

心肌细胞膜修饰的新型阳离子脂质纳米颗粒 介导心肌肥厚的高效治疗研究

矫莉萍¹ 李玮² 孙枝红² 刘杰² 孙成铭^{*1,2}

¹(青岛大学医学部, 青岛 266071) ²(青岛大学附属烟台毓璜顶医院医学检验科, 烟台 264000)

摘要 心肌肥厚是高血压、心肌梗死和冠心病等心血管疾病的共同病理结果,研究发现,持续性心肌肥厚是导致心力衰竭和猝死重要诱因之一。miR-133a 是心肌组织中含有最丰富的 miRNA 之一,作为心肌肥厚的关键调节因子,直接参与心肌肥厚的发生及发展。尽管基于 miR-133a 基因治疗是一种很有前途的心肌肥厚干预方法,但安全、有效的 miR-133a 胞内递送是高效治疗面临的重要障碍。为了实现 miR-133a 高效的递送,本研究制备了一种新型的仿生基因递送载体(HR-133a@F_{1,5}LNPs),并分析了其在心肌肥厚治疗中的应用价值。结果表明,HR-133a@F_{1,5}LNPs 具有良好的生物安全性,并可优先靶向心肌肥厚细胞,实现 miR-133a 的胞内递送。荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)和免疫印迹(Western blot)结果进一步证实 HR-133a@F_{1,5}LNPs 可以有效调控心肌肥厚关键因子 RhoA 的 mRNA 和蛋白的表达水平。本研究构建的新型 HR-133a@F_{1,5}LNPs 具有良好的生物安全性和靶向性,可将 miR-133a 递送至心肌肥厚细胞中,并抑制相关因子表达,为实现心肌肥厚的高效治疗提供了一种全新的治疗思路。

关键词 心肌肥厚; 仿生; 基因递送载体; 生物安全性; 靶向性

心肌肥厚是在血压升高或后负荷增加时为了维持心脏正常的收缩功能而发生的生理适应性反应^[1]。病理性心肌肥厚常与收缩功能障碍、间质纤维化、心脏结构重塑和胎儿心脏基因的重新表达相关联,是诱发心力衰竭和猝死的重要原因之一^[2-3]。目前,心肌肥厚的主要治疗策略是药物治疗,即通过使用降低血压或者能够阻断肾上腺素能受体的药物^[4],但患者的临床响应率低,治疗效果并不理想。因此,亟需寻找一种能有效预防或者逆转心肌肥厚的新型治疗方式^[5]。

MicroRNAs(miRNAs)是一类非编码的小 RNA,以碱基互补配对的形式与靶基因 3'非编码区(3'UTR)识别和结合,通过对靶基因的切割或翻译抑制而调控靶基因的表达^[6]。miR-133a 是心肌组织中含有最丰富的 miRNA 之一,在心血管疾病进程中具有重要作用^[7]。研究发现,miR-133a 与心肌肥厚呈负相关^[8],主要通过抑制 GDP-GTP 交换蛋白(RhoA)的表达来调控心肌肥厚的病理过程^[8-10]。因此,miR-133a 具有治疗心肌肥厚的应用潜力。

基于 RNA 技术的基因治疗(如 mRNA、siRNA 和 miRNA 等)通过调控相关基因的表达实现治疗包括心血管病、肿瘤、遗传病和免疫性疾病等多种疾病的目的^[11]。为了实现有效治疗,RNA 疗法需将治疗性的 RNA 输送至靶细胞中^[12-13]。然而,RNA 在递送的过程中面临着多重阻碍,如 RNA 表面负电荷和亲水性阻碍了 RNA 在跨质膜之间的被动扩散,并且易与血清蛋白结合而被吞噬细胞吞噬,体内血液循环中极易被 RNA 酶降解等,均导致其难进入细胞中发挥作用^[14]。为了克服上述阻碍,多种病毒类和非病毒递送系统被开发用于 RNA 的递送。相较于病毒递送系统,非病毒递送系统可绕过病毒载体的限制,在不引起免疫反应的前提下将目标 RNA 运送至靶细胞中发挥作用。

阳离子脂质纳米颗粒(Lipid nanoparticles, LNPs)是目前应用最广的非病毒类 RNA 药物递送载体,通常由阳离子脂质、磷脂、胆固醇和聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)构成^[15]。其中,阳离子脂质是通过与带负电荷的核酸相互作用促进核酸包裹和介导内体破裂使核酸释放到细胞质中,主要起到保护核酸

2023-06-13 收稿; 2023-10-23 接受

山东省自然科学基金项目(No. ZR2022MH100)资助。

* E-mail: chengmingsun012@163.com

免受核酸酶降解的作用。PEG 通常在 LNP 中占比最小,影响 LNP 的粒径和电荷,在增强颗粒稳定性的同时阻止 LNP 聚集,在循环和生物分布过程中具有关键作用。此外,辅助性脂质(如磷脂和胆固醇)主要作用是支持颗粒结构,并在储存和循环过程中增强稳定性^[16-17]。

基于 LNP 的递送载体在 RNA 治疗领域具有很好的应用前景,但其在体内的有效靶向输送问题值得重视^[18]。本研究基于“模仿自然”的观念,利用天然细胞膜伪装纳米载体制备了 HR-133a@F_{1.5}LNP 仿生纳米运载系统,此系统具有类天然细胞的生物性能,因此兼具良好的生物相容性、同源靶向性、更低的毒副作用以及更长的体内循环时间^[19]。Hu 等^[20]将纳米级的红细胞膜包裹聚乳酸-羟基乙酸共聚物(Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA),开发了一种新药物递送平台。此平台将红细胞膜和聚合物载体的特点相融合,利用红细胞膜表面的 CD47 将药物纳米载体伪装成“自我”而躲过了巨噬细胞的摄取和免疫系统的清除,有效延长了体内循环的循环时间,并靶向至病变部分。Wang 等^[21]通过从血液中分离出血小板膜并将其修饰于聚合物表面,构建了一种全新的仿生载体。此载体表面修饰的血小板膜所保留的膜蛋白成分,可以有效地结合人类的胶原蛋白,并靶向孤立血管的损伤区域。Chen 等^[22]报道了一种将癌细胞膜包覆于吲哚菁绿(ICG)聚合物核表面而组成的核-壳纳米结构(ICNPs)。此 ICNPs 具有源癌细胞相似的细胞粘附分子,有利于源癌细胞摄取膜结合的肿瘤抗原进行有效的呈递和下游免疫的激活,而且可以通过同型结合机制,将 ICNPs 精准地靶向至源癌细胞,进而实现更有效的治疗效果。这种集天然细胞膜功能和纳米载体功能于一体的纳米载体在生物医学领域中具有巨大的应用潜力和发展前景^[23-24]。

在前期仿生研究的基础上,本研究将心肌细胞膜(采用 H 表示)修饰在搭载 miR-133a 的脂质体(F_{1.5})纳米颗粒 R-133aF_{1.5}LNP(即 F₁ 阳离子载体在氮磷比(N/P)为 5:1 时吸附 miR-133a 形成的纳米颗粒)表面,构建了兼具高递送效率和低细胞毒性的仿生基因载体 HR-133a@F_{1.5}LNP。通过仿生基因载体 HR-133a@F_{1.5}LNP 将 miR-133a 递送至肥厚性心肌细胞中,靶向结合 RhoA 3'UTR 抑制 RhoA/ROCK 信号通路,抑制了细胞周期重启和细胞骨架的重新排列,调控了心肌肥厚的病理过程,达到抑制心肌肥厚和发挥基因治疗的目的^[9-10,14],为心肌肥厚治疗提供了一种新思路。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ZS90 型纳米粒度电位仪(英国 Malvern 公司); Tecnai G2 F20 S-TWIN 型透射电子显微镜(工作电压 200 kV,美国 FEI 公司); UH-100B 型超声波细胞破碎仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); Axio Observer 7 全自动倒置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司); Beckman Moflo-XDP 流式细胞仪(上海贝克曼库尔特商贸有限公司); TC-XP-D 博日基因扩增仪(杭州博日科技有限公司); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、NanoDroplite 分光光度计和 EVOS M7000 型智能成像分析系统(美国 Thermo Fisher 公司); Multiskan FC 型酶标仪、蛋白电泳转膜系统和 GeldocXR+凝胶成像系统(美国 BioRad 公司); Chemi Scope6200Touch 化学发光成像分析系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

MiR-133a(安徽通用生物系统有限公司); GAPDH、BNP 和 RhoA 引物(生工生物工程(上海)有限公司); 1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-Dioctadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DSPC)和胆固醇(Cholesterol, CHO)(艾伟拓(上海)医药科技有限公司); 1,2-二肉豆蔻酰-*rac*-甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000(1,2-Dimyristoyl-*rac*-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000, DMG-PEG(2000))和鬼笔环肽(美国 Avanti 公司); 血管紧张素 II(Angiotensin II, Ang II, 美国 MCE 公司); 聚乙酰胺(Polyethyleneimine, PEI, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 磷酸盐缓冲溶液(PBS, 美国 Corning 公司); DAPI 溶液(即用型,北京索莱宝科技有限公司)。细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒(碧云天生物技术有限公司); M5 Hiper Universal RNA Mini Kit 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒和 M5 Super plus qPCR RT kit with gDNA remover、2 × M5 HiPer Realtime PCR Super mix with High Rox、M5 Hiper Cell Counting Kit(CCK)CCK-8 细胞增殖与活性检测试剂盒(北京聚合美生物科技有限公司); One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (12%)试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 脂质纳米粒(R-133a@FLNPs)的合成和筛选

分别称取 2 mg 阳离子脂质分子 F_1 、 F_2 和 F_3 (结构见图 1)溶于 1 mL 无水乙醇中(2 mg/mL), 并按照推荐摩尔比^[25](阳离子脂质: DSPC: 胆固醇: DMG-PEG(2000)=50: 10: 38.5: 1.5)加入 DSPC、胆固醇和 DMG-PEG, 分别制备 F_1 -LNPs、 F_2 -LNPs 和 F_3 -LNPs; 随后, 用 200 μ L PBS 溶液溶解 1 OD(1 OD = 40 μ g) miR-133a(200 ng/ μ L)。F-LNPs 与 miR-133a 的合成比例用氮磷比(N/P)表示, 按照 N/P 比为 2.5:1、5:1 和 10:1, 将乙醇相中 F_1 -LNPs、 F_2 -LNPs 和 F_3 -LNPs 分别快速注入 miR-133a PBS 相中, 反复吹打混匀后, 室温孵育 30 min, 制备成 3 种不同 N/P 比的基因载体 R-133a@ F_1 LNPs、R-133a@ F_2 LNPs 和 R-133a@ F_3 LNPs, 再采用 PBS 溶液分别稀释至终体积为 1 mL, 通过纳米粒度电位仪检测纳米复合物的粒径大小和表面电荷。

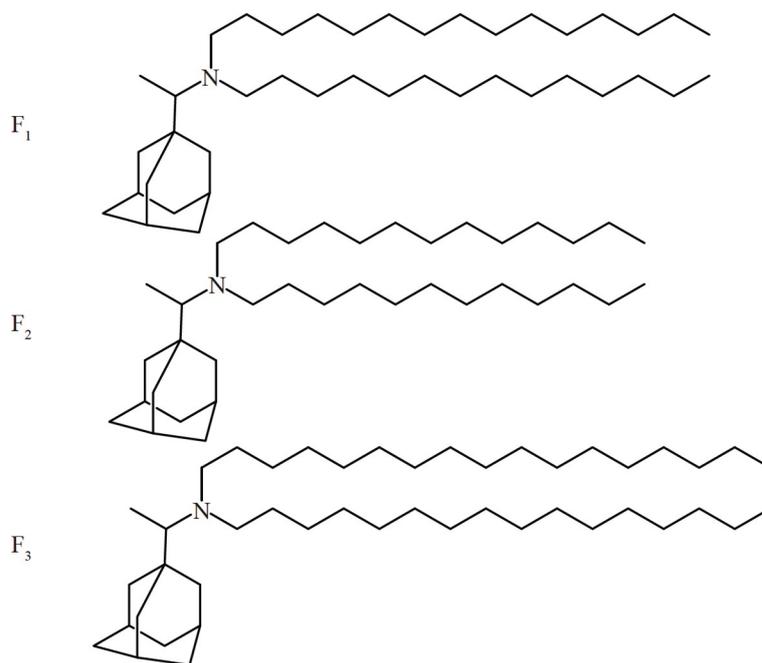


图1 阳离子脂质 F_1 、 F_2 和 F_3 的结构示意图

Fig.1 Structure diagram of cationic lipids F_1 , F_2 and F_3

为了评估 R-133a@FLNPs 对核酸的浓缩能力, 以阳离子载体的“金标准”PEI 作为对照。将按照不同 N/P 比制备的一系列基因载体 R-133a@FLNPs 稀释至终体积为 10 μ L, 室温孵育 30 min 后进行琼脂糖凝胶阻滞实验。在电压为 100 V 条件下电泳 30 min 后, 在凝胶成像仪下观察, 比较不同 N/P 比载体与 miR-133a 的结合能力, 筛选出 3 种纳米颗粒结合 miR-133a 的最佳比例。

将对数生长期的 HL1 心肌细胞以 8×10^3 /孔的密度接种于 8 孔共聚焦小室中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中培养过夜。待细胞生长至 60%~80%时, 分别加入 R-133a@ F_1 LNPs、R-133a@ F_2 LNPs 和 R-133a@ F_3 LNPs, 继续在培养箱中孵育 12 h 后, 弃去培养基, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 去除多余载体, 再向其中加入 DAPI 染液, 避光处理 10 min, 预冷 PBS 洗涤 3 次(每次 5 min)。通过激光共聚焦显微镜观察心肌细胞对不同组基因载体的摄取情况。Cy5 标记的 miR-133a 的吸收波长为 650 nm, 发射波长为 670 nm。DAPI 的吸收波长为 358 nm, 发射波长为 461 nm。

将 HL1 心肌细胞接种于 12 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养过夜。待细胞生长至 60%~80%时, 分别向其中加入 R-133a@ F_1 LNPs、R-133a@ F_2 LNPs 和 R-133a@ F_3 LNPs, 培养箱中孵育 12 h 后, 弃去培养基, 经胰酶消化处理并收集细胞悬液(2000 r/min, 5 min); 用预冷 PBS 洗涤 2 次(1000 r/min, 5 min)后, 将其转移至流式管中, 进行流式细胞术分析; 以未处理细胞为阴性对照, 检测 Cy5 阳性细胞比例和荧光强度。

1.2.2 仿生基因载体(HR-133a@F_{1.5}LNPs)的制备和表征

将处于对数生长期的 HL1 心肌细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中,过夜培养后收集细胞,并按照细胞膜提取试剂盒(碧云天生物技术有限公司)说明书的要求提取 HL1 心肌细胞膜。首先用预冷 PBS 洗涤 3 次,将细胞用细胞刮分离后收集于 15 mL 离心管中,2000 r/min 离心 5 min,留取细胞沉淀。向细胞沉淀中加入 PMSF 终浓度为 1 mmol/L 的膜蛋白抽提试剂 A,并轻轻混匀,置于冰上裂解 15 min。将细胞悬液转移至预冷的玻璃研磨器,研磨 30~50 次,收集裂解液;在 4 °C 以 2000 r/min 离心 10 min,去除细胞核和未破碎的细胞。收集上清液,在 4 °C 以 14000 r/min 离心 30 min,获得的沉淀即为 HL1 心肌细胞膜,于 -80 °C 保存备用。

将 HL1 心肌细胞膜重悬于去离子水中,超声破碎混匀。将上述悬液在 0.22 μm 过滤器上重复过滤 10 次,使细胞膜均匀覆盖于滤器的滤网上;将筛选出的最佳基因载体 R-133a@F_{1.5}LNPs 在同一滤器上过膜挤压 10 次,使细胞膜均匀覆盖在基因载体表面,获得仿生纳米载体 HR-133a@F_{1.5}LNPs。采用透射电子显微镜(TEM)和粒径分析仪对 HR-133a@F_{1.5}LNPs 的粒径和基本形貌进行表征,并通过考马斯亮蓝染色评估 HR-133a@F_{1.5}LNPs 的膜包裹情况。

1.2.3 HR-133a@F_{1.5}LNPs 的生物安全性测定

将 HL1 心肌细胞以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。更换培养基后,加入不同浓度(0~100 μg/mL)的 R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 PEI,继续恒温培养 24 h。更换新鲜培养基后,加入 CCK-8 试剂,于 37 °C 避光孵育 30 min,采用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度,通过公式(1)计算细胞存活率(Cell viability, CV)。

$$CV (\%) = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100 \quad (1)$$

其中, A_s 为加入阳离子基因载体的实验组吸光度, A_c 为未加入阳离子基因载体的对照组吸光度, A_b 为不含细胞的培养基空白对照组的吸光度。

体外溶血实验也是评估基因载体的生物相容性的重要指标之一。取 2 mL C57BL/6J 小鼠外周血于 EDTA 抗凝管中,分离血细胞重悬于 PBS 中,加入浓度为 25 μg/mL、N/P 比为 5:1 的 R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 PEI 重悬红细胞,在细胞培养箱中分别孵育 12 和 24 h。以 PBS 处理为阴性对照,去离子水处理为阳性对照,采用分光光度计测定不同实验组样品在 545 nm 处的吸光度,通过公式(2)计算红细胞的溶血率(Hemolysis ratio, %)。将处理后的红细胞分散在载玻片上,在显微镜下直接观察红细胞的形态,评估红细胞的完整结构。

$$\text{Hemolysis ratio}(\%) = \frac{OD_{\text{test}} - OD_{\text{neg}}}{OD_{\text{pos}} - OD_{\text{neg}}} \times 100 \quad (2)$$

其中, OD_{test} 为加入纳米材料处理的实验组的吸光度, OD_{neg} 和 OD_{pos} 分别为阴性对照和阳性对照的吸光度。

1.2.4 体外心肌肥厚模型的建立及 HR-133a@F_{1.5}LNPs 体外靶向性分析

通过 Ang II 刺激 HL1 心肌细胞,模拟长期高血压引起的心脏超负荷导致的心脏代偿性肥厚,建立心肌肥厚的细胞模型^[26]。采用体外评估心肌细胞相关肥厚基因(B-Type natriuretic peptide, BNP)和 HL1 心肌细胞体积变化情况验证建模是否成功。将处于对数期的 HL1 心肌细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱过夜培养。更换无血清的 MEM 培养基后,分别向其中加入不同浓度(1×10^{-5} mol/L、 1×10^{-6} mol/L、 1×10^{-7} mol/L 和 1×10^{-8} mol/L)的 Ang II 培养液刺激处理 48 h,测定诱导心肌细胞肥大的最佳药物处理浓度。

采用 M5 Universal RNA Mini Kit 试剂盒提取不同浓度组 HL1 心肌细胞的总 RNA,采用 NanoDrop 紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。参照 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)逆转录试剂盒说明书,配制逆转录反应体系,逆转录后将 cDNA 置于 -20 °C 保存备用。qPCR 反应扩增体系根据 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书在冰上进行配制。qPCR 数据分析时,选择 GAPDH 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算不同浓度 Ang II 刺激的 HL1 心肌细胞的 BNP 相对表达量。引物序列: GAPDH

Forward primer(5'-3'):GGTTGTCTCCTGCGACTTCA; GAPDH Reverse primer(3'-5'):TGGTCCAGGGTTTCT-TACTCC; BNP Forward primer(5'-3'):AAGAGAAAAGTCGGAGGAAATGG; BNP Reverse primer(3'-5'):TA-CAACAACCTTCAGTGCCTTACAGC。

将处于对数生长期的 HL1 心肌细胞接种于共聚焦小皿中, Ang II (1×10^{-7} mol/L) 刺激处理 48 h, 建立心肌肥厚的细胞模型。待心肌肥厚模型建立后, 向每孔加入 500 μ L 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 10 min, PBS 洗涤 3 次, 弃去溶液。向每孔加入 200 μ L 37 $^{\circ}$ C 预热的鬼笔环肽染液, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中避光培养 30 min。弃去染液后, 以 PBS 溶液洗涤 3 次, 加入 DAPI 溶液(即用型)染色 5 min, 再经 PBS 溶液洗涤后, 以激光共聚焦显微镜观察心肌细胞 HL1 细胞形态, 随机选取 5 个视野进行拍照, 每个视野随机选取 10 个细胞, 采用 Image J 软件计算心肌细胞表面积, 取平均值, 每组重复测量 3 次。

将 HL1 心肌细胞接种于共聚焦小皿中, Ang II (1×10^{-7} mol/L) 刺激处理 48 h, 建立心肌肥厚的细胞模型。分别加入 R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 PEI/miR-133a 溶液处理 12 h, 弃去培养基, PBS 溶液清洗 2 次, 加入 DAPI 染色 5 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 在共聚焦显微镜下观察肥厚性心肌细胞对 HR-133a@F_{1.5}LNPs 的摄取情况。

1.2.5 HR-133a@F_{1.5}LNPs 体外对心肌肥厚治疗效果评价

为了验证 HR-133a@F_{1.5}LNPs 是否将 miR-133a 递送至细胞中, 将 HL1 心肌细胞接种于 6 孔板中, Ang II (1×10^{-7} mol/L) 刺激处理 48 h, 建立心肌肥厚的细胞模型。更换培养基, 以 PBS 处理组为对照, 分别加入 R-133a@F_{1.5}LNPs 和 HR-133a@F_{1.5}LNPs, 继续培养 12 和 24 h。采用 qPCR 测定 HL1 心肌细胞中 RhoA 基因的表达水平。引物序列: RhoA Forward primer(5'-3'):GTTGCTGATGGAGCTTGTGG; RhoA Reverse primer(3'-5'):CAGCTGTGTCCCATAAAGCC

将处于对数生长期的 HL1 心肌细胞接种于 6 孔板内, Ang II 刺激 HL1 心肌细胞, 建立心肌的细胞肥厚模型。向其中分别加入 PBS、R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 PEI 继续培养 48 h。提取各处理组细胞中的蛋白质, 并通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定各样本的蛋白浓度。采用 One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit(12%)试剂盒制备 12% 蛋白电泳胶, 电泳槽中加入 Running buffer 电泳缓冲液, 每孔按相同蛋白量上样, 80 V 恒压电泳 25 min, 随后调整电压为 150 V 电泳 1 h。随后进行转膜、封闭、孵育一抗、洗涤、孵育二抗和洗涤, 加入发光液后, 置于化学发光成像分析仪进行成像, 检测 HL1 心肌细胞中的 RhoA 的蛋白水平表达。

1.2.6 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差表示, 采用 Graphpad Prism 软件对其分析, 组间两两比较采用 Student's t 检验, 当 $p < 0.05$ 时, 认为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 脂质纳米粒(R-133a@FLNPs)的合成和筛选

如图 2A 所示, N/P 比分别为 2.5:1、5:1 和 10:1 的 R-133a@F₁LNPs、R-133a@F₂LNPs 和 R-133a@F₃LNPs 纳米复合物的粒径随着 N/P 比增大而逐渐减小, 主要分布于 70~300 nm 范围内。相较于其它组别, N/P 比为 10:1 时各组的粒径最小。表面 Zeta 电位大约在 25~40 mV 之间, 随着 N/P 比值增加, 电荷增大(图 2B)。这是由于阳离子表面带正电荷, 可以通过静电作用将核酸缩合成尺寸更小的纳米颗粒^[27]。通过琼脂糖凝胶阻滞实验检测阳离子载体 F-LNPs 结合 miR-133a 的能力(图 2C), 合成的 R-133a@F₁LNPs、R-133a@F₂LNPs 和 R-133a@F₃LNPs 由于分子量变大而被阻滞在泳道口, 而未被结合的 miR-133a 会随着电泳向正极移动, 当 miR-133a 完全结合时, 相应的下端条带消失。R-133a@F₁LNPs 在 N/P 比为 5:1 时可完全结合 miR-133a, 而 PEI、R-133a@F₂LNPs 和 R-133a@F₃LNPs 在 N/P 比为 10:1 时才完全结合 miR-133a。

为了筛选出递送 miR-133a 进入 HL1 心肌细胞的最佳阳离子载体, 以流式细胞术和共聚焦显微镜进行体外测定。流式细胞术结果(图 3A)显示, 采用 R-133a@F₁LNPs、R-133a@F₂LNPs、R-133a@F₃LNPs 和 PEI/miR-133a 分别处理 HL1 心肌细胞后, 随着 N/P 比增加, Cy5(Cy5 标记 miR-133a)阳性细胞比例呈现先增高后降低的趋势, 这可能是因为在 N/P 比为 2.5:1 条件下制备的 3 种聚阳离子载体对核酸的结合能

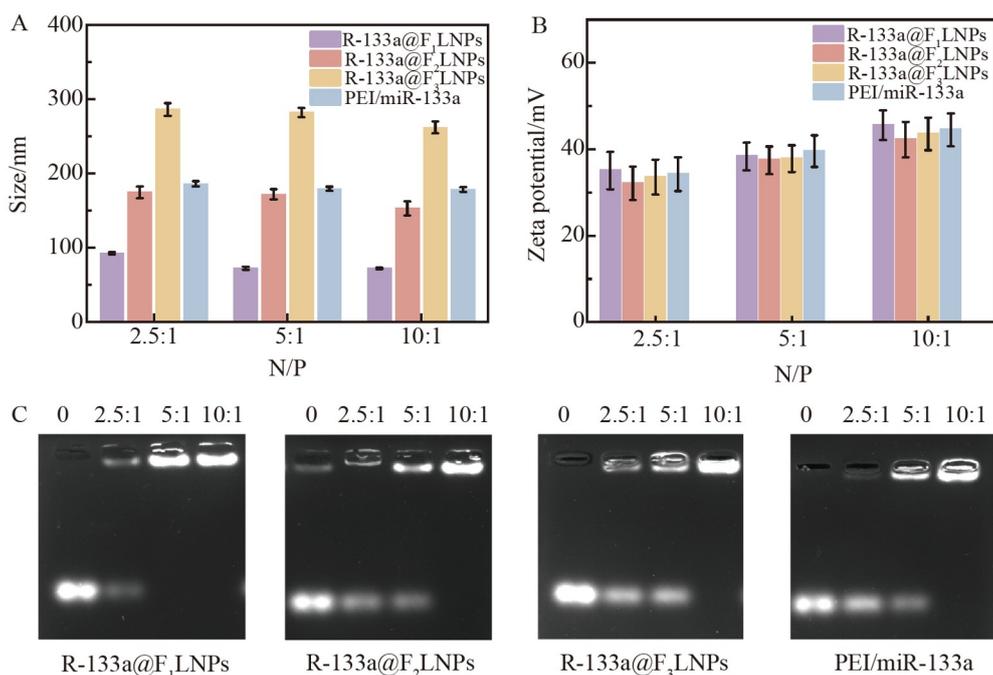


图2 (A) 不同氮磷(N/P)比的 R-133a@F₁LNPs、R-133a@F₂LNPs、R-133a@F₃LNPs 和 PEI/miR-133a 的粒径变化图; (B) 不同 N/P 比的 R-133a@F₁LNPs、R-133a@F₂LNPs、R-133a@F₃LNPs 和 PEI/miR-133a 的电荷变化图; (C) 凝胶阻滞分析不同 N/P 比的 F₁-LNPs、F₂-LNPs、F₃-LNPs 以及 PEI 对 miR-133a 的结合能力

Fig.2 (A) Particle size variation of R-133a@F₁LNPs, R-133a@F₂LNPs, R-133a@F₃LNPs, and PEI/miR-133a at different ratios of nitrogen to phosphorus (N/P); (B) Variations in charges of R-133a@F₁LNPs, R-133a@F₂LNPs, R-133a@F₃LNPs, and PEI/miR-133a at different N/P ratios; (C) Gel retardation analysis of the binding ability of F₁-LNPs, F₂-LNPs, F₃-LNPs and PEI with miR-133a at different N/P ratios

力较差,形成的纳米颗粒尺寸较大,不利于细胞的内存;当 N/P 比为 10:1 时,虽然纳米颗粒对核酸的浓缩能力变强,但在较高 N/P 比下,基因载体的表面电荷增高,导致细胞毒性增加。如图 3B 和 3C 所示,在 N/P 比为 5:1 时, R-133a@F_{1.5}LNPs 处理组的荧光强度和 Cy5 阳性细胞比例(92.3%)远高于其它处理组,而对照 PEI 处理组的荧光强度和 Cy5 阳性细胞比例最低,仅为 20.9%。共聚焦荧光显微镜的检测结果显示,相较于其它处理组, R-133a@F_{1.5}LNPs 处理组的 Cy5 红色荧光信号最强, PEI 处理组的荧光信号最弱。

综上,在 N/P 比为 5:1 时, R-133a@F_{1.5}LNPs 纳米复合物细胞递送性能最佳,可作为心肌肥厚基因治疗的最佳基因递送载体。

2.2 仿生基因载体(HR-133a@F_{1.5}LNPs)的制备和表征

采用心肌细胞膜包裹筛选出的最佳聚阳离子载体 R-133a@F_{1.5}LNPs 并制备成仿生纳米载体 HR-133a@F_{1.5}LNPs。透射电子显微镜结果表明, R-133a@F_{1.5}LNPs 呈球形,粒径约为 70 nm,水合粒径结果显示其分布较集中,平均粒径为(71 ± 1) nm;外层修饰 HL1 心肌细胞膜的 HR-133a@F_{1.5}LNPs 纳米颗粒也呈球形,并可观测到一层膜结构包覆于表面,其粒径约为 90 nm;水合粒径结果表明, HR-133a@F_{1.5}LNPs 粒径分布较集中,平均粒径为(90 ± 1) nm(图 4A)。为了进一步验证 HL1 心肌细胞膜已包覆于基因载体表面,通过考马斯亮蓝实验测定 HR-133a@F_{1.5}LNPs 表面细胞膜蛋白水平。由图 4B 可见, HR-133a@F_{1.5}LNPs 与 HL1 心肌细胞膜的膜蛋白表达基本一致,而 R-133a@F_{1.5}LNPs 组未检出蛋白。上述结果表明, HL1 心肌细胞膜已修饰在 R-133a@F_{1.5}LNPs 载体表面,即制备得到了仿生纳米载体 HR-133a@F_{1.5}LNPs。

2.3 HR-133a@F_{1.5}LNPs 的生物安全性测定

采用 CCK-8 实验评估不同浓度(0~100 μg/mL)HR-133a@F_{1.5}LNPs 体外细胞水平的生物安全性。如图 5A 所示,随着浓度增高, R-133a@F_{1.5}LNPs 和 HR-133a@F_{1.5}LNPs 处理组的 HL1 心肌细胞的存活率略

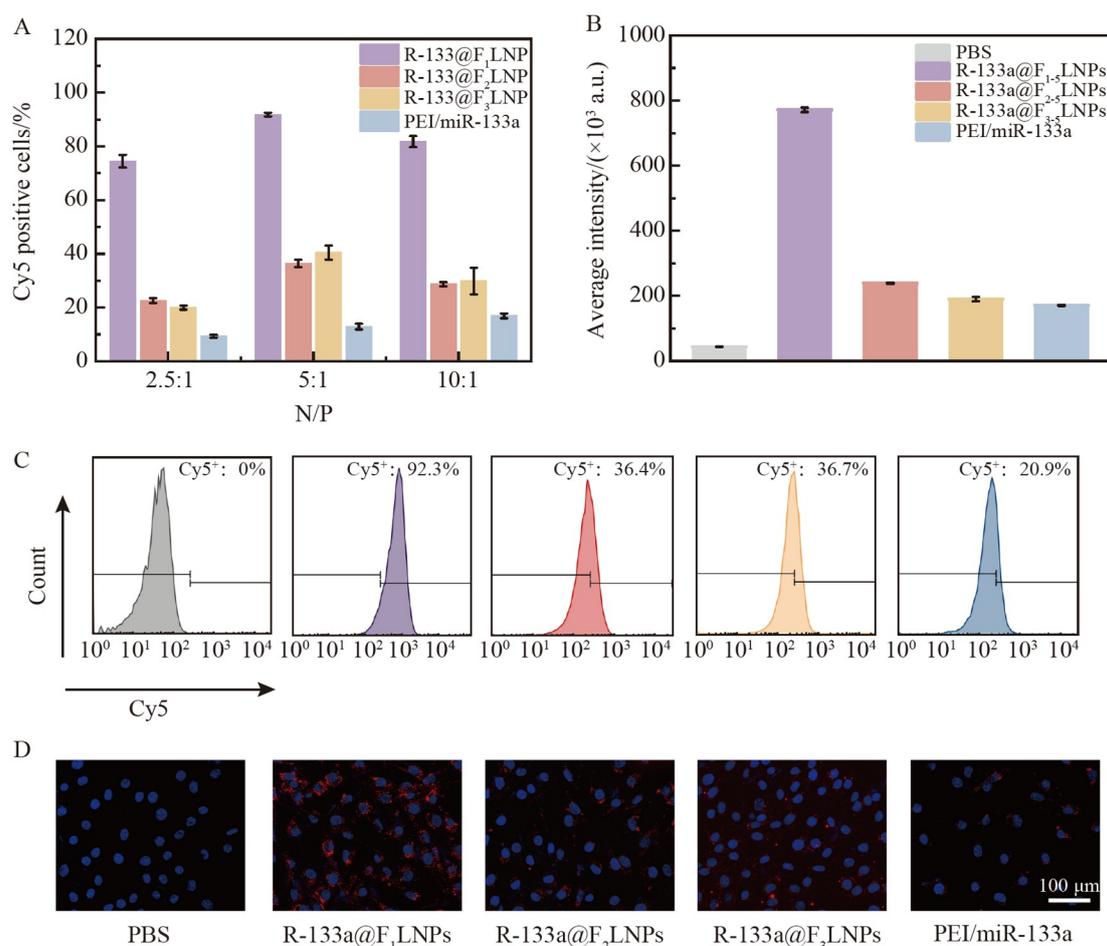


图3 (A) 不同 N/P 比的 R-133a@F₁LNPs、R-133a@F₂LNPs、R-133a@F₃LNPs 和 PEI/miR-133a 在 HL1 心肌细胞中的内化情况；(B) N/P 比为 5:1 时, HL1 心肌细胞对 R-133a@F_{1.5}LNPs、R-133a@F_{2.5}LNPs、R-133a@F_{3.5}LNPs 和 PEI/miR-133a 摄取的平均荧光强度；(C) N/P 比为 5:1 时, R-133a@F_{1.5}LNPs、R-133a@F_{2.5}LNPs、R-133a@F_{3.5}LNPs、PEI/miR-133a 在 HL1 心肌细胞中的转染效率；(D) 在荧光显微镜下观察 HL1 细胞对 R-133a@F_{1.5}LNPs、R-133a@F_{2.5}LNPs、R-133a@F_{3.5}LNPs 和 PEI/miR-133a 的摄入情况

Fig.3 (A) Internalization of different N/P ratios of R-133a@F₁LNPs, R-133a@F₂LNPs, R-133a@F₃LNPs and PEI/miR-133a in HL1 cardiomyocytes; (B) Average fluorescence intensity of R-133a@F_{1.5}LNPs, R-133a@F_{2.5}LNPs, R-133a@F_{3.5}LNPs and PEI/miR-133a uptake by HL1 cardiomyocytes at N/P ratio of 5:1; (C) Transfection efficiency of R-133a@F_{1.5}LNPs, R-133a@F_{2.5}LNPs, R-133a@F_{3.5}LNPs and PEI/miR-133a in HL1 cardiomyocytes at N/P ratio of 5:1; (D) Observation of uptake of R-133a@F_{1.5}LNPs, R-133a@F_{2.5}LNPs, R-133a@F_{3.5}LNPs and PEI/miR-133a by HL1 cells under fluorescent microscopy

有下降,但仍大于 90%。修饰 HL1 心肌细胞膜的仿生载体 HR-133a@F_{1.5}LNPs 处理组细胞的存活率略高于 R-133a@F_{1.5}LNPs, 并且两组均显著高于 PEI/miR-133a 处理组的 HL1 心肌细胞的存活率。采用 25 μg/mL 的 R-133a@F_{1.5}LNPs、R-133a@HF_{1.5}LNPs 和 PEI/miR-133a 评估溶血率(图 5B), PEI/miR-133a 处理红细胞 12 h 后,溶血率为 25.4%; 处理 24 h 后,溶血现象更明显,溶血率可达 52.3%,远高于生物材料允许的最大溶血率(5%)^[28]。R-133a@F_{1.5}LNPs 和 HR-133a@F_{1.5}LNPs 对红细胞产生的影响很小,处理 24 h 后溶血率仍较低。同时,红细胞的形态也可被用于评估纳米颗粒溶血的发生情况。与 PBS 处理组相比, PEI/miR-133a 处理组红细胞的形态发生了明显改变,而 R-133a@F_{1.5}LNPs 和 HR-133a@F_{1.5}LNPs 处理组红细胞的形态与 PBS 处理组几乎没有差异(图 5C),因此,相比于 PEI 组, R-133a@F_{1.5}LNPs 组细胞毒性低,尤其是细胞膜修饰后,基因载体的生物安全性明显提高。

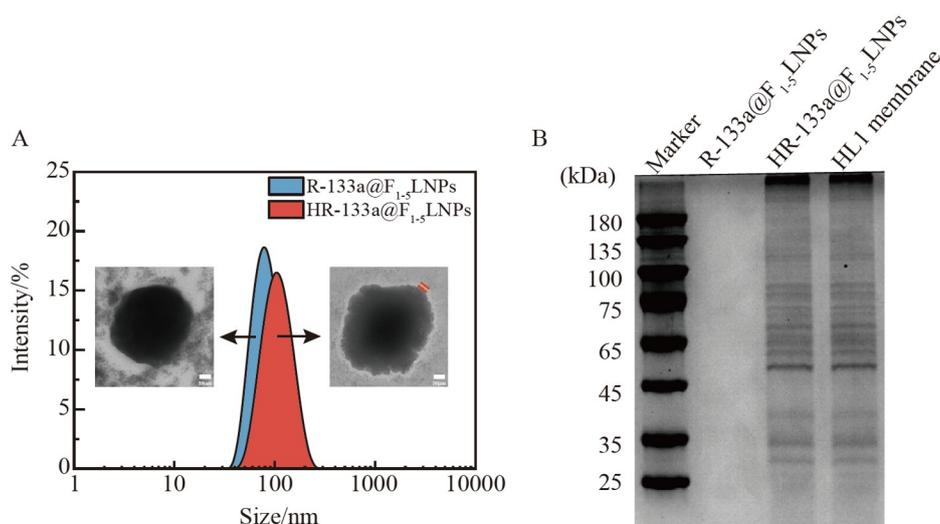


图4 (A) R-133a@F_{1.5}LNPs 和 HR-133a@F_{1.5}LNPs 的粒径分布和透射电镜形貌图; (B) R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 HL1 心肌细胞膜考马斯亮蓝染色结果

Fig.4 (A) Particle size distribution and transmission electron microscopy (TEM) morphology images of R-133a@F_{1.5}LNPs and HR-133a@F_{1.5}LNPs; (B) Results of Coomassie Brilliant Blue staining of R-133a@F_{1.5}LNPs, HR-133a@F_{1.5}LNPs and HL1 cardiomyocytes membrane

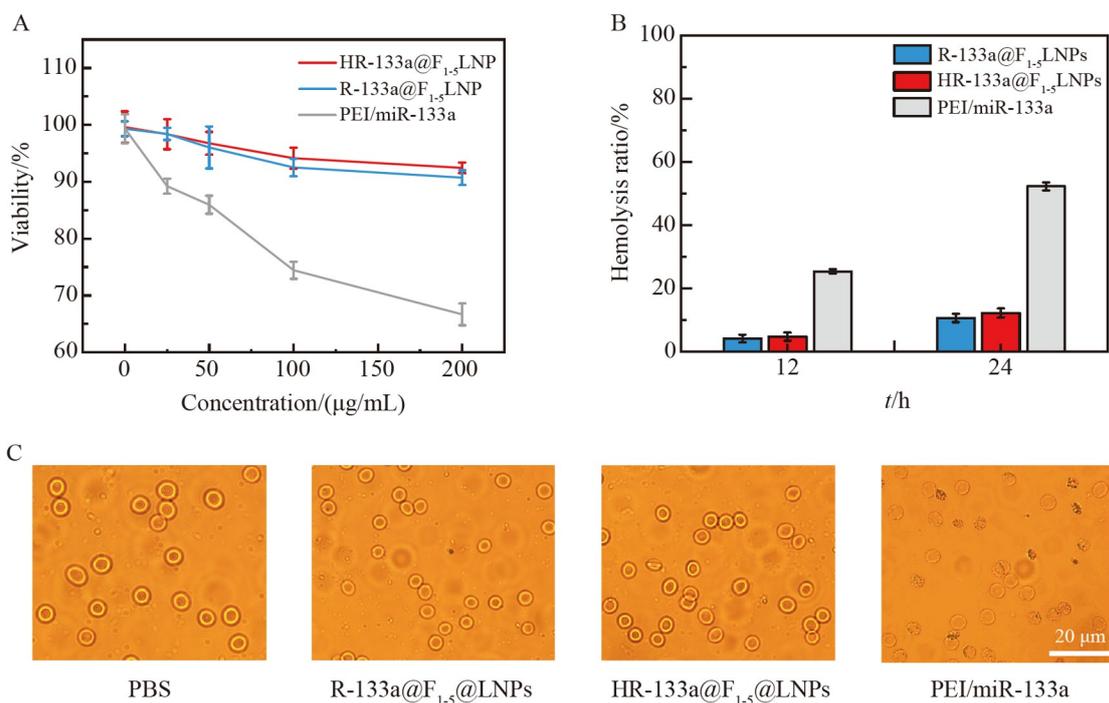


图5 (A) 不同浓度的 R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 PEI/miR-133a 对 HL1 心肌细胞的毒性作用; (B) 25 μg/mL R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 PEI/miR-133a 分别处理红细胞 12 和 24 h 后,红细胞的溶血率变化; (C) 25 μg/mL R-133a@F_{1.5}LNPs、HR-133a@F_{1.5}LNPs 和 PEI/miR-133a 处理红细胞 24 h 后红细胞形态

Fig.5 (A) Cytotoxic effects of different concentrations of R-133a@F_{1.5}LNPs, HR-133a@F_{1.5}LNPs and PEI/miR-133a on HL1 cardiomyocytes; (B) Changes in hemolysis rate of red blood cells after treatment with 25 μg/mL R-133a@F_{1.5}LNPs, HR-133a@F_{1.5}LNPs and PEI/miR-133a for 12 h and 24 h, respectively; (C) Morphology of red blood cells after treatment with 25 μg/mL R-133a@F_{1.5}LNPs, HR-133a@F_{1.5}LNPs, PEI/miR-133a for 24 h, respectively

2.4 HR-133a@F_{1,5}LNP_s体外靶向性分析

采用不同浓度(1×10^{-5} mol/L、 1×10^{-6} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-8} mol/L)的 Ang II 刺激 HL1 心肌细胞 48 h, 探索诱导心肌细胞肥大的最佳药物浓度。qPCR 结果(图 6A)显示, 与对照组相比, 不同浓度的 Ang II 刺激 HL1 心肌细胞内的 BNP 相对表达量均上调, 其中, 1×10^{-7} mol/L Ang II 组 BNP 表达水平最高, 差距具有统计学意义($p < 0.01$), 表明 1×10^{-7} mol/L 可能是诱导心肌细胞肥大模型的 Ang II 最佳浓度。通过鬼笔环肽染色 HL1 心肌细胞骨架观察其形态改变(图 6B), 与对照组相比, Ang II 诱导 HL1 心肌细胞的细胞面积显著增大, 进一步通过软件 Image J 测量细胞面积(图 6C), 也显示两者之间有显著差异($p < 0.05$)。

通过观察肥厚性 HL1 心肌细胞中的荧光信号, 评估细胞对 R-133a@F_{1,5}LNP_s 和 HR-133a@F_{1,5}LNP_s 的摄取。miR-133a 携带 Cy5 荧光, 在 646 nm 左右的激发光下可以发出红色荧光, 包裹了心肌细胞膜的纳米颗粒 HR-133a@F_{1,5}LNP_s 处理组中的红色荧光显著高于未包膜材料组(图 6D), 说明包裹 HL1 心肌细胞膜后提高了 HR-133a@F_{1,5}LNP_s 的靶向能力, 体外实验验证了 HR-133a@F_{1,5}LNP_s 具有更好的转染能力, 可以更好地协助纳米颗粒进入细胞中。

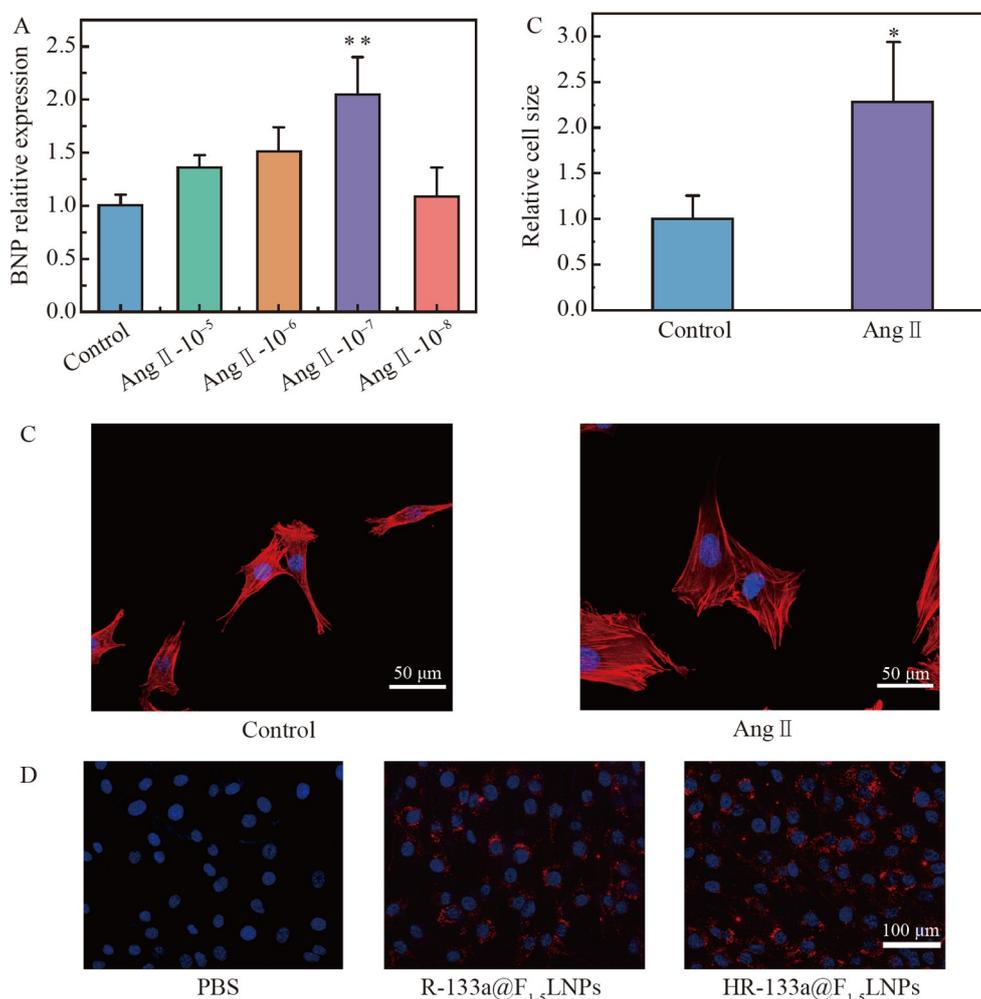


图6 (A) 使用不同浓度 Ang II 刺激 HL1 48 h 肥厚基因 B 型利钠肽(BNP)的表达情况; (B) 鬼笔环肽染色观察细胞形态改变; (C) 使用 Image J 软件对细胞面积进行统计分析结果, $n=3$, $**p < 0.01$ vs Control; (D) 肥厚性 HL1 心肌细胞对 R-133a@F_{1,5}LNP_s 和 HR-133a@F_{1,5}LNP_s 的摄取情况

Fig.6 (A) Expression of hypertrophy gene (B-Type natriuretic peptide, BNP) in HL1 cardiomyocytes after 48-h stimulation with different concentrations of Ang II; (B) Observation of cell morphology changes by Griffonia simplicifolia lectin staining; (C) Statistical analysis of cell area using Image J software, $n=3$, $**p < 0.01$ vs Control; (D) Uptake of R-133a@F_{1,5}LNP_s and HR-133a@F_{1,5}LNP_s by hypertrophic HL1 cardiomyocytes

2.5 HR-133a@F_{1.5}LNP的体外心肌肥厚治疗效果评价

为了验证 HR-133a@F_{1.5}LNP 能否将 miR-133a 递送至心肌细胞中并发挥作用,采用 qPCR 测定心肌肥厚相关基因的 mRNA 的表达水平。结果如图 7A 所示,与 PBS 对照组相比,HR-133a@F_{1.5}LNP 和 R-133a@F_{1.5}LNP 处理组的 RhoA mRNA 水平明显降低,相较于 R-133a@F_{1.5}LNP 处理组,HR-133a@F_{1.5}LNP 处理组表达水平更低。这表明 HR-133a@F_{1.5}LNP 可将 miR-133a 递送至心肌细胞中,并抑制了 RhoA 的表达。

采用 Western blot 方法检测了心肌肥厚细胞模型 HL1 心肌细胞分别经 R-133a@F_{1.5}LNP、HR-133a@F_{1.5}LNP 和 PEI/miR133a 处理后 RhoA 的蛋白表达水平(图 7B)。与正常 HL1 心肌细胞相比,在肥厚性的 HL1 心肌细胞中 RhoA 蛋白的表达明显增高,而 R-133a@F_{1.5}LNP 和 HR-133a@F_{1.5}LNP 处理组的心肌细胞中 RhoA 蛋白的表达显著下降,基本恢复至正常水平;PEI/miR133a 处理组的 RhoA 蛋白表达水平相较肥厚组细胞有所降低,但仍显著高于对照组。此结果表明,HR-133a@F_{1.5}LNP 可将 miR-133a 递送至 HL1 心肌细胞内,抑制 RhoA 蛋白的表达,具有诱导细胞结构重排的潜力,从而实现治疗心肌肥厚的目的。

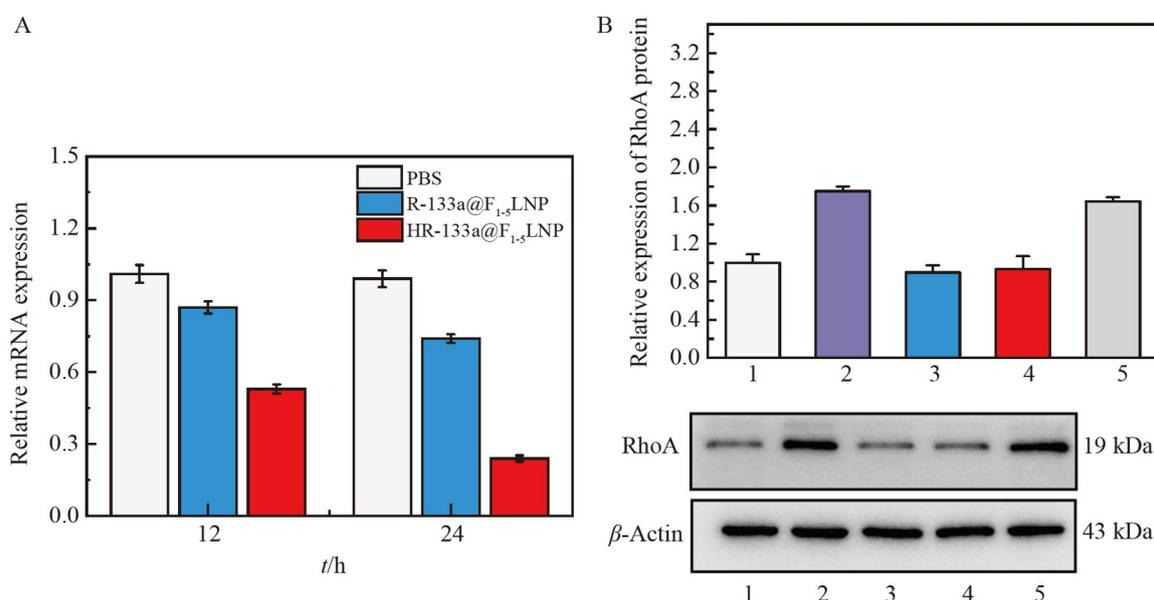


图7 (A) qPCR 检测 HL1 心肌细胞经 R-133a@F_{1.5}LNP 和 HR-133a@F_{1.5}LNP 处理 12 h 和 24 h 后 RhoA mRNA 的表达水平; (B) Western blot 检测 HL1 心肌细胞经 R-133a@F_{1.5}LNP、HR-133a@F_{1.5}LNP 和 PEI/miR-133a 处理 24 h 后 RhoA 和蛋白表达水平(1: PBS, 2: Ang II, 3: Ang II +R-133a@F_{1.5}LNP, 4: Ang II +HR-133a@F_{1.5}LNP, 5: Ang II +PEI/miR-133a)

Fig.7 (A) Detection of RhoA mRNA expression in HL1 cardiomyocytes after treatment with R-133a@F_{1.5}LNP and HR-133a@F_{1.5}LNP for 12 h and 24 h by qPCR; (B) Detection of RhoA protein expression levels in HL1 cardiomyocytes after treatment with R-133a@F_{1.5}LNP and HR-133a@F_{1.5}LNP for 24 h by Western blot

3 结论

基于“模仿自然”和阳离子载体递送的优势,本研究采用心肌细胞膜修饰的方法制备了一种新型仿生阳离子基因递送载体 HR-133a@F_{1.5}LNP,既保留了心肌细胞膜的同源靶向特性,又具备阳离子载体充分包裹 miR-133a 和促进细胞内化的双重效应。在体外实验中,此载体能够特异性地将 miR-133a 靶向递送至心肌细胞,表现出优异的递送效率,通过靶向结合 RhoA 3'UTR 抑制 RhoA/ROCK 信号通路,从而抑制了心肌细胞的重排和纤维化。此新型仿生递送系统改善了由压力超负荷而引起的心肌肥厚,为心肌肥厚的治疗提供了一种新的思路。

References

- [1] VAN BERLO J H, MAILLET M, MOLKENTIN J D. *J. Clin. Invest.* , 2013, 123(1): 37-45.
- [2] BALAKUMAR P, JAGADEESH G. *Pharmacol. Res.* , 2010, 62(5): 365-383.
- [3] OKA T, AKAZAWA H, NAITO A T, KOMURO I. *Circ. Res.* , 2014, 114(3): 565-571.
- [4] JESSUP M, BROZENA S. *N. Engl. J. Med.* , 2003, 348(20): 2007-2018.
- [5] HU M, ZHANG Z, LIU B, ZHANG S, CHAI R, CHEN X, KONG T, ZHANG F, ZHANG J, LIU S, LIU N. *Cell. Physiol. Biochem.* , 2018, 45(6): 2421-2430.
- [6] LIU Y, LIANG Y, ZHANG J, FU W. *Exp. Cell Res.* , 2017, 354(2): 65-70.
- [7] XIAO Y, ZHAO J, TUAZON J P, BORLONGAN C V, YU G. *Cell Transplant.* , 2019, 28(7): 831-838.
- [8] CARÈ A, CATALUCCI D, FELICETTI F, BONCI D, ADDARIO A, GALLO P, BANG M L, SEGNALINI P, GU Y, DALTON N D, ELIA L, LATRONICO M V G, HØYDAL M, AUTORE C, RUSSO M A, DORN II G W, ELLINGSEN Ø, RUIZ-LOZANO P, PETERSON K L, CROCE C M, PESCHLE C, CONDORELLI G. *Nat. Med.* , 2007, 13(5): 613-618.
- [9] BROWN J H, DEL RE D P, SUSSMAN M A. *Circ. Res.* , 2006, 98(6): 730-742.
- [10] GARCIA-PADILLA C, GARCIA-LOPEZ V, ARANEGA A, FRANCO D, GARCIA-MARTINEZ V, LOPEZ-SANCHEZ C. *Int. J. Mol. Sci.* , 2022, 23(8): 4179.
- [11] ISHIKAWA K, WEBER T, HAJJAR R J. *Circ. Res.* , 2018, 123(5): 601-613.
- [12] KAUFMANN K B, BÜNING H, GALY A, SCHAMBACH A, GREZ M. *EMBO Mol. Med.* , 2013, 5(11): 1642-1661.
- [13] HU B, ZHONG L, WENG Y, PENG L, HUANG Y, ZHAO Y, LIANG X J. *Signal Transduction Targeted Ther.* , 2020, 5(1): 101.
- [14] TENCHOV R, BIRD R, CURTZE A E, ZHOU Q. *ACS Nano*, 2021, 15(11): 16982-17015.
- [15] MA K, MI C L, CAO X X, WANG T Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2021, 105(2): 525-538.
- [16] GUÉGUEN C, BEN C T, BRIAND M, RENAUD K, SEILER M, ZIESEL M, ERBACHER P, HELLAL M. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* , 2023, DOI: 10.1016/j.ejpb.2023.08.002.
- [17] SCHOENMAKER L, WITZIGMANN D, KULKARNI J A, VERBEKE R, KERSTEN G, JISKOOT W, CROMMELIN D J A. *Int. J. Pharm.* , 2021, 601: 120586.
- [18] LI Y, YE Z, YANG H, XU Q. *Acta Pharm. Sin. B*, 2022, 12(6): 2624-2639.
- [19] ZHANG W, ZHAO Z, LI F. *Mol. Immunol.* , 2022, 144: 58-70.
- [20] HU C M J, ZHANG L, ARYAL S, CHEUNG C, FANG R H, ZHANG L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 2011, 108(27): 10980-10985.
- [21] WANG S, DUAN Y, ZHANG Q, KOMARLA A, GONG H, GAO W, ZHANG L. *Small Struct.* , 2020, 1(1): 2000018.
- [22] CHEN Z, ZHAO P, LUO Z, ZHENG M, TIAN H, GONG P, GAO G, PAN H, LIU L, MA A, CUI H, MA Y, CAI L. *ACS Nano*, 2016, 10(11): 10049-10057.
- [23] FANG R H, KROLL A V, GAO W, ZHANG L. *Adv. Mater.* , 2018, 30(23): e1706759.
- [24] YOO J W, IRVINE D J, DISCHER D E, MITRAGOTRI S. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2011, 10(7): 521-535.
- [25] HALD ALBERTSEN C, KULKARNI J A, WITZIGMANN D, LIND M, PETERSSON K, SIMONSEN J B. *Adv. Drug Delivery Rev.* , 2022, 188: 114416.
- [26] BHULLAR S K, DHALLA N S. *Cells*, 2022, 11(21): 3336.
- [27] MENDES B B, CONNIOT J, AVITAL A, YAO D, JIANG X, ZHOU X, SHARF-PAUKER N, XIAO Y, ADIR O, LIANG H, SHI J, SCHROEDER A, CONDE J. *Nat. Rev. Methods Primers*, 2022, 2(1): 24.
- [28] GB/T 14233.2-2005. Test Methods for Infusion, Transfusion, Injection Equipment for Medical Use-Part 2: Biological Test Methods. National Standards of the People's Republic of China.
医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分: 生物学试验方法. 中华人民共和国国家标准. GB/T 14233.2-2005.

New Cationic Lipid Nanoparticle Modified with Cardiac Cell Membrane for Effective Treatment of Cardiac Hypertrophy

JIAO Li-Ping¹, LI Wei², SUN Zhi-Hong², LIU Jie², SUN Cheng-Ming^{*1,2}

¹(Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

²(Center for Laboratory Diagnosis, Yantai Yuhuangding Hospital Affiliated to Qingdao University, Yantai 264000, China)

Abstract Myocardial hypertrophy is the common pathological result of hypertension, myocardial infarction, coronary heart disease and other cardiovascular diseases. It is found that persistent myocardial hypertrophy is one of the important causes of heart failure and sudden death. MiR-133a is one of the most abundant miRNAs in myocardial tissue, and as a crucial regulatory factor for myocardial hypertrophy, it directly participates in the occurrence and development of this condition. However, although MiR-133a-based gene therapy is a promising intervention method for myocardial hypertrophy, achieving safe and effective miR-133a intracellular delivery is a main obstacle to efficient treatment. Based on this, to achieve efficient delivery of miR-133a, a new biomimetic gene delivery vector (HR-133a@F₁₋₅LNPs) was successfully prepared in this work, and its application for myocardial hypertrophy treatment was discussed and investigated. The results indicated that HR-133a@F₁₋₅LNPs had good biological safety and could be preferentially targeted to cardiac hypertrophy cells, achieving intracellular delivery of miR-133a. Meanwhile, qPCR and Western blot results further confirmed that HR-133a@F₁₋₅LNPs could effectively regulate the mRNA and protein expression levels of the key factor RhoA in myocardial hypertrophy. In conclusion, the new biomimetic gene vector (HR-133a@F₁₋₅LNPs) constructed in this study had excellent biosafety and targeting properties, which could deliver miR-133a to myocardial hypertrophy cells and inhibit the expression of related factors, and successfully achieved miR-133a-mediated cardiac hypertrophy therapy. This study provided a new therapeutic approach for achieving efficient treatment of myocardial hypertrophy.

Keywords Cardiac hypertrophy; Biomimetic nanomaterials; Gene delivery vectors; Biosecurity; Active targeting

(Received 2023-06-13; accepted 2023-10-23)

Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province, China (No. ZR2022MH100).