

磁性纳米粒介导沉默PI3K γ 基因调控肿瘤相关巨噬细胞抗小鼠肺癌细胞效应的研究

陈全* 刘佳霖 贺静荣 范晓霞 吴蕊鑫

(重庆医科大学免疫学研究中心, 基础医学院免疫学教研室, 重庆 400016)

摘要 为了探讨超顺磁性Fe₃O₄纳米粒子(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs)介导的磷脂酰肌醇3激酶 γ (phosphatidylinositol 3 kinase γ , PI3K γ)抑制表达调控的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)对小鼠Lewis肺癌细胞(Lewis lung carcinoma, LLC)增殖和凋亡的影响, 该研究构建了能启动巨噬细胞(macrophage, M Φ)特异性表达PI3K γ 催化亚基p100 siRNA的pSilencer-EGFP-SP-p110质粒, 通过SPIONs负载成磁性纳米质粒复合物(SPIONs-DNA), 在强磁作用下转染M Φ , 通过普鲁士蓝染色法检测SPIONs-DNA在细胞内的分布, Real-time PCR和Western blot检测细胞PI3K γ p110亚基的表达水平。建立M1、M2型M Φ 模型, 将SPIONs-DNA在强磁作用下转染M2型M Φ , 通过Real-time PCR和Western blot鉴定细胞表型, 明确M2型M Φ 转化为M1型的强度。采用Transwell系统建立SPIONs-DNA转染的M2型M Φ 与小鼠LLC细胞的共培养模型, 通过锥虫蓝染色法检测LLC细胞的活细胞数并绘制细胞生长曲线, CCK-8法检测LLC细胞增殖情况, 硝酸还原酶法检测共培养液上清中NO含量, 流式细胞术检测LLC细胞凋亡情况。结果显示, 制备的SPIONs-DNA在强磁作用下成功转染M Φ 并大量分布在细胞胞核周围, SPIONs-DNA转染组细胞PI3K γ p110 mRNA和蛋白表达水平显著低于空白细胞对照组($P < 0.05$)。建立的M1型M Φ 高表达iNOS($P < 0.001$), M2型M Φ 高表达ARG-1($P < 0.001$)。M2型M Φ 转染SPIONs-DNA后细胞iNOS mRNA和蛋白的表达显著增加($P < 0.001$), ARG-1 mRNA和蛋白的表达显著降低($P < 0.01$)。在共培养组中, SPIONs-DNA转染的M2型M Φ 组能大量分泌NO, LLC细胞生长和增殖能力显著降低($P < 0.05$), 凋亡率显著增高($P < 0.01$)。结果表明, 磁性纳米粒负载pSilencer-EGFP-SP-p110重组质粒能够特异性靶向抑制巨噬细胞PI3K γ p110的表达, 诱导M2型M Φ 转化为M1型; 其转染的M2型M Φ 可显著抑制LLC细胞的生长和增殖, 促进细胞凋亡, 这与其大量分泌NO有关。该磁性纳米质粒复合物可诱导TAM发挥抗肿瘤作用, 为研究开发有效的抗肺癌基因治疗措施奠定基础。

关键词 巨噬细胞; PI3K γ ; 超顺磁性Fe₃O₄纳米粒子; Lewis肺癌; 增殖; 凋亡

Silencing PI3K γ Gene via Magnetic Nanoparticles Regulates the Effect of Tumor Associated Macrophages on Mouse Lung Cancer Cells

CHEN Quan*, LIU Jialin, HE Jingrong, FAN Xiaoxia, WU Ruixin,

(Immune Research Centre, Department of Immunology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The purpose of this research was to explore the effect of silencing PI3K γ (phosphatidylinositol 3 kinase γ) gene via SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) to regulate TAM (tumor-associated mac-

收稿日期: 2019-12-13

接受日期: 2020-02-10

*通讯作者。Tel: 023-68485248, E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

Received: December 13, 2019 Accepted: February 10, 2020

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485248, E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5182>

rophages) on the proliferation and apoptosis of mouse LLC (Lewis lung carcinoma) cells. The pSilencer-EGFP-SP-p110 plasmid which can specifically promote M Φ (macrophages) to express siRNA of PIK3CG (PI3K γ catalytic subunit p100) was constructed and loaded into SPIONs-DNA (magnetic nano-plasmid complexes) via SPIONs which was transfected into macrophages under strong magnetism. The distribution of SPIONs-DNA in the cells was detected by Prussian blue staining, and the expression of PI3K γ p110 of transfected cells was detected by Real-time PCR and Western blot. The M1 and M2 M Φ models were established, and SPIONs-DNA was transfected into M2 M Φ under strong magnetism. The phenotype of the transfected cells was identified by Real-time PCR and Western blot, and the intensity of M2 M Φ transformed into M1 was determined. The Transwell system was used to establish the co-culture models of SPIONs-DNA transfected M2 M Φ with mouse LLC cells. The number of live cells of LLC was detected by trypan blue staining and the cell growth curve was drawn. The proliferation of LLC cells was detected by CCK-8 assay. The NO concentrations in supernatant of co-culture medium was detected by Nitrate reductase method. The apoptosis level of LLC cells was detected by flow cytometry. The results showed that the prepared SPIONs-DNA complex was successfully transfected into M Φ under strong magnetism and distributed in a large amount around the cell nucleus. The mRNA and protein levels of PI3K γ p110 in SPIONs-DNA transfected cells were significantly lower than those in the blank control group ($P < 0.05$). The established M1 M Φ highly expressed iNOS ($P < 0.001$), and the M2 M Φ highly expressed ARG-1 ($P < 0.001$). After SPIONs-DNA transfection, the expression levels of iNOS mRNA and protein in M2 cells increased significantly ($P < 0.01$), and the expression of ARG-1 mRNA and protein decreased significantly ($P < 0.01$). Among the co-culture groups, SPIONs-DNA transfected M2 type cell group was able to secrete a large amount of NO, the growth and proliferation capacity of LLC cells were significantly reduced ($P < 0.05$), and the apoptosis rate of LLC cells were significantly increased ($P < 0.01$). These results confirm that magnetic nanoparticles loaded with pSilencer-EGFP-SP-p110 plasmids could specifically inhibit the expression of PI3K γ p110 in M Φ , and then induce the transformation of M2 type M Φ into M1 type. The SPIONs-DNA transfected M2 type M Φ can significantly inhibit the growth and proliferation of LLC cells, and promote the apoptosis of LLC cells, which is related to its large amount of NO secretion. The magnetic nano-plasmid complex can induce TAM to play an anti-tumor role what laying a foundation for the research and development of effective gene therapy for lung cancer.

Keywords macrophages; PI3K γ ; SPIONs; Lewis lung carcinoma; proliferation; apoptosis

在肿瘤的发生、发展过程中, 巨噬细胞(macrophage, M Φ)存在一系列连续可调节的功能状态, M1型和M2型是该状态的两个极端^[1]。M1型为促炎型, 即经典活化型, 可抵御胞内寄生菌和病毒, 参与炎症反应, 是抗肿瘤免疫的重要组成部分; M2型为抗炎型, 即替代活化型, 可促进肿瘤的生长和侵袭, 抑制T细胞的功能^[2]。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)是浸润到肿瘤间质内的巨噬细胞, 在大多数恶性实体肿瘤中, 其比例占肿瘤组织细胞总数的50%以上, 肿瘤微环境诱导产生的TAM, 其表型和功能更接近M2型^[3-4]。巨噬细胞表达的磷脂酰肌醇3激酶 γ (phosphatidylinositol 3 kinase γ , PI3K γ)是TAM极化为M2型和发挥促瘤效应的关键分子, 其介导的信号通路可促进肿瘤的生长, 而敲除PI3K γ 基因或使

用PI3K γ 抑制剂, 均可显著抑制肿瘤的生长^[5]。由于PI3K-Akt-mTOR信号通路在T细胞等免疫细胞的生长、分化、凋亡等方面同样发挥着重要作用^[2], 广谱抑制PI3K γ 会对T细胞等免疫细胞的功能产生不利效应。因此, 在以PI3K γ 为靶点的抗肿瘤研究中, 靶向并特异性地抑制巨噬细胞PI3K γ , 同时对其他免疫细胞的PI3K γ 不产生显著影响的研究尤为重要。超顺磁性Fe₃O₄纳米粒子(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs)作为基因治疗的载体, 无毒、无免疫原性、分散性好、对细胞膜及血脑屏障的穿透性强, 且可通过“摄粒或胞吞”直接进入细胞, 使其负载的药物或基因免受吞噬体酶的破坏, 由于它具有超顺磁性, 在体外磁场引导下可无创性靶向肿瘤部位^[6-7]。

本研究以M Φ 特异性启动子构建能够在M Φ 中特异性启动表达siRNA、带绿色荧光标签蛋白基因(enhanced green fluorescence protein, EGFP)的pSilencer-EGFP-SP工具质粒^[8],再以鼠PI3K γ 催化亚基p110编码基因(PI3K γ catalytic subunit p100, PIK3CG)为靶基因,构建能够在巨噬细胞内特异性敲减PI3K γ 的pSilencer-EGFP-SP-p110重组质粒,再由SPIONs负载成基因复合体,在细胞水平研究该基因复合体对TAM极化的影响以及抗肺癌细胞效应,为研究开发有效的抗肺癌基因治疗措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠巨噬细胞RAW264.7由重庆医科大学免疫学研究中心保存,小鼠LLC细胞由重庆医科大学检验医学院赠送。

1.1.2 主要材料与试剂 pSilencer-EGFP-SP质粒载体由重庆医科大学免疫学研究中心保存;超顺磁性Fe₃O₄纳米粒子材料(商品名:MagTransPoly)购于普瑞迈格生物科技有限公司;小鼠重组白介素4(interleukin 4, IL-4)、小鼠重组 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)购于Proteintech公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购于Sigma公司;DMEM高糖培养基购于Hyclone公司;胰蛋白酶购于Gibco公司;青霉素-链霉素溶液(penicillin-streptomycin solution, 100 \times)购于上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清购于Natocor-Industria Biologica公司;转染试剂脂质体Lipofectamine™ 3000试剂盒购于Invitrogen公司;RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) RT-PCR试剂盒均购于TaKaRa公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、PVDF膜(0.22 μ m/0.45 μ m)购于北京鼎国昌盛生物技术公司;SDS-PAGE凝胶试剂盒购于Bio-Rad公司;兔iNOS多克隆抗体购于Abcam公司;小鼠ARG-1单克隆抗体、小鼠 β -actin单克隆内参抗体购于Proteintech公司;兔PI3 Kinase p110 γ 单克隆抗体购于Cell Signaling Technology公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG、羊抗鼠IgG购于abbkine公司;0.4%锥虫蓝染液、普鲁士蓝染色液(细胞专用)购于Solarbio公司;CCK-8试剂购于GENVIEW公司;NO测定试剂(硝酸还原酶

法)购于南京建成生物工程研究所。

1.2 重组质粒构建、转染及功能验证

1.2.1 重组质粒的构建和转染 根据GenBank(NM_020272.2)在线设计能有效抑制PI3K γ p110表达的shRNA模板序列,选GC含量较少的3条合成3条DNA模板,该模板5'端含BamH I酶切位点,3'端含Hind III酶切位点,在PCR仪上退火后回收退火产物。用BamH I和Hind III双酶切质粒pSilencer-EGFP-SP使其具有相同的黏性末端,经0.1%琼脂糖凝胶电泳后回收载体大片段,与退火产物按1:4的摩尔比混匀经DNA连接酶于16 $^{\circ}$ C金属浴过夜连接。连接产物转化感受态*E.coli* Top10大肠杆菌,用含氨苄西林(50 μ g/mL)的LA培养基筛选,挑取阳性克隆单菌落继续培养,提取质粒后,通过EcoR I单酶切与目的基因测序鉴定所构建的重组质粒,酶切结果与成都擎科生物技术有限公司测序结果一致,显示重组质粒构建成功。重组质粒命名为pS-EGFP-SP-p110-1(简称为S1)、pS-EGFP-SP-p110-2(简称为S2)和pS-EGFP-SP-p110-3(简称为S3)。用Lipofectamine™ 3000脂质体转染试剂分别将3条重组质粒瞬时转染RAW264.7细胞,设转染pS-EGFP-SP空质粒载体的RAW264.7细胞为阴性对照组,未转染质粒的RAW264.7细胞为空白对照组,转染24 h后荧光显微镜观察荧光密度。

1.2.2 Real-time PCR法检测细胞PI3K γ p110 mRNA的转录水平 按RNA提取试剂盒说明分别提取3条重组质粒S1、S2、S3转染组、空质粒转染对照组、空白对照组五组细胞的总RNA,将其逆转录成cDNA,以cDNA为模板进行实时定量PCR扩增,测定各组细胞PI3K γ p110 mRNA转录水平。引物序列如下:PI3K γ p110上游引物为5'-TGA ACC GTA CCA CGA CAG TG-3',下游引物为5'-GGC TTC TTC TTG GAG GCC AT-3';内参GAPDH上游引物为5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3',下游引物为5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s,61 $^{\circ}$ C退火30 s,共39个循环;熔解曲线65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C递增,每0.5 $^{\circ}$ C 5 s,每个反应做3个复孔。扩增完毕后,对结果用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行相对定量分析, $\Delta\Delta$ Ct=对照组 Δ Ct(目的基因Ct-管家基因Ct)-各组 Δ Ct(目的基因Ct-管家基因Ct)。选择PI3K γ p110基因沉默效率最佳的重组质粒进行后续实验。

1.2.3 Western blot法检测细胞PI3K γ p110蛋白的表达 分别收集S1、S2、S3转染组、空质粒转染对照组、空白对照组五组细胞,用加有苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)的RIPA蛋白裂解液提取各组细胞的总蛋白,BCA法检测各组蛋白浓度后,调整上样体积使总蛋白浓度一致。总蛋白经SDS-PAGE 10%的分离胶和5%的浓缩胶电泳分离,恒电流转至PVDF膜(0.2 μ m)上。转至50 g/L脱脂牛奶室温封闭2 h后,分别加入兔PI3 Kinase p110 γ 单克隆抗体(1:1 000)和小鼠 β -actin单克隆内参抗体(1:5 000),于4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜;加入HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:10 000)、HRP标记的山羊抗兔IgG(1:10 000),室温条件下孵育2 h, TBST缓冲液洗涤3次后,用ECL化学发光试剂盒在Bio-Rad凝胶成像仪上显影,使用Image Lab分析条带灰度值。选择使RAW264.7细胞PI3K γ p110蛋白表达最低的重组质粒进行后续实验。

1.3 SPIONs-DNA复合物的制备及功能验证

1.3.1 SPIONs的表征及特性 SPIONs(商品名:MagTransPoly)购于普瑞迈格生物科技有限公司,通过透射电镜检测SPIONs的表征及分散性。

1.3.2 SPIONs-DNA复合物的制备及检测 将SPIONs与重组质粒DNA按不同的质量比混合,漩涡振荡数秒钟后,于37 $^{\circ}$ C孵箱孵育15 min以便充分吸附,得到SPIONs-DNA复合物。DNA掺入比计算:测定离心后上清液的体积,用蛋白核酸分析仪测定游离DNA的浓度,推算游离DNA的含量,计算掺入比例, DNA掺入比=(总DNA量-游离DNA量)/总DNA量 \times 100%。取最佳结合率复合物离心后的上清液,通过0.8%琼脂糖凝胶电泳进行检测,显示SPIONs与DNA的结合情况。

1.3.3 SPIONs-DNA复合物的转染及表达 转染前1天将RAW264.7细胞按照 1.2×10^6 个/孔接种于6孔板中,将所需量的SPIONs(根据最佳结合比的DNA量)加入无菌EP管中,用无血清无补充的DMEM培养基将所需量的重组质粒DNA稀释至200 μ L,将200 μ L DNA溶液加入SPIONs中,并通过快速移液立即混合,于37 $^{\circ}$ C孵箱孵育15 min后,向细胞中加入200 μ L复合物,每孔用无血清无补充的DMEM培养基补足至2 mL,将6孔板置于铷-铁-硼稀土强磁铁上并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养20 min后,取下磁板,细胞继续培养24 h,设Lipofectamine™ 3000脂质体转染DNA的细胞为对

照组,未转染质粒的细胞为空白对照组。通过普鲁士蓝染色法观察SPIONs-DNA在细胞内的分布;按RNA提取试剂盒说明分别提取SPIONs-DNA复合物转染组、Lip 3000转染DNA对照组、未转染质粒的空白对照组三组细胞的总RNA,将其逆转录成cDNA,以cDNA为模板进行实时定量PCR扩增,测定各组细胞PI3K γ p110 mRNA转录水平,PI3K γ p110引物序列、内参GAPDH引物序列、PCR反应条件同上;DPBS洗涤细胞后,用RIPA裂解液分别提取三组细胞的总蛋白,BCA法检测各组蛋白浓度后,调整上样体积使总蛋白浓度一致,Western blot检测方法、一抗、二抗、反应条件同上,用ECL化学发光试剂盒在Bio-Rad凝胶成像仪上显影,使用Image Lab分析条带灰度值。

1.4 M1、M2型巨噬细胞的诱导及表型的鉴定

参考Edwards等^[9]的方法,取对数期生长的RAW264.7细胞以 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,分别用小鼠重组IFN- γ (终浓度20 ng/mL)+LPS(终浓度100 ng/mL)、小鼠重组IL-4(终浓度20 ng/mL)处理之,48 h后即可诱导出M1型和M2型巨噬细胞,以未经处理的RAW264.7细胞为空白对照组。按RNA提取试剂盒说明分别提取M1型、M2型、空白对照组3组细胞的RNA,将其逆转录成cDNA,以cDNA为模板进行实时定量PCR扩增,测定各组细胞*iNOS* mRNA和*ARG-1* mRNA转录水平,引物序列如下:*iNOS*上游引物为5'-CCC TTC AAT GGT TGG TAC ATG G-3',下游引物为5'-ACA TTG ATC TCC GTG ACA GCC-3';*ARG-1*上游引物为5'-CAT ATC TGC CAA AGA CAT CGT-3',下游引物为5'-CCA GCT TGT CTA CTT CAG TCA-3';内参*GAPDH*上游引物为5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3',下游引物为5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,共39个循环;熔解曲线65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C递增,每0.5 $^{\circ}$ C 5 s,每个反应做3个复孔。通过Western blot法检测M1型、M2型、空白对照组3组细胞*iNOS*和*ARG-1*蛋白表达水平,一抗为兔*iNOS*多克隆抗体(1:1 000)、小鼠*ARG-1*单克隆抗体(1:5 000)、小鼠 β -actin单克隆内参抗体(1:5 000);二抗为HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:10 000)、HRP标记的山羊抗兔IgG(1:10 000),Western blot检测方法同上,用ECL化学发光试剂盒在Bio-Rad凝胶成像仪上显影,使用Image Lab分析条带灰度值。

1.5 SPIONs-DNA复合物对M2型巨噬细胞表型的影响

在钕-铁-硼稀土强磁作用下,将SPIONs-DNA复合物转染上述已诱导成功的M2型巨噬细胞,设重组质粒DNA(S1)转染组、空质粒PS-EGFP-SP转染组、SPIONs转染组为对照组,设未转染质粒及复合物的M2型细胞为空白对照组。通过Real-time PCR检测不同处理组M2型巨噬细胞*iNOS* mRNA、*ARG-1* mRNA转录水平,*iNOS*和*ARG-1*引物序列同上,PCR反应程序同上;Western blot法检测不同处理组M2型巨噬细胞*iNOS*和*ARG-1*蛋白表达水平,明确SPIONs-DNA复合物是否可诱导M2型巨噬细胞转化为M1型巨噬细胞。

1.6 SPIONs-DNA复合物转染的M2型巨噬细胞及RAW264.7细胞对LLC细胞的影响

1.6.1 共培养系统的建立 选择孔径为0.4 μm 的上室和24孔培养板建立Transwell共培养系统。上室接种处于对数期的LLC细胞(含细胞 1×10^5 个),下室接种不同表型的巨噬细胞(含细胞 2×10^5 个)。根据下室内的细胞类型分为:①(1)SPIONs-DNA转染的M2型细胞组;(2)SPIONs-DNA转染的RAW264.7细胞组;(3)M1型细胞组;(4)M2型细胞组;(5)RAW264.7细胞组;(6)空白对照组,未接种任何细胞。每天在下室更换1/3培养液,连续培养4天。

1.6.2 绘制LLC细胞生长曲线 上述各个共培养组分别设4个时间平行孔,每个时间点设2个复孔,实验重复3次。每隔24 h,连续4天分别对上室的LLC细胞进行锥虫蓝染色,计算每个时间点的平均活细胞数。以培养时间为横坐标、平均细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.6.3 CCK-8法检测LLC细胞增殖情况 上述各个共培养组,每隔24 h连续4天分别用胰酶消化上室的LLC细胞成单个细胞,取100 μL 细胞悬液于96孔板,加入10 μL CCK-8充分混匀,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱孵育1 h后,用酶标仪测定波长为450 nm的吸光度(*D*)值,以空白孔调零,记录结果并绘制LLC细胞增殖能力曲线。每组细胞均设2个复孔,实验重复3次。

1.6.4 硝酸还原酶法测定共培养液上清NO含量 取上述各个共培养组24 h后的共培养液上清,严格按试剂盒说明书操作测定NO含量,每组样本设3个复孔,取平均值计算,实验重复3次。

1.6.5 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测LLC细

胞的凋亡率 共培养48 h后,分别用胰酶消化各个共培养组上室中LLC细胞,收集细胞于离心管中1 000 r/min离心5 min,加入500 μL PBS缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL,FCM检测LLC细胞凋亡率。

1.7 统计学分析

所有实验均独立重复3次,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 25.0软件进行数据分析,各组间比较用单因素方差分析法(One-Way ANOVA);两组数据的比较使用独立样本的*t*检验; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

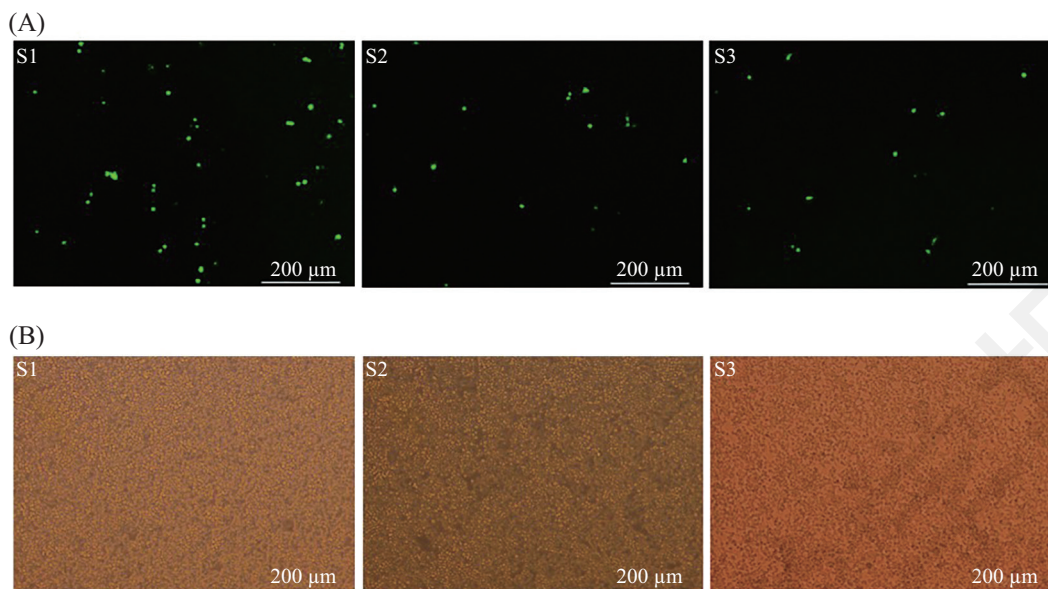
2 结果

2.1 重组pSilencer-EGFP-SP-p110质粒的转染及功能验证

2.1.1 重组pSilencer-EGFP-SP-p110质粒成功转染RAW264.7细胞 3条重组质粒转染细胞24 h后,用倒置荧光显微镜观察到重组质粒S1、S2、S3转染的细胞均可表达绿色荧光蛋白(图1),且重组质粒S1转染的细胞荧光密度相对于重组质粒S2和S3转染的细胞高。

2.1.2 重组质粒转染的RAW264.7细胞PI3K γ p110 mRNA和蛋白的表达水平 Real-time PCR结果显示(图2A),重组质粒转染RAW264.7细胞24 h后,五组细胞PI3K γ p110 mRNA的相对转录水平为: S1重组质粒转染组(0.35 ± 0.21) < S3重组质粒转染组(0.36 ± 0.21) < S2重组质粒转染组(0.43 ± 0.16) < 空质粒对照组(0.71 ± 0.26) < 空白对照组(定为1),通过组间比较,3条重组质粒S1、S2、S3转染组与空白对照组之间PI3K γ p110 mRNA转录水平的差异均具有统计学意义($P < 0.01$),但空质粒对照组与空白对照组PI3K γ p110 mRNA转录水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

Western blot结果(图2B和图2C)显示,5组细胞的PI3K γ p110蛋白的相对表达水平为: S1重组质粒转染组(0.001 ± 0.001) < S2重组质粒转染组(0.006 ± 0.003) < S3重组质粒转染组(0.009 ± 0.005) < PS-EGFP-SP空质粒对照组(0.044 ± 0.005) < 空白对照组(0.047 ± 0.004),通过组间比较,3条重组质粒S1、S2、S3转染组与空质粒对照组和空白对照组之间PI3K γ p110蛋白表达水平的差异均具有统计学意义($P < 0.01$),但空质粒对照组与空白对照组之间PI3K γ



A: 重组质粒转染RAW264.7细胞24 h后(荧光显微镜); B: 重组质粒转染RAW264.7细胞24 h后(相差显微镜)。

A: the plasmid transfected cells under fluorescence microscope; B: the plasmid transfected cells under ordinary optical microscopy.

图1 荧光显微镜观察pSilencer-EGFP-SP-p110重组质粒转染RAW264.7的绿色荧光

Fig.1 Observation of plasmid transfected into RAW264.7 cell using fluorescence microscope

p110蛋白表达水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。结果表明, 3条重组质粒均可显著降低RAW264.7细胞PI3K γ p110 mRNA和蛋白的表达, 且重组质粒S1转染组细胞PI3K γ p110 mRNA和蛋白的表达水平最低, 因此我们选取重组质粒S1进行后续实验。

2.2 SPIONs-DNA复合物的制备及功能验证

2.2.1 SPIONs的表征及特性 通过透射电镜检测SPIONs的表征及分散性(图3), 表面包被PEI-600的SPIONs直径约为10 nm, 似球型, 分散性好; pH7.4时表面zeta电位约为+40 mV; 具有超顺磁性, 饱和磁化强度约60 emu/g。

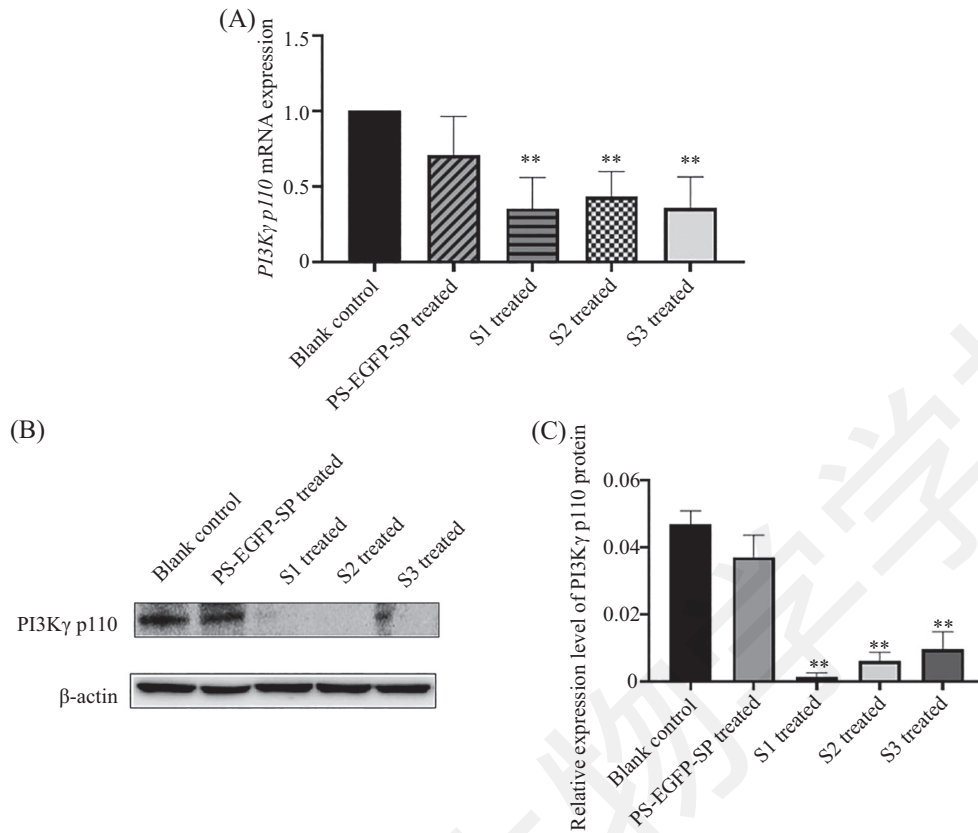
2.2.2 SPIONs与重组质粒DNA结合率的测定及琼脂糖凝胶电泳检测 当SPIONs与重组质粒DNA(S1)以质量比6:1混合时显示出较好的结合率(图4A), 结合率高达100%。当保持质粒DNA量不变, 逐渐增加SPIONs量时, 结合率基本处于平台期, 这是由于SPIONs与重组质粒DNA靠静电吸附结合, 一定量带正电荷的SPIONs只能吸附相当量带负电荷的重组质粒DNA。琼脂糖凝胶电泳结果显示(图4B), 与等质量的游离重组质粒DNA(S1)相比, SPIONs-DNA复合物中未见游离的质粒DNA泳出, 这表明SPIONs与重组质粒DNA有很好的结合率。

2.2.3 普鲁士蓝染色法观察SPIONs-DNA复合物在细胞内的分布 SPIONs-DNA转染RAW264.7细胞

24 h后, 通过普鲁士蓝染色观察到细胞胞浆内有多少不等的蓝染铁颗粒, 大部分的SPIONs-DNA复合物包绕在细胞核周围, 而细胞核未检测到(图5)。

2.2.4 SPIONs-DNA复合物转染的RAW264.7细胞PI3K γ p110 mRNA和蛋白的表达水平 Real-time PCR结果(图6A)显示, SPIONs-DNA转染RAW264.7细胞24 h后, 3组细胞PI3K γ p110 mRNA的相对转录水平为: SPIONs-DNA转染组(0.07 ± 0.11)<DNA(S1)转染组(0.34 ± 0.29)<空白对照组(定为1)。通过组间比较, SPIONs-DNA复合物转染组和重组质粒DNA(S1)转染组与空白对照组之间PI3K γ p110 mRNA转录水平的差异均具有统计学意义($P<0.01$), 但SPIONs-DNA转染组与重组质粒DNA(S1)转染组之间PI3K γ p110 mRNA转录水平无显著性差异($P>0.05$)。

Western blot结果(图6B和图6C)显示, 3组细胞PI3K γ p110蛋白的相对表达水平为: SPIONs-DNA转染组(0.0021 ± 0.0006)<重组质粒DNA(S1)转染组(0.0024 ± 0.0007)<空白对照组(0.0180 ± 0.0190), 通过组间比较, SPIONs-DNA复合物转染组、重组质粒DNA(S1)转染组与空白对照组之间PI3K γ p110蛋白表达水平的差异均具有统计学意义($P<0.05$), 但SPIONs-DNA复合物转染组与重组质粒DNA(S1)转染组之间PI3K γ p110蛋白表达水平无显著差异



A: Real-time PCR检测5组细胞PI3Kγ p110 mRNA水平; B: 5组细胞PI3Kγ p110的Western blot检测结果; C: 5组细胞PI3Kγ p110蛋白的相对表达水平, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较。Blank control group: 未转染质粒的RAW264.7空白对照组; PS-EGFP-SP treated group: 转染PS-EGFP-SP空质粒载体对照组; S1 treated group: 实验组或转染重组质粒S1的质粒转染组; S2 treated group: 实验组或转染重组质粒S2的质粒转染组; S3 treated group: 实验组或转染重组质粒S3的质粒转染组。

A: mRNA level of PI3Kγ p110 in the 5 groups detected by Real-time PCR. B: Western blot detection results of protein levels of PI3Kγ p110 in the 5 groups. C: the relative protein level of PI3Kγ p110 in the 5 groups, ** $P < 0.01$ compared with the blank control group. Blank control group: the cells treated do not treated; PS-EGFP-SP treated group: the cells transfected with PS-EGFP-SP empty plasmid; S1 treated group: the cells transfected with S1 recombinant plasmid; S2 treated group: the cells transfected with S2 recombinant plasmid; S3 treated group: the cells transfected with S3 recombinant plasmid.

图2 RAW264.7细胞PI3Kγ p110 mRNA和蛋白的表达水平

Fig.2 mRNA and protein level of PI3Kγ p110 in RAW264.7 cells

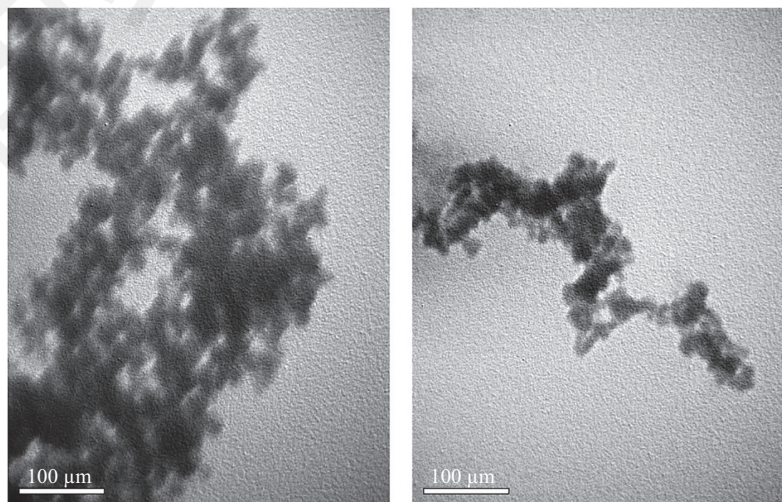
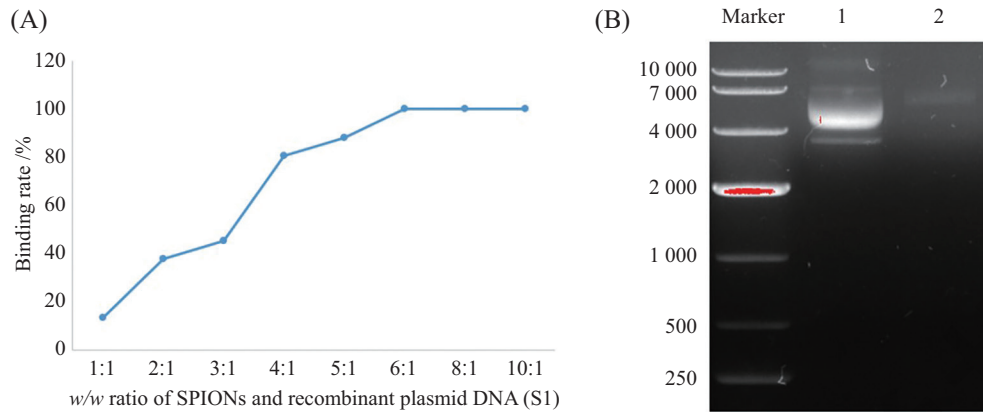


图3 MagTransPloy试剂中SPIONs-PEI分散于水相的透射电子显微镜图

Fig.3 Transmission electron microscopy of SPIONs-PEI dispersed in aqueous phase in MagTransPloy reagent

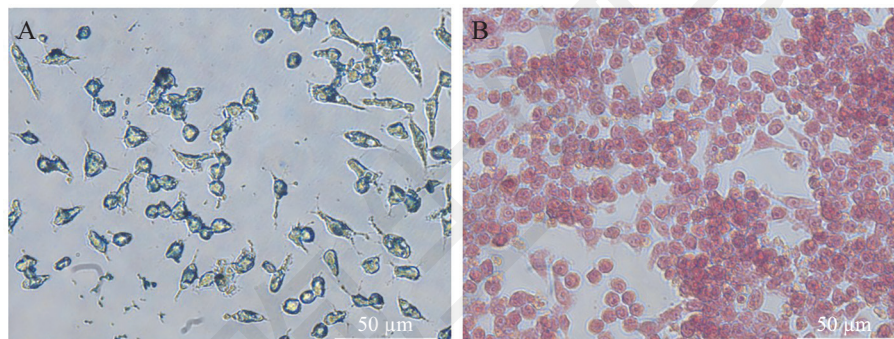


A: SPIONs与重组质粒DNA(S1)在不同质量比时的结合能力; B: SPIONs与重组质粒DNA(S1)的结合实验(1为重组质粒S1; 2为SPIONs与重组质粒S1结合比列为6:1时复合物)。

A: ability of precipitating DNA at different W/W ratio of SPIONs and recombinant plasmid DNA (S1); B: combination experiment of SPIONs and recombinant plasmid DNA (S1) (1 is recombinant plasmid S1; 2 is SPIONs precipitating recombinant plasmid S1 at the ratio of 6:1).

图4 SPIONs与重组质粒DNA(S1)结合能力的验证

Fig.4 Verification of SPIONs binding ability to recombinant plasmid DNA (S1)



A: SPIONs-DNA转染RAW264.7细胞24 h后(相差显微镜); B: 未转染SPIONs-DNA复合物RAW264.7细胞(相差显微镜)。

A: the SPIONs-DNA transfected cells under ordinary optical microscopy; B: the SPIONs-DNA untransfected cells under ordinary optical microscopy.

图5 普鲁士蓝染色结果

Fig.5 Prussian blue staining results

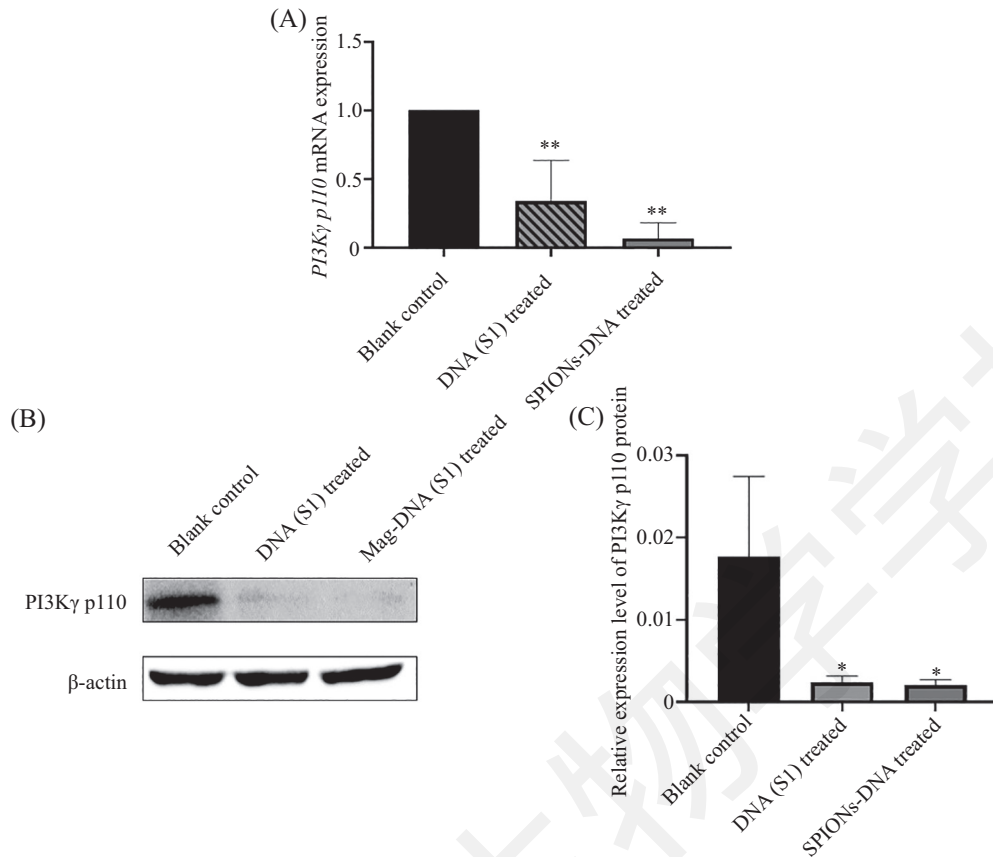
($P>0.05$)。结果表明, SPIONs-DNA复合物和重组质粒S1均可显著降低RAW264.7细胞PI3K γ p110 mRNA和蛋白的表达水平。

2.3 M1、M2型巨噬细胞的诱导及表型的鉴定

Real-time PCR结果显示(图7A), 不同处理组处理细胞48h后3组细胞*iNOS* mRNA的相对转录水平为: IFN- γ +LPS处理组(1.22 ± 0.38)>IL-4处理组($0.000\ 11\pm 0.000\ 02$)>空白对照组($0.000\ 05\pm 0.000\ 06$), 通过组间比较, IFN- γ +LPS处理组与IL-4处理组和空白对照组之间*iNOS* mRNA转录水平的差异均具有统计学意义(<0.001); 而IL-4处理组与空白对照组之间*iNOS* mRNA转录水平的差异不具有统计学意义($P>0.05$), 说明IFN- γ +LPS处理组*iNOS* mRNA的转录水平明显高于IL-4处理组及空白对照组。3组细胞*ARG-1* mRNA的相

对转录水平为: IL-4处理组(1.34 ± 0.26)>空白对照组(0.05 ± 0.04)>IFN- γ +LPS处理组(0.04 ± 0.003), 通过组间比较, IL-4处理组与IFN- γ +LPS处理组和空白对照组之间*ARG-1* mRNA转录水平的差异均具有统计学意义($P<0.001$); 而IFN- γ +LPS处理组与空白对照组之间*ARG-1* mRNA转录水平的差异不具有统计学意义($P>0.05$), 说明IL-4处理组*ARG-1* mRNA转录水平明显高于IFN- γ +LPS处理组及空白对照组。

Western blot结果显示(图7B), 3组细胞*iNOS*蛋白的相对表达水平为: IFN- γ +LPS处理组(1.574 ± 0.153)>IL-4处理组(0.021 ± 0.005)>空白对照组(0.015 ± 0.004), 通过组间比较, IFN- γ +LPS处理组与IL-4处理组和空白对照组之间*iNOS*蛋白表达的差异具有统计学意义($P<0.001$); 而IL-4处理



A: Real-time PCR法检测RAW264.7细胞PI3Kγ p110 mRNA水平; B: 3组细胞PI3Kγ p110的Western blot检测结果; C: 3组细胞PI3Kγ p110蛋白的相对表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较。Blank control group: 未转染质粒的RAW264.7空白对照组; DNA(S1) treated group: 转染S1重组质粒的对照组; SPIONs-DNA treated group: 实验组或转染SPIONs-DNA复合物的转染组。

A: mRNA level of PI3Kγ p110 in RAW264.7 cell detected by Real-time PCR; B: Western blot detection results of protein levels of PI3Kγ p110 in the 3 groups. C: the relative protein level of PI3Kγ p110 in the 3 groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the blank control group. Blank control group: the cells treated do not treated; DNA(S1) treated group: the cells transfected with DNA (S1) recombinant plasmid; SPIONs-DNA treated group: the cells transfected with SPIONs-DNA.

图6 SPIONs-DNA复合物对RAW264.7细胞PI3Kγ p110 mRNA和蛋白水平的影响

Fig.6 Effect of SPIONs-DNA complex on PI3Kγ p110 mRNA and protein levels in RAW264.7 cells

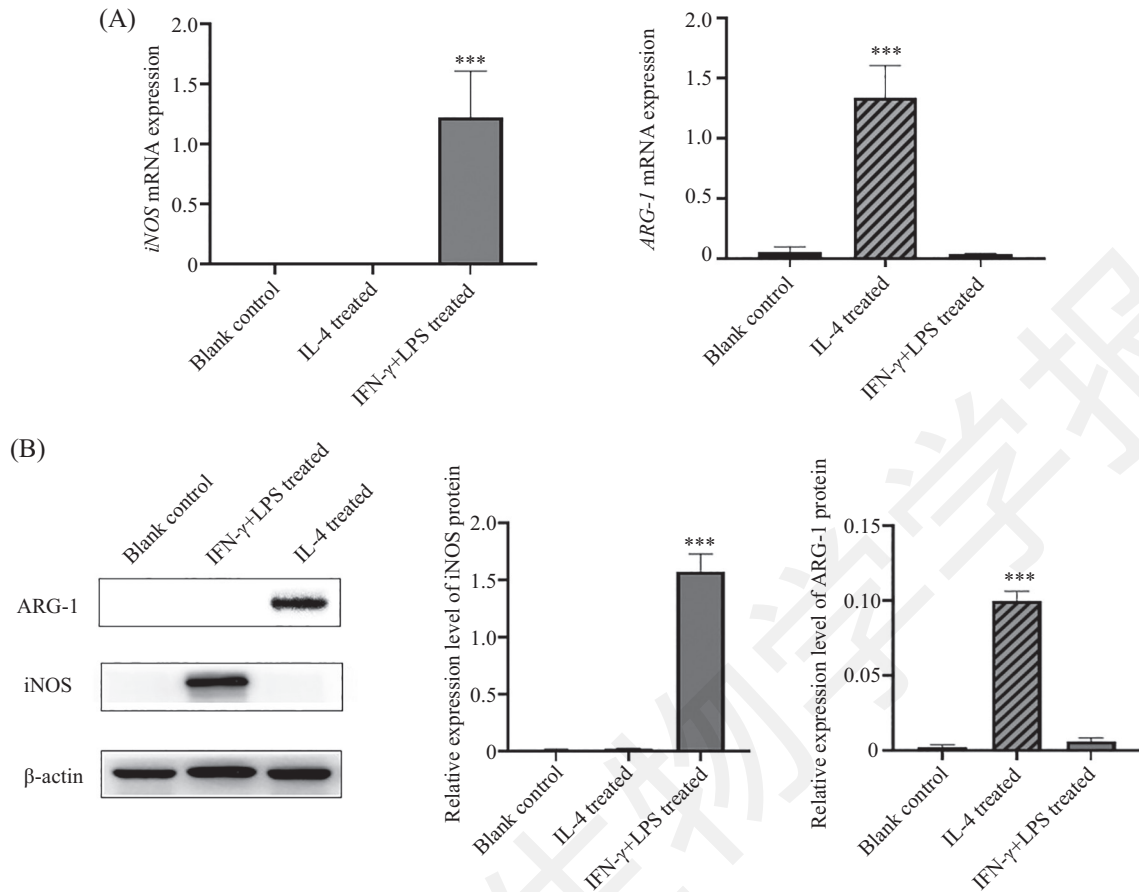
组与空白对照组之间iNOS蛋白表达的差异不具有统计学意义($P > 0.05$), 说明IFN-γ+LPS处理组iNOS蛋白的表达明显高于IL-4处理组及空白对照组。3组细胞ARG-1蛋白的相对表达水平为: IL-4处理组(0.100 ± 0.006) > IFN-γ+LPS处理组(0.006 ± 0.002) > 空白对照组(0.002 ± 0.001), 通过组间比较, IL-4处理组与IFN-γ+LPS处理组和空白对照组的ARG-1蛋白表达的差异具有统计学意义($P < 0.001$); 而IFN-γ+LPS处理组与空白对照组之间蛋白表达的差异不具有统计学意义($P > 0.05$), 说明IL-4处理组ARG-1蛋白表达的水平明显高于IFN-γ+LPS处理组及空白对照组。

以上结果表明, 小鼠重组IFN-γ联合LPS刺激RAW264.7细胞48 h后, 细胞高表达M1型特异性标志物iNOS, 成功极化成M1型巨噬细胞; 小鼠重组IL-4

刺激RAW264.7细胞48 h后, 细胞高表达M2型特异性标志物ARG-1, 成功极化成M2型巨噬细胞。

2.4 SPIONs-DNA复合物对M2型巨噬细胞表型的影响

Real-time PCR结果显示(图8A), 5组细胞iNOS mRNA的相对转录水平为: SPIONs-DNA转染组(1.241 ± 0.172) > DNA(S1)转染组(0.819 ± 0.473) > DNA(pS-EGFP-SP)转染组(0.146 ± 0.105) > 空白对照组(0.005 ± 0.006) > SPIONs转染组(0.003 ± 0.001); 通过组间比较, SPIONs-DNA转染组和重组质粒DNA(S1)转染组与所有对照组之间iNOS mRNA转录水平的差异均具有统计学意义($P < 0.001$); 而DNA(pS-EGFP-SP)转染组、SPIONs转染组与空白对照组之间iNOS mRNA转录水平的差异无统计学意义。



A: Real-time PCR法检测诱导细胞*iNOS*和*ARG-1* mRNA转录水平; B: Western blot检测诱导细胞*iNOS*和*ARG-1*蛋白表达水平; *** P <0.001, 与空白对照组比较。Blank control group: 未处理的RAW264.7空白对照组; IFN- γ +LPS treated group: IFN- γ +LPS极化刺激RAW264.7细胞48 h实验组; IL-4 treated group: IL-4极化刺激RAW264.7细胞48 h实验组。

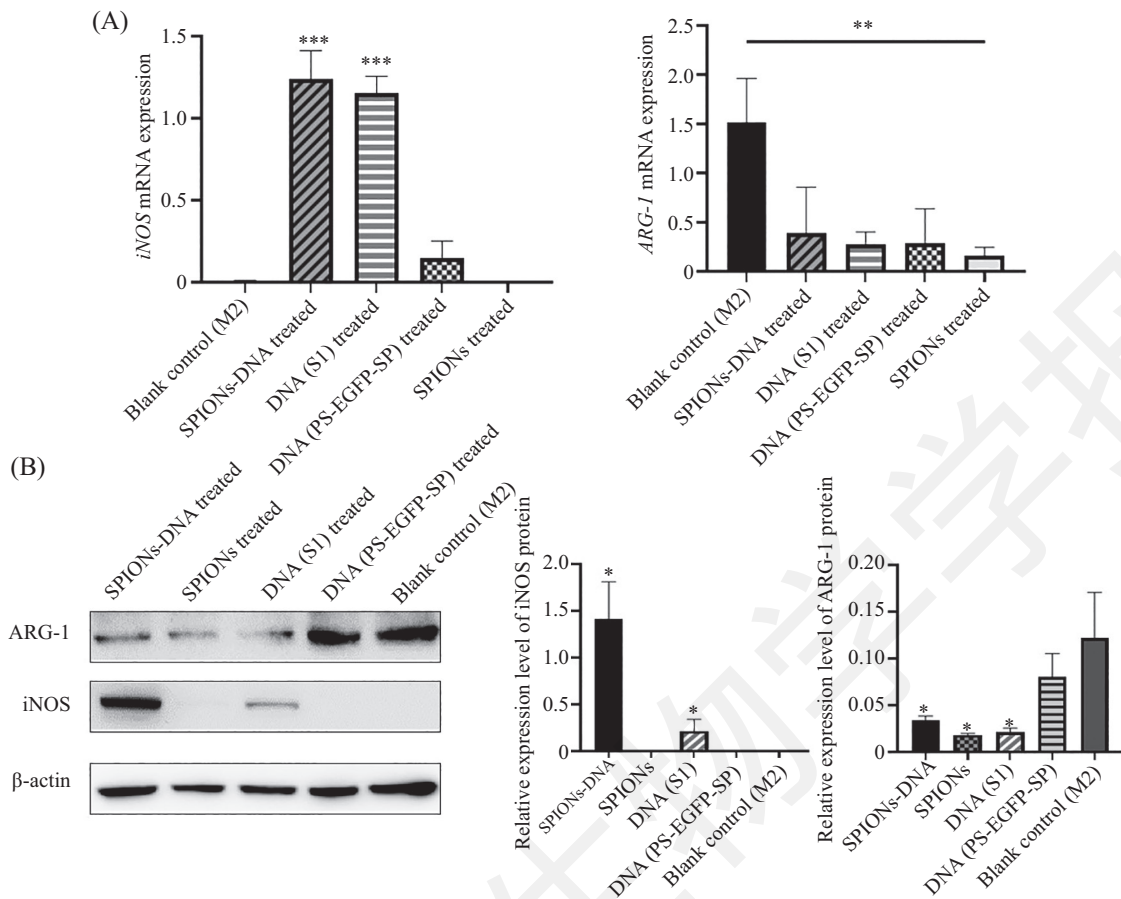
A: mRNA level of *iNOS* and *ARG-1* in induced cell detected by Real-time PCR; B: protein levels of *iNOS* and *ARG-1* in induced cell detected by Western blot; *** P <0.001 compared with the blank control group. Blank control group: the cells treated do not treated; IFN- γ +LPS treated group: the cells treated with IFN- γ +LPS for 48 hours; IL-4 treated group: the cells treated with IL-4 for 48 hours.

图7 M1、M2型巨噬细胞表型的鉴定

Fig.7 Identification of M1 and M2 macrophage phenotypes

义 (P >0.05), 说明 SPIONs-DNA复合物和重组质粒 S1 转染 M2 型巨噬细胞后均可显著增加细胞 *iNOS* mRNA 的转录水平, 而 DNA(pS-EGFP-SP) 与单独使用 SPIONs 对细胞 *iNOS* mRNA 的转录水平无显著影响。5 组细胞 *ARG-1* mRNA 的相对转录水平为: SPIONs 转染组 (0.162 ± 0.082) < DNA(S1) 转染组 (0.274 ± 0.127) < DNA(PS-EGFP-SP) 转染组 (0.282 ± 0.355) < SPIONs-DNA 转染组 (0.389 ± 0.469) < 空白对照组 (1.515 ± 0.446); 通过组间比较, 各个转染组与空白对照组之间 *ARG-1* mRNA 转录水平的差异均具有统计学意义 (P <0.01); 而各个转染组之间 *ARG-1* mRNA 转录水平的差异不具有统计学意义 (P >0.05), 说明各个转染组均可降低 M2 型巨噬细胞 *ARG-1* mRNA 的转录水平。

Western blot 结果显示 (图 8B), 5 组细胞 *iNOS* 蛋白的相对表达水平为: SPIONs-DNA 转染组 (1.409 ± 0.402) > DNA(S1) 转染组 (0.359 ± 0.016) > SPIONs 转染组 (0.003 ± 0.001) > DNA(pS-EGFP-SP) 转染组 (0.0003 ± 0.0001) > 空白对照组 (0.0002 ± 0.0001); 通过组间比较, SPIONs-DNA 转染组和重组质粒 DNA(S1) 转染组与所有对照组之间 *iNOS* 蛋白表达的差异均具有统计学意义 (P <0.05), 而其余转染组与空白对照组之间蛋白表达的差异不具有统计学意义 (P >0.05), SPIONs-DNA 转染组与 DNA(S1) 转染组之间 *iNOS* 蛋白表达的差异具有统计学意义 (P <0.05); 说明 SPIONs-DNA 复合物和重组质粒 DNA(S1) 转染 M2 型巨噬细胞后均可显著增加细胞 *iNOS* 蛋白的表达, 并且 SPIONs-DNA 转染组 *iNOS*



Blank control group: 未处理的M2型空白对照组; SPIONs-DNA treated group: SPIONs-DNA转染M2型巨噬细胞24 h实验组; DNA(S1) treated group: DNA(S1)转染M2型巨噬细胞24 h对照组; DNA(PS-EGFP-SP) treated group: DNA(PS-EGFP-SP)转染M2型巨噬细胞24 h对照组; SPIONs treated group: SPIONs转染M2型巨噬细胞24 h对照组。A: Real-time PCR法检测M2型巨噬细胞*iNOS*和*ARG-1* mRNA水平; B: Western blot检测M2型巨噬细胞*iNOS*和*ARG-1*蛋白表达水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与未处理M2型空白对照组比较。

Blank control group: the M2 macrophages treated do not treated; SPIONs-DNA treated group: the M2 macrophages transfected with SPIONs-DNA for 24 hours; DNA(S1) treated group: the M2 macrophages transfected with DNA(S1) for 24 hours; DNA(PS-EGFP-SP) treated group: the M2 macrophages transfected with DNA(PS-EGFP-SP) for 24 hours; SPIONs treated group: the M2 macrophages transfected with SPIONs for 24 hours. A: mRNA level of *iNOS* and *ARG-1* in M2 macrophages detected by Real-time PCR; B: protein levels of *iNOS* and *ARG-1* in M2 macrophages detected by Western blot; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the blank control group.

图8 SPIONs-DNA复合物对M2型巨噬细胞表型的影响

Fig.8 Effect of SPIONs-DNA Complex on Phenotype of M2 Macrophages

蛋白的表达明显高于重组质粒DNA(S1)转染组, 而DNA(pS-EGFP-SP)与单独使用SPIONs对细胞*iNOS*蛋白的表达无显著影响。5组细胞*ARG-1*蛋白的相对表达水平为: 空白对照组(0.12 ± 0.05) > DNA(pS-EGFP-SP)转染组(0.08 ± 0.03) > SPIONs-DNA转染组(0.033 ± 0.005) > DNA(S1)转染组(0.021 ± 0.004) > SPIONs转染组(0.018 ± 0.002); 通过组间比较, SPIONs-DNA转染组、DNA(S1)转染组、SPIONs转染组与空白对照组之间*ARG-1*蛋白表达水平的差异均具有统计学意义($P < 0.05$); 而DNA(PS-EGFP-SP)转染组与空白对照组之间*ARG-1*蛋白表达水平的差异不具有统计学意义($P > 0.05$), 说明SPIONs-DNA转染组、DNA(S1)转

染组、SPIONs转染组均可显著降低M2型巨噬细胞*ARG-1*蛋白表达水平。

以上结果表明, SPIONs-DNA复合物和重组质粒DNA(S1)转染M2型巨噬细胞24 h后均可使细胞转化为M1型, 高表达M1型巨噬细胞特异性标志物*iNOS*, 且SPIONs-DNA复合物的转化强度明显高于重组质粒DNA。

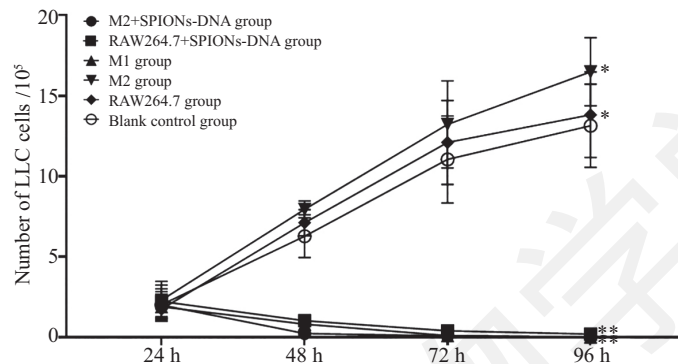
2.5 SPIONs-DNA复合物转染的M2型巨噬细胞及RAW264.7细胞对LLC细胞的影响

2.5.1 绘制LLC细胞生长曲线 根据各组锥虫蓝染色活细胞计数绘制LLC细胞生长曲线(图9), M2+SPIONs-DNA组、RAW264.7+SPIONs-DNA组、

M1型细胞组3组共培养的LLC细胞生长速度明显低于其余对照组($P<0.01$); 未转染SPIONs-DNA的M2型细胞组和RAW264.7细胞组共培养的LLC细胞生长速度明显高于空白对照组($P<0.05$)。结果表明, 转染了SPIONs-DNA的M2型巨噬细胞及RAW264.7细胞能够显著抑制LLC细胞生长, 而未转染SPIONs-DNA的M2型巨噬细胞和RAW264.7细胞能促进LLC

细胞的生长。

2.5.2 CCK-8法检测LLC细胞增殖情况 共培养24 h(图10), 各个共培养组LLC细胞的增值速度在各组间比较无明显的差异($P>0.05$); 共培养48 h、72 h和96 h, SPIONs-DNA转染的M2型细胞组、SPOPNS-DNA转染的RAW264.7细胞组、M1型细胞组共培养的LLC细胞增殖速度明显低于其余对照组($P<0.01$); M2型

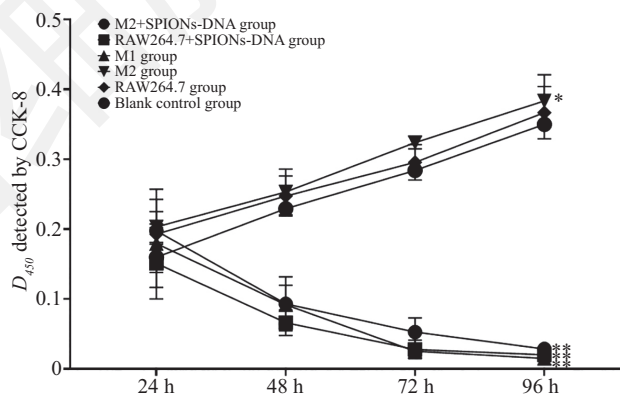


M2+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的M2型巨噬细胞共培养实验组; RAW264.7+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的RAW264.7细胞共培养实验组; M1 group: 下室接种M1型巨噬细胞共培养对照组; M2 group: 下室接种M2型巨噬细胞共培养对照组; RAW264.7 group: 下室接种RAW264.7细胞共培养对照组; Blank control group: 下室未接种细胞空白对照组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空白对照组比较。

M2+SPIONs-DNA group: co-culture group of M2 macrophages transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; RAW264.7+SPIONs-DNA group: co-culture group of RAW264.7 cells transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; M1 group: co-culture group of M1 macrophage in the lower chamber; M2 group: co-culture group of M2 macrophage in the lower chamber; RAW264.7 group: co-culture group of RAW264.7 cells in the lower chamber; Blank control group: uninoculated cells in lower compartment, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the blank control group.

图9 各个共培养组LLC细胞生长曲线

Fig.9 Growth curve of LLC cells in each co-culture group

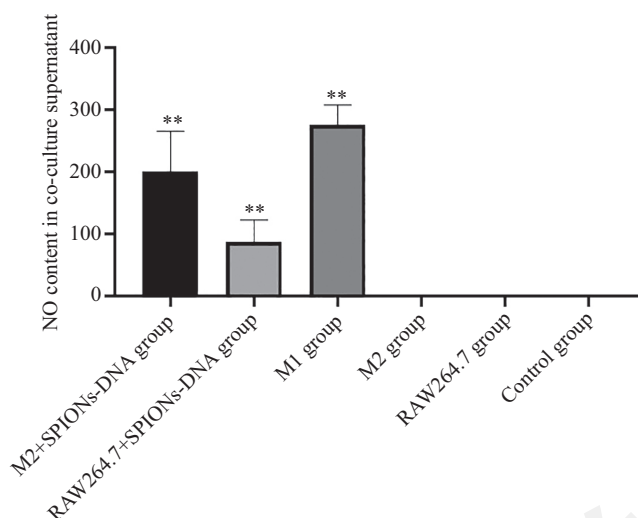


M2+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的M2型巨噬细胞共培养实验组; RAW264.7+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的RAW264.7细胞共培养实验组; M1 group: 下室接种M1型巨噬细胞共培养对照组; M2 group: 下室接种M2型巨噬细胞共培养对照组; RAW264.7 group: 下室接种RAW264.7细胞共培养对照组; Blank control group: 下室未接种细胞空白对照组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空白对照组比较。

M2+SPIONs-DNA group: co-culture group of M2 macrophages transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; RAW264.7+SPIONs-DNA group: co-culture group of RAW264.7 cells transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; M1 group: co-culture group of M1 macrophage in the lower chamber; M2 group: co-culture group of M2 macrophage in the lower chamber; RAW264.7 group: co-culture group of RAW264.7 cells in the lower chamber; Blank control group: uninoculated cells in lower compartment, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the blank control group.

图10 CCK-8法检测6组LLC细胞增殖能力

Fig.10 The proliferation of LLC in 6 groups detected by CCK-8



M2+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的M2型巨噬细胞共培养实验组; RAW264.7+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的RAW264.7细胞共培养实验组; M1 group: 下室接种M1巨噬细胞共培养对照组; M2 group: 下室接种M2型巨噬细胞共培养对照组; RAW264.7 group: 下室接种RAW264.7细胞共培养对照组; Blank control group: 下室未接种细胞空白对照组; ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较。

M2+SPIONs-DNA group: co-culture group of M2 macrophages transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; RAW264.7+SPIONs-DNA group: co-culture group of RAW264.7 cells transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; M1 group: co-culture group of M1 macrophage in the lower chamber; M2 group: co-culture group of M2 macrophage in the lower chamber; RAW264.7 group: co-culture group of RAW264.7 cells in the lower chamber; Blank control group: uninoculated cells in lower compartment, ** $P < 0.01$ compared with the blank control group.

图11 硝酸还原酶法检测共培养液上清NO含量

Fig.11 NO content in co-culture supernatant detected by nitrate reductase method

细胞组共培养的LLC细胞增殖速度高于空白对照组 ($P < 0.05$); 而RAW264.7细胞组与空白对照组LLC细胞的增殖速度无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 转染SPIONs-DNA的M2型巨噬细胞与RAW264.7细胞均可显著抑制LLC细胞的增殖, M2型巨噬细胞可促进LLC细胞的增殖。

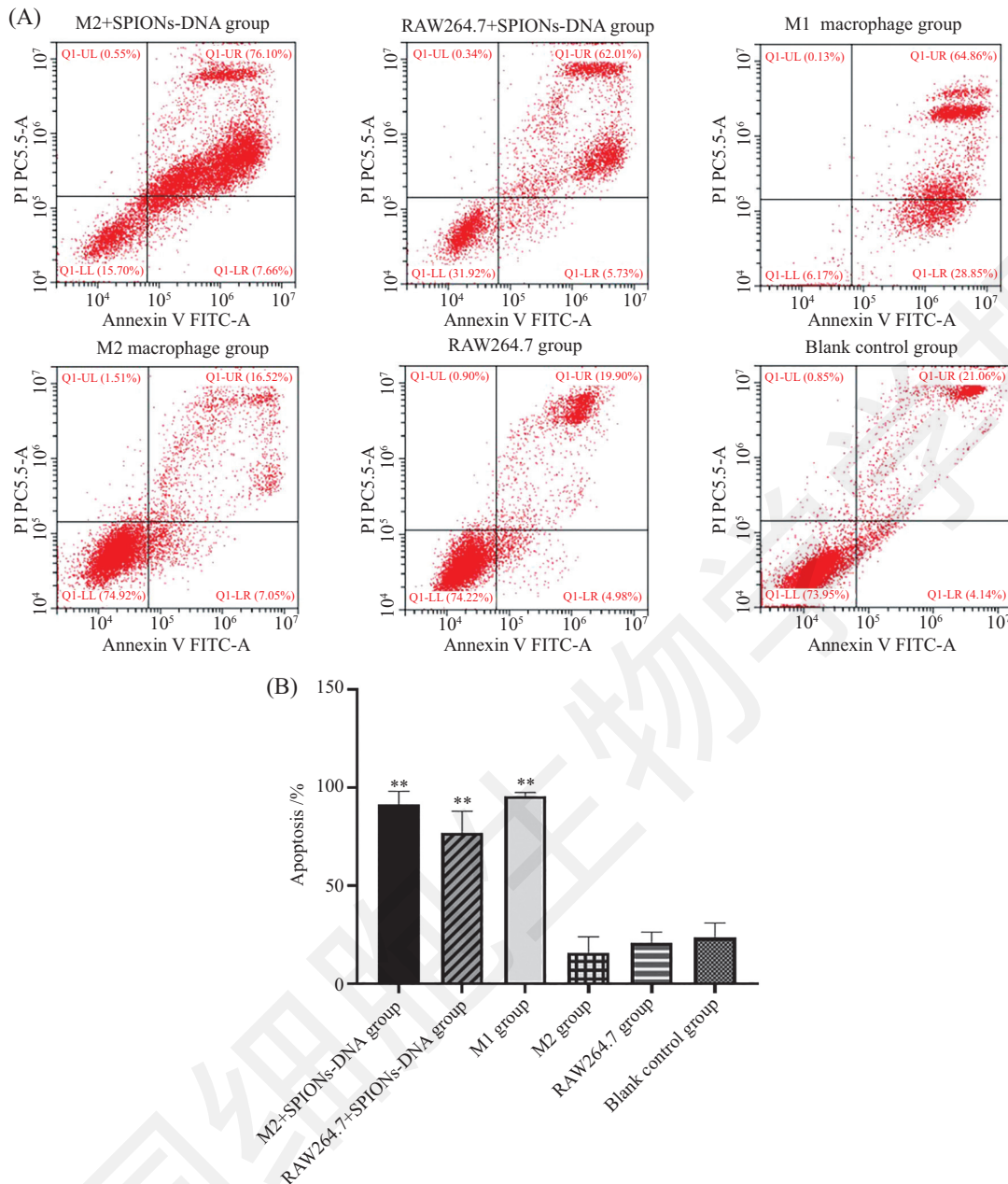
2.5.3 硝酸还原酶法测定共培养液上清NO含量 共培养24 h后, 各组共培养液上清NO含量为: M1型细胞组 (275.92 ± 32.0) > M2+SPIONs-DNA组 (200.01 ± 65.64) > RAW264.7+SPIONs-DNA组 (105.85 ± 2.95), M2型细胞组、RAW264.7细胞组和空白对照组均未能检测到NO的产生(图11), M2+SPIONs-DNA组、RAW264.7+SPIONs-DNA组、M1型细胞组与空白对照组之间的差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明, M2型巨噬细胞及RAW264.7细胞在转染了SPIONs-DNA后能够大量分泌NO。

2.5.4 流式细胞仪检测LLC细胞的凋亡情况 Annexin-V/PI染色之后, 用流式细胞术(FCM)检测各个共培养组LLC细胞同时间段的细胞凋亡率, 结果显示(图12), 6组LLC细胞凋亡率分别

为: M1型细胞组 (95.66 ± 1.73) > M2+SPIONs-DNA组 (91.40 ± 6.63) > RAW264.7+SPIONs-DNA组 (77.08 ± 10.83) > 空白对照组 (54.03 ± 36.07) > RAW264.7细胞组 (20.87 ± 5.46) > M2型细胞组 (15.82 ± 8.08); 经两两组间比较, M2+SPIONs-DNA组、RAW264.7+SPIONs-DNA组、M1型细胞组与空白对照组之间凋亡率的差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$); RAW264.7细胞组和M2型细胞组与空白对照组之间的凋亡率无显著性差异 ($P > 0.05$)。M2+SPIONs-DNA组、RAW264.7+SPIONs-DNA组、M1型细胞组的早期凋亡和晚期凋亡都明显高于空白对照组、M2型细胞组和RAW264.7细胞组。结果表明, M2型巨噬细胞和RAW264.7细胞在转染SPIONs-DNA后明显促进了LLC细胞的凋亡。

3 讨论

MΦ是免疫系统的重要组成部分, 在机体中发挥重要的防御功能, 其表型和功能具有极大的可塑性。MΦ在不同的微环境刺激下极化为不同的表型: (1)经典活化的MΦ, 又称M1型MΦ, 主要分泌促炎性细胞因子, 如IL-12、IL-16以及iNOS等, 发挥抗肿瘤作用; (2)替代活化的MΦ, 又称M2型MΦ, 高分泌IL-



A: 6组LLC细胞的凋亡情况; B: 6组LLC细胞的凋亡率; ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较。M2+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的M2型巨噬细胞共培养实验组; RAW264.7+SPIONs-DNA group: 下室接种转染SPIONs-DNA的RAW264.7细胞共培养实验组; M1 group: 下室接种M1巨噬细胞共培养对照组; M2 group: 下室接种M2型巨噬细胞共培养对照组; RAW264.7 group: 下室接种RAW264.7细胞共培养对照组; Blank control group: 下室未接种细胞空白对照组。

A: apoptosis of LLC in the 6 groups. B: the apoptosis rate of LLC in the 6 groups; ** $P < 0.01$ compared with the blank control group. M2+SPIONs-DNA group: co-culture group of M2 macrophages transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; RAW264.7+SPIONs-DNA group: co-culture group of RAW264.7 cells transfected with SPIONs-DNA in the lower chamber; M1 group: co-culture group of M1 macrophage in the lower chamber; M2 group: co-culture group of M2 macrophage in the lower chamber; RAW264.7 group: co-culture group of RAW264.7 cells in the lower chamber; Blank control group: uninoculated cells in lower compartment.

图12 流式细胞术检测LLC细胞的凋亡情况

Fig.12 Apoptosis rate of LLC by flow cytometry

10、TGF- β 以及ARG-1等,发挥促肿瘤生长转移的作用^[10-12]。TAM是外周血单核细胞浸润到实体肿瘤组织中演变成的M Φ ,它通过分泌多种炎症因子的方

式影响肿瘤微环境,在肿瘤的发生、生长、侵袭、转移、肿瘤血管和淋巴管生成等过程中发挥重要作用^[13]。近年来,越来越多的研究证实,肿瘤组织中浸

润的大量TAM与M2型MΦ相似^[4]。章必成等^[14]通过研究不同活化表型的MΦ对Lewis小鼠肺癌细胞增殖和侵袭的影响,发现M1型MΦ可产生NO,使Lewis小鼠肺癌细胞增殖和侵袭受到抑制,而M2型MΦ因为高表达血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C),从而促进Lewis小鼠肺癌细胞增殖和侵袭的能力,并且随着肿瘤微环境的进展,M1型MΦ可向M2型极化。DING等^[15]证明了M1型MΦ可以抑制肿瘤的生长,而M2型MΦ的比率与肿瘤增殖呈正相关,与患者预后呈负相关。因此,TAM的表型可作为评估肿瘤恶性程度的指标,是肿瘤侵袭和患者预后的潜在生物标志。目前以TAM为靶标的治疗策略主要集中在将TAM的M2型诱导为M1型,让这些大量“叛变”的、沦为肿瘤“帮凶”的M2型TAM转化为M1型MΦ继续发挥抗肿瘤效应。

目前,某些在M1型向M2型转化过程中发挥重要作用的调控分子^[2],如细胞核因子NF-κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)、信号转导子和转录激活子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)、STAT6等已相继被发现,这些分子及所介导的信号通路均可能成为肿瘤免疫治疗的潜在靶点。PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,除本身具有磷脂酰肌醇激酶和丝氨酸/苏氨酸激酶的活性外,还与v-ras和v-ser等癌基因的产物有关,参与调节细胞的分裂、分化、凋亡等活动。PI3K根据其结构和底物的特异性不同分为I型、II型和III型。其中,I型PI3K是目前研究最深、最广泛的亚型,其与肿瘤的关系也最为密切,已成为肿瘤治疗的重要靶标^[16-17]。2016年Nature刊文表明^[5],在小鼠肿瘤模型中,通过靶向抑制PI3Kγ可以消除免疫抑制并提高免疫检查点抑制剂的作用。通过PI3Kγ基因沉默也证实,MΦ特有的PI3Kγ信号通路的表达可以促进肿瘤的生长,PI3Kγ信号通路的抑制可以促进CD8⁺T细胞向肿瘤部位迁移并提高其抗肿瘤效应。更有研究报道,PI3Kγ在肿瘤信号下才会被激活,而在正常组织中的活性较低,因此靶向抑制TAM的PI3Kγ不会对正常MΦ造成影响^[18]。目前,靶向PI3K信号通路中关键位点的不同类型抑制剂正处于各自不同的临床研究阶段,用以治疗人体恶性肿瘤,例如: IPI549、AS-605240等^[18-19]。但是目前市售的PI3Kγ的抑制剂属PI3Kγ广谱抑制,这对T细胞等免疫细胞的功能也会产生不利效应。本研究所构建的能在MΦ中特

异性启动表达针对鼠PI3Kγ催化亚基p110编码基因(PIK3CG)的siRNA的pSilencer-EGFP-SP-p110重组质粒能靶向并特异性抑制TAM的PI3Kγ,而对其他免疫细胞的PI3Kγ不产生显著影响。

由于现行的病毒载体及脂质体载体在临床应用中存在很多问题和缺陷^[20-21],例如:病毒制备困难;装载外源性DNA大小有限;能诱导宿主免疫反应;具有潜在致癌性和细胞毒性;容易被宿主体内的酶降解等。而本研究所采用的SPIONs作为基因治疗的载体,无毒、无免疫原性,分散性好^[22]。在外加磁场推动下,对细胞膜及血脑屏障的穿透性强;它可通过“摄粒或胞吞”直接进入细胞,以免其负载的药物或基因受吞噬体酶的破坏;在强磁作用下可无创靶向肿瘤并实现安全有效的目的基因的靶向释放,解决了基因载体在靶位点浓度过低的问题;进入体内的SPIONs除部分被人体利用外,其余能通过皮肤、胆汁和肾脏等排除体外,且纳米颗粒在体内的循环时间明显长于普通大小的颗粒,在短时间内不会很快被吞噬细胞清除,从而延长与细胞的接触时间,提高转染效率^[7]。同时,Fe₃O₄纳米粒子可以调节细胞内铁含量,并使MΦ向M1型分化,发挥抗肿瘤的作用^[23]。

本研究成功建立了M1型和M2型MΦ模型,验证了M1型MΦ高表达iNOS, M2型MΦ高表达ARG-1。我们所构建的重组质粒pSilencer-EGFP-SP-p110由SPIONs负载成SPIONs-DNA复合物,在转染M2型MΦ后,成功将M2型MΦ转化为M1型,使细胞高表达iNOS。本研究进一步将SPIONs-DNA复合物转染的M2型MΦ与LLC细胞共培养,发现SPIONs-DNA复合物转染的M2型MΦ能大量分泌NO,明显抑制LLC细胞的生长和增殖,促进LLC细胞的凋亡,这也证实了SPIONs-DNA复合物可将M2型MΦ转化为M1型而发挥抗肿瘤效应。此外,本研究还发现将SPIONs-DNA复合物转染的RAW264.7细胞与LLC细胞共培养后,同样能大量分泌NO,抑制LLC细胞的生长和增殖,促进LLC细胞凋亡,说明SPIONs-DNA转染RAW264.7细胞后能使细胞发挥与M1型MΦ类似的抗肿瘤作用,具体的作用机制还有待于进一步的探究。本研究在基因水平和细胞水平上探索了所构建的纳米质粒复合物SPIONs-DNA对RAW264.7巨噬细胞PI3Kγ p110靶向抑制的效应以及对TAM极化的影响和抗肺癌细胞效应,为研究开发有效的抗肺癌等肿瘤的基因治疗措施奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] 王原来, 卞卡, 章丹丹. 肿瘤中巨噬细胞表型极化的调控机制及中药干预的研究进展[J]. 中国中药杂志(WANG Y L, BIAN K, ZHANG D D. Advance in studies on regulatory mechanism of phenotype polarization of macrophages and intervention with traditional Chinese medicines [J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2015, 40(2): 180-4.
- [2] 王丽飞, 陈刚, 王东昌等. 肿瘤相关巨噬细胞在肺癌中的研究进展[J]. 国际呼吸杂志(WANG L F, CHEN G, WANG D C, et al. Progress of tumor associated macrophages in lung cancer [J]. International Journal of Respiration), 2016, 36(22): 1735-39.
- [3] SOLINAS G, GERMANO G, MANTOVANI A, et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the Cancer-Related inflammation [J]. J Leukocyte Biol, 2009, 86 (5): 1065-73.
- [4] SICA A, LARGHI P, MANCINO A, et al. Macrophage polarization in tumour progression [J]. Semin Cancer Biol, 2008, 18(5): 349-55.
- [5] KANEDA M M, MESSER K S, RALAINIRINA N, et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression [J]. Nature, 2016, 539: 437-42.
- [6] UCHINO K, OCHIYA T, TAKESHITA F. RNAi therapeutics and applications of MicroRNAs in cancer treatment [J]. Jpn J Clin Oncol, 2013, 43(6): 596-607.
- [7] 邓迎春, 张志培, 程庆书, 等. 功能化Fe₃O₄的制备及在基因转染中的应用[J]. 生物医学工程与临床(DENG Y C, ZHANG Z P, CHENG Q S, et al. Preparation and application of functionalized DMNP nanoparticles as gene carrier [J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine), 2009, 13(1): 62-6.
- [8] 吴蕊鑫, 陈全, 贺静荣. 巨噬细胞冠蛋白-1 siRNA对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 中国细胞生物学学报(WU R X, CHEN Q, HE J R. Effect of coronin-1 siRNA on phagocytosis of mouse macrophages [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2018, 40(6): 884-91.
- [9] EDWARDS J P, ZHANG X, FRAUWIRTH K A, et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations [J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1298-307.
- [10] XUAN W, QU Q, ZHENG B, et al. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines [J]. J Leukoc Biol, 2015, 97(1): 61-9.
- [11] JOSEPHS D H, BAX H J, KARAGIANNIS S N. Tumor-associated macrophage polarization and re-education with immunotherapy [J]. Front Biosci, 2015, 7(2): 334-51.
- [12] RAMANATHAN S, JAGANNATHAN N. Tumor associated macrophage: a review on the phenotypes, traits and functions [J]. Iran J Cancer Prev, 2014, 7(1): 1-8.
- [13] BINGLE L, BROWN N J, LEWIS C E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies [J]. J Pathol, 2002, 196(3): 254-65.
- [14] 章必成, 王俊, 赵勇, 等. 不同活化表型的巨噬细胞对Lewis肺癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 第三军医大学学报(ZHANG B C, WANG J, ZHAO Y, et al. Effect of macrophages with different activated phenotype on proliferation and invasion of Lewis lung carcinoma cells [J]. Journal of Third Military Medical University), 2007, 29(11): 1013-6.
- [15] DING P, WANG W M, WANG J K, et al. Expression of Tumor-Associated macrophage in progression of human glioma [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(3): 1625-31.
- [16] CANTLEY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296(5573): 1655-7.
- [17] VANHAESEBROECK B, WHITEHEAD M A, PINEIRO R. Molecules in medicine mini-review: isoforms of PI3K in biology and disease [J]. J Mol Med, 2016, 94(1): 5-11.
- [18] DE HENAU, RAUSCH M, WINKLER D, et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K γ in myeloid cells [J]. Nature, 2016, 539(7629): 443-7.
- [19] EVANS C A, LIU T, LESCARBEAU, et al. Discovery of a selective phosphoinositide-3-kinase (PI3K)- γ inhibitor (IPI-549) as an immuno-oncology clinical candidate [J]. ACS Med Chem Lett, 2016, 7(9): 862-7.
- [20] WILLIAMS D A. Gene therapy advances but struggles to interpret safety data in small animal models [J]. Mol Ther, 2006, 13(6): 1027-8.
- [21] LUO D, SALTZMAN W M. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(8): 893-5.
- [22] ZANGANEH S, HUTTER G, SPITLER R, et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues [J]. Nat Nanotechnol, 2016, 11: 986-94.