

网络出版时间:2024-09-25 09:42:11 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240924.1711.002

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¹,刘彤彤²,尹秀娟¹,张磊²,王啸¹

(¹ 安徽医科大学第一附属医院放射科,合肥 230022;

² 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(MRI)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;miR-145;喜树碱;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%^[1]。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,常常被用作模型药物^[2]。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^[3]。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^[4-5],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^[6]。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^[7],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)以实现肝癌的磁共振成像(magnetic resonance imaging, 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实验动物中

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

心。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^[6]。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 细胞摄入实验

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 2×10^5 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% CO₂ 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 2×10^5 个将 HepG2 细胞接种于六孔板培养皿中,置于 37 °C、5% CO₂ 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 2×10^5 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^[8]。

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 2×10^5 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 2×10^5 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 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法比较分析各基因表达^[9]。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	CAGTTTCCCAGGAATCCCT	20
C-Caspase-3	F:GCTCATACTGTGGCTGTGT	20
	R:TCTGTTGCCACCTTTCGGTT	20
Cyt-c	F:GGGCGAGAGCTATGTAATGCAAG	23
	R:TACAGCCAAAGCAGCAGCTCA	21
β-actin	F:GATGAGATTGGCATGGCTT	19
	R:GTCACCTTCACCGTTCCAGT	20
U6	F:GGAACGATACAGAGAAGATTAGC	23
	R:TGGAACGCTTCACGAATTTGCC	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, CCl₄) 腹腔注射法诱导原位肝癌小鼠模型^[10]。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 MRI

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 MRI 将 HepG2 细胞和 HepaRG 细胞与含 Gd³⁺ 制剂 Gd-DOTA、CMGL 和 LA-CMGL 在 37 °C 下分别孵育 12 h。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 MRI。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 MRI 将制备好的 LA-CMGL、Gd-DOTA 和 CMGL 溶液通过尾静脉注射入肝癌模型小鼠体内,其中 Gd³⁺ 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 LA 修饰的具有靶

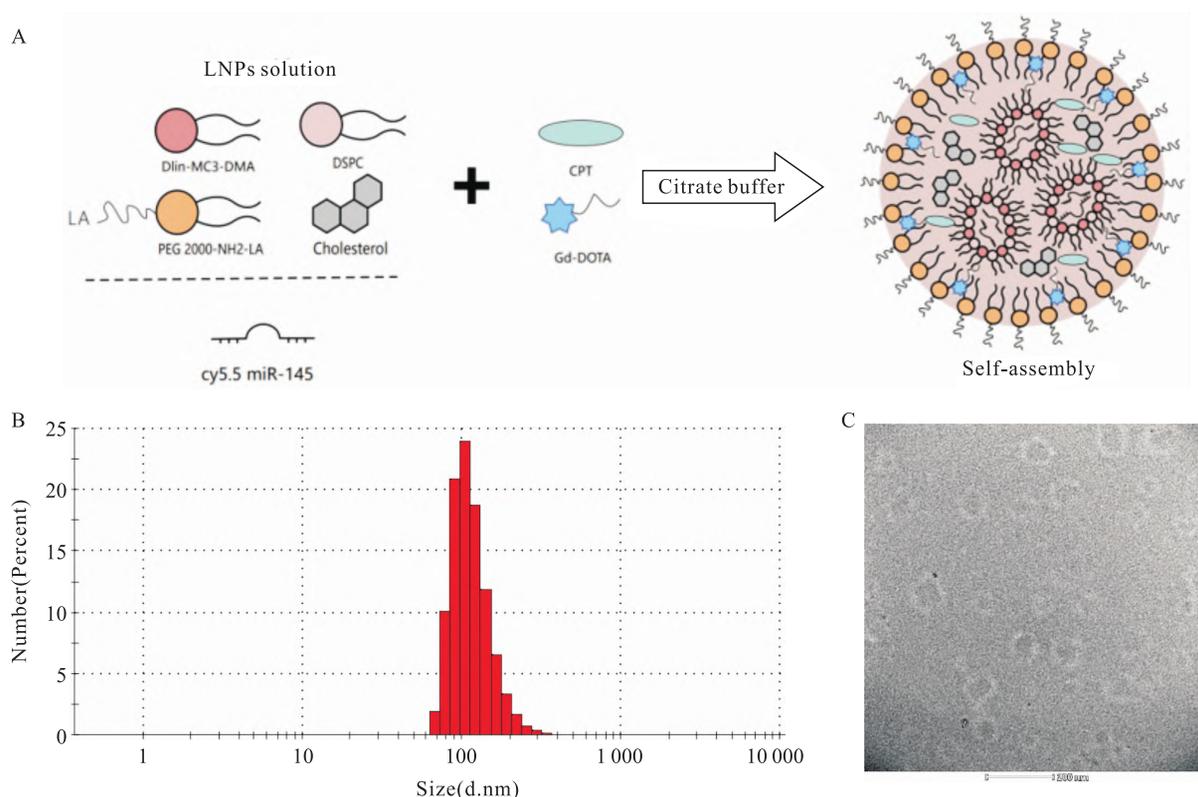


图 1 LA-CMGL 的合成及表征

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.

向能力的 LA-CMGL。

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 ($F = 14.68, 21.23, P < 0.01$)。

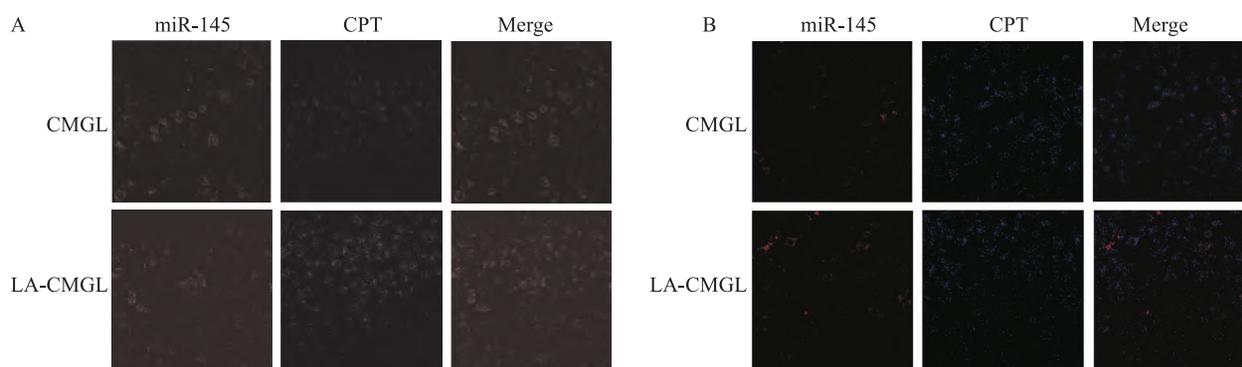


图 2 两种细胞对 CMGL 及 LA-CMGL 的摄取量比较

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)

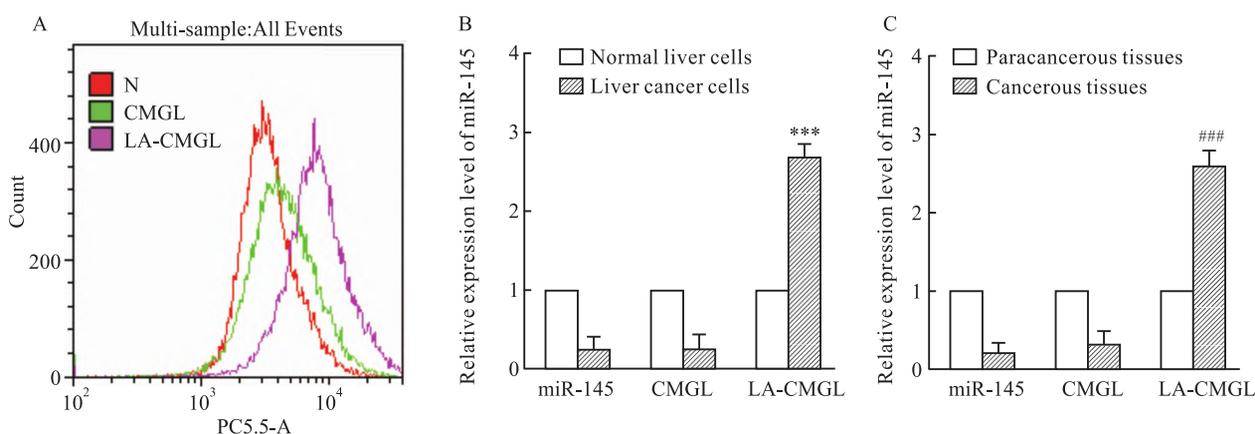


图 3 CMGL/LA-CMGL 的体外及体内摄取率测定

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.

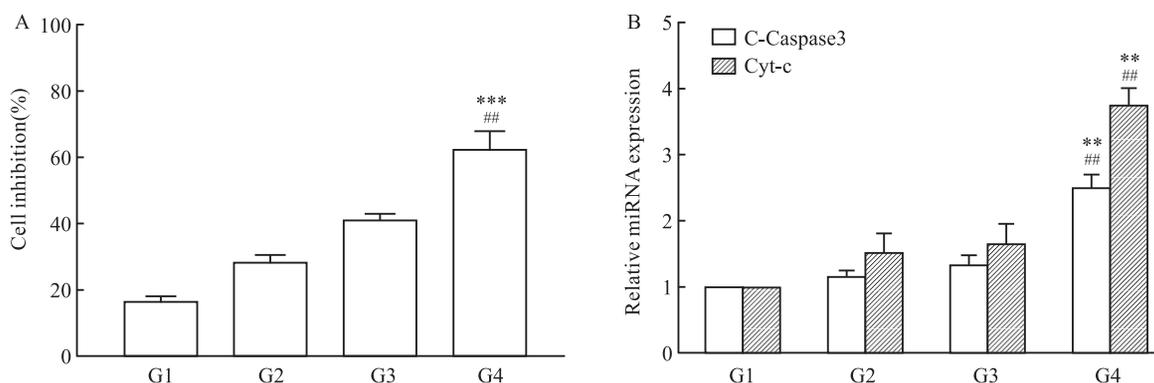


图4 LA-CMGL对肝癌细胞生长的影响

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

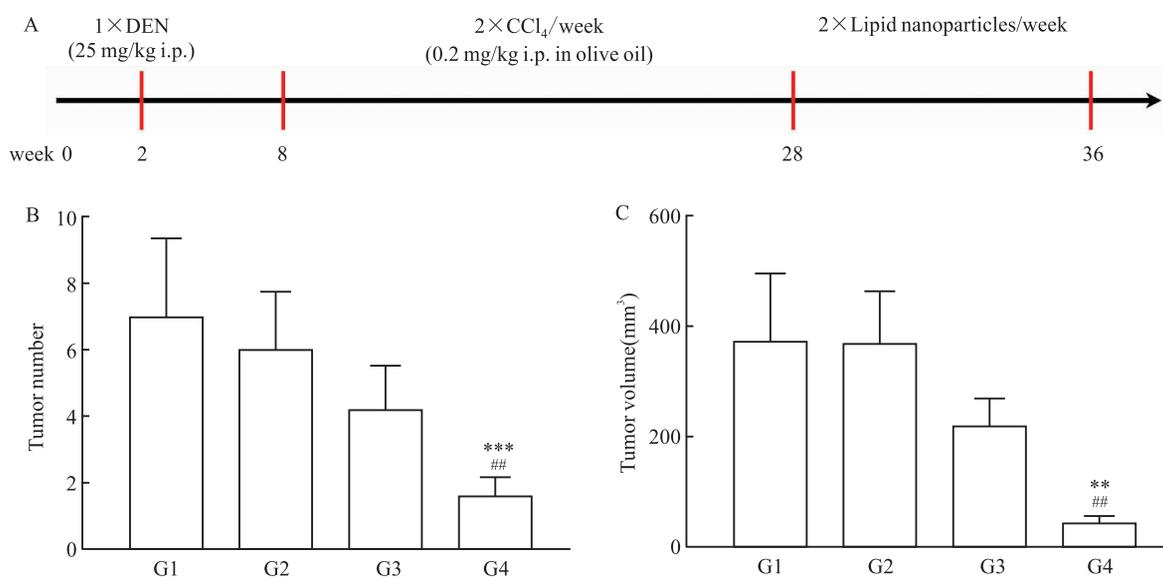


图5 治疗后肝癌小鼠肿瘤个数及体积

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 MRI 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

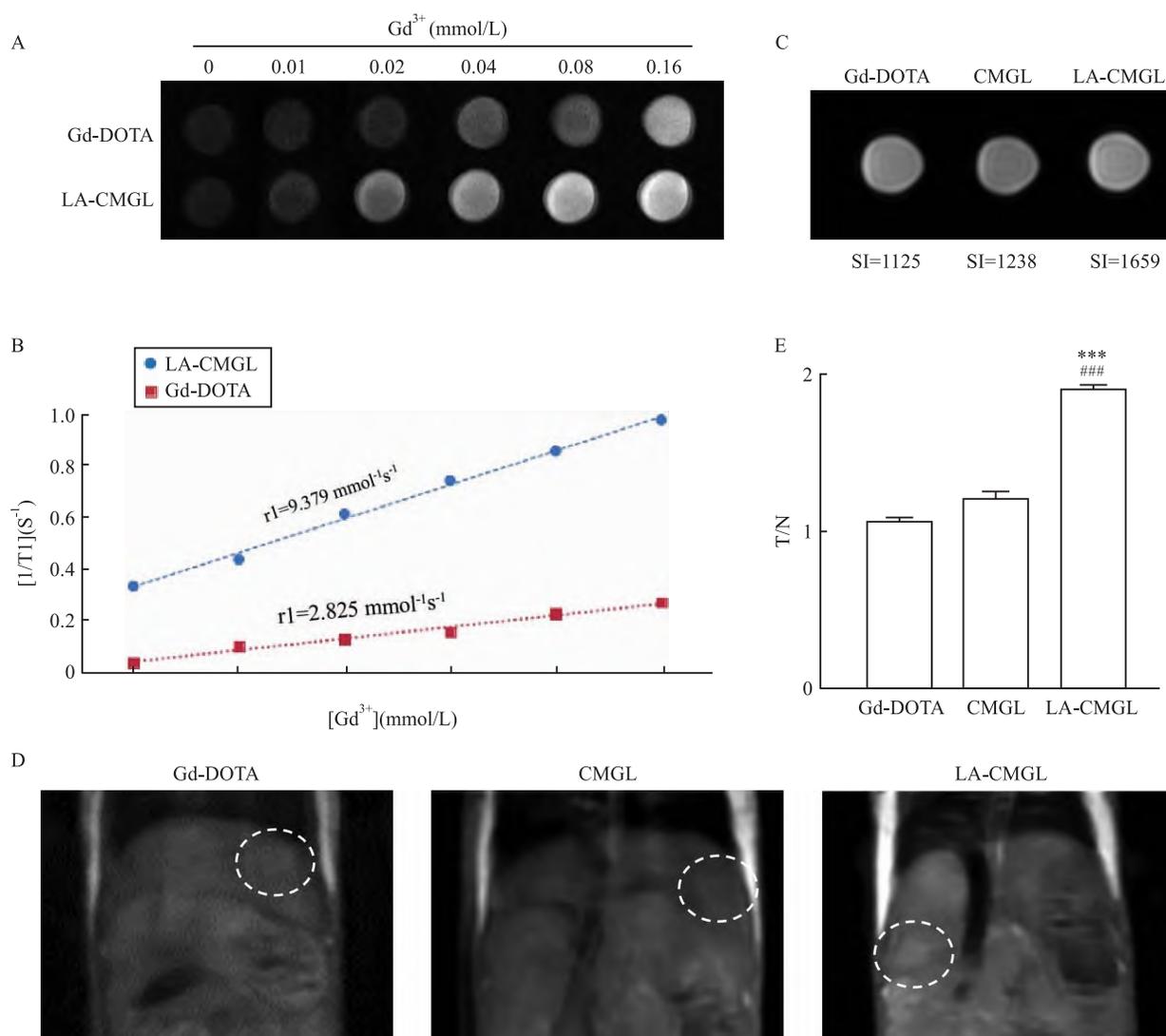


图 6 Gd-DOTA 和 LA-CMGL 的纵向弛豫率及小鼠肝癌 MR 增强

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^[11]。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地探索。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^[12]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 LA 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-LNPs 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-LNPs (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-LNPs。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。

MRI 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 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 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 的灵敏度。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^[13]。此外, 在相同 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 Gd^{3+} 递送至肿瘤细胞内, 提高了 MRI 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 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- α -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 photo-crosslinked 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 Jing¹, Liu Tongtong², Yin Xiujuan¹, Zhang Lei², Wang Xiao¹

¹Dept of Radiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²School 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/camptothecin (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; miR-145; camptothecin; 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