

## 血管内皮细胞靶向性 Tyr-RGD-PEG-PEI 纳米基因载体的合成及其生物特性的初步研究

高 勇<sup>1\*</sup>, 何胜利<sup>3</sup>, 钟高仁<sup>4</sup>, 蔡洪培<sup>2</sup>, 李 琦<sup>1</sup>

(1. 同济大学附属东方医院肿瘤科, 上海 200120; 2. 第二军医大学附属长征医院消化科, 上海 200003; 3. 复旦大学附属上海市第五人民医院肿瘤科, 上海 200240; 4. 复旦大学放射医学研究所, 上海 200032)

**摘要:** 本文设计和合成了具有血管内皮细胞靶向性的环五肽 RGD (cyclo-[Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys], Tyr-RGD) 修饰的纳米基因载体聚乙二醇-聚乙烯亚胺 (PEG-PEI), 并研究其纳米特性、载药特性及其体内外的肿瘤靶向特性。采用化学方法合成所需要的纳米载体, 鉴定该纳米载体的纳米特性及载药特性, 并采用体外血管内皮细胞竞争结合实验研究其靶向性, 最后将荧光标记的纳米载体注入荷瘤小鼠体内, 观察其肿瘤靶向性。Tyr-RGD-PEG-PEI 纳米载体采用分步合成方法, 所获得的载体粒径约为 145 nm, 其对小分子干扰核糖核酸 (siRNA) 的封装率好, 血浆内孵育 30 min, 仅约 3% 的 siRNA 游离出来, 结构稳定。薄层层析法分析鉴定其为单一斑点 ( $R_f$  0.65)。受体竞争实验表明该纳米载体可有效地与多肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 竞争结合内皮细胞膜上的受体; 荷瘤小鼠实验表明, 载有荧光标记 siRNA 的 Tyr-RGD-PEG-PEI 纳米药物注射入小鼠体内 24 h 后, 主要分布在肿瘤组织内, 而无 Tyr-RGD 靶向的纳米药物则除了瘤体内, 还分布在肝脏、肺等脏器。合成的 Tyr-RGD 靶向纳米载体 Tyr-RGD-PEG-PEI 具有较好的纳米特性和高效的基因药物封装率, 荷瘤裸鼠研究表明其肿瘤的靶向性明显优于无 Tyr-RGD 靶向的纳米药物。

**关键词:** 整合素; 纳米; 肿瘤; 内皮细胞; 小分子干扰核糖核酸

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 09-1034-06

## Vascular endothelial cells targeted Tyr-RGD-PEG-PEI nano-drug synthesis and its biological activity

GAO Yong<sup>1\*</sup>, HE Sheng-li<sup>3</sup>, ZHONG Gao-ren<sup>4</sup>, CAI Hong-pei<sup>2</sup>, LI Qi<sup>1</sup>

(1. Department of Oncology, Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China;

2. Department of Digestive Medicine, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China;

3. Department Oncology, Shanghai 5th People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China;

4. Radiology Institute, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** The study is designed to synthesize nano-carrier Tyr-RGD (cyclo-[Arg-Gly-Asp-d-Tyr-Lys]) and poly(ethylene glycol) modified polyethylenimine (Tyr-RGD-PEG-PEI) targeting vascular endothelial cells, then analyze its nanoparticle properties and the characteristics of drug carrying and targeting properties *in vivo* / *in vitro* tumor. The nano-carrier Tyr-RGD-PEG-PEI was synthesized with the method of chemical synthesis and the properties of this nanoparticle and drug carrying characteristics were identified. Its effect of targeting vascular endothelial cells *in vitro* was studied with the method of competitive binding assay. The fluorescent labeled nano-drug was injected into tumor-bearing nude mice to observe its tumor-targeting. The mean size of nano-carrier Tyr-RGD-PEG-PEI was about 145 nm, good in encapsulation efficiency of siRNA. After incubation in

收稿日期: 2009-02-24.

基金项目: 上海市科学技术委员会纳米专项基金资助项目 (05nm05007).

\*通讯作者 Tel: 86-21-38804518, Fax: 86-21-38798999, E-mail: gaoyon@gmail.com

plasma for half an hour, only about 3 percent of siRNA out. It was confirmed that it was a single spot with TLC analysis, the  $R_f$  value was 0.65. Receptor competition experiments showed that the nano could effectively compete with RGD in binding the receptors on endothelial cells. Tumor-bearing nude mice experiments showed that when containing a fluorescent-labeled siRNA of Tyr-RGD-PEG-PEI nano-drug was injected into mice, after 24 hours this nano-drug mainly distributed within the tumor tissue. However, nano-drug without Tyr-RGD appeared in tumor tissue as well as other organs such as livers, lungs, etc. The Tyr-RGD-targeted gene vector Tyr-RGD-PEG-PEI synthesized in this study has good nanoparticle properties and high efficiency of gene-drug encapsulation. Study of nude mice shows that the ability of its tumor-targeting is significantly better than nano-drug without Tyr-RGD.

**Key words:** integrin; nanoparticle; tumor; endothelial cell; siRNA

分子靶向治疗已成为恶性肿瘤治疗的一个重要的研究领域, 靶向药物和靶向载体是其主要的两个研究方向。靶向药物如针对肿瘤新生血管的人源化单抗 Avastin, 针对表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的单抗 erlotinib 等已在临床上得到广泛的应用, 而靶向载体的研究也有了重大的进展, 如脂质体表阿霉素等。小分子干扰核糖核酸 (small interfering RNAs, siRNAs) 是近年发展起来的封闭靶基因的有效方法, 针对肿瘤细胞内的癌基因或其他促癌生长的基因的反义核酸基因治疗技术已部分进入临床前研究<sup>[1,2]</sup>。纳米生物材料作为一种新型非病毒基因靶向载体受到广泛关注, 但转染效率低仍是其主要缺点。在纳米载体的表面偶联靶细胞的配体或抗体, 通过靶向性分子与细胞表面特异性受体结合, 可实现基因治疗的主动靶向性。

研究表明肿瘤细胞及肿瘤内活化的血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 膜表面特异表达细胞整合素 (integrin) 受体  $\alpha_v\beta_3$ , 而人体其他部位的正常细胞膜表面几乎不存在该整合素受体<sup>[3]</sup>。而多肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 可以特异性地与细胞膜上的  $\alpha_v\beta_3$  牢固结合, 据此, 以靶向用于肿瘤及其 EC 的载体研究成为近年的热点。Schiffelers 等<sup>[4]</sup>将整合到纳米粒表面, 针对人血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR2) 设计的 siRNA 成功地导入活化的 EC 内, 几乎不出现在未活化的正常组织 EC 内, 并完全封闭了 VEGFR2 的作用, 实现了真正意义上的双重靶向治疗, 即靶向细胞和靶向基因。将 RGD 与同位素结合则可以用于肿瘤血管的影像学研究<sup>[5]</sup>。本研究采用新型环五肽 RGD (cyclo-[Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys], Tyr-RGD), 经与聚乙二醇 (PEG)-聚乙烯亚胺 (PEI) 纳米载体聚合形成具有靶向作用的纳米复合物 (Tyr-RGD-PEG-PEI), 以此纳米为载体制备纳米基因药物并探讨其靶向肿瘤的作用。

## 材料与方法

**材料** Tyr-RGD, Sigma 公司; 单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基丙酸盐 (mPEG-SPA, mPEG 分子量 2 000), Nektar 公司; 支链聚乙烯亚胺 (PEI, 平均相对分子量 25 000), Aldrich 化学公司; Cyanine 7 (Cy7), Biocompare 公司; 透析袋 (截留相对分子量 14 000 和 3 500), Spectrum laboratories 公司; Sephadex G25, Pharmacia 公司;  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , 中国原子能研究所。

**人脐静脉内皮细胞培养** 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 由复旦大学中山医院提供。EBM2 培养液 (Invitrogen 公司), 加 5% 胎牛血清, 1% 青霉素、链霉素, 0.4% 重组人纤维母细胞生长因子 B (recombinant human fibroblast growth factor B)、0.1% 重组人血管内皮生长因子 (recombinant human vascular endothelial growth factor)、0.1% 长效胰岛素样生长因子 (long R insulin like growth factor) 和 0.1% 重组人上皮生长因子 (recombinant human epidermal growth factor), 上述试剂均为 Invitrogen 公司产品, 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  培养。取 3~5 代的 HUVEC 进行实验, 并用 RGD 缓冲液配成一定浓度的细胞悬浮液, 置室温下备用。

**Tyr-RGD-PEG-PEI 的制备** 参照文献<sup>[6]</sup>, 精密称取 vinyl sulfone-PEG-NHS (14.7  $\mu\text{mol}$ , Nektar AL) 50 mg 至含有 500  $\mu\text{L}$  DMSO 溶液的圆底烧瓶中, 室温下搅拌溶解后, 加入等摩尔的 Tyr-RGD, 搅拌 2 h, 用薄层色谱法 (TLC) 分析跟踪反应, 直到 Tyr-RGD 完全消失。真空条件下蒸去溶剂, 然后用蒸馏水重新溶解, 再用去离子水透析除去小分子物质, 透析袋 (截留相对分子量 3 500), 浓缩待用。取浓缩后的 vinyl sulfone-PEG-Tyr-RGD ( $\sim 14.7 \mu\text{mol}$ ) 完全溶解在 DMSO 溶液 500  $\mu\text{L}$  中, 然后加入 1.47  $\mu\text{mol}$  的 PEI 溶液 (DMSO 500  $\mu\text{L}$ ), 室温下搅拌 18 h, TLC 跟踪反应到结束。真空条件下蒸去溶剂, 然后用蒸馏水重新溶解, 再用去离子水透析, 透析袋 (截留相对分子量

为 14 000), 经冷冻干燥, 得到 Tyr-RGD-PEG-PEI 固体产物。

**Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA 纳米复合物的制备** Tyr-RGD-PEG-PEI 和 siRNA 根据需要分别配成相应浓度, 将 Tyr-RGD-PEG-PEI 溶液滴加于搅拌的等体积 siRNA 溶液中, 室温孵育 30 min, 制成不同 N:P (N: 载体分子表面胺基的数量, P: 核苷酸中磷酸基团的数量) 比例的复合物, 复合物溶液无菌过滤后 4 °C 备用。

**Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA 纳米复合物的检测** 取纳米复合物溶液适量, 用去离子水稀释至 1.5 mL, 用 90 Plus/BI-MAS 纳米粒度仪及 Zetaplus 电位分析仪 (Brookhaven) 测定粒径及 zeta 电位。复合物的稳定性用琼脂糖凝胶电泳分析法测定 siRNA 的降解量: 取等体积的复合物和新鲜大鼠血浆混合, 37 °C 保温 30 min 后, 取出一定量的样品, 用肝素解离出游离的 siRNA, 然后用琼脂糖凝胶电泳分析。

**RiboGreen 测定 Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA 纳米复合物封装率** 参照试剂盒说明 (Invitrogen, RiboGreen<sup>®</sup> RNA) 并适当修改, 具体方法: 从不同 N/P 比例的纳米复合物中取 siRNA 终浓度为 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的复合物, 取 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔平底板 (Corning, USA), 每孔加稀释好的 Ribogreen 染料 (用 Tris-EDTA 稀释为 1:200) 100  $\mu\text{L}$ , 室温孵育 30 min, 酶标仪测定荧光强度 (波长分别为 485 和 535 nm), 空白对照为缓冲液和 PicoGreen 染料。标准浓度曲线采用试剂盒提供的试剂同时测定并计算出每孔 siRNA 浓度。

**<sup>125</sup>I-Tyr-RGD 的制备** 标记: 取一支涂有 Iodogen (5  $\mu\text{g}$ ) 的小试管, 依次加入 Tyr-RGD 溶液 5  $\mu\text{L}$  (0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 由复旦大学中山医院提供), Na<sup>125</sup>I 溶液 2~4  $\mu\text{L}$  (18 GBq $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 室温条件下搅拌反应 5 min 后, 加入 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.4 的 PBS 缓冲液 0.5 mL 终止反应。反应液用 Sep-Pak C<sub>18</sub> 小柱进行纯化, 分别用甲醇、双蒸水和 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 各 5 mL 依次平衡小柱, 标记反应液加到小柱上后, 用 0.1% TFA 淋洗至放射性计数到最低, 然后用 60% 乙腈的 0.1% TFA 溶液洗脱, 收集的洗脱液经冷冻干燥, 用含 0.1% 牛血清白蛋白的 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4 的 PBS 缓冲液溶解, -20 °C 贮存备用。

**体外细胞竞争结合实验** 塑料试管中依次加入悬浮的 HUVEC 细胞 0.5 mL ( $1\times 10^6$  细胞)、<sup>125</sup>I-Tyr-RGD-PEG-PEI 0.1 mL ( $1\times 10^{-4}$   $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、0~10  $\mu\text{g}/\text{tube}$  的 RGD 0.1 mL, 最终反应体积为 0.7 mL, 混匀后

4 °C 放置 5 h。然后以 3 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 吸去上清液, 用  $\gamma$  计数器测定沉淀细胞的放射性量即为 <sup>125</sup>I-Tyr-RGD-PEG-PEI 与 HUVEC 细胞总结合管的程度。计算: ① 特异结合 = 总结合管 - 非特异管; ② 通过了解不同量的 RGD 或 RGD 修饰的衍生物阻断 <sup>125</sup>I-Tyr-RGD-PEG-PEI 与 HUVEC 细胞受体结合程度, 可计算出本实验制备的纳米载体与 HUVEC 表面整合素受体结合的生物活性程度。

**CCK8 法检测纳米粒细胞毒性** 取处于对数生长期的胰腺癌 PANC-1 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 20% 胎牛血清的 DMEM 制成细胞数为  $1\times 10^5/\text{mL}$  的单细胞悬液。每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板并于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内过夜。实验孔分别用上述培养液配置成 10、20 和 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Tyr-RGD-PEG-PEI 和 PEI, 对照组仅用培养液, 空白组每孔加入相同的培养液, 但无细胞。每组设 6 个复孔, 继续培养 24 h 后每孔加入 CCK8 10  $\mu\text{L}$ , 置于 37 °C 孵箱中培养 4 h, 酶标仪测定各孔 450 nm 波长的吸收度。采用 *t* 检验对数据进行显著性检验。

$$\text{细胞存活率 (\%)} = \frac{(\text{实验孔} - \text{空白孔})}{(\text{对照孔} - \text{空白孔})} \times 100\%$$

**Tyr-RGD-PEG-PEI 和 siRNA 复合物体内示踪实验** 按使用说明用荧光素 Cy7 标记 siRNA。参照上述方法制备 Tyr-RGD-PEG-PEI 和 Cy7-siRNA 复合物, 裸鼠选用 BALB/c-nu, 肿瘤细胞株 A549 (American Type Culture Collection, ATCC), 注射  $1\times 10^6$  个细胞 (200  $\mu\text{L}$ ) 于裸鼠背部皮下, 3 周左右成瘤。分组: 空白组 (注射 PBS), Cy7-siRNA 组 (no nano, drug1 only), Tyr-RGD-PEG-PEI-Cy7-siRNA (RGD-nano + drug1), Tyr-RGD-PEG-PEI-Cy7-endostatin (RGD-nano + drug2), PEG-PEI-Cy7-siRNA (nano-drug1)。于小鼠尾静脉注入等量药物, 按规定时间进行荧光成像, 荧光成像采用美国 Lighttools Research 公司活体荧光成像系统。

## 结果

### 1 纳米粒鉴定

<sup>1</sup>HNMR 分析: Tyr-RGD-PEG-PEI 固体产物适量溶于 D<sub>2</sub>O, 根据氢谱中 PEG 和 PEI 单元质子峰的峰面积, 计算出本实验用 Vinyl sulfone-PEG-Tyr-RGD: PEI  $\approx 10:1$  (mol: mol) 的投料比制备得 Tyr-RGD-PEG-PEI 中, 平均每分子的 PEI 接有 5~8 个 PEG 分子。

薄层色谱法分析: 固定相为 HSGF<sub>254</sub> 硅胶薄层板, 展开剂用氯仿-二氯甲烷-甲醇-正丁醇 (5:4:2:1), 用碘蒸气显色, 结果观察到 Tyr-RGD-PEG-PEI 为单一斑点,  $R_f$  值为 0.65。

**1.1 Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA 复合物物理特性分析** 纳米复合物的光散射粒径和  $\zeta$  电位用粒度/Zeta 电位测定仪测定。结果表明: 上述制得的复合物 Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA 粒径约为 50~300 nm, 并随 N:P 的比例增加而减小, N/P 为 5 时纳米粒径为 (145 ± 4.2) nm, 复合物  $\zeta$  电位随 N:P 的比例增加而增大, N/P 为 5 时  $\zeta$  电位为 (-10.8 ± 1.2) mV (表 1)。

**Table 1** The particle size and zeta potential of Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA complex with different ratios of N/P

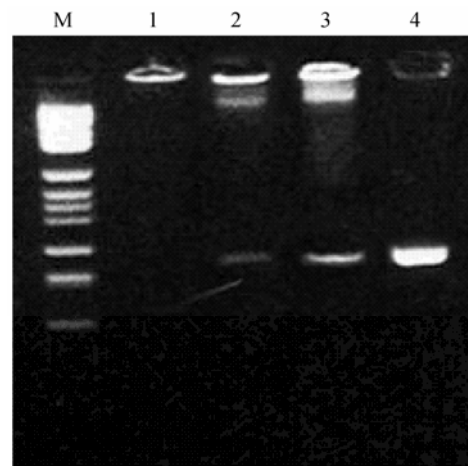
N/P	Particle size/nm	Zeta potential/mV
0.5	335 ± 13.3	-35.2 ± 5.1
1	224 ± 8.4	-21.5 ± 3.8
2.5	186 ± 3.7	-17.4 ± 3.2
5	145 ± 4.2	-10.8 ± 1.2
7.5	127 ± 2.6	3.1 ± 0.6
10	119 ± 2.4	11.2 ± 0.9
20	78 ± 3.1	16.8 ± 1.4

复合物的包封率用测定 siRNA 的试剂药盒 (RiboGreen 荧光染料法) 测定。当 N/P > 2.5 时, 接近 100% 的 siRNA 结合在复合物中, 表明该纳米复合物对 siRNA 有良好的包封率。

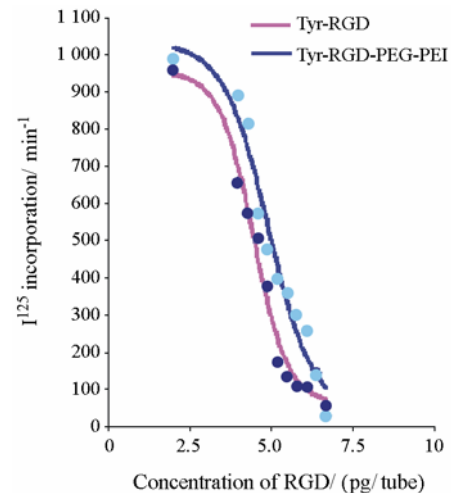
复合物的稳定性用琼脂糖凝胶电泳分析法测定 siRNA 的降解量。结果表明 Tyr-RGD-PEG-PEI 与 siRNA 反应得到的复合物在 37 °C 保温 30 min 后, 只有约 3% 的 siRNA 解离成为游离态, 复合物在血浆内状态稳定 (图 1)。

**1.2 体外细胞结合分析** 通过竞争性结合受体研究, 观察到不同量的 Tyr-RGD 或 Tyr-RGD-PEG-PEI 复合物可与一定量的 <sup>125</sup>I-Tyr-RGD 竞争性地与 HUVEC 细胞表面受体结合, 随着 Tyr-RGD 或 Tyr-RGD-PEG-PEI 量的增加, 更多的 <sup>125</sup>I-Tyr-RGD 被游离出来 (图 2), 表明 RGD 与受体的结合是可逆的, Tyr-RGD-PEG-PEI 纳米复合物具有与细胞上 RGD 受体竞争结合的生物活性。

**1.3 细胞毒性实验** 将纳米载体 Tyr-RGD-PEG-PEI 和 PEI 按不同质量浓度 10、20 和 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  作用于胰腺癌 PANC-1 细胞 24 h, CCK8 法测定并计算细胞存活率。结果与对照组比较, Tyr-RGD-PEG-PEI 未显示出明显的细胞毒性 ( $P > 0.05$ ); 而相同浓度的



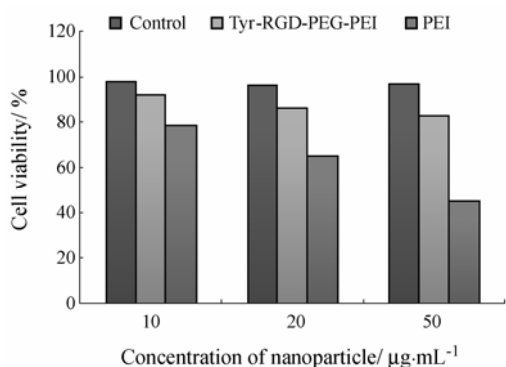
**Figure 1** Agarose gel electrophoresis of Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA incubation with serum for 0 min (lane 1), 30 min (lane 2) and 24 h (lane 3). Lane 4 is control (siRNA only). Lane M is RNA marker. Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA is very stable incubation with serum. Less than 5% was released after 24 h incubation



**Figure 2** The result of <sup>125</sup>I-Tyr-RGD and RGD competed to bind  $\alpha_v\beta_3$  on the membrane of HUVEC. Excessive Tyr-RGD and Tyr-RGD-PEG-PEI can both compete combination of HUVEC cell surface integrin receptors with <sup>125</sup>I-Tyr-RGD

PEI 有明显的细胞毒性, 3 种浓度的细胞存活率分别为 78.7% ± 7.2%, 65.3% ± 5.8%, 45.1% ± 3.2%, 与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (图 3)。

**1.4 Tyr-RGD-PEG-PEI 和 siRNA 复合物体内示踪结果** 荷瘤小鼠经尾静脉注射药物后 1 h 成像, 空白组无任何荧光, RGD-nano+drug1 和 RGD-nano+drug2 两组可见荧光集中分布在瘤体, 还有其他脏器如肝脏、胃及肾脏等。nano-drug1 组可见荧光分布较弥散, 除瘤体外, 肝脏、胃、肾脏及肺内均有大量荧光分布, 而 drug1 only 组荧光随血液全身分布 (图 4A)。



**Figure 3** Cytotoxicity of PEI or Tyr-RGD-PEG-PEI at various concentrations. Tyr-RGD-PEG-PEI did not exhibit significant cytotoxicity at any determined concentration while PEI showed very significant cytotoxicity at 20 and 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

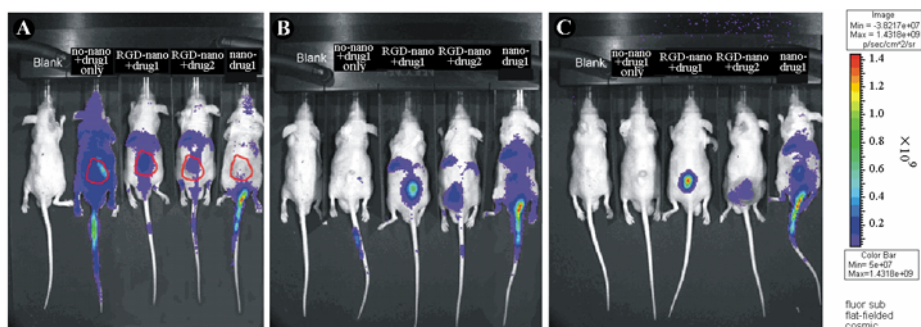
药物注射 24 h 可见空白组无任何荧光, drug1 only 组小鼠体内未见明显荧光分布, RGD-nano+drug1 和 RGD-nano+drug2 两组可见荧光集中分布在瘤体, 其他如肝脏、胃及肾脏等脏器也有荧光分布。nano-drug1 组可见荧光分布分散, 除瘤体外, 肝脏、胃、肾脏及肺内均有大量荧光分布 (图 4B)。

药物注射 48 h 可见空白组无任何荧光, drug1 only 组小鼠体内未见明显荧光分布, RGD-nano+drug1 和 RGD-nano+drug2 两组可见荧光集中分布在瘤体, 其他如肝脏、胃以及肾脏等脏器的荧光已消失, 提示 Tyr-RGD-PEG-PEI/siRNA 可高效地集中分布在瘤体内, 具有极好的靶向性。nano-drug1 组可见荧光分布分散, 除瘤体外, 肝脏、胃、肾脏及肺内均有大量荧光分布 (图 4C)。

### 讨论

针对血管内皮细胞的治疗已经成为肿瘤靶向治疗的一个关键靶点, 肿瘤靶向药物 Avastin<sup>[7]</sup> 和 cetuximab<sup>[8]</sup> 在包括肺癌和胃肠道肿瘤中发挥重要的作用, 甚至已成为某些肿瘤的一线治疗药物, 这些结果证明了抗肿瘤新生血管治疗的有效性, 而血管生长因子的 siRNA 在体外具有良好的分子靶向性和抗新生血管作用而受到重视, 但由于在体内该类药物的器官或组织的靶向性差, 分子结构不稳定而难以进入临床使用。设计一个具有良好靶向性的载体将药物特异性的导向肿瘤内的新生血管内皮细胞可明显提高该类药物靶向治疗的疗效。

目前常用的纳米载体主要是阳离子聚合物 PEI, 其正电荷的氨基基团与核酸带负电荷的磷酸基团通过静电吸附作用而发生电性中和, 形成稳定的纳米-核酸复合物, 表面电荷呈中性或弱阳性, 与表面带负电荷的细胞膜相互作用而进入细胞内, 具有较高的靶向和转染效率<sup>[8, 9]</sup>。但 PEI 本身具有相对较大的细胞毒性, 限制了其应用范围。PEG 修饰 PEI 可屏蔽其密度过高的正电荷, 从而降低其细胞毒性。PEG 修饰还可以减少巨噬细胞对复合物的吞噬, 延长纳米粒在体内的循环时间, 同时可减少载药纳米复合物对蛋白质及酶的吸附, 减少降解<sup>[10, 11]</sup>, 但 PEG 修饰后 PEI 与核酸形成的复合物的组织和器官靶向性不高, 不利于特定细胞摄取<sup>[12, 13]</sup>, 对 PEG-PEI 进行靶向性修饰可提高对特定细胞的靶向转染效率。研究表明 RGD 可以与活化的血管内皮和肿瘤细胞膜上  $\alpha_v\beta_3$



**Figure 4** Fluorescence imaging at 1 h, 24 h and 48 h after injection drug. A: 1 h after injection drug. Chart shows that the blank group without any fluorescence. Fluorescence of drug only group can be seen everywhere with the systemic blood distribution. Fluorescence of RGD-nano+drug1 and RGD-nano+drug2 groups mainly distribute in the tumor, also some in liver, stomach, kidneys and other organs. Nano-drug1 group can be seen scattered fluorescent distribution. B: 24 h after drug injection. Mice of drug only group have not any fluorescence detection at 24 h. Fluorescence of RGD-nano+drug1 and RGD-nano+drug2 groups focuses on the mass of tumor, and liver, stomach, nano-drug1 group shows that the distribution of fluorescence is still scattered, with the exception of the tumor, the liver, stomach, kidneys and lungs have a large number of fluorescent distribution. C: 48 h after drug injection, drug only group still has not any fluorescence detected. Fluorescence of RGD-nano+drug1 and RGD-nano+drug2 groups can be detected in the mass of tumor only, fluorescence can be detected in tumor, liver, lung and stomach in nano-drug1 group

特异结合, 肿瘤内的血管内皮细胞由于受高浓度的 VEGF 等细胞因子的刺激而处于活化状态, 身体其他部位的血管内皮细胞则基本处于非活化状态, 因此 RGD 具有很强的肿瘤特异靶向作用。环五肽 RGD 是在保留 RGD 特性的基础上增加了 Tyr-Lys 两个氨基酸并形成环肽, 该环肽可以更容易与 PEG 稳固连接。体外血管内皮细胞结合实验表明, 本实验制备的 Tyr-RGD-PEG-PEI 纳米载体 (直径约 145 nm), 可与 RGD 竞争结合内皮细胞膜上的  $\alpha_v\beta_3$ 。该纳米载体与 siRNA 同样有较强的结合效率, 当 N/P > 2.5 时, 接近 100% 的 siRNA 可被纳米复合物包封, 并且将该纳米复合物与血浆混合后置于室温下孵育 30 min 后, 测得其离解率不超过 3%。体外细胞毒性研究表明该纳米载体没有明显细胞毒性。

动物实验表明, Tyr-RGD 靶向的纳米载体 PEG-PEI 进入动物体内后, 主要分布在瘤体组织内, 而无 RGD 靶向的纳米载体 PEG-PEI 则除了分布在肿瘤组织内, 还广泛分布在肝脏、肺等脏器, 单纯使用药物组则在用药后被迅速从组织内清除, 24 h 后体内基本没有残留。

PEG 及 Tyr-RGD 修饰后的 PEI 纳米载体具有结构稳定、核酸药物包封率高、荷瘤动物体内使用安全性高、肿瘤靶向性高的特点, 有可能成为核酸药物及其他抗肿瘤药物靶向治疗的一个非常有前景的药物载体。

## References

- [1] Mook OR, Baas F, de Wissel MB, et al. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 833–843.
- [2] Zhang C, Newsome JT, Mewani R, et al. Systemic delivery and pre-clinical evaluation of nanoparticles containing antisense oligonucleotides and siRNAs [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 480: 65–83.
- [3] Zitzmann S, Ehemann V, Schwab M. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 5139–5143.
- [4] Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle [J]. *Nucl Acids Res*, 2004, 32: e149.
- [5] Decristoforo C, Faintuch-Linkowski B, Rey A. [<sup>99m</sup>Tc] HYNIC-RGD for imaging integrin alphavbeta3 expression [J]. *Nucl Med Biol*, 2006, 33: 945–952.
- [6] de Wolf HK, Snel CJ, Verbaan FJ, et al. Effect of cationic carriers on the pharmacokinetics and tumor localization of nucleic acids after intravenous administration [J]. *Int J Pharm*, 2007, 331: 167–175.
- [7] Golshayan AR, George S, Heng DY. Metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 235–241.
- [8] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1757–1765.
- [9] Zhu J, Tang A, Law LP, et al. Amphiphilic core-shell nanoparticles with poly (ethylenimine) shells as potential gene delivery carriers [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16: 139–146.
- [10] Neu M, Germershaus O, Behe M, et al. Bioreversibly crosslinked polyplexes of PEI and high molecular weight PEG show extended circulation times *in vivo* [J]. *J Control Release*, 2007, 124: 69–80.
- [11] Glodde M, Sirsi SR, Lutz GJ. Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 347–356.
- [12] Gharwan H, Wightman L, Kircheis R, et al. Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between cationic polymer PEI and naked DNA) [J]. *Gene Ther*, 2003, 10: 810–817.
- [13] Lee M, Kim SW. Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery [J]. *Pharm Res*, 2005, 22: 1–10.