



VEGFR2 基因靶向 RNA 纳米颗粒抑制剂的研究

肖楚琼^a, 郭玉琴^b, 金伟波^a, 吕正兵^a

(浙江理工大学, a. 生命科学与医药学院; b. 图书馆, 杭州 310018)

摘要: 为开发靶向血管内皮生长因子-血管内皮生长因子受体 2(VEGF-VEGFR2)通路的肿瘤抑制剂药物, 通过生物信息学筛选多条高效的小干扰 RNA(siRNA), 构建一种针对 VEGFR2 基因的可自组装形成环状结构的 KD-VEGFR2-RNA 纳米颗粒; 通过大肠埃希菌表达系统进行大量制备, 对其结构进行表征, 并评估其体内外抗血管生成活性。结果表明: KD-VEGFR2-RNA 纳米颗粒的粒径为 100~200 nm, 结构稳定; 在质量浓度为 25.0 ng/ μ L 时该纳米颗粒对 HUVEC 细胞具有良好安全性, 能明显抑制细胞迁移和成管能力, 抑制率分别为 57.57% 和 64.77%; 纳米颗粒可降低 VEGFR2 mRNA 水平和蛋白表达量, 并具有体内抗血管生成的活性。该研究制备的 KD-VEGFR2-RNA 纳米颗粒可通过协同抑制 VEGFR2 通路发挥抗血管生成作用, 为肿瘤靶向治疗提供了一种新策略。

关键词: 血管内皮生长因子受体 2; RNA 干扰; 血管生成; 纳米颗粒; 肿瘤抑制剂

中图分类号: Q781

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2025)11-0827-09

引文格式: 肖楚琼, 郭玉琴, 金伟波, 等. VEGFR2 基因靶向 RNA 纳米颗粒抑制剂的研究[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2025, 53(6): 827-835.

Reference Format: XIAO Chuqiong, GUO Yuqin, JIN Weibo, et al. An investigation into VEGFR2-targeted RNA-based nanoparticle inhibitors[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2025, 53(6): 827-835.

An investigation into VEGFR2-targeted RNA-based nanoparticle inhibitors

XIAO Chuqiong^a, GUO Yuqin^b, JIN Weibo^a, LÜ Zhengbing^a

(a. College of Life Sciences and Medicine; b. Library, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To develop a tumor-suppressive agent targeting the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR2 signaling pathway, multiple efficient small interfering RNA (siRNA) sequences were selected through bioinformatic analysis and assembled into a circular KD-VEGFR2-RNA nanoparticle capable of self-assembly. The nanoparticle was efficiently produced using an *Escherichia coli* expression system, and its structure and anti-angiogenic activity were characterized both *in vitro* and *in vivo*. Results showed the KD-VEGFR2-RNA nanoparticle had a stable structure with diameters ranging from 100 nm to 200 nm. At a concentration of 25.0 ng/ μ L, the nanoparticle exhibited excellent biosafety with HUVEC cells, significantly inhibiting HUVEC migration and tube formation capabilities, with corresponding inhibition rates of 57.57% and 64.77%. The nanoparticle could reduce both VEGFR2 mRNA levels and protein expression, demonstrating anti-angiogenic activity *in vivo*. The KD-VEGFR2-RNA nanoparticle prepared in this study exerts anti-angiogenic activity by synergistically suppressing the VEGFR2 signaling pathway and offers a promising strategy for targeted cancer therapy.

Key words: VEGFR2; RNA interference; angiogenesis; nanoparticles; tumor inhibitor

0 引言

血管内皮生长因子受体(Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)是表达在内皮细胞膜上的一类跨膜蛋白,血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)作为 VEGFR 的配体,可以与其结合,进而参与调控人体血管和淋巴管的生成^[1-2]。VEGFR2 作为 VEGFR 的一种亚型,是大小为 210~230 kD 的酪氨酸激酶受体,与 VEGFA、VEGFC 和 VEGFD 结合后激活下游的由 MAPK/ERK 介导的信号通路,从而引发人体内皮细胞增殖和迁移、诱发血管通透性增强、促进血管和淋巴管新生与发育。新生血管为维持健康人体内正常细胞的生理活动提供了充足的氧气和丰富的营养物质^[3],然而在肿瘤缺氧微环境中 VEGFA 等生长因子过表达会导致恶性肿瘤病人体内短时间产生过量的新生血管,进而促使肿瘤细胞大量分裂增殖^[4-5]。VEGFA 等生长因子的表达持续增多,使血管难以完全发育并维持稳定的状态来支持免疫细胞发挥功能,进一步加剧了肿瘤细胞在患者体内的逃逸和转移^[6]。故,抑制 VEGF-VEGFR2 信号通路的靶向药物是开发抗肿瘤药物的主要对策之一。目前靶向该通路的药物大多为以阿帕替尼为代表的的小分子抑制剂以及以贝伐珠单抗为代表的抗体药物^[7-9],但这 2 类药物均存在耐药性强、脱靶率高和全身毒性强等不足^[10-12],鉴于此分子量更小、靶向性更高的核酸药物具有更广阔的应用前景。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种典型的转录后基因调控机制,依赖小双链 RNA(Double-stranded RNA, dsRNA)分子或通过与靶信使 RNA(Messenger RNA, mRNA)序列的互补配对,特异性地抑制基因表达或翻译过程。小干扰 RNA(Small interfering RNA, siRNA)通常由 21~23 个核苷酸组成,通过降解特定 mRNA 分子以沉默相关的细胞信号通路。siRNA 介导的基因沉默不仅能有效抑制肿瘤细胞增殖,还可增强化疗药物的敏感性,为解决肿瘤耐药问题提供了新策略^[13]。siRNA 药物因研发周期短、治疗靶点覆盖广及适应症范围广等特点受到广泛关注,在恶性肿瘤治疗领域展现出广阔的应用前景。然而,siRNA 药物因其亲水性特征及负电荷属性,面临体内递送的多重障碍,其中跨质膜脂质双层的渗透效率低下尤为突出;此外,siRNA 在靶向递送过程中易受核糖核酸酶降

解^[14]。因此,开发高效的递送系统将 siRNA 靶向递送至所需组织至关重要。

不同于传统单链 siRNA 依赖脂质体或聚合物包载的被动递送方式,本文通过生物信息学分析,设计并筛选出由多条靶向 VEGFR2 的 siRNA,并使其串联自组装,形成 KD-VEGFR2-RNA 纳米颗粒抑制剂,并利用大肠埃希菌表达系统对其进行高效制备;在此基础上,测定其对细胞 VEGFR2 表达水平和细胞成管的抑制作用以及对胚胎血管生成的抑制效应,以期为研发高效安全的抗肿瘤血管新生药物提供新思路。

1 实验部分

1.1 实验材料及仪器

材料:大肠埃希菌 HT115(DE3)和 pET-28a(+)质粒由本实验室保存,人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 购于上海富衡生物科技有限公司, RNA 提取酚试剂和青-链霉素购于 Solarbio 公司,胎牛血清购于 Gibco 公司,ECM 培养基购于 ScienCell 公司,逆转录试剂盒和预混型 qPCR 试剂盒购于艾科瑞公司, VEGFA 购于金斯瑞公司, Matrigel 基质胶购于 Corning 公司, VEGFR2 一抗购于 Abcam 公司, RIPA 细胞裂解液、蛋白酶抑制剂混合液和 β -actin 一抗购于 Proteintech 公司, HPR 标记山羊抗兔二抗、HPR 标记山羊抗小鼠二抗和 DEPC 购于南京碧云天科技有限公司, 250 目铜网普通微栅碳支持膜购于北京中镜科仪技术有限公司, 乙酸氧铀购于 ACMEC 公司, 特氟龙环购于上海氟耐威有限公司, SPF 级鸡蛋购于南京竹顺生物技术公司。

仪器:透射电子显微镜(TEM, JEM-1400Flash, JEOL 日本电子株式会社), 细胞培养箱(Forma 310, 赛默飞世尔科技公司), 生物安全柜(1300 SERIES A2, 赛默飞世尔科技公司), 酶标仪(AMR-100T, 杭州奥盛生物科技有限公司), 倒置荧光显微镜(ECLIPSE TE2000-E, 尼康株式会社), 体视显微镜(SDPTOP SZN, 舜宇光学科技有限公司)和孵化器(MTX-2, 德州牧泰孵化设备公司)。

1.2 RNA 纳米颗粒的设计与制备

使用 siDirect 软件(版本 2.0)根据 VEGFR2 的基因筛选出特异性强、热稳定率高的 siRNA 分子,将这些 siRNA 分子通过茎环结构等元件连接后得到一条长链 RNA 分子序列,将其命名为 KD-VEGFR2-RNA;将编码 KD-VEGFR2-RNA 的 DNA 序列进行人工合成后通过 Xba I 和 Xho I 双

酶切插入到 pET-28a(+) 质粒的 T7 启动子下游, 重组质粒转化至大肠埃希菌 HT115 (DE3) 中, 获得表达 *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒的工程菌。将该工程菌接种在含有质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培育至对数生长期, 加入终摩尔浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下继续培养 4 h; 8000 r/min 离心收集菌体, 用 10 mmol/L 的 Tris-HCl-MgAc₂ 重悬菌体后加入 RNA 酚提取液, 剧烈摇晃后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 加入氯仿混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 10 min。取上清, 加入氯仿反复振荡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 15 min, 取上清, 加入无水乙醇置于 -20 $^{\circ}\text{C}$; 沉降过夜后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀物用 10 mmol/L 的 Tris-HCl-MgAc₂ 溶液溶解, 即获得 *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒。

1.3 纳米颗粒的测试表征

设置 RNA 提取液 Tris-HCl-MgAc₂ 为空白对照组, 命名为 Blank Control; 设置质量浓度为 1000.0 ng/ μL 的 *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒为实验组, 命名为纳米颗粒。将上述样品在干燥环境中吸附到铜网上, 使用 10 mg/mL 的乙酸氧铀进行染色, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干直至成像, 通过 TEM 对纳米颗粒进行表征。

1.4 RNA 纳米颗粒细胞毒性分析

使用含有质量分数为 10% 的胎牛血清、质量分数为 1% 的内皮细胞生长补充剂以及质量分数为 1% 的青-链霉素的内皮细胞培养基, 对 HUVEC 细胞进行培养; 将 HUVEC 接种在 96 孔细胞培养板 (7×10^3 个细胞/孔) 中, 贴壁后用含有纳米颗粒(质量浓度分别为 0、2.5、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0、500.0、800.0 ng/ μL 和 1000.0 ng/ μL) 的无血清培养基(100 μL /孔) 处理 48 h, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 继续培养 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各个处理孔的吸光度比值。

1.5 细胞划痕愈合实验

将 HUVEC 接种到 6 孔细胞培养板中, 培养细胞至密度为 90%~100%; 用吸头刮下细胞, 然后用 PBS 洗去脱落细胞, 用含 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VEGFA 的无血清培养基进行分组处理; 纳米颗粒组设置 0、2.5 ng/ μL 和 25.0 ng/ μL 质量浓度梯度, 阴性对照组则添加 25.0 ng/ μL nonsense RNA, 采用倒置荧光显微镜记录划痕处理前和处理 24 h 后的细胞划痕愈合情况。

1.6 细胞成管实验

将 Matrigel 基质胶^[15] 与无血清培养基按 1:1 体积混合, 然后包被于 96 孔细胞培养板, 置于细胞培养箱中直至凝固。将 HUVEC 细胞接种于基质胶包被板 (2×10^4 个细胞/孔), 用含 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VEGFA 的无血清培养基进行分组处理: 纳米颗粒组设置 0、2.5 ng/ μL 和 25.0 ng/ μL 质量浓度梯度, 阴性对照组则添加 25.0 ng/ μL nonsense RNA, 培养 6 h 后用倒置荧光显微镜拍摄细胞成管情况。

1.7 qRT-PCR 检测 VEGFR2 mRNA 表达水平

采用 Trizol、氯仿和异丙醇等试剂, 从处理后的 HUVEC 细胞中提取总 RNA, 利用逆转录和 qRT-PCR 试剂盒对总 RNA 逆转录得到 cDNA, 然后进行 qRT-PCR 分析。程序设置如下: 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 进行 30 s 预变性; 接着进行 40 个循环, 每个循环包含 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s 与 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s。反应完成后, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法对所得数据进行分析。VEGFR2 正向引物 (5'-CGGTCAACAAAGTCGGGAGA-3')、反向引物 (5'-CAGTGCACCACAAAGACACG-3'); GAPDH 的正向引物 (5'-GCTCTCTGCTCCTCC TGTTCG-3')、反向引物 (5'-GCGAACACATCC GGCCTGC-3')。

1.8 Western Blotting 检测 VEGFR2 蛋白

将处理后的细胞使用细胞刮刀转移至含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 溶解缓冲液中, 并在冰上裂解 30 min。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 条件下离心 15 min, 收集上清。采用 BCA 蛋白质检测试剂盒测定总蛋白浓度, 将蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后再转印到 PVDF 膜上, 室温下用质量分数为 5% 脱脂奶粉封闭膜 2 h; 然后用含体积分数为 0.1% Tween-20 的 TBST 清洗膜 5 次, 每次 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 VEGFR2 及 β -actin 一抗 (1:10000) 过夜, 然后用 TBST 清洗膜 5 次, 每次 5 min; 室温孵育 HRP 标记的二抗 (1:5000) 1 h, 然后用 TBST 清洗膜 5 次, 每次 5 min; 最后进行化学发光显影。

1.9 鸡胚绒毛尿囊膜模型评估 VEGFR2 蛋白表达水平

选取受精后第 5 天、血管处于初级形成状态的 SPF 级鸡胚作为实验对象。在鸡蛋气室位置开窗 (直径 (2.0 ± 0.2) cm), 随后用 PBS 冲洗除去蛋壳碎屑, 并吸取 1 mL 蛋清, 加入 100 μL 青-链霉素; 将灭菌后的特氟龙圈环 (内径 1 cm) 放置于 CAM 二级血管分支交汇处。分别将 100 μL 不同质量浓度 (0、2.5、10.0 ng/ μL 和 100.0 ng/ μL) 的纳米颗粒滴加

入特氟龙圈内的血管处,使用封口膜封上窗口,继续置于 37 ℃、相对湿度 60% 的培养箱中孵化。使用体视显微镜拍摄处理前和处理 48 h 后的图像,分析特氟龙圈内血管分支数量的变化。

1.10 统计学分析

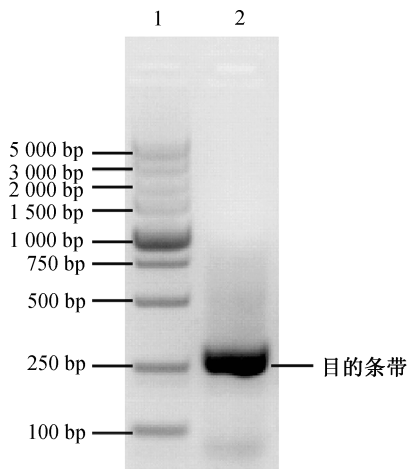
根据实验设计类型,分别选用单因素方差分析(One-way ANOVA)与双因素方差分析(Two-way ANOVA)进行组间差异比较,所有实验均设置 3 个独立生物学重复。显著性阈值设定为:ns 表示无显著性($P \geq 0.05$),* 表示显著性($P < 0.05$),** 高度显著性($P < 0.01$),*** 表示极高度显著性($P < 0.001$)。

2 结果与讨论

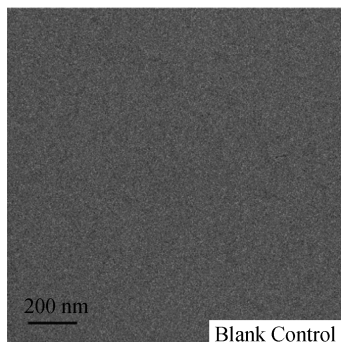
2.1 *KD-VEGFR2-RNA* 通过原核系统表达后自组装成为环状纳米颗粒

不同于化学合成纳米颗粒,本文采用了一种更为经济高效的规模化发酵制备策略,通过核糖核酸酶 III(Ribonuclease III, RNase III)缺陷型大肠埃希菌 HT115 (DE3) 表达系统,实现 *KD-VEGFR2-*

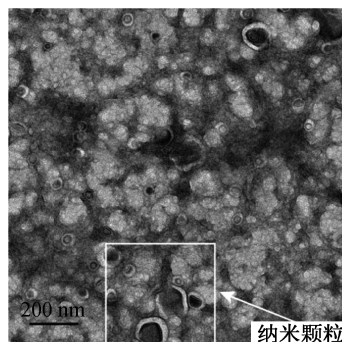
RNA 的高效表达和组装。该菌株基于 T7 表达系统,在 IPTG 诱导下能够高效表达 T7 RNA 聚合酶,特异性转录 *KD-VEGFR2-RNA*。其基因组中 *rnc* 基因的缺失导致 RNase III 双链 RNA 水解酶活性缺失,能够有效避免转录产物被内源性核酸酶降解^[16]。将提取获得的 *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒溶解于 10 mmol/L 的 Tris-HCl-MgAc₂ 溶液中,通过 Mg²⁺ 介导的金属离子配位作用,纳米颗粒通过其完成端与端的互补形成 kissing loop 二级结构,从而实现纳米颗粒的自组装以提高其稳定性。图 1 为纳米颗粒的琼脂糖凝胶电泳成像图和 Blank Control 与纳米颗粒的 TEM 图。从图 1(a)可看出:提取获得的 RNA 样品,在 250 bp 位置可见清晰单一的条带,为 *KD-VEGFR2-RNA*;微量大肠埃希菌残留 rRNA 呈现 23S/16S rRNA 特征条带。RNA 提取液 Tris-HCl-MgAc₂ 与 RNA 提取所得产物用乙酸氧铀负染处理后^[17],利用 TEM 进行结构表征。图 1(b)是空白对照溶液 Blank Control 的 TEM 图;图 1(c)是纳米颗粒的 TEM 图。通过图 1



(a) *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒的琼脂糖凝胶电泳图



(b) Blank Control 的 TEM 图



(c) *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒的 TEM 图

图 1 纳米颗粒琼脂糖凝胶电泳图及 Blank Control 与纳米颗粒 TEM 图

注:图 1(a)中 1 为 DL 5000 DNA Marker 上样泳道,2 为 *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒上样泳道,目的条带即为纳米颗粒。

(b)与图 1(c)对比可知,图 1(c)中观察到纳米颗粒,而图 1(b)中无此结构,这表明 RNA 提取成功。此外,图 1(c)显示 *KD-VEGFR2-RNA* 通过两端的互补环序列成功实现了碱基互补配对,形成 kissing loop 结构,进一步自组装为具有近方形环状拓扑特征的纳米颗粒^[18-19],粒径为 100~200 nm,呈现多分散性分布,形貌与预期设计相符。

2.2 纳米颗粒对 HUVEC 细胞活力的影响

传统的转染方法需先对干扰 RNA 进行处理,再将其导入细胞以发挥作用^[20]。相比之下,*KD-VEGFR2-RNA* 自组装后形成的纳米颗粒可直接用于处理细胞,在高效地穿透细胞膜的同时发挥其结构中 siRNA 的作用,并在一定程度上避免了核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)的影响。图 2 为不同质量浓度的纳米颗粒处理 HUVEC 细胞 48 h 后的细胞活力检测结果,从图中可以看出:纳米颗粒对 HUVEC 细胞的半数抑制质量浓度(Half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 211.1 ng/ μ L;当纳米颗粒质量浓度提升至 1000.0 ng/ μ L 时, HUVEC 的细胞活力降至 20%以下,显示出较强的细胞毒性;而在 25.0 ng/ μ L 时, HUVEC 的细胞活力保持在~80%,表明此时的质量浓度对细胞具有较良好的生物安全性。后续实验中均选取 25.0 ng/ μ L 作为纳米颗粒的作用质量浓度。

2.3 纳米颗粒显著抑制 HUVEC 细胞迁移与成管能力

VEGF 与 VEGFR2 的结合能够引起 VEGFR2 上 Tyr1175 等位点自磷酸化,从而激活下游信号通路的级联反应,其中 MAPK/ERK 通路通过驱动迁移相关基因表达上调,促进细胞迁移;PI3K/AKT 通路介导细胞极性建立,导致管腔网络形成^[21-23]。图 3 为细胞划痕愈合实验中细胞划痕愈合情况及细胞相对迁移率。由图 3(a)可知,对照组细胞迁移能

力较强,划痕闭合率较高,相比之下纳米颗粒处理组的细胞划痕在 24 h 后的闭合程度降低。由图 3(b)可知:细胞划痕愈合实验结果显示,纳米颗粒处理组的 HUVEC 迁移率明显低于对照组,且迁移抑制程度与颗粒质量浓度呈正相关;当纳米颗粒质量浓度为 25.0 ng/ μ L 时,细胞迁移抑制率为 57.57%。这表明纳米颗粒可以降低 HUVEC 表面 VEGFR2 的表达,该表达下调显著抑制了环境中 VEGFA 与 VEGFR2 的结合,从而阻断下游信号通路驱动

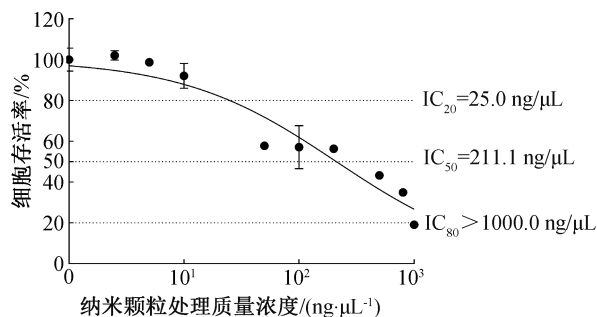
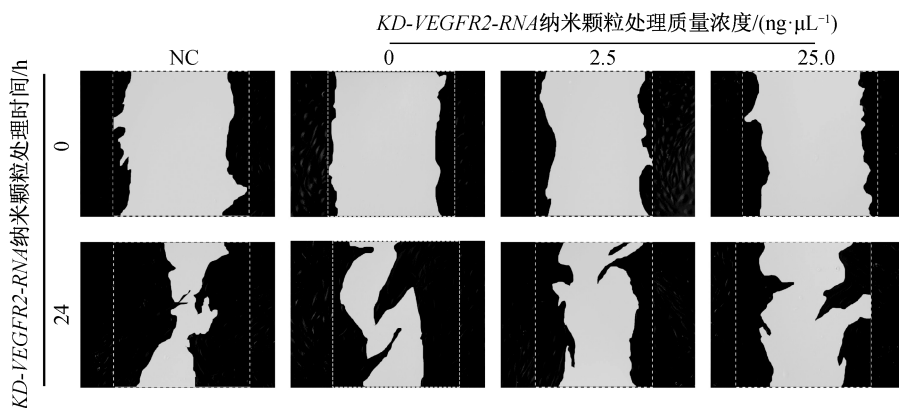


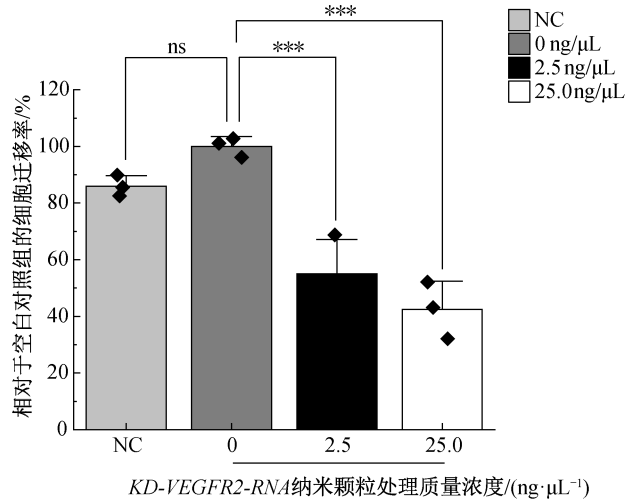
图 2 细胞毒性 CCK-8 实验结果

注: IC_{20} 指纳米颗粒能够抑制 20% HUVEC 活性的质量浓度; IC_{50} 指纳米颗粒能够抑制 50% HUVEC 活性的质量浓度; IC_{80} 指纳米颗粒能够抑制 80% HUVEC 活性的质量浓度。图中拟合曲线由 GraphPad Prism 9.5.0 分析数据后绘制得到。

图 4 为细胞成管实验结果。图 4(a)为细胞成管情况,从图中可以看出,对照组中细胞自发形成显著的管腔网络结构,而纳米颗粒处理组中管腔结构的形成被抑制。图 4(b)为细胞划痕愈合实验中细胞相对迁移率,由图可知:*KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒可显著抑制 HUVEC 分化形成管腔结构的能力,且呈现质量浓度依赖趋势;当纳米颗粒质量浓度为 25.0 ng/ μ L 时,细胞迁移抑制率为 64.77%。以上功能性实验表明,纳米颗粒通过调控 VEGFR2 表达干扰了 VEGF 诱导的细胞迁移和血管形成过程。



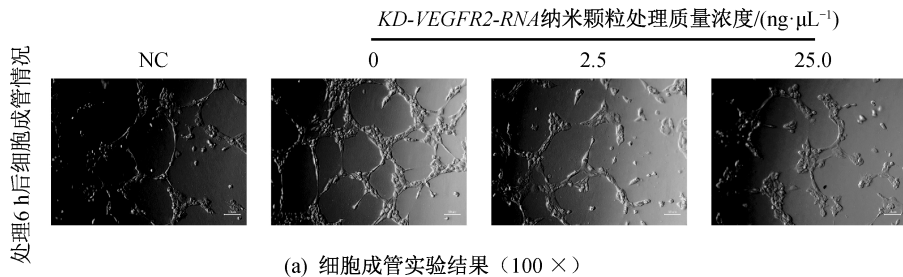
(a) 细胞划痕愈合实验结果 (100 ×)



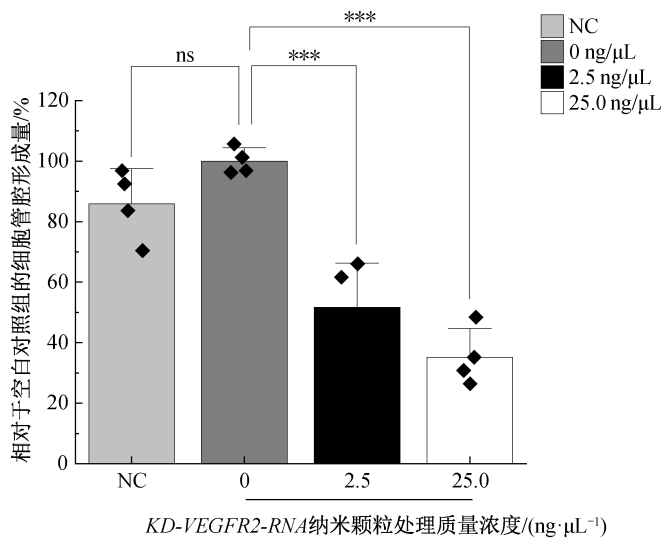
(b) 细胞划痕愈合实验中细胞相对迁移率

图3 细胞划痕愈合实验中细胞划痕愈合情况及细胞相对迁移率

注: NC代表 negative control, 即为阴性对照 nonsense RNA, 处理质量浓度为 25.0 ng/μL。图 3(a)为细胞划痕实验的显微成像结果, 其中中间空白区域代表细胞划痕区域; 图 3(b)为通过 ImageJ 软件对图 3(a)中划痕面积变化进行连续测量后绘制的柱状数据图。



(a) 细胞成管实验结果 (100 ×)



(b) 细胞成管实验中管腔相对形成量

图4 细胞成管实验中管腔形成情况及相对形成量

注: NC代表 negative control, 即为阴性对照 nonsense RNA, 处理质量浓度为 25.0 ng/μL。图 4(a)为细胞成管实验的显微成像结果; 图 4(b)为通过 ImageJ 软件对图 4(a)中细胞管腔形成数量进行计数后绘制的柱状数据图。

2.4 纳米颗粒显著抑制 VEGFR2 的转录与蛋白表达

通过 qRT-PCR 与 Western Blotting 分析, 从基因转录及蛋白表达水平系统验证了纳米颗粒对 HUVEC 细胞 VEGFR2 表达的抑制作用, 结果如图 5 和图 6 所示。纳米颗粒处理可显著下调

VEGFR2 mRNA 表达水平, 且在 24 h 处理后即达到抑制平台期(见图 5); 后续时间点虽有降低趋势, 但无显著差异, 这可能与 mRNA 降解速度减缓或靶标稳定性增强有关。图 6 显示: VEGFR2 蛋白表达在 24~96 h 处理过程中呈持续下降趋势, 且在

48~72 h 达到相对稳定阶段,但 72~96 h 后再次显著降低,可能是纳米颗粒累积作用或细胞凋亡导致 VEGFR2 蛋白表达水平进一步下降;VEGFR2 蛋白表达水平与处理时间呈负相关,显示出良好的时间效应,进一步证实了纳米颗粒的环状拓扑结构通过构建空间位阻效应,有效抑制了 RNase 对其的降解作用,从而维持其长效生物活性。

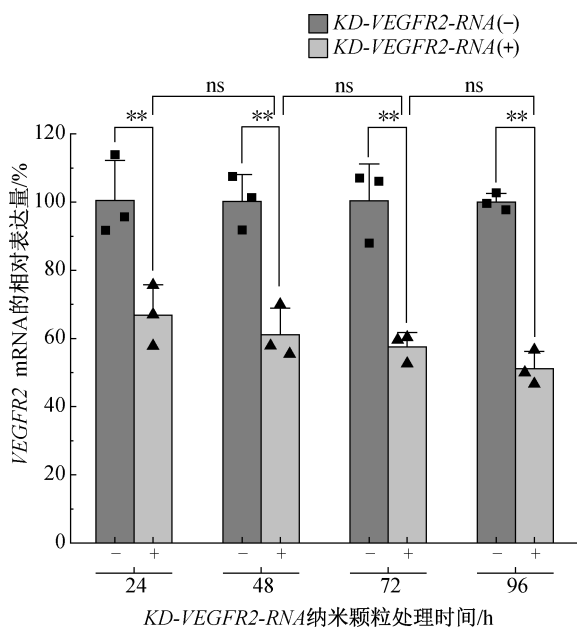
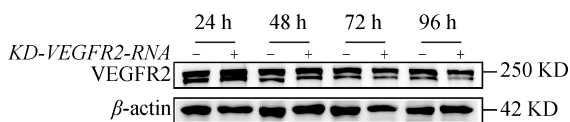
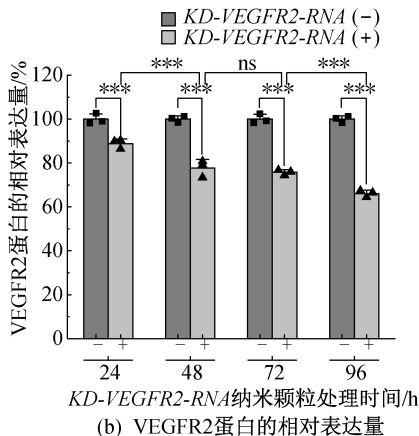


图 5 qRT-PCR 检测 VEGFR2 的 mRNA 相对表达结果
注:图 5 中“-”表示未添加有纳米颗粒的空白对照组,“+”表示添加有 25.0 ng/μL 纳米颗粒的实验组。



(a) VEGFR2 和 β-actin 的表达



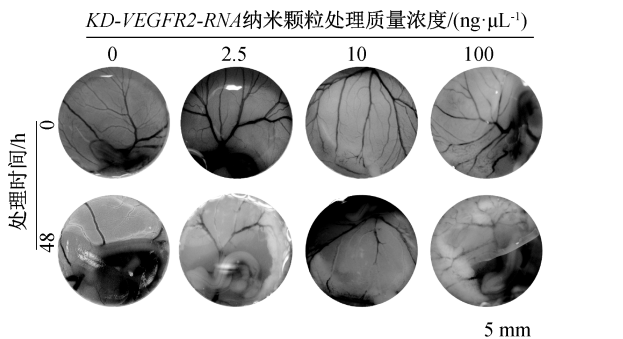
(b) VEGFR2 蛋白的相对表达量

图 6 Western Blotting 检测 VEGFR2 蛋白表达情况及相对表达量

注:“-”表示未添加有纳米颗粒的空白对照组,“+”表示添加有 25.0 ng/μL 纳米颗粒的实验组。

2.5 基于 CAM 模型揭示纳米颗粒下调 VEGFR2 介导的血管生成抑制效应

CAM 模型血管系统发育清晰、操作简便以及与人类基因高度保守。因此 CAM 模型已被广泛应用于血管生成和抗肿瘤药物的研究^[24-25]。为了进一步验证 KD-VEGFR2-RNA 纳米颗粒在体内的抗血管生成能力,采用 CAM 模型进行功能验证,结果如图 7 所示。图 7(a) 表明:在正常发育过程中,对照组 CAM 血管密度轻微下降,符合胚胎发育后期血管重塑的生理规律;纳米颗粒处理组相较于对照组血管腔明显变狭窄,血管分支数量显著减少,分布紊乱,边缘模糊不清,血管网络呈现明显退化趋势,并且在纳米颗粒作用下的鸡胚胚胎发育水平亦明显低于对照组。图 7(b) 表明:纳米颗粒处理组中,随着 KD-VEGFR2-RNA 纳米颗粒质量浓度的增加,CAM 血管密度显著下降,表现出质量浓度依赖性的抑制效应;然而,当质量浓度超过一定阈值后,抑制效应不再随质量浓度升高而增强。



(a) CAM 实验中血管变化情况

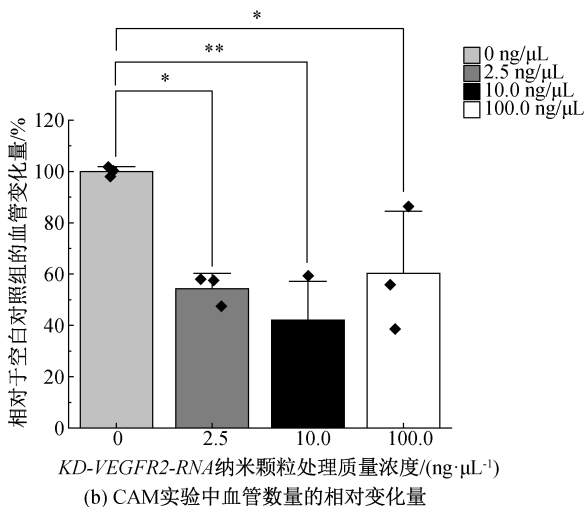


图 7 CAM 实验评价纳米颗粒抑制血管生成能力

注:图 7(a)为经过纳米颗粒处理后 CAM 模型中血管的变化情况;图 7(b)为将各血管分支分别计数为独立单位,统计完成后绘制的柱状图。

3 结 论

本文基于 RNA 的自组装特性,设计并构建了一种可靶向 *VEGFR2* 基因的新型纳米颗粒抑制剂。该纳米颗粒可有效抑制 *VEGFR2* 基因的转录和翻译,在体外实验和鸡胚血管生成模型中均能有效抑制 VEGF-*VEGFR2* 通路。主要结论如下:

a) *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒具备良好的细胞膜穿透能力,可在胞内有效发挥 RNA 干扰功能,显著降低细胞 *VEGFR2* 表达,抑制新生血管的形成。

b) *KD-VEGFR2-RNA* 纳米颗粒形成的特殊的正方形环状拓扑结构能够有效抵御 RNase 的降解,显著延长功能作用时间,使 *VEGFR2* 的表达呈现出稳定且时间依赖性下调趋势。

本研究为肿瘤靶向治疗药物的研发提供了创新性策略。基于已有的研究成果,后续研究将围绕纳米颗粒的工艺优化、生物活性验证及转化应用开展系统性攻关,为纳米颗粒在肿瘤治疗中的应用提供更有力的支持。

参考文献:

- [1] Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(10): 611-625.
- [2] 杨阳, 王万祥. 血管内皮生长因子及其受体靶向治疗在胆道恶性肿瘤中的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2024, 33(2): 265-272.
- [3] Peach C J, Mignone V W, Arruda M A, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at *VEGFR2* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1264.
- [4] Sitohy B, Nagy J A, Dvorak H F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: Reassessing the target[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(8): 1909-1914.
- [5] Pérez-Gutiérrez L, Ferrara N. Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(11): 816-834.
- [6] Cho R, Sakurai Y, Jones H S, et al. Silencing of *VEGFR2* by RGD-modified lipid nanoparticles enhanced the efficacy of anti-PD-1 antibody by accelerating vascular normalization and infiltration of T cells in tumors[J]. *Cancers*, 2020, 12(12): 3630.
- [7] Wang D Y, Liu J C, Li T Q, et al. A VEGFR targeting peptide-drug conjugate (PDC) suppresses tumor angiogenesis in a TACE model for hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Cell Death Discovery*, 2022, 8(1): 411.
- [8] Li H S, Huang H Y, Zhang T, et al. Apatinib: A novel

antiangiogenic drug in monotherapy or combination immunotherapy for digestive system malignancies [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 937307.

- [9] Xie C F, Zhou X, Liang C H, et al. Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via *VEGFR2/STAT3/PD-L1* and *ROS/Nrf2/p62* signaling in lung cancer [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2021, 40(1): 266.
- [10] Thakur A, Rana M, Mishra A, et al. Recent advances and future directions on small molecule VEGFR inhibitors in oncological conditions [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2024, 272: 116472.
- [11] Marques C S, Brandão P, Burke A J. Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 (*VEGFR-2*): Latest insights on synthetic strategies[J]. *Molecules*, 2024, 29(22): 5341.
- [12] Li W H, Zhou C, Yu L, et al. Tumor-derived lactate promotes resistance to bevacizumab treatment by facilitating autophagy enhancer protein *RUBCNL* expression through histone H3 lysine 18 lactylation (*H3K18la*) in colorectal cancer [J]. *Autophagy*, 2024, 20(1): 114-130.
- [13] Tong L N, Liu D Q, Cao Z Y, et al. Research status and prospect of non-viral vectors based on siRNA: A review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 3375.
- [14] Ali Zaidi S S, Fatima F, Ali Zaidi S A, et al. Engineering siRNA therapeutics: Challenges and strategies[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 381.
- [15] 李沁芸, 邹和琴, 杨亦彬. 糖尿病大鼠皮下基质胶血管生成模型的构建[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(9): 913-917.
- [16] Guan R B, Chu D D, Han X Y, et al. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA interference in agricultural pest control [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 753790.
- [17] Tuijtel M W, Mulder A A, Posthuma C C, et al. Inducing fluorescence of uranyl acetate as a dual-purpose contrast agent for correlative light-electron microscopy with nanometre precision[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10442.
- [18] Grabow W W, Zakrevsky P, Afonin K A, et al. Self-assembling RNA nanorings based on RNAI/II inverse kissing complexes[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(2): 878-887.
- [19] Severcan I, Geary C, Verzemnieks E, et al. Square-shaped RNA particles from different RNA folds [J]. *Nano Letters*, 2009, 9(3): 1270-1277.
- [20] Kim T K, Eberwine J H. Mammalian cell transfection: The present and the future [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(8): 3173-3178.
- [21] Lorenc P, Sikorska A, Molenda S, et al. Physiological and tumor-associated angiogenesis: Key factors and therapy targeting VEGF/VEGFR pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 180: 117585.
- [22] Elayat G, Selim A. Angiogenesis in breast cancer: Insights and

- innovations[J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2024, 24(1): 178.
- [23] Apte R S, Chen D S, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [24] Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay[J]. *Reproductive Toxicology*, 2017, 70: 97-101.
- [25] 罗雪兰, 滕红丽, 覃裕旺, 等. 高尿酸对血管内皮细胞 eNOS 基因表达的调节作用及其对血管新生的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(7): 1498-1502.

团队介绍

吕正兵教授团队专注于海洋生物药物与基因工程疫苗研发,致力于海洋多肽类药物筛选技术开发、鲨鱼单域抗体高效表达系统构建及重组疫苗安全性提升等研究。吕正兵教授长期从事海洋多肽类药物、鲨鱼单域抗体和基因工程疫苗等重组生物技术药物的研发,主持和参与“863”、“973”、国家科技支撑计划项目等国家级项目,以及浙江省自然科学基金、重大新药创制共 20 余项,主持企业重大攻关项目 4 项,参加抗糖尿病口服疫苗和人用禽流感疫苗等多个新药的研发;发表学术论文 130 余篇,其中 SCI 80 余篇,授权发明专利 16 项,主编教材 2 部,获国家级金课 1 门,并获多项省部级奖励。

(责任编辑:张会巍)