

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.003

· 基础研究 ·

## 叶酸受体介导的壳聚糖-pGPU6/GFP/Neo 纳米粒靶向转染肿瘤细胞的特点

杨 琰<sup>1</sup>, 卢 实<sup>2</sup>, 李敏芳<sup>2</sup>, 王泽华<sup>2</sup> (1. 广东医学院附属医院妇产科, 广东 湛江 524001; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科, 湖北 武汉 430022)

**[摘要]** 目的: 研究叶酸受体介导下的壳聚糖-pGPU6/GFP/Neo 纳米粒在叶酸受体表达程度不同的肿瘤细胞中的靶向转染特点。方法: 制备叶酸偶联壳聚糖 pGPU6/GFP/Neo 纳米粒 (folate-chitosan-pGPU6/GFP/Neo, FA-CS-DNAnano) 和壳聚糖 pGPU6/GFP/Neo 纳米粒 (chitosan-pGPU6/GFP/Neo, CS-DNAnano), 红外光谱扫描鉴定其合成, 透射电镜观测纳米粒的形态特征及直径大小。纳米粒转染叶酸受体表达阳性的人类卵巢癌细胞系 SKOV3、乳腺癌细胞系 MCF-7 和宫颈癌细胞系 HeLa, 流式细胞术检测细胞转染效率, MTT 法检测纳米粒的细胞毒性。结果: 成功制备 FA-CS-DNAnano 和 CS-DNAnano, 纳米粒接近球形、表面光滑、结构均匀; FA-CS-DNAnano 直径为 (78.1 ± 0.3) nm, CS-DNAnano 直径为 (138.4 ± 0.7) nm。FA-CS-DNAnano 在 SKOV3 和 MCF-7 细胞的转染效率明显高于 CS-DNAnano [(24.3 ± 0.7)% vs (0.7 ± 0.1)%, (16.8 ± 1.2)% vs (0.3 ± 0.1)%; 均  $P < 0.01$ ], 而在 HeLa 细胞中两者转染效率无明显差异 ( $P > 0.05$ )。FA-CS-DNAnano 转染前后 MCF-7、SKOV3 和 HeLa 细胞的活力分别为 (87.9 ± 2.4)%、(91.4 ± 1.0)%、(97.4 ± 1.1)% 和 (63.0 ± 2.5)%、(90.6 ± 1.3)%、(99.3 ± 1.6)%。结论: 对于叶酸受体强阳性表达的 SKOV3 和 MCF-7 肿瘤细胞, 叶酸偶联壳聚糖是良好的靶向基因转运载体。

**[关键词]** 叶酸; 壳聚糖; 基因靶向转运载体; 卵巢肿瘤; 乳腺肿瘤; 宫颈肿瘤

**[中图分类号]** R737.3; Q782

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)05-0499-06

## Folic acid receptor-mediated targeted transfection of chitosan-pGPU6/GFP/Neo nanoparticles into tumor cells

YANG Yan<sup>1</sup>, LU Shi<sup>2</sup>, LI Min-fang<sup>2</sup>, WANG Ze-hua<sup>2</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangzhou 524001, Zhangjiang, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate folic acid receptor-mediated targeted gene delivery of chitosan-pGPU6/GFP/Neo nanoparticles to tumor cells expressing different degrees of folic acid receptors. **Methods:** Folate-chitosan-pGPU6/GFP/Neo nanoparticles (FA-CS-DNAnano) and chitosan-pGPU6/GFP/Neo nanoparticles (CS-DNAnano) were prepared and identified by infrared spectrometer, and their morphology characteristics and diameters were observed under transmission electron microscope. Human ovarian cancer cell line SKOV3, breast cancer cell line MCF-7, and cervical cancer line HeLa were transfected with the prepared nanoparticles; the transfection efficiency was evaluated by flow cytometry; and cytotoxicities of the nanoparticles were detected by MTT method. **Results:** FA-CS-DNAnano and CS-DNAnano were successfully prepared. The particles had a smooth surface and a uniform structure, with the diameters being (78.1 ± 0.3) nm and (138.4 ± 0.7) nm. Transfection efficiency of FA-CS-DNAnano was significantly higher than that of CS-DNAnano in SKOV3 and MCF-7 cells ([24.3 ± 0.7]% vs [0.7 ± 0.1]%, [16.8 ± 1.2]% vs [0.3 ± 0.1]%; all  $P < 0.01$ ), but not in HeLa cells ( $P > 0.05$ ). The cell vitalities of MCF-7, SKOV3 and HeLa cells were (87.9 ± 2.4)%, (91.4 ± 1.0)%, (97.4 ± 1.1)% before transfection, and were (63.0 ± 2.5)%, (90.6 ± 1.3)%, and (99.3 ± 1.6)% after

**[基金项目]** 广东省医学科学技术研究基金资助项目 (No. B2010247); 广东医学院博士启动基金 (No. B2009011)。Project supported by the Medical Science and Technology Research Foundation of Guangdong Province (No. B2010247); and the Start-up Foundation for Doctorate Candidates of Guangdong Medical College (No. B2009011)

**[作者简介]** 杨琰 (1974 -), 女, 湖北省武汉市人, 博士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤方面的研究。E-mail: lindayanyang@126.com

**[通信作者]** 王泽华 (WANG Ze-hua, corresponding author), E-mail: zehwang@163.com

transfection with FA-CS-DNAnano. **Conclusion:** Chitosan modified with folic acid is an efficient target gene carrier for folic acid receptor highly positive SKOV3 and MCF-7 tumor cells.

[ **Key words** ] folic acid; chitosan; targeted gene delivery; ovarian neoplasmas; breast neoplasmas; cervical neoplasmas  
[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 499-504 ]

如何将治疗性基因安全有效地靶向转运至肿瘤细胞及组织是目前肿瘤基因治疗所要克服的难点,故构建高效的基因载体是提高基因治疗效果的重要措施之一<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>证明,壳聚糖(chitosan, CS)是可以作为基因及药物载体的天然多聚物,它有良好的生物降解性、生物相容性、低毒、低免疫原性,但其基因转染效率却一直不容乐观。研究<sup>[4]</sup>表明,叶酸受体- $\alpha$ (Folic acid receptor- $\alpha$ , FR- $\alpha$ )是肿瘤标记物,常用作肿瘤靶向转运的识别受体。Mansouri等<sup>[5]</sup>首先将叶酸(Folic acid, FA)作为配基修饰壳聚糖,将其包裹DNA形成纳米粒,并对其理化性质作了研究,证实其可作为基因运载体。但叶酸修饰壳聚糖纳米粒转染肿瘤细胞的研究国内外鲜有报道,对其转染效率的研究更罕见。本研究利用胺还原法将叶酸与壳聚糖偶联,以此包裹绿色荧光蛋白表达质粒pGPU6/GFP/Neo形成纳米粒,将其分别转染3种叶酸受体阳性表达的妇科肿瘤细胞系,用流式细胞术检测叶酸偶联前后转染效率的变化,以期为叶酸偶联壳聚糖基因纳米粒的肿瘤靶向治疗提供细胞学研究依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

壳聚糖(相对分子质量为50 000,脱乙酰度85%)购自青岛海汇公司,叶酸购自上海博奥生物公司。真核表达载体pGPU6/GFP/Neo由上海吉玛生物公司提供,质粒中提试剂盒(Pureyield™ plasmid midiprep system)购自美国Promega公司。无叶酸细胞培养基RPMI 1640购自美国生命技术公司,普通细胞培养基RPMI 1640和胎牛血清购自加拿大Gibco公司。胰蛋白酶、PBS缓冲液(10×)和MTT粉均购自美国Invitrogen公司。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自美国Sigma公司。FR- $\alpha$ 高表达细胞系:人类卵巢癌细胞系SK-OV3<sup>[6]</sup>、乳腺癌细胞系MCF-7<sup>[7]</sup>和FR- $\alpha$ 低表达细胞系:宫颈癌细胞系HeLa<sup>[8]</sup>,均购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心)。

### 1.2 叶酸偶联壳聚糖复合载体(FA-CS)的制备及其红外光谱扫描鉴定

取5 mg叶酸,用2 ml脱水DMSO室温下充分

搅拌溶解,再加入25 mg的EDC,25℃避光搅拌1 h,即得红棕色的叶酸活化酯的DMSO溶液。称取CS 20 mg,溶于5 ml醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.7)中,磁力搅拌下缓慢加入叶酸活性酯的DMSO溶液(20 mg/ml),室温下避光反应16 h,然后逐滴滴加NaOH溶液,调pH至9.0。混合液首先在pH为7.4的PBS液中透析3 d除去磷酸钠盐,再在双蒸水中透析3 d除去水分。偶联后多聚物的冻干粉低压冻干收集备用。紫外分光光度仪测定叶酸含量,并计算叶酸偶联率(CR)。CR(%) = 叶酸量/参与反应的叶酸量 × 100%。

取2 mg的FA、CS和FA-CS样品在玛瑙研钵中研磨成细末,与干燥溴化钾粉混合均匀,装入模具内,把制备好的样品放入样品架,然后插入到仪器样品室固定位置上,在压片机上压制成片测试。根据被测化合物红外特性吸收谱带的出现来确定-NH-CO-的存在,从而确定叶酸偶联壳聚糖的成功。

### 1.3 叶酸偶联壳聚糖pGPU6/GFP/Neo纳米粒(FA-CS-DNAnano)和壳聚糖pGPU6/GFP/Neo纳米粒(CS-DNAnano)的制备

本实验利用复凝聚法合成纳米粒。将CS和FA-CS用1%醋酸溶液(pH为5.5)溶解,最终调定到0.02%(m/V)。用5 mmol/L硫酸钠溶液稀释质粒pGPU6/GFP/Neo,使其达0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。分别将这两种溶液置于55℃恒温水浴槽中孵育30 min,然后等容混合,立即涡轮旋转振荡1 min,使反应液在室温下通过静电反应充分偶合,放置30 min后待性质测定。

### 1.4 透射电镜观测纳米粒的形态特征及直径大小

用微量滴管滴一滴纳米粒溶液于有碳粉的铜网上,室温下使溶液自然干燥,10 min后用滤纸小心吸去多余的液体,再在空气中干燥2 min,滴一滴1 mmol/L乙酸双氧铀于干燥的样品上,对每一标本在7℃环境中进行5 s的负染色,直至溶液变干,然后上机。对每一标本进行扫描,扫描频率为0.6 Hz,扫描尺寸定位0.2  $\mu\text{m}$  × 0.2  $\mu\text{m}$ 。

### 1.5 细胞培养及纳米粒转染

SKOV3、MCF-7和HeLa细胞以 $2.5 \times 10^5$ /孔加入到六孔板中,以含10%胎牛血清的FA缺乏型RPMI 1640培养基培养24 h。转染时弃去原有培养

基,换成含有 100  $\mu\text{l}$  的 FA-CS-DNAnano 和 CS-DNAnano 溶液的完全培养基 2 ml 培养过夜。次日,将含有纳米粒的培养基换成单纯的完全培养基 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h。倒置荧光显微镜下观察转染后细胞形态及绿色荧光蛋白表达情况。

#### 1.6 流式细胞术测定纳米粒对肿瘤细胞转染效率

将转染后细胞的培养上清吸去,用 PBS 缓冲液洗涤 1 遍。每孔加入 500  $\mu\text{l}$  0.25% 的胰酶 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中作用 1~3 min,观察细胞状态。一经发现细胞伪足消失、间隙增大、形态变圆,则立即倒掉胰酶,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 1 ml 终止消化。用巴氏滴管反复轻柔吹打贴壁细胞,使其成为均匀的细胞悬液,将细胞悬液转移入 10 ml 玻璃离心管中,1 000  $\times g$  离心 5 min,去上清液,加入 300~400  $\mu\text{l}$  完全培养基,调整细胞密度为  $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。每种细胞另设一孔作为阴性对照以完全培养基培养 48 h。将上述所有样品依次(先对照,后相应转染细胞)以流式细胞术测定细胞转染效率(TR)。TR(%) = 表达细胞数/被检测细胞总数  $\times 100\%$ 。数据以 DFACSDvia Software V5.0.2 软件分析。

#### 1.7 MTT 法检测纳米粒的细胞毒性

SKOV3、HeLa、MCF-7 细胞用含有 10% 胎牛血清、50 U/ml 的青链霉素和 10 mmol/L HEPES 的 RPMI 1640 培养基在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。作用前 24 h,所有细胞以  $1 \times 10^4/\text{孔}$  的密度种植在 96 孔板内,每种细胞设 6 个复孔。24 h 后,细胞获得 75%~85% 的融合度。立即去掉原有培养基,用 PBS 洗涤 1 遍,更换含有 CS-DNAnano 和 FA-CS-DNAnano(CR 为 7.5%)溶液 20  $\mu\text{l}$  的 100  $\mu\text{l}$  完全培养基。作用 24 h 后,每孔更换 200  $\mu\text{l}$  的完全培养基。孵育过夜后,MTT 法检测细胞活性。细胞活性(%) = 处理细胞  $D_{570}$ /阴性对照  $D_{570} \times 100\%$ 。同时,本实验以常用的多聚物基因转染载体 PEI-PG-PU6/GFP/Neo 纳米粒(PEI-DNAnano)作为细胞毒性的阳性对照。

#### 1.8 统计学处理

所有实验均重复 3 次,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SPSS 11.5 软件对数据分析,采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FA-CS 红外吸收光谱鉴定

在 FA-CS 的红外光谱图(图 1)中,壳聚糖与叶

酸反应键(即-CO-NH-)所对应的  $1\,563\text{ cm}^{-1}$  处有一宽的吸收峰,由于-NH<sub>2</sub> 的偏振效应,-CO-NH-在  $1\,658\text{ cm}^{-1}$  处也出现一中强吸收峰,两者都能说明壳聚糖与叶酸偶联成功,但以前者为主。在 CS 的红外吸收光谱图中可见-NH<sub>2</sub> 对应  $1\,640\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰,而在叶酸的红外吸收光谱图中可见-COOH 对应  $1\,693\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰。紫外分光光度计测得 FA-CS 的偶联率为 7.5%。

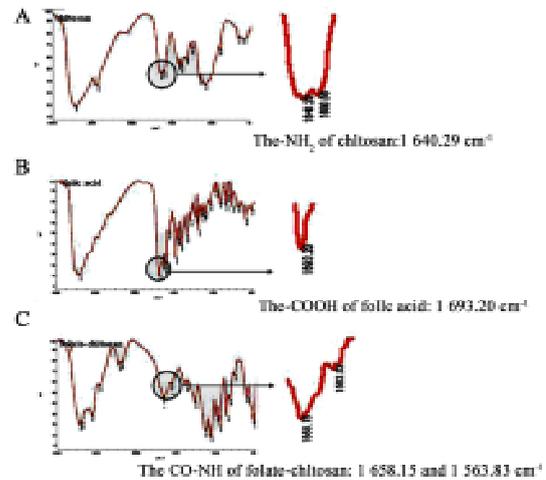


图 1 FA、CS 和 FA-CS 傅立叶红外吸收图谱

Fig. 1 Fourier transform infrared spectroscopy spectra of CS (A), FA (B) and FA-CS (C)

### 2.2 FA-CS-DNAnano 和 CS-DNAnano 的形态特征

肉眼观 CS-DNAnano 溶液为无色、透明,室温静置下无沉淀;FA-CS-DNAnano 溶液为均质、微黄、透明。通过透射电镜观察 FA-CS-DNAnano 和 CS-DNAnano 形态及粒径大小(图 2),见所有纳米粒接近球形,表面光滑,结构均匀。FA-CS-DNAnano 粒径为  $(78.1 \pm 0.3)\text{ nm}$ ,CS-DNAnano 直径为  $(138.4 \pm 0.7)\text{ nm}$ 。

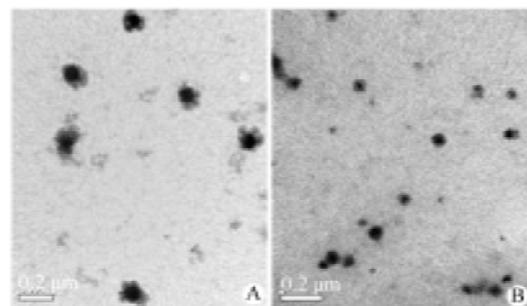


图 2 透射电镜观察两种不同纳米粒的形态

Fig. 2 Transmission electron microscopic photos of two kinds of nanoparticles

A: CS-DNAnano; B: FA-CS-DNAnano

### 2.3 纳米粒转染后肿瘤细胞的形态

图3为CS-DNAnano和FA-CS-DNAnano分别转染各肿瘤细胞后的荧光照片及相应细胞白片。其中CS-DNAnano转染SKOV3及MCF-7细胞后未见明显绿色荧光蛋白表达;白片见细胞生长正常,未见凋亡。FA-CS-DNAnano转染SKOV3及MCF-7细胞

后,可见有较强绿色荧光蛋白表达;白片见细胞形态正常,未见明显皱缩、肥大和变性改变。CS-DNAnano和FA-CS-DNAnano转染HeLa细胞后,可见少量绿色荧光蛋白表达,但偶联前后表达无明显改变;白片均见细胞形态正常,未见明显细胞死亡表现。

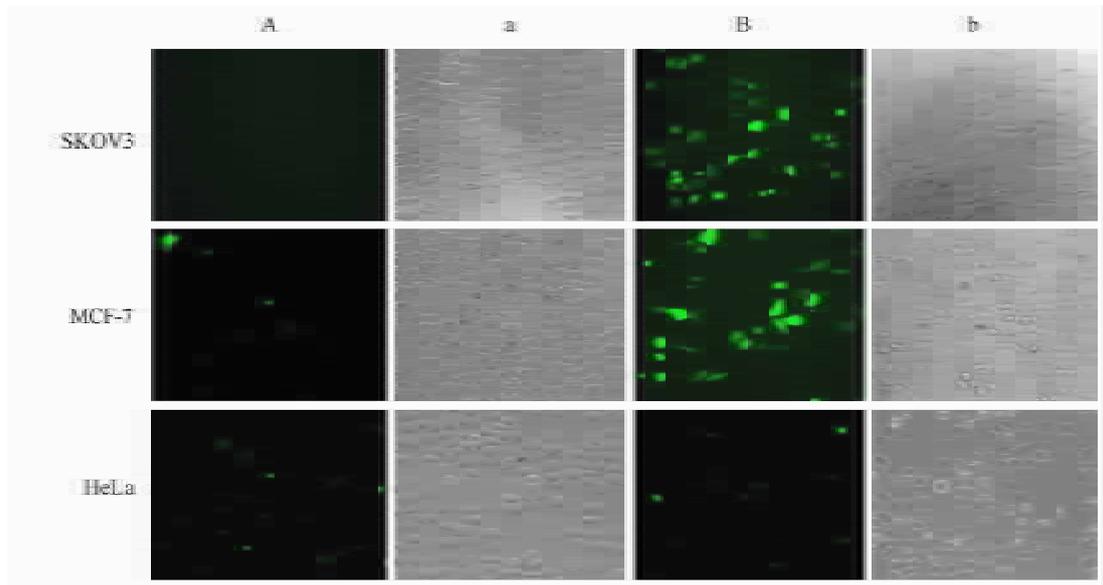


图3 CS-DNAnano和FA-CS-DNAnano转染后各肿瘤细胞荧光的表达(×200)

Fig. 3 Fluorescence expressions in different tumor cells transfected with CS-DNAnano and FA-CS-DNAnano(×200)

A: Cells transfected with CS-DNAnano; B: Cells transfected with FA-CS-DNAnano; a and b: Cells blank controls

### 2.4 两种纳米粒转染肿瘤细胞的效率

流式细胞仪测定CS-DNAnano和FA-CS-DNAnano转染肿瘤细胞的转染效率,结果(图4)可见,经叶酸偶联后,FA-CS-DNAnano转染SKOV3细胞的转染效率明显提高,偶联前后转染效率分别为(0.7±0.1)%和(24.3±0.7)%( $t = -13.229 P = 0.000$ )。同样,FA-CS-DNAnano对MCF-7细胞的转染效率为(16.8±1.2)%,与CS-DNAnano对MCF-7细胞的转染效率[(0.3±0.1)%]相比,差异有统计学意义( $t = -23.733, P = 0.000$ )。CS-DNAnano在HeLa细胞的转染效率极低,通过叶酸偶联,FA-CS-DNAnano转染效率无明显提高( $P > 0.05$ )。

### 2.5 纳米粒对于不同肿瘤细胞的毒性

纳米粒FA-CS-DNAnano和CS-DNAnano对SKOV3、HeLa和MCF-7细胞的毒性检测结果见图5。CS-DNAnano对MCF-7、SKOV3和HeLa细胞的活性均影响较小,细胞活性分别为(87.9±2.4)%、(102.0±4.0)%和(97.4±1.1)%。FA-CS-DNAnano对SKOV3以及HeLa细胞的活性影响与CS-

DNAnano相比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。毒性阳性对照PEI-DNAnano转染SKOV3、HeLa和MCF-7细胞后,其细胞活性均明显下降,细胞活力分别为(70.2±3.6)%、(66.6±1.7)%和(49.7±1.2)%,与FA-CS-DNAnano比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。

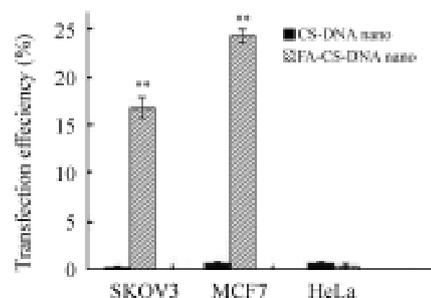


图4 两种纳米粒转染不同肿瘤细胞的效率

Fig. 4 Transfection efficiency of two nanoparticles for different tumor cells

\*\*  $P < 0.01$  vs CS-DNAnano

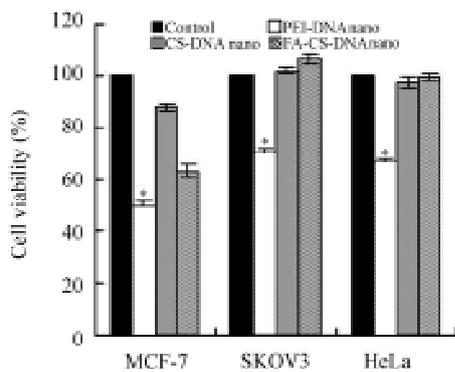


图5 两种纳米粒对不同肿瘤细胞毒性的比较

Fig. 5 Cytotoxicities of two different nanoparticles against different tumor cells

\*  $P < 0.05$  vs CS-DNA nano or FA-CS-DNA nano

### 3 讨论

CS 是一种从甲壳类动物外壳如贝类、虾类中提取的碱性高分子多糖,制备容易,来源广泛<sup>[9]</sup>,具有良好的生物降解性,无毒,而且有良好的生物相容性,故而将其用于基因载体有许多优点<sup>[3]</sup>。然而其对细胞转染效率很低。很多研究者均在 CS 位偶联上具有活性的氨基和羟基,标记上肿瘤特异性小分子,实现基因或药物的体内肿瘤靶向传递。如 Lee 等<sup>[10]</sup>用脱氧胆酸对 CS 进行偶联,使其疏水化,用其介导质粒 DNA 对 COS-1 细胞的基因转染,转染效率明显高于裸 DNA。Park 等<sup>[11]</sup>制备了半乳糖改性的壳聚糖-DNA 复合物,从而提高其对高表达该受体的肝细胞的靶向性。

本研究通过酰胺键将 CS 及 FA 有效偶联,通过红外吸收光谱法鉴定证实酰胺键的形成。利用特征性红外吸收光谱可以鉴定证实化合物功能基团结构的存在<sup>[12]</sup>。在红外吸收光谱图中,酰胺的特征吸收主要是 N-H 伸缩振动 ( $3\ 500 \sim 3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ )、C=O 伸缩振动 ( $1\ 680 \sim 1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ , 酰胺 I 谱带),以及 N-H 的弯曲振动 ( $1\ 655 \sim 1\ 590\ \text{cm}^{-1}$ , 酰胺 II 谱带)组成<sup>[12]</sup>。在 FA-CS 的红外光谱图中(图 1), $-\text{NH}_2$  在  $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$  的吸收峰消失,而出现了在  $1\ 563\ \text{cm}^{-1}$  处的新的强吸收峰,这说明 CS 和 FA 通过酰胺键的形成而成功偶联。

在酸性介质中,CS 的氨基基团表现正电位,能通过静电反应与带负电荷的核酸物质如 DNA、RNA 产生强烈的静电反应,形成直径在 100 nm 左右的纳米球,同时对带有负电荷的细胞膜产生膜扰动效

应<sup>[13]</sup>。故而表面电位及粒径的大小直接影响转染效率<sup>[14]</sup>。

FR- $\alpha$  介导基因传递可以明显提高选择性靶向转染的特异性和安全性,前提是靶细胞必须高表达叶酸受体。人体癌细胞如卵巢癌、乳腺癌等细胞表面的叶酸受体表达明显高于正常组织<sup>[15-16]</sup>,是有潜力的基因靶向治疗靶点。FR- $\alpha$  在正常组织表达量极为微弱,而在癌组织不仅表达增强,而且功能活性也明显提高。在转移瘤组织中的表达显著高于原发瘤<sup>[17]</sup>,几乎 90% 以上上皮性卵巢癌组织都高表达 FR- $\alpha$ <sup>[18]</sup>。本研究将 FA-CS-DNA nano 和 CS-DNA nano 转染 FR- $\alpha$  高表达的 MCF-7、SKOV3 细胞和低表达的 HeLa 细胞,并将绿色荧光蛋白作为报告蛋白来检测不同纳米粒的转染效率。如图 3、4 所示,在 MCF-7 和 SKOV3 细胞中,FA-CS-DNA nano 的转染效率明显高于 CS-DNA nano;但在 HeLa 细胞中,CS-DNA nano 转染效率和 FA-CS-DNA nano 转染效率都处于极低水平。结果说明,FA-CS 并不能提高纳米粒对所有细胞的转染效率。Canal<sup>[8]</sup>研究证实,叶酸偶联的 GFP 标记多柔比星在肺癌 A549 细胞系(FR- $\alpha$  阴性)、宫颈癌 HeLa 细胞系(FR- $\alpha$  弱阳性)的摄取率明显低于上皮细胞癌 KB-3-1 细胞系(FR- $\alpha$  强阳性);也有文献<sup>[6]</sup>证实,人乳腺癌细胞株 MCF-7<sup>[7]</sup>和人卵巢癌细胞株 SKOV3 是 FR- $\alpha$  高表达的肿瘤细胞,通过叶酸偶联能提高这两种细胞的药物摄取量。多项研究均证实,叶酸偶联复合物(治疗性基因或药物)的细胞靶向转运率直接与 FR- $\alpha$  的表达量呈密切正相关。本实验中,叶酸偶联后对 HeLa 细胞系的转染效率无明显提高,主要是因为该细胞虽然表达 FR- $\alpha$ ,但表达水平并不高的原因<sup>[8]</sup>,但仍有待于细胞分子生物学方面的进一步研究证实。另外本实验也证实,对于 FR- $\alpha$  高表达的 MCF-7<sup>[7]</sup>和 SKOV3 细胞<sup>[6]</sup>,FA-CS-DNA nano 的转染效率明显高于 CS-DNA nano ( $P < 0.05$ ),说明通过 FR- $\alpha$  的介导,可明显提高 FR- $\alpha$  高表达细胞的基因摄入量,其机制与细胞表面 FR- $\alpha$  表达量明显相关。

既往研究<sup>[19-21]</sup>表明,CS 对于许多细胞表现为低细胞毒性,如 HEK293、MG63、HepG2 细胞等。本实验也对 CS 及 FA-CS 纳米粒的细胞毒性做了进一步观察,并与另一类毒性明显的高分子基因载体 PEI (聚乙烯亚胺, polyethyleneimine) 做比较。如图 5 所见,CS 纳米粒对 MCF-7、SKOV3 和 HeLa 细胞系的细胞活性均影响较小,分别为  $(87.9 \pm 2.4)\%$ 、 $(102.0 \pm 4.0)\%$  和  $(97.4 \pm 1.1)\%$ 。经叶酸偶联后的纳米粒对 SKOV3 以及 HeLa 细胞的活性也均无明显

显影响。而 PEI-DNAnano 转染 SKOV3、HeLa 和 MCF-7 细胞后,细胞活性均明显下降[( 70. 2 ± 3. 6)%、( 66. 6 ± 1. 7)% 和( 49. 7 ± 1. 2)%]。结果表明,与 PEI 相比,FA-CS 粒是一种低毒的基因转染载体。

综上所述,叶酸偶联壳聚糖可以明显提高 CS-DNAnano 对于 FR-α 高表达肿瘤细胞的转染效率,是高效的基因转染载体。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy [ J ]. Nature, 2004, 427( 6977 ): 779-781.

[ 2 ] Schaffert D, Wagner E. Gene therapy progress and prospects: Synthetic polymer-based systems [ J ]. Gene Ther, 2008, 15 ( 16 ): 1131-1138.

[ 3 ] Zhao QQ, Chen JL, Han M, Liang WQ, Tabata Y, Gao JQ. Combination of the poly ( ethylenimine ) and chitosan induce high gene transfection efficiency and low cytotoxicity [ J ]. Biosci Bieng, 2008, 105( 1 ): 65-68.

[ 4 ] Zhao X, Li H, Lee RJ. Targeted drug delivery via folate receptors [ J ]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5( 3 ): 309-319.

[ 5 ] Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Bendorour M, et al. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy [ J ]. Biomaterials, 2006, 27( 9 ): 2060-2065.

[ 6 ] Zheng Y, Cai Z, Song X, Yu B, Bi Y, Chen Q, et al. Receptor mediated gene delivery by folate conjugated N-trimethyl chitosan *in vitro* [ J ]. Int J Pharm, 2009, 382( 1/2 ):262-269.

[ 7 ] Zhang Z, Huey Lee S, Feng SS. Folate-decorated poly( lactide-co-glycolide )-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery [ J ]. Biomaterials, 2007, 28( 10 ): 1889-1997.

[ 8 ] Canal F, Vicent MJ, Pasut G, Schiavon O. Relevance of folic acid/polymer ratio in targeted PEG-epirubicin conjugates [ J ]. J Control Release, 2010, 146( 3 ): 388-399.

[ 9 ] Basarkar A, Singn J. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery [ J ]. Int J Nanomedicine, 2007, 2 ( 3 ): 353-360.

[ 10 ] Lee KY, Kwon IC, Kim YH, Jo WH, Jeong SY. Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system [ J ]. J Control Release, 1998, 51( 2/3 ): 213-220.

[ 11 ] Park IK, Kim TH, Park YH, Shin BA, Choi ES, Chowdhury Eh,

et al. Galactosylated chitosan-graft-poly( ethylene glycol ) as hepatocyte-targeting DNA carrier [ J ]. J Control Release, 2000, 76 ( 3 ): 97-108.

[ 12 ] 张 锐. 现代材料分析方法 [ M ]. 化学工业出版社, 北京: 2007. 第三章.

[ 13 ] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue [ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55( 3 ): 329-347.

[ 14 ] Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, Labhasetwar V. Size dependency of nanoparticles- mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles [ J ]. Int J Pharm, 2002, 244 ( 1/2 ): 105-115.

[ 15 ] Jhaveri Ms, Rait AS, Chung KN, Trepel JB, Chang EH. Anti-sense oligonucleotides targeted to the human alpha folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment [ J ]. Mol Cancer Ther, 2004, 3( 12 ): 1505-1512.

[ 16 ] Siegel BA, Dehdashti F, Mutch DG, Podoloff DA, Wendt R, Sutton GP, et al. Evaluation of In-DTPA-Folate as a receptor-targeted diagnostic agent for ovarian cancer: Initial clinical results [ J ]. J Nucl Med, 2003, 44( 5 ): 700-707.

[ 17 ] Ross JF, Wang H, Behm FG, Mathew P, Wu M, Booth R, et al. Folate receptor type betais a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia [ J ]. Cancer, 1999, 85 ( 2 ): 348-357.

[ 18 ] Kalli KR, Oberg AI, Keeney GL, Chriatianson TJ, Low PS, Knutson KL. Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer [ J ]. Gynecol Oncol, 2008, 108( 3 ): 619-626.

[ 19 ] Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Bendorour M. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy [ J ]. Biomaterials, 2006, 27( 9 ): 2060-2065.

[ 20 ] Gao S, Chen J, Dong L, Ding Z, Yang YH, Zhang J. Targeting delivery of oligonucleotide and plasmid DNA to hepatocyte via galactosylated chitosan vector [ J ]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 60( 3 ): 327-334.

[ 21 ] Coris K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles [ J ]. Biomaterials, 2007, 24( 7 ): 1255-1264.

[ 收稿日期 ] 2010 -06 -17 [ 修回日期 ] 2010 -08 -20

[ 本文编辑 ] 韩 丹

