

# 基于二氧化锰纳米片实现 let-7a 向癌细胞的 可视化递送及其体外抗癌研究

杨强强,张广智,吴芳芳,范书华,于淑娴,洪敏

(聊城大学 化学化工学院,山东 聊城 252059)

**摘要** 在多种实体瘤中,let-7a 都被证明呈下调状态,而这也与癌症病人的预后情况有直接相关性。通过上调 let-7a 在癌细胞中的表达,对于研究有效的癌症治疗方案有积极的推动作用。设计了一种负载着荧光素(FAM)修饰的 let-7a(FAM-let-7a)的二氧化锰纳米探针,其中 FAM 的荧光能够被二氧化锰纳米片( $MnO_2$  NSs)有效淬灭。待探针以胞吞的形式进入肿瘤细胞后,呈高表达状态的谷胱甘肽(GSH)会将  $MnO_2$  NSs 降解成锰离子( $Mn^{2+}$ ),使得负载的 FAM-let-7a 被释放出来,之前被淬灭的 FAM 荧光信号重新恢复,利用激光共聚焦荧光显微镜可以实现对细胞内这一过程的原位可视化监测,并对运送到细胞内的 FAM-let-7a 进行荧光成像。结果表明, $MnO_2$  NSs 作为一种有效的 microRNA 载体,能够将 let-7a 模拟物输送进癌细胞,从而上调 let-7a 的表达,有效诱导其凋亡。

**关键词** 二氧化锰纳米片;let-7a;荧光成像;基因调控;癌细胞凋亡

**中图分类号** R730.54.4

**文献标识码** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Delivery of Let-7a to Cancer Cells Visually Based on $MnO_2$ Nanosheets and the Anti-cancer Research in Vitro

YANG Qiangqiang,ZHANG Guangzhi,WU Fangfang,  
FAN Shuhua,YU Shuxian,HONG Min

(School of Chemistry and Chemical Engineering,Liaocheng University,Liaocheng 252059,China)

**Abstract** Let-7a has been shown to be down-regulated in a variety of solid tumors,and this is directly related to the prognosis of cancer patients.By up-regulating the expression of let-7a in cancer cells,it can promote the research of effective cancer treatment.A manganese dioxide nanoprobe loaded with fluorescein (FAM) modified Let-7a(FAM-let-7a) was designed,in which the fluorescence of FAM could be effectively quenched by manganese dioxide nanosheets( $MnO_2$  NSs).After entering tumor cells by endocytosis, $MnO_2$  NSs will be degraded into manganese ion( $Mn^{2+}$ ) by the overexpressed glutathione(GSH).At the same time,the loaded FAM-let-7a will be released and the fluorescence of FAM will be resumed.All of these process can be monitored in situ visually by the use of laser confocal fluorescence

**收稿日期**:2020-08-20

**基金项目**:国家自然科学基金项目(91543206);山东省自然科学基金项目(ZR2015BM024);山东省泰山学者研究基金和聊城大学研究基金资助

**通讯作者**:洪敏,女,汉,博士,副教授;研究方向:癌症的诊疗及抗癌药物体外筛选,E-mail:hongmin@lcu.edu.cn.

microscopy, and the intracellular FAM-let-7a can be imaged fluorescently. The results showed that  $\text{MnO}_2$  NSs, as an effective microRNA vector, could deliver let-7a analog into cancer cells, thus up-regulating let-7a expression and effectively inducing the apoptosis of cancer cells.

**Key words**  $\text{MnO}_2$  nanosheets; let-7a; fluorescent imaging; gene regulation; apoptosis of cancer cell

## 0 引言

目前,癌症成为导致人类死亡的主要疾病之一。迄今为止,尚未发现特别有效的治疗和预防方法。传统的癌症治疗主要以外科手术、放射性治疗及化学疗法为主,但存在不良反应,疗效不彰,无法根治等缺点。目前,对于攻克癌症,其治疗关键是早期诊断和精准化个性治疗。随着不少“癌基因”和“抑癌基因”的相继发现,肿瘤基因治疗前景乐观。基因检测(即分子靶标检测)是以研究疾病发生、发展过程中细胞分子生物学上的差异为基础,筛选和鉴定与疾病密切相关的蛋白质、核酸等生物大分子作为药物作用的靶点,通过靶向给药实现有效的靶向治疗及个体化精准医疗。肿瘤分子靶标的出现使得靶标基因药物能够针对癌细胞本身进行治疗,不会对正常细胞产生重大伤害,缓解患者病痛的同时更带给他们生的希望。自肿瘤基因治疗技术应用以来,治疗效果十分显著,得到了越来越多的癌症患者的认可,成为非常有前途的个体化治疗方法<sup>[1]</sup>。

MicroRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 20-24 个核苷酸的非编码单链小 RNA,其参与多种重要细胞活动的调控,如细胞增殖、分化、凋亡等<sup>[2]</sup>。研究发现,miRNA 的表达与多种癌症的发生、发展有关,其既可以充当抑癌基因(如 microRNA-21)<sup>[3,4]</sup>,又可以充当癌基因(如 let-7a)<sup>[5,6]</sup>。通过基因技术,下调癌细胞内过表达的癌基因,或上调低表达的抑癌基因,都被证明能有效诱导癌细胞凋亡<sup>[7,8]</sup>,因此,被认为是非常有潜在价值的癌症治疗方法。

目前制约基因疗法的主要问题是核酸序列的高效输送问题,传统方法主要是以病毒为载体进行输送,但由于病毒本身的毒副作用及潜在的免疫原性和致癌性等问题,限制了其在该领域的应用。例如,以病毒为载体包裹 microRNA 转染进入癌细胞,进行功能性缺失或恢复,研究上调或下调 microRNA 的表达对癌症的治疗作用<sup>[9]</sup>。该方法的优势是可以长期稳定恢复或降低 microRNA 的表达水平,沉默肿瘤中活化的靶向癌基因,从而起到治疗肿瘤的作用。但是该方法在杀伤肿瘤细胞的同时也会感染正常的细胞。同时,病毒载体转染进细胞时会随机插入正常宿主细胞 DNA,破坏一些基因信号通路,从而导致原癌基因活化。另外,因为外源病毒引入,还会诱发机体免疫反应,进而对机体的安全性产生较大影响<sup>[10]</sup>。因此,输送核酸药物的非病毒载体,主要包括脂质体、阳离子多聚体、碳纳米材料、以及金属纳米颗粒等,成为基因药物递送的更好选择<sup>[11]</sup>。为了促进该领域的发展,研究者们试图利用一些新材料来解决当前药物载体的一些不足,比如制备复杂、载药量低、容易泄露等问题。近年来,新开发的一种制备简单、低成本、低毒性的二维纳米材料——二氧化锰纳米片( $\text{MnO}_2$  nanosheets,  $\text{MnO}_2$  NSs)<sup>[12]</sup>,被人们广泛使用。一方面,其对单链 DNA 或 RNA 具有很强的吸附能力;另一方面,吸附单链核酸的  $\text{MnO}_2$  NSs 能以胞吞的形式进入癌细胞,随后会被癌细胞中高表达的谷胱甘肽(GSH)降解为锰离子( $\text{Mn}^{2+}$ ),将其表面吸附的 DNA 或 RNA 释放到细胞质中,从而实现单链核酸的跨膜运输。除此之外, $\text{MnO}_2$  NSs 还具有强的荧光淬灭能力,会使吸附到  $\text{MnO}_2$  NSs 上的核酸上修饰的荧光基因发生淬灭,而当  $\text{MnO}_2$  NSs 被 GSH 降解,核酸被释放出来后,荧光信号会重新恢复<sup>[13]</sup>。基于这种荧光信号从“关”到“开”的转变,可以实时监测负载核酸的  $\text{MnO}_2$  NS 探针的跨膜情况及核酸在细胞中的分布,而这些性质都为  $\text{MnO}_2$  NSs 用于疾病诊断和治疗提供了新的契机。

基于以上表述,本实验中,我们试图以  $\text{MnO}_2$  NSs 为载体,负载上 5'端有荧光素(FAM)修饰的 microRNA let-7a(FAM-let-7a),制备得到 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针,该探针以胞吞的形式进入癌细胞后,在癌细胞内高表达的 GSH 的作用下  $\text{MnO}_2$  NSs 降解为  $\text{Mn}^{2+}$ ,从而将其表面吸附的 FAM-let-7a 释放到细胞质中,同时探针上被淬灭的 FAM 的荧光会重新恢复。利用激光共聚焦荧光显微成像,根据实时观察到的荧光信号的变化,判断 FAM-let-7a 进细胞的情况。另外,作为抑癌基因,当癌细胞内的 let-7a 的表达被上调时,希望实现诱导癌细胞凋亡的目的。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

氯化锰四水合物( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 四甲基氢氧化铵( $\text{TMA} \cdot \text{OH}$ ), 还原型谷胱甘肽(GSH), 二甲基亚砜(DMSO), 氯化钙溶液(1 M), 氯化镁溶液(1 M), 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3 wt%), Tris-盐酸(Sigma-Aldrich 购得), Tris-HCl 缓冲液(100 mM, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5), 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 136.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.72 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.41 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 细胞培养试剂和 3-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT)(定国生物科技有限公司), 用超纯水制备所有水溶液, 王水由体积比 3:1 的盐酸和硝酸混合而成。其它试剂均为市售分析纯试剂。

FAM-let-7a 的序列: 5'-FAM-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3';

let-7a-RNA 的序列: 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3';

control-RNA 的序列: 5'-AUAAUAGGAGGGGUAGAAGG-3'.

JEM-2100 透射电子显微镜(JEOL 有限公司、日本), 90 Plus/BI-MAS 设备(美国), Zetasizer(莫尔文 Nano-Z, 英国), Lambda750 紫外可见分光光度计(PerkinElmer, 英国), F-7000 荧光光谱仪(日立, 日本), LSM880 激光扫描共聚焦显微镜(蔡司, 德国), ELX808 酶标仪(BioTek, 美国)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 合成  $\text{MnO}_2$  NSs 并进行表征。在 15 s 内使  $\text{TMA} \cdot \text{OH}$ (0.6 M) 和  $\text{H}_2\text{O}_2$ (3 wt%) 的混合物(20 mL) 与  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10 mL, 0.3 M) 溶液反应, 形成深棕色悬浮液后, 将所得混合物在室温下搅拌约 24 h, 以 2000 rpm 离心 10 min, 用去离子水和甲醇洗涤, 然后在  $-60^\circ\text{C}$  下干燥。随后取 10 mg 干燥的粗产物, 分散在 20 mL 去离子水中并超声处理 10 h, 最后将分散体系在 2000 rpm 下离心 30 min, 并将上清液用于实验中<sup>[13]</sup>。

1.2.2 荧光淬灭和恢复。将不同量的  $\text{MnO}_2$  NSs 溶液(最终浓度分别为 0、14、28、35、42、48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与 let-7a RNA 溶液(最终浓度为 100 nM) 混合, 最后加入 Tris-HCl 缓冲液配置成 200  $\mu\text{L}$  的试样。30 min 后, 记录样品的荧光强度。对于荧光恢复实验, 不同浓度的 GSH(0、2、4、6、8、10、15 mM) 与 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针( $\text{MnO}_2$  NSs: 48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FAM-let-7a: 100 nM) 混合, 最后加入 Tris-HCl 缓冲液配置成 200  $\mu\text{L}$  的样品, 静置 5 min, 然后测定各体系的荧光强度(激发波长: 488 nm)。

1.2.3 纳米探针的制备。FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针: 取 220  $\mu\text{L}$  DEPC 水加入到 FAM-let-7a(1 OD) 中, 溶解混匀。之后, 将 FAM-let-7a(最终浓度为 200 nM) 加入到包含  $\text{MnO}_2$  NSs(最终浓度为 84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 放置 30 min 后, 即得 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针母液, 将其储存在  $4^\circ\text{C}$  条件下备用。let-7a-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 或 control-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针: 方法同上, 得到的探针母液中 RNA 的最终浓度为 200 nM,  $\text{MnO}_2$  NSs 最终浓度为 84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.4 细胞培养。人宫颈癌细胞(HeLa), 人肝癌细胞(HepG2)、人乳腺癌细胞(MCF-7) 用 Dulbecco's modified Eagle 的培养基(DMEM GIBCO) 在培养瓶中培养, 并加入 10% 胎牛血清、青霉素(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和链霉素(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 在含 5% 二氧化碳、 $37^\circ\text{C}$  湿润的环境中培养。用细胞计数器测定细胞数量。

1.2.5 HeLa、HepG2、MCF-7 细胞中进行 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针的原位成像。将癌细胞(0.4 mL,  $1 \times 10^6$  细胞/mL) 接种在 20 mm 共聚焦培养皿中培养 24 h, 然后将一定量的 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针母液加入到每个培养皿中, 使探针中  $\text{MnO}_2$  NS 的浓度保持在 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。之后, 细胞在  $37^\circ\text{C}$  条件下继续孵育 4 h 后, 除去培养基, 用 PBS 溶液冲洗两遍后, 再加入一定量的 PBS, 随后用激光共聚焦显微镜进行检测成像, 激发波长为 488 nm。

1.2.6 细胞的存活率研究。将三种不同的细胞(包括 HepG2、MCF-7 以及 HeLa 细胞) 分别接种在 96 孔板( $1 \times 10^5$  细胞/孔) 中培养 24 h, 然后将细胞与相同浓度的纳米探针一起孵育不同时间(24、36、48 和 72 h) 或与不同浓度的纳米探针孵育 72 h。处理后, 除去培养基, 并将制备的 MTT(0.5 mg/mL) 加入孔中, 在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 4 h 后, 除去培养基, 并向每个孔中加入 100  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜。然后, 在室温下振荡细胞板 10 min, 以溶解由活细胞形成的晶体, 之后使用酶标仪在 490 nm 处测量每个孔的吸光度。通过  $(A_{\text{Test}}/A_{\text{Control}}) \times 100$

计算相对细胞存活率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验原理

5'端有荧光分子 FAM 修饰的 FAM-let-7a 会通过物理吸附直接结合到  $\text{MnO}_2$  NSs 的表面,此时 FAM 的荧光信号会被淬灭,体系处于“turn-off”的状态,形成的 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针,随后利用  $\text{MnO}_2$  NSs 能够以胞吞的形式进入细胞,而将 FAM-let-7a 输送入细胞中。进入肿瘤细胞后,在 GSH 的作用下, $\text{MnO}_2$  NSs 降解成  $\text{Mn}^{2+}$ ,同时结合在  $\text{MnO}_2$  NSs 上的 FAM-let-7a 被释放出来,之前被淬灭的 FAM 荧光信号恢复 (turn-on),利用激光共聚焦荧光显微镜观察该荧光信号,可以实现对细胞内这一过程的原位监测及荧光成像分析(如图 1 所示)。由于 FAM-let-7a 在大多数癌细胞中都扮演抑癌基因的角色,而我们这里的设计就相当于上调了癌细胞中的这种抑癌基因,从而进一步诱导癌细胞走向凋亡。

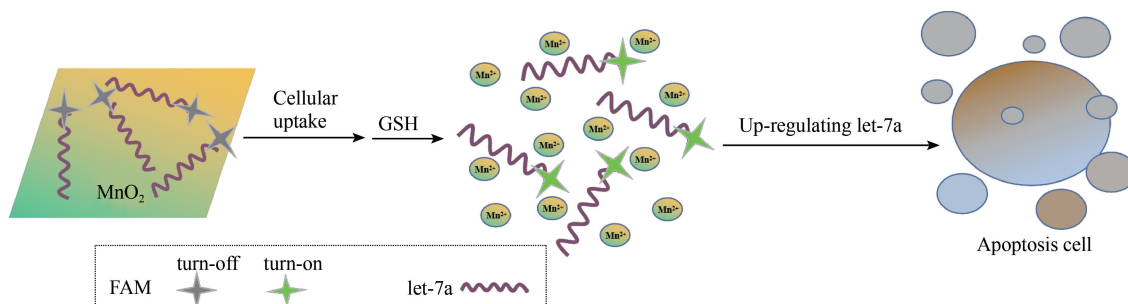


图 1 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针进细胞,释放 FAM-let-7a 及上调癌细胞内 let-7a 表达诱导癌细胞凋亡示意图

### 2.2 二氧化锰纳米片表征

TEM 测试结果表明, $\text{MnO}_2$  NSs 显示二维片状薄纱样结构(如图 2(a) 所示),但在其用于载体制备 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针前,会利用超声对  $\text{MnO}_2$  NSs 进行充分破碎,以利于其进入细胞。此外, $\text{MnO}_2$  NSs 的 UV-vis 光谱约在 370 nm 处显示出最大吸收峰(如图 2(b)所示),这些实验结果均与文献报道一致<sup>[14]</sup>,进而表明  $\text{MnO}_2$  NSs 被成功地制备出来。

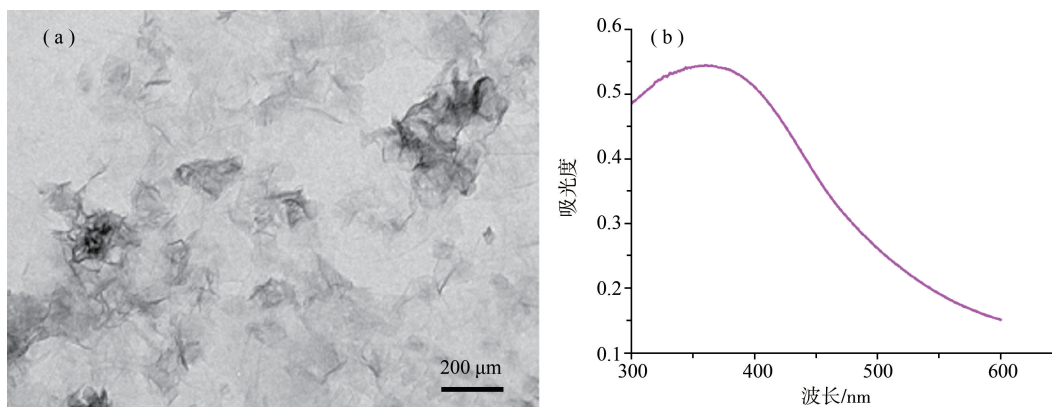


图 2 (a) 二氧化锰纳米片透视电子显微镜图像;(b) 二氧化锰纳米片 UV-vis 光谱图

### 2.3 荧光淬灭和恢复

向 FAM-let-7a 溶液中各加入不同量的  $\text{MnO}_2$  NSs, FAM-let-7a 的浓度固定在 100 nM,而  $\text{MnO}_2$  NS 的浓度依次增加(0、14、28、35、42、48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),混合 30 min,依据荧光淬灭强度来评估制备的  $\text{MnO}_2$  NSs 对 FAM-let-7a 的吸附效果。在不存在  $\text{MnO}_2$  NSs 的时候,如果以 488 nm 为激发波长, FAM-let-7a 上修饰的 FAM 会在 525 nm 处有特征荧光发射,结果表明,随着  $\text{MnO}_2$  NSs 浓度的增加, FAM 的荧光强度逐渐降低,当  $\text{MnO}_2$  NSs 在 42  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下完全淬灭 FAM 的荧光(如图 3(a)),我们认为,在此  $\text{MnO}_2$  NSs 浓度下能够完全有效吸附 FAM-let-7a,因此,为保证探针溶液中, FAM-let-7a 被有效吸附到  $\text{MnO}_2$  NSs 上,后续制备成的 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针母液中, FAM-let-7a 和  $\text{MnO}_2$  NSs 的比例为 100 nM:42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

另外,当向完全淬灭的 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针中添加不同浓度的 GSH(0、2、4、6、8、10、15 mM)

时,随着 GSH 浓度的增大,更多的  $\text{MnO}_2$  NSs 被降解,FAM 标记的 FAM-let-7a 被释放出来,FAM 的荧光逐步恢复,体系中的荧光强度逐渐增强(如图 3(b)所示),从而证实  $\text{MnO}_2$  NSs 可以被 GSH 有效降解.但与没有被  $\text{MnO}_2$  NSs 吸附的相同浓度 FAM-let-7a 的荧光强度相比,FAM 的荧光并没有完全恢复,这可能是由于  $\text{MnO}_2$  NSs 的吸附会影响 FAM 的荧光效率造成的<sup>[13]</sup>。

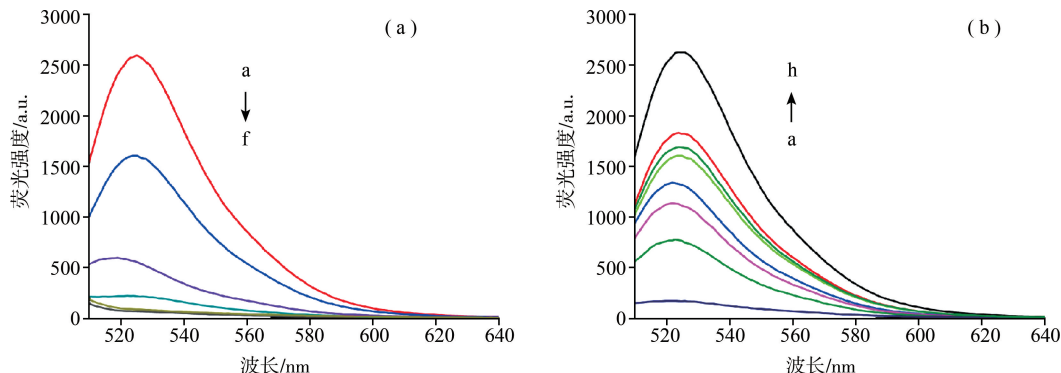


图 3 (a)  $\text{MnO}_2$  NSs 吸附 FAM-let-7a 荧光淬灭图(a-f  $\text{MnO}_2$  NSs 浓度逐渐增加);(b) 在 GSH 作用下 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针的荧光恢复图(a-g GSH 浓度逐渐增加,h100 mM 单纯的 FAM-let-7a)

## 2.4 细胞内荧光成像

接下来我们希望实现 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针在癌细胞内原位成像,选择了人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 HepG2、及人乳腺癌细胞 MCF-7 作为研究对象。FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 纳米探针通过内吞作用进入细胞,细胞内所含的 GSH 会使  $\text{MnO}_2$  NSs 降解,FAM 标记的 FAM-let-7a 将从  $\text{MnO}_2$  NSs 上释放,因此荧光恢复。为了获得最佳成像效果,将细胞与探针一起孵育 4 h 后观察细胞。在 HeLa、HepG2、MCF-7 细胞中可以清楚地观察到荧光信号(如图 4),从而证明在这里研究的三种癌细胞中的 GSH 能有效的将  $\text{MnO}_2$  NSs 降解,使得被负载的 FAM-let-7a 释放到细胞质中。其中 HeLa 细胞给出的荧光图清楚表明这种荧光体系在细胞质中的分布,而对于不同的细胞类型,荧光信号分布则有一些差异(如 MCF-7),但整体显示,运送的 FAM-let-7a 都进入了细胞质中。

## 2.5 细胞的存活率

microRNA let-7a 在癌细胞中起到抑制其增殖的作用,在之前的很多工作中都得到了证实<sup>[15-17]</sup>。相对于正常细胞而言,在大部分癌细胞中,let-7a 都是低表达的<sup>[4]</sup>,而通过基因转染的方法往癌细胞中人为输送进一定量的 let-7a,也就相当于上调 let-7a 在癌细胞中的表达,应该能够达到诱导癌细胞凋亡的目的<sup>[18]</sup>。例如陈杰课题组<sup>[19]</sup>报道了一个胆固醇包裹 let-7a 模拟物转染进细胞的工作,以人肝癌细胞为研究对象,结果表明,通过该方法上调 let-7a 的表达后有效抑制了癌细胞的增殖,体内实验证明胆固醇包裹 let-7a 模拟物可以明显抑制肝癌移植瘤的生长和转移。

鉴于此,我们希望这里用到的 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针可通过上调抑癌基因 let-7a 的表达来达到诱导癌细胞凋亡的目的。为了评估这种效应,一定浓度的 let-7a-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针与三种癌细胞作用不同时间(24、36、48、72 h),然后使用 MTT 法测定癌细胞的存活率。研究表明,let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 复合物对不同癌细胞的存活率具有明显的时间依赖性影响。作用时间越久,细胞的存活率越低(如图 5A、B、C),72 h 后,三种癌细胞的存活率都降到 60% 以下,HepG2 细胞的存活率甚至降到 50% 左右.这些结果与之前的报道吻合,例如,陈杰等人研究了胆固醇包裹 let-7a 对肝癌细胞的抑制作用,与 HepG2 细胞作用 5 D 后,细胞存活率下降到了 37.7%<sup>[19]</sup>。另外,Takahashi 等人进行的体外细胞实验也证明,提高 A549 细胞中 let-7a 的含量可以有效抑制其增殖<sup>[20]</sup>。

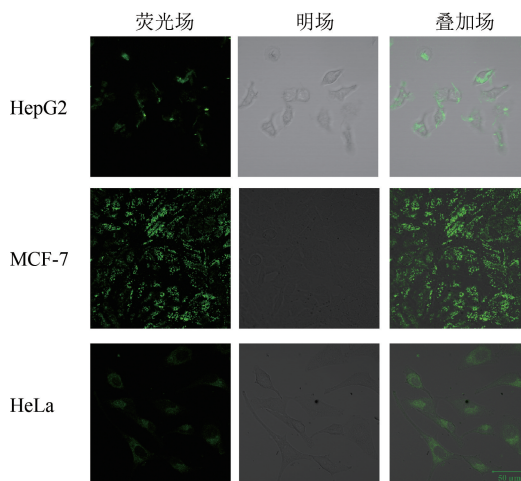


图 4 与 FAM-let-7a/ $\text{MnO}_2$  NS 探针一起孵育后 HepG2、MCF-7、HeLa 细胞的共聚焦图像

作为对照,我们将与 let-7a 有相同长度的任意序列的 Control-RNA 结合到  $\text{MnO}_2$  NSs 上,得到了 Control-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针。按照同样的实验操作,测定结果表明相同浓度的 Control-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针 对癌细胞增殖的影响明显小于 let-7a-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针。

另外,我们还测定了不同浓度的  $\text{MnO}_2$  NSs 及 Control-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针与 HeLa 细胞作用 72 h 后对 HeLa 细胞存活率的影响。MTT 实验结果表明,当  $\text{MnO}_2$  NSs 的浓度低于  $40 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,HeLa 细胞与其作用 72 h 后其生存率仍能保持在 90% 以上,而我们这里用到的  $\text{MnO}_2$  NSs ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的浓度处在这个范围内。这些结果都充分证明 let-7a-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针通过上调癌细胞中 let-7a 的含量,对癌细胞的增殖起抑制作用,而非由于  $\text{MnO}_2$  NSs 自身的细胞毒活性。

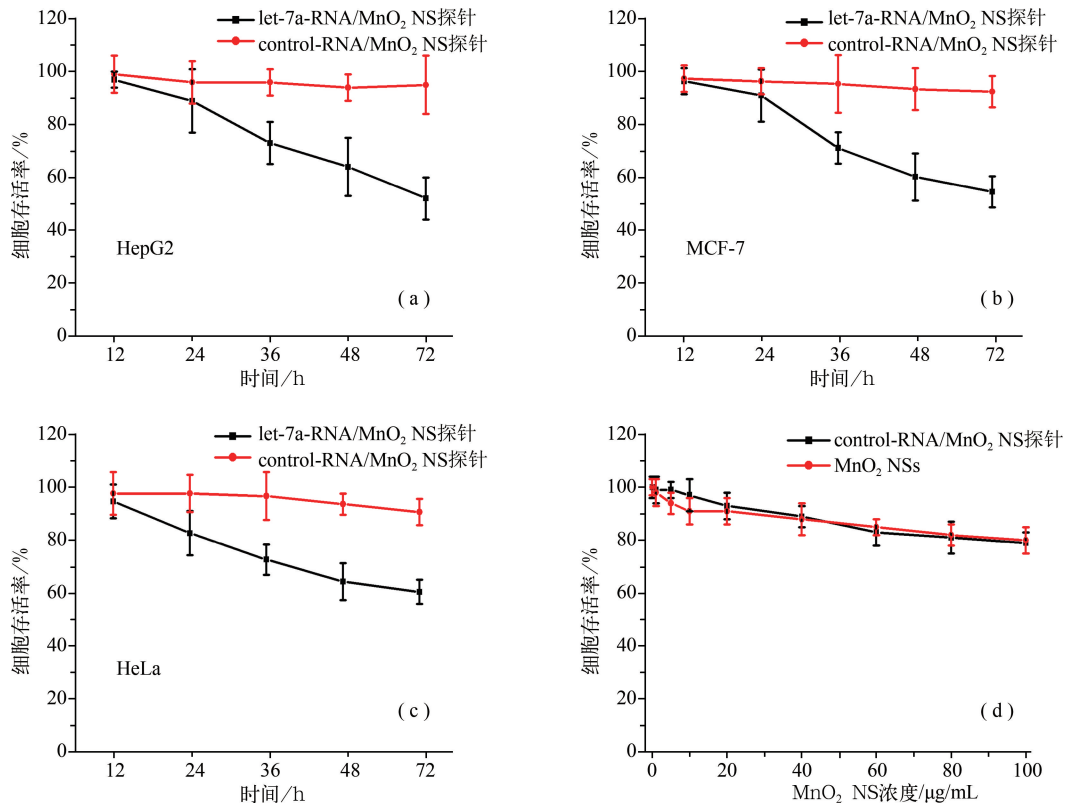


图 5 let-7a-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针与不同细胞作用不同时间后细胞的存活率 ( $\text{MnO}_2$  NSs 的浓度为  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ )  
(a) HepG2 细胞; (b) MCF-7 细胞; (c) HeLa 细胞; (d) 不同浓度的  $\text{MnO}_2$  NSs 及 control-RNA/ $\text{MnO}_2$  NS 探针与 HeLa 细胞孵育 72 h 后的的细胞存活率

### 3 结论

本实验中,通过  $\text{MnO}_2$  NSs 负载着 FAM-let-7a 进入癌细胞,在癌细胞内高表达的 GSH 的作用下,  $\text{MnO}_2$  NSs 发生降解, FAM-let-7a 被释放到细胞质中。根据细胞内 FAM 荧光信号的恢复情况通过激光共聚焦荧光成像实现了对这一过程的原位监测。同时,通过上调抑癌基因 let-7a 的方式实现了有效诱导癌细胞凋亡的目的。

### 参 考 文 献

- [1] LIM E K, KIM T, PAIK S, et al. Nanomaterials for theranostics: recent advances and future challenges [J]. Chemical Reviews, 2015, 115 (1): 327-394.
- [2] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [3] CHAN J A, KRICHEVSKY A M, KOSIK K S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. Cancer research, 2005, 65(14): 6029-6033.
- [4] HONG M, SUN H, XU L, et al. In situ monitoring of cytoplasmic precursor and mature microRNA using gold nanoparticle and graphene

- oxide composite probes [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1021: 129-139.
- [5] SAMPSON V B, RONG N H, HAN J, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells [J]. *Cancer Research*, 2007, 67(20): 9762-9770.
- [6] DENG M, HOU J, HU J, et al. Hepatitis B virus mRNAs functionally sequester let-7a and enhance hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Letters*, 2016, 383(1): 62-72.
- [7] MAQBOOL R, UL HUSSAIN M. MicroRNAs and human diseases; diagnostic and therapeutic potential [J]. *Cell and Tissue Research*, 2014, 358(1): 1-15.
- [8] CHENG C J, BAHAL R, BABAR I A, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment [J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 107-110.
- [9] CAWOOD R, WONG S L, DI Y, et al. MicroRNA controlled adenovirus mediates anti-cancer efficacy without affecting endogenous microRNA activity [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16152.
- [10] LEJA J, NILSSON B, YU D, et al. Double-detargeted oncolytic adenovirus shows replication arrest in liver cells and retains neuroendocrine cell killing ability [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8916.
- [11] CONDE J, EDELMAN E R, ARTZI N. Target-responsive DNA/RNA nanomaterials for microRNA sensing and inhibition; the jack-of-all-trades in cancer nanotheranostics? [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 81: 169-183.
- [12] CHEN Y, YE D, WU M, et al. Break-up of two-dimensional MnO<sub>2</sub> nanosheets promotes ultrasensitive pH-triggered theranostics of cancer [J]. *Advanced Materials*, 2014, 26(41): 7019-7026.
- [13] ZHAO Z, FAN H, ZHOU G, et al. Activatable fluorescence/MRI bimodal platform for tumor cell imaging via MnO<sub>2</sub> nanosheet-aptamer nanoprobe [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(32): 11220-11223.
- [14] LI J, LI D, YUAN R, et al. Biodegradable MnO<sub>2</sub> nanosheet-mediated signal amplification in living cells enables sensitive detection of down-regulated intracellular microRNA [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(7): 5717-5724.
- [15] JOHNSON C D, ESQUELA-KERSCHER A, STEFANI G, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells [J]. *Cancer Research*, 2007, 67(16): 7713-7722.
- [16] TSANG W P, KWOK T T. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3 [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(10): 1215-1222.
- [17] JOHNSON S M, GROSSHANS H, SHINGARA J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family [J]. *Cell*, 2005, 120(5): 635-647.
- [18] YEUNG M L, JEANG K T. MicroRNAs and cancer therapeutics [J]. *Pharmaceutical Research*, 2011, 28(12): 3043-3049.
- [19] LIU Y M, XIA Y, DAI W, et al. Cholesterol-conjugated let-7a mimics; antitumor efficacy on hepatocellular carcinoma in vitro and in a pre-clinical orthotopic xenograft model of systemic therapy [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 889-895.
- [20] TAKAMIZAWA J, KONISHI H, TAKAHASHI T, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. *Cancer Research*, 2004, 64: 3753-3756.