

网络出版时间: 2021-7-28 11:50 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1031.047.html>

# 自组装 DEAC-PNAG@ miR-150 纳米体系制备及其血管保护机制研究

李雅珺,许航,任珊

**摘要** 目的 研究自组装技术制备脱乙酰化聚 N-乙酰氨基葡萄糖( DEAC-PNAG) -miR-150 纳米靶向体系 ,并对其血管保护机制进行探讨。方法 通过自组装技术制备纳米聚合物 ,通过透射电镜和 DLS 进行表征 ,凝胶位移法用于评价封装效率。通过荧光显微镜检测细胞摄取 ,RT-PCR 用于检测转染细胞中 miR-150 的表达 ,Western blot 用于检测纳米纳聚合物对 HUVECs 细胞中血管紧张素 II ( Ang-II ) 和 DLK-1 表达影响。结果 DEAC-PNAG 聚合物具有纳米尺寸和阳性表面电势 ,可保护 miRNA 不被 RNase A 降解。此外 ,DEAC-PNAG@ miRNA 能促进 miRNA 的细胞摄取 ,通过抑制 HUVECs 细胞中 Ang-II 和 DLK-1 的表达发挥血管保护作用。结论 DEAC-PNAG@ miR-150 是一个有效的 miRNAs 递送平台 ,可能对脓毒症治疗有积极意义。

**关键词** 内皮功能障碍; 脓毒症; miRNA 传递; 炎症

**中图分类号** R 783.1

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2021)09-1424-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.015

脓毒症是重症监护病房高死亡率的主要原因之一<sup>[1]</sup>。脓毒症可释放大量炎症因子 ,促进免疫细胞的活化和转运。此外 ,脓毒症常因内皮功能障碍扰乱微循环 ,导致器官衰竭<sup>[2]</sup>。因此 ,减少脓毒症患者体内相关炎症因子的释放、减轻内皮细胞损伤对于降低脓毒症患者的死亡率大有裨益。微小 RNA ( microRNA, miRNA) 能预防和修复脓毒症患者体内细胞压力和炎症引起的内皮细胞损伤<sup>[3-4]</sup>。miR-150 是内皮细胞中表达的 miRNA ,对维持血管完整性和血管生成具有重要意义<sup>[5-7]</sup>。核酸的一些理化性质限制其细胞摄取和潜在治疗效果<sup>[8]</sup>。因此 ,开发一种安全有效的 miRNA 载体对 miRNA 的治疗具有重要意义<sup>[9]</sup>。该研究通自组装技术制备脱乙酰

2021-02-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金( 编号: 81801957); 八师石河子市中青年科技创新领军人才项目( 编号: 2020RC01)

作者单位: 石河子大学医学院第一附属医院重症医学一科 ,石河子 832000

作者简介: 李雅珺,女,硕士研究生;

任珊,女,副主任医师,责任作者,E-mail: newllyshan@163.com

化聚 N-乙酰氨基葡萄糖( DEAC-PNAG) -miRNAs 纳米聚合物并对其进行表征 检测纳米聚合物对 miRNAs 保护和靶向作用 ,并探讨其发挥血管保护作用的相关机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 脱乙酰聚 N-乙酰氨基葡萄糖 ( DEAC-PNAG) 40 mg/ml( 分子量约 40 000) 和无菌 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( 50 mmol/L) 购自阿拉丁公司( 中国) ; EBM-2 基础培养基 ,胎牛血清( FBS) 、细胞培养基、青霉素链霉素溶液购自 Sigma Aldrich( 美国) ; miR-150-5p ( UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG) 、miR-150-5p 抑制剂从 Genechem( 中国) 获得; 标记为 hsa-miR-150-5p 的 Cy3 购买自 GE Healthcare Dharmacon( 美国) ; 含 DAPI 的 Extend® Gold 防褪色试剂( ThermoFisher Scientific 美国) ; RT-PCR 试剂盒购自 Qia- gen 公司( 美国) ; 人脐静脉内皮细胞( human umbilical vein endothelial cells ,HUVECs) 购自 BioVector 公司( 中国) ; NIH3T3 胚胎成纤维细胞购自 Solarbio 公司( 美国) 。

**1.2 仪器与设备** 5424R 离心机( Eppendorf ,德国) ; JEOL-J1010 透射电子显微镜( 美国) ; 滨松 C4742-95 数码相机( 日本) ; Zetasizer Nano-ZS 90 ( Malvern 英国) ; UV-vis 透照仪( Alpha Innotech Corporation ,日本) ; Synergy 4 微板阅读器( BioTek ,美国) ; Olympus IX73 倒置显微镜( Olympus ,日本) ; CFX96 实时 PCR 检测系统( Bio-Rad 美国) 。

**1.3 纳米颗粒制备** 在室温下向 100 μl 浓度为 50 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中加入 miR-150-5p ( 0.5 ~ 25.0 μg) ,以研究封装效率。添加 1.1 mg 的 DEAC-PNAG 后高速涡流 20 s。随后 添加 NaCl ,自组装在室温下反应 15 min。使用 NaOH 中和纳米聚合物混悬液 ,涡流 10 s ,最终 pH 值为 7。通过 15 000 r/min 4 °C 离心 1 h ,分离纳米颗粒备用。N/P 采用以下公式计算:

$$N/P = (\text{阳离子 DEAC - PNAG} \times 150 \text{ 氨基摩尔数}) / (\text{miRNA} \times 44 \text{ 磷酸基团摩尔数})$$

制备 4 种不同比例的 DEAC-PNAG/miRNA , 分别含有 24.48、1.80、0.90 和 0.45  $\mu\text{g}$  miRNA , 比例为 50 : 1、700 : 1、1 400 : 1 和 2 700 : 1。

**1.4 DEAC-PNAG @ miRNA 表征** 取 DEAC-PNAG@ miRNA 混悬液离心 , 弃上清液。将纳米颗粒重悬于 TEM 网格上。样品在超纯净水中冲洗 , 干燥 , TEM 成像 , DLS 测定 DEAC-PNAG 纳米聚合物的尺寸和 Zeta 电位。

**1.5 电泳迁移率** 用 4% ( W/V ) 琼脂糖 E-gel 和 iBase 系统检测 DEAC-PNAG 与 miR-150 的结合 , 向凝胶中添加 20  $\mu\text{l}$  的纳米聚合物样品 , iBase 电泳按照制造商说明书实施。使用 UV-Vis 透照仪分析 miR-150 条带。

**1.6 封装效率** 为评价 DEAC-PNAG 对 miRNA 的包封效率 , 用游离 miRNA 绘制标准曲线。不同浓度的 miRNA 在 4% ( W/V ) 琼脂糖 E- 凝胶中用 iBase 系统电泳 30 min。同时 , 使用 4% SDS 溶解凝胶中的纳米聚合物。用 Image J 分析条带 , 根据谱带强度生成标准曲线 , 并根据标准曲线计算被包封的 RNA 浓度。

### 1.7 DEAC-PNAG @ miRNA 对 miRNA 保护作用

为评价 DEAC-PNAG@ miRNA 对 miRNA 的保护作用。纳米聚合物和游离 miR-150 在 37 °C 下用 0.18  $\mu\text{g}$  RNase A 处理 1 h。15 000 r/min 25 °C 离心 , 弃上清液 , 用 4  $\mu\text{l}$  EDTA ( 0.25 mol/L ) 处理 10 min。随后将沉淀重新悬浮在 2% 十二烷基硫酸钠中 , 在凝胶电泳前静置 30 min。处理后的纳米聚合物和游离 miRNA 用 4% ( W/V ) 琼脂糖 E- 凝胶在 iBase 系统中电泳 30 min。

### 1.8 体外细胞实验

**1.8.1 细胞活力检测** 使用 EBM-2 基础培养基 , 在 37 °C 、 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。培养基每 48 h 更换一次 , 第 3~5 代取用。在添加 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养。研究不同比例 DEAC-PNAG@ miRNA 处理后 HUVECs 的存活率: miRNA 纳米聚合物用 MTT 法测定 , 在 2.0 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔的 96 孔板中孵育。补充培养基 , 用不同 N/P 摩尔比的纳米聚合物处理细胞。培养 24 h 后 , 洗涤细胞并加入 MTT 溶液。使用 Synergy 4 微板阅读器在 570 nm 的吸光度处评估细胞活性。

**1.8.2 细胞摄取** 用 Cy3 标记的 miRNA-150 ( Cy3-miRNA-150 红色 ) 摄取 , 细胞核用 DAPI ( 蓝色 ) 复染。25  $\mu\text{l}$  摩尔浓度分别为 55.0、27.5 和 14.0 nmol/L 纳米聚合物处理 HUVECs 24 h。去除聚合

物 , 用 PBS 洗涤细胞 , 用 4% PFA 固定 20 min。去除 PFA 后 , 使用含 DAPI 的 Extend® Gold 防褪色试剂固定。荧光图像通过 Olympus IX73 倒置显微镜获得。

**1.8.3 RT-PCR** HUVECs 细胞和 NIH3T3 细胞以 1.0 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度接种。让细胞孵育过夜 , 随后用 25  $\mu\text{l}$  纳米聚合物处理 24 h。用 Mirnaesy 试剂盒分离 miRNA。使用 Bio-Tek Gen5 Take 3 s 软件阅读分析数据评估 RNA 完整性。通过 miScript II RT 试剂盒 , 将 1  $\mu\text{g}$  miRNA 合成 cDNA。使用 miScript-SYBR-Green-PCR 试剂盒扩增 cDNA 产物。采用 CFX96 实时 PCR 检测系统评估 hsa-miR-150-5p 的变化 , 以 RNU6B 为内参。

**1.8.4 Western blot** 血管紧张素-II ( Angiotensinogen-II , Ang-II ) : 将接种在 6 孔板中的 HUVECs ( 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔 ) 与纳米聚合物 ( 50 : 1 ) 孵育 24 h , 纳米聚合物每孔含有 1.0  $\mu\text{g}$  的阴性对照 siRNA 或 miR-150。用 EBM-2 基础培养基饥饿培养 16 h , 然后用 LPS 处理 6 h 或 24 h。用含蛋白酶 / 磷酸酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶的 RIPA 缓冲液溶解。蛋白质裂解物在 4% ~ 12% Bis-Tris 中在 100 ~ 200 V 下溶解 1.5 h。转至 PVDF 膜上 1 h , 用 Odyssey 封闭液阻断 1 h。用磷酸化 Ang-II ( 1 : 1 000 ) 和 actin ( 1 : 1 000 ) 4 °C 过夜 , 用 Odyssey-Licor 成像系统分析印迹。

DLK-1: 将接种在 6 孔板中的 HUVECs 与含有 1.0  $\mu\text{g}$  阴性对照 siRNA 或 miR-150-5p 的纳米聚合物以 50 : 1 的比例培养 48 h。提取细胞蛋白按上述方法裂解产物。印迹法 α- 微管蛋白 ( 1 : 1 000 ) 或 DLK-1 ( 1 : 1 000 ) 4 °C 下过夜和 IRDye 二抗 ( 1 : 10 000 ) 孵育 1 h。

**1.9 统计学处理** 所有统计分析均使用 GraphPad Prism 7 软件进行 , 数据表示为  $\bar{x} \pm s$ 。RT-PCR 数据分析采用方差分析和 Tukey 或 Kruskal-Wallis 检验 , 采用 Student's *t* 检验分析 Ang-II 和 DLK-1 数据。

## 2 结果

**2.1 DEAC-PNAG @ miRNA 的制备及对 miRNA 保护作用** 由于非特异性抗菌特性 , 本研究选用 DEAC-PNAG 作为 miRNAs 的传递系统。通过琼脂糖凝胶电泳迁移率变化分析 , 确定 DEAC-PNAG 结合 miRNA 的有效性。结果表明 N/P 在 50 : 1 ~ 2 700 : 1 的配比范围内 , miRNA 可完全与 DEAC-PNAG 结合 ( 图 1A )。不同 N/P 的 DEAC-PNAG @ miRNA 和游离 miRNA 分别与 RNase A 共培养 60 min 后 , N/P 为

700 : 1 和 1 400 : 1 观察到少量的 miRNA 降解,而在 N/P 2 700 : 1 的聚合物中观察到 miRNA 的大量降解(图 1B)。在 N/P 为 700 : 1 时,约 80% 的 miRNA 被封装,而在 1 400 : 1 和 2 700 : 1 的比率下,仅有约 50% 的 miRNA 被封装(图 1C、D)。

**2.2 细胞摄取及细胞活力检测** 为证实纳米聚合物促进 HUVECs 的细胞摄取,本研究制备荧光标记的 DEAC-PNAG@ Cy3-miRNA-150 聚合物。该聚合物处理 HUVECs 24 h 后,通过荧光显微镜分析聚合物的亚细胞定位(图 2)。在 N/P 为 700 : 1、1 400 : 1 和 2 700 : 1 三组中观察 Cy3 阳性细胞,而仅用 Cy3-miRNA-150 孵育的细胞中没有 Cy3 荧光(图 2A)。阳离子聚合物可以影响细胞代谢活性和活力,因此我们使用 MTT 比色法确定 DEAC-PNAG@miR-150 的细胞代谢活性。使用 N/P 为 700 : 1、

1 400 : 1 和 2 700 : 1 的 DEAC-PNAG@ miR-150 处理 HUVECs 24 h,以未添加样品正常培养的细胞为参照。结果表明对照组和实验组间未观察到细胞代谢活性的显著差异(图 2E)。

**2.3 DEAC-PNAG @ miRNA 表征** TEM 成像结果显示 N/P 700 : 1 的纳米聚合物呈圆形或椭圆形,且单分散(图 3A)。基于 DLS 分析,N/P 700 : 1 纳米聚合物的平均粒径约为 254 nm(图 3B)。700 : 1 纳米颗粒的 Zeta 电位为 +16.4 mV,多分散指数(PDI)为 0.479,表明纳米颗粒的分散性较高。

**2.4 RT-PCR 和 Western blotting** 为进一步量化纳米聚合物处理 HUVECs 后 miRNA 的递送,我们进行了 RT-PCR 试验。与对照组和 DEAC-PNAG 单独应用比较,DEAC-PNAG @ miR-150 聚合物增加 HUVECs 细胞中 miR-150 的表达(图 4A、B)。随

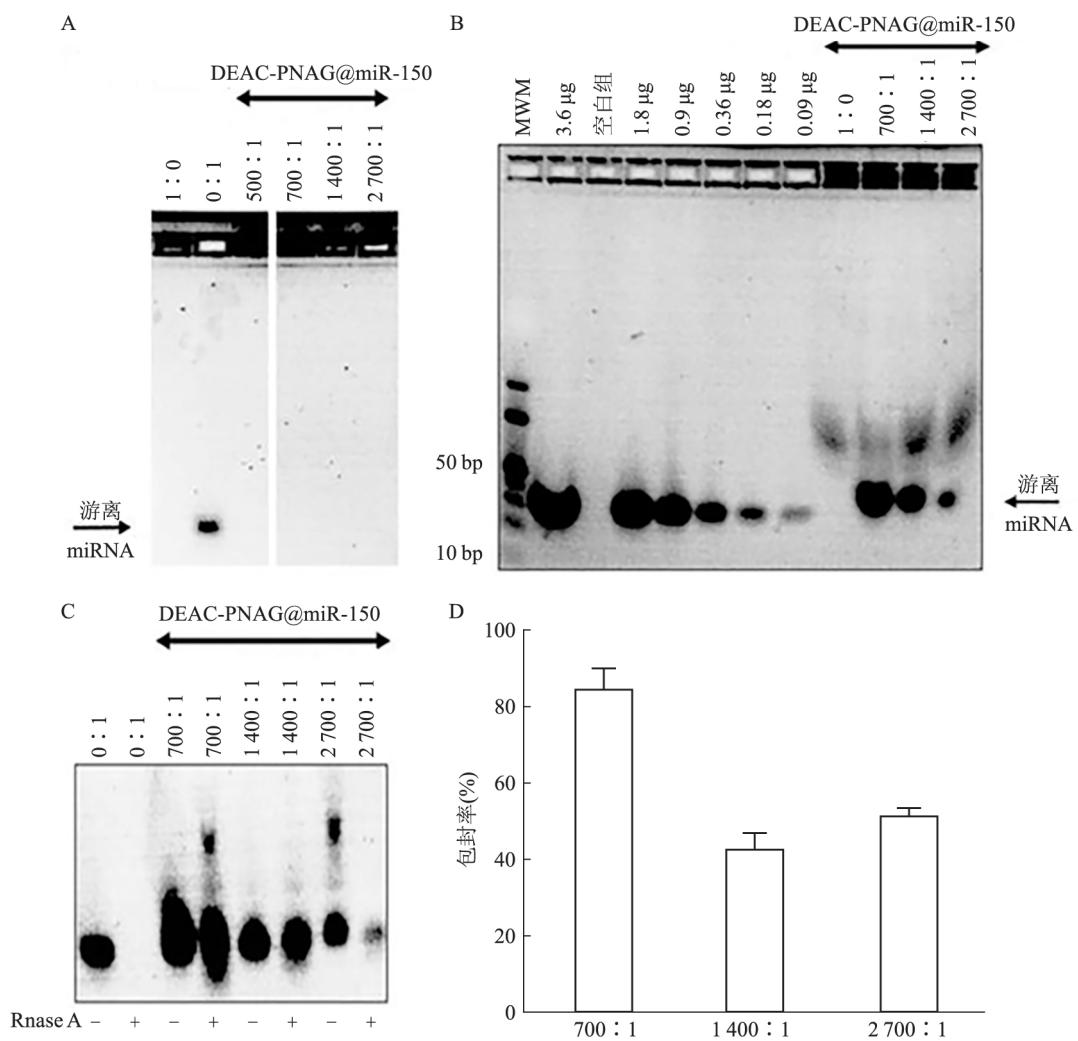


图 1 DEAC-PNAG 对 miRNA-150 的保护作用及封装效率

A: DEAC-PNAG 对 miRNA-150 的凝胶阻滞作用; B: 不同 N/P 纳米聚合物对 miRNA 的保护作用; C: 不同浓度游离 miRNA(2、4~8 道); D: 封装效率柱状图

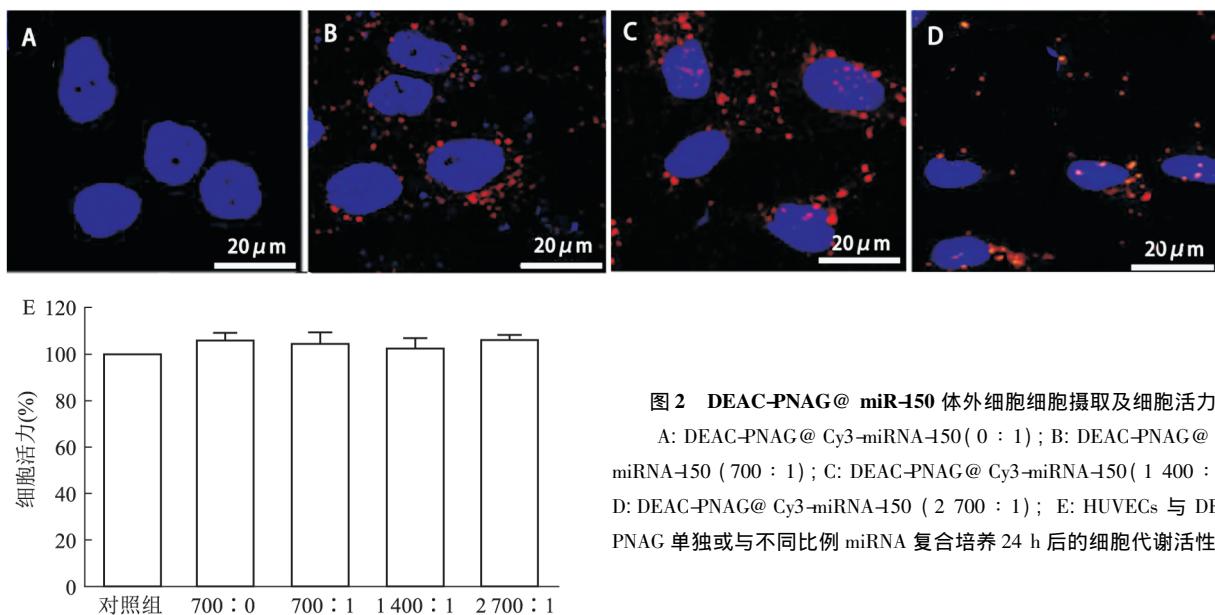


图2 DEAC-PNAG@ miR-150 体外细胞细胞摄取及细胞活力

A: DEAC-PNAG@ Cy3-miRNA-150 (0 : 1); B: DEAC-PNAG@ Cy3-miRNA-150 (700 : 1); C: DEAC-PNAG@ Cy3-miRNA-150 (1 400 : 1); D: DEAC-PNAG@ Cy3-miRNA-150 (2 700 : 1); E: HUVECs 与 DEAC-PNAG 单独或与不同比例 miRNA 复合培养 24 h 后的细胞代谢活性

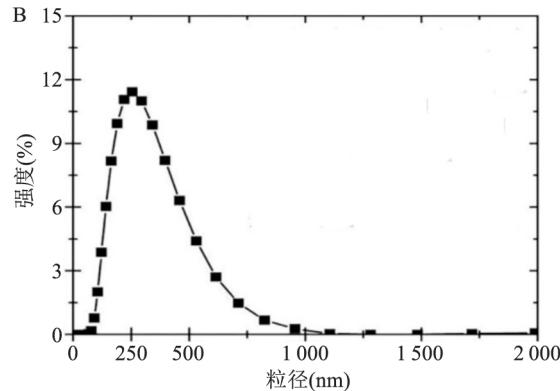
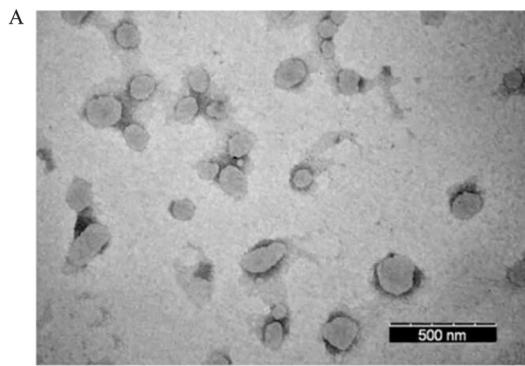


图3 TEM 和 DLS 分析纳米颗粒

A: N/P 700 : 1 的纳米聚合物 TEM 结果; B: N/P 700 : 1 的纳米聚合物的粒径分布

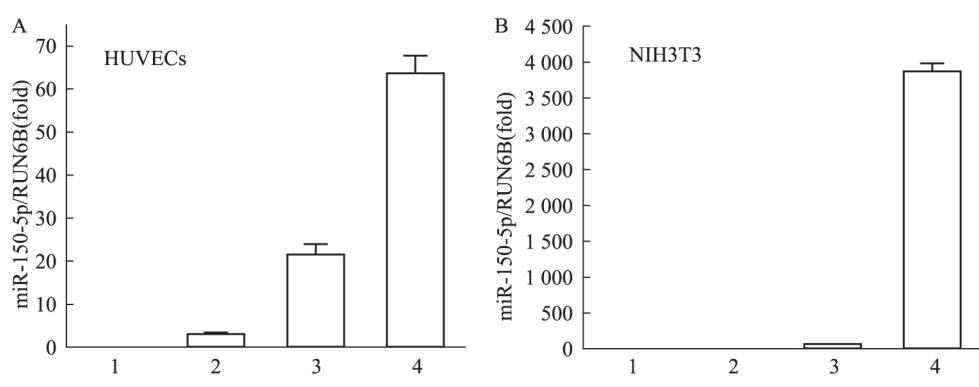


图4 聚合物转染 24 h 后细胞中 miR-150 的表达水平

A: 聚合物转染 24 h 后 HUVECs 中 miR-150 水平实时 PCR 分析; B: 聚合物转染 24 h 后 NIH3T3 中 miR-150 水平的实时 PCR 分析; 1: 对照组; 2: DEAC-PNAG 组; 3: miR-150-5p 组; 4: DEAC-PNAG@ miR150-5p 组

后进一步研究 miRNA 在 miR-150 表达水平较低的 NIH3T3 细胞中的递送。结果用 DEAC-PNAG@ miR-150 纳米聚合物培养的 NIH3T3 细胞 miR-150 表达量增加 3 772 倍(图 4B)。以上数据表明 DEAC-PNAG 聚合物可以有效地递送 miRNAs 以提高其细胞表达量。

Western Blot 检测结果显示, 使用 N/P 50 : 1 的纳米聚合物具有体外生物效应(图 5A、C), 并能有效抑制 RNase A 降解(图 5B)。与 DEAC-PNAG@ NsiRNA 比较, DEAC-PNAG@ miR-150 纳米聚合物显著抑制了 HUVECs 细胞内 Ang-II 和 DLK-1 表达( $P < 0.05$ ) (图 5A、C)。

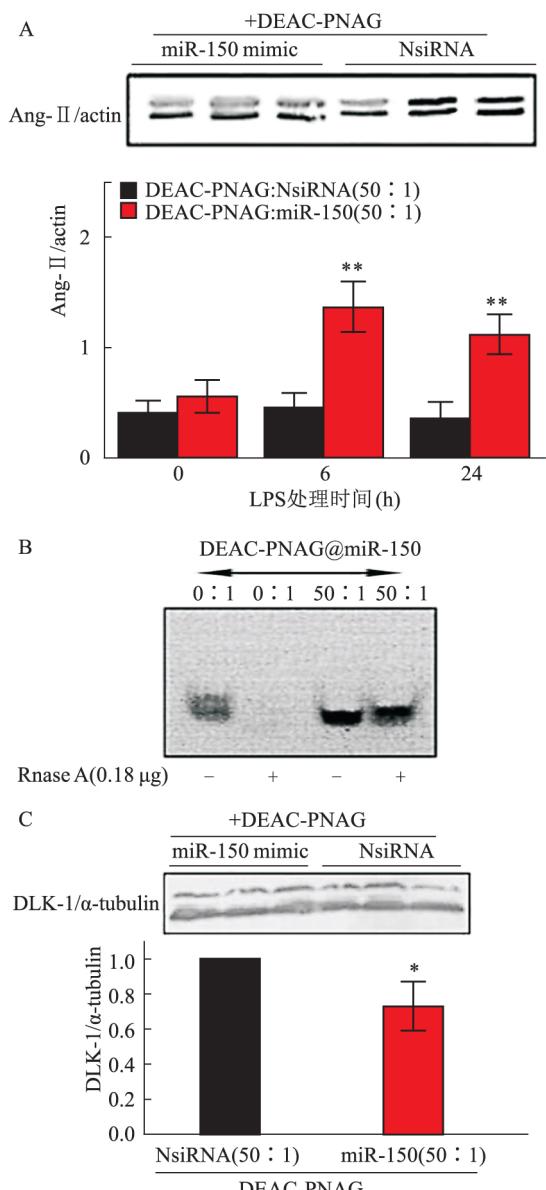


图 5 DEAC-PNAG@miRNAs 50:1 聚合物对 Ang-II 和 DLK-1 蛋白表达抑制作用

A: HUVECs 中 Ang-II 的表达; B: N/P 50:1 的 DEAC-PNAG@miRNAs 对 miRNA 的保护作用; C: HUVECs 中 DLK-1 的表达; 与 DEAC-PNAG@NsiRNA(50:1) 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

由于基因的不稳定性,miRNA 治疗需引入有效的载体平台将其导入细胞。病毒、脂质体和壳聚糖等载药系统已被应用于 miRNA 负载。由于制备流程复杂,体内外核酸递送效率低,应用价值有限<sup>[10]</sup>。为降低上述限制,我们通过自组装技术制备了 DEAC-PNAG@miRNA 自组装聚合物,该聚合物可有效递送 miRNA 至 HUVECs 和 NIH3T3 细胞中。RT-PCR 结果显示,DEAC-PNAG@miRNA-150 纳米聚合物可显著提高 miR-150 细胞内表达水平。

DEAC-PNAG 聚合物具有抗菌作用,是递送用于脓毒症治疗 miRNA 的理想载体。Vournakis et al 的<sup>[11]</sup>研究表明,聚 N-乙酰氨基葡萄糖(sNAG)纳米纤维(DEAC-PNAG 的类似物),在伤口愈合过程中发挥抗菌作用。他们特别指出,sNAG 可增强内皮细胞和角质形成细胞中  $\alpha$ -防御素和  $\beta$ -防御素的表达,减少金黄色葡萄球菌的感染概率。此外,本研究证实作为治疗脓毒症 miRNA 载体,DEAC-PNAG 能有效地包埋 miRNA 并保护其不被 RNase 降解,这点对于保证 miRNA 在体内环境中的稳定性至关重要。此外,纳米聚合物直径(约 200 nm)允许其在循环过程中避免被肝脏和网状内皮系统吸收,而其阳离子 Zeta 电位表明其具有良好的稳定性。

DEAC-PNAG@miRNA-150 聚合物能有效地将 miRNA 传递给细胞,导致细胞功能性改变。细胞内传递的 miRNA 水平与细胞类型有相关性,我们研究结果证实了这一点。HUVECs 的 miR-150 表达水平的增加明显低于 3T3 成纤维细胞。这可能是细胞特异性给药效率不同,也可能是由于内皮细胞中 miR-150 的表达水平高于成纤维细胞所致<sup>[12]</sup>。尽管 700:1 的纳米聚合物有最佳的 miRNA 保护作用,但体外数据表明该浓度在细胞内不能产生最佳 miRNA 活性。可能该浓度会阻碍 miRNA 从纳米聚合物中释放,导致 miRNA 功能受损。此外,50:1 浓度 DEAC-PNAG@miRNA-150 可往细胞内递送完整的 miRNA,同时允许 miRNA 从聚合物中分离,继而抑制 Ang-II 和 DLK-1 的翻译。

众所周知,Ang-II 可引起血管通透增加,过量的 Ang-II 生成与脓毒症患者死亡率升高关系密切。miR-150 能通过沉默包含互补序列的 mRNA 调节信号网络,抑制 Ang-II 生成,从而减轻血管损伤<sup>[13]</sup>。DLK1 可通过 NOTCH1 的激活抑制内皮细胞增殖,从而抑制血管生成。DEAC-PNAG@miRNA-150 对二者的抑制,将有助于降低血管通透性,促进血管内皮细胞再生,从而促进血管发挥组织屏障作用。上述作用对于提升脓毒症患者的生存率具有重要意义。未来研究中我们将进一步探讨纳米聚合物对脓毒症小鼠存活率、脓毒症内皮功能障碍和血管通透性的影响。重点监测 50:1 纳米聚合物,由于 50:1 纳米聚合物含有更多的 miRNA,尚需确定是否存在剂量反应。此外,使用  $\alpha\beta3$  整合素配体 LXW7 修饰或 RGD 肽将有助于提高纳米聚合物靶向作用<sup>[14-15]</sup>,miR-150 对脓毒症微环境中内皮功能的影响也有待进一步探讨。

DEAC-PNAG 聚合物是一种可行的 miRNAs 载体, DEAC-PNAG@ miRNA-150 纳米粒子聚合物提高了 miRNAs 稳定性和细胞摄取, 允许 miRNA 从聚合物中分离并抑制 Ang-II 和 DLK-1 基因翻译。这些研究表明 DEAC-PNAG 作为 miR-150 载体的可行性, 为脓毒症小鼠存活率及其血管保护的体内研究奠定基础。

## 参考文献

- [1] De Backer D ,Dorman T. Surviving sepsis guidelines: a continuous move toward better care of patients with sepsis [J]. *Jama* ,2017 ,317( 8) :807 – 8.
- [2] Bosrame-Helms J ,Kremer H ,Schini-Kerth V ,et al. Endothelial dysfunction in sepsis [J]. *Curr Vasc Pharmacol* 2013 ,11( 2) :150 – 60.
- [3] Iomo H ,Siomi M C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals [J]. *Mol Cell* 2010 ,38( 3) :323 – 32.
- [4] Yue Y ,Garikiparti V N S ,Verma S K ,et al. Interleukin-10 deficiency impairs reparative properties of bone marrow-derived endothelial progenitor cell exosomes [J]. *Tissue Eng PTA* ,2017 ,23 ( 21/22) :1241 – 50.
- [5] Thurston G. Role of angiopoietins and tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Cell Tissue Res* 2003 ,314( 1) :61 – 8.
- [6] Desjarlais M ,Dussault S ,Dahri W ,et al. MicroRNA-150 modulates ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017 ,37( 5) :900 – 8.
- [7] Rajput C ,Tauzeeb M ,Farazuddin M ,et al. MicroRNA-150 suppression of angiopoietin-2 generation and signaling is crucial for resolving vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ,2016 ,36 ( 2) :380 – 8.
- [8] Son S ,Namgung R ,Kim J ,et al. Bioreducible polymers for gene silencing and delivery [J]. *Accounts Chem Res* 2012 ,45( 7) :1100 – 12.
- [9] Izano E A ,Sadovskaya I ,Vinogradov E ,et al. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Acinetobacter pleuropneumoniae* [J]. *Microb Pathog* 2007 ,43( 1) :1 – 9.
- [10] Yang W ,Wang F ,Feng L ,et al. Applications and prospects of non-viral vectors in bone regeneration [J]. *Curr Gene Ther* ,2018 ,18 ( 1) :21 – 8.
- [11] Vournakis J N ,Finkelsztein S. Anti-bacterial applications of poly-N-acetylglucosamine nanofibers: U. S. Patent 9 642 871 [P]. 2017 – 05 – 09.
- [12] Luo J ,Fan Y ,Shen L ,et al. The pro-angiogenesis of exosomes derived from umbilical cord blood of intrauterine growth restriction pigs was repressed associated with miRNAs [J]. *Int J Biol Sci* ,2018 ,14( 11) :1426.
- [13] Rajput C ,Tauzeeb M ,Farazuddin M ,et al. MicroRNA-150 suppression of angiopoietin-2 generation and signaling is crucial for resolving vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ,2016 ,36 ( 2) :380 – 8.
- [14] Hao D ,Xiao W ,Liu R ,et al. Discovery and characterization of a potent and specific peptide ligand targeting endothelial progenitor cells and endothelial cells for tissue regeneration [J]. *ACS Chemical Biology* 2017 ,12( 4) :1075 – 86.
- [15] Kunjachan S ,Pola R ,Gremse F ,et al. Passive versus active tumor targeting using RGD-and NGR-modified polymeric nanomedicines [J]. *Nano Lett* 2014 ,14( 2) :972 – 81.

## Preparation of self-assembly DEAC-PNAG@ miR-150 nano-system and its mechanism of vascular protection

Li Yajun ,Xu Hang ,Ren Shan

(First Dept of Intensive Care Unit ,The First Affiliated Hospital of Shihezi University ,Shihezi 832000)

**Abstract Objective** To develop a nano particle delivery system which combined deacetylated poly ( N-acetylglucosamine) ( DEAC-PNAG) polymer with miR-150 by self-assembly and the corresponding vascular protection mechanism were discussed. **Methods** Nano polymer was obtained by self-assembly ,characterized by transmission electron microscopy and DLS. The gel displacement method was used to evaluate the encapsulation efficiency. Cell uptake was detected by fluorescence microscopy. RT-PCR was used to detect the expression of miR-150 in transfected cells. Western blot was used to detect the effect of nano-polymer on the expression of Ang-II and DLK-1 in HUVECs. **Results** DEAC-PNAG polymer with nano size and positive surface potential could protect miRNA from RNase A degradation. In addition ,DEAC-PNAG@ miRNA could promote the cell uptake of miRNA and play a role in vascular protection by inhibiting the expression of Ang-II and DLK-1 in HUVECs. **Conclusion** DEAC-PNAG is an effective miRNAs delivery platform ,which may have positive significance for sepsis treatment.

**Key words** endothelial dysfunction; multibacillary sepsis; miRNA delivery; inflammation