

叶酸靶向 anti-miR-221 阴离子脂质体的制备及体外抗肿瘤作用[△]

张文典^{1*}, 崔杰², 夏一帆², 段少峰^{2#}[1.广东省人民医院(广东省医学科学院)药学部, 广州 510080; 2.河南大学药学院, 河南开封 475001]

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)07-0813-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.07.08



摘要 目的 基于阴离子脂质体制备一种叶酸靶向 miR-221 反义寡核苷酸(anti-miR-221)递送系统,并初步评价其体外抗肿瘤效果。方法 采用薄膜分散水化法制备叶酸靶向 anti-miR-221 脂质体(FRL),测定其粒径、Zeta 电位和包封率。以钙黄绿素为模型药物,通过体外细胞摄取实验观察所制叶酸靶向阴离子脂质体在人肝癌 HepG2 细胞中的靶向递送效果。利用流式细胞术检测 FRL 对 HepG2 细胞凋亡和周期的影响。结果 所制 FRL 的粒径为 (172.70 ± 3.76) nm, Zeta 电位为 (-1.16 ± 0.15) mV, 包封率为 $(83.53 \pm 1.85)\%$ 。体外细胞摄取实验结果显示,叶酸靶向阴离子脂质体成功将模型药物钙黄绿素递送至 HepG2 细胞中,且递送效率高于普通非靶向脂质体($P < 0.01$)。细胞凋亡检测结果显示, FRL 作用后细胞的凋亡率显著高于普通非靶向脂质体作用后的细胞($P < 0.01$)。细胞周期检测结果显示, FRL 可使细胞的 S 期缩短,并将细胞阻滞于 G₀/G₁、G₂/M 期。结论 FRL 可以较好地包封 anti-miR-221, 并成功将其递送至肝癌 HepG2 细胞中,而且在诱导细胞凋亡和细胞周期调控方面呈现出良好的体外抗肝癌效果。**关键词** miR-221 反义寡核苷酸; 叶酸; 阴离子脂质体; 肝癌; 靶向; 纳米给药系统

Preparation of folate-targeted anti-miR-221 anionic liposome and its *in vitro* anti-hepatocellular carcinoma effect

ZHANG Wendian¹, CUI Jie², XIA Yifan², DUAN Shaofeng²[1. Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangzhou 510080, China; 2. School of Pharmacy, Henan University, Henan Kaifeng 475001, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare folate-targeted miR-221 antisense oligonucleotide (anti-miR-221) delivery system, and to preliminarily evaluate its *in vitro* anti-cancer effect on hepatocellular carcinoma. **METHODS** Folate-targeted anti-miR-221 liposomes (FRL) were prepared by thin-film dispersion method; the particle size, Zeta potential and encapsulation efficiency were determined. The delivery efficiency of folate-targeted anionic liposome in human hepatoma HepG2 cells was determined by *in vitro* cellular uptake experiment using calcein as the model drug. Flow cytometry was used to detect the effects of FRL on the apoptosis and cell cycle of HepG2 cells. **RESULTS** The particle size of prepared FRL was (172.70 ± 3.76) nm, Zeta potential was (-1.16 ± 0.15) mV and encapsulation efficiency was $(83.53 \pm 1.85)\%$. *In vitro* cellular uptake experiments showed that folate-targeted anionic liposome successfully delivered calcein to HepG2 cells, and the delivery efficiency in targeted group was higher than that of non-targeted liposome group ($P < 0.01$). Apoptosis experiment results showed that the apoptotic rate of HepG2 cells treated with FRL was significantly higher than that of non-targeted liposome ($P < 0.01$). In cell cycle experiment, FRL could shorten the S phase fraction of HepG2 cells and induced arrest in the G₀/G₁ and G₂/M phases. **CONCLUSIONS** FRL can encapsulate anti-miR-221 well and deliver it to hepatocellular carcinoma HepG2 cells successfully, and has a good *in vitro* anti-hepatoma effect in inducing apoptosis and cell cycle regulation.

KEYWORDS miR-221 antisense oligonucleotide; folate; anionic liposome; hepatocellular carcinoma; targeted; nanoparticle delivery system

在中国,肝癌新发和死亡人数均占全球该疾病患者的 50% 以上,给中国社会和医疗体系带来了沉重的负担;且肝癌隐匿性强,超 70% 肝癌患者确诊时已处于晚

[△] 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(No.2018020306);开封市科技发展计划项目(No.1903024)

* 主管药师,硕士。研究方向:靶向纳米给药系统。E-mail: zhangwendian@gdph.org.cn

通信作者:教授,博士。研究方向:新材料与新型给药系统。E-mail: sduan@henu.edu.cn

期^[1]。目前,被批准用于晚期肝癌的一线治疗药物仅有索拉非尼和仑伐替尼 2 种,且其不良反应和耐药现象常有报道,通常患者用药数月后会出现肝癌的复发和进展,治疗后生存率和预后较差^[2]。因此,探索新的治疗药物和治疗策略仍为肝癌治疗的迫切问题。

基因调控理论的发展为癌症等严重疾病的治疗提供了新思路。microRNA(后文简称“miRNA”)是一类由 20~24 个核苷酸组成的内源性单链小 RNA 分子,可通

过阻断翻译和(或)降解 mRNA 来调节靶基因表达,并参与各种生物学过程(如细胞增殖、凋亡、分化、代谢和肿瘤转移)^[3-5]。miR-221 作为 miRNA 的一种,在肝癌细胞中过度表达,并与肝硬化、肿瘤分期以及肝癌患者预后有关^[6-7]。随着对 miRNA 的深入研究,miRNA 在肿瘤靶向治疗领域的应用潜力逐渐受到关注。然而,开发基于 miRNA 的治疗方法面临许多挑战,包括避免体循环中的过早降解、实现足够的细胞摄取、增强组织特异性递送、最小化全身毒性和脱靶效应等^[8-9]。化学修饰为提高 miRNA 药物的稳定性提供了一些解决方案,例如引入磷酸二酯键、硫代磷酸等^[10]。此外,由于 RNA 具有较高的负电荷和分子量,细胞膜屏障是 RNA 递送的另一个障碍,而纳米药物递送系统(如脂质体相关制剂)可改善 RNA 的细胞递送^[8]。

脂质体作为经典的纳米药物释放系统,具有亲和性好、安全性高等特点^[11]。与 RNA 递送中常用的阳离子载体不同,阴离子脂质体的免疫原性较低,但在递送效率方面存在劣势^[8]。对此,可通过对阴离子脂质体进行化学修饰,在其结构中引入靶向配体,从而实现其特异性靶向递送功能,提高其递送效率。叶酸是一种可被用作靶向配体的维生素,对叶酸受体过度表达的癌细胞具有较好的亲和性^[12]。叶酸受体 α 可内化亲水的叶酸结合分子及其他叶酸分子修饰的纳米粒,而叶酸受体再循环使得叶酸受体靶向底物的持续累积成为可能,也使其成为将叶酸标记的载体递送到肿瘤细胞的理想靶点^[12-14]。

本研究拟制备一种阴离子脂质体,用于递送 RNA 药物,以增强 RNA 药物的入胞效率和药物疗效。根据前期实验,本研究选择化学修饰的 miR-221 反义寡核苷酸(anti-miR-221)作为治疗药物模型,anti-miR-221 可以降低 miR-221 的表达,是一种潜在的肝癌肿瘤抑制因子^[15]。在前期实验中,本课题组合成了叶酸-聚乙二醇 4000-胆固醇琥珀酸单酯(folate-polyethylene glycol 4000-cholesteryl hemisuccinate, Folate-PEG₄₀₀₀-CHEMS)^[16],该化合物为两亲性叶酸偶联物。为了提高阴离子脂质体的转染效率,本研究将 Folate-PEG₄₀₀₀-CHEMS 应用于叶酸靶向 anti-miR-221 脂质体(folate-targeted anti-miR-221 liposome, FRL)的制备中,并利用流式细胞术考察 FRL 对人肝癌 HepG2 细胞凋亡及周期的影响,从而为该叶酸靶向阴离子脂质体在抗肝癌治疗中的应用提供实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括 ZEN3690 型激光粒度仪(英国 Malvern 公司),CytoFLEX 型流式细胞仪[贝克曼库尔特生物科技(苏州)有限公司],Ziss 880 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Carl Zeiss AG 公司),UV-2000 型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司],EnSpire 型全波长扫描式多功能读数仪[珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

Folate-PEG₄₀₀₀-CHEMS 由本课题组自制(批号 20200811,叶酸、PEG₄₀₀₀、CHEMS 物质的量之比为 1:5:5);细胞周期检测试剂盒(批号 C1052)购自上海碧云天生物技术有限公司;YF[®]488-Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(批号 HY0701)购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司;钙黄绿素(批号 ATX189,分析纯)购自上海毕得医药科技股份有限公司;胆固醇(批号 EB12BA0036,纯度 \geq 95%)购自 BBI 生命科学有限公司;氢化大豆磷脂(hydrogenated soybean phosphatidylcholine, HSPC)、1,2-二硬脂酰甘油磷脂酰乙醇胺-N-甲氧基聚乙二醇 2000(DSPE-mPEG₂₀₀₀)均购自上海艾韦特医药科技有限公司;琼脂糖凝胶 CL-4B 购自上海源叶生物科技有限公司;RPMI 1640 培养基购自德国 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;其余试剂均为市售分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞购自南京科佰生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 anti-miR-221 的合成

anti-miR-221(碱基序列为 5'-GAAACCCAGA-CAGACAAUGUAGCU-3')委托广州锐博生物技术有限公司合成,并在此核苷酸序列上进行化学修饰:在 5' 位进行 5-羧基荧光素(5-carboxyfluorescein, FAM)荧光标记,在 3' 位进行胆固醇修饰,在 5' 端的 3 个核苷酸间与 3' 端的 3 个核苷酸间进行硫代磷酸酯键修饰,在 2' 位进行甲氧基修饰。

2.2 脂质体的制备

采用薄膜分散水化法制备脂质体^[16]。精密称取氢化大豆卵磷脂、胆固醇、DSPE-mPEG₂₀₀₀、Folate-PEG₄₀₀₀-CHEMS(物质的量之比为 55:4.5:35:0.5)于茄形瓶中,加入适量三氯甲烷溶解后,置于 37 °C 水浴下减压旋蒸 1 h,形成均匀的脂质薄膜;加入 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)和 anti-miR-221(20 mmol/L)160 μ L,60 °C 水化孵育 30 min;水化完的液体样品分别用 450、220 nm 微孔滤膜整粒,各 5 次;然后以 PBS 为洗脱剂,经 CL-4B 琼脂糖凝胶柱分离纯化,即得 FRL。非靶向 anti-miR-221 脂质体(non targeted anti-miR-221 liposome, RL)的制备方法同上,处方不含 Folate-PEG₄₀₀₀-CHEMS。叶酸靶向钙黄绿素脂质体(folate-targeted calcein liposome, FCL)及非靶向钙黄绿素脂质体(non targeted calcein liposome, CL)的制备方法同上,处方以钙黄绿素水溶液替代 anti-miR-221 水溶液(用于细胞摄取实验)。

2.3 2 种叶酸脂质体的表征

2.3.1 粒径和 Zeta 电位 取适量 FRL 和 RL,以适量 PBS(pH7.4)稀释后,利用激光粒度仪测定脂质体的粒径和 Zeta 电位。采用 GraphPad Prism 5 软件对实验数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组间比较采用 *t* 检验,

检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果显示,FRL的平均粒径和Zeta电位分别为 (172.70 ± 3.76) nm和 (-1.16 ± 0.15) mV,RL的平均粒径和Zeta电位分别为 (169.10 ± 4.15) nm和 (-1.42 ± 0.18) mV,2种叶酸脂质体间粒径和Zeta电位差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.2 包封率 参考文献[17-18]方法并加以调整后测定。取5 nmol anti-miR-221溶于250 μ L水中,配成20 μ mol/L的水溶液,作为母液。取母液分别制备成1.0、0.8、0.5、0.4、0.25 μ mol/L 5个浓度的水溶液,利用全波长扫描式多功能读数仪在激发波长493 nm、发射波长518 nm条件下检测其荧光强度。以anti-miR-221浓度(x)为横坐标、荧光强度(y)为纵坐标作图(图1),并拟合得到线性回归方程 $y=168\ 676x-2\ 472.1$ ($R^2=0.999\ 6$)。结果显示,anti-miR-221在上述检测浓度范围内,与其荧光强度呈现出良好的线性关系。

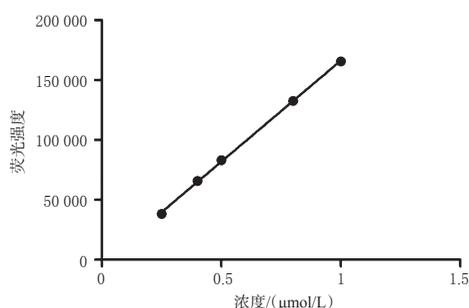


图1 anti-miR-221的标准曲线

分别取FRL、RL,加入适量10% Triton X-100,超声(功率480 W、频率40 kHz)振荡2 min破膜,根据前文绘制的标准曲线,测定并计算FRL、RL中anti-miR-221含量,并计算其包封率:包封率($\%$)=脂质体中anti-miR-221含量/总投料量 $\times 100\%$ 。按照“2.3.1”项下方法进行统计分析。结果显示,FRL、RL中anti-miR-221的包封率分别为 $(83.53 \pm 1.85)\%$ 、 $(85.23 \pm 2.43)\%$,两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

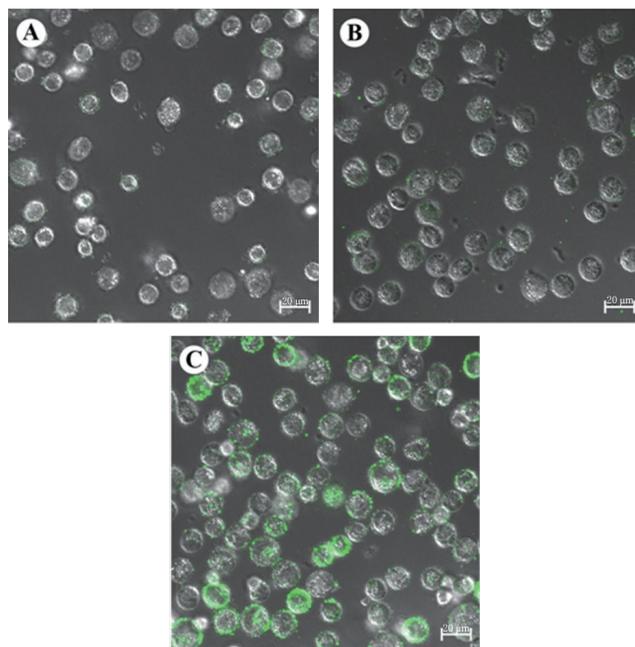
2.4 细胞培养

将HepG2细胞接种至含有1%青霉素-链霉素和10%胎牛血清的无叶酸RPMI 1640培养基中,将培养基置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养。本研究所用的为传代5~10代的细胞。

2.5 细胞摄取实验

将处于对数生长期的HepG2细胞按每孔 5×10^5 个接种于6孔板中,将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜。分别设置空白对照组、CL组、FCL组,每组设置3个复孔。空白对照组给予培养基常规培养,加药组分别按钙黄绿素(模型药物)每孔14 μ g/mL的质量浓度加入CL、FCL,在37 $^{\circ}$ C培养1 h,然后将细胞转移至1.5 mL EP管中,以PBS清洗3遍后,置于激光共聚焦扫描显微镜下观察(图2)。经Image J 1.52a软件分析,得各组HepG2细胞的荧光强度。采用GraphPad Prism 5软件对实验数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组

之间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Turkey检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果,FCL组细胞的绿色荧光强度 (134.89 ± 17.61) 显著高于CL组 (22.30 ± 10.62) 和空白对照组 (15.34 ± 4.39) ($P<0.01$),表明细胞对FCL的摄取量显著高于CL。该结果提示,所制叶酸靶向阴离子脂质体可以有效地将药物递送到HepG2细胞内。



A: 空白对照组;B: CL组;C: FCL组

图2 钙黄绿素脂质体在HepG2细胞中摄取情况的荧光显微图

2.6 细胞凋亡检测

采用Annexin V/PI双染色法检测细胞凋亡情况。将对数生长期的HepG2细胞按每孔 8×10^5 个接种于6孔板中,将细胞置于培养箱中常规培养过夜。分别设置空白对照组、RL组、FRL组。空白对照组给予培养基常规培养,加药组按anti-miR-221每孔200 nmol/L的浓度加入RL、FRL,在37 $^{\circ}$ C下培养24 h后,将细胞常规消化并转移至EP管中,以PBS洗涤细胞3遍后,按YF[®]488-Annexin V/PI试剂盒方法操作,采用流式细胞仪分析HepG2细胞的凋亡情况(图3)。按“2.5”项下方法进行统计分析。结果,与空白对照组 $[(13.34 \pm 1.46)\%]$ 比较,RL组和FRL组细胞的凋亡率[分别为 $(19.09 \pm 3.28)\%$ 、 $(33.08 \pm 2.90)\%$]均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且FRL组细胞的凋亡率显著高于RL组($P<0.01$)。

2.7 细胞周期检测

将处于对数生长期的HepG2细胞按每孔 8×10^5 个接种于6孔板中,置于培养箱中常规培养过夜。分别设置空白对照组、RL组、FRL组,每组设置3个复孔。空白对照组给予培养基常规培养,加药组按anti-miR-221每孔200 nmol/L的浓度加入RL、FRL,培养24 h后,将细胞进

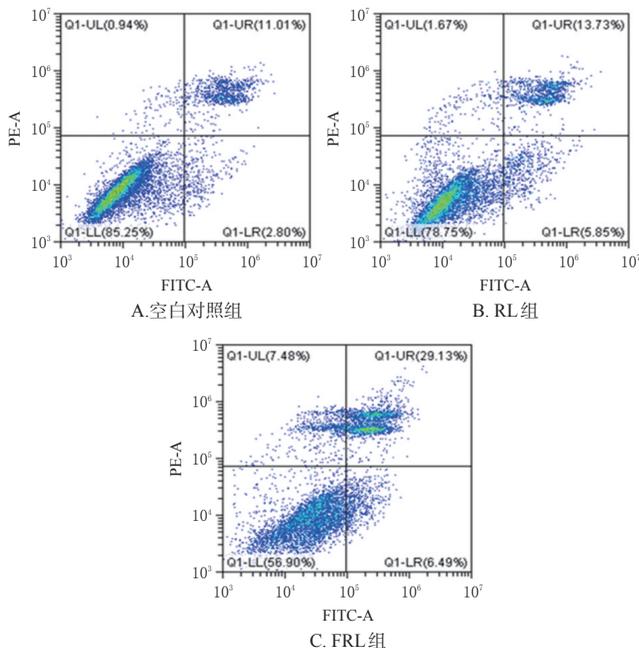


图3 各组细胞凋亡检测的流式细胞图

行常规消化并转移至EP管中,用PBS洗涤细胞3遍。用70%乙醇溶液固定细胞,4℃保存过夜,染色前用PBS洗去固定液,加50 μL的RNase A,37℃水浴30 min,再加200 μL PI染色液,4℃避光孵育30 min,采用流式细胞仪进行细胞周期检测(图4)。按“2.5”项下方法进行统计分析。结果,与空白对照组比较,FRL组G₀/G₁期细胞的比例、RL组和FRL组G₂/M期细胞的比例均显著升高($P < 0.01$),RL组和FRL组S期细胞的比例均显著降低($P < 0.01$);与RL组比较,FRL组G₀/G₁期细胞的比例显著升高($P < 0.01$),S期细胞的比例显著降低($P < 0.05$)。各组细胞的周期检测结果见表1。

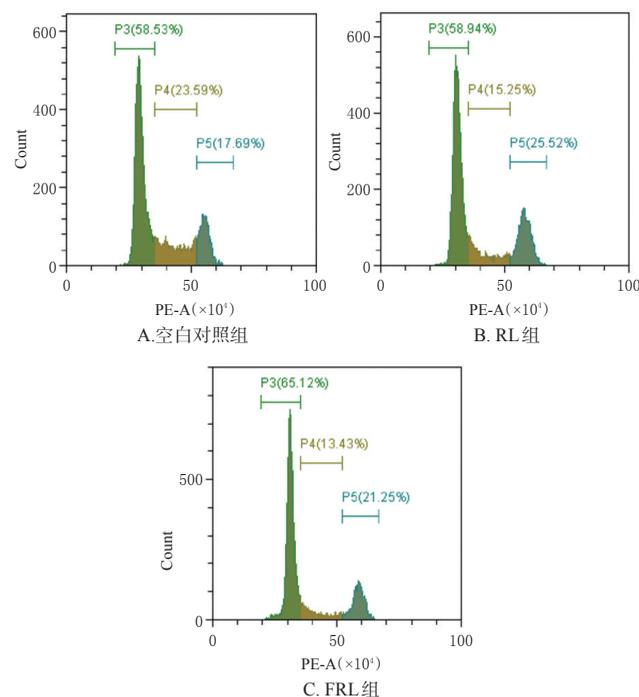


图4 各组细胞周期检测的流式细胞图

表1 各组细胞的周期占比检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白对照组	59.52 ± 0.88	23.19 ± 1.37	16.77 ± 1.00
RL组	61.16 ± 1.98	14.12 ± 1.32 ^a	24.02 ± 1.34 ^a
FRL组	67.41 ± 2.32 ^{ac}	12.12 ± 1.94 ^{ab}	19.97 ± 1.12 ^{ac}

a:与空白对照组比较, $P < 0.01$;b:与RL组比较, $P < 0.05$;c:与RL组比较, $P < 0.01$

3 讨论

随着癌症机制研究的拓展,RNA药物成为了应对肿瘤治疗困境的一个新思路。miRNA参与调节1/3功能基因组的表达,是机体生物机制中的重要“齿轮”,且在肿瘤发生发展和转归中表现出重要作用^[19]。miR-221在肝癌细胞中表达水平异常升高,可作为肝癌治疗的潜在作用靶点^[4,7]。靶向脂质体制剂有助于解决RNA药物的应用限制,2018年,全球第一款RNA药物以脂质体制剂的形式上市,其临床应用前景诱人^[20]。

本研究基于阴离子脂质体制备了一种包载了anti-miR-221的叶酸靶向递送系统。由于天然miRNA化学骨架结构上的磷酸基团使其呈现微弱负电荷,导致其难以通过细胞膜,也难以被包封至阴离子脂质体中,限制了其应用^[8]。本研究采用薄膜分散水化法制备脂质体,使anti-miR-221的包封率高达(83.53 ± 1.85)% ,这得益于在anti-miR-221结构上进行的胆固醇修饰。脂质体是由脂质双层膜形成的磷脂囊泡,该囊泡具有独立的亲水相和亲脂相空间,亲水性药物可以包裹在内水相中,而疏水性药物可以包裹在脂质层中。胆固醇修饰增加了该寡核苷酸链的亲脂性,使其更易融入脂质体的脂质层中,从而增加了脂质体对anti-miR-221的包封率。本研究所制FRL的粒径为(172.70 ± 3.76) nm,并带有微弱的负电荷。本研究中所用辅料氢化大豆卵磷脂、胆固醇、DSPE-mPEG₂₀₀₀占总处方量的99.5%,这3种辅料已被美国FDA批准应用于上市脂质体制剂(如DOXIL)的制备^[21],其生物安全性已经得到了认可。在前期研究中,本课题组将叶酸通过线性亲水性PEG结构与胆固醇琥珀酸单酯偶联,合成了Folate-PEG₄₀₀₀-CHEMS,该两亲性高分子材料中的亲脂性类固醇结构能够融入脂质体的脂质层,从而完成脂质体表面的叶酸化学修饰,该化学修饰赋予了脂质体靶向功能^[16]。为了实现靶向递送,增加靶细胞中药物富集效果,本研究在脂质体的制备中加入了Folate-PEG₄₀₀₀-CHEMS。

HepG2细胞是肝癌研究中常用的细胞之一,该细胞内miR-221异常高表达^[7,22]。本研究以钙黄绿素为模型药物,通过体外细胞摄取实验证实了所制叶酸靶向阴离子脂质体对HepG2细胞具有靶向性。在细胞凋亡实验中,FRL组细胞的凋亡率相较于RL组显著升高,提示FRL可以诱导更多HepG2细胞进入凋亡状态。细胞周期实验结果显示,FRL可以使HepG2细胞S期缩短,且使更多细胞被阻滞于G₀/G₁、G₂/M期。相关研究显示,miR-221在肝癌细胞中的高表达可抑制PTEN、TIMP3、

p27、p57等下游基因的表达,而上述基因是肿瘤发生发展相关的重要基因^[23-25],其中p27、p57等基因可导致细胞周期阻滞于G₁期^[26]。

综上所述,本研究制备的FRL可以较好地包封anti-miR-221,并成功将其递送至体外肝癌HepG2细胞内,而且在诱导细胞凋亡和细胞周期调控方面呈现出良好的体外抗肝癌效果。该递送系统制备简便,可操作性和应用性强,为包封RNA药物并靶向递送至肝癌细胞提供了一种可行方案。本研究仅初步评价了FRL的体外递送能力及抗肝癌效果,其体内抗肝癌效果及机制值得进一步深入研究。

参考文献

[1] 梁军,李丽.肝癌免疫治疗策略的进展与思考[J].中华消化外科杂志,2021,20(2):184-190.

[2] REBOUISSOU S, NAULT J C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2020, 72(2):215-229.

[3] MOLLAEI H, SAFARALIZADEH R, ROSTAMI Z. microRNA replacement therapy in cancer[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8):12369-12384.

[4] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. microRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3):203-222.

[5] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of micro RNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5):5451-5465.

[6] MARKOVIC J, SHARMA A D, BALAKRISHNAN A. microRNA-221: a fine tuner and potential biomarker of chronic liver injury[J]. Cells, 2020, 9(8):1767.

[7] LIU W F, HU K S, ZHANG F, et al. The prognostic significance of microRNA-221 in hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis[J]. Int J Biol Markers, 2021, 36(2):17246008211032689.

[8] SONG H L, HART S L, DU Z X. Assembly strategy of liposome and polymer systems for siRNA delivery[J]. Int J Pharm, 2021, 592:120033.

[9] SHUAI Q, ZHU F T, ZHAO M D, et al. mRNA delivery via non-viral carriers for biomedical applications[J]. Int J Pharm, 2021, 607:121020.

[10] CROOKE S T, WITZTUM J L, BENNETT C F, et al. RNA-targeted therapeutics[J]. Cell Metab, 2018, 27(4):714-739.

[11] 李维,陈梁,尹丹,等.川芎嗪眼用脂质体温敏凝胶的制备及体内外特性评价[J].中国药房,2021,32(3):320-327.

[12] FARRAN B, MONTENEGRO R C, KASA P, et al. Folate-conjugated nanovehicles: strategies for cancer therapy[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 107:110341.

[13] LI W, XIE X, WU T T, et al. Targeted delivery of Auristatin PE to HepG2 cells using folate-conjugated boron nitride nanotubes[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 109:110509.

[14] WANG H P, SUN S L, ZHANG Y, et al. Improved drug targeting to liver tumor by sorafenib-loaded folate-decorated bovine serum albumin nanoparticles[J]. Drug Deliv, 2019, 26(1):89-97.

[15] ZHANG W D, PENG F Q, ZHOU T T, et al. Targeted delivery of chemically modified anti-miR-221 to hepatocellular carcinoma with negatively charged liposomes[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10:4825-4836.

[16] 张文典,崔杰,夏一帆,等.两种叶酸偶联物的合成及体外靶向性研究[J].中国药科大学学报,2021,52(4):447-454.

[17] 侯玉群,胡姗姗,宋长伟,等.应用多功能荧光酶标仪分析盐酸阿霉素含药量[J].现代医药卫生,2015,31(24):3692-3693.

[18] 杜亚楠.基于多重微滴PCR偶联荧光分光光度法生物基因定性、定量、高通量检测技术研究[D].上海:上海师范大学,2018.

[19] CHENG C J, BAHAL R, BABAR I A, et al. microRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour micro environment[J]. Nature, 2015, 518(7537):107-110.

[20] 周建平.纳米技术在药物递送中的应用与展望[J].中国药科大学学报,2020,51(4):379-382.

[21] BARENHOLZ Y. Doxil®: the first FDA-approved nano-drug: lessons learned[J]. J Control Release, 2012, 160(2):117-134.

[22] ZHU Y L, LIANG G F, SUN B, et al. A novel type of self-assembled nanoparticles as targeted gene carriers: an application for plasmid DNA and antimicroRNA oligonucleotide delivery[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11:399-410.

[23] FU X H, WANG Q, CHEN J S, et al. Clinical significance of miR-221 and its inverse correlation with p27Kip¹ in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(5):3029-3035.

[24] LI N N, MEN W X, ZHENG Y B, et al. Oroxin B induces apoptosis by down-regulating microRNA-221 resulting in the inactivation of the PTEN/PI3K/AKT pathway in liver cancer[J]. Molecules, 2019, 24(23):4384.

[25] YUAN Q G, LOYA K, RANI B, et al. microRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration[J]. Hepatology, 2013, 57(1):299-310.

[26] PATERAS I S, APOSTOLOPOULOU K, NIFOROU K, et al. p57KIP2: "Kip" ing the cell under control[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(12):1902-1919.

(收稿日期:2021-11-27 修回日期:2022-01-16)

(编辑:林 静)