

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

朱嫚嫚¹,程勇¹,饶鹏¹,张贵阳²,刘昊³,肖雷⁴,刘加涛^{1,4}

摘要 目的 构建可以稳定负载并有效释放 siRNA 的叶酸改性聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (FA-TPGS) 纳米材料并观测其对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞毒性和剪切型 X-框结合蛋白 1 (XBPIs) 表达水平的影响。方法 将 FA-TPGS 与罗丹明 B (RhB) 标记的 XBPI siRNA 按照 5:1 比例混合均匀得到包被 XBPI siRNA 的纳米复合物 (FT@XBPI)。通过透射电镜、动态光散射、紫外可见光谱和荧光光谱分析对 FT@XBPI 表征,同时计算 XBPI siRNA 从 FT@XBPI 纳米载体中释放的药量。应用扫描电镜 (SEM)、CCK-8 以及流式细胞术检测 FT@XBPI 的细胞毒性,并应用 Western blot 法检测 FT@XBPI 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中 XBPIs 的抑制作用。结果 FA-TPGS 与 siRNA 具有良好的结合作用,其中 FT@XBPI 的平均粒径为 (200 ± 20) nm。相对释放结果提示,酸性环境 (pH 5.0) 有利于 siRNA 从 FT@XBPI 中释放。CCK-8 和凋亡实验均显示,FT@XBPI 对 RAW264.7 细胞的增殖和凋亡影响较小,且 FT@XBPI 处理可显著抑制 RAW264.7 中 XBPIs 蛋白的表达 ($P < 0.001$)。结论 叶酸修饰的 TPGS 纳米载体可有效包载 XBPI siRNA,抑制巨噬细胞 XBPIs 表达且细胞相容性良好。

关键词 叶酸;聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯;siRNA;巨噬细胞;X-框结合蛋白 1

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)11-1865-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.011

利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的新兴疗法能够选择性沉默目标基因,精准调控信号通路^[1],常用于癌症、遗传性疾病和病毒感染等疾病的治疗。但小干扰 RNA (siRNA) 为带有阴电荷的水溶性大分子,易被清除,体内生物利用率低。此外,siRNA 还具有易被酶解,跨膜吸收差,并可通过与

Toll 样受体的相互作用诱发机体不良反应等缺点^[2-3]。因此,为将 siRNA 运送至特定的靶器官甚至是靶细胞并发挥特异性调控作用,常需对 siRNA 进行特定修饰。近年来,以毒性和免疫原性低的纳米载体作为 siRNA 递送系统成为研究热点。维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 载体同时具有亲水和疏水性基团,可显著提高 siRNA 稳定性和渗透性^[4]。此外,活化巨噬细胞表面表达大量叶酸受体^[5]。因此,以叶酸修饰 TPGS 作为载体,通过交联作用构建包裹 X-框结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBPI) siRNA 的叶酸改性聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (folic acid modified TPGS, FA-TPGS) 复合物并对其进行表征鉴定,观察其安全性和对内质网应激关键转录因子 XBPIs 的敲降作用,以期探究 XBPIs 在巨噬细胞表型和功能转化中的作用并为靶向内质网应激的疾病治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 罗丹明 B 异硫氰酸酯、乙二醇、叶酸均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; NaHCO₃ 和硫酸镁粉末均购自上海碧云天有限公司;TPGS 和 N-羧基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxysuccinimide, NHS) 均购自上海麦克林试剂公司;对甲苯磺酰氯 (p-Toluene Sulfonyl Chloride, PTSC)、二氯甲烷、三乙胺、N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide, DMF)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸 [N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, CDC] 和 1,4 二氧六环均购自上海阿拉丁试剂公司。

细胞培养用胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 DMEM 高糖基础培养基均购自美国 Gibco 公司;青-链霉素、DAPI 染核液均购自上海碧云天有限公司;山羊抗兔蛋白激酶小鼠抗 β -actin mAb 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗 XBPIs mAb 购自美国 CST 公司;细胞凋亡试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司。

2023-06-29 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2008085MH257);安徽高校科学研究项目(编号:KJ2020A0177)

作者单位:安徽医科大学¹药学院、²基础医学院,合肥 230032

安徽医科大学第一附属医院³肿瘤内科、⁴药剂科,合肥 230022

作者简介:朱嫚嫚,女,硕士研究生;

刘加涛,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,
E-mail: jiatao177@126.com

透射电子显微镜(Talos L120C G2,美国 Thermo 公司);动态光散射仪(Zeta sizer Nano-ZS, Malvern ZS90, 英国 Malvern 公司);紫外-可见分光光度计(UV-1900)、荧光吸收光谱仪(RF5301PC)(日本岛津公司);全波长酶标仪(Infinite M1000 PRO, 瑞士 Tecan 公司);场发射扫描电子显微镜(GeminiSEM 300, 德国蔡司公司);流式细胞仪(CytoFLEX, 美国 Beckman coulter 公司)。

1.2 细胞培养 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自武汉普诺赛生命科技有限公司并在含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素溶液的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养,待细胞贴壁生长到 80% 左右更换培养基传代。

1.3 罗丹明 B 修饰 siRNA 的合成 无菌无酶环境下,将罗丹明 B(rhodamine B, RhB)异硫氰酸盐 DM-SO 溶液(0.266 mg/ml, 500 ml)加入到 siXBP1 无酶水溶液(1.65 mg/ml, 1 ml, 2:1)中并充分摇动混匀后逐滴加入适量 NaHCO₃ 澄清上清液(0.1 ml, 1 mol/L)以调节溶液的 pH 值至 8.0,室温下磁力搅拌过夜。将混合物置于截留分子量为 1 000 的透析袋中(9 L ddH₂O)两端用透析夹夹紧,于 37 °C 条件下在磁力搅拌器上搅拌透析过夜,每 8 h 换液 1 次,并经冷冻干燥 48 h 得到 RhB 修饰的 siXBP1 红色粉末(RhB-siXBP1)。

1.4 FA 改性 TPGS 的合成 将 0.19 g PTSC 和 1 g TPGS 加至 5 ml CH₂Cl₂ 溶液中,室温下磁力搅拌并逐滴加入 1.4 ml 三乙胺,反应 12 h 后逐滴加入 2~3 滴浓盐酸,以中和未反应完全的三乙胺。加入适量硫酸镁以去除多余水分,经抽滤得滤液,并将滤液于室温下旋蒸 30 min。预冷的无水乙醚滴加到冷凝滤液中析出沉淀后于 40 °C 干燥箱中干燥,得白色沉淀。氮气条件下将白色沉淀充分溶解于 2 ml DMF 溶液中,然后加入适量乙二胺,40 °C 下剧烈搅拌 24 h 得到 TPGS-NH₂ 配合物。

将等摩尔当量的 FA(2.207 mg)和 CDC(0.857 mg)溶解于 PBS 缓冲液中,磁力搅拌 30 min 后,滴加等摩尔当量的 NHS(0.578 mg)反应 3 h 以活化 FA。将 TPGS-NH₂(100 mg)充分溶解于 2 ml PBS 缓冲液中,然后逐滴滴加活化的 FA 溶液,室温下磁力搅拌 72 h 并将混合物置于截留分子量为 1 000 的透析袋中(9 L ddH₂O)于 37 °C 条件下在磁力搅拌器上搅拌透析以去除多余反应物。所得样品经冷冻干燥后得到姜黄色 FA-TPGS 油状物。

1.5 FA-TPGS 包被 siRNA 的合成 将 FA-TPGS

和 siXBP1 按照一定比例混合均匀后(5:1),通过交联作用合成了 FA-TPGS 包裹 siRNA 的纳米材料(FA-TPGS@RhB-siXBP1,简称为 FT@XBP1)。首先,将 FA-TPGS(2.24 mg)、RhB-siXBP1 和 1,4-二氧六环(2 ml)加入青霉素瓶中,超声处理 20 min 后借助微型流量计进行组装(7 ml ddH₂O)并于磁力搅拌器上快速搅拌 2 h。将得到的样本置于截留分子量为 1 000 的透析袋中透析,最后经冷冻干燥得淡红色粉末。

1.6 FT@XBP1 的鉴定及表征

1.6.1 TEM (transmission electron microscopy, TEM) 取 FA-TPGS 和 FT@XBP1 100 μl PBS 缓冲液[c(FA-TPGS):0.896 mg/ml]溶于 ddH₂O 至适宜浓度,取 100 μl 左右液体滴至铜网上,空气中自然干燥后利用透射电子显微镜鉴定 FA-TPGS 及 FT@XBP1 形态及粒径大小,并拍照。

1.6.2 动态光散射(dynamic light scattering, DLS)

取适宜浓度的 FA-TPGS 和 FT@XBP1 各 100 μl,超声波振荡处理 2 min 左右后采用动态光散射仪室温下测定纳米载体及纳米载体-siRNA 复合物粒径大小及分布情况。

1.6.3 紫外可见光吸收光谱 应用紫外吸收光谱仪观测纳米载体包裹 siXBP1 前后紫外吸收情况。分别取各样品溶于 100 μl PBS 缓冲液[c(FA-TPGS):0.896 mg/ml]再用 PBS 缓冲液稀释至适宜浓度。用紫外-可见分光光度计在 260~280 nm 范围内收集每个样本的紫外-可见吸收光谱,最后利用 Origin 2018 软件进行数据处理。

1.6.4 荧光吸收光谱 借助荧光吸收光谱仪观察 FT@XBP1 及其对照组 FT@NC 荧光光谱图。将 RhB 标记的 FT@NC 和 FT@XBP1 溶于 100 μl PBS 缓冲液[c(FA-TPGS):0.448 mg/ml]再用 PBS 缓冲液稀释至适宜浓度。采用荧光光谱仪室温考察 RhB 的荧光变化情况。RhB 的激发光波长为 550 nm,最大发射波长为 580 nm,狭缝宽度设置为 5 nm。最后用 Origin 2018 软件进行数据处理。

1.7 相对释放 将 FT@XBP1 纳米颗粒分别分散在 1 ml PBS(pH 值为 5.0 和 7.4)中并在室温下置于截留分子量为 15 000 的透析袋中(9 L ddH₂O)进行透析,两端用透析夹夹紧,于 37 °C 条件下在磁力搅拌器上搅拌,分别于 0、10、20、30 和 40 h 取样检测,每次取透析介质 2 ml,取后用等体积磷酸盐缓冲液补充。采用全波长酶标仪检测 siXBP1 从 FT@XBP1 纳米材料的释放情况,按照公式^[6]以时间为

横坐标, siRNA 累积释放率为纵坐标, 做出 siRNA 的体外释放研究曲线。实验重复 3 次, 结果取平均值, 相关度为 $P < 0.05$ 。根据公式计算每个取样点的累积药物释放量。

1.8 细胞相容性

1.8.1 扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM) 将 RAW264.7 细胞以 5×10^4 个/孔的接种密度接种于铺有无菌 10 mm 圆形玻片的 6 孔板中, 待细胞贴壁生长 40% ~ 50%, 将 FA-TPGS 以及 FT@XBP1 纳米材料 [c(FA-TPGS): 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$] 与小鼠巨噬细胞 RAW264.7 共孵育 48 h。刺激结束后, 弃培养上清液, 并用预冷的 PBS 缓冲液清洗细胞, 将样品用 5% 戊二醛 (1 ml) 固定过夜, 并依次加入一系列乙醇 (30%、50%、70%、80%、90% 和 100%) 进行样本脱水处理。样本经冷冻保存并喷金后借助扫描电子显微镜进行拍摄。

1.8.2 CCK-8 检测细胞活力 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 计数后按照 3×10^3 个/孔接种到 96 孔板中。待细胞融合度达 60% ~ 70% 后, 以 PBS 组为对照, 每组分别加 FA-TPGS 和 FT@XBP1 [c(FA-TPGS): 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$] 继续培养 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 试液 10 μl , 避光孵育 2 ~ 4 h, 最后在酶标仪上检测 OD₄₅₀ 数值, 计算 FA-TPGS 和 FT@XBP1 对 RAW264.7 巨噬细胞活力的影响。

1.8.3 流式细胞术检测细胞凋亡 为了研究 FT@XBP1 纳米材料对巨噬细胞凋亡的影响, 课题组使用 FT@XBP1 纳米材料和对照组刺激细胞 48 h 后弃掉培养基, 以 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞, 预冷 PBS 清洗 3 次后按照说明书加入结合液, 混合均匀后避光加入 10 μl Annexin V 吹打混匀, 继续加入 15 μl PI 溶液避光孵育 15 min, 最后通过流式细胞仪获得数据, 并计算凋亡细胞比例。

1.9 激光共聚焦检测细胞摄取 将 RAW264.7 细胞以 5×10^4 个/孔的细胞密度接种在激光共聚焦小皿中培养, 约 6 h 后, 加入 FT@XBP1 [c(FA-TPGS): 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] 与 RAW264.7 细胞共孵育 24 h, 弃上清液, 用预冷的 PBS 清洗细胞, 4% 多聚甲醛 200 μl 固定细胞 5 ~ 10 min, 室温下在 5% BSA 溶液中封闭 1 h, 最后用含抗荧光淬灭剂的 DAPI 染色 5 ~ 10 min 后于激光共聚焦显微镜镜下拍摄。

1.10 Western blot 实验 应用 FT@XBP1 纳米材料转染 RAW264.7 细胞 48 h 后通过 Western blot 技术检测经 FT@XBP1 处理后巨噬细胞 XBP1s 的表达水平。简而言之, 提取细胞蛋白质后通过聚丙烯酸

凝胶电泳将目标蛋白 (10 ~ 20 μg) 转至 PVDF 膜上, 封闭后, 再用 PBS 清洗 3 次, 每次 8 min, 后与按比例进行稀释 (1 : 1 000) 的特异性一抗 (β -actin 和 XBP1s) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日将条带与相应种属的二抗室温下共孵育 1 h, 最后使用发光成像系统检测荧光信号并拍摄。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的数据比较用差异 t 检验, 两组以上数据的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FT@XBP1 颗粒大小及粒径分布 构建了包被 XBP1 siRNA 的叶酸改性 TPGS 纳米载体 (FT@XBP1), 如图 TEM (图 1A) 和 DLS (图 1B) 所示, FT@XBP1 聚合物外观呈球形, 尺寸均匀, 与 FA-TPGS 纳米载体的颗粒大小接近, 平均粒径为 (200 \pm 20) nm。

2.2 FT@XBP1 的特征峰鉴定 荧光光谱显示, FT@NC 和 FT@XBP1 均在 550 nm 左右处显现 RhB 的特征吸收峰 (图 2A)。紫外吸收光谱图表明, FA-TPGS、FT@XBP1 在 220 ~ 300 nm 处均有 FA-TPGS 的特征吸收峰, 并且 RhB 修饰的 siXBP1 和 FA-TPGS 聚合交联后, 分别在 350 nm 和 550 nm 左右显示出 siRNA 的小的吸收峰, 这表明 FA-TPGS 和 RhB-siXBP1 成功结合 (图 2B)。

2.3 FT@XBP1 相对释放 将 FT@XBP1 置于不同 pH 值的 PBS 溶液中, 由图 3 可见, RhB-siXBP1 在 pH 5.0 的 PBS 溶液中 24 h 累积释放量高达 (69.65 \pm 3.95)%, 并且在 36 h 保持不变, 而在 pH 7.4 的 PBS 溶液中时, RhB-siXBP1 的相对释放率稳定在 (52.28 \pm 4.69)% 左右。上述结果提示, 酸性条件有利于 RhB-siXBP1 从 FA-TPGS 纳米载体中的释放。

2.4 RAW264.7 细胞摄取 FT@XBP1 通过激光共聚焦显微镜观察小鼠巨噬细胞 RAW264.7 与 FT@XBP1 共孵育 24 h 后红色荧光的分布情况。结果显示, RhB (红色) 标记的聚合物可以被巨噬细胞成功摄取并吞入细胞质, 部分进入细胞核 (图 4)。

2.5 FT@XBP1 的安全性 通过 SEM、CCK-8 和凋亡试验检测 FT@XBP1 的细胞毒性。将 FA-TPGS 和 FT@XBP1 分别与小鼠巨噬细胞 RAW264.7 共培养 48 h。如图 5A 所示, SEM 成像显示与 FA-TPGS

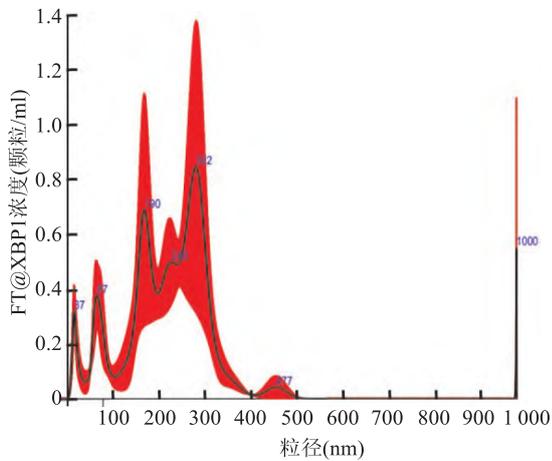
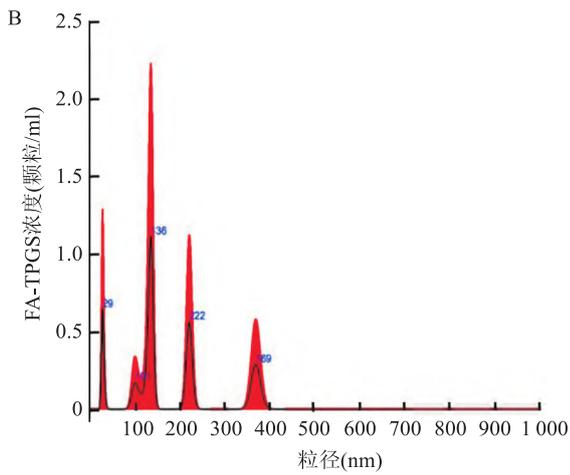
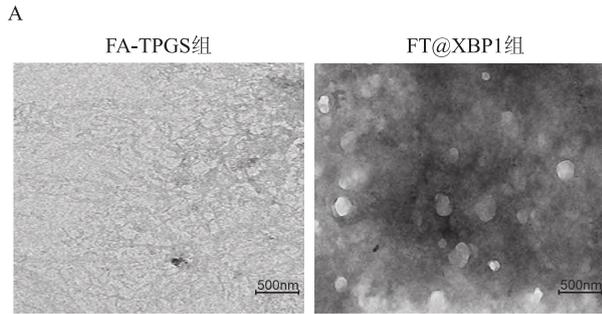


图1 FA-TPGS和FT@XBPI的颗粒大小和粒径分布

A:透射电镜检测FA-TPGS和FT@XBPI微观形态×13 500;B:FA-TPGS和FT@XBPI的粒径分布图

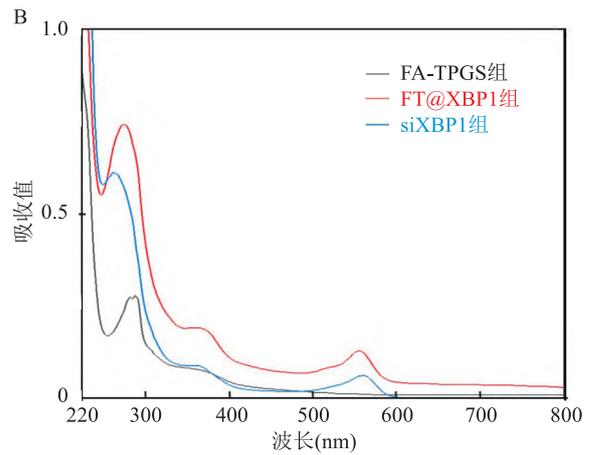
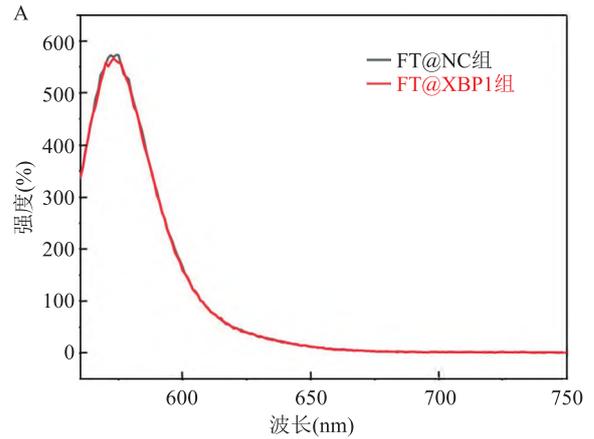


图2 FT@XBPI的荧光/紫外吸收光谱图

A:FT@NC和FT@XBPI的荧光光谱图;B:FA-TPGS、FT@XBPI和siXBPI的紫外可见光光谱图

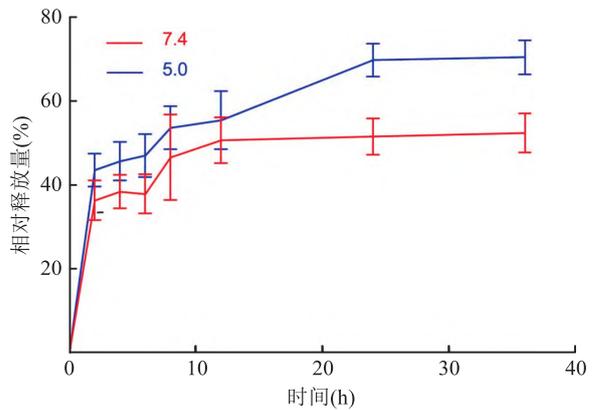


图3 FT@XBPI的相对释放(n=3)

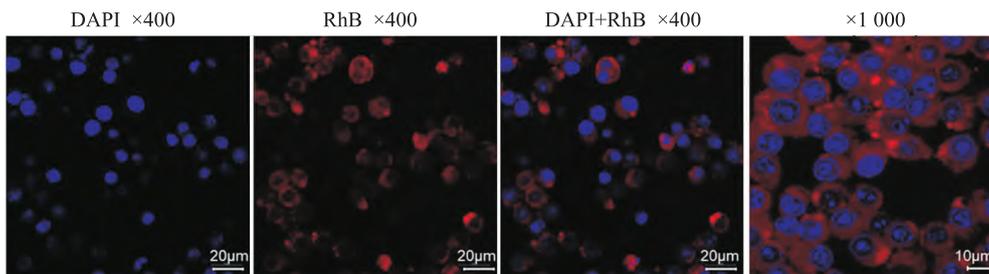


图4 激光共聚焦显微镜检测RAW264.7细胞摄取FT@XBPI

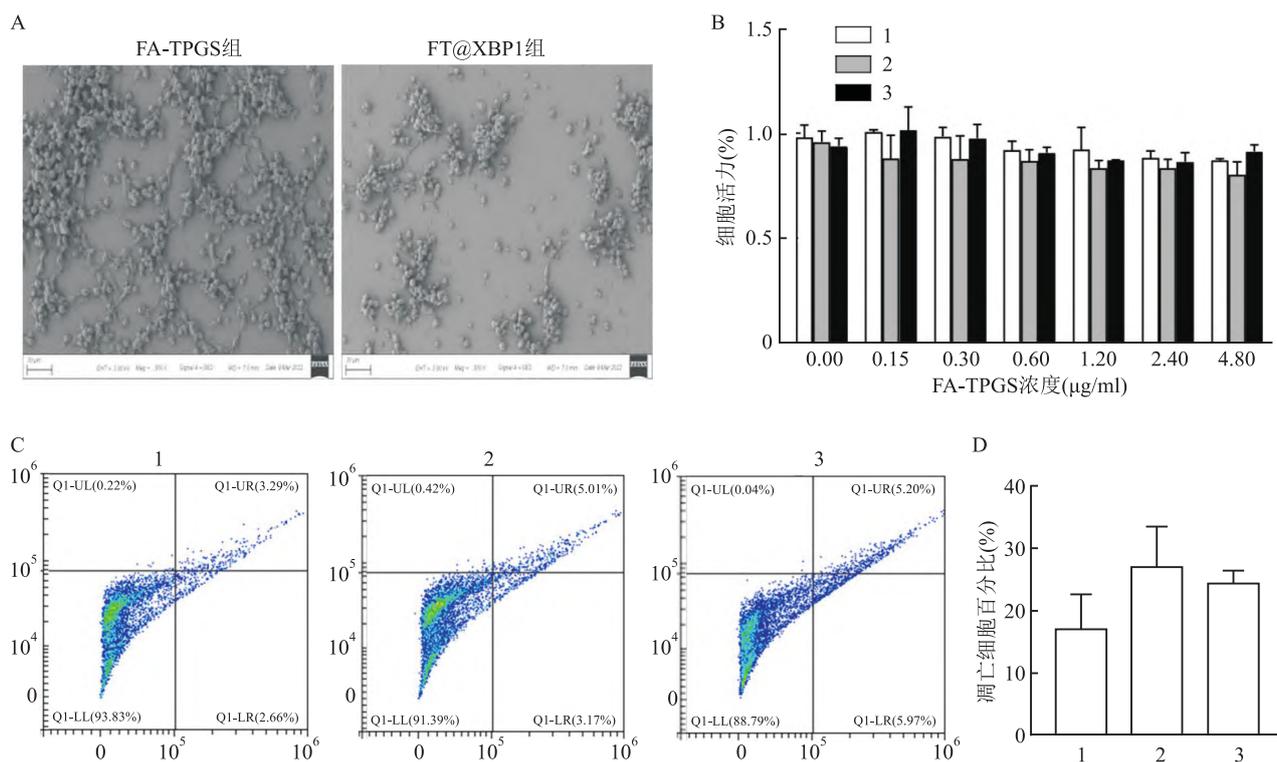


图5 FT@XBP1对巨噬细胞的安全性分析

A: FA-TPGS和FT@XBP1与RAW264.7细胞共孵育后的场扫描电镜图 $\times 300$; B: CCK-8检测FA-TPGS组和FT@XBP1组的细胞活力; C: 流式细胞术分析FA-TPGS和FT@XBP1对细胞凋亡的影响; D: 为各组凋亡细胞百分比的定量分析; 1: PBS组; 2: FA-TPGS组; 3: FT@XBP1组

相比, FT@XBP1对RAW264.7细胞状态几乎无影响。分别使用不同浓度的FA-TPGS和FT@XBP1与RAW264.7共培养48 h, CCK-8试验显示FT@XBP1在浓度为0.15~4.80 $\mu\text{g/ml}$ 范围内几乎不降低巨噬细胞的细胞活力(图5B)。并且凋亡检测也表明,与PBS组相比, FT@XBP1在2.40 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下对巨噬细胞凋亡无明显影响($F = 3.314, P = 0.122$)(图5C、D)。结果显示, FT@XBP1对巨噬细胞具有良好的细胞相容性和安全性。

2.6 FT@XBP1的敲降作用 通过Western blot方法检测FT@XBP1对巨噬细胞XBP1s的敲除作用。如图6所示,与FT@NC组相比,2.40 $\mu\text{g/ml}$ 的FT@XBP1刺激RAW264.7细胞48 h后能明显降低巨噬细胞XBP1s的表达($F = 22.601, P < 0.001$)。

3 讨论

巨噬细胞是机体固有免疫系统的重要组成部分,也是参与炎症反应和损伤-修复的重要细胞成分,在维持内环境稳定中发挥至关重要的作用。根据经典学说,活化的巨噬细胞通常分为两种表型,即经典活化的M1型巨噬细胞和替代活化的M2巨噬细胞。研究表明,巨噬细胞表型转化在多种疾病的

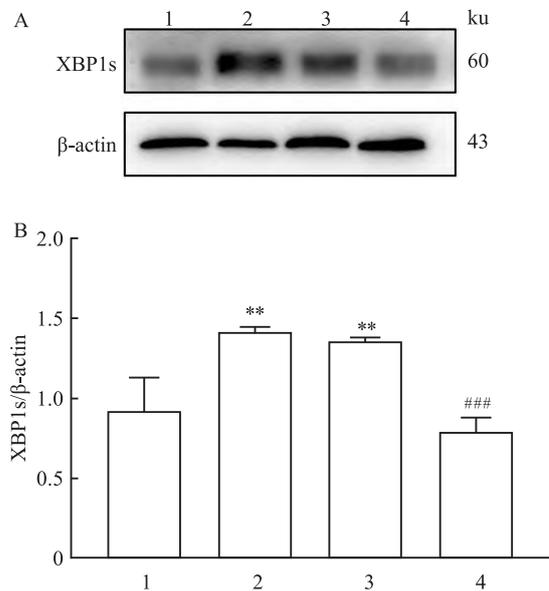


图6 FT@XBP1对巨噬细胞XBP1s的沉默作用

A: RAW264.7细胞与FA-TPGS、FT@NC和FT@XBP1共同培养48 h后XBP1s蛋白水平测定; B: 对条带进行定量分析; 1: PBS组; 2: FA-TPGS组; 3: FT@NC组; 4: FT@XBP1组; 与PBS组比较: ** $P < 0.01$; 与FT@NC组比较: ### $P < 0.001$

发生发展和治疗中发挥关键作用。如特异性阻断髓系LDH-A可将TAM向抗肿瘤表型转变,同时改善

肿瘤细胞浸润^[7], IL4/IL13 激活的 M2 样巨噬细胞有助于组织修复和炎症消退,从而保护动脉粥样硬化^[8]。因此,靶向调控巨噬细胞表型重编程可能是有效的疾病治疗策略。

营养缺乏、低氧、高代谢需求和氧化应激等都会导致内质网蛋白质折叠功能的紊乱,引起内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),进而激活UPR反应^[9]。该课题组前期研究^[10]表明,肝癌细胞可以将ERS信号传递给微环境的巨噬细胞,促进巨噬细胞M2转化。也有研究^[11]报道,ERS可能是巨噬细胞M2表型转化所必须的因素但ERS的肿瘤细胞如何调控微环境中浸润的巨噬细胞M1/M2型转化尚不清楚。IRE1 α -XBP1是UPR反应中最保守的通路,有文献^[12]报道,IRE1 α -XBP1通路在巨噬细胞表型转化中发挥至关重要的调控作用。如急性肝损伤期间,敲除XBP1损害线粒体自噬激活巨噬细胞中的mtDNA-cGAS-STING信号加剧损伤。此外,XBP1s高表达与肿瘤进展、不良预后和耐药呈正相关^[13]。因此,通过靶向调控IRE1 α -XBP1下游关键核转录因子XBP1s调控巨噬细胞表型重塑,恢复微环境免疫平衡状态值得深入研究。

靶向调控微环境巨噬细胞及其内质网应激水平,重塑巨噬细胞极化状态,进而恢复免疫微环境稳态一直是肿瘤及炎症相关疾病治疗中面临的巨大挑战。肿瘤细胞和活化的巨噬细胞表面均过表达叶酸受体(folic acid receptor, FRs),且这些受体表现出高亲和力、低免疫原性,而FRs在正常的组织中含量较少^[14],这提示可以用叶酸(FA)修饰的纳米载体荷载药物或核酸等物质发挥治疗作用。TPGS是天然维生素E的两亲性衍生物,包含亲脂性部分和聚乙二醇(PEG)的亲水性部分,具有高渗透性,已被美国食品药品监督管理局批准应用于食品和药物的安全辅助剂。研究^[7]表明TPGS不仅可以作为纳米颗粒的基质材料,用于疏水药物的高效封装,而且它与药物聚合成胶束的时候,会提高胃肠道的吸收率,因此,可以明显地提高利用率。更重要的是,TPGS不仅具有小粒径、低毒性、缓释性以及转染效率高等特点,而且对癌细胞有选择性的细胞毒性活性。因此,TPGS可能是递送siRNA的理想载体。该研究通过交联作用制备叶酸修饰的TPGS纳米载体,并在此基础上构建有效包载、稳定释放XBP1 siRNA的纳米载药系统FT@XBP1,体外研究表明FT@XBP1可被巨噬细胞有效摄取,在不影响细胞增殖和凋亡的

情况下即可显著抑制XBP1s表达,为开发以巨噬细胞和内质网应激IRE1 α -XBP1通路为靶点的治疗策略提供依据。

参考文献

- [1] 赵丹,李贤玉,袁美春,等. E2F1 siRNA通过抑制血红素诱导的神经元凋亡发挥保护作用[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(6):842-7.
- [2] Merkel O M, Beyerle A, Librizzi D, et al. Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their *in vivo* performance[J]. Mol Pharm, 2009, 6(4):1246-60.
- [3] 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):2075-109.
- [4] Chen M C, Mi F L, Liao Z X, et al. Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2013, 65(6):865-79.
- [5] Yang Y, Guo L, Wang Z, et al. Targeted silver nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy via macrophage apoptosis and Repolarization[J]. Biomaterials, 2021, 264:120390.
- [6] 乔瑾. 载阿霉素叶酸修饰硬脂酸-白芨多糖聚合物/维生素E聚乙二醇琥珀酸酯混合胶束的制备及药代动力学研究[D]. 长春:吉林大学,2020.
- [7] Seth P, Csizmadia E, Hedblom A, et al. Deletion of lactate dehydrogenase-A in myeloid cells triggers antitumor immunity [J]. Cancer Res, 2017, 77(13):3632-43.
- [8] Calkin A C, Tontonoz P. Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis[J]. Arterioscl Throm Vas, 2010, 30(8):1513-8.
- [9] 化维,朱嫚嫚,刘加涛. 基于低糖低血清营养胁迫构建内质网应激和自噬模型及其评价[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(11):1779-84.
- [10] Liu J, Fan L, Yu H, et al. Endoplasmic reticulum stress causes liver cancer cells to release exosomal miR-23a-3p and up-regulate programmed death ligand 1 expression in macrophages [J]. Hepatology, 2019, 70(1):241-58.
- [11] Oh J, Riek A E, Weng S, et al. Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation [J]. J Biol Chem, 2012, 287(15):11629-41.
- [12] Liu Z, Wang M, Wang X, et al. XBP1 deficiency promotes hepatocyte pyroptosis by impairing mitophagy to activate mtDNA-cGAS-STING signaling in macrophages during acute liver injury [J]. Redox Biol, 2022, 52:102305.
- [13] Chen S, Chen J, Hua X, et al. The emerging role of XBP1 in cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127:110069.
- [14] Tang M, Huang Y, Liang X, et al. Sorafenib-loaded PLGA-TPGS nanosystems enhance hepatocellular carcinoma therapy through reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance [J]. AAPS PharmSciTech, 2022, 23(5):130.

Preparation and characterization of folic acid modified D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanomaterials encapsulated with siRNA

Zhu Manman¹, Cheng Yong¹, Rao Peng¹, Zhang Guiyang², Liu Hao³, Xiao Lei⁴, Liu Jiatao^{1,4}

(¹School of Pharmacy, ²School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

³Dept of Oncology, ⁴Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To construct folate modified D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) nanomaterials (FA-TPGS), which can stably load and effectively release siRNA, and to observe the effects of nanoparticles on the cytotoxicity and spliced X-box binding protein 1 (XBP1s) of mouse leukemia cells of monocyte macrophage (RAW264.7). **Methods** Mixed FA-TPGS and rhodamine B (RhB) labeled XBP1 siRNA solution in a proportion of 5 : 1 and obtained the nano-complex coated with XBP1 siRNA (FT@XBP1). FT@XBP1 nanocarriers were characterized by transmission electron microscope, dynamic light scattering, ultraviolet visible spectrum analysis and/or fluorescence analysis. And the release of siRNA from FA-TPGS nano-carriers was calculated simultaneously. The cell cytotoxicity of FT@XBP1 nanomaterials were detected by scanning electron microscopy (SEM), CCK-8 and flow cytometry. And the inhibited effect of XBP1s of RAW264.7 cells was checked by Western blot. **Results** FA modified TPGS could effectively bind XBP1 siRNA. And the average particle size of FT@XBP1 nanocarriers were (200 \pm 20) nm. The relative release assays showed that acidic environments (pH 5.0) was beneficial for siRNA to release from FT@XBP1. Both CCK-8 and apoptosis assay showed that the effects of FT@XBP1 on the proliferation and apoptosis of RAW264.7 cells were relatively small, and FT@XBP1 could significantly inhibit the expression of XBP1s protein in RAW264.7 ($P < 0.001$). **Conclusion** TPGS nanoparticles modified with folic acid can effectively encapsulate XBP1 siRNA and inhibit XBP1s expression of RAW264.7 cells with good cellular compatibility.

Key words folic acid; D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate; siRNA; macrophages; X-box binding protein 1

(上接第 1864 页)

of FBG, Scr, BUN, 24 h urine protein, and the kidney injury score in the exercise group and the low-temperature exercise group decreased, while the levels of NRF2 and HO-1 in the exercise group and the low-temperature exercise group increased ($P < 0.05$). Compared with the low-temperature group and the exercise group, the levels of FBG, Scr, BUN, 24 h urine protein, and the kidney injury score in the low-temperature exercise group decreased, while the levels of NRF2 and HO-1 in the low-temperature exercise group increased ($P < 0.05$). ② After the aerobic exercise intervention at low temperature, the levels of Scr, BUN, and UACR in the exercise group (1 time/week) and the exercise group (≥ 2 times/week) were lower than those in the control group, and eGFR were higher than that in the control group ($P < 0.05$). The cumulative incidence of poor prognosis in the exercise group (≥ 2 times/week) was 2.13% (1/47), which was lower than in the exercise group [1 time/week, 11.43% (4/35)] and the control group [16.07% (18/112), $P < 0.05$]. COX regression analysis showed that exercise intervention ≥ 2 times/week ($HR = 0.123$, 95% CI : 0.016 - 0.925) reduced the risk of poor short-term prognosis in patients with diabetic nephropathy compared with no intervention. **Conclusion** Aerobic exercise intervention at low temperature can correct renal metabolic abnormalities in diabetic nephropathy, protect renal tissues, and reduce the risk of poor short-term prognosis by a mechanism that may be related to upregulation of NRF2/HO-1 axis expression.

Key words diabetic nephropathy; low temperature; aerobic exercise; renal metabolism; short-term prognosis