

共载TFPI-2及顺铂磁性纳米复合物的制备及其对鼻咽癌的治疗

刘芳 刘涛 谢民强* 张涛 陈帅君 江珊珊

(南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉头颈外科, 广州 510282)

摘要 构建共载组织途径抑制因子-2(tissue factor pathway inhibitor-2, TFPI-2)及顺铂(cisplatin, CDDP)的磁性纳米(magnetic nanoparticles, MNP)复合物(MNP-CDDP/TFPI-2), 研究该复合物对鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的综合抑制效应。将前期制备的载CDDP磁性纳米颗粒(MNP-CDDP)和聚乙二醇单甲醚-聚乙烯亚胺(MPEG-PEI)TFPI-2静电吸附, 制备MNP-CDDP/TFPI-2, 通过红外光谱、透射电镜、激光粒度仪观察复合物的结构、粒径大小及电位, 邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPDA)法检测复合物中CDDP含量。通过流式细胞仪检测基因转染效率, 分析磁性纳米复合物转染TFPI-2的情况; RT-PCR及Western blot法检测CNE-2细胞转染TFPI-2质粒后TFPI-2 mRNA和蛋白表达情况。采用CCK-8实验、流式细胞术及Matrigel侵袭实验检测MNP-CDDP/TFPI-2对CNE-2细胞增殖、凋亡及细胞侵袭能力的影响。研究结果显示, 纳米复合物成功合成, 平均水动力学粒径151.2 nm, Zeta电位+14.5 mV, 复合物中CDDP含量平均为120 $\mu\text{g/mL}$, 包封率33.3%。复合物所载TFPI-2质粒转染率22.7% $\pm$ 2.5%。CNE-2转染TFPI-2质粒后, 胞内TFPI-2 mRNA和蛋白表达明显增加。MNP-CDDP/TFPI-2组细胞生长抑制率及凋亡率分别为34.8%和42.3%, 明显高于MNP-CDDP组(27.1%、38.0%)和(MPEG-PEI)TFPI-2组(18.9%、16.2%)($P<0.05$)。Matrigel侵袭实验结果显示, 纳米复合药物组穿膜细胞数为28 $\pm$ 3个, 明显低于对照组($P<0.05$), 提示MNP-CDDP/TFPI-2组细胞侵袭和迁移能力降低。结果表明, 本研究已成功构建携带TFPI-2表达基因及CDDP的MNP-CDDP/TFPI-2; 体外实验显示, MNP-CDDP/TFPI-2对NPC细胞具有良好的综合抑制效应。

关键词 磁性纳米颗粒; TFPI-2; 顺铂; 鼻咽癌

The Preparation of a Novel Magnetic Nanoparticles Carrying TFPI-2 and Cisplatin and Its Evaluation of Inhibitory Effect on Nasopharyngeal Carcinoma *In Vitro*

Liu Fang, Liu Tao, Xie Minqiang*, Zhang Tao, Chen Shuaijun, Jiang Shanshan

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract MNP-CDDP/TFPI-2 was prepared to construct a novel multifunctional magnetic nanocarrier loading tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) and cisplatin (CDDP). We evaluated comprehensive inhibitory

收稿日期: 2014-10-06 接受日期: 2014-11-14

国家自然科学基金(批准号: 81372477、81260406)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20114433110001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-61643389, E-mail: min_qiang_x@hotmail.com

Received: October 6, 2014 Accepted: November 14, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372477, 81260406) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education from the Ministry of Education of China (Grant No.20114433110001)

*Corresponding author. Tel: +86-20-61643389, E-mail: min_qiang_x@hotmail.com

网络出版时间: 2015-01-23 15:17 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150123.1517.002.html>

effect of this nanocomposites on nasopharyngeal carcinoma (NPC). MNP-CDDP/TFPI-2 was constructed with magnetic nanoparticles-cisplatin (MNP-CDDP) and (MPEG-PEI)TFPI-2. The CDDP concentration, morphology, particle size and zeta potential of nanocomposites were measured by OPDA (o-phenylenediamine) colourimetry, Fourier transform infrared spectrum (FT-IR), transmission electron microscope (TEM) and laser particle detector, respectively. Flow cytometry was used to analyze the gene transfection efficiency of magnetic nanocomposites. TFPI-2 mRNA and protein expression levels were evaluated by RT-PCR and Western blot. Proliferation rate, cell apoptosis and invasion ability of CNE-2 cells cultured with MNP-CDDP/TFPI-2 were measured by CCK-8, flow cytometry and matrigel invasion test. The results showed that nanocomposites were successfully synthesized, with the average particle size 151.2 nm, Zeta potential +14.5 mV. OPDA showed that the CDDP concentration of nanocomposites was 120 $\mu\text{g/mL}$ and the encapsulation efficiency of CDDP was 33.3%. The transfection efficiency of TFPI-2 in the nanocomposites was $22.7\%\pm 2.5\%$. The mRNA and protein expression levels of TFPI-2 in CNE-2 cells of MNP-CDDP/TFPI-2 group were significantly increased compared with those of the control group. The rate of growth inhibition and cell apoptosis were 34.8% and 42.3%, whereas that in MNP-CDDP group were 27.1% and 38.0%, in (MPEG-PEI)TFPI-2 group were 18.9% and 16.2%, respectively ($P<0.05$). Matrigel invasion assay showed that the number of transmembrane cells was 28 ± 3 in MNP-CDDP/TFPI-2 group, which was lower than that in the control group ($P<0.05$). MNP-CDDP/TFPI-2 carrying cisplatin and TFPI-2 was successfully constructed and proved to be significantly inhibitory effect on the growth of CNE-2 cells.

Keywords magnetic nanoparticles; TFPI-2; cisplatin; nasopharyngeal carcinoma

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国高发恶性肿瘤之一,放化疗是其主要的治疗手段。虽然放化疗设备和技术不断更新,晚期NPC放化疗的平均5年生存率仍不乐观^[1]。肿瘤基因治疗因有效性、特异性、安全性的特点而备受关注^[2]。组织途径抑制因子-2(tissue factor pathway inhibitor-2, TFPI-2)能有效地抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族中多种蛋白水解酶的活性,在维持细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构完整、抑制肿瘤细胞浸润、转移及促进凋亡等方面起重要作用。有研究发现,在肝癌^[3]、乳腺癌^[4]、鼻咽癌^[5]等肿瘤组织中TFPI-2的表达降低,促进了肿瘤的侵袭转移,而TFPI-2对肺癌^[6]、口咽癌^[7]等的侵袭转移有明显的抑制作用。

作为晚期肿瘤化疗的首选药物之一的顺铂(cisplatin, CDDP),因其水溶性低、对正常组织毒副作用大、易产生耐药性等缺点,限制了其抗肿瘤作用的更好发挥。磁性纳米颗粒具有生物相容性好、超顺磁性、稳定等特点,针对磁性纳米这些特点,我们课题组前期已制备载CDDP磁性纳米(MNP-CDDP)抗癌药物,体外试验证实对NPC有着良好的抑制效应^[8]。我们希望在此基础上,用聚乙二醇单甲醚-聚乙烯亚胺(methoxy polyethylene glycol-

polyethylenimine, MPEG-PEI)连接TFPI-2基因,制备共载TFPI-2和CDDP的磁性纳米复合物,实现对鼻咽癌的同时化疗和基因治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 聚乙烯亚胺(枝状)(polyethylenimine, PEI, 分子量 25 kDa)、二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS分析纯)购自阿拉丁试剂公司;聚乙二醇单甲醚(methoxy polyethylene glycol, MPEG, 分子量 2 kDa)购自Sigma公司;N,N-二甲基甲酰胺(dimethyl formamide, DMF)、 $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)、 $\text{FeSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)、食品级海藻酸钠及纳米制备的其余试剂均为国产分析纯(广州化学试剂厂);顺铂(cisplatin, CDDP)购自齐鲁制药有限公司;CNE-2由本实验室保存;RPMI1640培养基、胎牛血清及胰酶购自Gibco公司;TFPI-2质粒由上海吉玛生物公司构建(GFP标记基因);质粒大量抽提纯化试剂盒及BCA法蛋白测量试剂盒购自北京康为公公司;Celling Counting Kit-8试剂盒购自日本Dojindo Laboratories公司;Transwell培养板购自美国Corning公司;TFPI-2抗体购自Santa Cruz公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™]

II(Tli RNaseH Plus)、RNAiso plus等相关产品购自日本TaKaRa公司。

1.1.2 仪器与设备 QL-861型旋涡混合器购自上海江仪仪器有限公司; Brookhaven Zeta Plus激光粒度仪购自美国Brookhaven公司; UVIKON923紫外-可见分光光度计购自美国BIO-TEK公司; PCR扩增仪购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 电泳仪购自北京市六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 MNP-CDDP/TFPI-2的制备 取MPEG 10 g和丁二酸酐2.5 g, 真空干燥24 h后, 溶解在干燥后的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 在氮气保护和75 °C下反应, 冷却回流8 h。将所得产物透析(截留分子量500), 每12 h换水, 透析3 d, 样品冷冻干燥。通过红外光谱判断是否为所需产物(MPEG-COOH)。MPEG-COOH与富含氨基的PEI脱水缩合生成MPEG-PEI共聚物。具体过程如下: 将5.0 g PEI及2.0 g MPEG-COOH分别溶解于二甲基亚砜, 待样品完全溶解后, 向体系中加入0.6 g DCC和0.35 g NHS, 室温下反应24 h, 收集产物去离子水, 透析3 d(截留分子量8 000), 样品冷冻干燥, 即得MPEG-PEI共聚物。将此共聚物载体溶于水与质粒(TFPI-2)按5:1的质量比混合均匀, 漩涡20 min, 制备(MPEG-PEI)TFPI-2复合物。将(MPEG-PEI)TFPI-2与课题组前期制备的醛基化海藻酸钠改性磁性纳米粒(Alg-Fe₃O₄-CDDP)^[9]即MNP-CDDP按4:1质量比混合均匀, 漩涡30 min, 制备共载基因及顺铂的磁性纳米复合物MNP-CDDP/TFPI-2。

1.2.2 MNP-CDDP/TFPI-2表征 (1)透射电镜观察磁性纳米复合物形态: 将制成的磁性纳米载体悬液用去离子水稀释5倍, 超声振荡(200 W, 3 min)后滴至专用覆膜铜网上, 常温干燥, 在透射电镜下观察。(2)傅里叶红外(FT-IR)光谱分析MPEG分子是否生成COOH: 将制备的MPEG-COOH冷冻干燥, 利用FT-IR对样品进行红外测试, 扫描范围为500~4 000 cm⁻¹, 分辨率为4 cm⁻¹。(3)粒径、Zeta电位检测: 将制成的MNP-CDDP/TFPI-2用去离子水稀释超声振荡, 激光粒度检测仪分别测定其有效粒径及Zeta电位。(4)邻苯二胺法检测磁性纳米复合物中顺铂的含量^[10]: 吸取6 mL的样品, 加入6 mL 1.2 mg/mL OPDA/DMF溶液, 浸于沸水浴中, 煮沸10 min后取出, 迅速冷却后在703 nm波长下比色, 记录吸光度, 对比标准曲线得出CDDP的含量。计算包封率, 包封率(%)=CDDP含

量/CDDP总量×100%。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳分析磁性纳米载体MNP与质粒的结合实验 实验分两组, I组: MNP与质粒结合实验, 将MNP与质粒按不同比例静电吸附, 涡旋均匀后的混合物分别电泳。II组: DNase-I酶消化实验, 分为裸质粒、裸质粒与DNase-I和磁性纳米复合物、质粒与DNase-I。常温下孵育30 min。各取6 μL, 分别加1 μL含溴酚蓝的Loading Buffer, 进行琼脂糖凝胶电泳实验: 1%琼脂糖凝胶, 60 V, 电泳30 min, 紫外灯下观察结果。以上实验重复3次。

1.2.4 RT-PCR及Western blot检测磁性纳米复合物所载质粒(TFPI-2)在细胞内的表达 CNE-2细胞在6孔板中培养, 实验组(MNP-CDDP/TFPI-2)、阴性对照组MNP/TFPI-2及阳性对照组PEI/TFPI-2。

(1)转染48 h后, 去上清, 加Trizol提总RNA。

内参引物: 18S: F: 5'-CCT GGA TAC CGC AGC TAG GA-3'; R: 5'-GCG GCG CAA TAC GAA TGC CCC-3'。TFPI-2: F: 5'-CTT CTC CGT TAC TAC TAC GAC AGG T-3'; R: 5'-GCC TCC CAG GTG TAG AAA TTG TTG-3'。

依次在PCR反应体系中加入PCR反应物, 使用SYBR®Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)试剂盒, 预变性: 95 °C 30 s; PCR反应: 95 °C 5 s, 60 °C 30 s(40个循环); 延伸并终止反应后确认RT-PCR的扩增曲线与溶解曲线, 进行PCR定量, 制备标准曲线。

(2)PBS洗涤收集转染48 h后的CNE-2细胞, 利用Western blot法检测TFPI-2蛋白的表达情况。一抗为1:2 000稀释的鼠抗人TFPI-2, 二抗为1:4 000 HRP标记羊抗鼠IgG-HRP, 用化学发光检测, 发光成像系统取像。利用图像分析系统分析, 以对照蛋白的光强度作为参照, 其他的蛋白与之相比较, 以β-actin作为内参。

1.2.5 MNP-CDDP/TFPI-2细胞毒性及对鼻咽癌细胞凋亡的体外实验 (1)采用CCK-8检测药物作用前后细胞增殖能力: 将对数生长期的CNE-2细胞按1×10⁵/mL的密度、100 μL/孔接种到在96孔板, 培养24 h。分为对照组、调零孔组(仅有培养基)、实验组[(MPEG-PEI)TFPI-2、MNP-CDDP、MNP-CDDP/TFPI-2]。每孔加入CCK-8 10 μL继续培养2 h, 于酶标仪上检测450 nm波长处的吸光值(D₄₅₀)。计算各组CNE-2细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%)=1-[D(加药)-D(空白)]/[D(对照)-D(空白)]×100%。

(2)流式检测细胞凋亡: 取对数生长期的CNE-2

细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度按2 mL/孔接种于6孔板,培养24 h后,去上清液,加完全培养基稀释的MNP-CDDP/TFPI-2复合物共培养48 h,收集所有细胞,并一分为二。一半细胞用流式细胞仪检测细胞内质粒转染效率,TFPI-2组为对照组;另一半细胞根据Annexin V FITC-A试剂盒说明,流式细胞仪检测细胞凋亡,以加入MNP、MNP-CDDP、(MPEG-PEI)TFPI-2组为对照组。

1.2.6 Matrigel胶侵袭实验检测转染前后细胞的侵袭能力 在Transwell小室均匀平铺Matrigel胶(50 μL /室)于聚碳酸酯膜上,聚合凝固。取对数生长期的CNE-2细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度按500 μL /孔接种于24孔板,贴壁生长24 h,去上清液,加完全培养基稀释的MNP-CDDP/TFPI-2复合物30 μL 共培养12 h,去上清消化,RPMI1640稀释CNE-2细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度按100 μL /室加入Transwell上室,500 μL 含5.0%血清的RPMI1640培养液加入下室。以加入MNP、MNP-CDDP、(MPEG-PEI)TFPI-2组为对照。24 h后取出小室,无菌棉签擦除上室未穿膜的细胞及Matrigel胶,4%

多聚甲醛固定,PBS清洗,结晶紫染色。显微镜下计数膜背面的细胞数,任意取5个视野求平均值。侵袭抑制率($\%$)=(1-实验组侵袭细胞数/对照组侵袭细胞数) $\times 100\%$ 。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据分析,数据用均数 $\pm$ 标准差来表示。两组样本均数比较采用独立样本的 t 检验,多个样本均数两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MNP-CDDP/TFPI-2复合物的表征

磁性纳米复合物于室温下静置,肉眼观察呈淡褐色,外观流动性佳,连续观察3个月未发现明显的颗粒沉淀。电镜观察磁性纳米复合物分散均匀,单个纳米复合物粒径约13 nm(图1)。红外光谱分析显示,是否连接上COOH,在 1700 cm^{-1} 处有明显的羧基伸缩振动吸收峰(箭头指示),表明MPEG分子成功枝接COOH(图2)。激光粒度检测仪检测MNP-CDDP/TFPI-2纳米复合物的粒径为151.2 nm,Zeta电位为+14.5 mV(图3)。采用OPDA法测定CDDP含量,其标准曲线见图4,回归方程为 $y(\text{吸收值})=0.0045x(\text{浓度})+0.0043$, $R^2=0.9893$,计算得到CDDP载药量平均为120 $\mu\text{g}/\text{mL}$,封装率为33.3%。

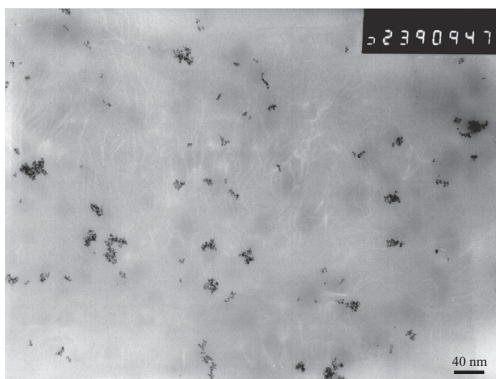


图1 MNP-CDDP/TFPI-2复合物透射电镜图

Fig.1 TEM of MNP-CDDP/TFPI-2 nanocomposites

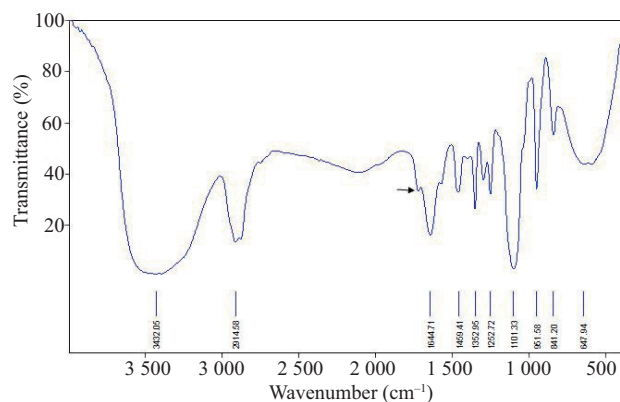


图2 MPEG-COOH红外光谱图

Fig.2 FT-IR of MPEG-COOH

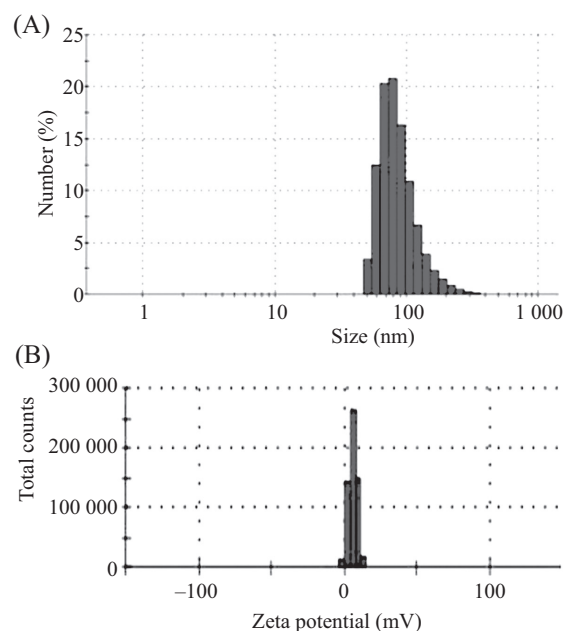


图3 MNP-CDDP/TFPI-2粒径与Zeta电位图

Fig.3 Particle size and Zeta potential of MNP-CDDP/TFPI-2

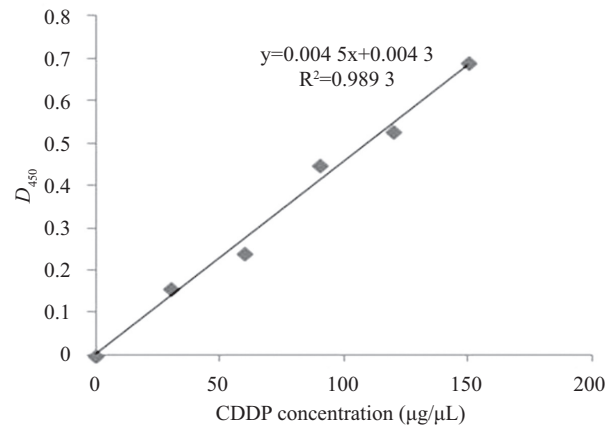
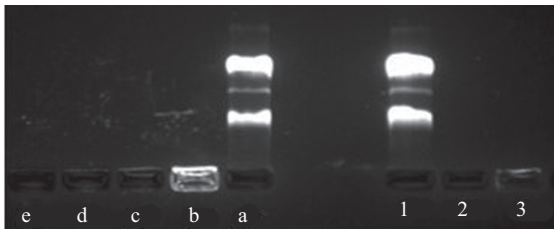


图4 CDDP含量标准曲线

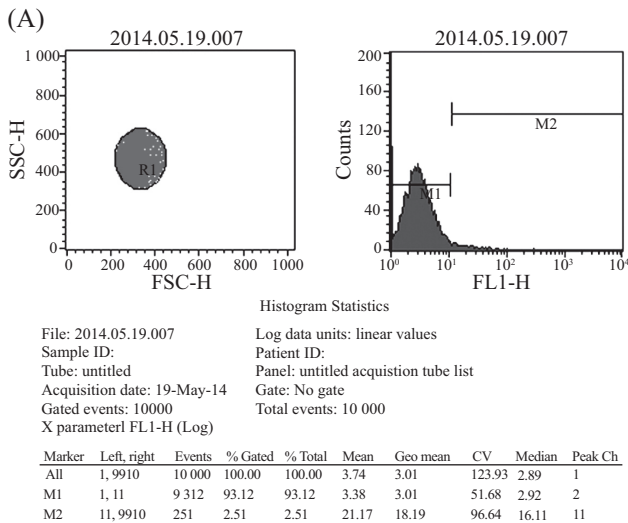
Fig.4 Standard curve of CDDP concentrations



a、b、c、d、e分别为磁性纳米载体与质粒比0:10、10:10、10:2、10:1、10:0; 1、2、3分别为裸质粒、质粒与DNase-I、裸质粒与DNase-I及磁性纳米复合物。

a,b,c,d,e indicated MNP carrier/plasmid ratio of 0:10, 10:10, 10:2, 10:1 and 10:0, respectively. 1,2,3 lines indicated plasmid, plasmid and DNase-I, plasmid DNase-I and MNP carrier, respectively.

图5 琼脂糖凝胶电泳检测磁性纳米载体与质粒的结合情况图
Fig.5 Agarose gel electrophoresis assay binding reaction of MNP carrier and plasmid



A: TFPI-2对照组; B: MNP-CDDP/TFPI-2实验组。

A: TFPI-2 control group; B: MNP-CDDP/TFPI-2 group.

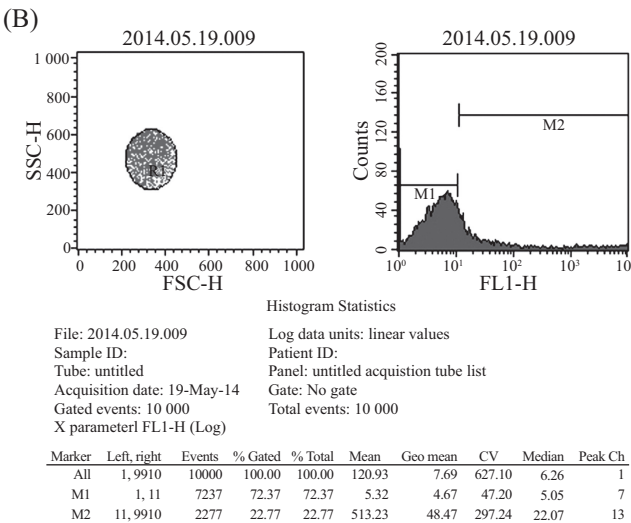
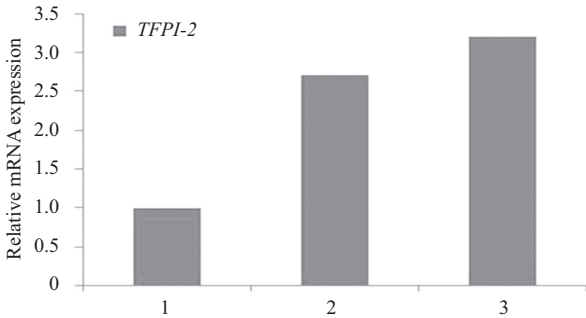


图6 流式细胞仪检测基因转染率
Fig.6 Flow cytometry test rate of gene transfection

琼脂糖凝胶电泳(图5)显示,点样孔1中可见明显裸质粒;2未见裸质粒,提示裸质粒已被DNase-I所消化;3中电泳道未见条带,在点样孔中见质粒,提示质粒被磁性纳米吸附并包裹,对DNase-I的破坏具有一定的保护作用。a、b、c、d、e中磁性纳米载体与质粒比分别为0:10、10:10、10:2、10:1、10:0,电泳结果说明,当磁性纳米复合物与质粒质量比大于等于5:1时,复合物能包裹好质粒。

2.2 MNP-CDDP/TFPI-2复合物体外基因转染观察

流式细胞仪检测显示,实验组CNE-2细胞内质粒转染效率为22.7%,明显高于对照组(7.5%)(图6)。RT-PCR结果显示,MNP-CDDP/TFPI-2组TFPI-2 mRNA的相对表达量明显高于MNP载体对照组(增加1.7倍),



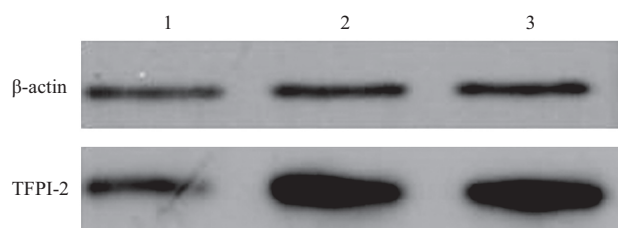
1: MNP/TFPI-2组; 2: MNP-CDDP/TFPI-2组; 3: PEI/TFPI-2组。

1: MNP/TFPI-2 group; 2: MNP-CDDP/TFPI-2 group; 3: PEI/TFPI-2 group.

图7 RT-PCR检测TFPI-2 mRNA的表达

Fig.7 Expression of TFPI-2 mRNA determined by RT-PCR

略低于PEI/TFPI-2组(图7)。利用Western blot检测转染TFPI-2质粒表明,CNE-2细胞中TFPI-2蛋白表达比



1: MNP/TFPI-2组; 2: MNP-CDDP/TFPI-2组; 3: PEI/TFPI-2组。

1: MNP/TFPI-2 group; 2: MNP-CDDP/TFPI-2 group; 3: PEI/TFPI-2 group.

图8 Western blot检测CNE-2细胞中TFPI-2蛋白的表达

Fig.8 The expressions of TFPI-2 protein in CNE-2 cells determined by Western blot

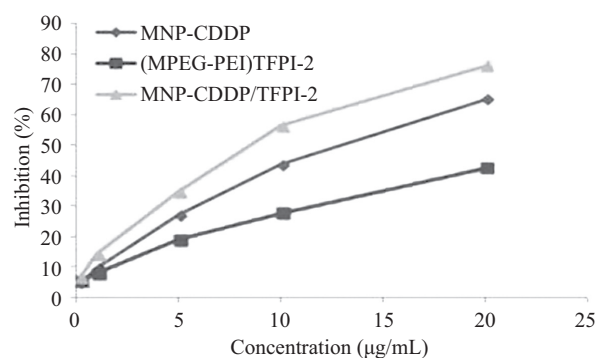
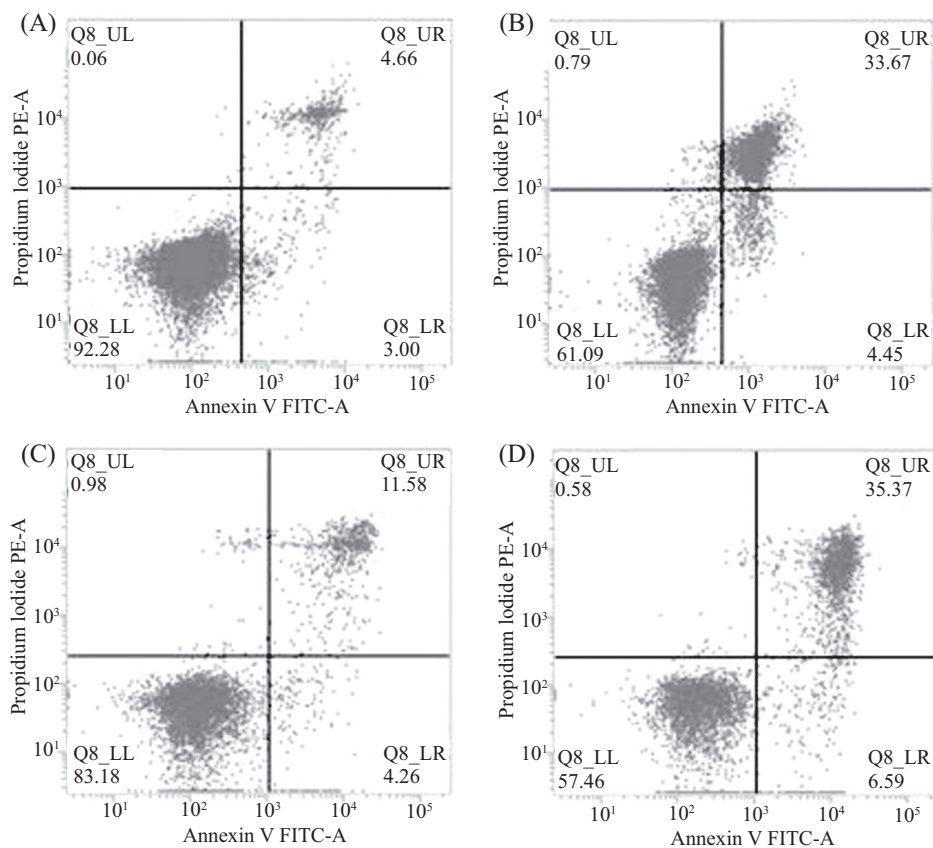


图9 复合物对CNE-2细胞生长的抑制作用

Fig.9 Effects of compounds on CNE-2 cells growth



A: MNP-(MPEG-PEI)组; B: MNP-CDDP组; C: (MPEG-PEI)TFPI-2组; D: MNP-CDDP/TFPI-2组。

A: MNP-(MPEG-PEI) group; B: MNP-CDDP group; C: (MPEG-PEI)TFPI-2 group; D: MNP-CDDP/TFPI-2 group.

图10 流式细胞仪检测细胞凋亡

Fig.10 Apoptosis analysis by flow cytometry

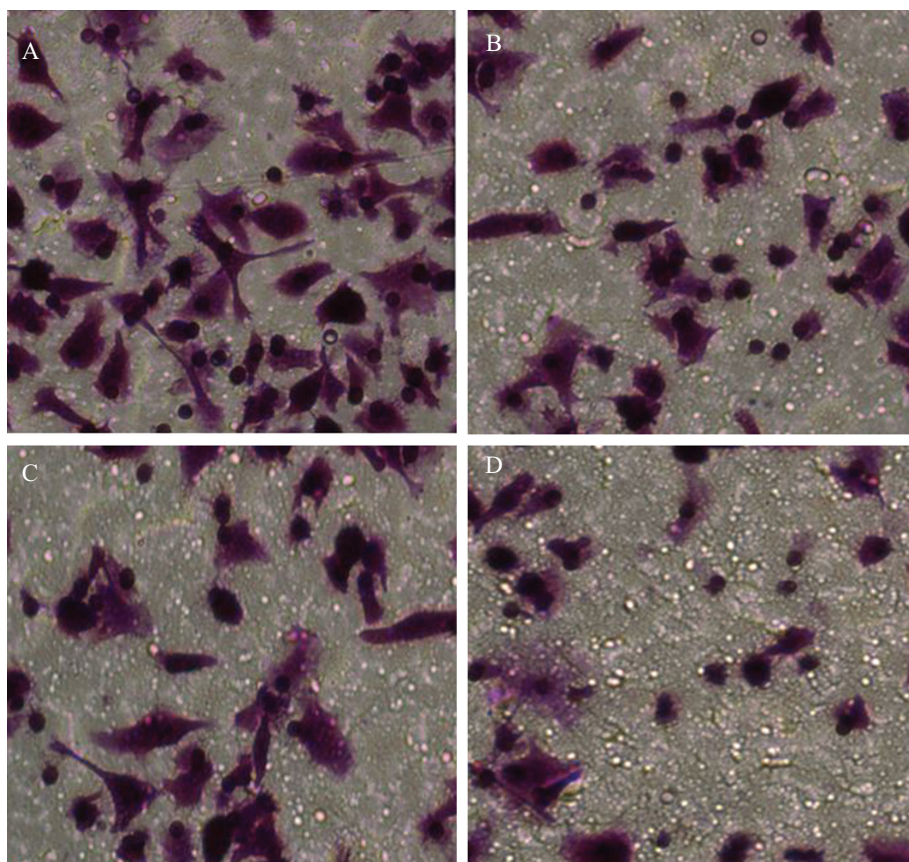
MNP载体组高,但低于PEI/TFPI-2组(图8)。

2.3 MNP-CDDP/TFPI-2复合物对HNE-1细胞的体外抑制实验

CCK-8法检测细胞抑制率,结果显示,当培养体系中CDDP终浓度为5 μg/mL时, MNP-CDDP/TFPI-2组24 h抑制率为34.8%,高于MNP-CDDP组(27.1%)和(MPEG-PEI)TFPI-2(基因浓度5 μg/mL)组(18.9%)。联合用药组对CNE-2细胞有更明显的细胞抑制作用

($P < 0.05$),并随药物浓度的增加而增加,一定程度上表现出浓度依赖性(图9)。

流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示,载体组的凋亡率为7.66%,凋亡不明显。当载CDDP终浓度为5.00 μg/mL时, MNP-CDDP/TFPI-2组24 h凋亡率为42.3%±3.34%,高于MNP-CDDP组(38.0%±2.17%)与(MPEG-PEI)TFPI-2(基因浓度为5 μg/mL)组(16.2%±3.59%)($P < 0.05$)(图10)。



A: MNP-(MPEG-PEI)组; B: MNP-CDDP组; C: (MPEG-PEI)TFPI-2组; D: MNP-CDDP/TFPI-2组。

A: MNP-(MPEG-PEI) group; B: MNP-CDDP group; C: (MPEG-PEI)TFPI-2 group; D: MNP-CDDP/TFPI-2 group.

图11 CNE-2细胞Matrigel侵袭实验图(100×)

Fig.11 The influence of various samples on Matrigel invasion of CNE-2 cells (100×)

Matrigel胶侵袭实验显示,载体组穿膜CNE-2细胞数为 55 ± 4 (图11A),MNP-CDDP组穿膜细胞数为 42 ± 2 (图11B), (MPEG-PEI)TFPI-2组穿膜细胞数为 46 ± 3 (图11C),而MNP-CDDP/TFPI-2组穿膜数为 26 ± 3 (图11D),比对照组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

MNP在医学中的应用研究已成为肿瘤诊断和治疗的一个热点,它除了一般纳米粒的特性外还具有超顺磁性和磁场靶向移动,进入体内后通过渗透增强和截留作用(enhanced permeability and retention effect, EPRE)更容易聚集在肿瘤组织中^[11-12],利用磁性纳米的这些特点,有研究将其用于肿瘤的磁热疗^[13]。我们课题组之前已成功制备出载顺铂的海藻酸钠改性四氧化三铁(Alg-Fe₃O₄-CDDP)^[9],体外实验显示,对NPC有着一定的抗肿瘤效应^[8];但体内实验显示,Alg-Fe₃O₄易被肝肾组织屏障,且CDDP化疗易产生

耐药性^[14],要补偿这些不足就需要联合其他治疗。

组织途径抑制因子-2(TFPI-2)在肿瘤组织中表达降低,促进肿瘤侵袭转移^[5]。研究证实,TFPI-2能明显抑制肺癌细胞^[6]等的侵袭转移。我们过去的研究也发现,借助腺病毒转染TFPI-2能明显抑制荷瘤裸鼠移植瘤的生长^[15],表明TFPI-2可用于肿瘤基因治疗。基因治疗中载体在转染中担任重要角色^[16],树枝状聚乙烯基亚胺(PEI)是富含氨基的有机高分子阳离子聚合物,具有良好的基因转染效率,但因其有较大的细胞毒性,限制其作为基因载体的应用^[17]。聚乙二醇(PEG)具有无毒性、具有良好的水溶性并与许多有机物组分有良好的相容性等优点,PEI上连接PEG分子可提高PEI-DNA复合物的水溶性,减少与血液中蛋白组分的作用,降低肝脾网状内皮系统非特异性吞噬,延长体内循环时间,降低细胞毒性^[18]等。

目前,化疗药物和基因共传递因可促进协同作用、增强治疗效果、减少毒副作用、阻止耐药形成

等优势而成为肿瘤治疗的研究热点^[19]。MPEG-PEI吸附TFPI-2质粒并通过静电作用包裹MNP-CDDP, 形成性质稳定、分散均匀的磁性纳米复合物, 其平均水动力学粒径为151.2 nm, 符合纳米药物的应用要求; 其CDDP的包封率为33.3%。凝胶电泳实验显示, 磁性纳米载体能够携带并保护质粒。有文献报道, 适当PEG化(每分子PEI连接的PEG链段不超过2个)可提高转染效率^[20], 我们制备的MPEG-PEI摩尔比约为1:1, RT-PCR、Western blot显示, CNE-2细胞中TFPI-2 mRNA及蛋白明显增加, 提示磁性纳米载体成功介导TFPI-2质粒的转染, 流式细胞检测证实MNP-CDDP/TFPI-2转染率为22.7%, 比单纯PEI的转染率略低, 但CCK-8细胞抑制实验、流式细胞凋亡及侵袭实验分析显示, MNP-CDDP/TFPI-2与单纯载TFPI-2基因治疗、单纯载CDDP化疗相比, 细胞抑制率、凋亡率及肿瘤细胞侵袭能力明显降低, 说明磁性纳米复合物中CDDP与TFPI-2具有综合抑制效应。

综上所述, 本研究已成功制备出共载TFPI-2基因和CDDP的磁性纳米复合物, 具有抑制CNE-2细胞增殖和促进凋亡的作用, TFPI-2和CDDP联合作用提高了抗肿瘤的效应, 在体外实现了集化疗、基因治疗于一体的肿瘤综合治疗。今后, 将针对肿瘤细胞的分子靶点制备靶向特异性纳米基因的化疗药物, 实现真正意义上的细胞内分子靶向治疗。

参考文献 (References)

- 1 Chua DT, Ma J, Sham JS, Mai HQ, Choy DT, Hong MH, *et al.* Long-term survival after cisplatin-based induction chemotherapy and radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: A pooled data analysis of two phase III trials. *J Clin Oncol* 2005; 23(6): 1118-24.
- 2 Walther W, Schlag PM. Current status of gene therapy for cancer. *Curr Opin Oncol* 2013; 25(6): 659-64.
- 3 Zhu B, Zhang P, Zeng P, Huang Z, Dong TF, Gui YK, *et al.* Tissue factor pathway inhibitor-2 silencing promotes hepatocellular carcinoma cell invasion *in vitro*. *Anat Rec (Hoboken)* 2013; 296(11): 1708-16.
- 4 Xu C, Wang H, He H, Zheng F, Chen Y, Zhang J, *et al.* Low expression of TFPI-2 associated with poor survival outcome in patients with breast cancer. *BMC Cancer* 2013; 13(15): 118.
- 5 Wang S, Xiao X, Zhou X, Huang T, Du C, Yu N, *et al.* TFPI-2 is a putative tumor suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 2010; 10(9): 617.
- 6 Lavergne M, Jourdan ML, Blechet C, Guyetant S, Pape AL, Heuze-Vourc'h N, *et al.* Beneficial role of overexpression of TFPI-2 on tumour progression in human small cell lung cancer. *FEBS Open Bio* 2013; 27(3): 291-301.
- 7 Lai YH, He RY, Chou JL, Chan MW, Li YF, Tai CK. Promoter hypermethylation and silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 in oral squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 2014; 12(1): 237.
- 8 李仲汉, 谢民强, 陈帅君, 王 蕾. 改性载顺铂磁性纳米药物治疗鼻咽癌的体外实验 (英文). 中国组织工程研究与临床康复 (Li Zhonghan, Xie Minqiang, Chen Shuaijun, Wang Lei. Complexing cis-diaminedichloroplatinum-loaded magnetic nanomedicine for treating nasopharyngeal carcinoma *in vitro*. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2009; 29(13): 5637-40.
- 9 谢民强, 陈帅君, 徐雪青, 李仲汉, 沈 辉, 许家瑞. 两种顺铂磁性纳米颗粒制备及其特性的比较. 科学通报 (Xie Minqiang, Chen Shuaijun, Xu Xueqing, Li Zhonghan, Shen Hui, Xu Jiarui. Preparation of two kinds of superparamagnetic carriers supported cis-platinum-complexes and the comparison of their characteristics. *Chin Sci Bull*) 2005; 50(19): 33-8.
- 10 Hasson H, Warshawsky A. High-performance liquid chromatographic determination of cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) as the o-phenylenediamine complex. *J Chromatogr* 1990; 530 (1): 219-21.
- 11 Greish K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J Drug Target* 2007; 15 (7/8): 457-64.
- 12 Aslan B, Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Nanotechnology in cancer therapy. *J Drug Target* 2013; 21 (10): 904-13.
- 13 Baldi G, Ravagli C, Mazzantini F, Loudos G, Adan J, Masa M, *et al.* *In vivo* anticancer evaluation of the hyperthermic efficacy of anti-human epidermal growth factor receptor-targeted PEG-based nanocarrier containing magnetic nanoparticles. *Int J Nanomed* 2014; 9: 3037-56.
- 14 谢民强, 王 蕾, 陈帅君, 徐雪青, 沈 辉. 载顺铂磁性纳米药物在小鼠体内的组织分布. 中国药理学杂志 (Xie Minqiang, Wang Lei, Chen Shuaijun, Xu Xueqing, Shen Hui. Tissue distribution of cisplatin loaded magnetic nano medicine in mice. *Chin Pharm J*) 2010; 45(21): 1644-7.
- 15 Sun Y, Xie M, Liu M, Jin D, Li P. Growth suppression of human laryngeal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene 2. *Laryngoscope* 2006; 116(4): 596-601.
- 16 Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm* 2014; 459(1/2): 70-83.
- 17 Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release* 1999; 60(2/3): 149-60.
- 18 Kichler A, Chillon M, Leborgne C, Danos O, Frisch B. Intranasal gene delivery with a polyethylenimine-PEG conjugate. *J Control Release* 2002; 81(3): 379-88.
- 19 Ma D, Zhang HB, Chen YY, Lin JT, Zhang LM. New cyclodextrin derivative containing poly (L-lysine) dendrons for gene and drug co-delivery. *J Colloid Interf* 2013; 405: 305-11.
- 20 姚 懿, 吴 飞, 金 拓. 聚乙烯亚胺衍生物作为非病毒基因载体的研究进展. 中国医药工业杂志 (Yao Yi, Wu Fei, Jin Tuo. Progress of polyethylenimine derivatives used as non-viral gene vectors. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*) 2007; 38(5): 387-90.