

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0235-05

氧化铁磁性纳米颗粒介导 wt-p53 基因对肺腺癌细胞增殖和凋亡的影响

周东波, 胡成平*, 梁 硕, 陈 琼, 杨红忠(中南大学 湘雅医院 呼吸内科, 长沙 410008)

[摘 要] **目的:** 探讨氧化铁磁性纳米颗粒介导野生型 *p53* 基因(wild type *p53*, wt-*p53*)对耐顺铂人肺腺癌细胞 A549/DDP 增殖抑制和凋亡诱导的作用。**方法:** 氧化铁磁性纳米颗粒介导 wt-*p53* 转染肺腺癌细胞 A549/DDP 作为实验组, 以纳米颗粒介导空载体 pcDNA3 转染作为阴性对照组, 脂质体介导 wt-*p53* 转染作阳性对照组。MTT 法和绘制生长曲线观察基因转染对 A549/DDP 细胞增殖抑制作用, 荧光显微镜、流式细胞术观察其对 A549/DDP 细胞诱导凋亡作用, RT-PCR 检测其对 A549/DDP 细胞 *Bax* mRNA 表达的影响。**结果:** 氧化铁磁性纳米颗粒介导 wt-*p53* 对人肺腺癌细胞 A549/DDP 增殖有持续的抑制作用, 而以脂质体介导 wt-*p53* 对增殖抑制作用持续时间短暂; 纳米颗粒介导 wt-*p53* 对人肺腺癌细胞 A549/DDP 诱导凋亡作用明显强于以脂质体载体; 同时介导 wt-*p53* 上调 *Bax* mRNA 表达水平的作用也明显强于以脂质体载体。**结论:** 氧化铁磁性纳米颗粒介导 wt-*p53* 转染对人肺腺癌细胞 A549/DDP 有持续的增殖抑制和诱导凋亡的作用。

[关键词] 氧化铁磁性纳米颗粒; 野生型 *p53* 基因; 肺腺癌细胞; 凋亡

[中图分类号] R730.54

[文献标志码] A

Influence of magnetic iron oxide nanoparticle-mediated wild-type *p53* gene on proliferation and apoptosis of human lung adeno-carcinoma cells

ZHOU Dong-bo, HU Cheng-ping*, LIANG Shuo, CHEN Qiong, YANG Hong-zhong(Department of Respiratory Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective:** To study roles of magnetic iron oxide nanoparticle-mediated wild-type *p53* gene delivery in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human lung adeno-carcinoma cell line A549/CDDP. **Methods:** The magnetic iron oxide nanoparticles-mediated wild-type *p53* gene delivery was used in treatment groups; nanoparticle-mediated pcDNA3 vector was used as negative control; and liposome mediated wt-*p53* gene was used as positive control. The proliferation inhibition of A549/DDP cells was investigated by MTT assay in the 3 groups and the growth curves were drawn. The apoptosis of cells were detected by flow cytometry and fluorescent microscope. RT-PCR was employed to examine the variation of *Bax* mRNA expression. **Results:** Wt-*p53* DNA-loaded magnetic iron oxide nanoparticles demonstrated a sustained and significantly greater antiproliferative effect than those lipofectamine-mediated wt-*p53* DNA. Wt-*p53* DNA-loaded magnetic iron oxide nanoparticles also induced stronger apoptosis of A549/DDP cells than lipofectamine-mediated wt-*p53* DNA. Expression of *Bax* mRNA in A549/CDDP cells in magnetic iron oxide nanoparticle group was obviously higher than lipofectamine-mediated group. **Conclusion:** Magnetic iron oxide nanoparticle-mediated wild-type *p53* gene delivery has sustained antiproliferative and apoptosis-inducing effects on human lung adeno-carcinoma cell line A549/CDDP.

[Key words] magnetic iron oxide nanoparticles, wild - type *p53* gene, lung adeno-carcinoma cell, apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 235-239]

野生型 *p53* (wild type *p53*, wt-*p53*) 基因作为一种细胞转录调控元件, 对细胞的生长、分裂、凋亡起着严格的调控作用。研究证明许多肿瘤都伴有 *p53* 功能的丧失。Boldrini 等^[1] 所研究的非小细胞肺癌细胞株中, 发现 *p53* 的突变率达 62.5%; 国内研究^[2] 表明肺鳞癌和肺腺癌组织中 *p53* 的突变率分别为 50.8% 和 58.3%; 本实验室^[3] 也发现肺癌胸腔积液中 *p53* 的突变率达 34%。因此, 恢复和重建肿瘤细胞中 wt-*p53* 的功能已经成为基因治疗的一个研

究热点, 而基因导入技术是研究基因功能和基因治疗的关键技术。裸 DNA 在细胞内外及体内外均不稳定, 容易被核酸酶降解^[4], 因此基因导入必须借

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(No. 04JJ3104)。Supported by Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 04JJ3104)

[作者简介] 周东波(1977 -), 男, 湖南新化市人, 博士, 主要从事肺癌基因治疗方向的研究。E-mail: zhoudp20032003@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: huchengp28@yahoo.com.cn

助于基因载体。近年来,磁导向的纳米载体引起越来越多关注。本实验室前期研究已证实多聚赖氨酸包裹的氧化铁磁性纳米颗粒(dextran coated iron oxide nanoparticles modified with poly-L-lysine, pII-DCIONP)具有很强的p53结合能力和抵御消化酶消化作用,其在体外基因转染中具有较高的转染效率(论文另行发表)。本研究进一步利用pII-DCIONP作为wt-p53转染载体,探讨该载体介导wt-p53对A549/DDP细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

葡聚糖、氯化亚铁、氯化铁、氨水等化学试剂均为分析纯,购自长沙科益化玻仪器有限公司。细胞培养液DMEM和多聚赖氨酸30000-70000购自华美生物工程公司。小牛血清和Dnaes-I消化酶购自北京鼎国生物工程有限公司。脂质体转染试剂盒Lipofectamine™2000为Invitrogen公司产品。TRIzol试剂盒、反转录试剂盒和Taq酶购于Fermentas公司。引物由上海英俊生物科技有限公司合成。质粒提取试剂盒为北京百泰克生物公司产品。

1.2 细胞、质粒以及纳米颗粒

耐顺铂人肺腺癌细胞株A549/DDP由第三军医大学呼吸内科研究所馈赠,培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,置于37℃、5%CO₂中培养。真核表达质粒pcDNA3-HA-p53以及空载体pcDNA3由美国波士顿大学医学院肖志雄教授馈赠。质粒用宿主菌DH5α扩增,质粒的提取、纯化及鉴定等按试剂盒说明书和常规方法进行。多聚赖氨酸包裹的氧化铁磁性纳米颗粒(pII-DCIONP)根据向娟娟^[5]等方法由本实验室制备。

1.3 纳米颗粒介导wt-p53对肺腺癌细胞的转染

将 2.5×10^3 个/孔的细胞于转染前1天接种96孔板中,置于37℃、5%CO₂中培养。实验分组:(1)空载体组作为阴性对照组(pII-DCIONP与空载体pcDNA3的质量浓度均为10.5 μg/ml);(2)脂质体载体组作为阳性对照组(脂质体Lipofectamine™2000质量浓度为21 μl/ml,质粒pcDNA3-HA-p53质量浓度为10.5 μg/ml);(3)纳米载体组为实验组(pII-DCIONP与质粒pcDNA3-HA-p53的质量浓度均为10.5 μg/ml)。实验前将上述各组混合物4℃放置1h以上,脂质体转染根据说明书操作进行。根据上述分组和浓度用无血清的DMEM培养液配成100 μl分别加入96孔板中(含有pII-DCIONP组置于钕-铁-硼稀土强磁块下15 min),4~6 h后改用

含有10%小牛血清的DMEM培养液培养1、3、5、7 d,期间换液2次,每种转染方法设3个复孔。

1.4 MTT法检测基因转染对癌细胞增殖的影响

于上述各时间点于96孔板中分别加入MTT溶液(5 g/L),每孔10 μl,继续在培养箱中培养4 h后弃去上清,每孔加入DMSO(二甲基亚砜)溶液100 μl,震荡后室温静置10 min,使其充分溶解,然后用酶标仪于570 nm处测定光密度(D)值,计算细胞增殖抑制率,增殖抑制率(%)=(1-实验组D值/空载体组D值)×100%。然后绘制生长曲线。

1.5 荧光显微镜观察各组细胞凋亡形态

将 5×10^4 个/孔的细胞于转染前1天接种含有盖玻片的6孔板中,置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。实验分组和方法如上述,于培养的第3天取出盖玻片进行丫淀橙和溴化乙淀双染色,立即于荧光显微镜下观察并照相。

1.6 流式细胞术检测各组细胞的凋亡

将 5×10^4 个/孔的细胞于转染前1天接种6孔板中,置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。实验分组和方法如上述,于培养的第1、3、5天分别以0.25%胰蛋白酶消化后,收集 1×10^6 个细胞,PBS缓冲液洗涤,5 min×3次。70%冷乙醇4℃固定,加入结合缓冲液490 μl,混匀,加PI染液10 μl,AnnexinY-FITC染液5 μl,37℃孵育10 min,流式细胞术检测细胞凋亡率。实验重复3次。

1.7 RT-PCR检测转染细胞Bax mRNA的表达

将 5×10^4 个/孔的细胞于转染前1天接种6孔板中,置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。实验分组和方法如上述,于培养第3天收集上述各组细胞采用TRIzol试剂一步法提取总RNA,逆转录成互补脱氧核糖核酸(cDNA),以此为模板行PCR扩增引物,Bax引物序列:上游引物:5'-AGACG-GAGTTTCGCCATGTT-3',下游引物:5'-TGCCTCAT-GATCTCTTTTGG-3'。DAPDH引物序列:上游引物5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3',下游引物5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'。PCR反应条件:50 μl反应体系,94℃预变性2 min,94℃变性30 s,56℃退火35 s,72℃延伸50 s,反应32个循环后再72℃延伸10 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳,扩增产物片段长分别为538、395 bp。用凝胶成像系统扫描分析,分别测定各扩增带灰度值,将目的基因与内参照的扩增带灰度值比作为mRNA的定量值。

1.8 统计学处理

所有数据均用统计软件SPSS13.0处理。所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计不同时间、不同组别间的

比较采用多因素的方差分析,实验组与对照组间的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 pII-DCIONP 介导 wt-p53 对 A549/DDP 细胞增殖的抑制

A549/DDP 细胞经氧化铁磁性纳米颗粒介导

wt-p53 转染 1、3、5、7 d 后,其增殖明显受抑,抑制效应呈时间依赖性和持续性;而脂质体作为 wt-p53 转染载体时,第 1 天其抑制率与纳米颗粒作为 wt-p53 转染载体比较无明显差别 ($P > 0.05$),第 3 天开始其增殖抑制效应随时间延长反而逐渐减弱,明显弱于以纳米颗粒作为 wt-p53 转染载体时 ($P < 0.01$,表 1)。

表 1 pII-DCIONP 介导 wt-p53 基因对人肺腺癌细胞 A549/DDP 增殖的抑制($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Inhibition of human lung adeno-carcinoma A549/DDP cells proliferation in 3 groups($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	1 d	3 d	5 d	7 d
Negative control	-	-	-	-
Positive control	34.4 ± 2.56	30.7 ± 2.78	25.6 ± 2.03	22.5 ± 3.38
Test group	33.5 ± 3.44	40.3 ± 3.42*	52.7 ± 1.98**	68.6 ± 3.58**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs positive control

2.2 pII-DCIONP 介导 wt-p53 致 A549/DDP 细胞凋亡形态的改变

A549/DDP 细胞经氧化铁磁性纳米颗粒介导 wt-p53 转染第 3 天,荧光显微镜下可见空载体组细胞染成绿色,细胞核 DNA 为绿色均匀荧光,核仁清

晰;脂质体组和纳米载体组细胞核 DNA 部分或全部呈黄色,染色质浓缩、边集于核膜下,或裂解成质膜包绕的碎片,并可见细胞膜突出形成的质膜小泡,为典型的“出泡”现象。纳米载体组较脂质体组凋亡现象更为明显(图 1)。

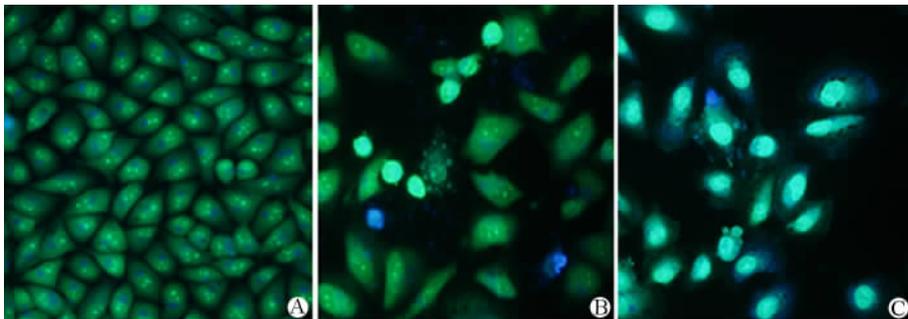


图 1 荧光显微镜观察的各组细胞凋亡形态($\times 400$)

Fig. 1 Apoptosis of cells in different groups detected by fluorescent microscope($\times 400$)

A: Negative control; B: Positive control; C: Treatment group

2.3 pII-DCIONP 介导 wt-p53 致肺腺癌细胞 A549/DDP 细胞凋亡率的增加

流式细胞术分析显示:空载体组第 1、3、5 天凋亡率分别为(1.5 ± 0.4)%、(2.4 ± 0.6)%、(1.8 ± 0.3)%,凋亡现象不明显。脂质体组转染后第 1、3、5 天凋亡率分别为(35.6 ± 4.3)%、(30.2 ± 2.7)%、(22.3 ± 5.3)%。纳米载体组第 1、3、5 天凋亡率分别(36.2 ± 3.4)%、(63.5 ± 5.2)%、(81.4 ± 4.1)%;纳米载体组与脂质体组比较第 1 天凋亡率无统计学差异,第 3、5 天凋亡率明显高于脂质体组

($P < 0.01$);纳米载体组各天的凋亡率均显著高于空载体组 ($P < 0.01$,图 2)。

2.4 pII-DCIONP 介导 wt-p53 转染对肺腺癌细胞 A549/DDP Bax mRNA 表达水平的影响

RT-PCR 结果显示,转染第 3 天空载体组凋亡促进基因 Bax mRNA 表达为(24.5 ± 6.43)%,最弱;脂质体组 Bax mRNA 表达为(56.8 ± 7.84)%,高于空载体组 ($P < 0.05$);纳米载体组 Bax mRNA 表达为(94.2 ± 9.26)%,最强,显著高于脂质体组 ($P < 0.01$,图 3)。

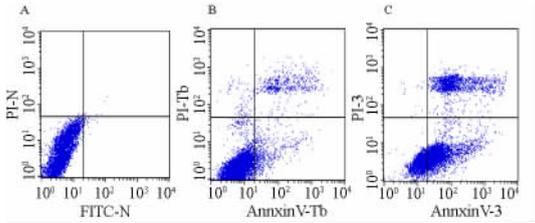


图2 流式细胞术检测各组细胞转染后第3天的凋亡情况

Fig.2 Apoptosis of cells in different groups as measured by flow cytometry on the third day after transfection

A: Negative control; B: Positive control; C: Treatment group

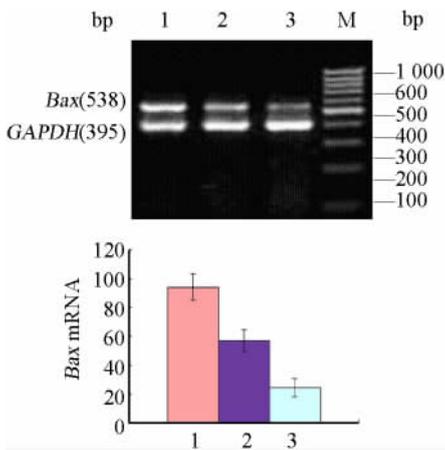


图3 RT-PCR 检测各组细胞 Bax mRNA 的表达

Fig.3 Expression of Bax mRNA in cells in 3 groups as detected by RT-PCR

1: Treatment group; 2: Positive control; 3: Negative control; M: Marker

3 讨论

肺癌是全球恶性肿瘤死亡的主要原因。虽然化疗药物的发展大大地改善了肺癌的临床疗效,但肺癌患者的5年生存率仍然低于15%。因此寻找治疗肺癌的有效方法意义重大。

wt-p53 基因被认为是肿瘤抑制基因,是“基因组的保护者”,它的功能主要是参与细胞周期调控、DNA 损伤的修复及细胞凋亡过程^[6-8]。当细胞 DNA 受损被损伤识别蛋白 HMG1 识别后,将损伤信号传递给 ATR(ATM-Rad3-related protein),它能激活 p53 使 p21 表达升高,细胞周期阻滞于 G₁/S 期,为 DNA 修复创造时间;同时上调 Gadd45a 的转录阻止 DNA 的合成。当损伤不能修复或损伤过激时,p53 上调 Bax,Bax 与 bcl-2 比例失调,促使细胞色素 C 从线粒体释放出来,Caspase-3 被激活,凋亡发生。因而

wt-p53 已被成功用于多种肿瘤的基因治疗。

有效的基因治疗除了安全有效的治疗基因外,安全高效的基因导入系统也至关重要。基因导入载体包括两大类,即病毒和非病毒载体。病毒载体由于其高转导效率和较好的靶向性而成为肿瘤基因治疗中应用最广泛的方法,但是病毒载体自身具有能诱导宿主免疫反应、潜在的致癌性、装载容量有限、代价高等缺点^[9-11]。因此,寻找更加安全、有效的基因导入载体非常必要。非病毒型载体因具有安全、低毒、装载容量大、操作简单等优势而逐渐引起学者们的关注,但转染效率偏低是其最大缺陷^[12-14]。

近年来的研究表明^[15-16],阳离子聚合物纳米基因载体与 DNA 形成的复合物是最有前途的非病毒基因导入载体系统之一。潘碧峰等^[17]研究表明碳纳米管-树形分子复合物是一种高效的基因递送载体,能够携带 Survivin 反义寡核苷酸进入肝癌细胞,并高效抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖,显著增强反义寡核苷酸的作用效果。董勤等^[18]研究也表明磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚钾纳米微粒具有抑制肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的作用,处于 G₀/G₁ 期 SMMC-7721 细胞可能为其药物作用的目标。向娟娟等^[5]在氧化铁磁性生物纳米颗粒表面修饰阳离子聚合物多聚赖氨酸(PLL-DCIONP),证实其能很好的作为体外基因转染载体,在外加磁场下,其转染效率提高 5~10 倍。本实验的前期工作也已成功应用多聚赖氨酸包裹的氧化铁磁性纳米颗粒(PLL-DCIONP)作为基因载体介导 wt-p53 基因的体外转染 A549/DDP 细胞,且证实转染效率高于常用的脂质体(另文报道)。本研究进一步探讨其对入肺腺癌细胞 A549/DDP 持续增殖抑制和凋亡诱导的作用,结果表明 PLL-DCIONP 介导 wt-p53 能持续抑制 A549/DDP 细胞增殖,持续诱导细胞凋亡发生,明显上调凋亡促进 Bax 的表达,其抑制作用和凋亡诱导作用呈时间依赖性;而脂质体包裹的 wt-p53 仅能短暂的抑制 A549/DDP 细胞增殖,第 3 天时其抑制细胞增殖以及诱导细胞凋亡作用减弱,说明 PLL-DCIONP 能长时间保持质粒的完整性,抵御溶酶体的消化,能明显延长基因的缓释性,这对于基因治疗尤为重要^[19]。

本研究从体外证实了以纳米颗粒 pll-DCIONP 作为 wt-p53 载体治疗入肺腺癌细胞 A549/DDP 的优越性,为使用纳米颗粒 pll-DCIONP 作为 wt-p53 载体体内靶向治疗肺癌提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, et al. Identification of FAS(APO-

- 1/CD95) and p53 gene mutations in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(1): 155-159.
- [2] 徐美林,田铁栓,杨霞,等. P53 基因突变与非小细胞肺癌病理类型及分期的关系[J]. *天津医药*, 2004, 32(11): 694-695.
- [3] 顾其华,李玲芝,舒畅,等. 肺癌胸腔积液 p53 基因测序的研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1995, 22(5): 282.
- [4] Dash PR, Read ML, Barrett LB, *et al.* Factors affecting blood clearance and *in vivo* distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(4): 643-650.
- [5] 向娟娟,聂新民,唐敬群,等. 磁性氧化铁纳米颗粒用于体外基因的转染及其外加磁场对于转染效率的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(2): 71-74.
- [6] Takayama K, Nakanishi Y, Hara N. Gene therapy for lung cancer treatment [J]. *Nippon Rinsho*, 2000, 58(2): 1048-1052.
- [7] Lieberman DA, Hoffman B, Steinman RA. Molecular control of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways[J]. *Oncogene*, 1995, 11(1): 199-210.
- [8] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 323-331.
- [9] Fox JL. Gene therapy safety issues come to fore[J]. *Nat Biotech*, 1999, 17(12): 1153.
- [10] Williams DA. Gene therapy advances but struggles to interpret safety data in small animal models[J]. *Mol Ther*. 2006, 13(6): 1027-1028.
- [11] Yi Y, Hahn SH, Lee KH. Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions[J]. *Curr Gene Ther*, 2005, 5(1): 25-35.
- [12] Marshall J. The trouble with vectors[J]. *Science*, 1995, 269(2): 1015-1055.
- [13] Liu F, Qi H, Huang L, *et al.* Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection *in vivo* via intravenous administration[J]. *Gene Ther*, 1997, 4(6): 517-523.
- [14] Tandia BM, Loney C, Vandenbranden M, *et al.* Lipid mixing between lipoplexes and plasma lipoproteins is a major barrier for intravenous transfection mediated by cationic lipids[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12255-12261.
- [15] Merdan T, Kopecek J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(5): 715-758.
- [16] 崔大祥. 纳米材料在肿瘤生物治疗中潜在应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(2): 79-82.
- [17] 潘碧峰,崔大祥,徐萍,等. 碳纳米管-树形分子载体递送 Survivin 反义寡核苷酸对肝癌细胞增殖的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(3): 176-180.
- [18] 董勤,蔡洪培,张忠兵,等. 磁性聚乳酸羟基乙酸氧化酚酮纳米微粒对人肝癌细胞生长的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(3): 196-199.
- [19] Prabha S, Labhasetwar V. Nanoparticle-mediated wild-p53 gene delivery results in sustained antiproliferative activity in breast cancer cells[J]. *Mol Pharm*, 2004, 1(3): 211-219.

[收稿日期] 2007 - 01 - 17

[修回日期] 2007 - 03 - 21

[本文编辑] 郁晓路

· 简讯 ·

《中华现代内科学杂志》征稿

《中华现代内科学杂志》为中华临床医药学会主办的内科专业学术刊物,月刊;被美国化学文摘(CODEN:ZXNZAY)、波兰哥白尼索引、中文生物医学期刊文献数据库、中国生物医学期刊引文数据库、国家科技部《中文科技期刊数据库》、中华首席医学网等收录,国内外读者均可以在中华首席医学网免费阅读杂志全文。

本刊主要栏目:专论、内科论坛、论著、综述与讲座、临床医学、经验交流、心电图分析、临床病理(病例)讨论、实验研究、中西医结合、中医中药、特检与临床、药物与临床、内科护理、误诊分析、病例报告、医院感染等。

本刊欢迎如下稿件:

(1) 有实际指导意义的述评、临床研究、经验介绍、临床病理(例)讨论和病例报告,以及反映国内外内科重要进展的文献综述等;(2) 探讨大内科领域(心血管内科、神经内科、血液内科等)某一方面的理论研究、临床基础研究和实验研究成果的论文;(3) 中医药、中西医结合防治常见内科疾病的经验和科研进展;(4) 新技术、新疗法、新器械的研制,书评,学术讨论,学术动态等。

本刊表周期短,免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省/部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿!

投稿邮箱:北京市海淀区 83 - 106 信箱《中华现代内科学杂志》编辑部

邮编:100083; E-mail: neikexue@sohu.com

电话:010 - 62242528; 传真:010 - 62245829

网址:www.shouxi.net & www.cmmj.net; 网络实名:首席医学网