

p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒联合磁流体热疗对肝癌细胞的抑制作用

赵成桂,袁晨燕,吴国球(东南大学附属中大医院 检验中心,江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**建立 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒靶向基因治疗和磁流体热疗系统用于肝癌的联合治疗,以提高治疗的安全性和有效性。**方法:**亚克隆基因重组法构建靶向肝癌的治疗基因 p[5HRE]AFPp-p53,并用限制性内切酶凝胶电泳法检测重组质粒是否构建成功;用共沉淀法制备磁性纳米颗粒 PEI-Fe₃O₄,利用透射电镜、粒径仪、傅里叶转换红外光谱仪等对 PEI-Fe₃O₄ 进行表征检测。MTT 法检测 PEI-Fe₃O₄ 转染 p[5HRE]AFPp-p53 至不同细胞系后的细胞增殖及磁流体热疗和基因治疗联合作用对肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用。**结果:**成功制备载有靶向治疗基因的 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒,由其介导的基因治疗组与阴性及纳米颗粒对照组相比,明显抑制肝癌 HepG2(AFP 阳性)细胞 (0.592 ± 0.041) vs (1.052 ± 0.031) , (1.012 ± 0.021) , $P < 0.01$ 和 SMMC7721(AFP 阴性)细胞 (0.813 ± 0.042) vs (1.073 ± 0.032) , (1.182 ± 0.052) , $P < 0.01$ 的增殖活性,但对非肝癌细胞(L929 和 Lovo)增殖抑制作用无明显影响($P > 0.05$)。基因治疗和磁流体热疗联合组与单独使用热疗组及基因治疗组相比显著增加 HepG2 细胞的增殖抑制率(76.11% vs 35.22%、42.92%,均 $P < 0.01$)。**结论:**p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒对肝癌细胞具有特异性杀伤作用,并且能与磁流体热疗产生协同效应,是一种选择性高、治疗效果好的肿瘤治疗方法。

[关键词] 肝癌;HepG2 细胞;SMMC7721 细胞;靶向基因治疗,磁性纳米颗粒,磁流体热疗,联合治疗

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0044-08

p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ magnetic nanoparticle combined with magnetic fluid hyperthermia inhibit hepatoma cells

ZHAO Chenggui, YUAN Chenyan, WU Guoqiu(Laboratory Center, Zhongda Hospital affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a combined therapy of p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ magnetic nanoparticle and Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) to treat liver carcinoma and improve the safety and efficacy of the treatment. **Methods:** Sub-clone was used to construct hepatoma targeted gene p[5HRE]AFPp-p53, which was then confirmed by enzyme digestion and gel electrophoresis. The PEI-Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were prepared by coprecipitation method, and its surface characteristics were examined by transmission electron microscope, particle size analyzer and Fourier transform infrared spectrometer etc. The proliferation of cell lines transfected with p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄, and the inhibition effect of targeted gene therapy combined with MFH on HepG2 cell proliferation were detected by MTT method. **Results:** p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were successfully constructed. Comparing with negative control group and nanoparticles control group, the proliferation activity of HepG2 cells (0.592 ± 0.041) vs (1.052 ± 0.031) , (1.012 ± 0.021) , $P < 0.01$ and SMMC772 cells (0.813 ± 0.042) vs (1.073 ± 0.032) , (1.182 ± 0.052) , $P < 0.01$ was significantly inhibited in p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ mediated gene treatment group, however the proliferation of nonhepatoma cells (L929 and LOVO) was not significantly inhibited ($P > 0.05$). Comparing with MFH group and gene therapy group, the inhibition rate of HepG2 cell proliferation was significantly increased in gene + MFH group (35.22%, 42.92% vs 76.11%, $P < 0.01$). **Conclusion:** p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ magnetic nanoparticle

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81271636)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81271636)

[作者简介] 赵成桂(1971-),男,江苏省南京市人,硕士生,主管技师,主要从事肿瘤免疫的基础与临床研究,E-mail:jsnjzcg@163.com

[通信作者] 吴国球(WU Guoqiu, corresponding author),E-mail:nationball@163.com

has specific killing effect on liver carcinoma cells; it will have synergistic effect when combined with MFH; the combined therapy is an anti-tumor treatment with high selection and good therapeutic effect.

[**Key words**] hepatoma; HepG2 cell; SMMC7721 cells; targeted gene therapy; magnetic nanoparticles; magnetic fluid hyperthermia; combined therapy

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 44-51. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.007]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国的高发肿瘤之一,据国际癌症研究中心估计2000年全球肝癌的发病人数为56.4万,其中55%发生在中国^[1-3]。目前治疗肝癌首选方案是手术后辅以化疗或放疗,而传统的放、化疗尚缺乏特异性和靶向性,一旦肝癌患者失去手术机会则很难治愈,因此寻找新的有效的靶向性肿瘤治疗模式成为研究者的当务之急。基因疗法在肿瘤治疗方面显示出良好的前景^[4-5]。常用的治疗基因包括抑癌基因、自杀基因和反义基因^[6]。抑癌基因p53是与肿瘤相关性最强的基因,超过50%的人类恶性肿瘤和60%的肝细胞癌中都存在p53的突变,选用野生型p53作为治疗基因,能调节细胞周期、修复DNA、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成和控制肿瘤转移等^[7-9],还有研究^[10]显示,p53基因治疗可以提高肿瘤组织对热疗、化疗和放疗的敏感性。磁性纳米颗粒由于其特有的磁响应性,将其作为纳米载体时不仅能通过体外磁场定位增加基因运送的靶向性,并且能在交变磁场中(alternating magnetic field, AMF)将磁能转化为热能,实现肿瘤局部的可控升温,对肿瘤细胞进行靶向精确热疗,又被称为磁流体热疗(magnetic fluid hyperthermia, MFH)^[11]。肿瘤特异性基因治疗的研究通常关注何时和如何调控治疗基因的表达。本研究利用肝癌特异性启动子(AFP启动子)和乏氧反应序列引导下游抑癌基因的表达构建肝癌特异性的治疗基因p[5HRE]AFPp-p53,并用磁性纳米颗粒PEI-Fe₃O₄作为基因载体运送治疗基因,从而将肿瘤靶向基因治疗与磁流体热疗结合起来,极大地提高治疗的安全性、特异性和有效性,为肿瘤治疗提供新的模式和思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

透射电子显微镜(JEM-200CX)购自日本JEOL公司,扫描电子显微镜(S-3400N II型)购自日本Hitachi公司,傅里叶转换红外光谱仪(NEXUS870)购自美国NICOLET公司,Zeta电位和粒径分析仪购自美国Brookhaven公司,DMEM培养基购自美国Gibco-Invitrogen公司,酶标仪购自芬兰Thermo公司。MTT试剂、聚乙烯亚胺(PEI)等试剂均购自美

国Sigma公司,所有试剂均为分析纯。肝癌细胞系HepG2(AFP阳性)和SMMC7721(AFP阴性)、成纤维细胞系L929和结肠癌细胞系Lovo均购自中科院上海细胞研究所,并培养在DMEM完全培养液中(含10%胎牛血清)。质粒pUC57-5HRE购自长沙赢润生物公司。

1.2 抑癌基因重组载体的构建与鉴定

直接合成法制备人类AFP基因的启动子序列(0.3 kb),在序列两端合成限制性内切酶Mlu I和Hind III位点,将其插入质粒pCDNA3.1-EGFP相应的酶切位点,替换CMV启动子,生成pCDNA3.1-AFPp-EGFP。Mlu I酶切质粒pUC57-5HRE释放5HRE序列,将其插入pCDNA3.1-AFPp的Mlu I位点,得到[5HRE]AFP融合启动子引导的绿色荧光蛋白表达的载体p[5HRE]AFP-EGFP,用限制性内切酶Nhe I和Hind III对其进行酶切电泳检查插入位置和片段大小是否正确。用抑癌基因野生型p53序列插入杂合启动子下游,替换EGFP基因,得到真核表达重组载体p[5HRE]AFP-p53,限制性内切酶EcoR I和Xho I对其进行酶切电泳鉴定。所有重组质粒进行测序分析插入片段序列是否正确。

1.3 磁性纳米颗粒(PEI-Fe₃O₄)的构建和表征

1.3.1 Fe₃O₄纳米颗粒的制备 FeCl₃和FeCl₂以摩尔比5:3混合,溶于200 ml纯水,通入N₂持续搅拌,逐滴加入25%氨水溶液将溶液pH值调至(9.5 ± 0.1)后,将溶液温度升至50 °C并反应30 min,得到固体Fe₃O₄沉淀物,用磁性分离产物,以纯水多次洗涤至pH值至7.0。

1.3.2 PEI修饰的磁性纳米颗粒的制备 0.5 g Fe₃O₄纳米颗粒溶于100 ml草酸溶液(5 g/L),水浴超声60 min后,磁性分离,以纯水洗涤数次后经超声分散重悬于PBS缓冲溶液(pH7.0),逐滴加入20%高分子量(25 kD)聚乙烯亚胺(PEI),30 °C水浴中磁力搅拌24 h,得到稳定的PEI-Fe₃O₄纳米颗粒胶体水溶液,磁性分离PEI-Fe₃O₄纳米颗粒后用纯水洗涤取出多余的PEI。

1.3.3 纳米颗粒表征和生物相容性试验 透射电镜观察Fe₃O₄纳米颗粒和PEI-Fe₃O₄纳米颗粒的粒径形态及分散性;Zeta电位和粒径分析仪测量

Fe₃O₄ 和 PEI-Fe₃O₄ 纳米颗粒的表面电位、PEI-Fe₃O₄ 纳米颗粒的水合粒径;用傅里叶转换红外光谱仪检测纳米颗粒的近红外吸收光谱图,以分析颗粒表面的基团。将浓度为 1 mg/ml 的 PEI-Fe₃O₄ 纳米颗粒磁流体溶液置于交变磁场中($f = 230$ kHz, $I = 30$ A) 1 h, 每间隔 5 min 测量一次磁流体溶液的温度, 绘制升温曲线图。分别使用 0、10、20、50、100、150 和 200 μg/ml 的 PEI 和 PEI-Fe₃O₄ 纳米颗粒与成纤维细胞系 L929 共孵育 72 h, 然后进行 MTT 试验, 在酶标仪 492 nm 波长处测定细胞光密度(D)值, 以未处理细胞为阴性对照计算细胞相对增值率。细胞相对增值率(%) = (实验组 D 值/阴性对照组 D 值) × 100%。

1.4 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒的制备

凝胶阻滞试验以及复合物粒径电位检测: 重组质粒 p[5HRE]AFP-P53 和纳米颗粒 PEI-Fe₃O₄ 以不同质量比(纳米颗粒: 重组质粒为 0、0.5、1、2、4、8、10)混合后进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 每个泳道的质粒量固定为 1 μg, 纳米颗粒的量按如上比例增加。100 V 电压电泳 1 h 后在凝胶成像仪上观察。按不同纳米颗粒的 DNA 质量比例结合的 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 复合物在 zeta 电位和粒径分析仪上检测表面电位和水合粒径。

1.5 基因重组质粒 p[5HRE]AFPp-p53 转染肝癌 HepG2 细胞

选择合适的质量比(10:1)将 PEI-Fe₃O₄ 纳米颗粒和 p[5HRE]AFP-EGFP 结合以后, 加至肝癌细胞系 HepG2(6 孔细胞培养板每孔转染复合物含有纳米颗粒 40 μg, 重组质粒 4 μg), 24 h 后去除转染复合物, 加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 继续培养至 48 h 后在倒置荧光显微镜下观察增强荧光蛋白(enhance green fluorescence protein, EGFP)的表达, 并用流式细胞仪分析表达 EGFP 的细胞比例, 检测转染表达效率。

1.6 MTT 法检测转染 p[5HRE]AFPp-P53/PEI-Fe₃O₄ 对不同细胞系细胞增殖的影响

选择肝癌系 HepG2 (AFP 阳性)、SMMC7721 (AFP 阴性); 非肝癌细胞系 L929 (成纤维细胞)、Lovo (结肠癌细胞)。4 株不同细胞系细胞用 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 转染后连续培养 4 d, 隔天更换含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液。每个转染细胞分别设立阴性对照组(不加纳米颗粒和质粒)和纳米颗粒对照组(仅加入 PEI-Fe₃O₄, 不加质粒), 用 MTT 法检测细胞增殖活性, 在酶标仪 492

nm 处检测各组细胞的光密度(D)值。

1.7 MTT 法检测基因治疗联合磁流体热疗对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

根据不同的处理方法, 将试验中的 HepG2 细胞分为 5 组: (1) 阴性对照组: 细胞常规培养, 不做任何处理; (2) 磁流体热疗组: 上述细胞培养液中加入终浓度为 1 mg/ml 的 PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒, 置于交变磁场中($f = 230$ kHz, $I = 30$ A) 1 h, 然后去除纳米颗粒, 换以上述细胞培养液继续培养 48 h; (3) 基因治疗组: p[5HRE]AFPp-P53/PEI-Fe₃O₄ 转染后(4 μg 质粒, 40 μg 纳米颗粒/孔), 24 h 后去除转染混合物, 加入上述细胞培养液培养 24 h; (4) 基因治疗联合磁流体热疗组, p[5HRE]AFPp-P53/PEI-Fe₃O₄ 转染 24 h 后进行细胞热疗 1 h (方法同磁流体热疗组), 然后加入上述细胞培养液培养 24 h; (5) 纳米颗粒对照组: 加入纳米颗粒 40 μg/孔(不加重组载体), 24 h 后去除纳米颗粒, 加入上述细胞培养液继续培养 48 h。以上各组细胞用 MTT 法检测细胞增殖活性, 并按下式计算细胞增殖抑制率(IR): $IR(\%) = [1 - \text{实验组细胞光密度}(D) \text{值} / \text{阴性对照组细胞光密度}(D) \text{值}] \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建与鉴定肝癌靶向治疗基因重组 p[5HRE]AFP-p53 载体

AFP 基因的启动子入质粒 pCDNA3.1-EGFP 替换 CMV 启动子, 生成 pCDNA3.1-AFPp-EGFP, 用限制性内切酶 *Mlu*I 和 *Hind* III 对其进行酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示插入的 AFP 启动子条带(图 1A)。5HRE 序列, 将其插入 pCDNA3.1-AFPp-EGFP 的 *Mlu*I 位点, 得到 [5HRE]AFP 融合启动子引导的绿色荧光蛋白表达的载体 p[5HRE]AFP-EGFP, 用限制性内切酶 *Nhe*I 和 *Hind* III 对其进行酶切电泳后显示杂合启动子 [5HRE]AFP 插入位置和片段大小正确(图 1B)。本实验室自备的 p53 序列从其他表达质粒中用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后释放, 酶切电泳可见切下 1 194 bp p53 片段(图 1C)。将其替换 p[5HRE]AFP-EGFP 中的 EGFP 序列后得到重组质粒 p[5HRE]AFP-p53, 用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Xho*I 对其进行酶切电泳鉴定结果显示, p53 片段大小和插入位置正确(图 1D)。所有重组质粒经测序分析, 插入片段正确, 与 Gene-

Bank 中相应序列完全吻合,没有发生碱基突变。

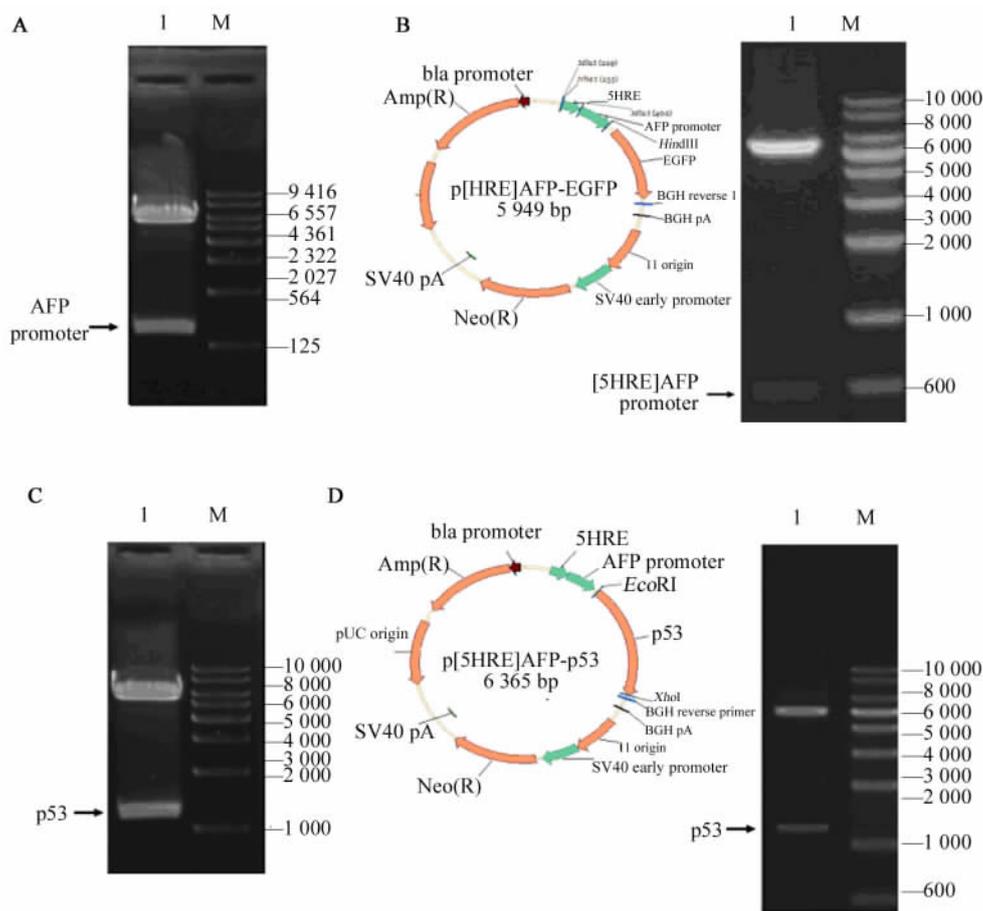


图1 重组质粒构建及酶切电泳鉴定图

Fig. 1 Construction and recombinant plasmid confirming by digestion gel electrophoresis

A: The plasmid pCNA-AFPp-EGFP was digested by *Mlu* I and *Hind* III, the released segment AFP promoter was 300 bp;
 B: The recombinant plasmid p[5HRE]AFP-EGFP was digested by *Nhe* I and *Hind* III, the released segment [5HRE]AFP promoter was 453 bp, which was inserted into correct site as shown in gel electrophoresis; C: The gel electrophoresis of p53, which was released from other plasmid by *Eco*R I and *Xho* I double digestion; D: The recombinant plasmid p[5HRE]AFP-p53 was digested by *Eco*R I and *Xho* I, the released segment p53 was 1 194 bp, which was inserted into correct site as shown in gel electrophoresis; Line 1: the digested plasmid; Line M: DNA Marker

2.2 纳米颗粒与表征测试

透射电镜观察(图2)显示,制备的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒为大小均一的球形颗粒,粒径为 20 ~ 30 nm,分散性良好,测得的表面电位为(-20.16 ± 3.02)mv(图2A);经过 PEI 对其进行表面修饰后,颗粒大小和分散性没有明显变化,表面电荷变为正值(39.01 ± 4.17)mv(图2B)。经傅里叶转换红外光谱分析,PEI 修饰后,纳米颗粒的吸收光谱发生变化,出现 PEI 特征性的吸收峰(图2C)。PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒的水合粒径为(141.7 ± 11.6)nm(图2D),在交变磁场($f = 230$ kHz, $I = 30$ A)中浓度为 1 mg/ml 的 PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒能可控性的升温

并稳定在有效热疗温度(43 °C)左右(图2E)。用不同浓度的 PEI-Fe₃O₄ 和 PEI 与 L929 细胞共孵育以后,其细胞的相对增殖率(RGR)与纳米粒浓度的关系(图2F)显示,与 PEI 相比,PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒对细胞的毒性明显降低($P < 0.05$)。

2.3 成功制备 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒复合物

2.3.1 凝胶电泳阻滞结果 试验结果显示,与重组质粒当纳米颗粒 DNA 质量比达到 2:1 以后,复合物不能向凝胶电泳正极泳动(图3),提示 DNA 已经完全与 PEI-Fe₃O₄ 纳米颗粒结合,复合物颗粒表面带正电荷。

2.3.2 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒的粒径和表面电位 对不同纳米颗粒的 DNA 的质量比例结合形成的 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒进行表面电位和水合粒径的检测结果显示, 纳米颗粒:DNA 的质量比达到 2:1 以

后, 复合纳米颗粒表面电荷变为正值, 并随着纳米颗粒比例的增加而增加(图 4A)。在纳米颗粒:DNA 的质量比为 1 和 2 时复合纳米颗粒的粒径最大, 随着纳米颗粒比例的增加而逐渐减小(图 4B)。

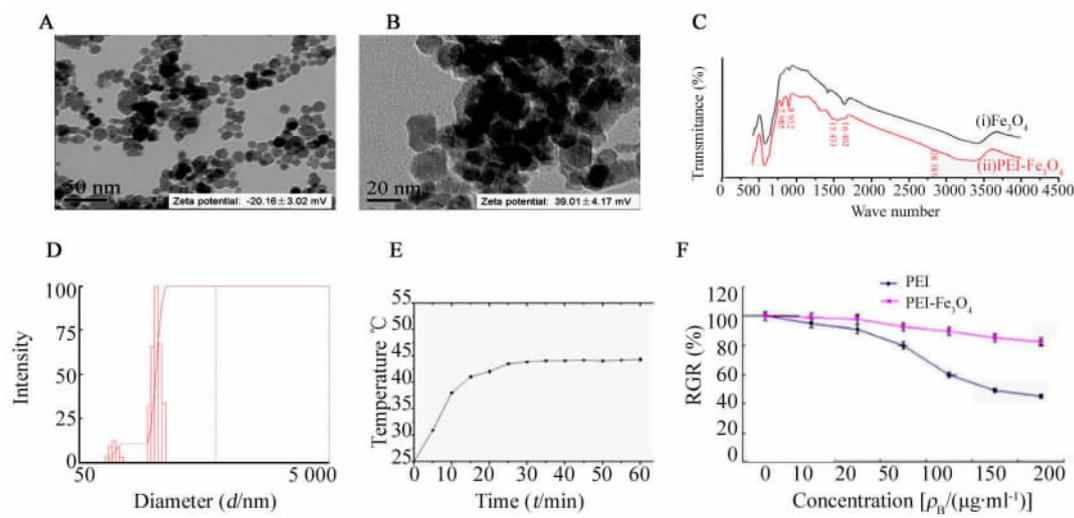


图 2 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒和 PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒的表征和生物相容性分析

Fig. 2 Characterizations and biocompatibility of Fe₃O₄ and PEI-Fe₃O₄ magnetic nanoparticles

A: TEM image and zeta potential of Fe₃O₄ nanoparticles(×200 000); B: TEM image and zeta potential of PEI-Fe₃O₄ nanoparticles(×500 000); C: FTIR spectroscopy Fe₃O₄(black line)and PEI-Fe₃O₄ nanoparticles(red line); D: Hydrated particle of PEI-Fe₃O₄ , (141.7 ± 11.6) nm ; E: Temperature curve of PEI-Fe₃O₄ in alternating magnetic field (f = 230 kHz, I = 30A); F: The RGR of L929 cells incubated with PEI and PEI-Fe₃O₄ nanoparticles at different concentration for 72 h



图 3 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 纳米颗粒凝胶电泳阻滞

Fig. 3 Gel electrophoresis retardation of p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ nanoparticles

2.4 PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒载体能有效介导基因转染

检测 PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒介导基因转染的效率, p[5HRE]AFP 杂合启动子在肝癌细胞内的表达情况, PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒作为载体将 p[5HRE]AFP-EGFP 转染至 HepG2 细胞后 24 h, 因 p[5HRE]AFP-EGFP 是含有绿色荧光蛋白基因的重组载体, 用透射电镜观察显示, 细胞内有成团的纳米

颗粒(图 5A 箭头所示); 转染后 48 h, 倒置荧光显微镜可观察到细胞内表达的 EGFP(图 5B); 用流式细胞仪对绿色荧光表达的细胞进行计数, 检测结果, 转染后的细胞中有 97.45% 表达 EGFP(图 5C)。

2.5 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 介导的靶向基因治疗可选择性明显抑制肝癌细胞的增殖

MTT 法检测结果(表 1)显示, p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 基因治疗组 HepG2 (AFP 阳性) 和 SMMC7721 (AFP 阴性) 肝癌细胞的光密度 (D) 值显著低于阴性对照组和纳米颗粒对照组, 分别为 (0.592 ± 0.041) vs (1.052 ± 0.031)、(1.012 ± 0.021) 和 (0.813 ± 0.042) vs (1.073 ± 0.032)、(1.182 ± 0.052)。光密度 (D) 值差异均有统计学意义 (均 P < 0.01)。结果提示, HepG2 和 SMMC7721 细胞的增殖 (增殖抑制率分别为 43.73% 和 24.23%) (均 P < 0.01)。成纤维细胞 L929 株和结肠癌细胞 Lovo 株磁纳米颗粒 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 转染组的光密度 (D) 值与阴性对照组及纳米颗粒对照组的差异均无统计学意义 (均 P >

0.05), 分别为[(1.321 ± 0.021) vs (1.362 ± 0.024)、(1.321 ± 0.021)]和[(1.153 ± 0.025) vs (1.158 ± 0.032)、(1.092 ± 0.014)]。磁纳米颗粒 p[5HRE]AFPp-p53/ PEI-Fe₃O₄ 靶向性抑制肝癌细胞的增殖, 对非肝癌细胞和正常细胞增殖无抑制作用。

2.6 肝癌靶向基因联合磁流体热疗能明显抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖

MTT 法检测结果(表 2)显示, 单独磁流体热疗组、单独基因治疗组及联合治疗组的细胞光密度(D)值与阴性对照组相比, HepG2(AFP 阳性)细胞的光密度(D)值均明显降低[(0.892 ± 0.023)、(0.786 ± 0.047)、(0.329 ± 0.050) vs (1.377 ± 0.045)], 均 P < 0.01 [(细胞增殖抑制率分别为 35.22%、42.92% 和 76.11%)], 联合治疗组细胞增殖抑制率显著高于其他两组(P < 0.01)。而纳米颗粒对照组与阴性对照组相比, 差异无统计学意义(P > 0.05), 其细胞增殖抑制率仅为 6.00%。

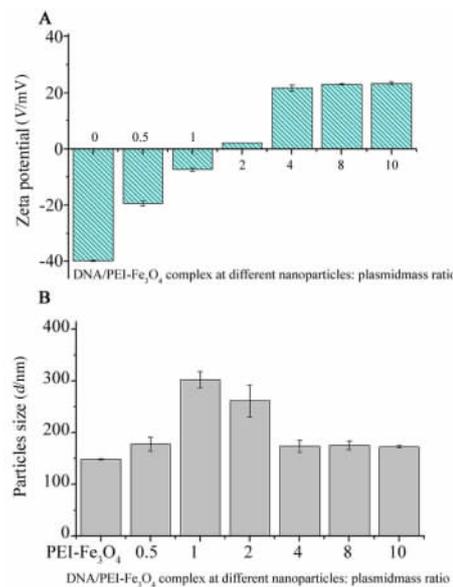


图 4 不同的纳米颗粒与 DNA 质量比例结合形成的 DNA/PEI-Fe₃O₄ 复合物的表面电位 (A) 和水合粒径 (B)
 Fig. 4 Zeta potential (A) and hydrodynamic size (B) of DNA/PEI-Fe₃O₄ complex at ratio of particle with DNA mass

表 1 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 作用于不同细胞系后经 MMT 检测的光密度(D)值及增值抑制率

Tab. 1 Optical density (D) and inhibition rates of cell lines treated with p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ by MTT assays

Group	L929		LOVO		HepG2		SMMC7721	
	D ₄₉₂	IR(%)	D ₄₉₂	IR(%)	D ₄₉₂	IR(%)	D ₄₉₂	IR(%)
Negative	1.362 ± 0.024	-	1.158 ± 0.032	-	1.052 ± 0.031	-	1.073 ± 0.032	-
Nanoparticles	1.321 ± 0.021 *	0	1.092 ± 0.014 *	0	1.012 ± 0.021 *	0.038	1.182 ± 0.052 *	0
Tranfection	1.321 ± 0.021 ^{△△}	0	1.153 ± 0.025 *	0	0.592 ± 0.041 ^{△△}	43.73	0.813 ± 0.042 *	24.23

* P > 0.05 vs negative control group; ^{△△} P < 0.01 vs the other two groups

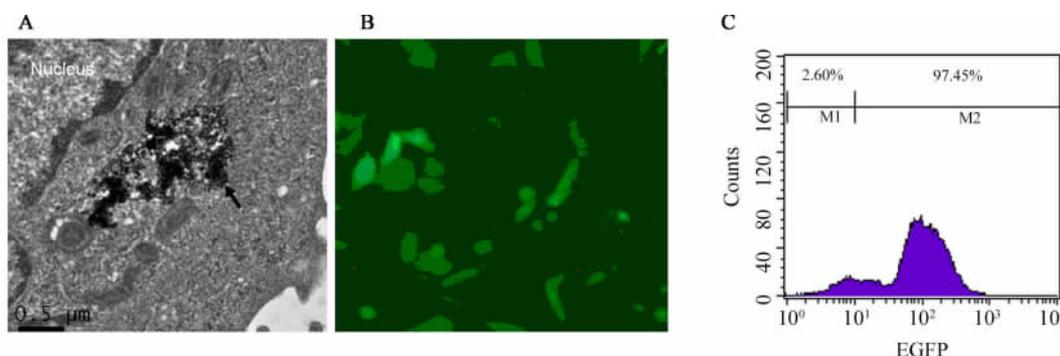


图 5 p[5HRE]AFP-EGFP/PEI-Fe₃O₄ 转染 HepG2 细胞电镜图和 EGFP 表达效率

Fig. 5 TEM image and EGFP expression rate of HepG2 cells transfected by p[5HRE]AFP-EGFP/PEI-Fe₃O₄

Note: HepG2 cells were transfected with p[5HRE]AFP-EGFP/PEI-Fe₃O₄ and nanoparticles; DNA mass ratio was 10:1;

A: At post transfection 24 h, nanoparticles clusters enveloped by HepG2 cells in the TEM image (shown by black arrows(20 000 ×) ;

B: At post transfection 48 h, the expression of EGFP in HepG2 cells visualized under an inverted fluorescence microscope(40 ×) ;

C: 97.45% of HepG2 cells expressing EGFP counted by flow cytometry

表2 HepG2 细胞经不同处理后 MTT 试验光密度以及增殖抑制率($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Optical density (D) and inhibition rates of HepG2 cells with different treatments ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	D_{492}	IR(%)
Negative control	1.377 ± 0.045	-
Nanoparticles control	1.288 ± 0.036 *	6.00
Hyperthermia	0.892 ± 0.023	35.22
Gene therapy	0.786 ± 0.047	42.92
Gene therapy combined with hyperthermia	0.329 ± 0.050 * *	76.11

* $P > 0.05$ vs negative control group; ** $P < 0.01$ vs the other four groups;

3 讨论

肿瘤的发生和发展是一个多因素、多步骤和多基因参与的复杂过程,其中抑癌基因失活和(或)癌基因激活是最基本的分子要素^[12]。Chen 等^[13]用基因芯片发现在肝癌和非肝癌组织中有 1 640 个以上基因表达明显不同,认为 $p53$ 是细胞癌变过程中最重要的抑癌基因,其下游靶基因包括涉及细胞周期、凋亡、分化、DNA 修复、化学应激和免疫监控等调控基因。

但是临床基因治疗仍然面临很多障碍,其中安全性是最大的问题。基因治疗是将治疗效应限定在特定的靶细胞、组织和器官内,不伤害其他正常细胞、组织和器官^[14]。运用特定的基因表达调控元件或肿瘤特异性启动子介导的基因,通过控制治疗基因只在肿瘤细胞内表达,可提高基因治疗的靶向性^[15-16]。

本研究用甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)启动子介导下游治疗基因表达,实现肝癌细胞的靶向性基因治疗。AFP 是一种大分子糖蛋白,主要由胎儿肝细胞和卵黄囊产生,出生后 AFP 的合成逐渐停止。但是当肝细胞癌变时,可以激活 AFP 基因,重新产生大量 AFP^[17]。AFP 阳性肝癌患者约占肝细胞癌患者的 2/3。分子生物学研究表明癌组织 AFP mRNA 检出率高于癌旁组织^[18]。

人类 AFP 基因的转录受控于其 5' 侧翼序列的调控区域,这个区域高度保守,含有转录因子的特异结合序列,即启动子、增强子和沉默子区域,使 AFP 基因转录得到精确调控^[19]。Ido 等^[20]证明 AFP 启动子介导的抑癌基因可杀伤 AFP 阳性肝癌细胞。

AFP 基因在转录水平的活化是绝大部分肝细胞癌的特征性表现,以 AFP 启动子介导下游基因表达从而在转录水平实现靶向性基因治疗在大部分肝细胞癌患者是可行的。本研究使用的 0.3 kb AFP 启动子核心序列紧位于 AFP 基因上游 300 bp 区域,用野生型抑癌基因 $p53$ 序列插入此启动子下游,构建肝癌靶向基因治疗质粒 p[5HRE]AFPp- $p53$ 。

基因治疗中,载体能否安全、有效地将基因运送到指定位点是能否临床应用的关键所在。基因载体主要分两类:病毒型载体和非病毒型载体。病毒型载体最大的优点是转染率高,可达 90% 以上。但是病毒型载体制备复杂,基因运载量有限,还存在安全隐患,如潜在的致病性、免疫原性及可导致插入基因融合而激活癌基因等缺陷,使病毒型载体的应用受到很大限制^[21]。非病毒型载体,尤其纳米颗粒载体在治疗基因运载方面显示很大优势。纳米量级(1 ~ 100 nm)的载体能穿过组织间隙并被细胞吸收。其具有的无免疫原性、无致瘤性、无毒或极低毒性、运载量受限小、制备简单、易与 DNA 结合、不受 DNA 片段大小限制和通过靶向修饰可以转运 DNA 到靶细胞等优点,很大程度上弥补了病毒型载体的缺陷^[22]。本研究制备的磁性纳米颗粒 PEI- Fe_3O_4 和重组质粒 p[5HRE]AFPp- $p53$ 以质量 10:1 结合时,形成的 p[5HRE]AFPp- $p53$ / PEI- Fe_3O_4 复合纳米粒子的粒径最小,表面带正电荷较大,可有效转染治疗基因,转染后基因表达率达 97.45%。本实验结果显示, p[5HRE]AFPp- $p53$ / PEI- Fe_3O_4 磁性纳米颗粒对 HepG2(AFP 阳性)和 SMMC7721(AFP 阴性)肝癌细胞增殖抑制率分别为 43.73% 和 24.23%,对 LOVO 结肠癌细胞和 L929 成纤维细胞的增殖抑制率均为 0。提示 p[5HRE]AFPp- $p53$ / PEI- Fe_3O_4 磁性纳米颗粒是靶向性特异杀伤肝癌细胞,对正常细胞无伤害。

磁性纳米颗粒作为治疗基因的载体,其特有的磁响应性不仅可通过体外磁场定位增加治疗基因运送的靶向性,而且能在交变磁场中将磁能转化为热能,实现肿瘤局部可控升温,达到 41 ~ 46 °C,对肿瘤细胞进行“细胞内热疗”,提高局部血供和血管通透性,促进局部组织对氧分子吸收,改变肿瘤细胞微环境缺氧状态,增加疗效。本研究用磁性纳米颗粒 PEI- Fe_3O_4 单独磁流体热疗、p[5HRE]AFPp- $p53$ / PEI- Fe_3O_4 复合纳米粒子单独基因治疗和 p[5HRE]AFPp- $p53$ / PEI- Fe_3O_4 复合纳米粒子 + 磁性纳米颗粒 PEI- Fe_3O_4 的基因治疗结合磁流体热疗治疗 HepG2 肝癌细胞抑制率分别为 35.22%、42.92% 和

76.11%。基因治疗联合磁流体热疗抑制肝癌细胞增殖显著高于单独磁流体热疗和单独基因治疗 ($P < 0.01$)。

综上所述,本研究用 p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒作治疗基因载体对肝癌细胞进行靶向基因治疗和磁流体热疗,能精确地特异性识别肝癌细胞,减少对周围组织的损伤,减少治疗的毒副作用,并显著增强有效杀伤肝癌细胞的能力,提高治疗的安全性和有效性,为临床失去手术机会的晚期肝癌患者提供新的治疗思路和实验数据。

[参 考 文 献]

- [1] MAZZANTI R, GRAMANTIERI L, BOLONDI L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspect [J]. *Mol Aspects Med*, 2008, 29(1/2): 130-143. PMID: 18061252.
- [2] STEWARD B W, KLEIHUES P. World cancer report [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2003, 1-315.
- [3] 陈建国, 宋新明. 中国肝癌发病水平的估算及分析 [J]. *中国肿瘤*, 2005, 14(1): 28-31. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0242.2005.01.009.
- [4] SANGRO B, MAZZOLINI G, RUIZ M, et al. A phase I clinical trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(12): 837-843. DOI:10.1038/cgt.2010.40.
- [5] SMERDON C, MENNEE S, HERNANDEZ-ALCOCEBA R, et al. Gene therapy for HCV/HBV-induced hepatoma carcinoma [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2010, 11(12): 1368-1377.
- [6] VASSAUX G, MARTIN-DUQUE P. Use of suicide genes for cancer gene therapy: study of the different approaches [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(4): 519-530. DOI: 10.1517/14712598.4.4.519.
- [7] FAMEBO M, BYKOV V J, WIMAN K G. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20: 57-62. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.02.152.
- [8] TANAKA T. Mechanisms of cellular senescence by tumor suppressor p53 [J]. *Nihon Rinsho*, 2011, 69(10): 1891-1900. DOI: org/10.3143/geriatrics.48.134.
- [9] LIM S O, KIM H, JUNG G. p53 inhibits tumor invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584: 2231-2236. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.04.006.
- [10] OHNISHI T. The role of the p53 molecule in cancer therapy with radiation and/or hyperthermia [J]. *J Cancer Res Ther*, 2005, 1(3): 147-150. DOI:org/10.4103/0973-1482.19594.
- [11] LAURENY S, DUTZ S, HAFELI U O, et al. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2011, 166(1/2): 8-23. DOI: 10.1016/j.cis.2011.04.003.
- [12] KIM H A, NAM K, LEE M, et al. Hypoxia/hepatoma dual specific suicide gene expression plasmid delivery using bio-reducible polymer for hepatocellular carcinoma therapy [J]. *J Control Release*, 2013, 171(1): 1-10. DOI:10.1016/j.jconrel.2013.06.033.
- [13] CHEN X, CHEUNG S T, So S, et al. Gene expression patterns in human liver cancers [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(6): 1929-1939. DOI: 10.1091/mbc.02-02-0023.
- [14] JAZWAA, FLORCZYK U, JOZKOWICZ A, et al. Gene therapy on demand: site specific regulation of gene therapy [J]. *Gene*, 2013, 525(10): 229-238. DOI:10.1016/j.gene.2013.03.093.
- [15] DANDA R, KRISHNAN G, GANAPATHY K, et al. Targeted expression of suicide gene by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer gene therapy [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e83398. DOI: 10.1371/journal.pone.0083398.
- [16] DORER D E, NETTELBECK D M. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7/8): 554-571. DOI:org/10.1016/j.addr.2009.03.013.
- [17] CANTABONI A, SIRONI M, TACCAGNIGL, et al. Immunohistochemical study of the appearance of some markers in liver adjoining hepatocellular carcinoma [J]. *Basic Appl Histochem*, 1986, 30(2): 165-172.
- [18] 胡成进, 杨道理, 李劲松, 人干细胞癌中 AFP 基因的表达 [J]. *中国肿瘤临床*, 1998, 25(5): 341-342.
- [19] IGARASHIK, AOYAGI Y, OHKOSHI S, et al. Sequence analysis of the proximal promoter region of the human alpha-fetoprotein gene in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 1994, 76(2/3): 93-99. DOI: org/10.1016/0304-3835(94)90383-2.
- [20] IDO A, UTO H, MORIUCHI A, et al. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to human α -fetoprotein promoter [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 3016-3021. Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 12, 2015.
- [21] SUM C H, WETTIG S, SLAVCEV R A. Impact of DNA vector topology on non-viral gene therapeutic safety and efficacy [J]. *Curr Gene Ther*, 2014, 14(4): 309-329. DOI: org/10.2174/1566523214666140612154929.
- [22] YIN H, KANASTY RL, ELTOUKHY A A, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(8): 541-555. DOI:10.1038/nrg3763.

[收稿日期] 2015 - 10 - 10

[修回日期] 2015 - 12 - 22

[本文编辑] 阮芳铭