, 本实验通过适当增加超声时间使脂质体粒径变小且均匀稳定, 通过单因素考察和星点设计-效应面法, 优化五味子油阳离子脂质体的制备工艺条件, 由数据可知, 经过工艺优化制出的共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒具有较好的包封率、粒径和 Zeta 电位, 并且形状良好。

MTT 作用机制是可使活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶还原成不溶于水的蓝色结晶-甲臌, 死细胞不能发生此反应, 而 DMSO 可以溶解甲臌, 经酶标仪测定的 A 值可以体现出活细胞的多少^[18-19]。本实验表明, 共载 HBx-siRNA 与五味子油组抑制 HepG2.2.15 细胞增殖的效果最强, 具有较好的抑制 HepG2.2.15 细胞增殖的作用。

通过细胞划痕实验可以考察出药物对细胞迁移能力的影响^[20]。本研究发现共载 HBx-siRNA 与五味子油组具有较好的抑制 HepG2.2.15 细胞迁移能力。HepG2.2.15 细胞对共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体的摄取是产生其抑制乙型肝炎效果的重要指标, 实验表明, HepG2.2.15 细胞对载 FAM-HBx-siRNA 的阳离子脂质体纳米粒的摄取效果显著。

HBeAg 与 HBsAg 的含量是检测是否感染乙型肝炎的重要指标, 目前惯用的测定 HBeAg 和 HBsAg

的方法是 ELISA 实验。常用双抗原夹心法可简单、方便、敏感度较高的快速检测到 HepG2.2.15 细胞上清液中分泌的 HBeAg 和 HBsAg^[21-22]。本研究发现,共载 HBx-siRNA 与五味子油阳离子脂质体纳米粒有较好的抑制 HepG 2.2.15 细胞分泌 HBeAg 和 HBsAg 的作用。综上所述,五味子油协同 HBx-siRNA 具有较好的抑制乙型肝炎的效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Delaney W E. Molecular virology of chronic hepatitis B and C: Parallels, contrasts and impact on drug development and treatment outcome [J]. *Antivir Res*, 2013, 99(1): 34-48.
- [2] 贾继东, 侯金林, 魏来, 等. 《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》新亮点 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2020, 28(1): 21-23.
- [3] 牛莉萍. 北五味子挥发油生物活性的研究及其诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡机制的初步探讨 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2011.
- [4] 冯宇飞, 常书源, 秦国昭, 等. 星点设计-效应面法优化 pH 值响应及线粒体靶向双功能金丝桃苷脂质体的处方及其体外评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(23): 5934-5942.
- [5] 王梦玥, 李腾, 蒋曙光, 等. 脂质体共递药系统用于肿瘤联合治疗的新进展 [J]. *生物加工过程*, 2018, 16(5): 33-41.
- [6] 张园, 展佳楠, 孟柯, 等. 阳离子脂质体与基因治疗 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(1): 33-35.
- [7] 朱顺耀, 来银芳, 李晓稳, 等. 唾液酸修饰绿原酸脂质体制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6178-6187.
- [8] 孔华丽, 闫亮, 段惠娟. 五味子醇提取物保肝作用成分分析 [J]. *解放军药学学报*, 2010, 26(1): 27-29+62.
- [9] 王小宁, 郝晶, 刘子晨, 等. 五味子油超声辅助提取工艺优化及其护肝作用 [J]. *食品与机械*, 2018, 34(1): 135-139.
- [10] 李思敏, 吴文瀚, 高丽娜, 等. 柠檬苦素脂质体的制备和制剂学评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(24): 5957-5962.
- [11] Bolcato-Bellemin A L, Bonnet M E, Creusat G, *et al.* Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing [J]. *PNAS*, 2007, 104(41): 16050-16055.
- [12] He C B, Hu Y P, Yin L C, *et al.* Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(13): 3657-3666.
- [13] Ma L, Zheng X L, Yang Y, *et al.* Epigenetic differences of chronic hepatitis B in different TCM syndromes: Protocol for a case-control, non-interventional, observational clinical study [J]. *Medicine*, 2018, 97(39): e12452-e12452.
- [14] 丁雪纯. 慢性乙型病毒性肝炎与代谢综合征的相关性研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020.
- [15] 谭静净, 程岚, 李学涛. 中心组合设计-效应面法优化长春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方 [J]. *中草药*, 2012, 43(9): 1742-1745.
- [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.
- [17] 侯丽芬, 谷克仁, 吴永辉. 不同制剂脂质体制备方法的研究进展 [J]. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2016, 37(5): 118-124.
- [18] 李旋. MTT 比色法及 ATP 生物发光法在鸡蛋蛋壳表面细菌总数检测中的应用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [19] Boncler M, Rózsalski M, Krajewska U, *et al.* Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells [J]. *J Pharmacol Tox Met*, 2014, 69(1): 9-16.
- [20] 宋晓燕, 杨娟, 袁青玲. FAM66E 靶向调控微小 RNA-544a 对非小细胞肺癌细胞迁移侵袭的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2021, 26(4): 302-307.
- [21] 郝卫, 邱立文, 车小燕. 一种快捷、定量检测烟曲霉 GM 抗原双 mAb 夹心 ELISA 的方法 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(3): 279-281.
- [22] Qin Y J, Sha R C, Feng Y C, *et al.* Comparison of double antigen sandwich and indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of hepatitis C virus antibodies [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(11): e23481-e23481.

[责任编辑 郑礼胜]