基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003578

可编辑DNA纳米花抑制LLC细胞增殖、迁移及侵袭的实验研究

曹宇超，廖洪建，胡　璨，郭佳俊，杜永洪
（重庆医科大学生物医学工程学院/超声医学工程国家重点实验室，重庆　400016）

【摘　要】目的：探究载有阿霉素（doxorubicin，DOX）和缺氧诱导因子-1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）反义寡核苷酸的DNA纳米花（DNA nanoflower，DF）对小鼠肺癌（lewis lung carcinoma，LLC）细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。**方法：**通过滚环扩增反应（rolling circle amplification，RCA）合成含有HIF-1α反义寡核苷酸的DHA-DF，并检测其物理特性；负载DOX后获得载DOX纳米花（DOX-loaded DNA nanoflower，DDF）。通过细胞计数试剂（cell counting kit-8，CCK-8）评价DHA-DDF对LLC细胞活性的影响；通过划痕实验和Transwell小室实验检测DHA-DDF对LLC细胞迁移及侵袭能力的影响；通过蛋白质印记实验和定量聚合酶链反应检测LLC细胞HIF-1α的表达水平。**结果：**DHA-DF为多孔花瓣状球形颗粒，粒径为（421.26±7.90）nm；与游离DOX和DA-DDF相比，经DHA-DDF处理后的LLC细胞HIF-1α蛋白及mRNA的表达量明显下降（均$P<0.05$），且其细胞活性、划痕愈合面积及侵袭细胞数目明显减少（均$P<0.05$）。**结论：**DHA-DDF能有效降低HIF-1α的表达并抑制LLC细胞的增殖、迁移和侵袭，有望为临床肿瘤治疗提供新的思路。

【关键词】DNA纳米花；缺氧；肺癌；反义寡核苷酸
【中图分类号】R734.2　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-11-10

An experimental study of editable DNA nanoflowers inhibiting the proliferation，migration and invasion of Lewis lung carcinoma cells

Cao Yuchao，Liao Hongjian，Hu Can，Guo Jiajun，Du Yonghong
（*State Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering，College of Biomedical Engineering，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effects on the proliferation，migration and invasion of Lewis lung carcinoma（LLC）cells induced by DNA nanoflowers（DFs）carrying doxorubicin（DOX）and hypoxia inducible factor-1α（HIF-1α）antisense oligonucleotides. ***Methods*：**DFs containing HIF-1α antisense oligonucleotides（DHA-DF）were synthesized by rolling circle amplification，and the physical properties of DHA-DF were examined. DOX was loaded into DFs to form DDF.We evaluated the cell viability of LLC cells treated with DHA-DDF by using Cell Counting Kit-8；assessed the effects of DHA-DDF on the migration and invasion of LLC cells by using scratch assay and Transwell assay；and measured the expression level of HIF-1α in LLC cells by Western blot and quantitative polymerase chain reaction. ***Results*：**DHA-DF appeared flower-like porous spherical particles with a size of（421.26±7.90）nm. Compare with free DOX and DA-DDF，DHA-DDF significantly decreased the mRNA and protein expression of HIF-1α in LLC cells，and significantly reduced cell viability，the area of wound healed and the number of invasive cells（all $P<0.05$）. ***Conclusion*：**DHA-DDF could effectively reduce the expression of HIF-1α，and inhibit the proliferation，migration and invasion of LLC cells，providing new ideas for clinical treatment of tumors.

【Key words】DNA nanoflower；hypoxia；lung cancer；antisense oligonucleotide

作者介绍：曹宇超，Email：610826991@qq.com，研究方向：肺癌靶向治疗。
通信作者：杜永洪，Email：duyonghong@cqmu.edu.cn。
基金项目：重庆市技术创新与应用发展专项面上资助项目（编号：cstc2019jscx-msxmX0255）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240925.1741.012（2024-09-26）

化疗是临床肺癌治疗的主要方式之一，其疗效往往受到实体肿瘤微环境的影响[1-3]，其中缺氧是肺癌耐药、转移的重要诱导因素之一[4]。缺氧诱导因子-1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）是一种与缺氧高度相关的蛋白，也是癌症进展与治疗的关

键转录因子[5]。HIF-1α不仅可以促进肿瘤细胞的增殖、侵袭转移以及血管异常[6]，还会通过诱导外排药物转运蛋白的表达增强肿瘤细胞的耐药性[7]。因此，抑制HIF-1α的表达有利于削弱肿瘤细胞的耐药性并提高化疗药物对肿瘤的治疗效果。目前已有多种技术被用于特异性抑制基因表达[8-9]，其中，反义技术是一种通过沃森-克里克碱基互补原理来干扰基因表达的手段，其最常使用的反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide，ASO）也被视作一种新型药物[10]。与传统药物相比，ASO直接在基因层面发挥作用，干扰蛋白质的翻译，具有高度特异性、合成简单等优点，因而备受关注[11]。

DNA纳米花（DNA nanoflower，DF）是一类以焦磷酸盐为核心的具有多孔花瓣状结构的DNA无机杂化纳米材料，具有良好的生物相容性、稳定性、pH响应性和核酸序列可编辑等特点[9,12]。DF表面致密缠绕的DNA长链能有效抵抗核酸酶的水解，亦可作为ASO、核酸酶等来抑制特定基因的表达[9]。阿霉素（doxorubicin，DOX）是一种临床常用的蒽环类化疗药物，被用于多种肿瘤的治疗[13-14]，可以通过氢键和静电吸附作用嵌入DNA碱基当中[12]。由此可见，DF可作为运输DOX和ASO的纳米载体，用于治疗肿瘤。

本研究制备含有AS1411适配体和HIF-1α ASO并载有化疗药物DOX的DNA纳米花（DHA-DDF），其具有靶向连接小鼠肺癌（lewis lung carcinoma，LLC）细胞、催化活性氧（reactive oxygen species，ROS）生成、抑制HIF-1α表达等功能，能有效抑制LLC细胞增殖、迁移及侵袭。本研究旨在应用该纳米载体高效且安全地递送药物，抑制LLC细胞HIF-1α的表达并削弱缺氧导致的耐药、远处转移等不利影响，为临床肿瘤治疗提供一种新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

本研究所用DNA模板及引物由上海生工生物工程股份有限公司代为合成与纯化，见表1；T4 DNA连接酶、DNA ladder购自北京Takara公司；dNTPs溶液购自上海生工生物工程股份有限公司；二苯基异苯并呋喃（1,3-diphenylisobenzofuran，DPBF）、异硫氰基荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记dUTP购自美国sigma-Aldrich公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、DMEM培养基购自美国Gibco公司；Phi29 DNA聚合酶、琼脂糖和DNA酶I（deoxyribonuclease I，DNase I）购自上海碧云天生物技术有限公司；细胞计数试剂（cell counting kit-8，CCK-8）购自日本Dojindo研究所；Falcon细胞培养小室购自美国Corning公司；Matrigel基质胶购自美国Invitrogen公司；产气厌氧袋购自日本三菱瓦斯化学株式会社；HIF-1α一抗（NB100-105）购自诺伟司国际贸易（上海）有限公司。

扫描电子显微镜（scanning electron microscopy，SEM）和能量色散X射线能谱（energy dispersive spectroscopy，EDS）购自日本Hitachi公司；马尔文激光粒度仪（dynamic light scattering，DLS）购自美国Zetasizer公司；激光共聚焦显微镜（confocal laser scanning microscopy，CLSM）购自日本Nikon公司；电感耦合等离子体原子发射光谱仪（inductively coupled plasma optical emission spectrometer，ICP-OES）、多功能酶标仪、恒温混匀仪购自美国Thermo Scientific科技公司；紫外分光光度计购自日本岛津制作所。

1.2 细胞来源及培养

LLC细胞株购自上海富衡生物科技有限公司，人支气管上皮样细胞系16HBE细胞株由重庆医科大学肿瘤学及表观遗传学实验室提供。LLC细胞和16HBE细胞均使用含10% FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基，在5% CO_2、37 ℃恒温湿润的条件下培养。

1.3 方法

1.3.1 DNA纳米花的制备及表征 DNA纳米花的制备流程见图1。

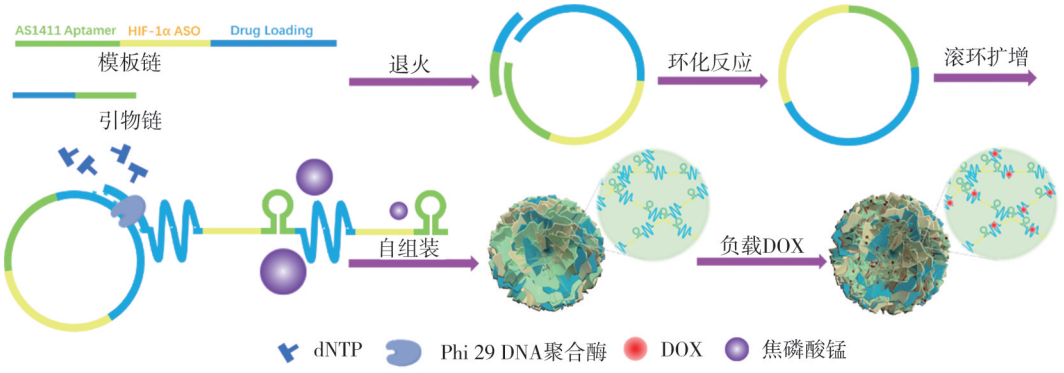


图1 载DOX的DNA纳米花的合成示意图

表1 DNA寡核苷酸模板序列

名 称	序列(5'~3')
DHA Template	Phosphate-TGCTGCGGCATATCGTACGATATGCCATAGCGATACGCGTATCGCTG
	CAGCTTGGACACTGGTGGCTCATTCCACCACCACCAACACCACCACCACC
DA Template	Phosphate-TGCTGCGGCATATCGTACGATATGCCATAGCGATACGCGTATCGCTG
	CAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCACCACCACCAACACCACCACCACC
DH Template	Phosphate-TGCTGCGGCATATCGTACGATATGCCATAGCGATACGCGTATCGCTG
	CAGCTTGGACACTGGTGGCTCATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
HA Template	Phosphate-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	AAAAAAATTGGACACTGGTGGCTCATTCCACCACCACCAACACCACCACCACC
DHA Primer	TATGCCGCAGCAGGTGGTGGTGGT
DH Primer	TATGCCGCAGCATTTTTTTTTTTT
HA Primer	TTTTTTTTTTTTGGTGGTGGTGGT
Drug Loading	TGCTGCGGCATATCGTACGATATGCCATAGCGATACGCGTATCGCTGCAGC
AS1411 aptamer	CCACCACCACCAACACCACCACCACC
HIF-1α ASO	TTGGACACTGGTGGCTCATT

1.3.1.1 环化反应 将DNA模板链(终浓度为1 μmol/L)和对应的引物链(终浓度为1.5 μmol/L)加入到T4核酸连接酶缓冲体系中,退火后加入T4 DNA连接酶(17.5 U/μL),于16 ℃反应13 h,65 ℃反应10 min使酶失活以终止反应。

1.3.1.2 滚环扩增反应 将环状DNA模板(0.5 μmol/L)、Phi29 DNA聚合酶(1 U/μL)、dNTP混合液(8 mmol/L)加入到RCA反应体系[50 mmol/L Tris-HCl,15 mmol/L $MnCl_2$,10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$,4 mmol/L DTT]中混匀。混合物置于恒温混匀仪上30 ℃反应10 h,最后加热至65 ℃反应10 min以终止反应。所得产物经10 000 r/min离心获取沉淀,去离子水洗涤3次后置于4 ℃冰箱保存。用表1所示模板分别制备DHA-DF、DH-DF、DA-DF、HA-DF。在RCA反应体系中加入FITC标记的dUTP,合成FITC-DHA-DF和FITC-DH-DF。

1.3.1.3 DNA纳米花的表征 2%琼脂糖凝胶电泳检测引物、模板、环化产物、RCA产物的相对分子量。DLS检测DHA-DF的粒径及电位。SEM观察DHA-DF的表观形貌并通过EDS分析其元素组成。

1.3.2 DNA纳米花的稳定性和pH响应性 为验证DHA-DF的血清稳定性和抗核酸酶降解能力,将DHA-DF与含10% FBS和10 U/mL DNase I的DMEM培养基混合,于37 ℃条件下孵育并在第12、24、36、48 h取样。为验证DHA-DF的pH响应性,将DHA-DF用MES(pH 5.5)溶液重悬,于12、24、36、48 h取样并调节pH至7.0。对上述样品进行2%琼脂糖凝胶电泳和DLS检测。

1.3.3 DNA纳米花的载药和释药 将DOX与DF共同孵育,于不同时间点离心获取上清液,使用紫外分光光度计测量233 nm处的吸光度(absorbance,A)值用以计算DHA-DF和HA-DF的载药率。同时测量DOX、DHA-DF、DHA-DDF的紫外光谱,CLSM观察FITC-DHA-DDF,以验证DOX的成功负载。将DHA-DDF沉淀用MES(pH 5.5)溶液重悬,于不同时间点(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、12.00、24.00、48.00 h)取上清液测量233 nm处的A值。上清液同时用ICP-OES测量Mn^{2+}的含量。DOX载药率、DOX释放率和Mn^{2+}释放率计算公式如下:DOX载药率(%)=DOX负载量/纳米花质量×100%;DOX释放率(%)=DOX释放量/DOX负载量×100%;Mn^{2+}释放率(%)=Mn^{2+}释放量/Mn^{2+}负载量×100%。

1.3.4 活性氧产生能力评价 将DPBF溶液分别与去离子水、DOX、$MnCl_2$、DHA-DDF(pH7.2)或DHA-DDF(pH5.5)混合,再加入H_2O_2溶液(终浓度为1.5%)。每3 min测定11次420 nm处的*A*值,将第x分钟的*A*值定义为I_x。根据体系中DPBF的消耗来评价催化活性氧产生的能力,计算公式如下:DPBF消耗率(%)=$(I_0-I_x)/I_0$×100%。

1.3.5 DNA纳米花的靶向性验证 将LLC细胞以1×10^5个/孔的密度接种于共聚焦皿中并孵育24 h,加入2 μg/mL FITC-DHA-DDF或FITC-DH-DDF悬液(本研究细胞实验部分所用药物均以无血清DMEM培养基配制,药物浓度以DOX计)。孵育3 h,用4%多聚甲醛固定,DAPI染液染色,每个步骤结束后用PBS洗涤3次。CLSM观察LLC细胞与FITC-DHA-DDF或FITC-DH-DDF的连接情况。

1.3.6 DNA纳米花的安全性验证 将生长良好的16HBE细胞以5×10^4个/孔的密度接种于96孔培养板中培养24 h后,与不同浓度DOX或DHA-DDF溶液(0.00、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 μg/mL)共同孵育4 h。PBS洗去多余药物,更换新的无血清DMEM培养基,继续孵育,并分别于第24、48和72 h使用CCK-8试剂检测16HBE细胞的细胞活性。

1.3.7 DNA纳米花对LLC细胞活性的影响

1.3.7.1 CCK-8法测定半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,IC_{50}) 将生长良好的LLC细胞以5×10^4个/孔的密度接种于96孔培养板中并在缺氧环境中培养24 h(后续实验细胞培养及药物处理均在缺氧条件下进行)。分为DOX组、DA-DDF组和DHA-DDF组,每组设3个复孔。用不同浓度的DOX、DA-DDF、DHA-DDF溶液(0.00、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 μg/mL)孵育4 h,PBS洗涤3次并更换新的培养基,24 h后用CCK-8试剂检测LLC细胞的活

性并计算各种药物的IC_{50}。

1.3.7.2 流式细胞术检测细胞周期 将生长良好的LLC细胞接种于6孔板，分为对照组、DOX组、DA-DDF组和DHA-DDF组，分别使用无血清DMEM培养基、DOX、DA-DF和DHA-DDF溶液处理4 h（实验组的DOX浓度为2 μg/mL），更换新的无血清培养基后继续培养24 h。收集1×10⁶个细胞，1 500 r/min离心5 min，PBS洗涤，加入预冷的70%乙醇固定4 h。1 500 r/min离心去除上清后，加入RNA水解酶和碘化丙啶（propidium iodine，PI）室温避光染色30 min。用流式细胞仪检测并分析结果。

1.3.8 DHA-DDF对LLC细胞迁移和侵袭能力的影响

1.3.8.1 划痕实验 将LLC细胞接种于6孔板，培养至细胞长满后用无菌枪头划线，PBS清洗。分组及药物处理同“1.3.7.2”。在第0 h和24 h观察并拍照，利用Image J软件测量各组划痕面积变化来评价LLC细胞的迁移能力。

1.3.8.2 Transwell小室实验 Matrigel基质胶与无血清DMEM培养基混合（1∶8）后加入上室凝固成型，上室加入300 μL浓度为5×10⁴个/mL的LLC细胞悬液（分组及处理同上），并在下室中加入800 μL含20% FBS的DMEM培养基，继续培养24 h。4 ℃甲醇固定后用1%结晶紫溶液染色，PBS洗净、阴干后观察计数。

1.3.9 DHA-DDF对HIF-1α表达的影响 将LLC细胞以1×10⁶个/孔接种于6孔板，贴壁后加入药物孵育4 h（分组及处理同“1.3.7.2”），提取各组LLC细胞总的蛋白及mRNA。

1.3.9.1 蛋白免疫印记实验（Western boltting，WB） 蛋白样品行SDS-PAGE凝胶电泳分离并转移到PVDF膜上。封闭后，依次敷抗体和TBST清洗，最后滴加发光液显影成像。

1.3.9.2 定量聚合酶链反应（quantitative polymerase chain reaction，qPCR） mRNA样品根据说明书操作步骤进行逆转录和定量，以β-actin作为内参，通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算HIF-1α的相对表达量。HIF-1α上游引物：5’-ACCCATTCCTCATCCGTCAA-3’，下游引物：5’-CTTCCGGCTCATAACCCATC-3’。

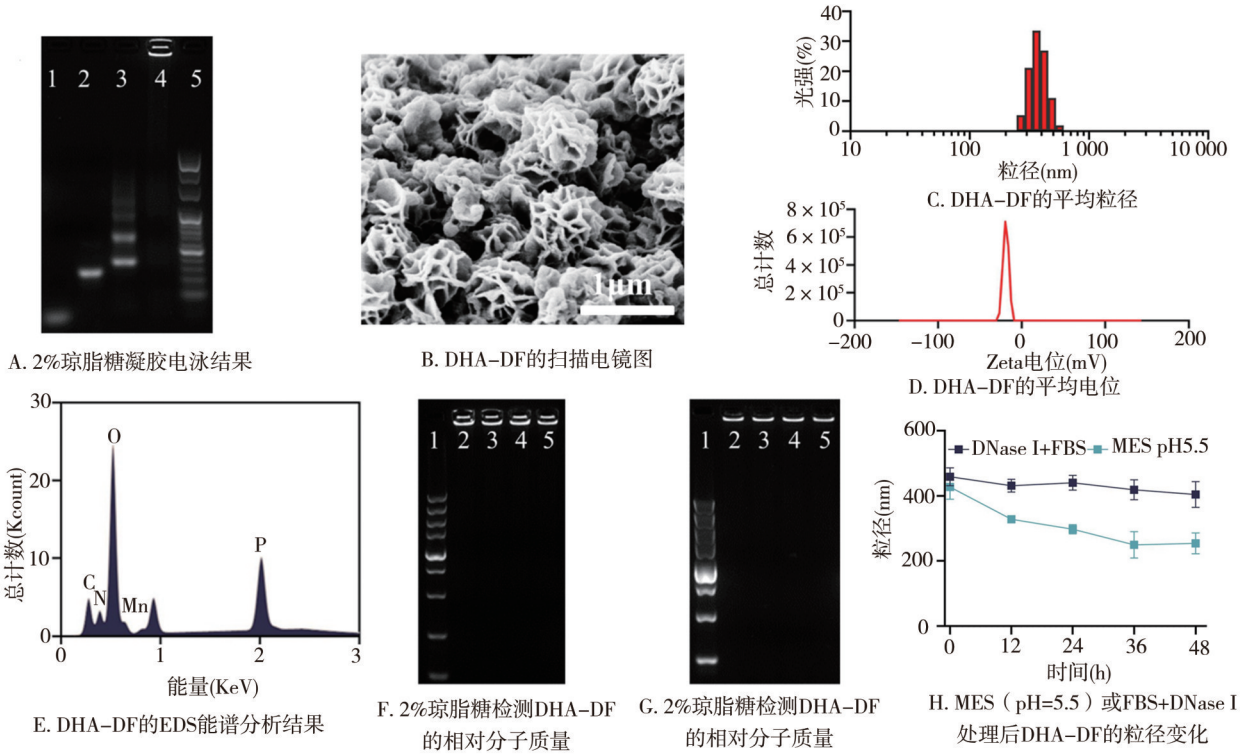
1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件进行绘图与数据分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，2组间比较采用独立样本t检验分析。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 DF的物理特性

琼脂糖凝胶电泳结果显示（图2A），环化产物比模板链移动更慢，而RCA产物则停留在加样孔处，证明成功制备环状DNA模板并通过RCA反应合成具有大分子量的DNA产物。SEM观察结果（图2B）显示，RCA产物为具有多孔花瓣状结构的球形颗粒，证明成功合成DF。DLS分析结果（图2C、2D）显示，DHA-DF的平均粒径为（421.26±7.90）nm，平均电位为（-18.0±1.8）mV。通过EDS分析DHA-DF中的元素组成（图2E），检测到C、N、O、P及Mn元素。DF为DNA与焦磷酸锰自组装形成的产物，而C、N、O、P及Mn为DNA和焦磷酸锰的主要组成元素。



A. 2%琼脂糖凝胶电泳结果　B. DHA-DF的扫描电镜图　C. DHA-DF的平均粒径　D. DHA-DF的平均电位

E. DHA-DF的EDS能谱分析结果　F. 2%琼脂糖检测DHA-DF的相对分子质量　G. 2%琼脂糖检测DHA-DF的相对分子质量　H. MES（pH=5.5）或FBS+DNase I处理后DHA-DF的粒径变化

注：A中1为引物链，2为模板链，3为环化产物，4为RCA产物，5为DNA ladder；F中1为DNA ladder，2~5为DHA-DF与DNase I+FBS孵育12、24、36、48 h；G中1为DNA ladder，2~5为DHA-DF在MES（pH=5.5）溶液中孵育12、24、36、48 h

图2 DNA纳米花的物理特性

2.2 DF具有良好的稳定性和pH响应性

使用DNase I和FBS模拟体内富含核酸酶的环境，检验DHA-DF的稳定性。2%琼脂糖凝胶结果（图2F）显示，通道2~5内的DHA-DF仍停留在加样孔处，表明其仍具有较高的相对分子量。DLS结果（图2H）也显示，48 h内DHA-DF的粒径未见明显变化。上述结果表明，经DNase I和FBS处理48 h内，DHA-DF未被分解，具有较强的稳定性。

使用MES溶液模拟肿瘤内部酸性环境，验证DHA-DF的pH响应性。如图2G所示，通道2~5内的DHA-DF均停留在加样孔附近，然而DLS结果（图2H）显示，经MES处理后，DHA-DF粒径随时间逐渐减小。由上述结果推测，在酸性环境下，DHA-DF的焦磷酸锰内核逐渐分解导致其粒径改变，而长链DNA仍维持结构及功能完整。

2.3 DF的载药和释药

负载DOX后DNA纳米花由白色变为红色（图3A），具有与DOX相似的紫外吸收光谱，在233 nm和480 nm处有特异性吸收峰（图3B）。CLSM观察FITC-DHA-DDF（图3C），镜下所见为橙红色颗粒点。如图3D所示，DF在较短时间（1 h内）即可完成对DOX的装载，其中DHA-DF的DOX负载率为（59.96 ± 2.64）%，高于无载药序列HA-DF的（34.49 ± 4.19）%。DHA-DDF的DOX释放结果（图3E）显示：DHA-DDF在中性条件下（pH=7.4）较为稳定，48 h累计释放率仅为（8.33 ± 0.69）%；在酸性条件下，DOX能快速释放，48 h累计释放率达（86.19 ± 2.69）%。Mn^{2+}在酸性条件下拥有与DOX相似的释放曲线（图3F）。

2.4 DHA-DDF催化ROS生成

通过检测DPBF的消耗来反映ROS的产量（图4A），在无DOX和$MnCl_2$的作用时，DPBF缓慢消耗，15 min内消耗率仅为（5.89 ± 0.06）%。在DOX或$MnCl_2$存在的情况下，15 min内的DPBF的消耗率分别为（25.95 ± 0.36）%和（19.55 ± 1.50）%。在中性条件下，DHA-DDF催化ROS产生的能力较弱，DPBF消耗率为（16.81 ± 0.07）%；酸性条件下DHA-DDF具有较强的催化ROS产生能力，15 min内DPBF消耗率为（36.41 ± 0.48）%。结果表明，DHA-DDF在酸性环境下具有较强的催化ROS产生的能力。

2.5 DHA-DDF具有靶向性

通过CLSM观察LLC细胞与FITC-DHA-DDF或FITC-DH-DDF的连接情况（图4B），在相同参数条件下，FITC-DHA-DDF组LLC细胞表面荧光信号强度高于FITC-DH-DDF组，表明FITC-DHA-DDF与LLC细胞具有更高的连接率。该实验证明含有AS1411序列的DHA-DF具有特异性识别并连接LLC细胞的能力。

2.6 DHA-DDF具有良好的生物相容性

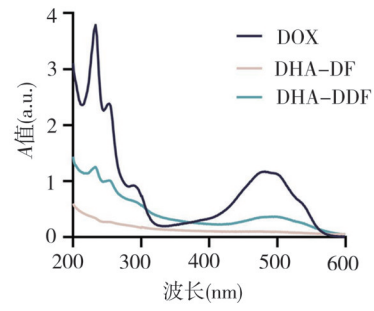
使用CCK-8试剂检测经DHA-DDF或DOX处理后的16HBE细胞活性（图4C~E）。相同浓度条件下，DOX对16HBE细胞活性的影响更加明显，而DHA-DDF对16HBE细胞活性影响较小。在72 h时，浓度为8 μg/mL时，经DOX处理后16HBE细胞的相对细胞活性仅为（0.802 ± 0.61）%，而经DHA-DDF处理的16HBE细胞的相对细胞活性为（46.23 ± 0.58）%，差异有统计学意义（t=36.401，P=0.000），表明通过DHA-DF负载DOX的形式能够降低DOX对正常细胞的毒性作用。

2.7 DHA-DDF能有效抑制LLC细胞增殖

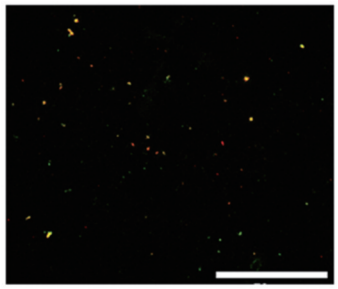
使用CCK-8检测来评价DOX、DA-DDF和DHA-DDF对LLC细胞活性的影响（图5A），在相同浓度下，DHA-DDF对LLC细胞活性的影响明显高于DOX和DA-DDF（t=3.793，P<



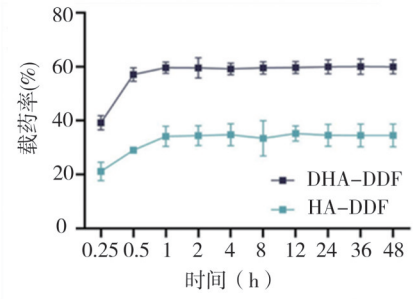
A. DHA-DF和DHA-DDF



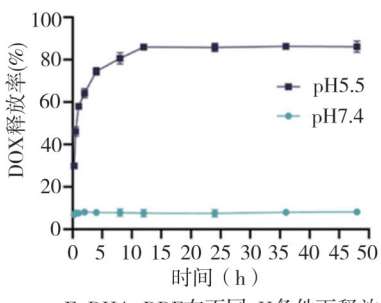
B. DOX、DHA-DF和DHA-DDF的紫外光谱图



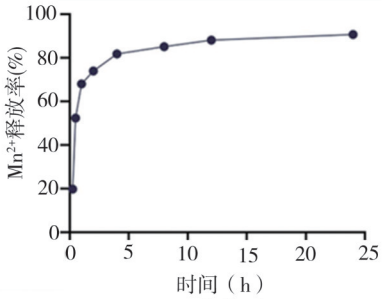
C. FITC-DHA-DDF的共聚焦观察结果（标尺为100 μm）



D. 纳米花负载DOX的时间-效率图

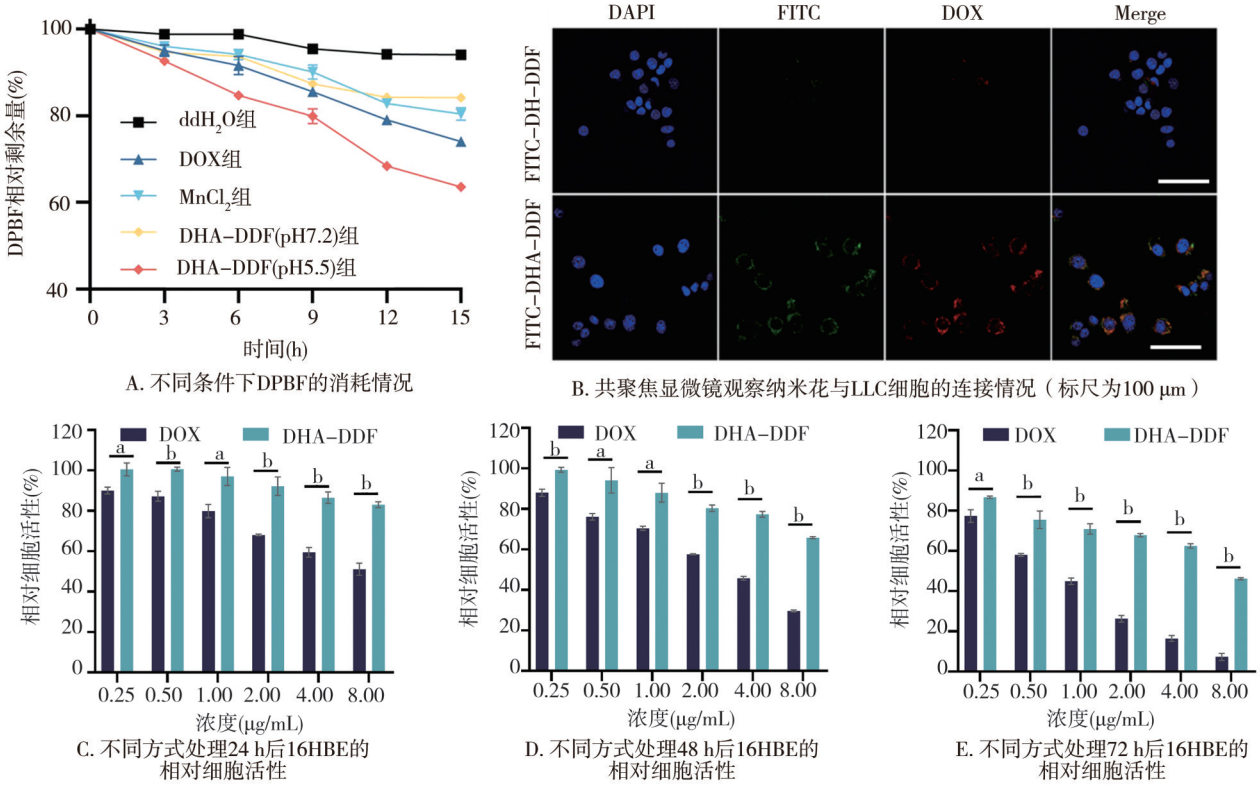


E. DHA-DDF在不同pH条件下释放DOX的时间-效率图



F. pH=5.5条件下DHA-DDF释放Mn^{2+}的时间-效率图

图3 DNA纳米花的DOX负载及释放



A. 不同条件下DPBF的消耗情况

B. 共聚焦显微镜观察纳米花与LLC细胞的连接情况（标尺为100 μm）

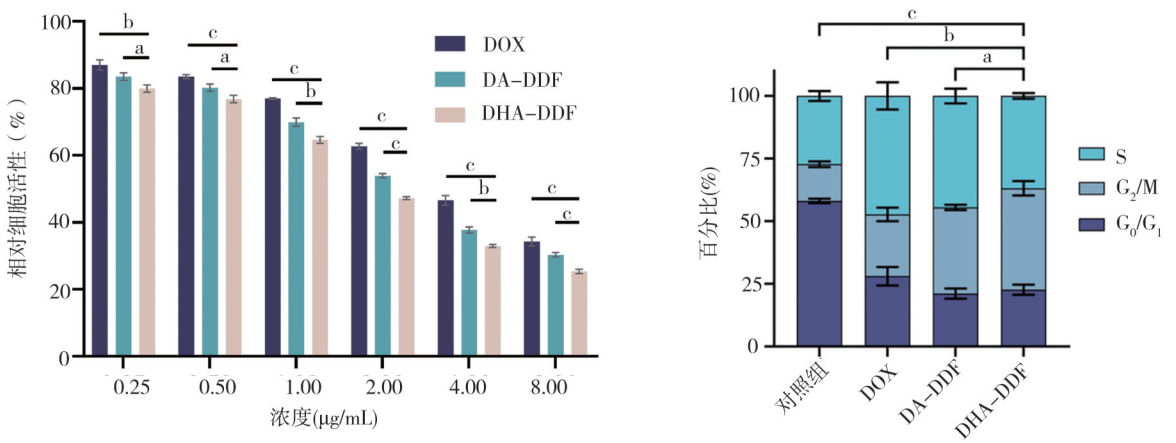
C. 不同方式处理24 h后16HBE的相对细胞活性

D. 不同方式处理48 h后16HBE的相对细胞活性

E. 不同方式处理72 h后16HBE的相对细胞活性

注：a，P<0.01；b，P<0.001

图4　DHA-DDF催化ROS产生、靶向性及安全性



A. 不同方式处理24 h后LLC细胞的相对细胞活性

B. 不同方式处理24 h后LLC细胞的细胞周期

注：a，P<0.05；b，P<0.01；c，P<0.001

图5　DHA-DDF对LLC细胞增殖的影响

0.05），可见DHA-DDF对LLC细胞具有更强的细胞毒性。当DOX终浓度为2 μg/mL时，经DHA-DDF处理过后的LLC细胞的相对细胞活为（62.91 ± 0.43）%，与DOX（t=27.733，P=0.000）和DA-DDF（t=15.208，P=0.000）形成明显差异。进一步分析得出，在缺氧状况下，DOX、DA-DDF和DHA-DDF对LLC细胞的IC_{50}分别为2.607、1.846和1.661 μg/mL。上述结果表明，DHA-DDF在缺氧条件下对LLC细胞活性的抑制作用强于DOX和DA-DDF。

流式检测结果显示（图5B），经DHA-DDF处理后，滞留于G_2/M期的细胞比例增加，为（40.50 ± 2.86）%，高于DOX组（t=7.428，P=0.002）与DA-DDF组（t=4.275，P=0.013），表明DHA-DDF能有效抑制LLC细胞增殖。

2.8　DHA-DDF有效抑制LLC细胞迁移和侵袭

通过细胞划痕实验和Transwell小室实验评价DHA-DDF对LLC细胞迁移和侵袭能力的影响。划痕实验结果（图6A、B）显示，DHA-DDF处理LLC细胞24 h过后的划痕

愈合面积为（0.388 ± 0.034）mm^2，明显低于 DOX 处理的（0.567 ± 0.037）mm^2，差异有统计学意义（t=6.178，P=0.004）。Transwell 小室实验结果（图 6C、D）显示，与 DOX 处理相比，DHA-DDF 处理组穿过 Matrigel 基质胶的 LLC 细胞数量减少，为（82.00 ± 12.12）个，差异有统计学意义（t=8.169，P=0.001）。上述结果表明，DHA-DDF 能有效抑制 LLC 细胞的迁移及侵袭能力。

2.9 DHA-DDF 有效降低 HIF-1α 的表达

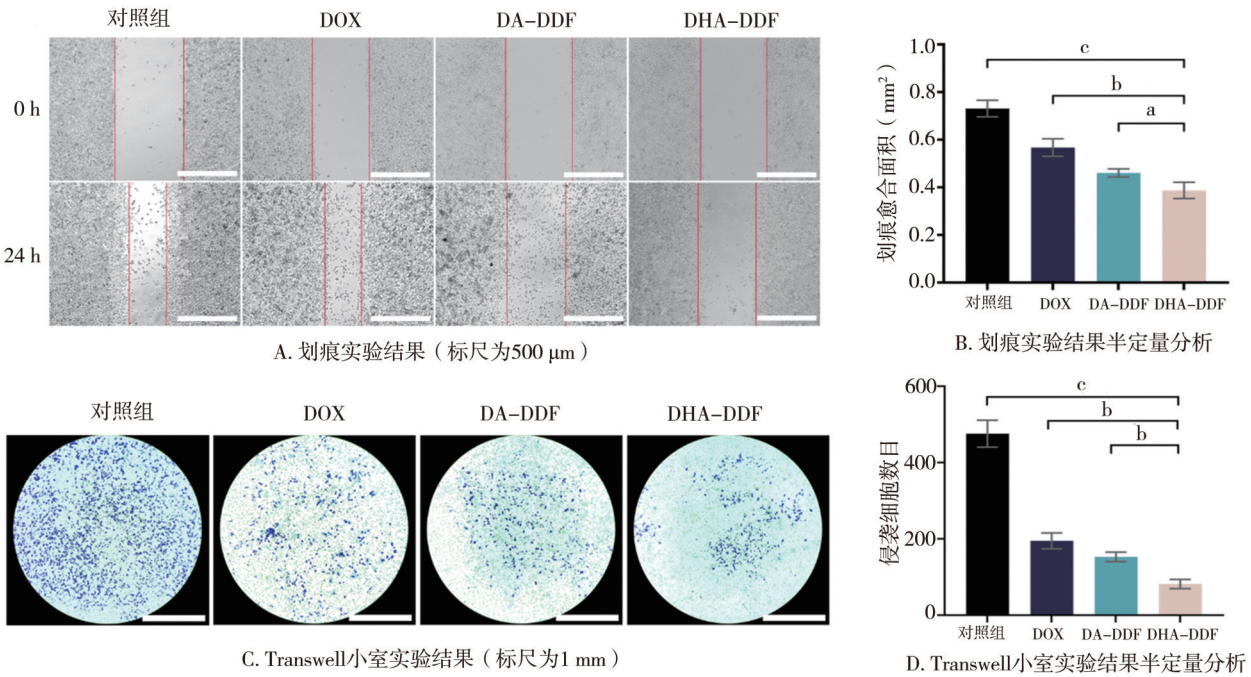
通过蛋白质印记实验检测不同实验组 LLC 细胞 HIF-1α 表达水平的变化，实验结果（图 7A）显示，与 DOX 和 DA-DDF 组相比，DHA-DDF 组 LLC 细胞的 HIF-1α 的表达水平降低。

qPCR 结果显示（图 7B），与对照组相比，经 DHA-DDF 处理后的 LLC 细胞 HIF-1α mRNA 的表达水平降低（t=14.750，P=0.000），而 DOX 和 DA-DDF 组 LLC 的 HIF-1α mRNA 表达水平未见明显变化。

3 讨 论

近年来，肿瘤治疗技术正朝着安全高效的方向发展，而纳米技术的日益成熟为之提供了便利[15]。纳米材料可以用来弥补传统药物的不足，实现药物的高效组装及递送[16]。DNA 纳米花是一种优秀的 DNA 无机杂化纳米材料，可灵活设计从而满足不同治疗策略的需求。

DOX 具有较强的副作用，往往诱发心肌损伤和骨髓抑制等不良反应，不利于治疗的进行。本研究通过 RCA 反应制备的 DHA-DDF 具有良好的稳定性（图 2F、2H），可以避免药物的提前释放，通过安全性实验（图 4C~F）证明负载 DOX 的 DHA-DDF 对



A. 划痕实验结果（标尺为500 μm）

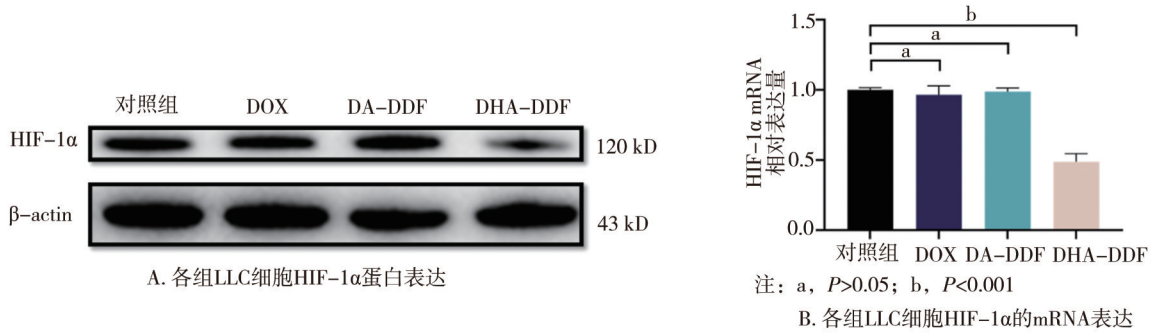
B. 划痕实验结果半定量分析

C. Transwell小室实验结果（标尺为1 mm）

D. Transwell小室实验结果半定量分析

注：a，P<0.05；b，P<0.01；c，P<0.001

图 6 DHA-DDF 对 LLC 细胞迁移及侵袭能力的影响



A. 各组LLC细胞HIF-1α蛋白表达

注：a，P>0.05；b，P<0.001

B. 各组LLC细胞HIF-1α的mRNA表达

图 7 DHA-DDF 对 LLC 细胞 HIF-1α 表达的影响

正常细胞的毒性较弱，具有良好的生物相容性。DHA-DDF表面的AS1411适配体能与癌细胞膜表面过表达的核仁素特异性结合[17]，增强DHA-DDF与LLC细胞的连接效率（图4B），有利于DHA-DDF在靶区的积累。DHA-DDF还具有pH响应性（图3E、3F），其核心组分焦磷酸锰能在实体肿瘤的酸性微环境中快速崩解，进而加速DOX的释放[18]。DOX和Mn^{2+}具有催化ROS产生的能力[19]，携带有DOX和Mn^{2+}的DHA-DDF能够产生较多的ROS（图4A）。ROS可以通过氧化脂质、损伤DNA、促使蛋白质断裂等多种途径诱导癌细胞凋亡[20-21]。因此本研究制备的DNA纳米花具有特异性杀伤肿瘤细胞的能力，可以作为递送DOX的优秀载体。

目前，有许多肿瘤治疗方式会消耗氧气、加重缺氧，进而诱导肿瘤耐药的发生，增加了治疗难度[20,22]。为减少肿瘤缺氧对治疗的不利影响，我们在制备DNA纳米花的模板链中添加了HIF-1α反义序列来抑制HIF-1α的表达，用以削弱LLC细胞对DOX的耐药性，增强DOX对LLC细胞的疗效。经DHA-DDF处理后，LLC细胞HIF-1α的表达水平降低（图7A、7B）。与DA-DDF相比，DHA-DDF具有更低的IC_{50}，且经DHA-DDF处理后的LLC细胞也表现出更弱的增殖、迁移及侵袭等能力（图5B、图6A~D），表明抑制HIF-1α表达后，LLC细胞对DOX的敏感性增强。

综上所述，本研究成功制备具有靶向、催化ROS生成、特异性抑制HIF-1α表达等多种功能的DNA纳米花，具有良好的生物相容性，能有效抑制LLC细胞的增殖、迁移及侵袭，有望为临床肿瘤治疗提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Huang XL, Zhuang J, Chung SW, et al. Hypoxia-tropic protein nanocages for modulation of tumor- and chemotherapy-associated hypoxia[J]. ACS Nano, 2019, 13(1): 236-247.

[2] Li ML, Xia J, Tian RS, et al. Near-infrared light-initiated molecular superoxide radical generator: rejuvenating photodynamic therapy against hypoxic tumors[J]. J Am Chem Soc, 2018, 140(44): 14851-14859.

[3] Chen J, Luo HL, Liu Y, et al. Oxygen-self-produced nanoplatform for relieving hypoxia and breaking resistance to sonodynamic treatment of pancreatic cancer[J]. ACS Nano, 2017, 11(12): 12849-12862.

[4] Park JH, Moon M, Kim JS, et al. TOPK mediates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and the invasion of nonsmall-cell lung cancer cells via the HIF-1α/snail axis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534: 941-949.

[5] Vito A, El-Sayes N, Mossman K. Hypoxia-driven immune escape in the tumor microenvironment[J]. Cells, 2020, 9(4): 992.

[6] Wu QH, You L, Nepovimova E, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 77.

[7] Wang K, Zhu X, Zhang K, et al. Interleukin-6 contributes to chemoresistance in MDA-MB-231 cells via targeting HIF-1α[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(3): e22039.

[8] Li H, Quan JS, Zhang MZ, et al. Lipid-albumin nanoparticles (LAN) for therapeutic delivery of antisense oligonucleotide against HIF-1α[J]. Mol Pharm, 2016, 13(7): 2555-2562.

[9] Pan M, Jiang QY, Sun JL, et al. Programming DNA nanoassembly for enhanced photodynamic therapy[J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59(5): 1897-1905.

[10] Crooke ST, Baker BF, Crooke RM, et al. Antisense technology: an overview and prospectus[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(6): 427-453.

[11] Bennett CF, Baker BF, Pham N, et al. Pharmacology of antisense drugs[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2017, 57: 81-105.

[12] Mei L, Zhu GZ, Qiu LP, et al. Self-assembled multifunctional DNA nanoflowers for the circumvention of multidrug resistance in targeted anticancer drug delivery[J]. Nano Res, 2015, 8(11): 3447-3460.

[13] Kuerban K, Gao XW, Zhang H, et al. Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(8): 1534-1548.

[14] Dai ZD, Song XZ, Cao JK, et al. Dual-stimuli-responsive TiO_x/DOX nanodrug system for lung cancer synergistic therapy[J]. RSC Adv, 2018, 8(39): 21975-21984.

[15] Bhatia SN, Chen XY, Dobrovolskaia MA, et al. Cancer nanomedicine[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(10): 550-556.

[16] Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology[J]. Saudi Pharm J, 2018, 26(1): 64-70.

[17] Bie LH, Wang Y, Jiang FZ, et al. Insights into the binding mode of AS1411 aptamer to nucleolin[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 1025313.

[18] Gao YT, Zhou H, Liu GG, et al. Tumor microenvironment: lactic acid promotes tumor development[J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 3119375.

[19] Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, et al. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity[J]. Pharmacol Ther, 1990, 47(2): 219-231.

[20] He YX, Liu SH, Yin J, et al. Sonodynamic and chemodynamic therapy based on organic/organometallic sensitizers[J]. Coord Chem Rev, 2021, 429: 213610.

[21] Cheng JJ, Zhu Y, Xing X, et al. Manganese-deposited iron oxide promotes tumor-responsive ferroptosis that synergizes the apoptosis of cisplatin[J]. Theranostics, 2021, 11(11): 5418-5429.

[22] Li L, Chen YS, Chen WJ, et al. Photodynamic therapy based on organic small molecular fluorescent dyes[J]. Chin Chem Lett, 2019, 30(10): 1689-1703.

（责任编辑：曾 玲）