

# 脂质纳米颗粒共载 miR-145/CPT 肝癌靶向共递送及磁共振成像的初步研究

容 静<sup>1</sup>, 刘彤彤<sup>2</sup>, 尹秀娟<sup>1</sup>, 张 磊<sup>2</sup>, 王 啸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院放射科, 合肥 230022;

<sup>2</sup> 安徽医科大学药学院炎症免疫性疾病安徽省实验室, 合肥 230032)

**摘要** 目的 制备肝癌靶向脂质纳米颗粒(LA-CMGL)共载 miR-145/喜树碱(CPT), 评估其靶向性、联合抗肿瘤作用及磁共振成像效果。方法 采用激光共聚焦显微镜和流式细胞术评估 HepG2 细胞和 HepaRG 细胞对乳糖酸修饰和未修饰脂质纳米颗粒的靶向摄取情况; 实时荧光定量(qPCR)评估肿瘤细胞和肿瘤组织内 miR-145 含量; 采用 CCK-8 法检测 CPT、LA-CPT-LNPs、LA-CMGL 对 HepG2 细胞的细胞毒性; 采用 qPCR 评估 CPT、LA-CPT-LNPs、LA-CMGL 对 HepG2 细胞凋亡的影响; 采用磁共振成像测定 LA-CMGL 的弛豫率, 评估其肝癌细胞靶向成像效果。结果 HepG2 细胞对 LA-CMGL 的摄取率明显大于 CMGL; LA-CMGL 组肝癌细胞和小鼠肝癌组织内 miR-145 的相对含量显著高于游离 miR-145 和 CMGL 组( $P < 0.001$ ); LA-CMGL 组对 HepG2 细胞的凋亡率高于 CMGL 组和 CPT 组( $P < 0.01$ ); 在相同钆离子( $Gd^{3+}$ )浓度下, LA-CMGL 的弛豫率显著高于 Gd-DOTA, 且 LA-CMGL 在 HepG2 细胞内的 MRI 信号相比 CMGL 及 Gd-DOTA 显著增高。结论 LA-CMGL 有良好的肝癌靶向递送、联合抗肿瘤和磁共振肝癌靶向成像效果, 为药物/基因联合治疗肝癌提供了新思路。

**关键词** 磁共振成像; 脂质纳米颗粒; 原发性肝癌; 分子靶向治疗; 乳糖酸; 联合治疗

**中图分类号** R 445.2; R 735.7

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1501-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.002

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌最常见的形式之一,其死亡率占全球癌症相关死亡的前五位,五年生存率仅为 21%<sup>[1]</sup>。喜树碱(camptothecin, CPT)作为拓扑异构酶 I 的抑制剂,是临床上广泛使用的化疗药物,因其本身自带蓝色荧光,常常被用作为模型药物<sup>[2]</sup>。miR-145 作为被广泛研究的 miRNA,在癌细胞的增殖、远处转移和化疗耐药等方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。药物-基因的联合治疗是提高化疗药物敏感性,对抗肿瘤耐药性的有效策略<sup>[4-5]</sup>,而缺少靶向且高效的共递送载体是目前药物-基因联合治疗的最大障碍。如今一种可电离脂质(DLin-MC3-DMA, MC3)的脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNPs)为药物-基因联合治疗带来了新的希望<sup>[6]</sup>。去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是一种在肝癌细胞上高表达的受体<sup>[7]</sup>,乳糖酸(lactobionic, LA)中的半乳

糖分子可以特异性靶向 ASGPR 受体,因而 LA 修饰的 LNPs 显著增加了其对肝癌细胞的靶向性。为此,该研究将制备 LA 修饰的 LNPs 共载 miR-145/CPT,以实现靶向抗肝癌作用,同时在 LNPs 内引入钆特酸(gadoteric acid, Gd-DOTA)以实现肝癌的 MRI 可视化。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与仪器** Gd-DOTA(西安凯新生物有限公司);LA 修饰的靶向脂质纳米颗粒(LA-CPT-miR-145-Gd-LNPs, LA-CMGL)、无靶纳米脂质纳米颗粒(CPT-miR-145-Gd-DOTA-LNPs, CMGL)及靶向单载 CPT 脂质纳米颗粒 LA-CPT-LNPs 由安徽医科大学药学院合成并表征;HepG2 细胞株、HepaRG 细胞株(中科院生物化学与细胞生物学研究所)。纳米粒度电位分析仪(Nano ZS90,英国 Malvern 公司);流式细胞仪(CytoFLEX,美国 Beckman 公司);激光共聚焦显微镜(LSM880,德国 Zeiss 公司);透射电子显微镜(Talos L120C G2,美国 Thermo 公司);3.0T 全身超导 MRI(美国 GE 公司)。

**1.2 实验动物** 雄性 C57BL/6 小鼠 120 只,日龄 12 d, (12 ± 5)g,饲养于安徽医科大学动物中心动物

2024-07-02 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:2023AH040370);安徽医科大学科研水平提升计划(编号:2021xkjT015)

作者简介:容 静,女,硕士研究生;

王 啸,男,博士,教授,博士生导师,通信作者, E-mail:

wangxiao@ahmu.edu.cn

房。该研究已通过安徽医科大学实验动物伦理委员会审查(批准号:LLSC20221110)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 LA-CMGL的合成** 采用乙醇稀释法制备负载 miR-145 的配方<sup>[6]</sup>。所有指定摩尔比的脂质成分以特定摩尔比(DLin-MC3-DMA/DSPC/Chol/LA-PEG = 50/10/38.5/1.5, mol/mol)、CPT 和 Gd-DOTA 溶解在乙醇中,miR-145 溶解在 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.0)中。将两种溶液以体积比为 3:1 的水乙醇快速混合,得到最终质量为 40:1 (总脂质/miR-145)。室温孵育 10 min 后,透析除去游离药物(透析液:PBS;每 6 h 更换 1 次),使用透析袋(MWCO: 30 ku),持续 24 h。干燥后的最终产物为脂质纳米颗粒 LA-CMGL。

#### 1.3.2 表征

**1.3.2.1 粒径分析** 采用纳米粒度电位分析仪(Nano ZS90,英国 Malvern 公司)对制备好的 LNPs 溶液的粒径、电位以及多分散指数进行检测,具体步骤如下:取 1 ml 制备好的 LNPs 溶液,采用动态光散射法(dynamic light scattering, DLS)测量 LNPs 粒径大小、电位和多分散指数,测量前充分摇晃使 LNPs 溶液均匀分散。

**1.3.2.2 透射电镜** 用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)对制备好的 LNPs 进行形貌及粒径观察,具体操作步骤如下:将 LNPs 溶液混匀后滴加在新的 230 目铜网上,吸附约 3 min 后,将铜网放在滤纸上自然晾干,待晾干后置于透射电镜下观察其形貌及粒径。

#### 1.3.3 细胞摄取实验

**1.3.3.1 HepG2 细胞摄取 LA-CMGL** 取对数生长期的细胞以每孔浓度  $2 \times 10^5$  个将 HepG2 细胞和 HepaRG 细胞分别接种于玻璃底共聚焦小皿中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后更换培养基,分别加入 CMGL 及 LA-CMGL,培养 6 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,置于激光共聚焦显微镜(laser confocal microscopy, LSCM)下观察细胞对 LNPs 的摄取情况,测量期间显微镜设置保持一致。

**1.3.3.2 流式细胞术评估 LNPs 的摄取** 为了进一步评估 HepG2 细胞对 LNPs 的摄取情况,利用流式细胞分析仪检测细胞对 LNPs 的摄取率,以每孔浓度  $2 \times 10^5$  个将 HepG2 细胞接种于六孔板培养皿中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后更换培养基,并分别加入 CMGL 及 LA-CMGL,培养 24 h 后,吸弃培养液,PBS 洗涤 2 次,离心收集细胞,配

置成细胞悬液,随即采用流式细胞仪进行荧光强度的分析。

**1.3.3.3 qPCR 检测细胞及组织内 miR-145 含量** 以每孔浓度  $2 \times 10^5$  个将肝癌细胞 HepG2 及正常肝细胞 HepaRG 分别接种于六孔板培养皿中,培养 24 h 后更换培养基,各孔分别加入 Free miR-145、CMGL 及 LA-CMGL,培养 6 h 后提取 RNA;组织内 miR-145 含量通过尾静脉注射 Free miR-145、CMGL 及 LA-CMGL 后取新鲜肝癌组织及癌旁组织测量,参照 microRNA 提取试剂盒说明书提取细胞及组织内总 RNA,再参照试剂盒进行 PCR 扩增定量,以 U6 为内参分析 miR-145 在细胞及组织内的相对表达水平<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.4 联合抗肿瘤实验

**1.3.4.1 细胞增殖抑制率测定** 采用 CCK-8 法测定细胞抑制率,将 HepG2 细胞分为 PBS 组、CPT 组、LA-CPT-LNPs 组和 LA-CMGL 组,各组 CPT 的最终浓度为 10 μg/ml。将处于对数生长期浓度为  $2 \times 10^5$  个的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,分别加入上述溶液,继续培养 24 h。然后根据 CCK-8 使用说明书进行后续操作,在 450 nm 处测量 CCK-8 的吸光度值,计算细胞的增殖抑制率。

**1.3.4.2 细胞凋亡率检测** 以每孔浓度  $2 \times 10^5$  个将 HepG2 细胞接种于六孔板培养皿中,培养后分为 PBS、LA-CPT-LNPs、CMGL 及 LA-CMGL 组,向各孔中分别加入对应试剂,共培养 6 h 后参照 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,再参照试剂盒进行 PCR 扩增定量,检测凋亡基因 Cleaved-Caspase3 (C-Caspase3) 及 Cyt-c 用于评估 LNPs 对细胞的抗肿瘤效果,以 β-actin 为内参,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 法比较分析各基因表达<sup>[9]</sup>。基因引物根据在 NCBI 上搜索目的基因的序列,运用 Primer 5 软件设计引物,由上海生工合成引物,具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequence

Gene	Primer sequence(5'-3')	Primer length (bp)
has-miR-145	CAGTTTTCCAGGAATCCCT	20
C-Caspase-3	F:GCTCATACCTGTGCTGTGT	20
	R:TCTGTTGCCACCTTTCGGTT	20
Cyt-c	F:GGCGAGAGCTATGTAATGCAAG	23
	R:TACAGCCAAAGCAGCAGCTCA	21
β-actin	F:GATGAGATTGGCATGGCTT	19
	R:GTCACCTTACCCTTCCAGT	20
U6	F:GGAACGATACAGAGAAGATTAGC	23
	R:TGGAACGCTTACGAATTTGCG	22

**1.3.4.3 原位肝癌小鼠模型的建立及治疗** 采用 N-二乙基亚硝胺 (N-diethylnitrosamine, DEN) + 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) 腹腔注射法诱导原位肝癌小鼠模型<sup>[10]</sup>。模型诱导成功后,将模型小鼠随机分为 4 组(每组 12 只),从第 28 周到第 36 周,每周 2 次通过尾静脉分别注射 PBS、CPT、LA-CPT-L 和 LA-CMGL,其中 CPT 浓度为 10 μg/ml, miR-145 浓度为 100 nmol。于 38 周后处死小鼠并取出肝组织进行后续实验处理。

### 1.3.5 磁共振成像

**1.3.5.1 弛豫率测定** 将 Gd-DOTA 和 LA-CMGL 配制成浓度为 0、0.01、0.02、0.04、0.08 和 0.16 mmol/L, 置入 2 ml 圆底离心管中,使用柔性线圈在 1.5T MRI 中行自旋回波 (spin echo, TE) T1WI 扫描,回波时间 (echo time, TE) 为 8.8 ms, 重复时间 (repetition time, TR) 设置为 300、500、600、800、1 000 ms, 采集磁共振图像后测定信号强度并计算 T1 值,取 1/T1 作图,直线的斜率即为对比剂纵向弛豫率。

**1.3.5.2 细胞磁共振成像** 将 HepG2 细胞和 Hep-aRG 细胞与含 Gd<sup>3+</sup> 制剂 Gd-DOTA、CMGL 和 LA-CMGL 在 37 °C 下分别孵育 12 h。然后,孵育结束后,用预冷 PBS 洗涤 2 次,然后转移到 2 ml 圆底离

心管中进行细胞磁共振成像。用 Gd-DOTA 孵育的细胞作为对照组,参数与上述参数相同。

**1.3.5.3 体内磁共振成像** 将制备好的 LA-CMGL、Gd-DOTA 和 CMGL 溶液通过尾静脉注入肝癌模型小鼠体内,其中 Gd<sup>3+</sup> 浓度 40 μmol/kg, 使用小鼠线圈在 3.0T MRI 中于注射前及注射后 5 min 行 T1WI 扫描。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件用于处理定量数据。所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示。miR-145 体内和体外摄取率的比较采用独立样本 *t* 检验,细胞抑制率、肝癌细胞 mRNA 表达水平、肿瘤个数、肿瘤体积及 T/N 的比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 表征** LA-CMGL 的合成示意图如图 1A 所示。马尔文粒度仪测得 LA-CMGL 平均粒径为 (165.2 ± 9.83) nm (图 1B), 多分散指数为 0.193, Zeta 电位为 (-3.58 ± 0.65) mV, ; 通过透射电镜观察到 LA-CMGL 为形态完整且均匀的双层脂质分子结构, 形貌见图 1C 所示。证明成功合成乳糖酸修饰的具有靶向能力的脂质纳米颗粒。

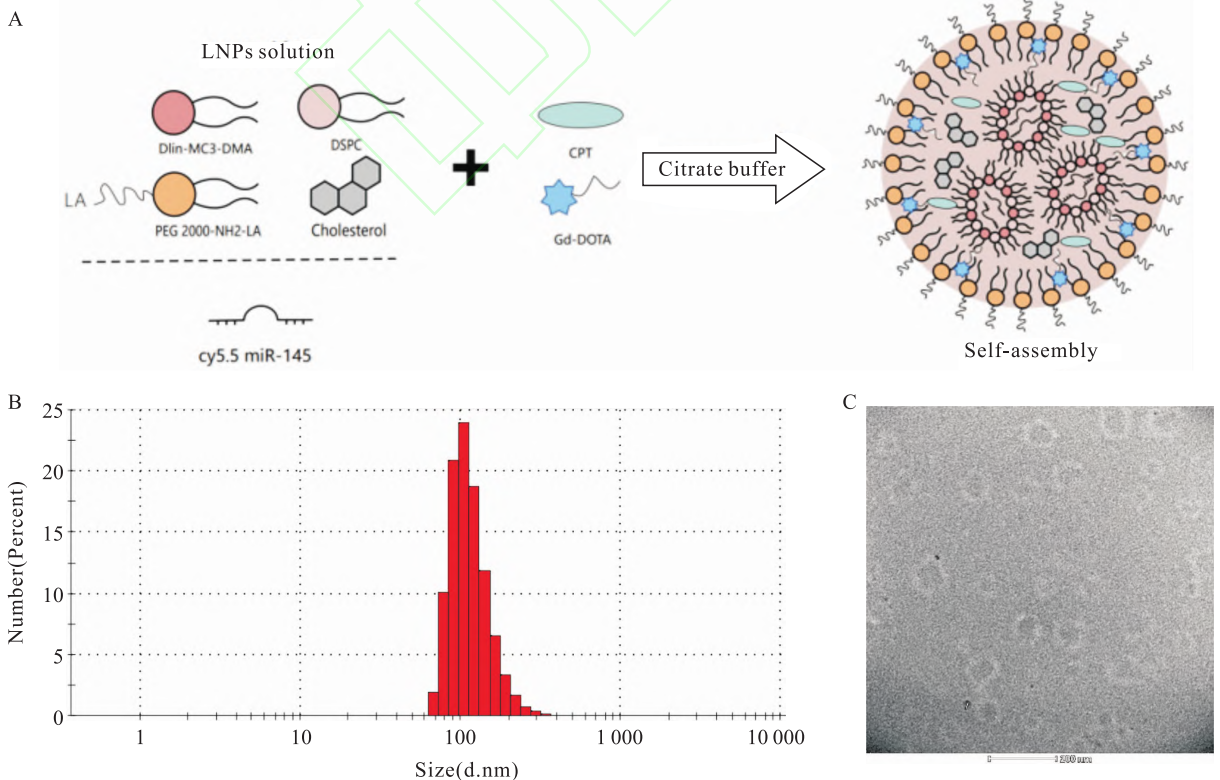


图 1 LA-CMGL 的合成及表征

Fig. 1 Synthesis and characterization of LA-CMGL

A: Synthesis steps and schematic illustration of LA-CMGL; B: Particle size and distribution; C: Transmission electron microscope image.

**2.2 靶向性检测结果** 激光共聚焦结果显示, HepG2 细胞对 LA-CMGL 的摄取量明显高于对 CMGL 的摄取量, 表现为 HepG2 细胞内 LA-CMGL 组 miR-145 (红色) 荧光和 CPT (蓝色) 荧光强度更强 (图 2A)。而 HepaRG 细胞对二者的摄取量无明显差异, 且 HepaRG 细胞内的红色和绿色荧光强度明显低于 HepG2 细胞内荧光强度 (图 2B)。

通过流式细胞术检测 HepG2 细胞对 CMGL 及 LA-CMGL 的摄取率可以观察到, 肝癌细胞对具有靶向能力的 LA-CMGL 的摄取率明显大于 CMGL 组 (图 3A)。

qRT-PCR 结果显示, 三组中正常肝细胞内 miR-145 相对表达量均低于肝癌细胞, 且在肝癌细胞内 miR-145 的表达量顺序为 LA-CMGL > CMGL > Free miR-145 (图 3B); 在组织中观察到肝癌组织中 miR-145 的含量也明显高于癌旁组织, 且在肝癌组织中

LA-CMGL 组表达量最高 (图 3C)。

**2.3 协同抗肿瘤作用**

**2.3.1 体外协同抗肿瘤作用** 共培养 24 h 后, 游离 CPT 组、LA-CPT-LNPs 组和 LA-CMGL 组的增殖抑制率分别为  $(22.16 \pm 1.32)\%$ 、 $(41.27 \pm 2.21)\%$  和  $(61.85 \pm 2.57)\%$  (图 4A), 差异有统计学意义 ( $F = 74.91, P < 0.01$ )。

与游离 CPT 及 LA-CPT-LNPs 组比较 (图 4B), LA-CMGL 组 C-Caspase3 和 Cyt-c 基因表达显著升高 ( $F = 50.62, 41.08, P < 0.01$ )。

**2.3.2 体内协同抗肿瘤作用** 通过尾静脉注射给予模型鼠治疗药物, 与空白对照组比较, LA-CMGL 组比单独使用 CPT 具有更显著的肿瘤抑制作用, 肿瘤个数 (图 5B) 及肿瘤体积 (图 5C) 明显低于相应对照组, 差异有统计学意义 ( $F = 14.68, 21.23, P < 0.01$ )。

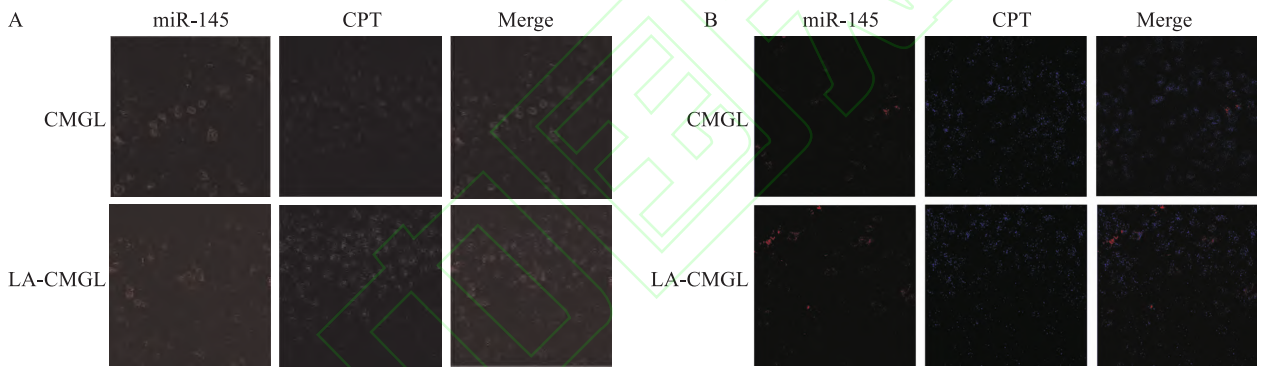


图 2 两种细胞对 CMGL 及 LA-CMGL 的摄取量比较

Fig. 2 The cellular uptake of CMGL and LA-CMGL in HepG2 and HepaRG cells

A: The confocal laser scanning microscopy images of HepG2 cell (scan bar = 20 μm); B: The confocal laser scanning microscopy images of HepaRG cells (scan bar = 20 μm)

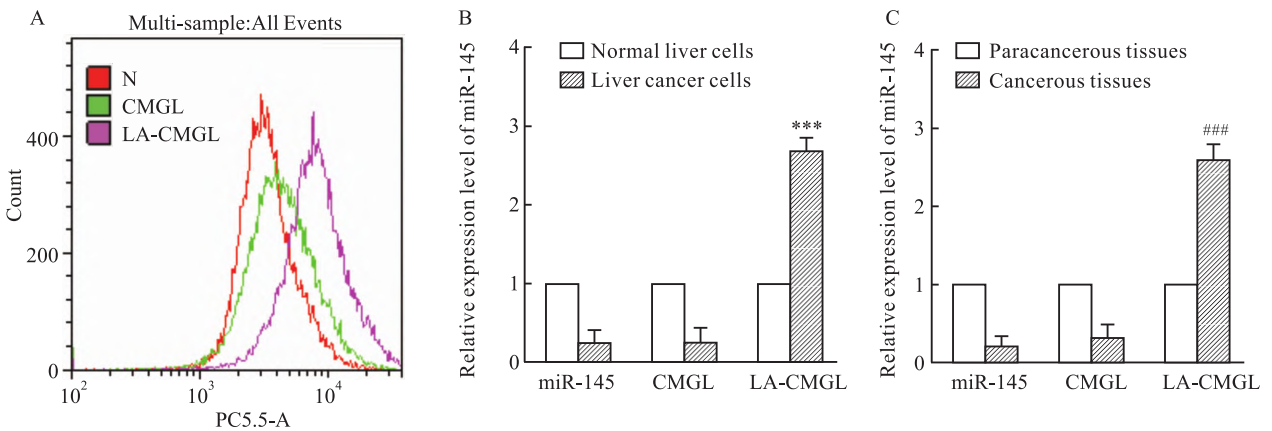


图 3 CMGL/LA-CMGL 的体外及体内摄取率测定

Fig. 3 The uptake rate of CMGL and LA-CMGL in vitro and in vivo

A: Fluorescent intensity of miR-145 in HepG2 cells by flow cytometry; B: Comparison of expression levels of miR-145 in normal liver cells and liver cancer cells; C: Comparison of expression levels of miR-145 in paracancerous tissues and cancerous tissues; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Normal liver cells; ###  $P < 0.001$  vs Paracancerous tissues.

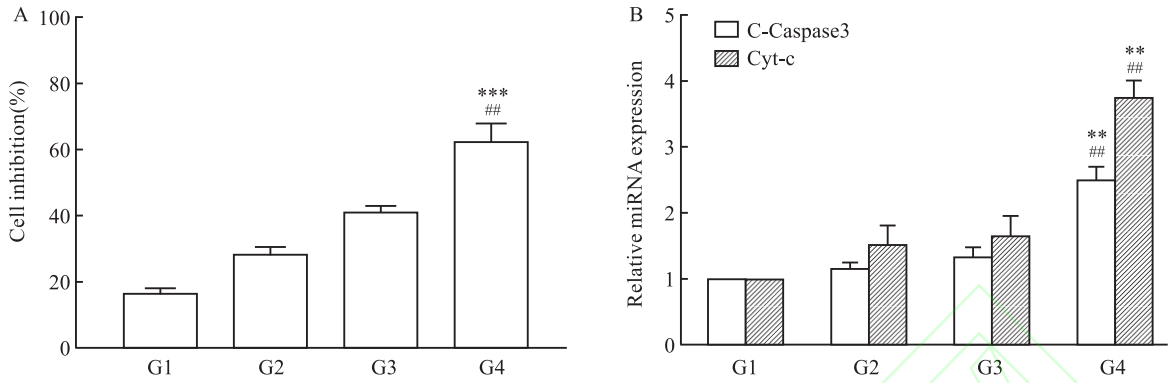


图4 LA-CMGL对肝癌细胞生长的影响

Fig. 4 The effect of LA-CMGL on the growth of liver cancer cells

A: Inhibitory rate of cell; G1: PBS group; G2: CPT group; G3: LA-CPT-LNPs group; G4: LA-CMGL group; B: The relative expression levels of C-Caspase3 and Cyt-c mRNA in HepG2 cells by qPCR; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs G2 group; ##  $P < 0.01$  vs G3 group

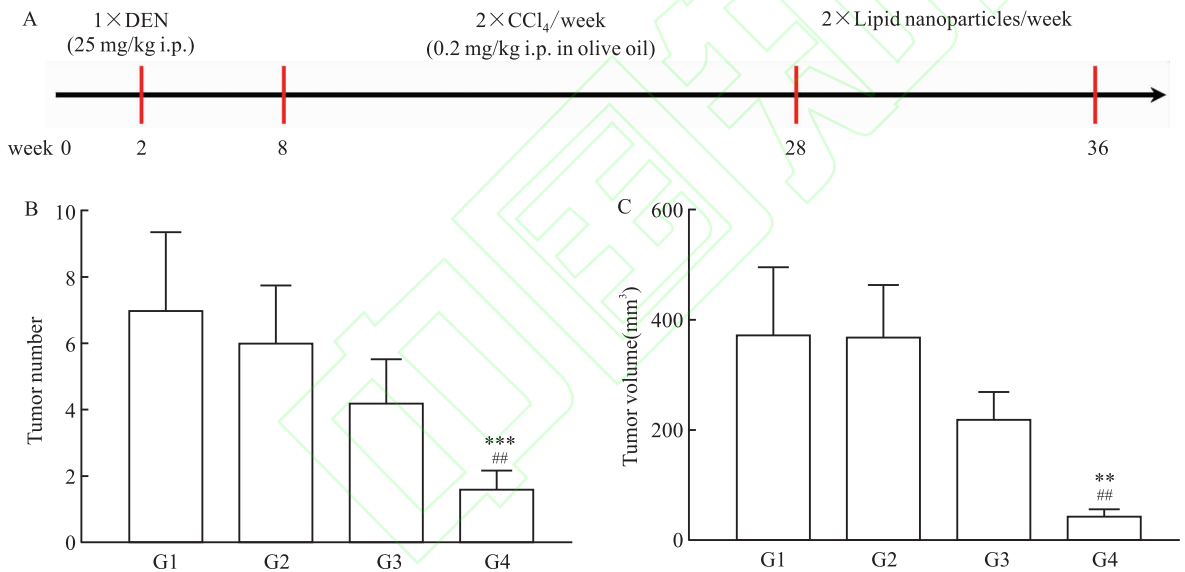


图5 治疗后肝癌小鼠肿瘤个数及体积

Fig. 5 Number of tumors and tumor size in HCC mice after treatment

A: Schematic schedule of HCC mouse model and administration regimen for therapy; B: Number of tumors after treatment; C: Tumor size after treatment; G1: PBS group; G2: CPT group; G3: LA-CPT-LNPs group; G4: LA-CMGL group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs G2 group; ##  $P < 0.01$  vs G3 group

**2.4 磁共振成像** 测量不同浓度  $Gd^{3+}$  浓度时 LA-CMGL 和 Gd-DOTA 对应的信号强度, 计算出 LA-CMGL 和 Gd-DOTA 的纵向弛豫率分别为  $9.379 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $2.825 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (图 6A、6B)。

由于 ASGPR 介导的内吞作用有望加速 LA-CMGL 的细胞内摄取, 通过对不同组的 HepG2 细胞孵育 12 h 测量 MRI 信号用来评估细胞内  $Gd^{3+}$  的摄取。在相同  $Gd^{3+}$  浓度下, LA-CMGL 在 HepG2 细胞内的 MRI 信号比 CMGL 及 Gd-DOTA 亮得多 (图 6C)。

LA 修饰的双载药脂质纳米颗粒 LA-CMGL 行尾静脉注射后, 观察到肿瘤边缘呈明显强化 (图 6D); 而给予商用对比剂 Gd-DOTA 组及 CMGL 组肿瘤强化程度轻且轮廓显示不清。且相较于 Gd-DOTA 与 CMGL 组, LA-CMGL 的 T/N 明显增高 (图 6E), 差异有统计学意义 ( $F = 114.5$ ,  $P < 0.001$ )。

### 3 讨论

化疗药物的耐药性是影响肝细胞癌化疗效果的主要原因之一。miR-145 是 miRNA 家族的一员, 已

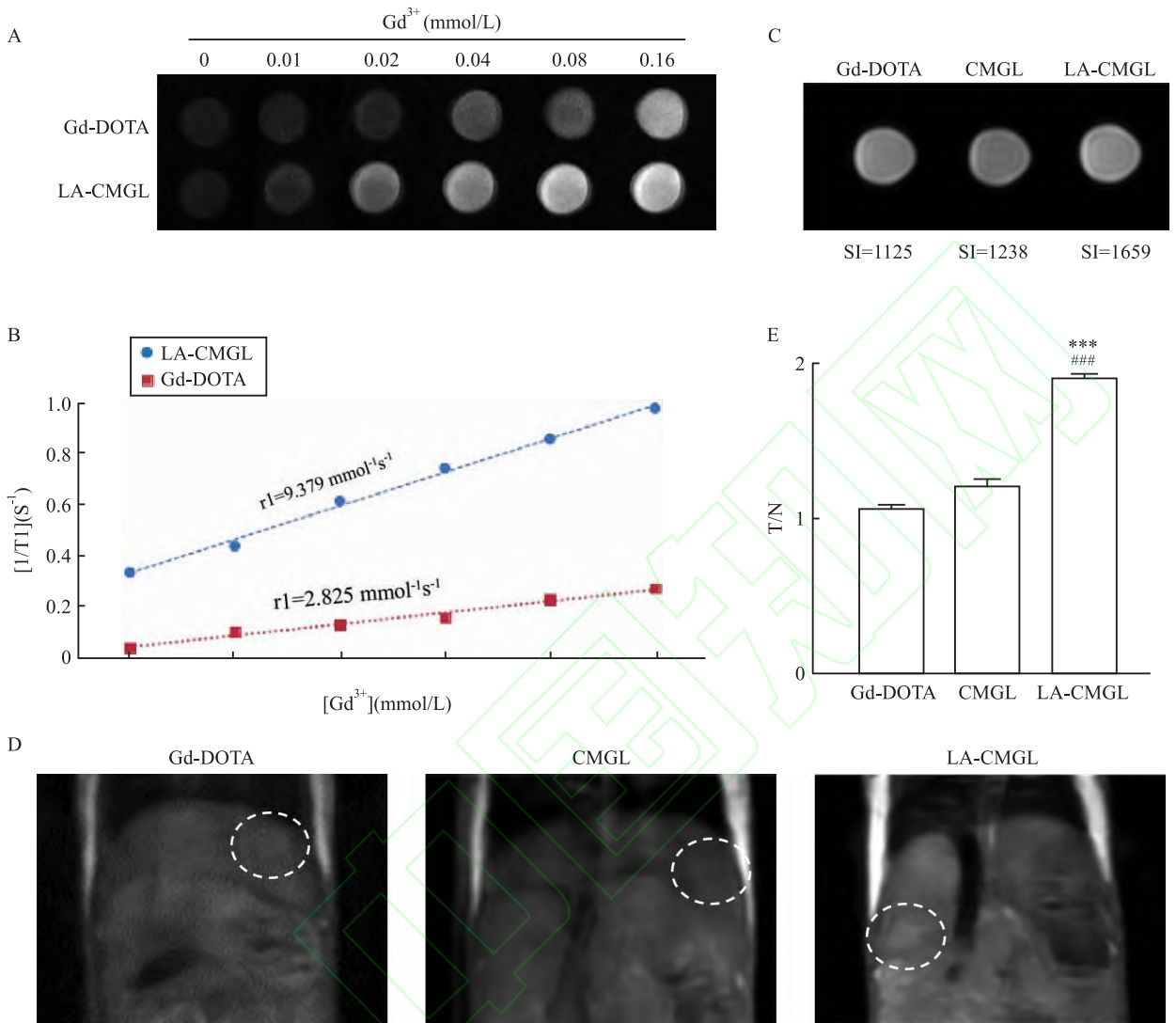


图6 Gd-DOTA 和 LA-CMGL 的纵向弛豫率及小鼠肝癌 MR 增强

Fig. 6 Longitudinal relaxation rates of Gd-DOTA and LA-CMGL and enhancement MR imaging of HCC mice

A: T1WI images of LA - CMGL and Gd-DOTA at different concentrations of  $Gd^{3+}$ ; B: Longitudinal relaxation rate curves of LA-CMGL and Gd-DOTA; C: T1-weighted MR images of HepG2 cells incubated with  $Gd^{3+}$  solutions (Gd-DOTA, CMGL and LA-CMGL) for 12 hours; D: T1WI images of Gd-DOTA, CMGL, and LA-CMGL after injection; E: The ratio of tumor tissue to normal tissue after injection of different LNPs solutions; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Gd-DOTA group; ###  $P < 0.001$  vs CMGL group

被发现在恶性肿瘤中普遍下调,并越来越多地被认为是癌症发生、转移和治疗耐药的关键因子<sup>[11]</sup>。此外,HepG2 细胞中 miR-145 的表达明显低于肝细胞,过表达 miR-145 可以通过下调细胞周期相关基因的表达显著抑制 HepG2 细胞的增殖。尽管 miR-145 在调节细胞周期中起着至关重要的作用,但无论是作为单一治疗还是联合治疗,它作为肝癌的新治疗靶点还没有得到充分的探索。因此,miR-145 抗肝癌新途径的探索和临床应用值得重视。

本研究制备了一种基于 MC3 的 LNPs,用于共

递送 CPT/miR-145 以同时实现肝癌的化疗药物/基因联合靶向治疗。该 LNPs 为球形、结构稳定,直径约为 165 nm。有研究<sup>[12]</sup>表明,平均直径约 200 nm 的纳米粒子因具有更长的血液循环时间和更低的单核细胞吞噬作用,而更易通过肿瘤的高渗透滞留效应 (enhanced permeability and retention, EPR) 在肿瘤部位被动富集。此外,激光共聚焦结果显示,与 LA-CMGL 共培养后,肝癌细胞中 miR-145 及 CPT 的荧光强度均强于正常肝细胞;流式细胞术摄取实验结果显示,HepG2 细胞对具有靶向性的 LA-CMGL

的吸收能力明显大于 CMGL 组及对照组。上述实验结果表明经过乳糖酸修饰后, LNP 可以通过靶向肝癌细胞膜表面高表达的 ASGPR 受体增强肝癌细胞对其内吞能力。为了进一步评估 miR-145 的靶向递送效果, 采用 qPCR 测量了 miR-145 在肿瘤细胞和组织中的含量。结果表明, miR-145 在正常肝细胞中的相对表达量高于肝癌细胞, 加入 LNP 培养后, 肝癌细胞中 miR-145 的表达量远远高于正常肝细胞; 在动物实验中亦是如此, 对照组及 CMGL 组癌旁组织内 miR-145 相对含量明显高于癌组织, 而通过尾静脉注射 LA-CMGL 后, 癌组织内 miR-145 相对含量明显高于癌旁组织。因此, 本研究结果表明, 制备的 LA-CMGL 具有肝癌细胞靶向性。

本研究使用 CPT、LA-CPT-LNP 及 LA-CMGL 与细胞共培养 24 h 后进行细胞抑制率的测定。结果显示, LA-CMGL 对 HepG2 细胞的增殖抑制率 (61.85%) 较游离 CPT (22.16%) 或 LA-CPT-LNP (41.27%) 更为明显。这是由于 LA 修饰的 LNP 可以通过靶向肝癌表面高表达的 ASGPR 受体, 从而介导更多的 LA-CMGL 进入肝癌细胞并释放 CPT 和 miR-145, 进而产生更好的协同治疗效果。C-Caspase3 及 Cyt-c 是检测细胞凋亡水平的常用指标, 本实验中各组 LNP 对 HepG2 细胞的凋亡作用结果表明, 各组 Caspase3 和 Cyt-c 水平均增高, 但 LA-CMGL 组促凋亡效果作用更强。这些结果均可表明, CPT 和 miR-145 联合作用的效果明显高于游离 CPT 或 LA-CPT-LNP。为实现临床转化的目的, 本研究进一步进行了体内实验, 根据前期实验结果, 采用 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CPT、100 nmol miR-145 通过尾静脉注射给予模型鼠治疗药物, 治疗结束后 LA-CMGL 组肿瘤数量最少、肿瘤体积最小, 进一步说明 LA-CMGL 携带的 CPT 和 miR-145 比单药对肝癌有更好的抑制作用。

磁共振成像技术在肿瘤的早期诊断和后期治疗中都发挥着极为重要的作用。对比剂的使用能极大提高磁共振显影的对比度, 提高对软组织的分辨率。目前临床上使用较多的对比剂主要是小分子  $\text{Gd}^{3+}$  螯合物, 具有体内存留时间短、灵敏度低、缺乏靶向性等缺点。因此将  $\text{Gd}^{3+}$  络合到大分子载体上构建分子探针, 能显著提高水质子的弛豫速率, 提高 MRI 的灵敏性。本研究合成的 LA 修饰的靶向 LNP 的弛豫率明显高于 Gd-DOTA, 这是由于合成的对比剂体积大使得旋转速率减慢, 旋转时间延长, 因此水质子弛豫率显著提高<sup>[13]</sup>。此外, 在相同  $\text{Gd}^{3+}$  浓度下,

LA-CMGL 在 HepG2 细胞的 MRI 信号相比 CMGL 及 Gd-DOTA 显著增高。体内实验也证实 LA-CMGL 对肿瘤实质的显像效果明显强于 Gd-DOTA 及非靶向组, 与对照组相比, 肝肿瘤与肝实质部分 T/N 比明显升高。以上结果均表明 LA-CMGL 具有良好的肝癌组织靶向性, 且 LA-CMGL 在肝内的堆积具有较长的持续性, 有利于检测药物的疗效。这是由于 LA 修饰 LNP 后, 可以靶向识别肝癌细胞表面高表达的 ASGPR 受体, 从而将更多的  $\text{Gd}^{3+}$  递送至肿瘤细胞内, 提高了磁共振成像的特异性, 在肝癌的早期诊断中有更好的效果。

综上所述, 本研究结果初步表明 CPT/miR-145 脂质纳米颗粒具有良好的肝癌靶向递送效果和联合抗肿瘤效应, 携带的  $\text{Gd}^{3+}$  也表现出很好的 T1 弛豫性能和肿瘤细胞及组织靶向成像的能力。这些发现为肝癌的可视化药物/基因联合治疗提供了新的研究思路。

### 参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48. doi:10.3322/caac.21763.
- [2] Zeng Y, Jiang H R, Zhang X T, et al. Canagliflozin reduces chemoresistance in hepatocellular carcinoma through PKM2-c-Myc complex-mediated glutamine starvation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 208: 571-86. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.006.
- [3] Xu W X, Hua Y T, Deng F, et al. MiR-145 in cancer therapy resistance and sensitivity: A comprehensive review [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(9): 3122-31. doi:10.1111/cas.14517.
- [4] Eljack S, David S, Faggad A, et al. Nanoparticles design considerations to co-deliver nucleic acids and anti-cancer drugs for chemoresistance reversal [J]. *Int J Pharm X*, 2022, 4: 100126. doi:10.1016/j.ijpx.2022.100126.
- [5] 朱曼曼, 程勇, 饶鹏, 等. 包被 siRNA 的叶酸改性聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯纳米材料的制备及其表征 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(11): 1865-71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.011.
- [5] Zhu M M, Cheng Y, Rao P, et al. Preparation and characterization of folic acid modified D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanomaterials encapsulated with siRNA [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(11): 1865-71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.011.
- [6] Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(4): 313-20. doi:10.1038/s41565-020-0669-6.
- [7] Li T S, Yu P, Chen Y H, et al. N-acetylgalactosamine-decorated nanoliposomes for targeted delivery of paclitaxel to hepatocellular

- carcinoma[J]. Eur J Med Chem, 2021, 222: 113605. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113605.
- [8] Zhong G L, Wan F, Wu S F, et al. Arsenic or/and antimony induced mitophagy and apoptosis associated with metabolic abnormalities and oxidative stress in the liver of mice[J]. Sci Total Environ, 2021, 777: 146082. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146082.
- [9] Balcells I, Cirera S, Busk P K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers[J]. BMC Bio, 2011, 11: 70. doi:10.1186/1472-6750-11-70.
- [10] Brown Z J, Heinrich B, Greten T F. Mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and highlights for immunotherapy research[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(9): 536-554. doi:10.1038/s41575-018-0033-6.
- [11] Xu W X, Hua Y T, Deng F, et al. MiR-145 in cancer therapy resistance and sensitivity: A comprehensive review[J]. Cancer Sci, 2020, 111(9): 3122-31. doi:10.1111/cas.14517.
- [12] Zou Y, Song Y, Yang W J, et al. Galactose-installed photocrosslinked pH-sensitive degradable micelles for active targeting chemotherapy of hepatocellular carcinoma in mice[J]. J Control Release, 2014, 193: 154-61. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.016.
- [13] 王 啸, 陈 妮, 钱银锋, 等. 胶质瘤靶向嵌段共聚物体内外MR成像效果的实验研究[J]. 中华放射学杂志, 2017, 51(11): 860-6. doi:10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2017.11.010.
- [13] Wang X, Chen N, et al. In vivo and in vitro MR imaging of glioma targeted block copolymer micelles[J]. Chin J Radiol, 2017, 51(11): 860-6. doi:10.3760/cma.j.issn.1005-1201.2017.11.010.

## Co-loaded with miR-145/CPT nanoparticles for targeted delivery and magnetic resonance imaging in hepatocellular carcinoma

Rong Jing<sup>1</sup>, Liu Tongtong<sup>2</sup>, Yin Xiujian<sup>1</sup>, Zhang Lei<sup>2</sup>, Wang Xiao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Radiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Anhui Medical University, Inflammation and Immune Mediated Diseases Laboratory of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To develop liver cancer-targeted nanoparticles (LA-CMGL) co-loaded with miR-145/CPT and assess their targeting specificity, combined anti-tumor effects, and magnetic resonance imaging efficacy. **Methods** Laser scanning confocal microscopy and flow cytometry were utilized to evaluate the targeted uptake of lactobionic acid-modified and unmodified nanoparticles by HepG2 cells and HepaRG cells; quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was employed to assess miR-145 content in tumor cells and tissues. The cytotoxicity of CPT, LA-CPT-LNPs and LA-CMGL on HepG2 cells were assessed using the CCK-8 assay. qPCR was also used to evaluate the effect of CPT, LA-CPT-LNPs and LA-CMGL on apoptosis of HepG2 cells. MRI was performed to measure the relaxation rate of LA-CMGL and evaluate its targeting imaging effect on liver cancer cells. **Results** The uptake rate of LA-CMGL by HepG2 cells surpassed that of CMGL significantly. The relative miR-145 content in liver cancer cells and mouse liver cancer tissues in the LA-CMGL group was markedly higher compared to free miR-145 and CMGL groups ( $P < 0.001$ ). The apoptosis rate of HepG2 cells in the LA-CMGL group exceeded that in the CMGL group and CPT group ( $P < 0.01$ ). At the same  $Gd^{3+}$  concentration, the relaxation rate of LA-CMGL significantly surpassed that of Gd-DOTA, and the MRI signal of LA-CMGL in HepG2 cells markedly increased compared to CMGL and Gd-DOTA. **Conclusion** LA-CMGL exhibits promising liver cancer-targeted delivery, combined anti-tumor effects, and MRI liver cancer cell-targeted imaging, offering a novel avenue for combined drug/gene therapy for liver cancer.

**Key words** magnetic resonance imaging; lipid nanoparticles; hepatocellular carcinoma; molecular targeted therapy; lactobionic acid; combination therapy

**Fund programs** Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH040370); Anhui Medical University Research Level Enhancement Plan (No. 2021xkjT015)

**Corresponding author** Wang Xiao, E-mail: wangxiao@ahmu.edu.cn