



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.012
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.012
China Journal of General Surgery, 2024, 33(10):1654-1666.

· 基础研究 ·

纳米颗粒递送 siRNA 联合声动力疗法协同治疗结肠癌的 实验研究

李琢¹, 陈真², 王华强², 肖志刚¹

(1. 湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院 结直肠肛门外科, 湖南 长沙, 410005; 2. 中南大学化学化工学院 湖南省微纳米材料界面科学重点实验室, 湖南 长沙 410083)

摘要

背景与目的: 声动力疗法 (SDT) 是一种新兴的肿瘤治疗方法, 主要利用低强度超声 (US) 激活声敏剂, 促使其产生细胞毒性的活性氧 (ROS) 杀伤细胞。本研究尝试开发一种包含声敏剂与肿瘤相关基因 RRS1 小干扰 RNA (siRRS1) 的新型纳米颗粒 (NPs), 并观察其对结肠癌的抗癌作用, 以期结肠癌的治疗提供新的思路。

方法: 在 TCGA 与 GEO 数据库下载 RRS1 RNA-Seq 数据, 收集湖南省人民医院结直肠肛门外科 80 例临床结肠癌患者的临床病理资料, 分析 RRS1 在结肠癌中的表达及其与结肠癌预后的关系。观察结肠癌细胞转染 siRRS1 后的增殖与凋亡情况。将声敏剂四 (4-羧基苯基) 卟啉 (TCPP)、基因载体 DSPE-PEI、siRRS1 组装成 TCPP@DSPE-PEI-siRRS1 NPs (T@D-siRRS1 NPs), 在体外对 T@D-siRRS1 NPs 进行结构表征, 以及其细胞摄取与 ROS 生成能力检查后, 进行体外细胞实验与在体荷瘤鼠实验观察 T@D-siRRS1 NPs 对结肠癌的抗癌作用。

结果: 数据库分析与临床标本检测均显示, RRS1 在结肠癌组织中表达高于癌旁正常组织; 并且高表达与预后不良相关 ($HR=1.88$, $95\% CI=1.27\sim 2.79$, $P=0.002$); 单因素与多因素分析显示, RRS1 mRNA 表达是结肠癌患者总生存期的独立危险因素 ($HR=1.354$, $95\% CI=1.447\sim 2.215$, $P=0.031$)。敲低 RRS1 后, 结肠癌细胞增殖能力明显减弱、凋亡明显增加 (均 $P<0.05$)。结构表征结果显示颗粒粒径均一, 稳定性好; T@D-siRRS1 NPs 通过细胞内吞作用进入细胞后, TCPP 在超声的辐照下可以产生单线态氧 (1O_2)。随后的体内外实验结果均显示, 转染携带 siRRS1 或 TCPP (T@D-对照 siRNA、T@D-siRRS1) +US 的 NPs 后, 结肠癌细胞的生长均有不同程度的抑制, 其中 T@D-siRRS1 NPs+US 的作用最强 (均 $P<0.05$)。此外, T@D-siRRS1 NPs+US 治疗小鼠的重要器官无明显损伤。

结论: T@D-siRRS1 NPs+US 集 SDT 与基因治疗于一体, 对结肠癌细胞可产生有效的协同杀伤作用, 且 T@D-siRRS1 NPs 具有良好的安全性与生物相容性, 具有临床应用的潜在可能。

关键词

结肠肿瘤; 声动力疗法; 基因治疗; 核糖体生物发生调节蛋白同源物

中图分类号: R735.3

基金项目: 湖南省肛肠疾病质量控制中心基金资助项目 (20220307-1006)。

收稿日期: 2024-06-30; **修订日期:** 2024-10-12。

作者简介: 李琢, 湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院硕士研究生, 主要从事结肠癌诊疗方面的研究。

通信作者: 肖志刚, Email: xzgsu@163.com

Nanoparticle-delivered siRNA combined with sonodynamic therapy for colon cancer

LI Zhuo¹, CHEN Zhen², WANG Huaqiang², XIAO Zhigang¹

(1. Department of Colorectal and Anal Surgery, Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410005, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Micro & Nano Materials Interface Science, College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract

Background and Aims: Sonodynamic therapy (SDT) is an emerging tumor treatment method that primarily utilizes low-intensity ultrasound (US) to activate sonosensitizers, leading to the production of cytotoxic reactive oxygen species (ROS) that kill cells. This study was conducted with an attempt to develop a novel nanoparticle (NPs) formulation containing a sonosensitizer and the small interfering RNA (siRRS1) of tumor-related gene RRS1 to observe its anticancer effects on colon cancer, to provide new strategies for colon cancer treatment.

Methods: RRS1 RNA-Seq data were downloaded from the TCGA and GEO databases, and clinical pathological data were collected from 80 patients with colon cancer at Hunan Provincial People's Hospital. The expression of RRS1 in colon cancer and its relationship with prognosis were analyzed. The proliferation and apoptosis of colon cancer cells transfected with siRRS1 were observed. The sonosensitizer tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin (TCPP), gene carrier DSPE-PEI, and siRRS1 were assembled into TCPP@DSPE-PEI-siRRS1 NPs (T@D-siRRS1 NPs). After structural characterization and examination of cellular uptake and ROS generation capabilities in vitro, the anticancer effects of T@D-siRRS1 NPs on colon cancer were assessed in cell experiments and tumor-bearing mouse models.

Results: Both database analysis and clinical specimen testing indicated that RRS1 expression in colon cancer tissues was higher than that in adjacent normal tissues, and high expression was associated with poor prognosis ($HR=1.88$, 95% $CI=1.27-2.79$, $P=0.002$). Univariate and multivariate analyses showed that RRS1 mRNA expression was an independent risk factor for overall survival in colon cancer patients ($HR=1.354$, 95% $CI=1.447-2.215$, $P=0.031$). Knockdown of RRS1 significantly reduced the proliferation capacity of colon cancer cells and increased apoptosis (both $P<0.05$). Characterization results showed that the particles were uniform and stable; T@D-siRRS1 NPs entered cells through endocytosis, where TCPP could generate singlet oxygen (1O_2) under ultrasound irradiation. Subsequent in vitro and in vivo experimental results demonstrated that transfection with NPs carrying siRRS1 or TCPP (T@D-control siRNA, T@D-siRRS1) combined with US resulted in varying degrees of growth inhibition in colon cancer cells, with the T@D-siRRS1 NPs+US treatment showing the strongest effect (all $P<0.05$). Moreover, no significant damage was observed in the vital organs of mice treated with T@D-siRRS1 NPs+US.

Conclusion: T@D-siRRS1 NPs plus US integrate SDT and gene therapy, producing an effective synergistic cytotoxic effect on colon cancer cells. Additionally, T@D-siRRS1 NPs demonstrate good safety and biocompatibility, suggesting potential for clinical application.

Key words

Colonic Neoplasms; Sonodynamic Therapy; Genetic Therapy; Ribosome Biogenesis Regulatory Protein Homolog

CLC number: R735.3

结肠癌是全球最常见的癌症之一^[1]，其发病与生活方式、饮食习惯和基因突变等因素有关^[2-3]。目前有多种治疗策略，如放疗、化疗和手术治疗等；但结肠癌的治疗仍然不够彻底^[4]。在此背景下，亟须寻求新的方法来提高结肠癌治疗效果。声动力疗法（sonodynamic therapy, SDT）是一种很有前景的肿瘤治疗策略，声敏剂在超声（US）辐照下可产生活性氧（ROS），选择性地杀伤肿瘤细胞^[5-6]。SDT具有时空控制、副作用小、无创、可穿透深部组织等优点^[7-8]，已经广泛应用于深部肿瘤的治疗。

核糖体生物发生调节因子1同系物（RRS1）是在酵母中发现的一种“保守蛋白”^[9-10]，与肿瘤的发展和转移、细胞周期调控等密切相关^[11]。RRS1参与调节多种人类恶性肿瘤，如宫颈癌^[12]和乳腺癌^[13]。此外，还可以刺激肝细胞癌增殖和克隆形成，抑制凋亡^[14]。

本研究首先发现RRS1在结肠癌中高表达，并

且高表达患者预后较差；然后设计合成RRS1的小分子干扰性RNA（siRRS1）转染结肠癌细胞，结果显示，敲低RRS1蛋白后能有效抑制结肠癌细胞增殖、加速凋亡。随后，基于以上基础，本研究设计合成基因载体DSPE-PEI，以四（4-羧基苯基）卟啉[tetrakis（4-carboxyphenyl）porphyrin（TCPP）]为基础，再将TCPP、siRRS1和DSPE-PEI组装成多功能纳米材料（TCPP@DSPE-PEI-siRRS1，T@D-siRRS1），用于结肠癌的声动力联合基因协同治疗。DSPE-PEI可以将疏水的TCPP包裹在里层，然后外层带正电荷的PEI可以吸附带负电的siRRS1，从而可以作为基因载体。T@D-siRRS1纳米颗粒（T@D-siRRS1 NPs）通过细胞内吞作用进入细胞后，TCPP在超声的辐照下可以产生单线态氧（¹O₂）对肿瘤细胞起到杀伤作用；同时作为基因载体携带siRRS1进入细胞敲低RRS1蛋白也能抑制肿瘤细胞的增殖，从而实现SDT联合基因治疗（图1）。

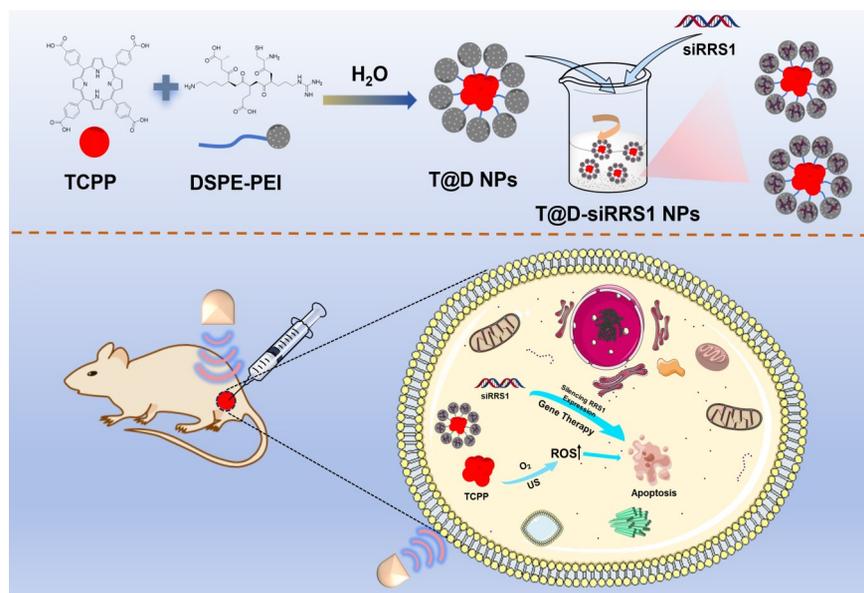


图1 T@D NPs的合成与治疗机制示意图

Figure 1 Schematic diagram of the synthesis and therapeutic mechanism of T@D NPs

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2014年1月—2018年1月在湖南省人民医院结直肠肛门外科行根治性手术切除的80例结肠癌患者临床及病理资料。纳入标准：(1)行结肠癌根治性切除，且术后病理确诊；(2)无远处转移；

(3)随访资料及临床资料完整。排除标准：(1)手术中未行相应部位淋巴结清扫；(2)合并有其他肿瘤；(3)死于其他疾病、失访患者。RRS1 RNA-Seq数据来自TCGA数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 和GEO数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)。

1.2 实验材料

1, 2-二硬脂酰基-sn-丙三基-3-磷脂酰乙醇

胺 (DSPE)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)、N-羟基丁二酰亚胺 (NHS)、聚乙烯亚胺 25K (PEI25K) 购于重庆渝恩医药; 9, 10-蒽二基-二(亚甲基)二丙二酸 (ABDA) 和 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 购自上海阿拉丁生化科技有限公司; siRNA 由北京青岛生物技术有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和 siRNA 转染 人结肠癌细胞株 Lovo 来自中国上海 iCell 生物科技有限公司。用含青霉素-链霉素溶液和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养细胞, 并孵育于 37 °C、5% CO₂ 湿化的培养箱。Lipofectamine 3000 进行 siRNA 转染。转染 siRRS1 为实验组, 转染对照 siRNA (siNC) 为对照组。

1.3.2 qRT-PCR 和 Western blot Lovo 细胞 siRNA 转染 48 h 后, 通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证转染效率。TRIzol 试剂 (Invitrogen) 从结肠癌细胞 (Lovo) 中提取总 RNA, SuperScript 逆转录酶试剂盒 (赛默飞世尔科技) 将等量的 RNA 逆转录为 cDNA, SYBR 绿色 PCR 预混液 (赛默飞世尔科技) 在快速实时荧光定量 PCR 7500 系统 (应用生物系统) 中扩增和分析总 cDNA。以 GAPDH 作为内对照, 2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 相对表达量。结果以归一化倍数变化表示。将总细胞样品用冰 PBS 洗涤 2 次, 并在裂解缓冲液中孵育 10 min。使用 BC 蛋白质测定试剂盒 (Sangon Biotech, 上海) 测定蛋白质浓度。SDS-PAGE 分离等量的样品蛋白 (20 μg) 并转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。5% 脱脂牛奶试剂封闭膜后与一抗 (1:1 200, NO.AF03364、Absin、中国) 在 4 °C 下孵育 12 h。通过与辣根过氧化物酶偶联二抗 (1:1 000, A-10651、武汉三鹰、中国) 孵育来检测蛋白质条带, 所有膜在双色红外激光成像系统 (Odyssey, LICOR, USA) 上显影成像。

1.3.3 CCK-8 实验 CCK-8 实验 (Dojindo Molecular Technologies, Inc) 用于检测 Lovo 细胞活力。将细胞接种在 96 孔板 (1 × 10⁴ 细胞/孔) 并在 0、24、48、72、96 h 进行检测。每孔中加入检测缓冲液 (100 μL; 培养基与 CCK-8 的比例, 9:1)。在 37 °C 下孵育 3 h 后, 酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (OD) 值。

1.3.4 细胞流式术 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪用来检测肿瘤细胞凋亡率。Lipofectamine 3000

或者 T@P siRNA NPs 转染 siRNA 48 h, 用冰 PBS 洗涤 3 遍, 把细胞重悬在膜联蛋白 V 结合缓冲液中, 并且与 FITC 偶联的膜联蛋白 V 抗体 (细胞信号技术) 和碘化丙啶 PI (1:100 稀释) 在室温下孵育 15 min, 最后用贝克曼计数器分析细胞。

1.3.5 DSPE-PEI、T@D-siRRS1 NPs 的合成 取 DSPE (1.0 eq) 于瓶中加入 10 mL 氯仿溶清, 加入 EDC (20 eq)、NHS (2.0 eq), 在 40 °C 环境下搅拌反应 3 h。酸水洗 3 次, 干燥后冰乙醚中析出, 真空泵带走乙醚; 得 DSPE 活化酯。PEI25K (1.0 eq) 于瓶中, 加入 2 mL 氯仿溶清后, 加入 DSPE 活化酯 (5.0 eq) 室温搅拌反应 5 min。旋干氯仿, 加入纯水 4 mL 溶清, 1 000 Da 透析袋透析 24 h。冻干即可得到 DSPE-PEI。将 3 mg TCPP 溶解于 3 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液中, 8 mg DSPE-PEI 溶于 20 mL 水溶液; 在超声的辐照下, 将上述 TCPP 溶解缓慢滴入 DSPE-PEI 水溶液中, 继续超声辐照 15 min 后用 500 Da 透析袋透析 24 h, 经聚醚砜膜 (0.22 μm) 过滤后得到 TCPP@DSPE-PEI NPs (T@D NPs)。加入 siRRS1 即可自行组装成 T@P-siRRS1 NPs。

1.3.6 MTT 实验 MTT 法检测不同治疗对肿瘤细胞的疗效。将细胞置于 96 孔板中, 各组中分别加入 PBS、siRRS1+PBS、T@D-siRRS1 NPs、T@D-siNC NPs。共培养 4 h 后进行超声辐照 (1 W/cm², 5 min)。为保证 siRRS1 充分发挥其生物学功能、超声辐照后再培养 48 h, 酶标仪检测细胞在 450 nm 处的 OD 值。

1.3.7 体外 ROS 生成测定 以 ABDA-Na₂ 作为 ¹O₂ 捕获剂, 研究 T@D-siRRS NPs 在水溶液中 ROS 的产生能力。在 2 mL 的水溶液中加入 ABDA-Na₂ (120 nmol/L, 80 μL) 和 T@D-siRRS (100 μL)。超声 (1.0 W/cm²) 照射后, 记录下混合物紫外可见吸收光谱 (UV-vis) 的变化。

1.3.8 细胞对 T@D-siRRS1 NPs 的摄取 Lovo 细胞 (结肠癌细胞) 用来评价肿瘤细胞对 T@D-siRRS1 NPs 的摄取能力。Lovo 细胞接种于 6 孔板中培养至约 60% 时, 加入 T@D-siRRS1 NPs 水溶液 (100 μL)。使用倒置荧光显微镜 (DMIL LED, 徕卡) 捕捉不同时间的荧光图。

1.3.9 细胞内 ROS 的检测 检测 T@D-siRRS1 NPs 细胞内 ROS 的生成能力。DCFH-DA 作为探针检测细胞内 ROS 生成。Lovo 细胞培养于 6 孔板中, 在培养皿中加入 PBS (100 μL) 或 T@D-siRRS1 NPs 水溶液

(100 μL) 共培养 4 h, 然后加入 DCFH-DA 探针继续孵育 30 min。US (1 W/cm²) 暴露 5 min 后, 在倒置荧光显微镜下成像。

1.3.10 体内实验和免疫组化分析 实验动物经湖南师范大学伦理委员会批准 (审批号: 4307272311031256555)。将 Lovo 结肠癌细胞注射于小鼠右侧背部, 建立小鼠皮下肿瘤模型。首先检测 T@D-siRNA 的荧光成像能力。肿瘤生长至约 400 mm³ 时, 瘤内注射 200 μL T@D-siRNA。小动物成像系统 (PerkinElmer's IVIS Lumina III) 捕获小鼠皮下肿瘤的荧光图像。接下来, 评估 T@D-siRNA 的纳米药物疗效。待肿瘤体积达到 50 mm³ 左右, 将小鼠随机分为 7 组, 每组 5 只: (1) PBS 组; (2) PBS+US 组; (3) siRRS1+PBS 组; (4) T@D-siNC 组; (5) T@D-siNC+US 组; (6) T@D-siRRS1 组; (7) T@D-siRRS1+US 组; 瘤内注射药物后, 对肿瘤进行超声照射 (1 W/cm², 10 min)。最后, 获取不同处理的小鼠重要内脏器官 (心、肝、脾、肺和肾), 并用 4% 多聚甲醛固定液保存。不同处理 72 h 后, 取小鼠肿瘤并保存在 4% 多聚甲醛固定液中, 行免疫组织化学分析。

1.4 统计学处理

统计学分析采用 SPSS 22.0 软件。TCGA 数据库中 RRS1 在结肠癌与癌旁组织中的差异表达通过 R 包 DESeq2 (version 1.26.0) 完成。两分类变量之间的相关性用 Pearson 相关系数评估。两组间计量资料比较采用 *t* 检验。Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验分析患者的总生存 (OS) 率。Cox 比例风险回归模型分析 OS 的独立预后因素。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RRS1 在结肠癌中的表达和预后价值

TCGA 数据库中的泛癌 RNA-seq 数据检测 RRS1 mRNA 在不同肿瘤中的表达。对 RRS1 mRNA 在肿

瘤和癌旁正常组织中的差异表达分析可发现, RRS1 mRNA 在包括结肠癌在内的 15 种肿瘤中高表达 (均 P<0.05) (图 2A)。通过 TCGA 和 GSE149289 数据库分析 RRS1 mRNA 在结肠癌组织和癌旁组织中的差异表达, 同样发现 RRS1 mRNA 在结肠癌肿瘤组织中的表达高于癌旁正常组织 (均 P<0.05) (图 2B)。80 例临床结肠癌样本进一步验证 RRS1 在结肠癌组织的高表达 (P<0.05) (图 2C)。收集临床 80 例结肠癌患者资料, Kaplan-Meier 生存分析显示, RRS1 蛋白高表达的患者有较低的 OS 率 (HR=1.88, 95% CI=1.27~2.79, P=0.002) (图 2D); 相关危险因素的单因素和多因素分析显示, 肿瘤大小 (HR=2.658, 95% CI=3.266~2.572, P=0.002)、RRS1 mRNA 表达 (HR=1.354, 95% CI=1.447~2.215, P=0.031) 是结肠癌 OS 期的独立危险因素 (表 1)。

2.2 敲低 RRS1 对结肠癌细胞的影响

转染 siRRS1 后, qRT-PCR 和 Western blot 实验验证 siRNA 的转染效率, 结果表明 siRRS1 转染可以成功降低细胞内 RRS1 mRNA 和 RRS1 蛋白的表达 (图 3A-B)。随后, CCK-8 实验显示, 敲低 RRS1 表达可以抑制 Lovo 细胞的增殖 (图 3C); 细胞流式术结果表明, 敲低 RRS1 表达可增加 Lovo 细胞的凋亡 (图 3D)。

2.3 T@D-siRNA 的结构表征

DSPE-PEI、siRNA、T@D NPs、T@D-siRNA NPs 和 TP NPs 水溶液的紫外可见吸收光谱 (UV-vis) (图 4A)。在 412 nm 的激发下, T@D-siRNA NPs 在 610 nm 处显示出红色荧光峰 (图 4B); 因此, T@D-siRNA NPs 具有适合荧光成像的特性。利用扫描电镜 (SEM) 分析 T@D-siRNA NPs 的形貌和粒径分布显示, 这些 NPs 呈现出均匀的球形形态, 粒径范围为约 ~90 nm (图 4C)。动态光散射 (DLS) 结果显示, NPs 的流体动力学直径为 95 nm, 多分散性指数为 0.355, 进一步表明 NPs 的粒径分布均匀 (图 4D)。7 d 后纳米粒的粒径分布保持在 96 nm, 表明纳米粒具有良好的稳定性。

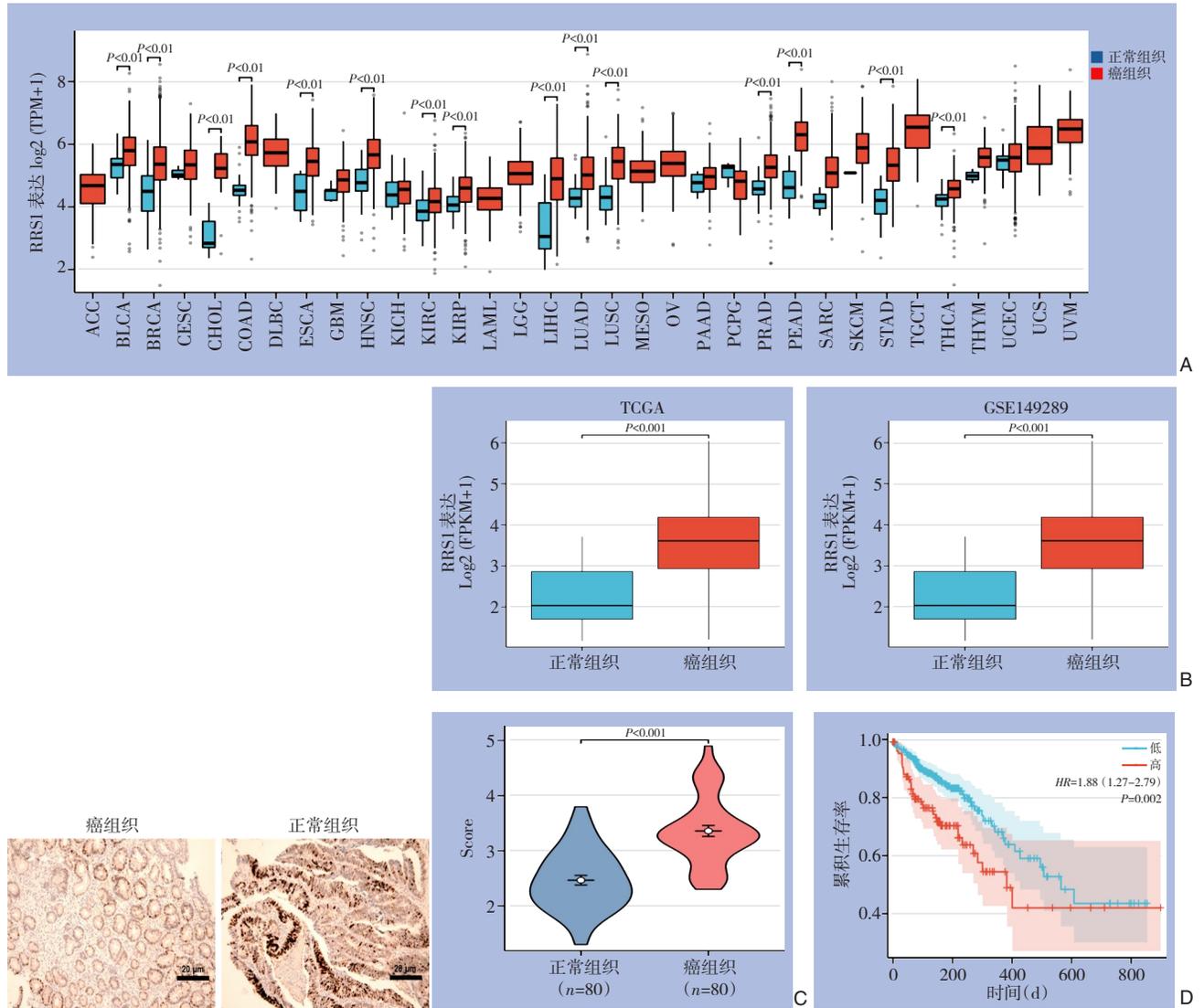


图2 RRS1 的表达与临床意义分析 A: RRS1 在泛癌中的表达水平; B: 数据库分析 RRS1 在结肠癌组织和正常组织中的表达; C: 免疫组化分析临床样本中 RRS1 的表达; D: RRS1 高表达和低表达组患者的预后比较

Figure 2 Analysis of RRS1 expression and its clinical significance A: Expression levels of RRS1 in pan-cancer; B: Database analysis of RRS1 expression in colon cancer tissue versus normal tissue; C: Immunohistochemical analysis of RRS1 expression in clinical samples; D: Prognostic comparison between patients with high and low expression of RRS1

表 1 80 例结肠癌患者 OS 的影响因素分析

Table 1 Analysis of factors influencing the OS in 80 patients with colon cancer

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
年龄	1.321(0.883~1.335)	0.063	—	—
性别	1.092(0.542~1.778)	0.923	—	—
肿瘤大小	1.324(4.015~26.977)	<0.001	2.658(3.266~2.572)	0.002
血管侵犯	3.235(0.547~2.421)	0.445	—	—
CEA	1.019(1.025~1.214)	0.022	1.213(0.754~1.214)	0.231
RRS1	1.875(1.251~2.346)	0.019	1.354(1.447~2.215)	0.031

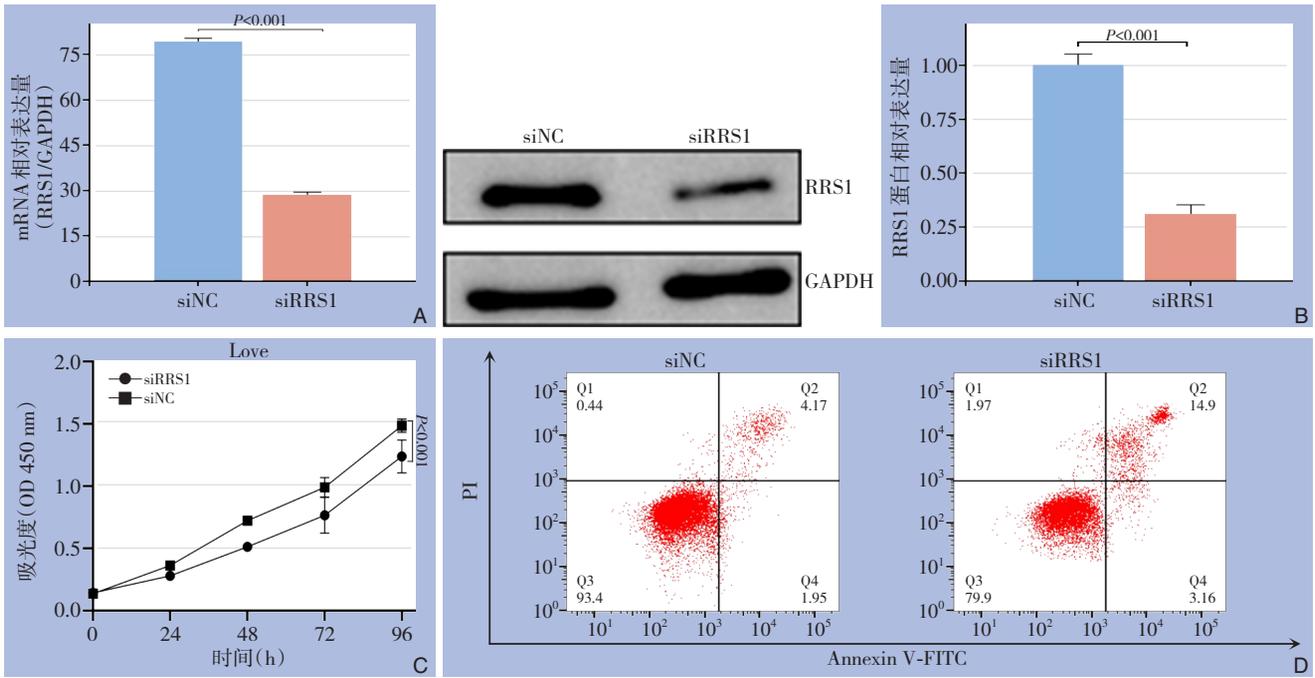


图3 转染效果检测及转染 RRS1 对结肠癌细胞的影响 A: qRT-PCR 检测转染效果; B: Western blot 检测转染效果; C: CCK-8 实验检测敲低 RRS1 对细胞增殖的影响; D: 细胞流式术检测敲低 RRS1 对细胞凋亡的影响

Figure 3 Detection of transfection effects and the impact of RRS1 transfection on colon cancer cells A: qRT-PCR detection of transfection efficiency; B: Western blot detection of transfection efficiency; C: CCK-8 assay to assess the impact of RRS1 knockdown on cell proliferation; D: Flow cytometry to evaluate the effect of RRS1 knockdown on cell apoptosis

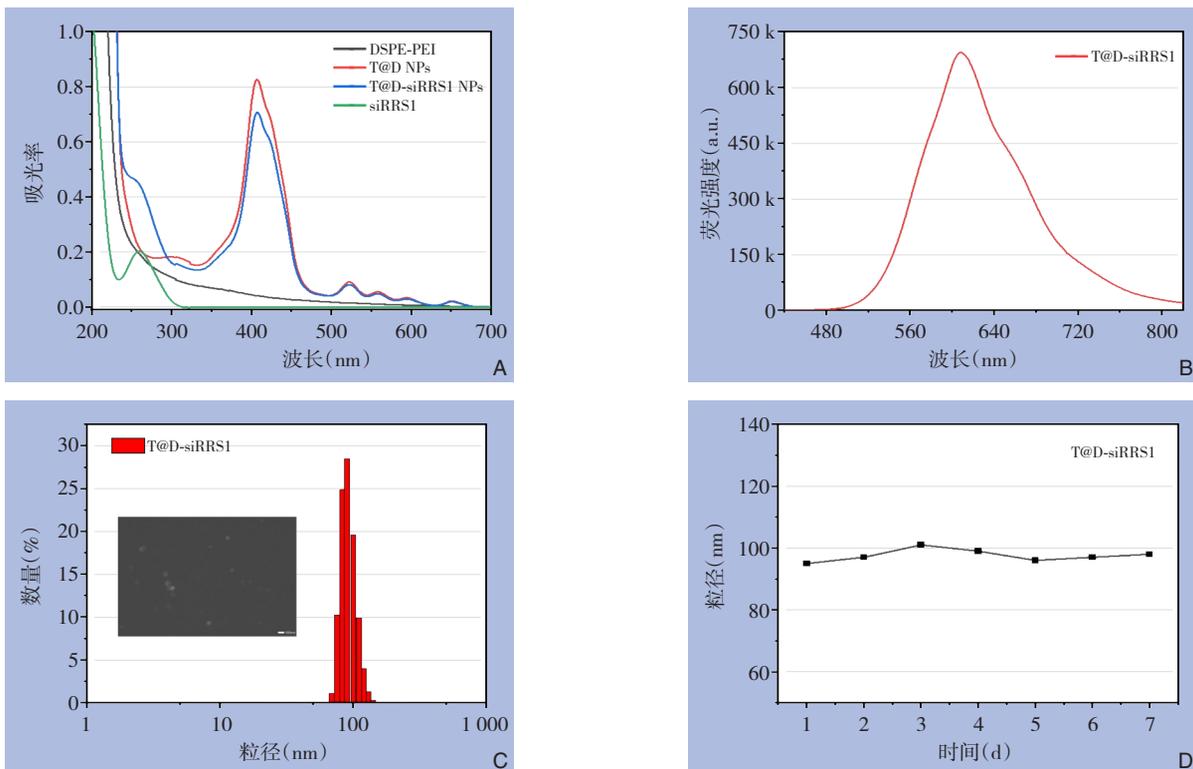


图4 结构表征检测 A: 不同 NPs 的 UV-vis; B: T@D-siRRS1 NPs 水溶液的荧光光谱; C: T@D-siRRS1 NPs 的 SEM 图像; D: T@D-siRRS1 NPs 在水溶液中的时间依赖性 DLS

Figure 4 Structural characterization analysis A: UV-Vis spectrum of different NPs; B: Fluorescence spectrum of T@D-siRRS1 NPs in aqueous solution; C: SEM image of T@D-siRRS1 NPs; D: Time-dependent DLS of T@D-siRRS1 NPs in aqueous solution

2.4 T@D-siRNA 细胞摄取和 ROS 生成能力检查

¹O₂ 是 ROS 的主要形式, 可触发细胞发生凋亡^[15]。ABDA-Na₂ 作为 ROS 生成探针评估 T@D-siRNA NPs 水溶液在超声辐照下 ¹O₂ 的生成能力。ABDA-Na₂ 水溶液的 UV-vis 呈现出 3 个吸收峰 (320 nm、359 nm、378 nm), 在 T@D-siRRS1 NPs 存在的情况下, 超声辐照下 3 个吸收峰逐渐降低 (图 5A); 没有 T@D-siRRS1 NPs 存在的情况下, 吸收峰保持不变 (图 5B)。405 nm 处的吸光度与超声辐照时间呈良好的线性关系 (图 5C)。这些结果证明了 T@D-siRRS1 NPs 在超声辐照下具备良好的 ¹O₂ 生成能力。

接下来, 研究 Lovo 细胞对 T@D-siRRS1 NPs 的摄取, 结果显示, T@D-siRRS1 NPs 孵育 30 min 后, Lovo 细胞出现红色荧光, 120 min 后出现较强的红色荧光, 这表明, 120 min 后 Lovo 细胞可以大量摄取 T@D-siRRS1 NPs; 使用 DCFH-DA 作为 ROS 探针检测 T@D-siRRS1 NPs 在细胞内 ROS 的生成能力, 结果显示, 在 T@D-siRRS1+US 组处理的细胞中可观察到强烈的绿色荧光。PBS 组、PBS+US 组和 T@D-siRRS1 组均未观察到绿色荧光 (图 5D-E)。此结果表明, 在超声照射 T@D-siRRS NPs 在细胞内能有效地产生 ROS。

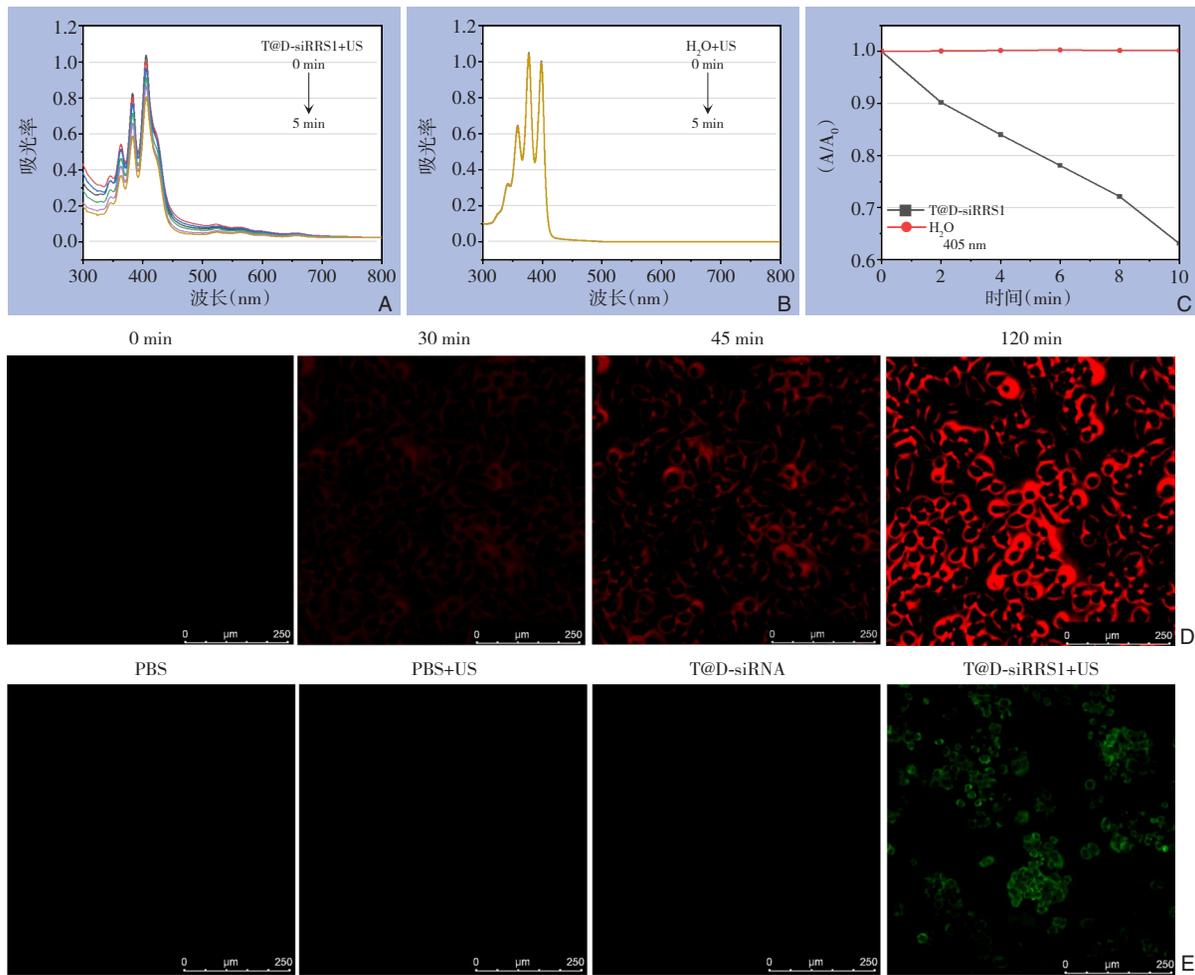


图 5 T@D-siRNA 细胞摄取和 ROS 生成检测 A: ABDA-Na₂ 水溶液在 T@D-siRNA NPs 存在条件下经超声辐照不同时间的 UV-vis; B: ABDA-Na₂ 水溶液在无 T@D-siRNA NPs 条件下经超声辐照不同时间的 UV-vis; C: 在 ABDA-Na₂ 存在的情况下, 经超声照射不同时间后, T@D-siRNA NPs 和水在 405 nm 处的吸光比; D: Lovo 细胞在 T@D-siRNA NPs 存在下孵育时间依赖性荧光图像; E: 不同处理下 DCFH-DA-Lovo 细胞的荧光图像

Figure 5 Cellular uptake of T@D-siRNA and detection of ROS generation A: UV-Vis spectrum of ABDA-Na₂ solution exposed to ultrasound irradiation for different times in the presence of T@D-siRNA NPs; B: UV-Vis spectrum of ABDA-Na₂ solution exposed to ultrasound irradiation for different times without T@D-siRNA NPs; C: Absorbance ratio at 405 nm for T@D-siRNA NPs and water after ultrasound irradiation for different times in the presence of ABDA-Na₂; D: Time-dependent fluorescence images of Lovo cells incubated with T@D-siRNA NPs; E: Fluorescence images of DCFH-DA-labeled Lovo cells under different treatments

2.5 T@D-siRNA 的细胞毒性

T@D-siRNA NPs 与 Lovo 共同孵育 4 h 后的荧光图中，红色荧光是由 TCPP 发出，绿色荧光是由 siRRS1 发出，红色荧光和绿色荧光完全重叠，这表明 siRRS1 已经被负载并且成功转染进细胞内（图 6A）。接下来，qRT-PCR 和 Western blot 检测分别显示，T@D-siRRS1 组和 T@D-siRRS1+US 组中 RRS1 mRNA 表达降低和 RRS1 蛋白被成功敲低，并且超声辐照不影响 siRRS1 mRNA 和 RRS1 蛋白的表达（图 6B-C）。随后检测不同处理后的细胞活力显示，PBS 组、PBS+US 组、siRRS1+PBS 组、T@D-

siRNA 组细胞活力均接近 100%，T@D-siNC+US 组经 SDT 后细胞存活率为 45.5%，T@D-siRNA 组基因治疗后细胞存活率为 60.5%。对于 T@D-siRRS1+US 组的肿瘤细胞，SDT 联合基因治疗后的存活率仅为 13.6%（图 6D）；流式细胞术分析显示，PBS 组、PBS+US 组、siRRS1+PBS 组、T@D-siNC 组细胞几乎未见凋亡。T@D-siRNA 组，因 RRS1 蛋白的敲低而增加 Lovo 细胞的凋亡率到 19.49%。相比之下，T@D-siNC+US 组通过 SDT 后凋亡率增加到 50.78%。SDT 联合基因治疗的 T@D-siRRS1+US 组的细胞凋亡率达 82.54%（图 6E）。

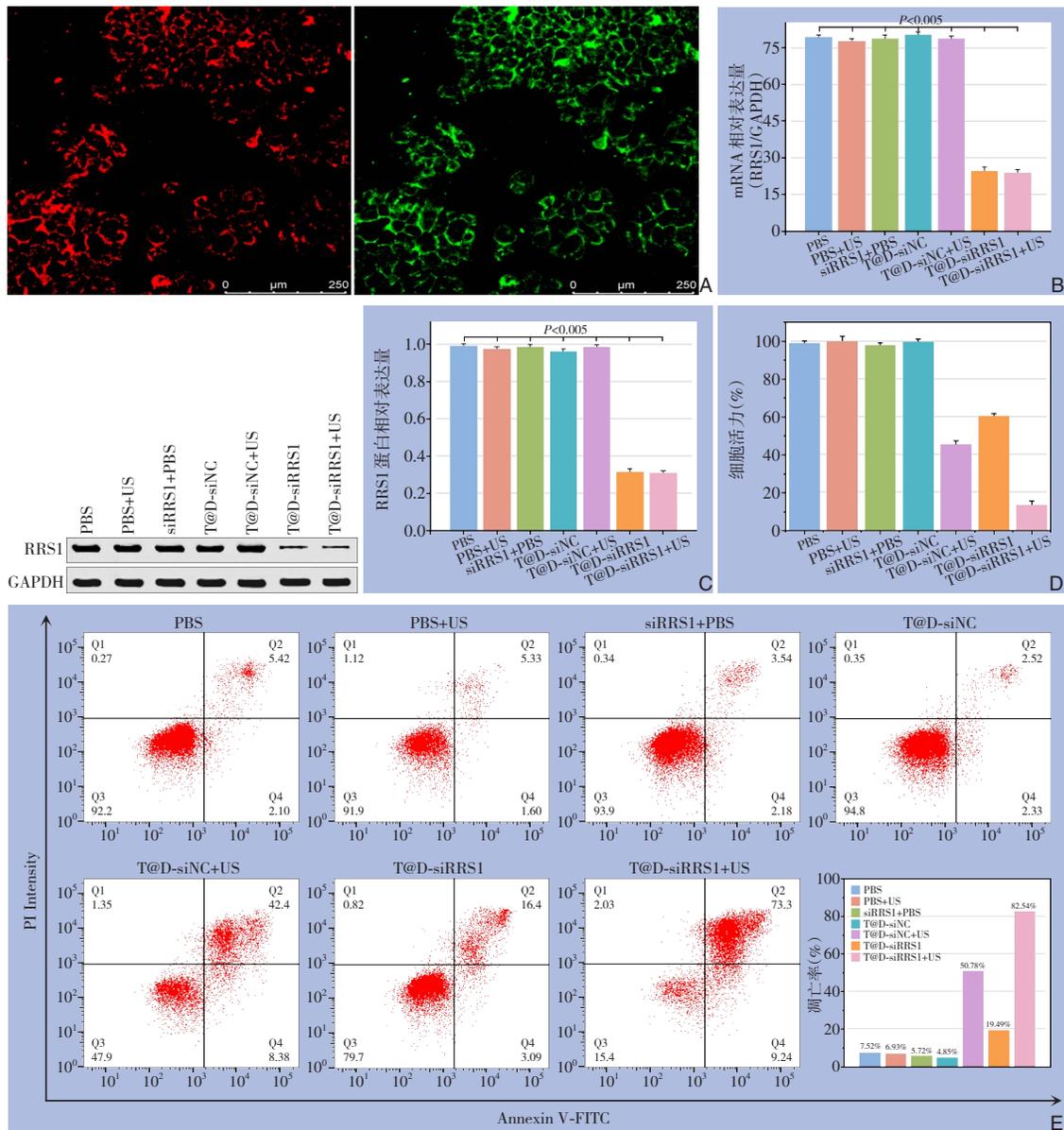


图 6 T@D-siRNA 的细胞毒性检测 A: Lovo 对 T@D-siRNA 摄取的荧光图; B: qRT-PCR 检测; C: Western blot 检测; D: 不同处理后 Lovo 细胞的活力; E: 不同处理后 Lovo 细胞的凋亡检测

Figure 6 Cytotoxicity assessment of T@D-siRNA A: Fluorescence images of T@D-siRNA uptake in Lovo cells; B: qRT-PCR analysis; C: Western blot analysis; D: Viability of Lovo cells under different treatments; E: Apoptosis detection of Lovo cells under different treatment

2.6 T@D-siRRS1 体内抗肿瘤特性

瘤内注射 T@D-siRRS1 NPs 200 μL 并行超声 (1 W/cm², 10 min) 照射治疗, 并观察 T@D-siRRS1 对肿瘤生长的抑制作用。治疗期间, PBS 组、PBS+US 组、siRRS1+PBS 组、T@D-siNC+US 组肿瘤体积持续增大; 相比之下, T@D-siRRS1 组在经过基因治疗肿瘤生长减慢; 在 SDT 处理下 T@D-siNC+US 组的肿瘤生长明显受到抑制。最后, SDT 联合基因治疗后 T@D-siRRS1+US 组肿瘤体积进一步缩小 (图 7A-B)。

不同治疗组小鼠体质量变化无明显差异 (图 7C), 说明 T@D-siRRS1 NPs 具有良好的生物相容性。治疗 14 d 后对重要脏器 (心、肝、脾、肺、肾) 和肿瘤组织进行组织切片分析, 结果显示, 在 T@D-siRRS1+US 组的肿瘤组织中可以观察到严重的损坏 (HE 染色)、肿瘤细胞增殖明显下降 (Ki-67 染色) 和大量凋亡细胞出现 (TUNEL 染色) (图 7D); 治疗后小鼠的重要器官 (心、肝、脾、肺、肾) 均未出现明显的坏死或损伤 (图 7E)。

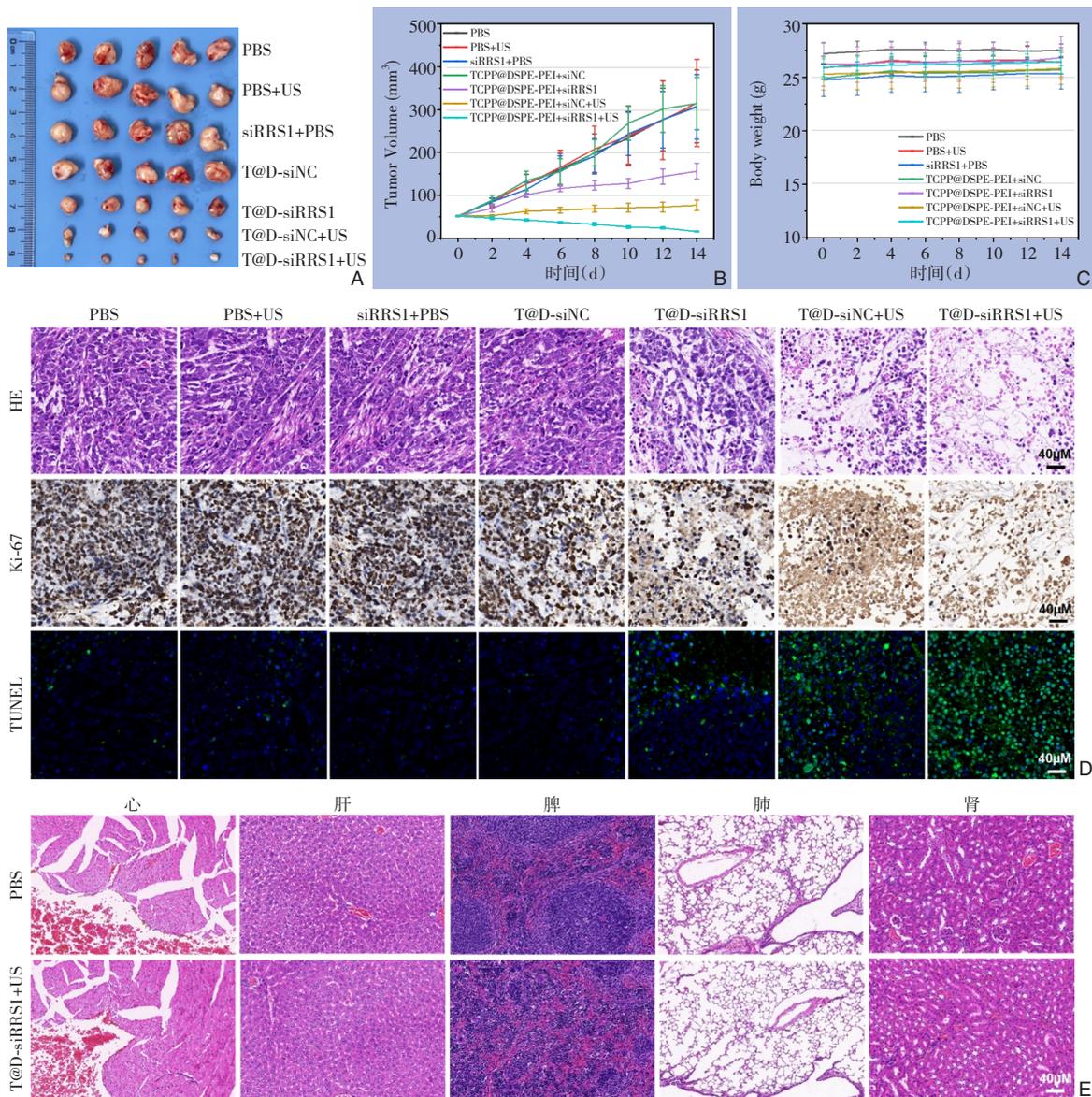


图 7 T@D-siRRS1 NPs 对结肠癌细胞体内生长及小鼠重要脏器的影响 A: 各组移植瘤标本; B: 移植瘤体积随时间的变化; C: 荷瘤鼠体质量随时间的变化; D: 治疗 14 d 后收集的肿瘤切片的 HE 染色、Ki-67 染色和 TUNEL 染色; E: 各组小鼠重要器官切片的 HE 染色

Figure 7 Effects of T@D-siRRS1 NPs on in vivo growth of colon cancer cells and important organs in mice A: Tumor specimens from each group; B: Changes in tumor volume over time; C: Changes in body weight of tumor-bearing mice over time; D: HE staining, Ki-67 staining, and TUNEL staining of tumor sections collected after 14 d of treatment; E: HE staining of important organ sections from mice in each group

3 讨论

结肠癌是世界上三大最常见的癌症之一^[4,16]，由于其发病机制复杂，易发生转移、预后差、难以治疗。目前，化疗、放疗和手术切除原发肿瘤是结肠癌主要的治疗策略^[17]。但较多的结肠癌患者发展到晚期一直处于无症状状态，早期诊断精度低和缺乏良好的预后标志物是结肠癌预后差、手术切除率低的重要原因。因此，寻找新的预后标志物和新的治疗手段具有对结肠癌的治疗具有重要意义。

本研究通过TCGA、GEO数据库和免疫组化分析发现RRS1在结肠癌中高表达。进一步研究分析80例患者的临床病理资料，发现RRS1是结肠癌患者的独立危险因素，并且高表达患者预后较差。有研究者^[18]发现RRS1在乳腺癌中同样高表达，并且高表达乳腺癌患者预后较差。RRS1与多种肿瘤的发生、发展密切相关；Cao^[19]发现RRS1可以通过减少RPL11-MDM2-p53信号传导来促进肝细胞癌的发展；另一项关于肝细胞癌的研究^[20]表明，肝细胞癌中RRS1启动子的低甲基化、RRS1基因组增益和hsa-miR-132-3p上调可能促进RRS1上调，从而导致肝细胞癌的发生和不良预后；RRS1是肝细胞癌的一个有前途的治疗靶点。

下调的lncRNA SBF2-AS1通过使microRNA-143海绵化并抑制RRS1的表达，进一步抑制乳腺癌的发生和发展^[13]。沉默RRS1可以通过抑制G₂/M进程和血管生成来抑制结直肠癌细胞的增殖和肿瘤发生^[21]。本文转染siRNA后通过CCK-8实验和细胞流式术发现沉默RRS1可以抑制结肠癌细胞增殖、增加结肠癌细胞凋亡。

TCPP是一种常用的声敏剂，Jiang等^[22]首次合成了稀土元素镝(Dy)与TCPP配位的金属有机骨架(MOF)纳米晶体(Dy-t-TCPP)，可用于肿瘤的SDT联合免疫治疗。另一方面，基因治疗在癌症治疗中显示出巨大的前景^[1,23]。siRNA已广泛应用于基因治疗。裸基因在循环系统中容易被核酸酶降解和细胞膜的不通透性，因此siRNA的治疗效果在很大程度上取决于基因载体^[24-25]。NPs作为siRNA基因载体，联合声动力疗法在肿瘤治疗方面已经取得了一些成就。Li等^[26]通过静电相互作用将siRNA和经原卟啉IX修饰的纳米精氨酸结合起来，创建了一种杂化纳米组装(HNA)，从而开发了

SDT联合基因疗法的NPs。Zhu等^[27]通过结合中-四(4-磺基苯基)卟啉(TPPS)和Fe³⁺，制备一种称为NTP的纳米结构，他们用锰超氧化物歧化酶(SOD2)、siRNA和Bis(DPA-Zn)-RGD修饰纳米结构。Wu等^[28]开发了具有肿瘤靶向特性的多功能Ru-TePt@siRNA-MVs纳米平台；该平台由siRNA(PD-L1 siRNA)、Ru-TePt纳米棒和仿生细胞膜囊泡组成具有肿瘤靶向能力NPs。Chen等^[29]开发一种具有肿瘤靶向功能的纳米药物(PT2-siRNA@PEG-FA)，用于SDT联合基因治疗肝细胞癌。

DSPE-PEI可以将疏水的TCPP包裹在内层组装成TCPP@DSPE-PEI NPs；然后加入siRNA，PEI带正电荷负载带负电的siRNA而自行组装成T@D-siRRS1 NPs。TCPP是一种常用的声敏剂，在超声的辐照下可以产生¹O₂^[30]；本研究发现T@D-siRRS1 NPs同样具备良好的¹O₂产生能力可用于SDT。T@D-siRRS1 NPs与结肠癌细胞共培养4 h后，能有效被细胞摄取。接下来，通过Western blot、qRT-PCR验证了siRRS1的转染效率，说明T@D-siRRS1 NPs是个较好的基因载体可用于基因治疗。最后，通过MTT、细胞流式术、体外动物实验进一步研究发现T@D-siRRS1 NPs具备良好的抗肿瘤特性。

综上，本研究发现RRS1有望成为结肠癌患者预后不良的生物学标志物、并可能成为结肠癌治疗的新靶点。T@D-siRRS1 NPs具有安全、稳定和生物相容性，可实现SDT联合基因协同治疗恶性肿瘤。该工作为肿瘤治疗药物的设计提供了新的思路。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：肖志刚负责论文设计、基金提供；李琢负责基因部分实验、数据分析，文章撰写；陈真、王华强负责材料部实验、数据分析等。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- [2] Bours MJ, Beijer S, Winkels RM, et al. Dietary changes and dietary supplement use, and underlying motives for these habits reported by colorectal cancer survivors of the Patient Reported Outcomes

- Following Initial Treatment and Long-Term Evaluation of Survivorship (PROFILES) registry[J]. *Br J Nutr*, 2015, 114(2):286–296. doi:10.1017/S0007114515001798.
- [3] Gulbake A, Jain A, Jain A, et al. Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(2):582–599. doi:10.3748/wjg.v22.i2.582.
- [4] Khan FA, Albalawi R, Pottou FH. Trends in targeted delivery of nanomaterials in colon cancer diagnosis and treatment[J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1):227–258. doi:10.1002/med.21809.
- [5] Xu F, Hu M, Liu C, et al. Yolk-structured multifunctional up-conversion nanoparticles for synergistic photodynamic-sonodynamic antibacterial resistance therapy[J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(4):678–685. doi:10.1039/c7bm00030h.
- [6] Xing XJ, Zhao SJ, Xu T, et al. Advances and perspectives in organic sonosensitizers for sonodynamic therapy[J]. *Coord Chem Rev*, 2021, 445:214087. doi:10.1016/j.ccr.2021.214087.
- [7] Pu Y, Yin H, Dong C, et al. Sono-controllable and ROS-sensitive CRISPR-Cas9 genome editing for augmented/synergistic ultrasound tumor nanotherapy[J]. *Adv Mater*, 2021, 33(45):e2104641. doi:10.1002/adma.202104641.
- [8] Wang X, Zhong X, Bai L, et al. Ultrafine titanium monoxide (TiO_{1+x}) nanorods for enhanced sonodynamic therapy[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(14):6527–6537. doi:10.1021/jacs.9b10228.
- [9] Tsuno A, Miyoshi K, Tsujii R, et al. RRS1, a conserved essential gene, encodes a novel regulatory protein required for ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(6):2066–2074. doi:10.1128/MCB.20.6.2066–2074.2000.
- [10] Zhang JY, Harnpicharnchai P, Jakovljevic J, et al. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(20):2580–2592. doi:10.1101/gad.1569307.
- [11] Hua YN, Song JL, Peng CX, et al. Advances in the relationship between regulator of ribosome synthesis 1 (RRS1) and diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 620925. doi: 10.3389/fcell.2021.620925.
- [12] Zhang Y, Sun BM, Zhao LB, et al. Up-regulation of miRNA-148a inhibits proliferation, invasion, and migration while promoting apoptosis of cervical cancer cells by down-regulating RRS1[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20181815. doi: 10.1042/BSR20181815.
- [13] Xia WF, Liu Y, Cheng T, et al. Down-regulated lncRNA SBF2-AS1 inhibits tumorigenesis and progression of breast cancer by sponging microRNA-143 and repressing RRS1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):18. doi:10.1186/s13046-020-1520-5.
- [14] Wang JT, Li Z, Zuo CZ, et al. Knockdown of RRS1 by lentiviral-mediated RNAi promotes apoptosis and suppresses proliferation of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(4): 2166–2172. doi:10.3892/or.2017.5906.
- [15] Blázquez-Castro A. Direct IO₂ optical excitation: a tool for redox biology[J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 39–59. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.011.
- [16] Han SB, Wang DC, Huang Y, et al. A reciprocal feedback between colon cancer cells and Schwann cells promotes the proliferation and metastasis of colon cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1):348. doi:10.1186/s13046-022-02556-2.
- [17] Jia SN, Han YB, Yang R, et al. Chemokines in colon cancer progression[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 3):400–407. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.02.007.
- [18] Song J, Ma Z, Hua Y, et al. Functional role of RRS1 in breast cancer cell proliferation[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(12):6304–6313. doi:10.1111/jcmm.13922.
- [19] Cao P, Yang A, Li P, et al. Genomic gain of RRS1 promotes hepatocellular carcinoma through reducing the RPL11-MDM2-p53 signaling[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(35): eabf4304. doi: 10.1126/sciadv.abf4304.
- [20] Zhang X, Cong P, Tian L, et al. Genomic gain/methylation modification/hsa-miR-132-3p increases RRS1 overexpression in liver hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(11):4329–4342. doi:10.1111/cas.15933.
- [21] Wu XL, Yang ZW, He L, et al. RRS1 silencing suppresses colorectal cancer cell proliferation and tumorigenesis by inhibiting G2/M progression and angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 82968–82980. doi:10.18632/oncotarget.20897.
- [22] Jiang S, Liu CC, He QJ, et al. Porphyrin-based metal—organic framework nanocrystals for combination of immune and sonodynamic therapy[J]. *Nano Res*, 2023, 16(7):9633–9641. doi: 10.1007/s12274-023-5477-5.
- [23] Yu C, Li L, Hu P, et al. Recent advances in stimulus-responsive nanocarriers for gene therapy[J]. *Adv Sci*, 2021, 8(14): 2100540. doi:10.1002/advs.202100540.
- [24] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(12 Pt 1):6387–6392.
- [25] Dong L, Li YN, Cong HL, et al. A review of chitosan in gene therapy: developments and challenges[J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 324:121562. doi:10.1016/j.carbpol.2023.121562.
- [26] Li GG, Zhang Y, Li JB. A hybrid nanoassembly for ultrasound-inducible cytosolic siRNA delivery and cancer sono-gene therapy[J]. *Ultrason Sonochem*, 2023, 92: 106262. doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106262.
- [27] Zhu J, Chu CC, Li DS, et al. Fe(III)-porphyrin sonotheranostics: a

- green triple-regulated ROS generation nanoplatform for enhanced cancer imaging and therapy[J]. *Adv Funct Materials*, 2019, 29(36): 1904056. doi:10.1002/adfm.201904056.
- [28] Wu SY, Zhang JZ, Pan J, et al. Integrated nanorod-mediated PD-L1 downregulation in combination with oxidative-stress immunogene therapy against cancer[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(17): e2300110. doi:10.1002/adhm.202300110.
- [29] Chen YZ, Pang E, Peng R, et al. Cationic polythiophene as gene carrier and sonosensitizer for sonodynamic synergic gene therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2024, 10(7):4601-4611. doi:10.1021/acsbiomaterials.4c00704.
- [30] Chen YZ, Tan QX, Tang YY, et al. Sorafenib and tetrakis (4-carboxyphenyl) porphyrin assembled nanoparticles for synergistic targeted chemotherapy and sonodynamic therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomater Sci*, 2024, 12(7):1864-1870. doi:10.1039/d3bm01994b.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:李琢,陈真,王华强,等. 纳米颗粒递送 siRNA 联合声动力疗法协同治疗结肠癌的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(10):1654-1666. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.012

Cite this article as: Li Z, Chen Z, Wang HQ, et al. Nanoparticle-delivered siRNA combined with sonodynamic therapy for colon cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2024, 33(10):1654-1666. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.012

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕4个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M (IQR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理地解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)应尽可能给出具体的 P 值(如 $P=0.0238$); 当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出95%置信区间。

中国普通外科杂志编辑部