

·实验研究 Experimental research·

维生素 A 修饰的纳米载体靶向肝星状细胞沉默 TLR4 基因并抑制其激活的体外实验研究

陈志伟， 韩世松， 安泳橙， 周智美， 陈 烨， 林立腾， 朱康顺

【摘要】 目的 制备由维生素 A(VA)修饰的纳米载体聚乙二醇(PEG)-聚乙烯亚胺(PEI),用于靶向肝星状细胞(HSC)(LX-2 细胞株)输送 Toll 样受体(TLR)4 小干扰 RNA(siRNA)。观察和评估 VA-PEG-PEI 对 LX-2 细胞转染效率、TLR4/核因子(NF)-κB 信号通路和 α-平滑肌肌动蛋白(SMA)表达的影响。**方法** 采用细胞计数试剂盒(CCK)-8 检测纳米基因药物细胞毒性。通过流式细胞术和荧光显微镜观察纳米药物转染效率。脂多糖(LPS)刺激 LX-2 细胞,并用不同多聚体[VA-PEG-PEI/siTLR4 或 PEG-PEI/siTLR4]进行转染。蛋白质印迹法(WB)和免疫荧光法分别检测 LX-2 细胞 TLR4/NF-κB 信号通路蛋白水平和 α-SMA 表达。**结果** 高浓度 (40 μg/mL)VA-PEG-PEI/siTLR4 孵育下 LX-2 细胞仍具有 80%以上存活率,表明纳米药物细胞毒性较低。LPS 刺激的 LX-2 细胞 TLR4/NF-κB 信号通路水平升高,这种作用经 VA-PEG-PEI/siTLR4 处理后显著减弱。同时,VA-PEG-PEI/siTLR4 能有效地使 LX-2 细胞失活,这可通过降低纤维化标志物 α-SMA 表达证明。**结论** VA-PEG-PEI/siTLR4 能高效转染 siRNA,有效下调 LX-2 细胞中 TLR4/NF-κB 信号通路和 α-SMA 表达。本体外实验研究表明,VA-PEG-PEI/siTLR4 具有治疗肝纤维化的巨大潜力。

【关键词】 肝纤维化；纳米载体；肝星状细胞；Toll 样受体 4；小干扰 RNA

中图分类号:R735 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2020)-10-1008-08

Vitamin A-modified nanocarrier for targeted TLR4 siRNA delivery to hepatic stellate cells for anti-fibrotic treatment: an experimental study in vitro CHEN Zhiwei, HAN Shisong, AN Yongcheng, ZHOU Zhimei, CHEN Ye, LIN Liteng, ZHU Kangshun. Department of Minimally Invasive Intervention, Laboratory of Interventional Radiology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510220, China

Corresponding author: ZHU Kangshun, E-mail: zhksh010@163.com

[Abstract] **Objective** To prepare the polyethylene glycol and polyethyleneimine(PEG-PEI) modified by vitamin A (VA) for targeted TLR4 siRNA delivery to hepatic stellate cells (LX-2 cells), to evaluate the transfection efficiency, the level of TLR4/NF-kappa B signaling pathway and the α-SMA expression in LX-2 cells treated with PEG-PEI-VA. **Methods** The cytotoxicity of the nanodrug was evaluated by CCK-8 assay. The transfection efficiency of the nanodrug was measured by flow cytometry and fluorescence microscopy. LX2 cells were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and transfected with different polyplexes (VA-PEG-PEI/siTLR4 or PEG-PEI/siTLR4). The protein levels of TLR4/NF-kappa B signaling pathway and α-SMA expression in LX2 cells were respectively assessed by Western blot assay and immunofluorescence. **Results** LX2 cells were incubated with VA-PEG-PEI/siTLR4 at a high concentration of 40 ug/mL, and at least 80% of them remained viable, indicating that the cytotoxicity of the nanodrug was very low. The level of TLR4/NF-kappa B signaling pathway of LX2 cells stimulated by LPS was obviously increased, such an effect was significantly detracted by VA-PEG-PEI/siTLR4 treatment. Moreover, VA-PEG-PEI/siTLR4 could effectively deactivate LX-2 cells as evidenced by the reduced level of fibrotic marker α-SMA. **Conclusion** VA-PEG-PEI/siTLR4 can achieve a highly efficient siRNA transfection, and effectively downregulate the TLR4/NF-

kappa B signaling pathway and α -SMA expression in LX-2 cells. This in vitro investigation indicates that VA-PEG-PEI/siTLR4 has great potential for the treatment of liver fibrosis. (J Intervent Radiol, 2020, 29: 1008-1015)

【Key words】 hepatic fibrosis; nanocarrier; hepatic stellate cell; TLR4; small interfering RNA

肝纤维化是肝脏对各种原因导致的慢性损伤的一种修复反应，以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增生为特征^[1]。目前研究认为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化是导致其发生的最关键环节。正常肝脏 HSC 是静止的，含有大量维生素 A(vitamin A, VA)脂质滴，肝组织损伤时活化的 HSC 转化为肌成纤维细胞，同时合成大量 ECM^[2-3]。肝纤维化发生、发展与转归取决于 ECM 合成和降解的净效应。通过抑制 HSC 活化减少 ECM 生成，有望逆转肝纤维化^[4-5]。因此开发针对活化 HSC 安全高效的靶向药物可能是治疗肝纤维化的有效方法之一。

Toll 样受体(TLR)4-髓样分化因子(MyD)88-核因子(NF)- κ B 信号通路广泛存在于各种组织细胞中，是介导炎性因子在细胞内和细胞间表达的重要信号通路之一^[6]。脂多糖(LPS)是革兰阴性细菌外膜的主要成分。现有研究证明 LPS 可通过 TLR4 途径大幅度诱导 HSC 活化，加重肝纤维化^[7-9]。在 LPS 诱导的 HSC 活化过程中，TLR4 通过衔接分子 MyD88 激活导致 NF- κ B 异位，进而导致 HSC 向肌成纤维细胞转化，并上调各种促炎细胞因子。另一研究也证实，TLR4 突变小鼠纤维化发生率会明显降低^[10]。上述研究均表明 TLR4 信号通路在调节 HSC 活化和增殖过程中起到了重要作用。近年广泛受到关注的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术是一种调控基因表达的有效方法，但其临床应用仍有较大限制，例如 RNA 在体内易降解，较大分子量且带有负电荷使其难以跨越细胞膜进入细胞内起作用等^[11]。为了解决上述难题，许多纳米载体应运而生^[12]，其中阳离子聚合物聚乙烯亚胺(PEI)即为一种常用于生物医学研究的纳米载体^[13]，具有很强的吸附能力，可用于负载小干扰 RNA(siRNA)，在体内外水平表现出良好的基因沉默功能^[14]。但 PEI 缺点之一是具有较强的细胞毒性，且对细胞输送 siRNA 也不具有选择性，因此单独应用 PEI 行基因药物递送的效果欠佳。必须对 PEI 进行适当修饰，降低其细胞毒性，同时赋予其靶向识别功能，才可能取得更好的疗效^[15]。

鉴于 HSC 在肝纤维化过程中的重要作用，本研

究选择 HSC 作为纳米载体靶向细胞。HSC 表面富含视黄醇结合蛋白(retinol binding protein, RBP)受体^[16]，可负责摄取和储存 VA。已有研究通过利用 VA 与 RBP 受体相互作用，用 VA 脂质体包载抑制前鞭毛体特异膜糖蛋白(gp46)siRNA 复合物，靶向 HSC 并抑制 gp46 表达^[17]。本研究类似地制备一种由 VA 修饰的聚乙二醇(PEG)-PEI 聚合物胶束(VA-PEG-PEI)用于 siRNA HSC 靶向递送，探索通过 VA-PEG-PEI 介导的 TLR4 siRNA(siTLR4)输送在体外细胞水平实现对 HSC TLR4/NF- κ B 信号通路的靶向调控，从而为肝纤维化治疗寻求一种新策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

实验用主要试剂有 HSC 细胞株(LX-2)(广东药科大学药学院馈赠)，有机化学原料 PEG(上海梵圣生物科技公司)，血清和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)，双抗(北京索莱宝科技公司)，LPS(美国 Sigma 公司)，无功能阴性对照 siRNA(SCR)(生工生物工程上海公司)，Cy3 标记的 SCR(SCR-Cy3)(美国 Invitrogen 公司)，琼脂糖(粉末，香港 Gene 公司)，溴化乙锭溶液(上海翊圣生物科技公司)，乙酸三酯-乙二胺四乙酸(TAE)缓冲液(江苏凯基生物技术公司)，4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(瑞士 Roche 公司)，TLR4 siRNA 单基因套装(广州锐博生物科技公司)，细胞计数试剂盒(CCK)-8(日本 Dojindo Laboratories 公司)，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)缓冲液(上海碧云天生物技术公司)，抗 α -平滑肌肌动蛋白(SMA) 兔单克隆抗体、抗 TLR4 兔单克隆抗体(武汉博士德生物工程公司)，抗 NF- κ B-p65 兔单克隆抗体(美国 CST 公司)，超敏增强型化学发光(ECL)试剂盒(上海碧云天生物技术公司)。

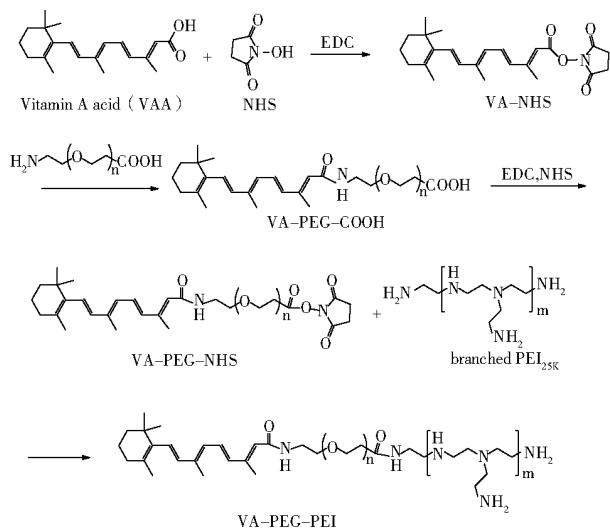
1.2 LX-2 细胞培养和分组

LX-2 细胞置于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中，放入 37℃、50 mL/L CO₂ 孵育箱(相对湿度 95%) 中培养。LX-2 细胞随机分为对照组、LPS 处理组、PEG - PEI/siTLR4 +LPS 处理组、VA - PEG - PEI/

siTLR4+LPS 处理组。其中对照组仅加入含血清和双抗的 DMEM 培养基培养,其余 3 个处理组均预加入浓度为 0.1 μg/mL LPS 培养基 12 h。

1.3 VA-PEG-PEI 合成方法与操作步骤

参照文献^[18]报道方法合成纳米载体复合物 VA-PEG-PEI,合成路线如图 1 所示。



PEG:聚乙二醇;PEI:聚乙烯亚胺;EDC:1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺;NHS:N-羟基丁二酰亚胺;VAA:维生素 A 酸

图 1 纳米聚合物 VA-PEG-PEI 合成线路

1.4 VA-PEG-PEI 核磁共振波谱表征

通过 VA 和 PEG-PEI 酰胺化反应合成纳米聚合物 VA-PEG-PEI,作为 siRNA 靶向纳米载体。将 VA 和纳米载体 PEG-PEI 分别溶解于氘代水,用 AVANCE III HD-400 MHz 超导核磁共振波谱仪检测两者 ¹H 化学位移。

1.5 聚合物 Zeta 电位和水合粒径检测

按照不同纳米聚合物氨基和 siRNA 磷酸根摩尔比(N/P 比)1、2、4、6、8、10、12 取相应 VA-PEG-PEI 溶液与 100 nmol/L SCR 混合,常温下静置复合 30 min。采用纳米粒度仪(英国 Malvern 公司)测量 VA-PEG-PEI Zeta 电位和水合粒径分布,每个样品测量 5 次,取平均值。

1.6 凝胶阻滞电泳试验

按照不同 N/P 比 0、1、2、4、6、8、10、12 取相应 VA-PEG-PEI 和 PEG-PEI 溶液分别与 100 nmol/L SCR 混合,常温下静置复合 30 min。配制 1% 琼脂糖溶液,加入溴化乙锭,终浓度为 0.5 μg/mL。将琼脂糖溶液倒入凝胶托盘并插入加样梳,常温放置 30 min 后待凝固。拔出加样梳,将琼脂糖凝胶浸没于盛有 TAE 缓冲液的水平电泳槽内,将复合好的不同 N/P

比 VA-PEG-PEI/SCR、PEG-PEI/SCR 样品分别加入各琼脂糖凝胶加样孔内。接上电源 100 V 恒压电泳 30 min,取出凝胶,于 Clinx ChemiScope 6000 型凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器公司)观察电泳 siRNA 条带,并摄片。

1.7 细胞活性试验

CCK-8 试验评估不同纳米复合物对 LX-2 毒性作用:①LX-2 以 5×10^3 个/孔种入 96 孔板内,培养箱中孵育至少 12 h 使细胞贴壁;②按 N/P=8、6 分别取 VA-PEG-PEI、PEG-PEI 和对照 PEI 与 SCR 复合 30 min,96 孔板内每孔加入 100 μL 含不同纳米聚合物(VA-PEG-PEI/SCR、PEG-PEI/SCR、PEI/SCR)的 DMEM 培养基,浓度梯度设为 10、20、40、80、160、320、640 μg/mL;③孵育 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 3~4 h;④酶标仪于 450 nm、610 nm 检测各孔光吸收值(A 值),酶标仪软件自动计算出校正后的 A 值,而未添加纳米聚合物处理的细胞培养孔设置为对照孔,细胞活性标准化为 100%;⑤按以下公式计算细胞活性:细胞存活率=(加药孔 A 值-本底孔 A 值)/(对照孔 A 值-本底孔 A 值)×100%。每次试验均设置 6 个检测副孔,A 值取 6 孔测量平均值。

1.8 细胞转染效率检测与细胞内化观察

通过流式细胞术(FCM)检测纳米载体对 HSC siRNA 转染效率:①将 LX-2 和用于对照的肝实质细胞 LO-2 分别种于 6 孔板内,细胞数量约为 2×10^5 个/孔,培养箱中孵育至细胞贴壁;②按 N/P=8、6,分别取纳米载体 VA-PEG-PEI、PEG-PEI 与 100 nmol/L SCR-Cy3 复合 30 min,另外按不同 N/P 分别等于 2、4、6、8、10,取相应 VA-PEG-PEI 与 100 nM SCR-Cy3 复合 30 min;③LX-2 更换分别含 VA-PEG-PEI/SCR-Cy3、PEG-PEI/SCR-Cy3 复合物培养基,于培养箱中孵育 5 h,LO-2 更换含 VA-PEG-PEI/SCR-Cy3 复合物培养基,于培养箱中孵育 5 h;④磷酸缓冲液(PBS)冲洗 3 次,0.25% 胰酶消化、分离细胞,离心并将细胞重悬于 600 μL PBS 中。根据 Cy3 激发和发射波长分别为 550 nm、570 nm,通过流式细胞仪选择合适通道检测 Cy3 阳性细胞比例,以评估纳米复合物对细胞转染效率,并用随机操作软件进行数据分析。

观察纳米载体细胞内化情况:①②③步骤同上;④孵育后,加入 4% 多聚甲醛固定 10 min;⑤加入 400 μL DAPI 溶液孵育 10 min,对细胞核进行染色;⑥于荧光显微镜上观察、摄片。上述所有操作过程均在避光条件下进行。

1.9 LX-2 TLR4/NF-κB 蛋白表达检测

蛋白质印迹法(western blot, WB)检测 LX-2 内 TLR4/NF-κB 蛋白表达:①适量 LX-2 接种于 6 孔板内, 培养箱中孵育 12 h 贴壁;②吸取一定量 siTLR4 置于 Eppendorf(EP)管内, 加入相应纳米载体 VA-PEG-PEI(N/P=8)、PEG-PEI(N/P=6)混匀复合 30 min, 配制复合物 VA-PEG-PEI/siTLR4、PEG-PEI/siTLR4;③更换含上述不同复合物的细胞培养基, siRNA 剂量为 100 nM, 孵育 48 h;④提取各组 LX-2 总蛋白, 二辛可酸(BCA)蛋白定量, 检测、拟合蛋白含量标准曲线, 将样品蛋白浓度调至一致;⑤按 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书配制 10% 分离胶(电泳电压为 100 V, 持续 60 min)和浓缩胶(电泳电压为 80 V, 持续 20 min);⑥90 min 后将聚偏二氟乙烯(PVDF)膜置于封闭液中封闭 1 h, 加入 1:1 000 一抗稀释液于 4℃ 中过夜;⑦加入相应二抗稀释液于室温中孵育 2 h, ECL 显影, 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参。

1.10 LX2 细胞 α-SMA 表达检测

免疫荧光化学检测步骤:无菌圆盖玻片上分别爬片构建对照组、PEG-PEI 处理组、VA-PEG-PEI 处理组的 HSC-LX2 细胞, 盖玻片于 12 孔板中培养 48 h;用 4% 多聚甲醛固定爬片 15 min, 体积分数 0.5% 的 Triton X-100 室温通透 20 min;玻片上滴加正常山羊血清, 室温封闭 30 min;废弃封闭液, 加入 1:1 000 稀释比的 Alexa Fluor 647 标记的抗 α-SMA 抗体 100 μL, 避光室温孵育 2 h;滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 对标本染核;吸水纸吸干爬片上液体, 含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 荧光显微镜下观察采集图像;用 Image J 图像分析软件分析各组荧光片细胞平均光密度(OD)值, 进行统计学分析。

1.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 统计学软件分析处理数

据, 以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

最终合成的聚合物 VA-PEG-PEI 通过核磁共振氢谱表征, 其 ^1H 波谱图见图 2。其中 5.37 ppm 峰(a)为 VA 双键基团质子特征峰, 3.6 ppm 附近的峰(b)为 PEG 特征峰, 1.8 ppm 和 1.2 ppm 峰为 PEI 特征基团, 而 7.3 ppm 峰为氘代氯仿的溶剂峰, 以三甲基硅烷(TMS)为内标(0 ppm)。所合成的聚合物 VA-PEG-PEI 在其每一个嵌段部分均有标志性特征峰, 证明该聚合物成功合成。

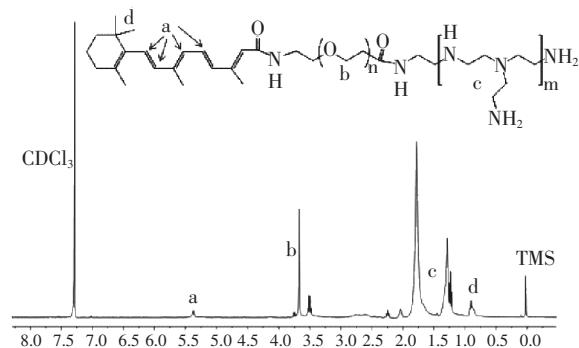


图 2 VA 和 PEG-PEI ^1H 核磁共振波谱图

纳米粒径分析仪检测不同 N/P 比时 VA-PEG-PEI/SCR 粒径分布和 Zeta 电位结果显示, 随着 N/P 比逐渐增加, 复合物粒径逐渐缩小, N/P 比增大至 8 时粒径达最小(125.0 ± 3.2) nm, 而后趋于稳定;Zeta 电位随 N/P 比增大逐渐增高, N/P 比为 8 时 Zeta 电位为(10.2 ± 1.0) mV, 见图 3。因此, N/P 比为 8 时, 复合物具有合适粒径和弱正电位, 有利于细胞摄取、吸收, 适合进行后续实验。

琼脂糖凝胶阻滞电泳试验结果显示, 随着 N/P 比逐渐增大, siRNA 条带逐渐减弱, 直至消失;VA-

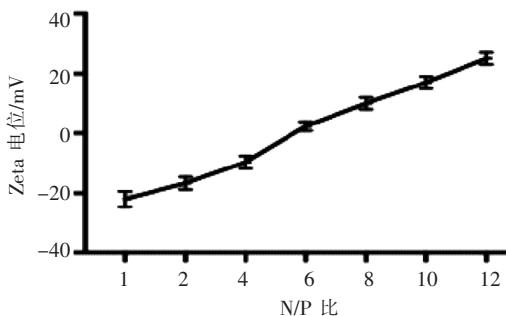
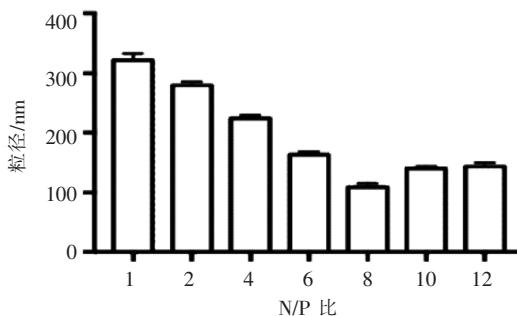


图 3 不同 N/P 比时靶向纳米复合物粒径和 Zeta 电位

PEG-PEI 组、PEG-PEI 组 N/P 比分别为 ≥ 8 、 ≥ 6 时, siRNA 条带完全消失, 说明在 siRNA 完全被载体复合; 其中 VA 靶向修饰后 PEG-PEI 复合 siRNA 能力较未修饰 PEG-PEI 稍有减弱, 但仍有良好的 siRNA 负载能力, 见图 4。

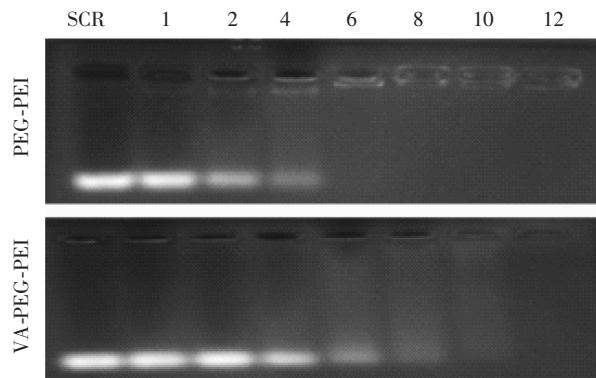
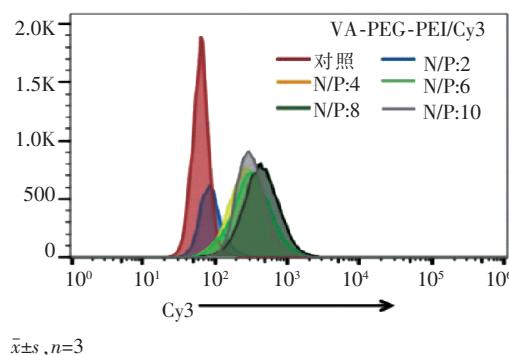


图 4 纳米复合物在不同 N/P 比凝胶阻滞电泳试验结果

CCK-8 试验评估不同纳米聚合物对 LX-2 活性影响, 设置浓度梯度为 10、20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 结果显示随着纳米聚合物浓度增加, 细胞生存活性逐渐下降, 其中在高浓度点 ($> 80 \mu\text{g}/\text{mL}$) 位置的细胞生存率开始明显下降; VA-PEG-PEI、PEG-PEI 对 LX-2 半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 124.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、93.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 见图 5; 表明两种纳米聚合物均有较低的细胞毒性。



$\bar{x} \pm s, n=3$

图 5 纳米聚合物细胞毒性检测

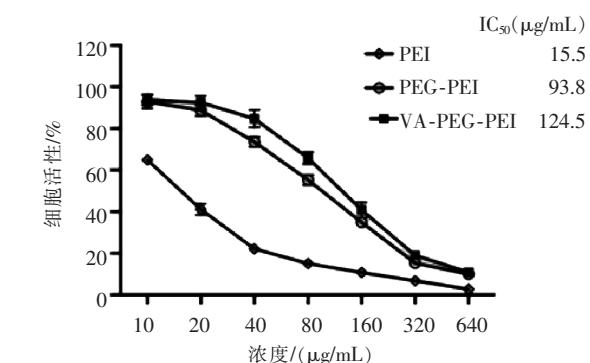
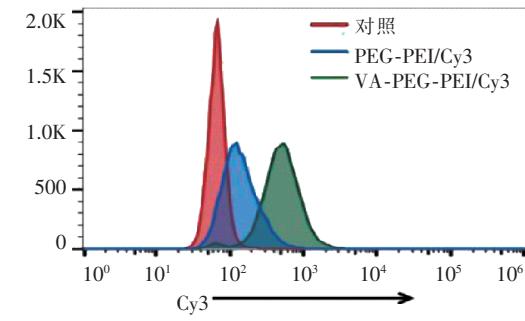


图 6 不同 N/P 比纳米聚合物对 LX-2 转染效率



$\bar{x} \pm s, n=3$; ¹⁾与 VA-PEG-PEI/Cy3 或 PEG-PEI/Cy3 相比, $P < 0.05$

图 7 FCM 检测纳米载体对 LX-2 转染效率

图 5 纳米聚合物细胞毒性检测

FCM 检测纳米载体对 LX-2 转染效率的结果显示, N/P=8 时靶向纳米聚合物转染效率最高, 随着 N/P 比继续增大, 转染效率略有下降(图 6), 此结果与琼脂糖凝胶阻滞试验结果一致; 靶向复合物 VA-PEG-PEI/SCR-Cy3 组、非靶向复合物 PEG-PEI/SCR-Cy3 组 Cy3 阳性细胞比例分别为 $(91.5 \pm 1.8)\%$ 、 $(55.1 \pm 2.1)\%$ (图 7), 靶向纳米复合物对 LX-2 转染效率明显高于非靶向纳米复合物。

荧光显微镜观察纳米复合物细胞内化结果显示, 靶向复合物 VA-PEG-PEI/SCR-Cy3 组 LX-2 细胞内红色荧光斑点数量及强度明显多(高)于非靶向复合物组和肝实质细胞组(图 8); 该结果与 FCM 检测结果一致, 再次反映靶向纳米载体 VA-PEG-PEI 对 LX-2 具有特异性高效 siRNA 输送功能。

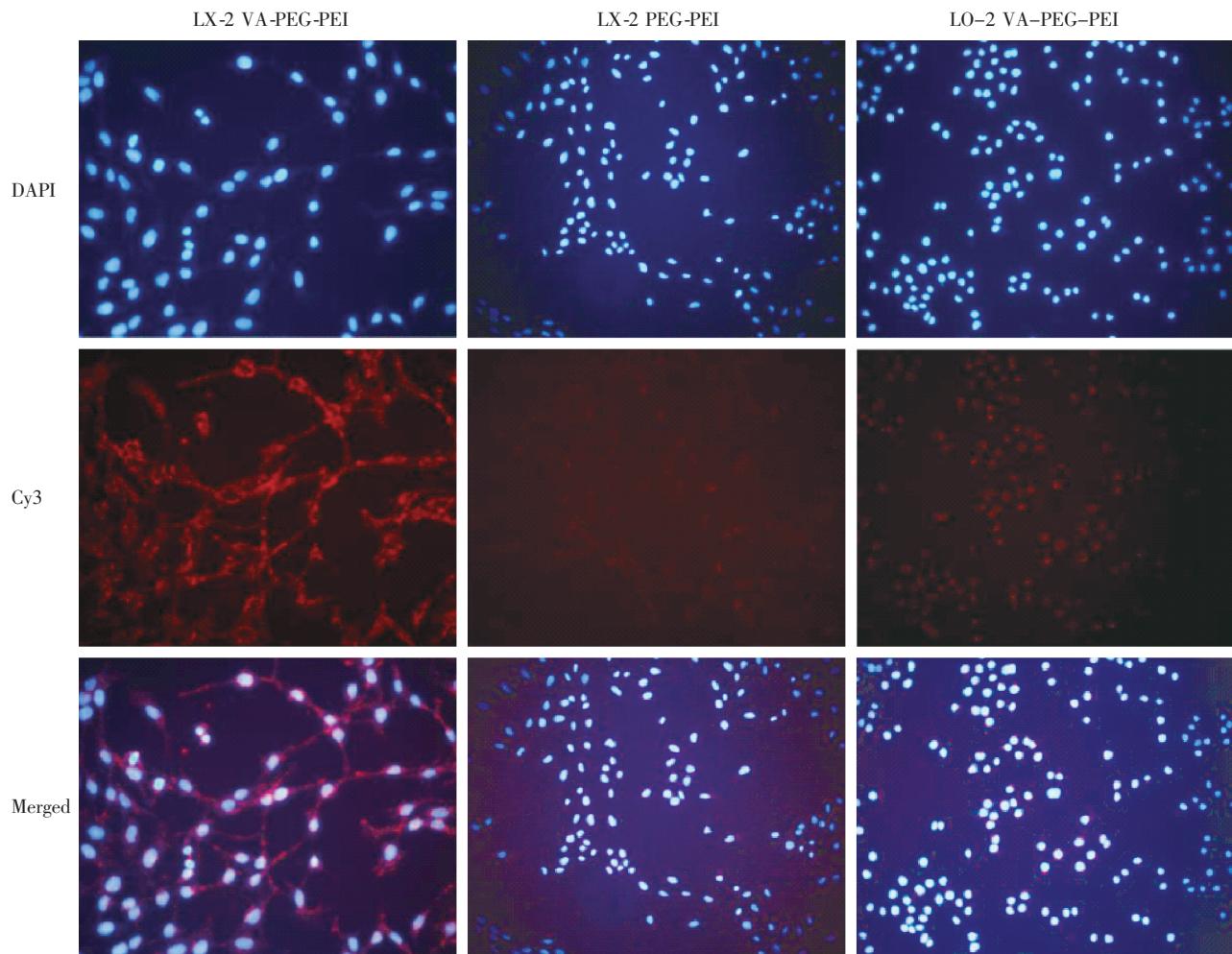


图 8 荧光显微镜观察 LX-2 和 LO-2 对复合物内化情况($\times 20$)

WB 检测纳米复合物对 LX-2 TLR4 基沉默效果显示, 适宜浓度 LPS 刺激 LX-2 后 TLR4、NF- κ B 表达明显升高, 加入 VA-PEG-PEI/siTLR4 或 PEG-PEI/siTLR4 干预后两者 TLR4、NF- κ B 表达均不同程度下降, VA-PEG-PEI/siTLR4 干预后下降更为明显($P<0.01$), 见图 9。

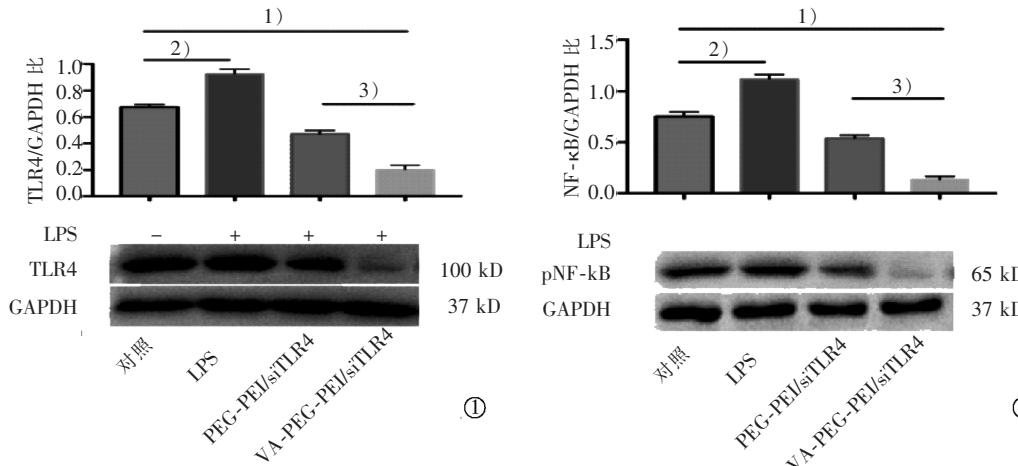
免疫荧光检测显示, 培养 48 h 后对照组 LX-2 高度表达 α -SMA, 平均荧光强度为(2.4±0.4)%, LPS 刺激处理组平均荧光强度较对照组增高, 为(3.5±0.5)%. PEG-PEI/siTLR4 组、VA-PEG-PEI/siTLR4 组 HSC α -SMA 表达均较对照组显著下降, α -SMA 平均荧光强度分别为(1.5±0.4)%、(0.8±0.4)%, 与对照组相比, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 见图 10。

3 讨论

本研究成功构建了一个能靶向 HSC 输送 siTLR4 的基因递送体系 VA-PEG-PEI, 该纳米载体可将负载 siRNA 高效输送至 HSC。复合 siTLR4 后

的靶向纳米复合物 VA-PEG-PEI/siTLR4 可有效抑制 HSC TLR4/NF- κ B 信号通路表达, 从而在体外细胞水平探索肝纤维化治疗的可行方法。

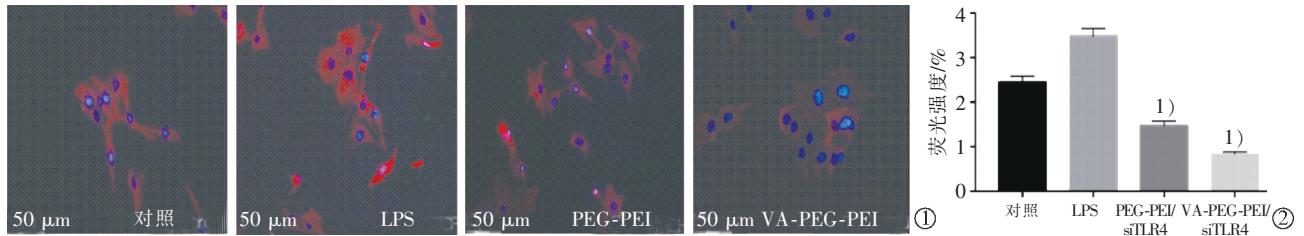
TLR4 作为细菌性 LPS 受体, 是一众所周知的炎症诱导剂, 是肝损伤和纤维化期间激活 HSC 的主要机制^[19]。它可通过 MyD88 依赖性信号通路触发 NF- κ B 快速激活, 从而上调包括转化生长因子(TGF)- β 在内的促纤维化细胞因子^[6]。现有大量研究表明, 抑制 TLR4 信号通路是治疗肝纤维化的一个很好策略^[20]。虽然 RNAi 技术是一种调控基因表达有效方法, 但由于 siRNA 细胞膜穿透能力较差及易被降解^[21], 需要一种更加安全高效的体内传递体系递送 siRNA。阳离子聚合物 PEI 所带强正电荷和不可生物降解性, 使其具有强烈的生物毒性。因此, 在确定纳米载体基本表征和 siRNA 复合能力后, 需要进一步检验对其生物安全性。只有生物安全性高的纳米载体, 才具有良好应用前景。细胞活性试验可用于评估纳米载体生物安全性。CCK-8 试验结果



$\bar{x} \pm s, n=3$; 两组间相比,^{1)P<0.01},^{2)P<0.05},^{3)P<0.01}

①TLR4 表达; ②NF-κB 表达

图 9 纳米载体对 LPS 刺激 LX-2 后 TLR4、NF-κB 表达的影响



¹⁾与对照组相比(单因素方差分析), $P<0.05$

①免疫荧光染色的 PEG-PEI/siTLR4 组、VA-PEG-PEI/siTLR4 组 LX-2 α -SMA(红色);② α -SMA 在 LX-2 中荧光强度($n=9$) $F=20.15$, 对照组对 PEG-PEI/siTLR4 组 <0.05 , 对照组对 VA-PEG-PEI/siTLR4 组 <0.05 , PEG-PEI/siTLR4 组对 VA-PEG-PEI/siTLR4 组 <0.05

图 10 VA-PEG-PEI 和 PEG-PEI 对 LX-2 α -SMA 表达的影响

显示,VA-PEG-PEI、PEG-PEI 对 HSC 的 IC_{50} 分别为 $124.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $93.8 \mu\text{g}/\text{mL}$, 说明无论靶向还是非靶向纳米聚合物的细胞毒性均很低。猜测其可能原因,一是在 PEI 外部连接不带电荷的 PEG 后,可大为改善聚合物生物相容性和强正电荷特性,从而降低其细胞毒性作用^[22];二是活化的 HSC 本身胞质内粗面内质网、高尔基体发达,具有旺盛的蛋白合成能力和较强的抗细胞毒性。

FCM、WB、免疫荧光检测结果表明,在体外细胞水平合成的纳米载体 VA-PEG-PEI 具有靶向 HSC 高效输送 siRNA 功能,而且在负载了带沉默基因功能的 siTLR4 后,靶向纳米复合物 VA-PEG-PEI/siTLR4 能有效下调 HSC TLR4/NF-κB 信号通路表达,同时作为 HSC 激活标志之一的 α -SMA 表达也明显下调,证明本研究体系在体外细胞水平改善肝纤维化是有效的。

本研究过程中也发现一些不足之处。首先,本研究采用 VA 为细胞靶向识别配体,在纳米材料细胞转染效率验证中虽然证明该纳米材料在 HSC

上高效率转染,但在其他细胞如肝实质细胞上仍有一定量纳米材料被转染。因此,进一步研究拟考虑选择优化纳米载体结构及连接多个配体对纳米载体进行修饰,以期取得纳米载体对目标细胞更加特异性地靶向选择及更高的疗效。其次,本研究迄今仅研究纳米基因药物对肝纤维化过程中 TLR4/NF-κB 信号通路表达的影响,而炎症诱发的肝纤维化发生与进展是一非常复杂的病理生理过程,同时存在多种信号通路共同起作用。最后,本研究体系迄今仅在体外细胞水平证明改善肝纤维化是有效的。下一步需将研究延伸至活体动物实验,探索本研究纳米药物体系在活体水平的治疗效果。

综上所述,本研究通过在纳米材料 PEI 上修饰 VA、与 HSC 表面 RBP 受体结合实现靶向效应,同时该纳米基因药物连接 PEG 后,生物毒性大幅度降低,血清稳定性明显提高,而且得益于靶向效应,其药物用量可明显降低,这使得本研究体系靶向性纳米基因治疗肝纤维化可能具有较理想的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] Yin C, Evason KJ, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123:1902-1910.
- [2] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. *Nat Med*, 2012, 18:1028-1040.
- [3] Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis[J]. *Lancet*, 2014, 383:1749-1761.
- [4] Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2012, 56:1171-1180.
- [5] Solis - Herruzo JA, Solis - Munoz P, Munoz Yague T, et al. Molecular targets in the design of antifibrotic therapy in chronic liver disease[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2011, 103:310-323.
- [6] Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, et al. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289:G571-G578.
- [7] 朱楠, 张甜甜, 吕维富, 等. 诱导型一氧化氮合酶、血小板衍生生长因子-B 和脂多糖在布-加综合征大鼠模型中的表达及意义[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28:262-267.
- [8] 伍振辉, 孟娴, 胡佳伟, 等. TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路与肝炎-肝纤维化-肝癌轴相关性研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44:396-401.
- [9] Yu LX, Schwabe RF. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14:527-539.
- [10] Bai T, Lian LH, Wu YL, et al. Thymoquinone attenuates liver fibrosis via PI3K and TLR4 signaling pathways in activated hepatic stellate cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15:275-281.
- [11] Su H, Wang Y, Gu Y, et al. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine[J]. *J Appl Toxicol*, 2018, 38:3-24.
- [12] 李鑫, 刘凤永, 袁宏军, 等. 纳米刀治疗肝癌[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26:939-943.
- [13] Boussif O, Lezoualéh F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:7297-7301.
- [14] Shen M, Gong F, Pang P, et al. An MRI-visible non-viral vector for targeted *Bel-2* siRNA delivery to neuroblastoma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7:3319-3332.
- [15] Chen Y, Lian G, Liao C, et al. Characterization of polyethylene glycol-grafted polyethylenimine and superparamagnetic iron oxide nanoparticles(PEG-g-PEI-SPION) as an MRI-visible vector for siRNA delivery in gastric cancer in vitro and in vivo [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48:809-821.
- [16] Sato Y, Murase K, Kato J, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26:431-442.
- [17] Ito S, Nagata K. Biology of Hsp47(Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 62:142-151.
- [18] Yang X, Iyer AK, Singh A, et al. Cluster of differentiation 44 targeted hyaluronic acid based nanoparticles for MDR1 siRNA delivery to overcome drug resistance in ovarian cancer[J]. *Pharm Res*, 2015, 32:2097-2109.
- [19] Zhu Q, Zou L, Jagavelu K, et al. Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice[J]. *J Hepatol*, 2012, 56:893-899.
- [20] Liu M, Xu Y, Han X, et al. Dioscin alleviates alcoholic liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:18038.
- [21] Zhang P, An K, Duan X, et al. Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers [J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23:900-911..
- [22] Qian C, Wang Y, Chen Y, et al. Suppression of pancreatic tumor growth by targeted arsenic delivery with anti-CD44v6 single chain antibody conjugated nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2013, 34:6175-6184.

(收稿日期:2019-10-29)

(本文编辑:边信)