共载阿霉素与小干扰RNA的脂质介孔硅纳米粒的制备表征及抗多药耐药肿瘤细胞研究Δ

张梦玮[1,2*]，杨硕晔[1,2#]，杨亚南[1,2]，王振威[1,2]，屈凌波[1,3]（1.河南工业大学生物工程学院，郑州 450001；2.郑州市生物医药功能分子重点实验室，郑州 450001；3.郑州大学化学与分子工程学院，郑州 450001）

中图分类号 R944.9；R979.1 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2022）23-2880-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.23.12

摘 要 目的 制备共载阿霉素（DOX）与小干扰RNA（siRNA）的脂质介孔硅纳米粒（CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA），并对其进行表征及抗多药耐药肿瘤细胞研究。**方法** 先以介孔硅纳米粒（MSNs）为基础制备MSNs-SS-NH_2@DOX，并以阳离子脂质体（CLs）对其包覆制得CLMSNs-SS-NH_2@DOX，进一步负载siRNA即得CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA。测定该制剂粒径及Zeta电位，观察其微观形态并进行差示扫描量热分析、X射线衍射分析、红外光谱分析、物理吸附分析；测定该制剂在不同pH条件下（pH5.0、pH7.4）及不同谷胱甘肽浓度下（0、2、5、10 mmol/L）DOX的体外释放度；考察该制剂对耐DOX型乳腺癌细胞MCF-7/ADR摄取、迁移、凋亡、周期及P-糖蛋白（P-gp）表达的影响。**结果** CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA结构清晰，表面脂膜层明显，粒径为（197.63±3.75）nm，Zeta电位为（20.64±0.98）mV，理化性质良好。体外释放结果显示，CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA具有良好的pH/还原双重响应释药特性。细胞实验结果显示，经CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA干预后，MCF-7/ADR细胞的药物摄取显著增强，迁移率和P-gp表达水平均显著降低，总凋亡比例和G_0/G_1期所占比例均显著升高（$P<0.05$）。**结论** 本研究成功制备同时负载DOX和siRNA的CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA；该制剂理化性质良好，具有pH/还原双重响应释药特性，且可通过下调P-gp表达逆转MCF-7/ADR细胞多药耐药。

关键词 介孔硅；小干扰RNA；阿霉素；抗肿瘤；多药耐药

Preparation and characterization of doxorubicin and siRNA co-loaded CLMSNs and study on anti-multidrug-resistant tumor cells

ZHANG Mengwei[1,2], YANG Shuoye[1,2], YANG Yanan[1,2], WANG Zhenwei[1,2], QU Lingbo[1,3] (1. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2. Zhengzhou Key Lab of Biomedical Functional Molecules, Zhengzhou 450001, China; 3. College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To prepare lipid-coated mesoporous silica nanoparticles (CLMSNs) co-loaded with doxorubicin (DOX) and siRNA (CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA), and to characterize it and study anti-multidrug-resistant tumor cells. **METHODS** MSNs-SS-NH_2@DOX was prepared on the basis of mesoporous silica (MSNs), covered with cationic liposomes (CLs) to synthesize CLMSNs-SS-NH_2@DOX, and then obtain CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA by co-loading with siRNA. The particle size and Zeta potential of the preparation were determined, and its micromorphology was observed; differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, infrared spectroscopy and physical adsorption analysis were conducted. The *in vitro* release of DOX from the preparation was determined under different pH conditions (pH5.0, pH7.4) and different glutathione concentrations (0, 2, 5, 10 mmol/L). The effects of this preparation on the uptake, migration, apoptosis, cycle and P-glycoprotein (P-gp) expression of MCF-7/ADR in DOX-resistant breast cancer cells were investigated. **RESULTS** CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA had a clear core-shell structure, obvious lipid membrane layer, particle size of (197.63±3.75) nm, Zeta potential of (20.64±0.98) mV, and with good physical and chemical properties. *In vitro* release results showed that CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA possessed good pH/reduction double-response. The results of cell experiment showed that after intervened with CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA, the fluorescence intensity of MCF-7/ADR cells was significantly enhanced, the migration rate and P-gp expression level were significantly reduced, while total proportion of apoptosis and that of G_0/G_1 phase were significantly increased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** In this study, DOX and siRNA co-loaded CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA is prepared successfully, which has good physical and chemical properties, pH/reduction double-response properties. It can reverse the multidrug resistance of MCF-7/ADR cells by down-regulation of P-gp expression.

KEYWORDS mesoporous silica; siRNA; doxorubicin; anti-tumor; multidrug resistance

Δ **基金项目** 河南省高等学校青年骨干教师培养计划（No. 2020GGJS090）；河南工业大学青年骨干教师培育计划（No.21420075）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：新型抗肿瘤复合纳米药物递送系统。E-mail：zmw15649858235@163.com

＃**通信作者** 副教授，硕士生导师。研究方向：功能性纳米材料与药物递送系统。E-mail：yangshuoyecpu@163.com

对于乳腺癌等恶性肿瘤，以阿霉素（doxorubicin，DOX）为代表的化学药治疗仍是目前临床上常用的治疗手段，但随着药物的反复使用，多药耐药（multiple drug resistance，MDR）已成为化疗失败的一个重要诱因。*MDR*1基因过表达是引发MDR的主要原因，其编码的P-糖蛋白（P-glycolprotein，P-gp）介导的药物外排是经典的耐药机制[1－2]。纳米载体可通过高渗透长滞留效应积聚于肿瘤部位，且具有功能化程度高、生物相容性好等优点[3]。根据肿瘤微环境特性开发出的刺激响应型纳米载药系统，当其受到如微酸性、高水平谷胱甘肽（glutathione，GSH）等微环境刺激时会迅速进入活化状态，载体结构发生改变，可在抑制MDR型肿瘤P-gp表达的同时，实现化疗药物的持续控释，从而协同增强对MDR型肿瘤的治疗效果[4－5]。

肿瘤细胞内通常呈现微酸性，且GSH水平为正常组织细胞的3倍以上[6]，故可利用还原性差异设计出对高水平GSH敏感的还原响应型纳米载体。氧化还原反应会促进纳米载体的降解，有效降低材料对细胞的毒性，常见的还原敏感键主要有二硫键（－SS－）、二硒键等，其中－SS－和GSH会发生氧化还原反应，从而导致自身被还原为巯基，使载体降解而释放化疗药物，进而实现在肿瘤组织部位的靶向控释[7－8]。基于此，本文以介孔硅纳米粒（mesoporous silica nanoparticles，MSNs）为基础制备MSNs-SS-NH_2@DOX，并以阳离子脂质体（cationic liposomes，CLs）对其包覆制得CLMSNs-SS-NH_2@DOX，进一步负载小干扰RNA（siRNA，可下调耐药细胞中P-gp的表达，有效逆转肿瘤MDR，提高抗肿瘤效果[9]）得到CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA复合载药系统；再以耐DOX型乳腺癌细胞MCF-7/ADR为研究对象，考察该制剂抗MDR型肿瘤细胞的作用，以期为其开发及后续临床应用提供参考。

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用主要仪器有JEM-2100F型透射电子显微镜（日本Hitachi公司），Nano ZS90s型纳米粒度仪（英国Malvern公司），ASAP 2460型物理吸附仪（美国麦克公司），Nicolet IS10型傅里叶红外光谱仪、Attune NxT型流式细胞仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），2695型高效液相色谱仪（美国Waters公司），Axio observer3型荧光显微镜（德国Zeiss公司），DSC214型差示扫描量热仪（德国耐驰公司），D8型X射线衍射仪（德国布鲁克公司）。

1.2　主要药品与试剂

DOX原料药（批号N1111A，含量＞98%）、DOX对照品（批号N1111AS，含量＞99%）购自大连美仑生物技术有限公司；十六烷基三甲基溴化铵、3-氨丙基三乙氧基硅烷（APTES）、乙二酸酐、二乙醇胺、硅酸四乙酯、异硫氰酸荧光素（FITC）均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；二油酰基三甲胺丙烷甲基硫酸盐（DOTAP）、二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）、二棕榈酰磷脂酰甘油（DPPG）均购自美国Avanti公司；Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司；兔源P-gp一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗购自美国LI-COR公司；siRNA由宁波康贝生化有限公司合成。

1.3　细胞

耐DOX型乳腺癌MCF-7/ADR细胞由河南工业大学生物工程学院细胞功能调控创新实验室提供。

2　方法与结果

2.1　CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的制备

采用模板剂法[10]制备MSNs。取100 mg MSNs置于10 mL无水乙醇中，超声（功率50 W，频率40 kHz，下同）20 min后加入2 mL APTES，并于60 ℃反应20 h，离心收集沉淀，真空干燥即得MSNs-NH_2。向100 mg MSNs-NH_2中加入10 mL丙酮，30 min后逐滴加入5 mL含有1.5 mol/L乙二酸酐的丙酮溶液，室温下搅拌24 h，所得沉淀即为MSNs-COOH。向100 mg MSNs-COOH中加入20 mL磷酸盐缓冲液（pH5.0）、75 mg 1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳化二亚胺盐酸盐、75 mg *N*-羟基琥珀酰亚胺，搅拌活化2 h后，向其中加入1 g半胱氨酸盐酸盐，在氮气保护条件下于35 ℃搅拌24 h，离心收集沉淀即得MSNs-SS-NH_2。取MSNs-SS-NH_2与DOX适量（两者质量比为2∶1），搅拌24 h后即得MSNs-SS-NH_2@DOX。

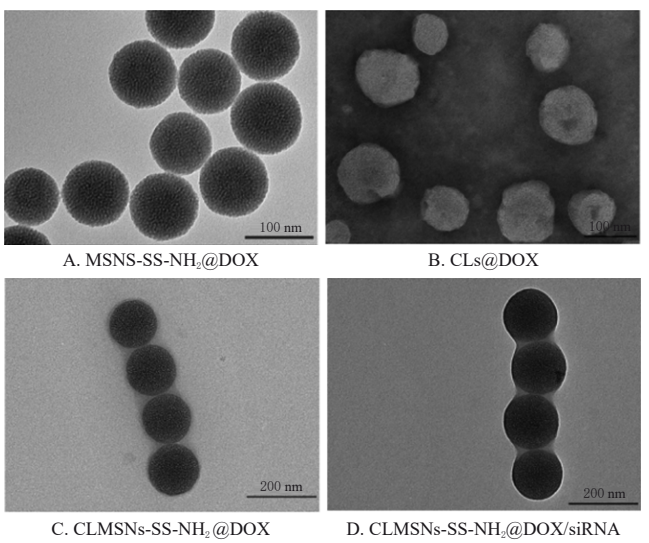
取100 mg DOTAP、50 mg胆固醇、30 mg DPPG、30 mg DSPC、8 mL氯仿，超声溶解后缓慢旋蒸成膜，即得CLs。取CLs与DOX适量（两者质量比为2∶1）超声融合5 min，即得CLs@DOX。将CLs分别与上述所得MSNs-SS-NH_2、MSNs-SS-NH_2@DOX溶液混合并超声后，即得CLMSNs-SS-NH_2、CLMSNs-SS-NH_2@DOX。将干粉状siRNA离心10 min后溶于375 μL DEPC水中，然后与CLMSNs-SS-NH_2@DOX涡旋混匀，即得CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA（现用现配），并以50 nmol为siRNA的最佳负载量。

2.2　CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的表征

2.2.1　粒径及Zeta电位分析　将适量MSNs-SS-NH_2@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH_2@DOX和CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA分散于去离子水中超声均匀，测定其粒径和Zeta电位。结果显示，MSNs-SS-NH_2@DOX的粒径为（153.73±15.6）nm，Zeta电位为（35.13±0.73）mV，多分散性指数（polydispersity index，PDI）良好。因CLs@DOX表面存在大量正电荷且粒径[（168.77±3.84）nm]较MSNs-SS-NH_2@DOX有所增大，故经CLs包埋后CLMSNs-SS-NH_2@DOX的粒径[（160.03±7.13）nm]增大且Zeta电位增大至（104.83±1.86）mV，这说明CLs可有效包覆于MSNs-SS-NH_2表面。进一步负载siRNA后，CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的粒径[（197.63±3.75）nm]增大，且由于核酸呈

负电性，故使其Zeta电位略有降低，这提示CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA可与静息状态下呈负电性的细胞相互吸引，以提高细胞摄取效率。

2.2.2　微观形态分析　分别取MSNs-SS-NH_2@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH_2@DOX和CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA适量分散于95%乙醇中，然后分别滴于铜网上，经充分干燥后，采用透射电子显微镜进行观察。结果显示，MSNs-SS-NH_2@DOX的介孔结构清晰，粒径均一，分散性较好；其经CLs包覆后，所得CLMSNs-SS-NH_2@DOX表面出现一层透明脂膜；进一步负载siRNA后，CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA结构清晰，表面脂膜层明显，这说明该纳米载体构建成功。结果见图1。



A. MSNS-SS-NH_2@DOX　B. CLs@DOX

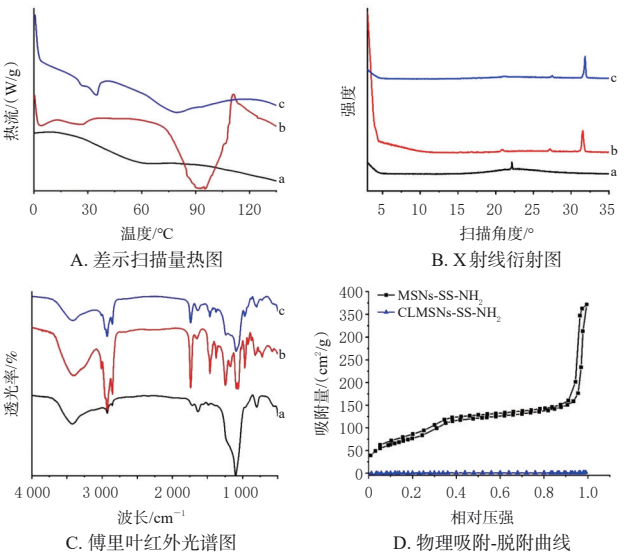
C. CLMSNs-SS-NH_2@DOX　D. CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA

图1　不同修饰型纳米载体的透射电子显微图

2.2.3　差示扫描量热分析　分别取MSNs-SS-NH_2@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA适量置于差示扫描量热仪中，设置升温速率为7 ℃/min，在N_2保护条件下检测各样品在－50～300 ℃范围内的吸放热峰形。结果显示，MSNs-SS-NH_2@DOX在60 ℃处有一明显吸热峰，表明其在该温度下可由不定形状态转变为结晶态。CLs@DOX在90 ℃处有一明显吸热峰，表明其可由固态转变为凝胶态。MSNs-SS-NH_2@DOX经CLs包埋后相变温度约为75 ℃，相较于原始相变温度有所提高，表明以CLs包埋可提高MSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的热稳定性。结果见图2A。

2.2.4　X射线衍射分析　分别取MSNs-SS-NH_2@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的干燥粉末适量，置于X射线衍射光谱仪中检测。结果显示，MSNs-SS-NH_2@DOX在22°处有一个特征吸收峰，CLs@DOX在32°处有一个特征吸收峰，CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA在22°和32°处均有特征吸收峰，这表明CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA已成功构建。结果见图2B。

2.2.5　红外光谱分析　分别取MSNs-SS-NH_2@DOX、CLs@DOX、CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的干燥粉末适量与溴化钾粉末混合，充分研磨均匀后，置于傅里叶红外光谱仪上检测。结果显示，MSNs-SS-NH_2@DOX在1 680 cm^{-1}处出现－SS－特征吸收峰，这表明－SS－成功连接至MSNs表面。CLs在2 930、2 850 cm^{-1}处均出现长链脂肪酸C－H伸缩振动峰。经CLs包埋后，CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA在1 240 cm^{-1}处的P＝O伸缩振动峰变宽，且位于3 500 cm^{-1}处的硅醇基团的伸缩峰有所减弱，这表明CLs可包覆于MSNs-SS-NH_2@DOX表面。结果见图2C。



A. 差示扫描量热图　B. X射线衍射图

C. 傅里叶红外光谱图　D. 物理吸附-脱附曲线

a：MSNs-SS-NH_2@DOX；b：CLs@DOX；c：CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA

图2　不同修饰型纳米载体的差示扫描量热图、X射线衍射图、傅里叶红外光谱图及物理吸附-脱附曲线

2.2.6　物理吸附分析　分别取MSNs-SS-NH_2、CLMSNs-SS-NH_2的干燥粉末适量，于氮气环境中置于物理吸附仪上进行检测。结果显示，MSNs-SS-NH_2的物理吸附-脱附曲线下面积最大。经CLs包覆后，CLMSNs-SS-NH_2的物理吸附-脱附曲线下面积减小，这表明CLs已成功包裹于MSNs-SS-NH_2表面。结果见图2D。

2.3　CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的体外释放度测定

采用高效液相色谱法[11]测定CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA在不同pH条件下（pH5.0、pH7.4）及不同GSH浓度下（0、2、5、10 mmol/L）DOX的体外释放度。结果显示，在同一pH条件下，CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA中DOX的释放度与GSH的浓度成正比，且在pH5.0条件下DOX的释放度均高于pH7.4条件下，这表明CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA具有良好的pH/还原双重响应释药特性。结果见图3。

2.4　CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的细胞实验考察

2.4.1　细胞摄取的考察　将对数生长期的MCF-7/ADR细胞以1×10^4个/孔接种于12孔板中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养24 h后，弃去培养基，然后分为DOX组、MSNs-SS-NH_2@DOX组、CLs@DOX组、CLMSNs-SS-NH_2@DOX组和CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA组，各

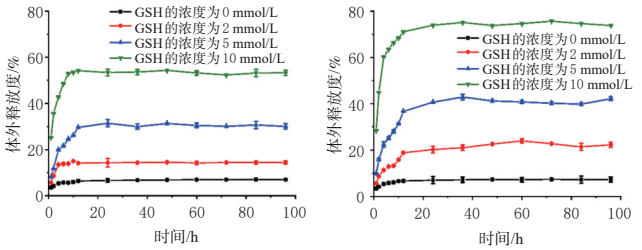


图3　不同pH条件下CLMSNs-SS-NH_2@DOX中DOX的体外释放度

组DOX的含量均为5 μg/mL（浓度根据前期预实验结果设置）。每组设3个复孔。各组加入相应含药培养基避光孵育12 h，以10 μg/mL Hochest33342染色30 min，再以磷酸盐缓冲液洗涤2～3次后，于倒置荧光显微镜下观察细胞的摄取情况，并采用Image J 1.48v软件对DOX的荧光强度进行定量分析。采用SPSS 25.0软件进行统计学分析，数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验，检验水准$\alpha=0.05$。结果显示，与DOX组（荧光强度为0）比较，其余各组细胞荧光强度（分别为27.7±1.7、31.2±1.8、159.7±10.3、193.7±7.6）均显著增强（$P<0.05$），且CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA组细胞荧光强度最强，这提示CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA的介导入胞能力最强。结果见图4。

2.4.2　细胞迁移的考察　将MCF-7/ADR细胞以5×10^3个/孔接种于24孔板中，分为对照组、DOX组、MSNs-SS-NH_2@DOX组、CLs@DOX组、CLMSNs- SS-NH_2@DOX组、CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA组，各组DOX的含量均为5 μg/mL。每组设3个复孔。各组加入相应含药培养基后，用200 μL移液管尖划过各孔孔底形成垂直伤口，采用显微镜观察培养0 h和24 h时的细胞迁移情况。结果显示，培养24 h后，对照组划痕明显变窄，MCF-7/ADR细胞的迁移率为（35.0±0.56）%，表明MCF-7/ADR细胞具有较强的迁移能力，其余各组MCF-7/ADR细胞的迁移率[分别为（20.0±0.45）%、（21.30±0.72）%、（18.00±0.23）%、（15.80±0.42）%、（8.00±0.34）%]较对照组均显著降低（$P<0.05$），且CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA组细胞迁移率最低，表明CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA可显著抑制MCF-7/ADR细胞迁移。结果见图5。

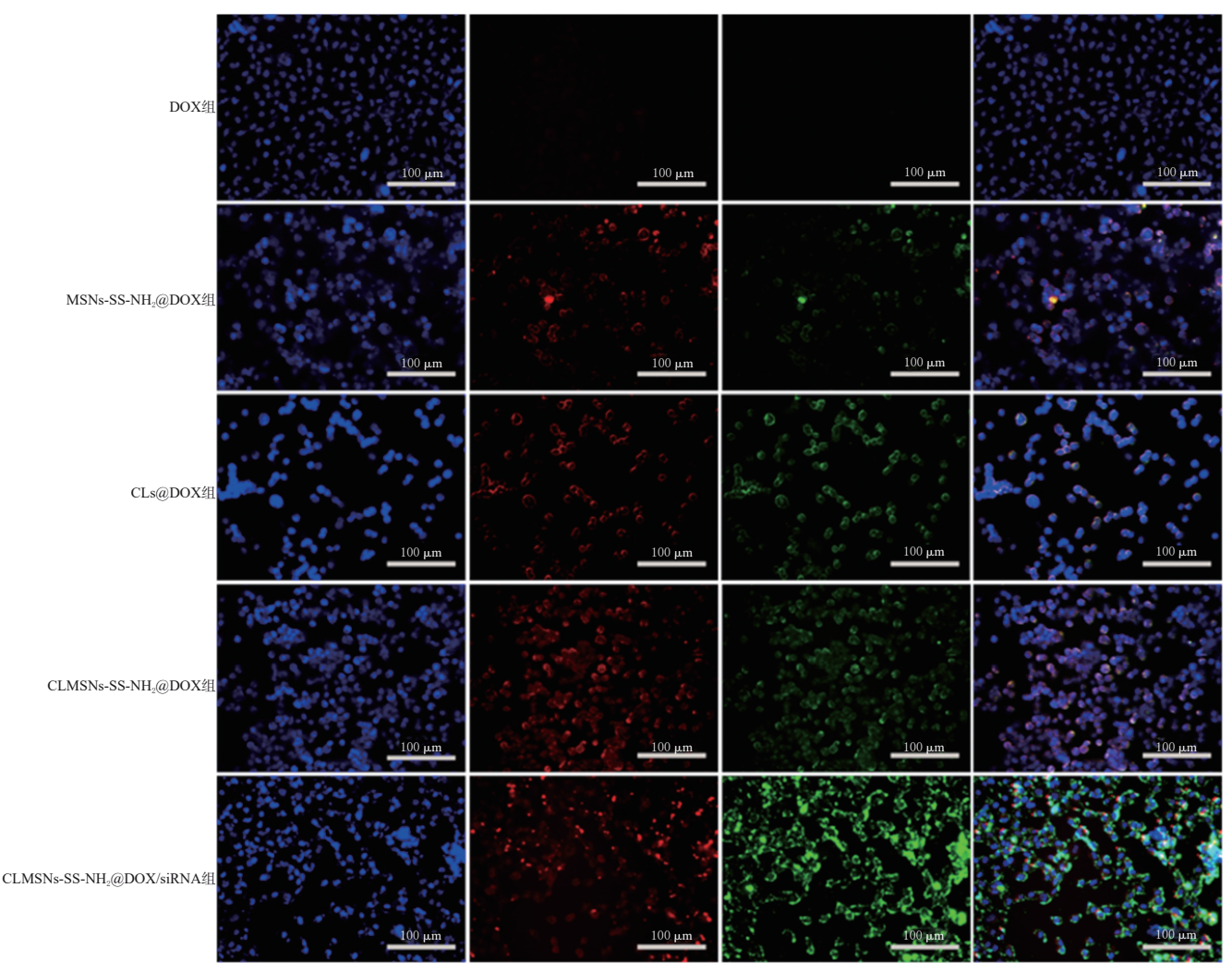


图4　各组MCF-7/ADR细胞摄取情况的荧光显微图

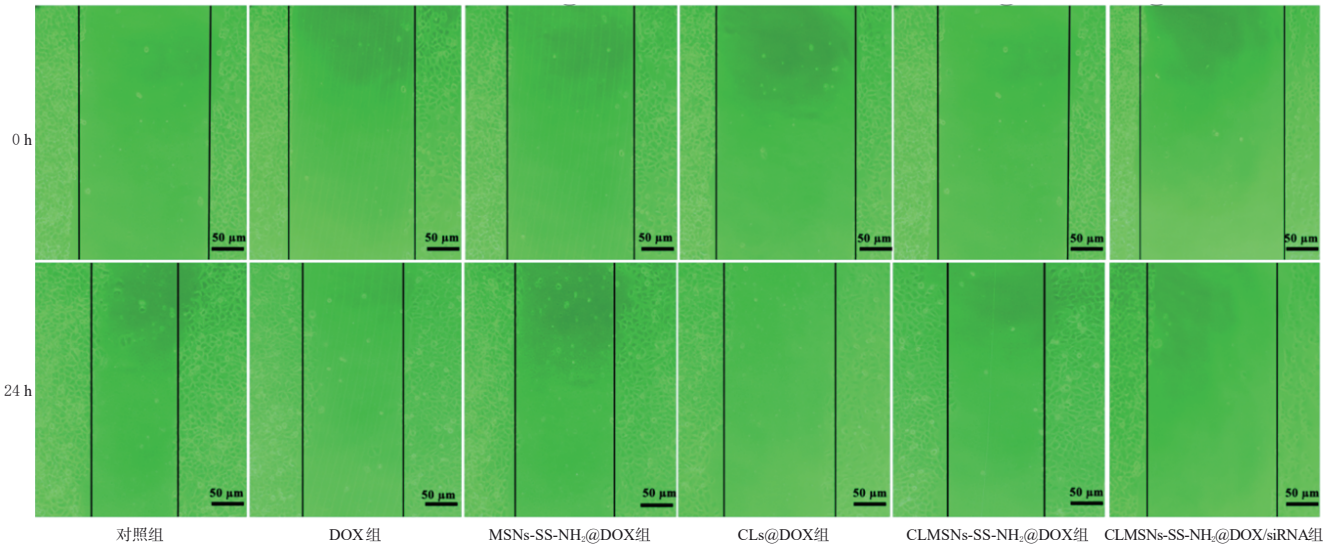


图5　各组MCF-7/ADR细胞的迁移情况

2.4.3　细胞凋亡的考察　将MCF-7/ADR细胞以2×10^{4}个/孔接种于6孔板，按“2.4.2”项下方法分组与给药，每组设3个复孔。继续培养24 h后收集细胞沉淀，加入500 μL结合液重悬均匀，分别加入5 μL Annexin Ⅴ-FITC和碘化丙啶（PI）染色液，室温孵育10 min后，采用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。结果显示，培养24 h后，对照组MCF-7/ADR细胞的总凋亡比例为（10.19±0.56）%，其余各组MCF-7/ADR细胞的总凋亡比例[分别为（18.84±0.25）%、（18.84±0.45）%、（24.86±0.75）%、（30.55±1.08）%、（40.90±0.78）%]较对照组均显著升高（P<0.05），且CLMSNs-SS-NH$_2$@DOX/siRNA组细胞总凋亡比例最高，表明CLMSNs-SS-NH$_2$@DOX/siRNA可促进MCF-7/ADR细胞凋亡。结果见图6。

2.4.4　细胞周期的考察　将MCF-7/ADR细胞以2×10^{4}个/孔接种于6孔板中，按“2.4.2”项下方法分组与给药，每组设3个复孔。继续培养24 h后收集细胞沉淀，以磷酸盐缓冲液洗涤1～2次后，于4 ℃条件下以1 mL 75%乙醇固定过夜；离心弃上清液，以磷酸盐缓冲液洗涤2次，加入500 μL PI染色液，于37 ℃避光培养30 min后，采用流式细胞仪检测各组细胞周期。结果显示，培养24 h后，对照组MCF-7/ADR细胞G_0/G_1期所占比例为（21.00±0.65）%，其余各组MCF-7/ADR细胞G_0/G_1期所占比例[分别为（35.40±1.12）%、（37.85±0.95）%、（42.33±1.37）%、（45.50±0.57）%、（63.90±2.37）%]较对照组均显著升高（P<0.05），且CLMSNs-SS-NH$_2$@DOX/siRNA组细胞G_0/G_1期所占比例最高，表明CLMSNs-SS-NH$_2$@DOX/siRNA可将MCF-7/ADR细胞的生长周期明显阻滞于G_0/G_1期，以增强逆转肿瘤细胞MDR的效果。

2.4.5　细胞中P-gp表达的考察　将MCF-7/ADR细胞以2×10^{4}个/孔接种于6孔板中，按“2.4.2”项下方法分组与给药，每组设3个复孔。继续培养24 h后收集细胞沉淀，

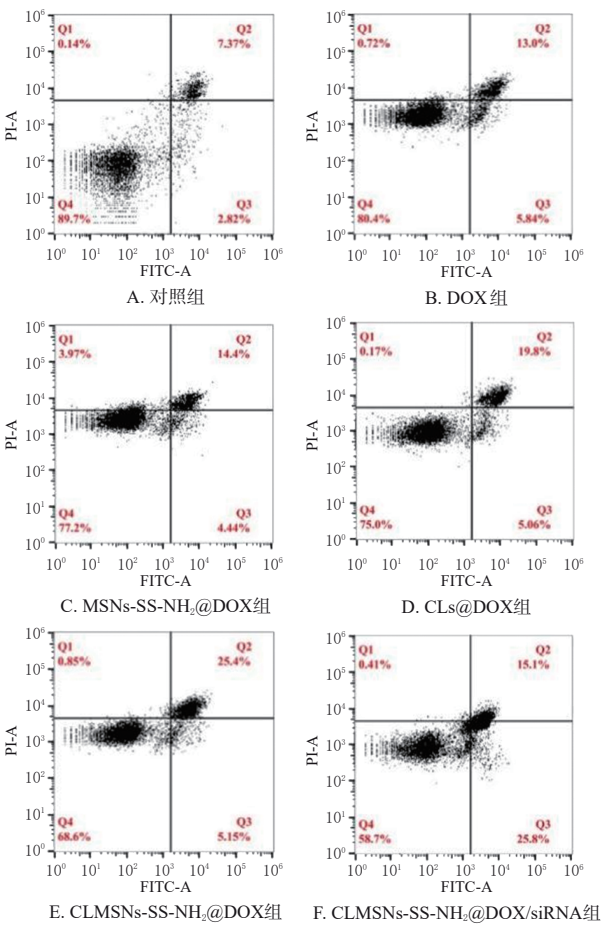
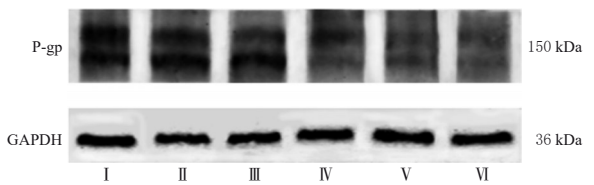


图6　各组MCF-7/ADR细胞的凋亡流式细胞图

置于冰上裂解15 min，提取总蛋白。蛋白经变性后，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，室温封闭，加入P-gp抗体（稀释度为1∶1 000），4 ℃孵育18 h；常温闭光孵育二抗（稀释度为1∶15 000）1 h，洗膜；采用双色红外激光成像系统显色，以GAPDH作为内参，采用Image J 1.48v软件分析目的蛋白灰度值，以目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达

水平。结果显示，与对照组（灰度值比值为1）和DOX组（灰度值比值为0.93±0.08）比较，其余各组MCF-7/ADR细胞中P-gp表达水平（灰度值分别为0.82±0.03、0.75±0.05、0.45±0.03、0.39±0.02）均显著降低（$P<0.05$），且CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA组MCF-7/ADR细胞中P-gp表达水平最低，表明该制剂递送的外源siRNA可被有效内化，从而下调P-gp的表达，逆转MCF-7/ADR细胞MDR。结果见图7。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：DOX组；Ⅲ：MSNs-SS-NH_2@DOX组；Ⅳ：CLs@DOX组；Ⅴ：CLMSNs-SS-NH_2@DOX组；Ⅵ：CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA组

图7　各组MCF-7/ADR细胞中P-gp蛋白表达的电泳图

3　讨论

MSNs-SS-NH_2具有中空介孔结构及较大的比表面积，以CLs对其包覆后，制得的CLMSNs-SS-NH_2复合载体具有更好的生物相容性，可提高药物装载量，并使药物积聚于肿瘤部位释放。另外，由于CLs带正电荷可有效将呈弱负电性的siRNA以静电吸附方式荷载[12—13]，从而制得同时负载DOX和siRNA的CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA，该制剂理化性质良好，且具有良好的pH/还原双重响应释药特性。这可能是由于在酸性环境中该制剂脂膜层更容易被破坏，进一步在肿瘤微环境中促使－SS－断裂，进而使DOX在肿瘤细胞内积聚释放[14—16]。细胞实验结果显示，CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA可将DOX和siRNA有效递送至MCF-7/ADR细胞内，进而抑制细胞迁移增殖，促进细胞凋亡，阻滞细胞于G_0/G_1期，并下调P-gp的表达以逆转肿瘤细胞MDR。

综上所述，本研究成功制备同时负载DOX和siRNA的CLMSNs-SS-NH_2@DOX/siRNA；该制剂理化性质良好，具有pH/还原双重响应释药特性，且可通过下调P-gp表达逆转MCF-7/ADR细胞MDR。

参考文献

[1] 张滨旋，于涛. 纳米药物递送系统协同光热疗法治疗肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 肿瘤，2020，40(4)：299-304.

[2] YUAN Y，LIU J，YU X N，et al. Tumor-targeting pH/redox dual-responsive nanosystem epigenetically reverses cancer drug resistance by co-delivering doxorubicin and GCN_5 siRNA[J]. Acta Biomater，2021，135：556-566.

[3] TORCHILIN V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect[J]. Adv Drug Deliv Rev，2011，63(3)：131-135.

[4] 王诚淏，王鹤樵，马梦超，等. 刺激响应型纳米载体用于克服肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 中国药师，2021，24(9)：1712-1716.

[5] ZHANG M，LIU E G，CUI Y N，et al. Nanotechnology-based combination therapy for overcoming multidrug-resistant cancer[J]. Cancer Biol Med，2017，14(3)：212-227.

[6] GUO X S，CHENG Y，ZHAO X T，et al. Advances in redox-responsive drug delivery systems of tumor microenvironment[J]. J Nanobiotechnol，2018，16(1)：74.

[7] PARIS J L，VALLET-REGÍ M. Mesoporous silica nanoparticles for co-delivery of drugs and nucleic acids in oncology：a review[J]. Pharmaceutics，2020，12(6)：E526.

[8] YANG S Y，SONG S B，HAN K S，et al. Characterization，*in vitro* evaluation and comparative study on the cellular internalization of mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers[J]. Microporous Mesoporous Mater，2019，284：212-224.

[9] GUO N N，GAO C，LIU J，et al. Reversal of ovarian cancer multidrug resistance by a combination of LAH4-L1-siMDR1 nano complexes with chemotherapeutics[J]. Mol Pharm，2018，15(5)：1853-1861.

[10] 魏亚青，吕江维，任君刚，等. 介孔硅纳米材料的制备及其在药物缓控释中的应用进展[J]. 化学与生物工程，2019，36(11)：1-7.

[11] CHEN C，SUN W，WANG X L，et al. pH-responsive nanoreservoirs based on hyaluronic acid end-capped mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery[J]. Int J Biol Macromol，2018，111：1106-1115.

[12] WEN C J，SUNG C T，ALJUFFALI I A，et al. Nanocomposite liposomes containing quantum dots and anticancer drugs for bioimaging and therapeutic delivery：a comparison of cationic，PEGylated and deformable liposomes[J]. Nanotechnology，2013，24(32)：325101.

[13] LIU X S，SITU A，KANG Y N，et al. Irinotecan delivery by lipid-coated mesoporous silica nanoparticles shows improved efficacy and safety over liposomes for pancreatic cancer[J]. ACS Nano，2016，10(2)：2702-2715.

[14] JEONG U H，GARRIPELLI V K，JO S，et al. Potential of pH-sensitive polymer-anchored cationic liposomes for combinatorial anticancer therapy with doxorubicin and siRNA[J]. J Drug Deliv Sci Technol，2014，24(1)：27-32.

[15] PAN Q S，CHEN T T，NIE C P，et al. *In situ* synthesis of ultrathin ZIF-8 film-coated MSNs for codelivering bcl 2 siRNA and doxorubicin to enhance chemotherapeutic efficacy in drug-resistant cancer cells[J]. ACS Appl Mater Interfaces，2018，10(39)：33070-33077.

[16] 仝瑶. 透明质酸和叶酸双靶头修饰阳离子脂质体递送siRNA-Bcl-2治疗宫颈癌的研究[D]. 苏州：苏州大学，2020.

（收稿日期：2022-06-11　修回日期：2022-10-17）

（编辑：唐晓莲）