

## 摘要

脑胶质母细胞瘤 (GBM) 是最具侵袭性的恶性脑肿瘤之一。尽管药物研发和临床技术不断进步, 但 GBM 患者预后较差, 中位生存期仅为 12-15 个月。近年来, 通过小干扰 RNA (siRNA) 进行 RNA 干扰策略已经被广泛用于 GBM 的治疗。与化疗药物相比, siRNA 具有高度特异性, 可以在信使 RNA (mRNA) 或蛋白质水平上特异性地调节目的基因来抑制肿瘤。然而, 游离的 siRNA 不仅容易在血液中被核酸酶降解, 而且无法穿过血脑屏障 (BBB) 以及较差的细胞摄取, 进而限制了其用于脑胶质瘤的治疗。脂质体、聚合物纳米粒子、无机纳米粒子等纳米载体系统已被用于在体内递送 siRNA, 尤其是脂质体已成为递送 siRNA 最重要的载体之一。脂质体可以保护被装载的 siRNA 免受核酸酶降解和肾脏清除, 并且具有低毒性、免疫原性以及良好的生物安全性和可降解性, 是一种非常理想的 siRNA 递送载体。但是脂质体也面临血脑屏障渗透低、靶向性差等问题, 往往导致治疗效果欠佳。因此构建一种能够穿越 BBB 并且递送 siRNA 靶向治疗 GBM 的脂质体至关重要。

基于此, 本课题构建了两性离子聚合物聚甲基丙烯酸酞氧乙基磷酰胆碱 (PMPC) 脂质体纳米递送系统, 用来递送 siRNA 高效穿越血脑屏障并精准靶向治疗脑胶质瘤。该两性离子脂质体 (PMPC-Lipo) 具备以下优势: (1) 它通过介导脑内皮细胞和脑胶质瘤细胞表面高表达的烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChRs) 和胆碱转运体 (ChTs) 来实现高效穿越 BBB, 并增强脂质体对 GBM 的靶向性; (2) 相较于常见的 PEG 脂质体, 它所具备的超亲水性两性离子外壳可以有效提高脂质体的免疫逃逸能力以及延长体内血液循环时间; (3) 它在工业化生产和临床转化方面潜力巨大。两性离子聚合物 PMPC 脂质体递送系统具有将多种核酸药物递送至脑部的潜力, 为脑部疾病治疗提供了一条新思路。

首先, 我们制备了两性离子聚合物 PMPC 修饰的阳离子脂质体 PMPC-Lipo 以及对照 POEG-Lipo、PEG-Lipo, 通过阳离子脂质 DOTAP 静电吸附带负电荷的 siRNA。通过动态光散射仪测得 PMPC-Lipo@siRNA 粒径为 112.6 nm, PDI 为 0.14, 粒径分散均一。透射电子显微镜拍摄图像显示 PMPC-Lipo@siRNA 为规则球形结构, 形貌均一。通过流式细胞仪测试和激光共聚焦显微镜拍摄成像验证纳米药物细胞内吞能力, 实验结果均证明 PMPC-Lipo@siRNA 与 POEG-Lipo@siRNA、PEG-Lipo@siRNA 相比具有较好的细胞

内吞效果，这是由于 PMPC 具有乙酰胆碱和胆碱类似的结构，进而可以与 U87MG 细胞上高表达 nAChRs 和 ChTs 特异性结合来介导内吞。通过细胞增殖实验和细胞凋亡实验均证明 PMPC-Lipo@siPLK1 对肿瘤细胞的杀伤能力最强，诱导细胞凋亡达 40.4%。

然后，我们验证了纳米脂质体药物在小鼠体内的药代动力学以及血液中 IgM 和 IgG 蛋白的水平。实验结果表明 PMPC-Lipo@siRNA 在体内的血液循环时间较长，IgM 和 IgG 水平与 PBS 组相当，低于 POEG-Lipo@siRNA 和 PEG-Lipo@siRNA 组，说明抗蛋白吸附能力强于聚乙二醇修饰的脂质体，能够提高 siRNA 在体内的稳定性，延长 siRNA 在体内的血液循环时间。然后我们考察了纳米脂质体药物在体内的靶向成像以及脑部肿瘤富集情况，PMPC-Lipo@siRNA 在原位 U87MG 荷瘤小鼠的脑部肿瘤区域富集能力高于其他组，这和荷瘤小鼠脑内皮细胞和脑胶质瘤细胞上高表达的 nAChRs 和 ChTs 密切相关。

最后，我们构建了 U87MG 胶质瘤和 CSC2 胶质瘤干细胞肿瘤模型验证两性离子脂质体药物的肿瘤抑制实验。实验结果表明 PMPC-Lipo@siPLK1 能够显著抑制肿瘤的生长，延长了肿瘤小鼠的生存时间。治疗结束后，解剖小鼠的主要器官制成石蜡切片并进行 H&E 染色，结果表明各器官组织并没有明显的病理变化，说明制备的纳米脂质体药物生物安全性较好。H&E 染色和 TUNEL 凋亡检测均证明 PMPC-Lipo@siPLK1 能高效靶向并诱导肿瘤细胞凋亡，显著抑制肿瘤的生长。最后，血常规和血生化实验检测的各项指标均证明制备的 PMPC-Lipo@siRNA 安全无毒，生物安全性良好。

综上所述，本课题成功制备了一种能够穿越 BBB 和靶向 GBM 的两性离子聚合物脂质体 (PMPC-Lipo)，用于高效精准地递送 siPLK1，从而实现了对脑胶质瘤安全有效的治疗。我们制备的脂质体通过 nAChRs 和 ChTs 介导跨细胞膜转运，由两性离子聚合物 PMPC 赋予穿越 BBB 能力，并且靶向进入肿瘤细胞。同时 PMPC-Lipo 具有良好的免疫逃逸能力和较长的血液循环特性，可以有效装载 siRNA，提高核酸药物在血液中的稳定性，从而更加高效地治疗脑胶质瘤。

**关键词：**两性离子聚合物，脂质体，siRNA，血脑屏障，脑胶质母细胞瘤

## ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is one of the most aggressive malignant brain tumors. Despite advances in drug development and clinical technology, the median survival time for GBM patients is only 12 to 15 months. In recent years, RNA interference strategies utilizing small interfering RNA (siRNA) have been extensively employed for the treatment of GBM. Compared with chemotherapy drugs, siRNA is highly selective and can specifically regulate target genes to suppress tumors at the messenger RNA (mRNA) or protein level. However, free siRNA is not only readily degraded by nucleases in the blood, but also incapable of crossing the blood-brain barrier (BBB) and has poor cellular uptake, limiting its use in GBM therapy. Various nanocarrier systems, including liposomes, polymeric nanoparticles and inorganic nanoparticles have been employed for siRNA delivery in vivo. Among these, liposomes have emerged as a prominent nanocarrier for siRNA delivery. More importantly, liposomes are a highly desirable vector for siRNA delivery due to their ability to protect loaded siRNA from nuclease degradation and kidney clearance. In addition, liposomes possess desirable characteristics such as low toxicity, immunogenicity, excellent biosafety and degradability rendering them as an optimal nanocarrier system. Besides all these advantages, liposomes face challenges of lower BBB penetration and poor targeting ability towards GBM, which often lead to poor therapeutic effect. Therefore, the construction of a liposomal vehicle capable of traversing the BBB and selectively delivering siRNA for the treatment of GBM is of highest priority.

To overcome the above challenges, this project constructed a zwitterionic-decorated liposomal system based on polymethylacryloxyethylphosphocholine (PMPC) polymer, which was used to deliver siRNA across BBB to precisely target GBM. The developed zwitterionic PMPC-modified liposome has the following advantages: (1) It can efficiently cross BBB via interaction with the highly expressed nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and choline transporters (ChTs) on the surface of brain endothelial or glioma cells and enhancing targeting capability of the liposomes towards GBM; (2) In comparison with conventional PEG-modified liposomes, its superhydrophilic zwitterionic corona can effectively enhance the immune evasion capacity of liposomes and extend the blood circulation span in vivo; (3) It has great potential for industrial production and clinical transformation. As an alternative to PEG-based liposomes, the zwitterionic PMPC-sheddable technology has the potential to deliver a variety of nucleic acid drugs to the brain, providing a new idea for the treatment of brain diseases.

Firstly, we prepared cationic zwitterionic PMPC-Lipo or control (POEG-Lipo and PEG-Lipo) liposomes that could readily adsorb negatively charged siRNA by the electrostatic interaction with cationic lipid DOTAP. The PMPC-Lipo@siRNA formulation exhibited a particle size of 112.6 nm (PDI=0.14) as determined by dynamic light scattering (DLS). Transmission electron microscopy (TEM) images show that PMPC-Lipo@siRNA has a regular spherical nanostructure morphology with uniform size distribution. Flow cytometry and confocal laser microscopy were used to verify the endocytosis ability of the liposomes. As expected, PMPC-Lipo@siRNA formulation exhibited superior endocytosis efficacy

compared to both POEG-Lipo@siRNA and PEG-Lipo@siRNA formulations. The structural similarity of PMPC with acetylcholine and choline facilitated their selective binding with U87MG cells that express high levels of nAChRs and ChTs, thus facilitating endocytosis. Both cellular proliferation and apoptosis experiments showed that PMPC-Lipo@siPLK1 had the strongest killing ability on tumor cells, inducing effective apoptosis up to 40.4%.

Secondly, we determined the pharmacokinetics of the liposomes in mice, as well as the levels of IgM and IgG proteins in the blood. The experimental results demonstrated that PMPC-Lipo@siRNA had a prolonged blood circulation time in vivo, while IgM and IgG levels were comparable to those of the PBS control. Unlike anti-PEG antibodies-induced immunogenicity, PMPC-modification avoided the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon, that potentially translated into their extended blood circulation time and improved therapeutic response. Next, the BBB-crossing property and tumor accumulation of the PMPC-modified formulation was evaluated through real-time colocalization of Cy5-labeled siRNA fluorescence and bioluminescence of U87MG-Luc tumor. PMPC-Lipo@siRNA showed highest tumor accumulation ability in orthotopic U87MG Luc bearing mice than other control groups, which further verified that the high expression of nAChRs and ChTs on brain endothelial and glioma cells facilitated their effective BBB-transversal and tumor targeting.

Finally, we constructed intracranial U87MG glioma and CSC2 glioma stem cell tumor models to verify the anti-GBM inhibitory effect of zwitterionic liposomal formulation. In both tumor-models, PMPC-Lipo@siPLK1 significantly inhibited tumor growth and prolonged the survival of mice with tumors. Following treatment, the major organs of mice were dissected into paraffin sections and stained with H&E. The results showed that there were no significant pathological changes in each tissue, indicating that the prepared nanoliposomal drugs had good biological safety in vivo. H&E staining and TUNEL apoptosis detection demonstrated that PMPC-Lipo@siPLK1 can effectively target and induce tumor cellular apoptosis, that led to significant retardation of tumor growth. Finally, the indexes of blood routine and blood biochemical tests proved that the prepared PMPC-Lipo@siRNA was safe, non-toxic and exhibited good biological safety.

In conclusion, this study successfully prepared zwitterionic PMPC-modified liposome (PMPC-Lipo) that enhances BBB traversal and GBM targeting for efficient and accurate delivery of siPLK1, thereby achieving a safe and effective glioma treatment. In the meantime, PMPC-Lipo has excellent immune evasion and longer blood circulation properties, and it can effectively load siRNA with enhanced stability, allowing for more effective glioma treatment.

**KEY WORDS:** Zwitterionic polymer, liposomes, siRNA, blood-brain barrier, glioblastoma

# 目 录

摘 要.....	I
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>III</b>
目 录.....	V
1 绪 论.....	1
1.1 脑胶质瘤.....	1
1.2 血脑屏障和血脑肿瘤屏障.....	1
1.3 siRNA 作用机制及 siRNA 递送障碍.....	3
1.3.1 siRNA 作用机制.....	3
1.3.2 siRNA 递送障碍.....	4
1.4 递送 siRNA 的纳米载体系统.....	5
1.4.1 基于脂质的纳米颗粒.....	7
1.4.2 基于聚合物的纳米颗粒.....	7
1.4.3 无机纳米颗粒.....	8
1.5 两性离子聚合物及其应用.....	8
1.6 两性离子聚合物 PMPC.....	10
1.7 课题设计.....	10
2 两性离子聚合物的合成和表征.....	13
2.1 实验试剂和仪器.....	13
2.1.1 实验试剂.....	13
2.1.2 实验仪器.....	13
2.2 实验方法.....	14
2.2.1 PMPC-CPADN 的合成.....	14
2.2.2 DSPE- PMPC 的合成.....	14
2.2.3 POEG-CPADN 和 DSPE- POEG 的合成.....	15
2.3 结果与讨论.....	16

2.3.1	PMPC-CPADN 的核磁氢谱表征 .....	16
2.3.2	DSPE-PMPC 的核磁氢谱表征 .....	17
2.3.3	POEG-CPADN 和 DSPE-POEG 的核磁氢谱表征 .....	18
2.4	本章小结 .....	19
3	两性离子脂质体纳米药物的制备和表征 .....	21
3.1	实验试剂和仪器 .....	21
3.1.1	实验试剂 .....	21
3.1.2	实验仪器 .....	21
3.2	实验方法 .....	22
3.2.1	两性离子脂质体纳米药物的制备 .....	22
3.2.2	两性离子脂质体纳米药物的表征 .....	22
3.3	结果与讨论 .....	22
3.3.1	两性离子脂质体纳米药物的粒径和形貌 .....	22
3.3.2	两性离子脂质体装载 siRNA 的能力 .....	23
3.3.3	两性离子脂质体纳米药物的稳定性 .....	24
3.4	本章小结 .....	24
4	细胞水平考察两性离子脂质体纳米药物 .....	27
4.1	实验试剂和仪器 .....	27
4.1.1	实验试剂 .....	27
4.1.2	实验仪器 .....	27
4.2	实验方法 .....	28
4.2.1	细胞培养 .....	28
4.2.2	细胞内吞实验 .....	28
4.2.3	细胞毒性实验 .....	29
4.2.4	细胞凋亡实验 .....	29
4.2.5	体外 BBB 穿透实验 .....	29
4.2.6	体外 3D 肿瘤球穿透实验 .....	30
4.2.7	体外基因沉默实验 .....	30

4.3 结果与讨论 .....	30
4.3.1 纳米药物的细胞内吞效果 .....	30
4.3.2 纳米药物对 U87MG 细胞的增殖抑制能力 .....	31
4.3.3 纳米药物对 U87MG 细胞的凋亡诱导情况 .....	32
4.3.4 纳米药物的体外 BBB 穿透效率 .....	33
4.3.5 纳米药物对 U87MG 肿瘤球的穿透效果 .....	34
4.3.6 纳米药物的体外基因沉默效果 .....	35
4.4 本章小结 .....	35
5 递送 siRNA 治疗原位 U87MG 胶质瘤荷瘤小鼠 .....	37
5.1 实验试剂和仪器 .....	37
5.1.1 实验试剂 .....	37
5.1.2 实验仪器 .....	37
5.2 实验方法 .....	37
5.2.1 动物模型 .....	37
5.2.2 血液中 IgM 和 IgG 蛋白的测定 .....	37
5.2.3 药代动力学实验 .....	38
5.2.4 体内靶向能力验证实验 .....	38
5.2.5 体内基因沉默实验 .....	39
5.2.6 原位 U87MG 荷瘤裸鼠肿瘤抑制实验 .....	39
5.2.7 H&E 染色和 TUNEL 凋亡检测 .....	40
5.2.8 生物安全性实验 .....	40
5.3 结果与讨论 .....	40
5.3.1 血液中 IgM 和 IgG 蛋白的测定分析 .....	40
5.3.2 药代动力学分析 .....	41
5.3.3 体内靶向性分析 .....	42
5.3.4 体内基因沉默效果分析 .....	43
5.3.5 原位 U87MG 荷瘤裸鼠的肿瘤抑制情况 .....	44
5.3.6 H&E 染色和 TUNEL 凋亡检测分析 .....	46
5.3.7 生物安全性分析 .....	47

5.4 本章小结 .....	47
6 递送 siRNA 治疗原位 CSC2 胶质瘤干细胞荷瘤小鼠 .....	49
6.1 实验试剂和仪器 .....	49
6.1.1 实验试剂 .....	49
6.1.2 实验仪器 .....	49
6.2 实验方法 .....	49
6.2.1 原位 CSC2 胶质瘤干细胞荷瘤裸鼠肿瘤抑制实验 .....	49
6.2.2 H&E 染色和 TUNEL 凋亡检测 .....	50
6.3 结果与讨论 .....	50
6.3.1 原位 CSC2 胶质瘤干细胞荷瘤裸鼠的肿瘤抑制情况 .....	50
6.3.2 H&E 染色和 TUNEL 凋亡检测分析 .....	51
6.4 本章小结 .....	52
7 总结与展望 .....	53
7.1 总结 .....	53
7.2 未来展望 .....	55
缩略语表 .....	57
参考文献 .....	59
致 谢 .....	67
攻读学位期间发表的学术论文目录 .....	69



# 1 绪论

## 1.1 脑胶质瘤

脑胶质瘤 (Glioblastoma, GBM) 是最为常见的原发性恶性脑肿瘤, 预后效果差, 复发率高<sup>[1]</sup>。据统计脑胶质瘤患者平均中位生存期为 12-15 个月, 5 年生存率小于 5%, 这大大降低患者的寿命<sup>[2]</sup>。目前针对脑胶质瘤患者最常用的治疗方法包括手术切除联合放疗或化疗<sup>[3, 4]</sup>。由于脑胶质瘤细胞的高度浸润性和侵袭性, 传统的手术切除并不能完全抑制脑胶质瘤的复发。脑胶质瘤的化疗通常受到治疗药物在血脑屏障 (BBB) 和血脑肿瘤屏障 (BBTB) 上的低通透性的阻碍<sup>[5]</sup>。由于血脑屏障及血脑肿瘤屏障的存在, 导致一些药物不能在脑胶质瘤内有效富集, 最终导致治疗效果不佳, 限制了很多药物在脑胶质瘤的临床应用<sup>[6]</sup>。近年来, 利用智能纳米载体装载各种治疗药物可以有效穿越血脑屏障 (BBB) 和血脑肿瘤屏障 (BBTB), 促进治疗药物在脑胶质瘤的富集, 提高对肿瘤的治疗效果<sup>[7-11]</sup>。主动靶向型纳米载药系统通常利用特异性配体提高靶向治疗效果, 同时构建具备合适理化性质的靶向纳米载体递送系统可以逃避肾脏或网状内皮系统的清除, 并且可以通过 EPR 效应积累在肿瘤区域。通常将纳米载体表面修饰肿瘤靶向配体可以与肿瘤细胞表面高表达的受体特异性结合, 进而介导纳米药物高效进入细胞。随着纳米技术的进步, 利用纳米载体进行药物靶向递送已成为癌症诊断和治疗的有前途的替代工具<sup>[12-16]</sup>。

## 1.2 血脑屏障和血脑肿瘤屏障

血脑屏障 (BBB) 由神经元、神经胶质细胞 (包括星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞)、血管细胞 (脑微血管内皮细胞 (BMEC)、周细胞和平滑肌细胞 (SMC)) 和脑特异性细胞外基质 (ECM) 组成。BMEC 排列在大脑的毛细血管上, 与周细胞形成密集排列的紧密连接, 并形成大脑独特的屏障结构, 即血脑屏障 (BBB) <sup>[17]</sup>。BBB 是一个复杂的网络, 对大脑功能的正常运行至关重要, 它阻止大多数外来物质经血液运输流入大脑, 以保持相对稳定的大脑内环境<sup>[18, 19]</sup>。周细胞包裹在脑毛细血管周围, 毛细血管负责通过收缩和松弛来调节脑毛细血管中的血液流动。星形胶质细胞在大脑代谢中具有重要功能, 允许细胞与 BBB 周围的神经元相互作用。脑微血管内皮细胞是 BBB 的主

要结构，严格控制约 98% 的小分子物质和几乎 100% 的大分子（如肽和蛋白质）向大脑中的扩散<sup>[20, 21]</sup>。

血脑肿瘤屏障（BBTB）由新生血管构成，与血脑屏障不同。高级别胶质瘤由增强的新生血管和血管内皮生长因子组成，以满足加速代谢的需求。这导致血管和血脑肿瘤屏障的形成并发生了功能改变，损害了血脑屏障的完整性。BBTB 存在于脑肿瘤组织和毛细血管之间，阻碍了治疗药物有效递送到肿瘤中<sup>[22, 23]</sup>。

BBB 和 BBTB 成为脑肿瘤治疗药物递送的主要障碍。因此，开发一种具有功能靶向肿瘤的新型药物递送系统，能够高效穿越 BBB 和 BBTB 具有重要意义<sup>[9, 10, 24-29]</sup>。近年来，用于递送治疗药物的纳米粒子（Nanoparticles, NPs）在生物医学领域越来越受到关注，被认为是药物开发的有前途的工具。目前构建开发的各种纳米粒子，如脂质体、聚合物纳米粒子、树枝状聚合物、环糊精、二氧化硅纳米粒子、磁性纳米粒子、金纳米粒子、量子点和碳纳米管等已成为递送药物穿越血脑屏障并靶向治疗脑胶质瘤和神经退行性疾病的常用载体<sup>[30-37]</sup>。纳米载体递送系统对大脑递送的适用性取决于纳米尺寸、表面电荷、形貌等理化性质。纳米粒子的物理表征参数，包括纳米粒子的大小、Zeta 电位和载药量，对其体内循环和靶向递送影响甚大，并最终影响纳米药物的有效性和安全性<sup>[38, 39]</sup>。此外，应保证纳米载体是生物相容性和可生物降解的，以便可以最大限度地减少体内毒性<sup>[40-44]</sup>。同时，构建合适的靶向纳米载体系统可以减少治疗药物在体内的非特异性分布进而降低不良副作用，增加大脑中病灶部位的药物浓度，从而提高治疗效果。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/618073056040007006>