

# 磁性纳米颗粒介导基因治疗乳腺癌实验研究

韦卫中<sup>1</sup>, 吴 华<sup>2</sup>, 李 芳<sup>3</sup>

Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Mediated Gene Therapy—A Study in Vitro on Breast Cancer

WEI Wei-zhong<sup>1</sup>, WU Hua<sup>2</sup>, LI Fang<sup>3</sup>

1. Department of Nuclear Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Nuclear Medicine, Xiamen First Hospital, Fujian Medical University; 3. Center of Gynecologic Cancer, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

**Abstract :Objective** To study the feasibility of using TRAIL gene to treat breast cancer mediated by PEI coated magnetic iron oxide nanoparticles (polyMA G1000). The therapeutic efficacy was also be evaluated. **Methods** PEI coated magnetic iron oxide nanoparticles were used as gene carrier to transfect TRAIL gene into MCF-7 cells. The polyMA G1000 without TRAIL gene was transfected into the tumor cells as negative control and liposome mediated TRAIL gene transfection was taken as positive control. The apoptosis of cells were detected by TUNEL method. The apoptosis ratio of tumor cells were measured with flow cytometry (FCM). **Results** The apoptosis of cells was demonstrated after transfecting TRAIL gene mediated by both polyMA G1000 and liposome. The apoptosis ratio in the group with polyMA G1000 as gene carrier were  $25.11\% \pm 2.85\%$ , whereas it was  $5.06\% \pm 1.05\%$  in the control group with polyMA G1000 ( $P < 0.01$ ). The lower apoptosis ratio of  $18.31\% \pm 2.44\%$  was showed in the group with liposome as gene carrier ( $P < 0.05$ , compared with the group with polyMA G1000 as gene carrier). **Conclusion** TRAIL gene may induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. The PEI coated magnetic iron oxide nanoparticles may be a potential gene carrier with high transfection efficacy in cancer gene therapy.

**Key words**: Magnetic iron oxide nanoparticles; TRAIL; Breast cancer; Gene therapy

**摘 要**:目的 探讨新型基因载体 PEI 包裹的磁性纳米颗粒 polyMA G1000 介导 TRAIL 基因治疗乳腺癌的可行性,观察 TRAIL 基因转染乳腺癌细胞后的治疗作用。方法 以 polyMA G1000 为基因载体,联结 TRAIL 质粒 DNA 后转染人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞,用 TUNEL 法检测细胞的凋亡,用流式细胞仪检测细胞的凋亡率,以空载体作为阴性对照,脂质体转染 TRAIL 基因作阳性对照。结果 TUNEL 法可见 MCF-7 细胞经 polyMA G1000 和脂质体转染 TRAIL 基因后均可见发生凋亡的细胞,流式细胞仪检测 polyMA G1000 转染的细胞凋亡率为  $25.11\% \pm 2.85\%$ ,脂质体转染的细胞凋亡率为  $18.31\% \pm 2.44\%$  ( $P < 0.05$ )。结论 TRAIL 对乳腺癌细胞 MCF-7 具有凋亡效应,PEI 包裹的磁性纳米颗粒介导的 TRAIL 基因治疗在肿瘤的基因治疗中具有应用前景。

**关键词**:氧化铁磁性纳米颗粒; TRAIL; 乳腺癌; 基因治疗

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)08-0473-03

## 0 引言

肿瘤坏死因子 (TNF) 相关的凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 是 TNF 家族成员中的一员,亦称凋亡素-2 配体 (Apo-2L)。目前多数研究表明<sup>[1]</sup>, TRAIL 只诱导肿瘤细胞和病毒感染细胞而不诱导

正常细胞的凋亡,这一特性为肿瘤治疗提供了新的靶点。近年已有 TRAIL 基因应用于肿瘤基因治疗的报道<sup>[2]</sup>,但 TRAIL 基因治疗多以病毒作为基因导入载体。由于 TRAIL 强大的凋亡活性可能导致病毒包装细胞的凋亡以及病毒载体自身存在许多缺点,寻找新的基因载体非常必要。非病毒型载体具有安全、低毒、装载容量大、操作简单等优势,但最大障碍是转染效率偏低<sup>[3]</sup>。近年来,磁导向的磁性纳米载体引起越来越多关注,我们的研究初步表明阳离子聚合物聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 包裹的氧化铁磁性纳米颗粒在体外基因转染实验中具有较高效率 (另文报道)。本文进一步探讨新型基

收稿日期:2004-10-25;修回日期:2005-01-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30171062)

作者单位:1. 430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院核医学科;2. 福建医科大学附属厦门第一医院核医学科;3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院妇科肿瘤中心

因载体 PEI 包裹的磁性纳米颗粒 polyMA G1000 介导 TRAIL 基因治疗乳腺癌的可行性,并观察 TRAIL 基因转染乳腺癌细胞后的治疗效果。

## 1 材料与方法

1.1 质粒和磁性纳米颗粒 携带 TRAIL 基因的真核表达载体 pcDNA 3.0 的真核表达质粒 pcDNA 3.0-TRAIL 由张振蔚博士馈赠,PEI 包裹的氧化铁磁性纳米颗粒 polyMA G1000 由德国 Chemicell 公司提供,脂质体购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养 人类乳腺癌细胞株 MCF-7 购自美国典型培养物收藏中心(ATCC)。细胞培养基 DMEM 购自 Hyclone 公司。胎牛血清购自 Gibco 公司。细胞置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

1.3 体外基因转染 将  $1 \times 10^5$  MCF-7 细胞于转染前一天种植于 6 孔板中,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,当细胞贴壁并增殖至约 70% 细胞融合时开始转染,将 polyMA G1000 与质粒 DNA 按 1:1 (v/w) 混合,每孔中 pcDNA 3.0-TRAIL 质粒 DNA 量约为 3 μg,静置 30 min 后,分别加入各孔中,各孔下方加一磁场(磁场强度约 0.3 特斯拉),15 min 后撤除磁场,转染后 6 h 更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养,以空载体作为阴性对照,脂质体转染 TRAIL 基因作阳性对照。每种转染方法平行实验 3 次。

1.4 Tunnel 法检测细胞的凋亡 凋亡试剂盒购自 Roche 公司,爬片的细胞于转染后第 3 天,常规无水乙醇固定后,用凋亡试剂盒检测细胞的凋亡。

1.5 流式细胞仪检测细胞的凋亡率 转染后第 3 天,常规胰酶消化,收集细胞,PI 染色后用流式细胞仪分析细胞的凋亡率。

1.6 统计分析 应用 SPSS 10 统计分析软件,统计分析数据,检测结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析, $P < 0.05$  为统计学差异显著的界值。

## 2 结果

2.1 Tunnel 法检测细胞的凋亡 如图 1 所示,正常细胞呈蓝色,凋亡细胞呈褐色。

2.2 流式细胞仪检测细胞的凋亡率 如图 2 所示。统计学分析,空载体转染对照组的凋亡率为  $(5.06 \pm 1.05)\%$ ,脂质体转染的凋亡率为  $(18.31 \pm 2.44)\%$  ( $P < 0.01$ ),PolyMA G1000 转染加磁场的凋亡率为  $(25.11 \pm 2.85)\%$  (与脂质体转染比较,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

TRAIL 由于其只诱导肿瘤细胞和病毒感染细

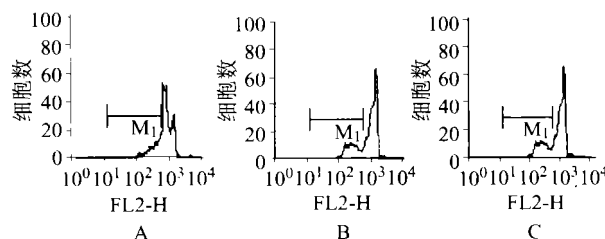


图 2 流式细胞仪检测凋亡率

A. 空载体转染对照, B. 脂质体转染,

C. PolyMA G1000 转染加磁场

胞凋亡而不诱导正常细胞凋亡的特性而倍受关注。目前研究表明<sup>[4,5]</sup>,TRAIL 特异性地诱导肿瘤细胞凋亡的分子基础是 TRAIL 分子及其受体分子间的调节。TRAIL 主要有两类受体:一类为死亡受体,如 DR<sub>4</sub>和 DR<sub>5</sub>,其具有转导凋亡信号的能力,诱导肿瘤细胞或转化细胞的凋亡;另一类为“诱骗”受体,如 DCR<sub>1</sub>和 DCR<sub>2</sub>,其不能转导 TRAIL 分子所诱发的凋亡信号,保护正常细胞免遭 TRAIL 的诱导凋亡作用。这 4 种受体广泛表达于正常组织中,DCR<sub>1</sub>和 DCR<sub>2</sub>作为 TRAIL 的“诱骗”受体存在于正常细胞中,DCR<sub>1</sub>或 DCR<sub>2</sub>可与 DR<sub>4</sub>或 DR<sub>5</sub>共表达,当与 TRAIL 分子结合后可形成无功能的 DCR<sub>1</sub>或 DCR<sub>2</sub>与 DR<sub>4</sub>或 DR<sub>5</sub>的异三聚体,因而不能传递凋亡信号,从而保护正常细胞免遭 TRAIL 诱导的凋亡作用;而肿瘤细胞或转化细胞缺乏“诱骗”受体,因而被 TRAIL 诱导凋亡。研究证实<sup>[6]</sup>,TRAIL 能诱导黑色素瘤、神经胶质瘤、胰腺癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞的凋亡,TRAIL 基因也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是关键因素之一。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,TRAIL 基因治疗的导入载体也较多应用病毒,但由于 TRAIL 强大的凋亡活性可能使病毒包装细胞发生凋亡,而且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,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。

近年来的研究表明<sup>[7]</sup>,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。PEI 也属阳离子聚合物,PEI 是人工合成的含有极高密度正电荷的有机大分子,研究证实<sup>[8]</sup>,PEI 在体、内外均有较高的转导效率,

但缺乏靶向性。如将 PEI 的高转导效率和磁性纳米材料磁导向性的优点结合起来,有可能建立一种新型的高效基因导入载体系统。本课题组已成功应用 PEI 包裹的氧化铁磁性纳米颗粒作为基因载体介导绿色荧光蛋白基因的体外转染,且证实转染效率高于常用的脂质体(另文报道)。本研究进一步探讨了 PEI 包裹的氧化铁磁性纳米颗粒作为治疗基因载体的可行性和疗效观察。研究发现, polyMA G1000 能成功地把治疗基因 TRAIL 导入到 MCF-7 细胞,并导致 MCF-7 细胞的凋亡,在最适转染条件下, polyMA G1000 体外转染 TRAIL 基因后, MCF-7 细胞的凋亡率高于经脂质体转染的。提示 PEI 包裹的氧化铁磁性纳米颗粒是较理想的体外基因转染的载体,可能适合于肿瘤基因治疗的导入载体。

研究表明<sup>[9]</sup>, TRAIL 基因对不同系的肿瘤细胞的凋亡效应存在差别,很多肿瘤细胞表现出对 TRAIL 抵抗,而且基因转染的条件也非常复杂,下一步我们将继续探讨 polyMA G1000 用于其他肿瘤细胞的基因导入和治疗效果, polyMA G1000 能否成功用于体内基因转染也值得进一步研究。

(本文图 1 见第 528 页)

#### 参考文献:

- [1] Wang S, El-Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (53): 8628-8633.
- [2] Seol JY, Park KH, Hwang CI. Adenovirus-TRAIL can overcome TRAIL resistance and induce a bystander effect [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(7): 540-548.
- [3] Thomas M, Klibanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(1): 27-34.
- [4] LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/ TRAIL and its death and decoy receptors [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(1): 66-75.
- [5] Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/ TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(3-4): 337-348.
- [6] Lee J, Hampl M, Albert P. Antitumor activity and prolonged expression from a TRAIL-expressing adenoviral vector [J]. *Neoplasia*, 2002, 4(4): 312-323.
- [7] 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.
- [8] Brokx R, Gariepy J. Peptide- and polymer-based gene delivery vehicles [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 90: 139-160.
- [9] Arizono Y, Yoshikawa H, Naganuma H. A mechanism of resistance to TRAIL/ Apo2L-induced apoptosis of newly established glioma cell line and sensitisation to TRAIL by genotoxic agents [J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(2): 298-306.

[编辑:贺文]

## VEGF 反义 RNA 抑制裸鼠体内食管癌细胞生长的实验研究

(正文见 457 页)

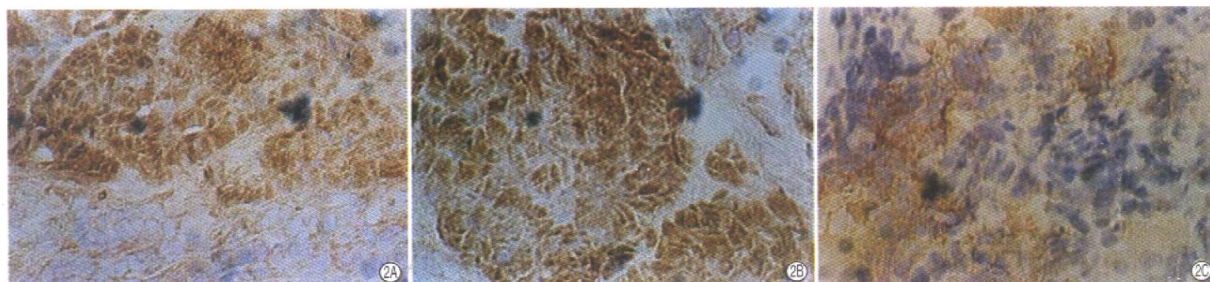


图2 不同荷瘤组织经抗 VEGF 抗体免疫组化染色结果  $\times 200$

A: TE-1-wt组; B: TE-1-E组; C: TE-1-A组

## 三氧化二砷诱导鼻咽癌 CNE1 细胞凋亡 及其作用机制的实验研究

(正文见 467 页)

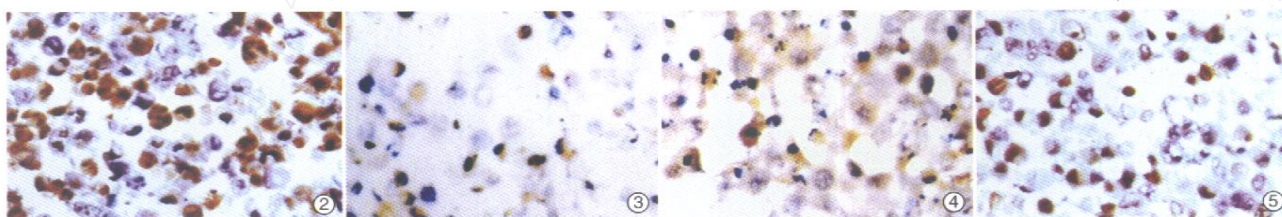


图2 1mg/L  $As_2O_3$  作用 CNE1 细胞 48h。TUNEL 染色, 棕褐色颗粒着于细胞核  $\times 400$

图3 CNE1 细胞 bcl-2 阳性, 胞浆着棕褐色 (IHC  $\times 400$ )

图4 CNE1 细胞 bax 阳性, 胞浆着棕褐色 (IHC  $\times 400$ )

图5 CNE1 细胞 p53 阳性, 胞核着棕褐色 (IHC  $\times 400$ )

## 磁性纳米颗粒介导基因治疗乳腺癌实验研究

(正文见 473 页)



图1a 空载体转染后 Tunnell 法镜下观

图1b 脂质体转染后 Tunnell 法镜下观

图1c polyMAG-1000 转染后 Tunnell 法镜下观