

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.17.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220413.1117.006.html\(2022-04-14\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220413.1117.006.html(2022-04-14))

## PEI-SPIO 包裹的 siRNA 在小鼠肝癌存留时间的研究\*

杨 针, 张文智, 卢 鹏<sup>△</sup>

(解放军总医院海南医院肝胆外科, 海南三亚 572000)

**[摘要]** **目的** 研究聚乙烯亚胺修饰的磁性纳米颗粒(PEI-SPIO)包裹的小干扰 RNA(siRNA)在小鼠原位肝癌中的持续时间。**方法** 利用稳定表达荧光素酶肝癌 luc-hepa1-6 细胞系在 C57BL/6 小鼠肝脏建立小鼠原位肝癌模型,在建立肝癌模型后第 21 天通过小动物活体成像观察小鼠肝脏组织中成瘤情况及肿瘤大小。在第 21 天尾静脉注射 PEI-SPIO 包裹的 siRNA(Cy5 荧光标记),分别在 2、8、24 h 通过 Lumina II 活体成像监测 siRNA 在小鼠体内的分布情况。最后灌注取材取离体的肝癌组织制备石蜡切片进行普鲁士蓝染色观察肿瘤组织中的磁性纳米颗粒的情况。**结果** 小动物活体成像显示小鼠原位肝癌建立,PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA 的复合物能够到达肿瘤并在肿瘤组织中持续聚集,并能明显延长 siRNA 在小鼠肿瘤中的滞留时间,肿瘤组织的普鲁士蓝染色证明 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 能够进入小鼠原位肝癌中且能在肝癌中持续存在。**结论** PEI-SPIO 包裹的 siRNA 能够到达肝癌并能延长其持续时间。

**[关键词]** 聚乙烯亚胺;磁性纳米颗粒;肝细胞肝癌;小干扰 RNA;动物模型**[中图法分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)17-2887-04

## Study on the retention of PEI-SPIO coated siRNA in mouse orthotopic liver cancer model\*

YANG Zhen, ZHANG Wenzhi, LU Peng<sup>△</sup>(Department of Hepatobiliary Surgery, Hainan Hospital of PLA General Hospital,  
Sanya, Hainan 572000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the retention of polyethyleneimine modified magnetic nanoparticles (PEI-SPIO) coated siRNA in mouse orthotopic liver cancer model. **Methods** The mouse orthotopic liver cancer model was established in C57BL/6 mouse liver by stably expressing (luciferase) luc-hepa1-6 cell line. The tumor formation and tumor size of the mouse were observed by vivo imaging of small animals on the 20th day after the establishment of the model. On the 21th day, PEI-SPIO-encapsulated siRNA (Cy5-fluorescent labelled) was injected into the tail vein, and the distribution of siRNA in mice was monitored by Lumina II in vivo at 2 h, 8 h and 24 h respectively. Finally, the hepatic tissue of the isolated body was taken and the paraffin sections were prepared for Prussian blue staining to observe the magnetic nanoparticles in the tumor tissue. **Results** The vivo imaging of small animals showed that mouse orthotopic liver cancer was stably established, and the complex of PEI-SPIO and Cy5-siRNA could reach the tumor and continue to aggregate in the tumor tissue. Prussian blue staining of the tumor tissue proved that the polyethyleneimine modified magnetic nanoparticle package siRNA can enter mouse orthotopic liver cancer and persist in liver cancer. **Conclusion** PEI-SPIO encapsulated siRNA can aggregate in mouse orthotopic liver cancer and extend its duration.

**[Key words]** polyethyleneimine; magnetic nanoparticles; hepatocellular carcinoma; siRNA; animal model

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-3]</sup>,多数患者在得到确诊时已发展至晚期,失去了手术或其他根治性治疗的机会,而对于晚期肝癌患者的治疗效果仍未能令人满意。小干扰 RNA(siRNA)在肿瘤基因靶向治

疗中已成为研究热点,成为有希望的治疗策略<sup>[4-5]</sup>。siRNA 是指具有特定长度和结构的 RNA,由双链 RNA 被核酸内切酶切割而成<sup>[5-6]</sup>,主要通过互补序列的 mRNA 降解来调节基因的表达,在进化中高度保

\* 基金项目:海南省自然科学基金项目(817357);海南省三亚市医疗卫生科技创新项目(2016YW13)。 作者简介:杨针(1991-),主治医师,硕士,主要从事肝癌研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: lupeng301@126.com。

守,具有特异性、简单性及稳定性<sup>[7]</sup>。然而,siRNA 在实际应用中存在着“脱靶”效应<sup>[8]</sup>、半衰期短、细胞摄取率低等问题,从而限制了其在抗肿瘤治疗中的应用。聚乙烯亚胺(PEI)是一种人工合成的阳离子纳米基因载体,广泛应用于质粒、核苷酸的传输<sup>[9]</sup>。PEI 通过氨基上的正电荷与磁性纳米颗粒(SPIO)的羧基、siRNA 磷酸基上的负电荷结合,再通过“质子海绵效应”将 siRNA 释放进而发挥 RNA 干扰作用<sup>[10]</sup>。有研究表明,聚乙烯亚胺修饰的磁性纳米颗粒(PEI-SPIO)与 siRNA 结合后能有效保护其不被核酸酶降解<sup>[11]</sup>,顺利穿过细胞膜进入细胞中,从而发挥 RNA 干扰作用<sup>[12]</sup>。如何将医用纳米技术应用在肝脏肿瘤的靶向治疗已成为研究的热点。本研究通过构建带有荧光素酶的 C57BL/6 小鼠原位肝癌模型,再将 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 注入小鼠体内,进一步测试 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 在 C57BL/6 小鼠原位肝癌中的摄取及 siRNA 在小鼠肿瘤滞留时间,从而为进一步研究 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 在抑制小鼠肝癌生长的作用提供基础,现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

20 只雌性 C57BL/6 小鼠,8 周龄,体重 20 g 左右(购于空军军医大学动物中心),饲养于空军军医大学医学实验动物中心,所有操作均符合空军军医大学科研伦理要求(审批号:XJYYLL-2014051)。小鼠肝癌 luc-hepa1-6 细胞系由本院实验室冻存。PEI-SPIO 由空军军医大学药理学系实验室合成,Cy5 荧光标记的 siRNA(Cy5-siRNA)由广州锐博公司合成。Matrigel 基质胶购于美国 Discovery Labware 公司,细胞计数仪、小动物活体成像仪购于美国 Caliper life science 公司,微量进样器、D-Luciferin 购于美国 Goldbio 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞培养

luc-hepa1-6 细胞完全培养基为 15% 胎牛血清的 DMEM,细胞置于 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中进行培养。

#### 1.2.2 luc-hepa1-6 细胞胶悬液制备

将 luc-hepa1-6 细胞用胰酶消化,离心,细胞计数仪计数,最后用 Matrigel 基质胶稀释成  $8 \times 10^7$  /mL 的胶悬液。用微量进样器吸取胶悬液,放置于冰上防止其凝固。

#### 1.2.3 C57BL/6 小鼠原位肝癌模型构建

用戊巴比妥钠对小鼠进行腹腔注射麻醉。将小鼠仰卧位固定于鼠板,以 75% 乙醇常规消毒,于下腹部正中中线切开腹部皮肤,依次剪开皮肤、腹膜,由下向上至剑突下,充分暴露肝脏,将微量进样器刺入肝叶内约 1 cm,缓慢推注 25  $\mu$ L 含有  $2 \times 10^6$  个 luc-hepa1-6 细胞的 Matrigel 基质胶悬液,缓慢拔出微量进样器。逐层缝合关腹,再次乙醇消毒。

#### 1.2.4 活体监测小鼠体内成瘤情况

在小鼠接种原位肝癌第 20 天按 10  $\mu$ L/g 体重浓度,加入相应体积的 30 mg/mL D-Luciferin 对小鼠进行腹腔注射。注射入体内 15 min 后,通过吸入 2% 异氟烷实施麻醉且在整个显像过程中持续吸入,将小鼠仰卧位摆放于 Lumina II 活体成像系统的暗箱中,进行原位肝癌的活体成像。

#### 1.2.5 活体检测 siRNA 在小鼠体内的分布

在接种原位瘤后的第 21 天,通过尾静脉注射 PEI-SPIO 包裹的 siRNA。先将 PEI-SPIO 在超声仪中超声 1 h,然后将 PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA(siRNA 的量按照与小鼠的体重比为 0.5 g/kg)按照一定的比例复合,使其总体积达到 400  $\mu$ L,室温孵育 30 min。将 C57BL/6 荷瘤小鼠固定在小鼠固定器中,尾静脉注射 Cy5-siRNA 或孵育好的 PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA 的复合物。分别在注射后 2、8、24 h 用 Lumina II 活体成像系统选择激发光波长在 640 nm 检测 Cy5 标记的 siRNA 在小鼠体内的分布情况。

#### 1.2.6 原位肝癌的病理检测

成像结束后,腹腔注射戊巴比妥麻醉,待麻醉后固定在小鼠版上,从心尖灌注生理盐水,灌注后留取肝脏、肾脏、脾脏等组织。经 10% 的甲醛固定液固定 24~48 h,制备石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色进行常规染色检查。同时切片进行普鲁士蓝染色,检测 PEI-SPIO 在原位肝癌中的分布。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 C57BL/6 小鼠原位肝癌模型

在小鼠肝原左叶接种  $2 \times 10^6$  个 luc-hepa1-6 细胞,接种后第 21 天用小动物活体成像系统检测小鼠原位肝癌的成瘤情况,结果显示 luc-hepa1-6 细胞系可在小鼠肝脏种植成瘤,见图 1。

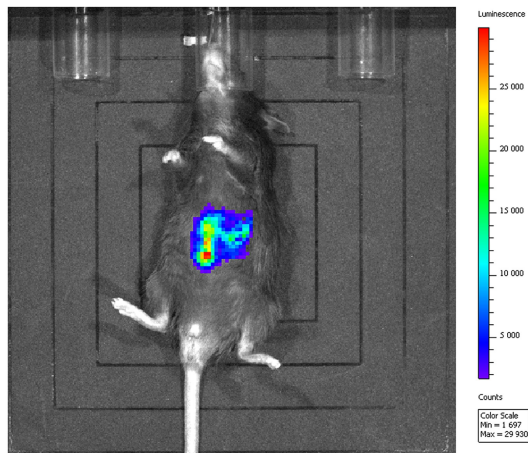


图 1 小鼠接种后第 21 天原位肝癌的荧光图

## 2.2 活体检测 siRNA 在小鼠体内的分布

Cy5-siRNA 和 PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA 的复合物主要在肝脏、肾脏聚集。Cy5-siRNA 于 2 h 在肝脏聚集达到高峰,很快转移至肾脏,8 h 后可见荧光值开始降低,24 h 肝脏部位荧光强度明显降低。而 PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA 的复合物可在肝癌部位持续存在,24 h 后仍可见到 Cy5-siRNA 的荧光值处于非常高的水平,见图 2。

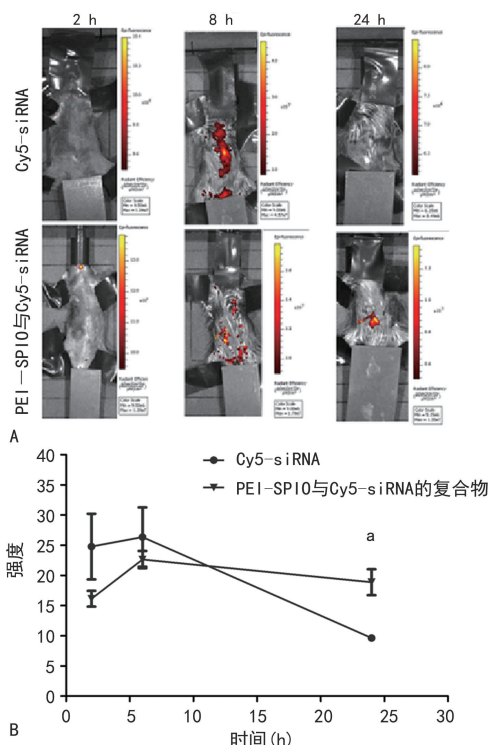


图 2 Cy5-siRNA 和 PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA 不同时间点的 siRNA 分布图

## 2.3 肝癌大体标本和病理学切片

小鼠灌注取材结果显示,肿瘤在小鼠肝脏左叶,其形态不规则呈结节状浸润生长,表明凹凸不平,质地较硬,见图 3。病理切片 HE 染色结果显示,肝癌组织内的细胞为类圆形或不规则形细胞异型性明显,核质比明显失调,呈块状或团块状分布,见图 4。

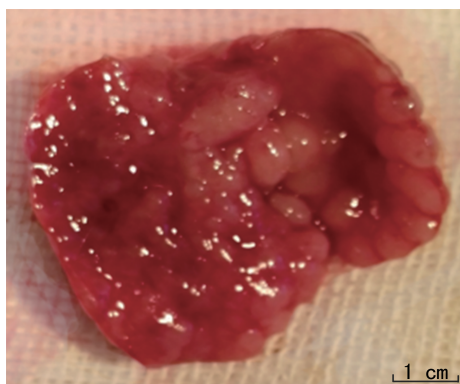


图 3 接种后第 21 天后小鼠原位肝癌大体标本图

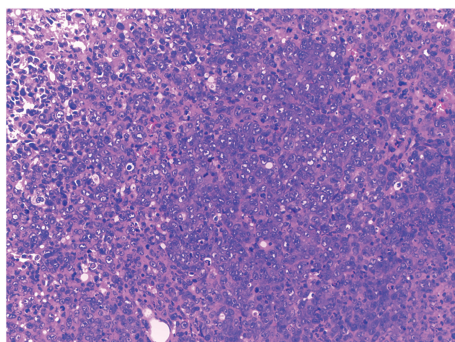


图 4 小鼠原位肝癌病理图(HE,200×)

## 2.4 普鲁士蓝染色

切片普鲁士蓝染色镜下明显可见肝癌组织中 SPIO 的蓝色颗粒,证实 PEI-SPIO 在肝癌中聚集,并能携带 siRNA 到肿瘤组织中,见图 5。

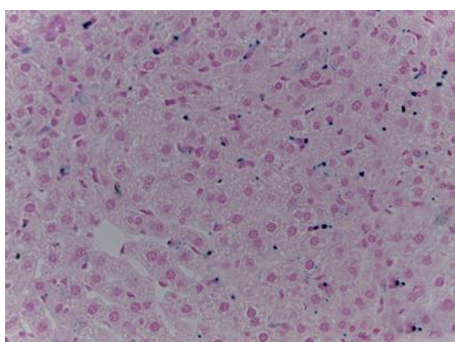


图 5 小鼠原位肝癌普鲁士蓝染色结果(400×)

## 3 讨论

近年来,siRNA 被广泛应用于肿瘤的治疗之中,siRNA 选择性地与 mRNA 的特异性序列结合从而持续抑制致病性蛋白的表达<sup>[13-14]</sup>,发挥其抑制肿瘤生长。医用纳米技术应用于肝癌的治疗中,已成为研究的热点,其为肝癌肿瘤的靶向治疗提供了新的研究方向<sup>[15-16]</sup>。本研究将纳米材料 PEI-SPIO 与 siRNA 结合,检验 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 在小鼠原位肝癌的持续时间,为后续研究奠定基础。hepa1-6 细胞是来源于 C57 小鼠的 BW7756 肝癌细胞系,所以,luc-hepa1-6 细胞构建的小鼠原位肝癌模型在组织学上与人肝癌高度相似,能够为本研究肝癌的发病机制、药物疗效评价及治疗方法提供动物模型。DUAN 等<sup>[12]</sup>通过 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 来治疗关节炎,结果发现相比于对照组,PEI-SPIO 包裹的 siRNA 组能明显延长 siRNA 在小鼠体内的半衰期。因此,本课题组将 PEI-SPIO 与 siRNA 结合来验证 PEI-SPIO 在小鼠肝癌组织中保护 siRNA 的能力及延长其半衰期,从而为医用纳米技术应用于肝癌的治疗提供了新的方法。

本研究首先通过 luc-hepa1-6 细胞在 C57BL/6 小鼠肝左叶建立小鼠原位肝癌模型,在建立模型过程中选择肝左叶是因为小鼠肝左叶体积相对于其他肝叶大,能够容纳 25 μL 体积的细胞胶悬液。在小鼠接种

原位肝癌后的第21天通过尾静脉注射 Cy5-siRNA 或 PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA 的复合物,分别在注射后的 2、8、24 h 监测 siRNA 在 小鼠体内的分布,结果发现 Cy5-siRNA 在 小鼠肝癌中 2 h 到达高峰,8 h 后可见 siRNA 的荧光值开始降低,24 h 后不能见到 siRNA 的荧光值,而 PEI-SPIO 与 Cy5-siRNA 的复合物可在肝癌中持续存在,24 h 仍可在肿瘤部位见到 Cy5-siRNA 聚集,说明 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 能明显延长 siRNA 在 小鼠肝癌组织中的半衰期。进一步灌注取材后可见肝左叶肿瘤组织,肿瘤病理切片证实为肿瘤细胞,同时可在肿瘤组织的普鲁士蓝染色中见到 PEI-SPIO,证明 SPIO 能够携带 siRNA 进入肿瘤组织中,为进一步发挥 siRNA 干扰抑制的作用提供载体。

综上所述,通过将 小鼠原位肝癌模型与 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 结合建立的模型,为研究肝癌的治疗提供了新的思路,同时也为医用纳米材料对肿瘤的治疗提供了新的手段。PEI-SPIO 包裹的 siRNA 能够到达 小鼠原位肝癌部位,并在肿瘤组织中持续存在一定时间。因此,今后有望通过 PEI-SPIO 包裹的 siRNA 实现针对肝癌的基因治疗,提高肝癌的总体治疗效果。

#### 参考文献

- [1] KULIK L, EL-SERAG H B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2): 477-491.
- [2] WEI W, ZENG H, ZHENG R, et al. Cancer registration in China and its role in cancer prevention and control [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(7): e342-349.
- [3] FENTON S E, BURNS M C, KALYAN A. Epidemiology, mutational landscape and staging of hepatocellular carcinoma [J]. *Chin Clin Oncol*, 2021, 10(1): 2.
- [4] SINGH A, TRIVEDI P, JAIN N K. Advances in siRNA delivery in cancer therapy [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(2): 274-283.
- [5] HU B, ZHONG L, WENG Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 101.
- [6] HOLM A, LOVENDORF M B, KAUPPINEN S. Development of siRNA therapeutics for the treatment of liver diseases [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2282: 57-75.
- [7] HU B, WENG Y, XIA X H, et al. Clinical advances of siRNA therapeutics [J]. *J Gene Med*, 2019, 21(7): e3097.
- [8] BARDOLI WALA D, PATEL V, JAVIA A, et al. Nanocarriers in effective pulmonary delivery of siRNA: current approaches and challenges [J]. *Ther Deliv*, 2019, 10(5): 311-332.
- [9] ZHUPANYN P, EWE A, BUCH T, et al. Extracellular vesicle (ECV)-modified polyethylenimine (PEI) complexes for enhanced siRNA delivery in vitro and in vivo [J]. *J Control Release*, 2020, 319: 63-76.
- [10] SAHAY G, QUERBES W, ALABI C, et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(7): 653-658.
- [11] YANG Z, DUAN J, WANG J, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with polyethylenimine and galactose for siRNA targeted delivery in hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 1851-1865.
- [12] DUAN J, DONG J, ZHANG T, et al. Polyethylenimine-functionalized iron oxide nanoparticles for systemic siRNA delivery in experimental arthritis [J]. *Nanomedicine*, 2014, 9(6): 789-801.
- [13] NAKAYAMA T, BUTLER J S, SEHGAL A, et al. Harnessing a physiologic mechanism for siRNA delivery with mimetic lipoprotein particles [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(8): 1582-1589.
- [14] MAHMOODI C G, DANA H, GHARAGOUZLOO E, et al. Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 3111-3128.
- [15] SHAO D, LI J, ZHENG X, et al. Janus “nanobullets” for magnetic targeting liver cancer chemotherapy [J]. *Biomaterials*, 2016, 100: 118-133.
- [16] MOK H, ZHANG M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(1): 73-87.