

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.011

· 基础研究 ·

## 磁性纳米颗粒 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 介导靶向自杀基因联合磁流体热疗对肝癌移植瘤的抑制作用

袁晨燕, 安艳丽, 王玲(东南大学附属中大医院 检验中心, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** **目的:** 探讨磁性纳米颗粒 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 介导靶向自杀基因联合磁流体热疗对肝癌移植瘤的特异性杀伤作用。**方法:** 亚克隆基因重组法构建靶向肝癌的自杀基因 p[HRE]AFP-HSVTK 和肿瘤细胞成像报告基因载体 p[HRE]AFP-Luc, 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。共沉淀法制备 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒并以聚乙烯亚胺 (PEI) 修饰后得到磁性纳米颗粒 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI, 将其作为肿瘤基因治疗的载体和磁流体热疗的介质, 并利用透射电镜、粒径仪、傅里叶转换红外光谱等对 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 进行表征鉴定。利用小动物活体成像仪检测 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 系统运送报告基因 p[HRE]AFP-Luc 至荷瘤裸鼠后的生物发光信号。p[HRE]AFP-HSVTK/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 作用于肝癌细胞后, 以 MTT 法检测细胞增殖抑制率, 流式细胞仪检测凋亡细胞比例, 动物实验验证体内肿瘤生长速度及瘤体质量抑制效果, 并用透射电镜分析肿瘤组织的亚细胞结构。**结果:** 成功构建磁性纳米颗粒 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 以及重组载体 p[HRE]AFP-HSVTK 和 p[HRE]AFP-Luc, 经尾静脉注射 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 运送的 p[HRE]AFP-Luc 后, 活体成像系统显示仅能在裸鼠肿瘤组织检测到明显的成像信号, 其主要器官病理组织分析无明显病理损伤。在体外肿瘤细胞杀伤试验中, 联合治疗组细胞增殖抑制率分别高于磁流体热疗组和基因治疗组 [(76.02±7.33)% vs (42.31±4.28)%、(47.76±4.81)%], 均  $P < 0.05$ ], 联合治疗组瘤细胞的凋亡率高于单独热疗组和基因治疗组 [(34.05±3.41)% vs (14.41±1.55)%、(11.64±1.20)%], 均  $P < 0.01$ 。体内治疗实验显示, 联合治疗组移植瘤体积增长明显减慢甚至下降, 瘤块质量显著小于其他单独治疗组 ( $P < 0.05$ ); 瘤块细胞亚结构出现明显的凋亡形态。**结论:** 自杀基因 p[HRE]AFP-HSVTK 对肝癌细胞具有选择性杀伤作用, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 可以作为有效的基因治疗载体和磁流体热疗的介质, 其介导的肝癌靶向治疗联合磁流体热疗能特异地抑制肝癌移植瘤。

**[关键词]** 磁性纳米颗粒; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI; 靶向基因治疗; 磁流体热疗; 联合治疗

**[中图分类号]** R73-36<sup>+</sup>2; R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-0913-07

## Magnetic nanoparticles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI induced targeted suicide gene therapy combined with magnetic fluid hyperthermia on hepatoma xenograft

YUAN Chenyan, AN Yanli, WANG Ling (Inspection Center, Affiliated Zhong Da Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the specific killing effect of magnetic nanoparticles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI induced targeted suicide gene therapy combined with magnetic fluid hyperthermia on hepatoma xenograft. **Methods:** The suicide gene targeting hepatoma p[HRE]AFP-HSVTK and tumor cell imaging reporter gene vector p[HRE]AFP-Luc were constructed by sub-cloning gene recombination method, and tested by restriction endonuclease gel electrophoresis. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nano-particles were prepared by co-precipitation method and modified by Polyethyleneimine (PEI) to obtain the magnetic nano-particles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI, which could be used as carrier for tumor gene therapy and a medium for magnetic fluid hyperthermia treatment; and the characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI was identified by transmission electron microscopy, particle size analyzer and Fourier transform infrared spectroscopy. The reporter genes p[HRE]AFP-Luc were delivered into the nude mice bearing xenografts via tail vein by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI, then the bioluminescence signals of mice were observed in an IVIS system. After the treatment of p[HRE]AFP-HSVTK/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI, the tumor cell inhibition rate was examined by MTT assay, the cell apoptosis was tested by Flow cytometry, the *in vivo* tumor development rate and tumor inhibition rate was tested by animal experiment, and the sub-cellular construction of tumor cells was observed by Transmission electron microscopy. **Results:** Nano-particles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI and recombinant vectors p[HRE]AFP-HSVTK and p[HRE]AFP-Luc were successfully constructed; after tale vein injection, image signals were detected only in tumor tissues via IVIS system, but no obvious pathologic damage in other major organs. In the *in vitro* cell killing test, the cell proliferation inhibition rate and the cell apoptosis rate in combination group was higher than that in hyperthermia treatment group and

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目资助 (No.81501525)。Project supported by the Youth Project of National Natural foundation of China (No.81501525)

**[作者简介]** 袁晨燕 (1979-), 女, 博士, 副主任技师, 主要从事生物纳米材料的制备及肿瘤治疗的研究, E-mail: sesame\_yuan@126.com

gene treatment group [inhibition rate: (76.02±7.33)% vs (42.31±4.28)%, (47.76±4.81)%, all  $P<0.05$ ; apoptosis rate: (34.05±3.41)% vs (14.41±1.55)%, (11.64±1.20)%, all  $P<0.01$ ]. The *in vivo* treatment showed that tumor volume development significantly slowed-down and even decreased in combination treatment group, and the tumor mass were significantly smaller than those of the single treatment groups (all  $P<0.05$ ); and the tumor cell sub-cellular structure showed obvious apoptotic morphology. **Conclusion:** the suicide gene p[HRE]AFP-HSVTK has specific killing effect on hepatoma cells, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI can be used as effective gene treatment carrier and media of magnetic hyperthermia treatment; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI mediated target treatment combined with magnetic fluid hyperthermia treatment could specifically inhibit the hepatoma xenograft.

**[Key words]** magnetic nanoparticles; targeted-gene therapy; magnetic inducing heating; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(9): 913-919. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.011]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的恶性肿瘤, 全世界每年有 60 万~100 万人死于 HCC。我国是 HCC 的高发国家, 每年发病率超过 30.3/10 万人<sup>[1-3]</sup>。HCC 恶性程度高、进展快, 其中能手术治疗的不足 10%, 而传统治疗方法缺乏肿瘤特异性, 对无法手术的肿瘤不能有效控制。德国学者 JORDAN 等<sup>[4]</sup>提出磁流体热疗法, 认为纳米磁流体在交变磁场中能将电能转化为热能, 从而局部加热并杀伤肿瘤细胞, 为肿瘤治疗提供一条新途径。磁性纳米颗粒即能在交变磁场中可控升温, 同时又能作为基因载体对肿瘤进行基因治疗<sup>[5-6]</sup>。本课题组<sup>[7]</sup>在前期的体外细胞实验中证实, 磁性纳米颗粒携带肿瘤特异性抑癌基因作用于 HCC, 可以产生磁流体热疗和细胞治疗的协同效应。但是此治疗体系是否能在体内特异有效地治疗 HCC, 还有待动物试验进一步验证。为了检测治疗体系的靶向性, 本实验采用 HCC 特异的 AFP 启动子和乏氧增强序列共同引导虫荧光素酶基因, 以磁性纳米颗粒作为基因载体将其运送至动物体内, 在体荧光素酶的表达实验中检测到肿瘤特异性的发光信号, 并利用动物模型进行了体内基因治疗和磁流体热疗联合抑癌试验, 结果显示磁性纳米颗粒携带肿瘤特异的治疗基因, 是一种有效安全、具有应用前景的肿瘤治疗方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

HCC 细胞系 HepG2 (AFP 表达阳性) 购自中科院上海细胞研究所。DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco-Invitrogen 公司, FeCl<sub>3</sub>、FeCl<sub>2</sub> 及聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 等化学试剂购自美国 Sigma 公司, 所用试剂均为分析纯。丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 购自福安药业集团庆余堂制药有限公司, Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司, 自杀基因的载体 pCDNA-HSVTK 购自长沙赢润生物公司。透射电镜为日本 JEOL 公司的 JEM-200CX 型, 扫描电镜 S-3400N II 型产自日本 Hitachi 公司, 傅里叶转换红外光谱仪为美

国 NICOLET 公司的 NEXUS870 型, Zeta 电位分析使用美国 Brookhaven 公司的电位仪, X 线衍射使用瑞典 ARL 公司的 X' TRA 型衍射仪, 体内生物发光成像使用美国 Xenogen 公司的 IVIS 成像系统, FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

### 1.2 磁性纳米颗粒制备和表征

共沉淀法制备 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒, FeCl<sub>3</sub> 和 FeCl<sub>2</sub> 以 5:3 置于反应体系中, 50 °C、pH 值 (9.5±0.1), N<sub>2</sub> 保护下反应 30 min, 得到 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒。去离子水清洗后的磁性纳米颗粒在草酸溶液 (5 g/L) 中超声分散 60 min 表面修饰负电荷, 清洗重悬后, 滴入 20% PEI 溶液 2.0 ml, 得到表面修饰 PEI 的磁性纳米颗粒 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI。用扫描电镜的能谱分析磁性纳米颗粒的成分, X 线衍射仪分析其晶体结构, 并在透射电镜下观察 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 和 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 的形态, 用 Zeta 电位分析仪测定 PEI 修饰前后磁性纳米颗粒的表面电位, 傅里叶转换红外光谱仪分析其表面化学基团在 PEI 修饰前后的变化。

### 1.3 构建重组载体

将本实验室前期制备的重组载体 pCDNAa-AFPp-p53 和含有自杀基因的载体 pCDNA-HSVTK 分别用 EcoRI 和 XbaI 双酶切, 回收酶切载体 pCDNA-[HRE]AFPp 和自杀基因片段 HSVTK, 在 T4 连接酶作用下合成由 AFP 启动子和乏氧序列 HRE 介导的肝癌特异性表达自杀基因重组载体 p[HRE]AFP-HSVTK。再以酶切位点 HindIII 和 XbaI 插入来自质粒 pGL3-Basic 的荧光素酶基因 Luciferase, 制备 HCC 肿瘤特异性表达的报告基因载体 p[HRE]AFP-luc。重组质粒均用酶切电泳验证插入片段的位置, 并测序分析插入片段序列是否正确。

### 1.4 荷瘤裸鼠模型的建立

动物实验在东南大学医学院的动物实验中心的无菌屏障系统中进行, 实验操作符合江苏省动物保护协会的相关规定, 由持动物试验上岗证的专业操作人员进行。实验所用动物为健康的 BALB/c 雄性裸鼠 (实验动物合格证号 2008001639607), 4 周龄, 体质量 18~20 g。在每只裸鼠后肢皮下注射指数

生长期的肝癌肿瘤细胞 HepG2 ( $2 \times 10^6$  个), 构建移植瘤动物模型, 在移植瘤直径达到 0.5 cm 时开始进行体内实验。

### 1.5 以活体成像系统中检测 p[HRE]AFP-luc 在裸鼠移植瘤内的特异性表达

将磁性纳米颗粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$ 和质粒 p[HRE]AFP-luc 以 1:10 质量比混合成治疗注射液, 在室温下静止 30 min 后使用。每只荷瘤裸鼠经尾静脉注射 100  $\mu\text{l}$ , 对照组尾静脉注入 100  $\mu\text{l}$  生理盐水。注射后 7 d, 进行裸鼠报告基因体内成像实验。成像前, 每只裸鼠腹腔内注射浓度为 15 mg/ml 荧光素酶底物 D-luciferin 钠盐 25  $\mu\text{l}$ , 10 min 后以活体成像 IVIS 系统中检测荷瘤裸鼠体内生物发光信号。注射 21 d 后处死裸鼠, 取主要脏器制作病理切片, H-E 染色后观察有无明显的病理改变。

### 1.6 体外联合抑瘤实验

在体外细胞抑瘤实验中, 将 HepG 细胞接种至 96 孔培养板, 细胞分为 4 个试验组: (1) 阴性对照组, 细胞常规培养 72 h 不做其他处理; (2) 单独磁流体热疗组, 细胞移去培养液后加入含有磁性纳米颗粒终浓度为 1 mg/ml 的细胞培养液, 置于交变磁场中 ( $f=230$  kHz,  $I=30$  A) 60 min, 然后去除磁性纳米颗粒, 用 PBS 缓冲液清洗数次后, 细胞继续培养 72 h; (3) 单独自杀基因治疗组, 将磁性纳米颗粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和治疗基因 p[HRE]AFP-HSVTK 按照质量比 10:1 混合于不含血清的 DMEM 细胞培养液中, 每孔转染复合物中含有磁性纳米颗粒 40  $\mu\text{g}$ , 重组质粒 4  $\mu\text{g}$ , 转染 24 h 后去除转染溶液。在细胞培养液中, 加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 GCV 持续培养 48 h; (4) 磁流体热疗联合基因治疗组, 细胞转染自杀基因后加入含有磁性纳米颗粒浓度为 1 mg/ml 的细胞培养液, 置于交变磁场中 ( $f=230$  kHz,  $I=30$  A) 60 min, 然后去除磁性纳米颗粒, 用 PBS 缓冲液清洗数次, 后加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 GCV 细胞培养液, 持续培养 48 h, 每组细胞各有 8 个重复管。以上 4 组细胞不同方法处理 72 h 后, 以 MTT 法检测细胞增殖情况, 由一下公式计算细胞增殖抑制率:

$$IR(\%) = (1 - A/B) \times 100\%$$

A 代表实验组细胞的光密度 ( $D$ ) 值, B 代表阴性对照细胞的  $D$  值。同时对各组细胞进行 A-V/PI 双染色, 凋亡细胞仅能被 A-V 标记, 由 A-V 和 PI 双标记的为坏死细胞, 在流式细胞仪上检测凋亡细胞比例。

### 1.7 体内联合抑瘤实验

选用移植瘤直径达到 0.5 cm 的模型裸鼠, 分为 4 组, 每组 5 只裸鼠: (1) 对照组: 裸鼠移植瘤内注射生

理盐水; (2) 热疗组: 瘤块内注射 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$ 磁性纳米颗粒 (1 mg/cm<sup>3</sup> 瘤块); (3) 基因组: 尾静脉注射携带治疗基因的磁性纳米颗粒 100  $\mu\text{l}$ , 其中含有 10  $\mu\text{g}$  肝癌特异性自杀基因质粒 p[HRE]AFP-HSVTK 和 100  $\mu\text{g}$  磁性纳米颗粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$ , 注射 48 h 后裸鼠腹腔注射 50 mg/ml 的 GCV 溶液 (30 mg/kg); (4) 联合组: 基因治疗方法同基因组, 于注射磁性纳米颗粒当日、第 3 和 6 天, 分别以异戊烷麻醉动物后将其置于高频磁场中 ( $f=230$  kHz,  $I=30$  A) 进行磁流体热疗 60 min。热疗中, 每间隔 5 min 使用红外测温仪检测裸鼠移植瘤体温度和直肠温度, 并绘制升温曲线。所有裸鼠培养 4 周, 每周用游标卡尺测定瘤块的长短径, 按以下公式计算瘤块体积, 绘制小鼠在体瘤块体积-时间曲线:  $V=AB^2\pi/6$

V: 瘤块的体积, A: 代表瘤块的长径, B: 代表瘤块的短径。4 周后处死裸鼠, 取瘤块, 分组称重拍照。联合治疗组瘤块制备电镜切片, 在透射电镜下观察各组瘤块亚细胞结构的改变。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计学软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用泊松分布及 ANOVA 方差分析作组间均数比较, 率的比较采用卡方检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$ 磁性纳米颗粒的表征

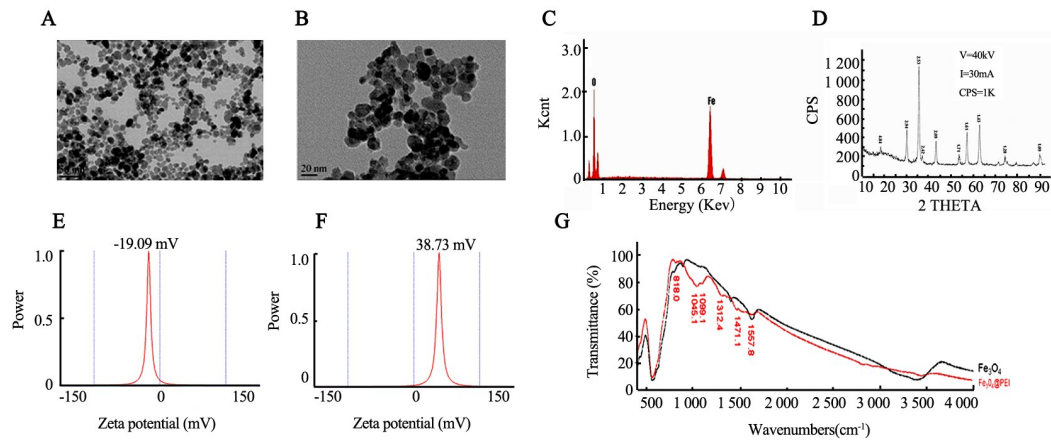
透射电镜下 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 呈球形, 颗粒均匀, 分散性较好, 粒径在 20 nm 左右 (图 1A); 经 PEI 修饰后粒径大小和形态基本保持不变 (图 1B)。能谱分析结果 (图 1C) 显示,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒主要元素是 Fe 和 O。X 衍射分析结果 (图 1D) 显示, 各衍射峰所对应的面间距符合典型的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  尖晶石结构 (powder diffraction file, PDF 19.629)。对  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$  进行表面电荷分析结果 (图 1E) 显示,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒表面电位为  $(-19.09 \pm 2.09)$  mV, 经 PEI 修饰后表面电位转为正值  $(38.73 \pm 0.29)$  mV (图 1F)。傅里叶转换红外光谱结果 (图 1G) 显示, 与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  相比,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$  纳米颗粒表面显示 PEI 特征性基团的谱峰。

### 2.2 成功构建肝癌细胞特异性表达重组质粒

经限制性内切酶琼脂凝胶电泳分析显示, 肝癌细胞特异性表达的自杀基因载体 p[HRE]AFP-HSVTK 质粒 (图 2A) 构建成功; 其中杂合启动子 [HRE] AFPp 片段大小正确 (453 bp), 插入位置正确 (图 2B); 自杀基因 HSVTK 片段大小正确 (1 194 bp), 插入位置也正确 (图 2C); 重荧光素酶报告基因载体 p

[HRE]AFP-HSVTK 图谱及其报告基因 luciferase 片段大小和插入位置也正确(图 3d、e)。表明以上 2 个重

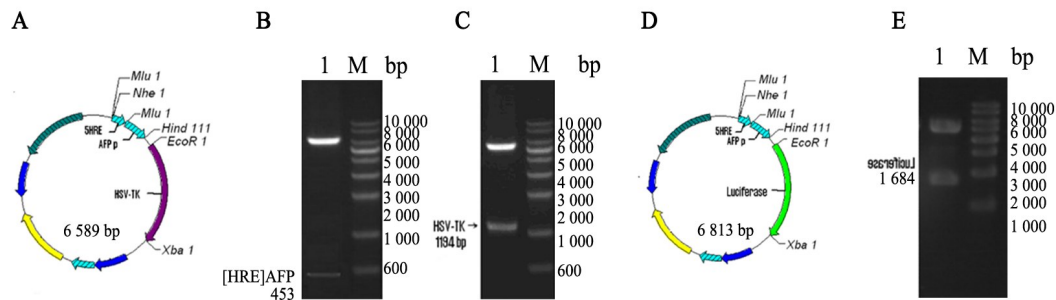
组质粒经测序分析, 序列正确, 无碱基突变。



A:  $Fe_3O_4$  nanoparticles observed by Transmission electron microscopy( $\times 100$ ); B:  $Fe_3O_4@PEI$  nanoparticles observed by Transmission electron microscopy; C: Energy spectrum of  $Fe_3O_4$  nanoparticles; D: X diffraction pattern of  $Fe_3O_4$  nanoparticles, a typical structure of iron oxide spinel; E: The surface zeta potential of  $Fe_3O_4$  nanoparticles; F: The surface zeta potential of  $Fe_3O_4@PEI$  nanoparticles; G: Fourier transform infrared spectroscopy of  $Fe_3O_4$  and  $Fe_3O_4@PEI$  nanoparticles

图1  $Fe_3O_4$ 和  $Fe_3O_4@PEI$ 磁性纳米颗粒的表征

Fig. 1 Characterization of  $Fe_3O_4$  and  $Fe_3O_4@PEI$  magnetic nanoparticles



A: Plasmid map of p[HRE]AFP-HSVTK; B: Lane M: DNAmarker, Lane 1: p[HRE]AFP-HSVTK was digested by restriction endonuclease NheI and HindIII, then agar gel electrophoresis, release of heterozygous promoter [HRE]AFPp of 453 bp fragment; C: Lane M: DNAmarker, Lane 1: p[HRE]AFP-HSVTK was digested by restriction endonuclease EcoRI and XhoI, then agar gel electrophoresis, the suicide gene HSV-TK and D: p[HRE]AFP-luc plasmid map with a release fragment of 1 194 bp were obtained; E: Lane M: DNAmarker, Lane 1: p[HRE]AFP-luc was digested by restriction endonuclease HindIII EcoRI and XhoI after agarose gel electrophoresis, The gene luciferase with a release fragment of 1 684 bp

图2 肝癌细胞特异性表达重组质粒的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid specifically expresses hepatoma cells

### 2.3 $Fe_3O_4@PEI$ 磁性纳米颗粒运载质粒 p[HRE] AFP-luc 提高在裸鼠肝癌移植瘤细胞内特异性表达

荷瘤裸鼠注射运载质粒 7 d 后, 以 IVIS 动物活体成像仪检测裸鼠全身的荧光素酶自发光成像信号, 结果(图 3)显示, 仅在移植瘤处检测到明显的生物发光信号,  $Fe_3O_4@PEI$  磁性纳米颗粒可以通过全身注射后有效运载质粒在瘤细胞内表达, 且 p[HRE]AFP-luc 仅在裸鼠移植瘤内表达。21 d 后取主要脏器做组织病理切片 HE 染色后观察, 心、肝、脾、肺和肾均未见明显病理异常和损伤(图 4), 进一步证明短期内系统注射纳米颗

粒/靶向基因对裸鼠主要脏器没有明显的损伤。

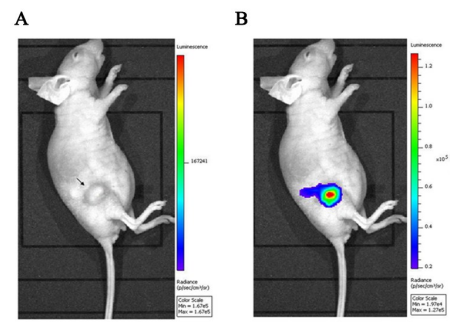
### 2.4 磁流体热疗联合基因治疗明显提高对 HepG2 细胞的杀伤效应

MTT 法检测结果显示, 处理 72 h 时, 联合组 HepG2 细胞增殖抑制率明显高于热疗组和基因组 [(76.02 $\pm$ 7.33)% vs (42.31 $\pm$ 4.28)%、(47.76 $\pm$ 4.81)%], 均  $P < 0.05$ 。流式细胞术检测结果(图 5)显示, 联合组 HepG2 细胞凋亡率明显高于热疗组和基因组 [(34.05 $\pm$ 3.41)% vs (14.41 $\pm$ 1.55)%、(11.64 $\pm$ 1.20)%], 均  $P < 0.01$ 。流式细胞术与 MTT 法检测结果相符, 表明

热疗联合靶向基因治疗对肝癌细胞具有显著的协同杀伤作用。

2.5 磁流体热疗联合基因治疗明显提高对裸鼠移植瘤的抑制作用

将荷瘤模型裸鼠在肿瘤直径达到 0.5 cm 时, 磁流体热疗裸鼠试验中进行了活体升温试验, 在交变磁场中, 瘤块内温度在最初的 25 min 内升高了 7 °C 左右, 到达有效治疗温度 44 °C, 并在随后的 30 min 热疗中保持基本稳定, 而裸鼠直肠温度没有改变(图 6)。治疗过程中, 联合组的肿瘤体积增加最慢, 后期甚至有所下降, 瘤块质量明显小于其他组(图 7)。电镜下联合组肿瘤组织亚细胞结构多呈现凋亡的典型形态, 表现为染色质浓缩边聚、凋亡小体形成和胞质空泡形成(图 8)。



A: Before the signal acquisition, the black arrow refers to the transplanted tumor of liver cancer in nude mice;  
B: Specific bioluminescence imaging of xenografts  
图3 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 运送 p[HRE]AFP-luc 至全身后裸鼠活体生物发光成像

Fig. 3 Bioluminescent imaging of nude mice after Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI delivering p[HRE]AFP-luc to whole body

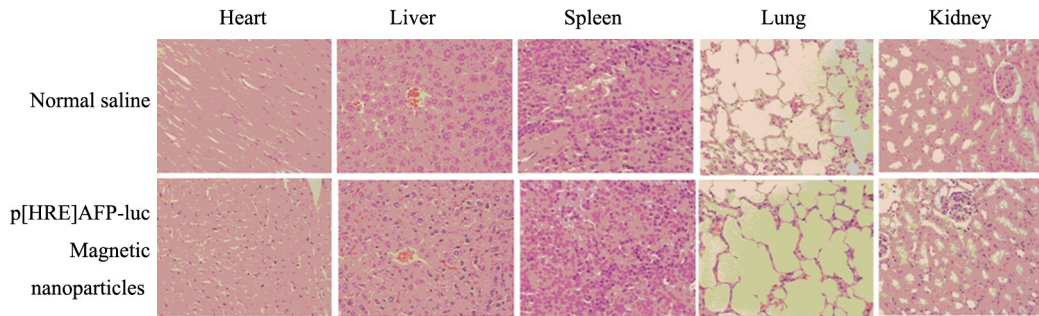
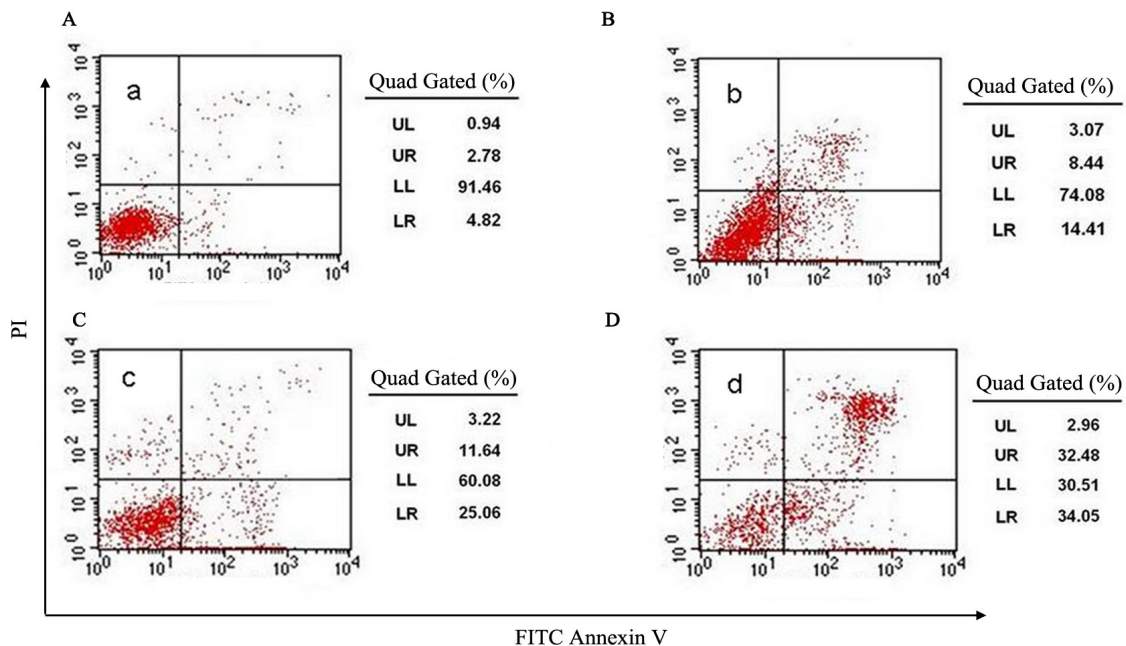


图4 尾静脉注射磁性纳米颗粒和靶向载体后裸鼠主要脏器组织病理(×40)

Fig. 4 Histopathological analysis of main organs in nude mice after injection of magnetic nanoparticles and targeting carriers (×40)



A: Control group; B: Hyperthermia group; C: Genome; D: Combined group.

图5 联合组 HepG2 细胞凋亡率明显提高

Fig.5 Apoptosis rate of HepG2 cells increased significantly in combined group

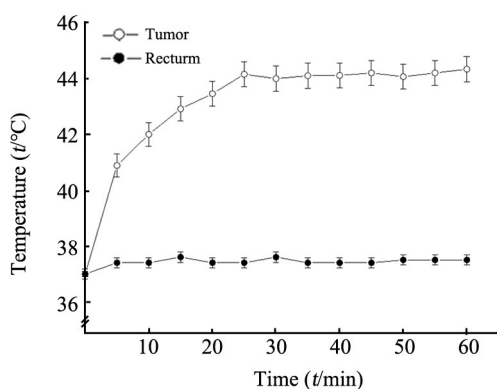


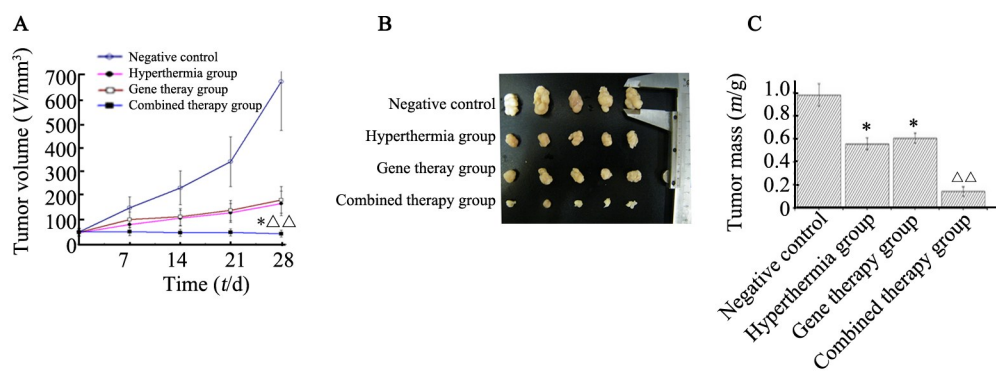
图6 磁流体热疗( $f=230\text{ kHz}$ ,  $I=30\text{ A}$ )时荷瘤裸鼠直肠和瘤体内的温度-时间曲线

Fig. 6 Temperature-time curve of the rectum and tumor of nude mice during magnetic fluid hyperthermia ( $f=230\text{ kHz}$ ,  $I=30\text{ A}$ )

### 3 讨论

抗病毒药物 GCV 本身对哺乳动物细胞无毒害, 但其能被单纯疱疹病毒腺苷激酶 (herpes simplex vi-

rus thymidine kinase, HSV-TK) 磷酸化, 而这种磷酸产物可抑制细胞 DNA 合成从而导致细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本研究使用 AFP 启动子可以介导下游 HSV-TK 仅在肝癌细胞内表达<sup>[9-11]</sup>, 所以 GCV 不会损伤正常组织细胞。使用虫荧光素酶基因 luciferase 作为报告基因可以敏感地检测活体内特异的生物发光信号<sup>[12-14]</sup>。本实验以磁性纳米颗粒作为基因载体, 将 AFP 引导的重荧光素酶基因载体 p[HRE]AFP-luc 经尾静脉注入小鼠体内, 仅在移植瘤中检测到生物发光信号, 证明动物体内  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$  磁性纳米颗粒能有效的运送基因到达肿瘤, AFP 引导的下游基因可以选择性的仅在肿瘤细胞内表达, 并且对其他脏器没有产生明显的毒副作用。热疗通常是肿瘤局部升温至  $40\sim 43^\circ\text{C}$  以杀伤肿瘤细胞, 是一种非常有前景的治疗手段, 加热可以改善肿瘤局部微环境, 增加肿瘤部位的血供, 提高免疫细胞在肿瘤组织中的浸润, 增加其对化疗等其他治疗方法的敏感性<sup>[15-17]</sup>。

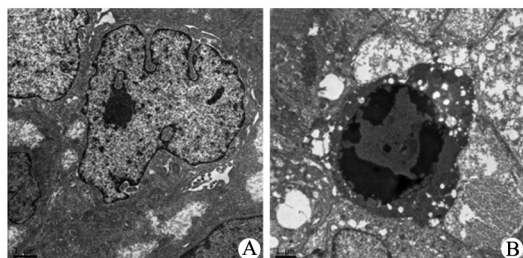


\* $P<0.05$  vs Hyperthermia or Gene therapy group,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs Control group

A: Volume time curve of xenografts in nude mice; B: Tumor morphology in different treatment groups; C: Mass of tumor lump in different treatment groups

图7 联合组裸鼠移植瘤不同时间体积和质量的变化

Fig. 7 Changes in volume and mass of transplanted tumor in nude mice in combined group



A: Control group; B: Combined treatment group

图8 联合组移植瘤亚细胞结构透射电镜图( $\times 10\ 000$ )

Fig. 8 Sub-cellular structure of transplanted tumor in combined group by transmission electron microscopy( $\times 10\ 000$ )

近期一项临床试验<sup>[18]</sup>报道, 相比静脉化疗, 腹腔内热灌注联合化疗可以显著提高卵巢癌的无进展生存期和患者的总生存率。在本研究中, 磁流体热疗联合靶向基因治疗对肿瘤细胞的杀伤产生了明显的协同效应, 在体内外的实验中都取得了最大的肿瘤抑制效应。在本实验中, 将不同分组的细胞进行 Annexin-V 和 PI 双荧光染色。正常活细胞中, 磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 位于细胞膜的内侧, 早期凋亡细胞中 PS 翻转到细胞外侧, Annexin-V 与 PS 高亲和力结合而被染色<sup>[19]</sup>, 因此仅能被 Annexin-V 染色是凋亡细胞。本试验结果显示, 联合组凋亡率高于基因组和热疗组, 在体内试验中也观察到的同样

的结果。本实验结果显示,磁性纳米颗粒 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 介导的体内靶向基因治疗和磁流体热疗的联合治疗,能对肿瘤细胞产生特异高效的治疗作用; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 介导的虫荧光素酶报告基因 p[HRE]AFP-luc 在活体肿瘤的特异成像,显示出治疗系统的安全性和靶向性,也为肝癌的早期影像成像提供了一条新的思路。对于肿瘤,现阶段单独的治疗手段多数还不足以实现有效的控制,本治疗系统在肿瘤的联合治疗中显示出一定的应用前景。

### [参考文献]

- [1] OZAKYOL A. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma (HCC epidemiology) [J]. *J Gastrointestinal Cancer*, 2017, 48(3): 238-240. DOI:10.1007/s12029-017-9959-0.
- [2] MAZZANTI R, GRAMANTIERI L, BOLONDI L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects[J]. *Mol Aspects Med*, 2008, 29(1/2): 130-143. DOI:10.1016/j.mam.2007.09.008.
- [3] SMERDOU C, MENNE S, HERNANDEZ-ALCOCEBA R, et al. Gene therapy for HCV/HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2010, 11(12): 1368-1377.
- [4] JOHANNSEN M, THIESEN B, WUST P, et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer[J]. *Int J Hyperthermia*, 2010, 26(8): 790-795. DOI:10.3109/02656731003745740.
- [5] KOLOSNAJ-TABI J, DI CORATO R, LARTIGUE L, et al. Heat-generating iron oxide nanocubes: subtle “destructor” of the tumoral microenvironment[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(5): 4268-4283. DOI:10.1021/nn405356r.
- [6] EL-BOUBBOU K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2018, 13(8): 929-952. DOI:10.2217/nmm-2017-0320.
- [7] 赵成柱, 袁晨燕, 吴国球. p[5HRE]AFPp-p53/PEI-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒联合磁流体热疗对肝癌细胞的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(1): 44-51. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.007.
- [8] WANG Y, CANINE B F, HATEFI A. HSV-TK/GCV cancer suicide gene therapy by a designed recombinant multifunctional vector[J]. *Nanomedicine*, 2011, 7(2): 193-200. DOI: 10.1016 / j. nano. 2010. 08.003.
- [9] KIM K I, CHUNG H K, PARK J H, et al. Alpha-fetoprotein-targeted reporter gene expression imaging in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(27): 6127-6134. DOI:10.3748/wjg.v22.i27.6127.
- [10] YAN C, YANG M, LI Z, et al. Suppression of orthotopically implanted hepatocarcinoma in mice by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with sTRAIL gene expression driven by AFP promoter[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 3035-3043. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.12.037.
- [11] 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/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83398[2018-05-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3877029/>. DOI:10.1371/journal.pone.0083398.
- [12] O'NEILL K, LYONS S K, GALLAGHER W M, et al. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research[J]. *J Pathol*, 2010, 220(3): 317-327. DOI:10.1002/path.2656.
- [13] PARK J H, KIM K I, LEE Y J, et al. Non-invasive monitoring of hepatocellular carcinoma in transgenic mouse with bioluminescent imaging[J]. *Cancer Lett*, 2011, 310(1): 53-60. DOI: 10.1016 / j. canlet.2011.06.013.
- [14] KE B, MA L, KANG T, et al. In vivo bioluminescence imaging of cobalt accumulation in a mouse model[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(8): 4946-4950. DOI:10.1021/acs.analchem.8b00391.
- [15] RAO W, DENG Z S, LIU J. A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors[J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2010, 38(1): 101-116. DOI:10.1615/critrevbiomedeng.v38.i1.80.
- [16] LI M, BU W, REN J, et al. Enhanced synergism of thermo-chemotherapy for liver cancer with magnetothermally responsive nanocarriers[J]. *Theranostics*, 2018, 8(3): 693-709. DOI: 10.7150 / thno. 21297.
- [17] BRÜNINGK S, POWATHIL G, ZIEGENHEIN P, et al. Combining radiation with hyperthermia: a multiscale model informed by in vitro experiments [J]. *J Royal Soc Interfact*, 2018, 15(138): 20170681. DOI:10.1098/rsif.2017.0681.
- [18] CERESOLI M, FRIGERIO L, ANSALONI L. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(14): 1363-1368. DOI:10.1056/NEJMc1802033.
- [19] 赵建夫, 赵凤芝, 陈文慧, 等. CIK 细胞联合贝伐单抗对肝癌 HepG2 细胞的体内外抗肿瘤活性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(4): 404-410. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.012.

[收稿日期] 2018-06-05

[修回日期] 2018-08-11

[本文编辑] 王映红