

· 论著 ·

基因 miRNA-34a 靶向纳米复合物抗前列腺癌细胞增殖的作用研究

于 森,毛峻琴 (解放军 85 医院药剂科,上海 200052)

[摘要] **目的** 通过构建具有前列腺癌细胞特异性靶向作用的基因载体适配体——聚乙二醇-聚酰胺-胺 (APT-PEG-PAMAM),携带具有抗前列腺癌增殖作用的基因 miRNA-34a,考察载体系统的转染效率及其对前列腺癌细胞的抑制作用。**方法** 运用核磁共振(NMR)鉴定 APT-PEG-PAMAM 基因载体的结构;利用粒径电位仪对 APT-PEG-PAMAM/miRNA 纳米复合物进行表征;利用基因转染实验考察 APT-PEG-PAMAM/miRNA 纳米复合物在前列腺癌细胞(PC3 和 LNCaP)上的表达效果;利用 CCK-8 细胞增殖抑制实验考察 APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a 对前列腺癌细胞的抑制作用。**结果** 通过结构鉴定确定 APT-PEG-PAMAM 合成成功。定性、定量转染效率实验证明,经 APT 进一步修饰后,对 LNCaP 细胞转染效率显著增加,证明 APT 的靶向作用。CCK-8 细胞增殖实验证明,APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a 对前列腺癌细胞具有抑制作用。**结论** APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a 有望成为今后靶向治疗前列腺癌的基因药物。

[关键词] 微 RNA;聚酰胺-胺;靶向治疗;前列腺癌;基因载体

[中图分类号] R737.2;Q78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)06-0539-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.06.016

Functional investigation of a new targeting gene delivery system of miRNA-34a nano-complexes into prostate cancer cell lines

YU Miao, MAO Junqin (Department of Pharmacy, No. 85 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

[Abstract] **Objective** To construct a gene delivery carrier with aptamer-polyethylene glycol-dendrimer-polyamidoamine (APT-PEG-PAMAM), forming nanoparticles to specifically target prostate cancer cell lines, carrying prostate cancer cell proliferative suppressor microRNA: miRNA-34a. We investigated the transfection efficiency of this gene delivery system as well as functionally studied its inhibitory effect on prostate cancer (PCa) cell proliferation. **Methods** The construction of APT-PEG-PAMAM gene carrier was identified and confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR). The nano-complex sizes and zeta potential of APT-PEG-PAMAM gene carrier complexes were measured by zeta sizer. The efficiency of gene transfection of APT-PEG-PAMAM/miRNA nano-complexes were investigated by measuring the expression miRNA-34a in prostate cancer cells (PC3 and LNCaP); the PCa specific cell proliferation inhibition of APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a nano-complexes were investigated by measuring CCK-8 cell proliferation inhibition experiments by comparing with APT-PEG-PAMAM and APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a nano-complexes. **Results** NMR results demonstrated that APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a nano-complexes were successfully synthesized by structural identification. Qualitative and quantitative transfection efficiency experiments data show that the cellular uptake of vectors were concentration-dependent, after the APT further modified it significantly and increased the LNCaP cell transfection efficiency and specificity of PCa cells targeting ability. CCK8 cell proliferation assay data indicated that APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a has the anti-PCa cells effect. **Conclusion** APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a may prove to see its efficacy for near future in pre-clinical and clinical study on the treatment of PCa.

[Key words] microRNA; polyamidoamine; cancer targeting; prostatic cancer; gene vector

前列腺癌(prostatic cancer, PCa)是指发生在前列腺的上皮恶性肿瘤。2012 年我国肿瘤登记地区前列腺癌发病率为 9.92/10 万,列男性恶性肿瘤

发病率的第 6 位^[1]。前列腺癌发病率在 55 岁前处于较低水平,55 岁后逐渐升高,发病率随着年龄的增加而上升,高峰年龄是 70~80 岁。家族遗传型前列腺癌患者发病年龄稍早,年龄≤55 岁的患者占 43%^[2]。对于早期前列腺癌患者可采用根治性治疗方法,能够治愈早期前列腺癌的方法包括:放射性粒子植入、根治性前列腺切除术、根治性外放射治疗。对于中期前列腺癌患者应采用综合治疗方法,如手

[作者简介] 于 森,主管药师,研究方向:纳米靶向制剂。Tel: (021) 81817040;E-mail:13661688861@163.com

[通讯作者] 毛峻琴,主任药师,研究方向:纳米靶向制剂。Tel: (021) 58172412;E-mail,mail:maojq204@163.com

术+放疗、内分泌治疗+放疗等。但这些治疗方法存在不良反应多、毒副作用大、患者依从性差等缺点。因此,针对前列腺癌中晚期基因药物治疗的研究是近年来的热点之一^[3]。

将目的基因靶向、可控并有效表达,是基因治疗成功的关键。前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)是一种前列腺癌表面特异性表达的肿瘤标志物,可作为前列腺癌靶向给药的潜在靶点^[4]。寡核苷酸适配体(aptamer, APT,简称适体)是一种具有特定三维立体结构的双链或单链寡核苷酸,具有体外稳定、易于合成等特点。适体 A10-3.2 是人工合成的第二代寡核苷酸适配体,可与前列腺癌细胞膜表面 PSMA 结合,以介导靶向给药系统向前列腺癌组织富集,实现靶向递送作用^[5]。另外,阳离子聚合物聚酰胺-胺(poly-amidoamine, PAMAM)是一类带有正电荷的树枝状高分子化合物。PAMAM 表面富含氨基,带正电荷,可与带有负电荷的核苷酸通过静电作用结合。同时,在前列腺癌,特别是 p53 突变的前列腺癌中,miRNA-34a 表达下调,导致 CD44 高表达。抑制 miRNA-34a 可抑制前列腺癌干细胞生长和肿瘤转移,提示 miRNA-34a 在前列腺癌治疗中具有很好的应用前景^[6]。

因此,本研究利用 APT-PEG-PAMAM 包裹具有抑制前列腺癌增殖作用的基因 miRNA-34a,构建前列腺癌纳米靶向给药系统,考察靶向给药系统的体外靶向性及对前列腺癌细胞增殖的抑制效果。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 Mercury Plus 300 MHz 超导核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司);IX2-RFA-CA 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);FACS-Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-N2(美国 Clontech 公司);荧光素酶质粒 pGL3-Control Vector,细胞裂解液和荧光素酶分析系统,化学发光检测仪(美国 Promega 公司);QIAGEN Plasmid Mega Kit(德国 Qiagen GmbH);第五代 PAMAM 甲醇溶液(5%,体积分数),Sulphydryl Addition Kit,BCA Protein Assay kit(美国 Thermo 公司);MAL-PEG-NHS,分子量 3 500(美国 Nektar 公司);miRNA-34a 质粒(上海英为信公司);A10 适配体(广州锐博公司);腺癌细胞 PC3 和 LNCaP(上海中科院细胞库)。

1.2 细胞培养 培养前列腺癌细胞 PC3(PSMA⁻)

和 LNCaP(PSMA⁺)方法参照文献[7]进行。

1.3 APT-PEG-PAMAM 的合成 精密量取 PAMAM 甲醇溶液,氮气吹干,与双活化的 NHS-PEG-MAL(PEG)溶液(溶于 pH 8.0 磷酸盐缓冲液 PBS)按照摩尔比 PAMAM : PEG = 1 : 2 混合,室温避光反应 15 min,产物采用超滤管(分子量 10 000 截留)超滤纯化,制得 PEG-PAMAM。按照摩尔比 PAMAM : APT = 5 : 1,定量取用 DTT 活化后的 APT-SH 溶液和 PEG-PAMAM 溶液,室温避光反应 24 h,制得 APT-PEG-PAMAM^[7]。

1.4 APT-PEG-PAMAM 的结构鉴定 分别称量 1 mg 的 PAMAM、PEG-PAMAM 和 APT-PAMAM,溶于 D₂O,进行核磁共振波谱分析。

1.5 APT-PAMAM/miRNA-34a 纳米复合物的制备及粒径 Zeta 电位测定 APT-PAMAM 与可表达 miRNA-34a 质粒溶液(DNA)(12 μg/ml)按照 PAMAM 与 DNA 的氮/磷(N/P)比 1 : 1、5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1 漩涡混合 30 s,即制得 APT-PEG-PAMAM/miRNA 复合物。不同 N/P 比 APT-PEG-PAMAM/miRNA 复合物粒径和 Zeta 电位通过激光粒度测定仪 Z90(英国 Malvern 公司)进行测定。

1.6 定性考察 APT-PEG-PAMAM 的转染效率 pEGFP-N2 绿色荧光蛋白表达质粒转染前列腺癌细胞 PC3(PSMA⁻)和 LNCaP(PSMA⁺)方法参照文献[7]进行。基因表达产物的绿色荧光利用倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.7 定量考察 APT-PEG-PAMAM 的转染效率 pGL3 虫荧光素酶表达质粒转染前列腺癌细胞 PC3(PSMA⁻)和 LNCaP(PSMA⁺)方法参照文献[7]进行。

1.8 miRNA-34a 纳米复合物抗前列腺癌细胞增殖效果考察 前列腺癌细胞 LNCaP 同“1.2”项培养,将新鲜配制的 3 种纳米复合物 PEG-PAMAM/miRNA, APT-PEG-PAMAM/NC-miRNA(negative control-miRNA), APT-PEG-PAMAM/miRNA(miRNA;miRNA-34a)按照以下浓度稀释备用:10、50、100、150、200、300、400、600、800、1 000 nmol/L。CCK-8 法测定 IC₅₀ 曲线方法参照文献[8]进行。

1.9 统计学处理 用软件 SPSS 18 进行独立样本 *t* 检验统计分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 APT-PEG-PAMAM 结构鉴定 本研究选用

的双功能 PEG, 两端分别带有马来酰亚胺 (MAL) 和琥珀酰亚胺 (NHS) 基团, 其中 NHS 可与 PAMAM 表面氨基 (-NH₂) 特异连接, 得到 PEG 修饰的 PAMAM。经巯基 (-SH) 修饰的 APT, 可与 PEG 另一端 MAL 特异反应而连接到 PAMAM 上。经核磁共振 (NMR) 分析鉴定, 4.7 ppm 左右为 D₂O 溶剂峰, 2.2~3.4 ppm 处是 PAMAM 骨架峰 (图

1A); 3.6 ppm 左右为 PEG 中亚甲基特征吸收峰, 6.7 ppm 处为 MAL 的特征峰 (图 1B), 从峰面积比可以得出, PEG : PAMAM 为 2.7, 符合实验设计要求。在图 1C 中, 2.2~3.4 ppm 处是 PAMAM 骨架峰和 APT 中各氨基氢峰的重叠峰, 6.7 ppm 处 MAL 的特征峰消失, 说明 MAL 已与 -SH 反应, 证明合成了 APT-PEG-PAMAM。

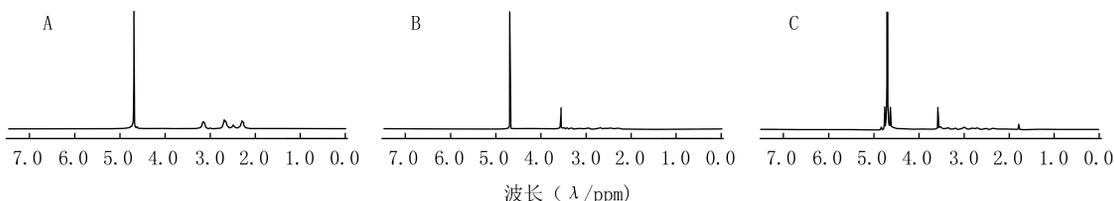


图 1 核磁共振波谱图

A. PAMAM; B. PEG-PAMAM; C. APT-PEG-PAMAM

2.2 不同 N/P 比的 APT-PEG-PAMAM/miRNA 纳米复合物粒径和 Zeta 电位考察 APT-PEG-PAMAM/miRNA 复合物粒径随着 N/P 比的增大而降低 (图 2), Zeta 电位随 N/P 比的增大而增加 (图 3), 说明随着 N/P 比的增大, 载体所带电荷增加, 使得纳米复合物颗粒包裹更加紧密。

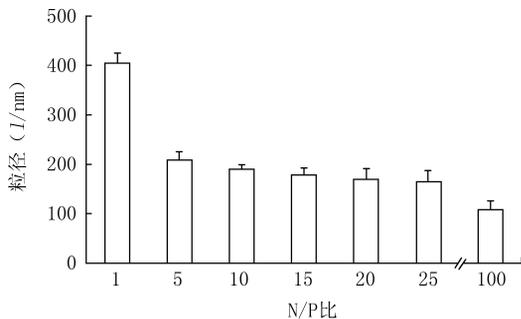


图 2 不同 N/P 比的 APT-PEG-PAMAM/miRNA 纳米复合物粒径

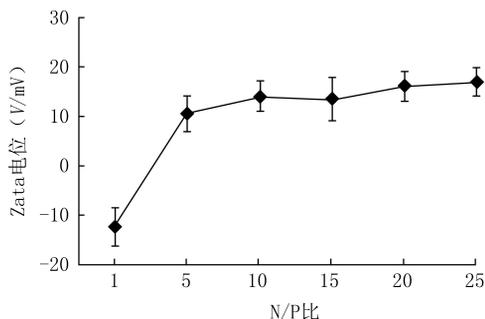


图 3 不同 N/P 比的 APT-PEG-PAMAM/miRNA 纳米复合物 Zeta 电位

2.3 定性观察和定量检测 APT-PEG-PAMAM 的转染效率 荧光显微镜 (图 4) 和生物发光检测仪 (图 5) 的检测结果显示, 随着 N/P 比的增加, 报告基因在细胞内的表达效率增加。在相同浓度下, PEG-PAMAM 经 APT 修饰后, LNCaP (PSMA⁺)

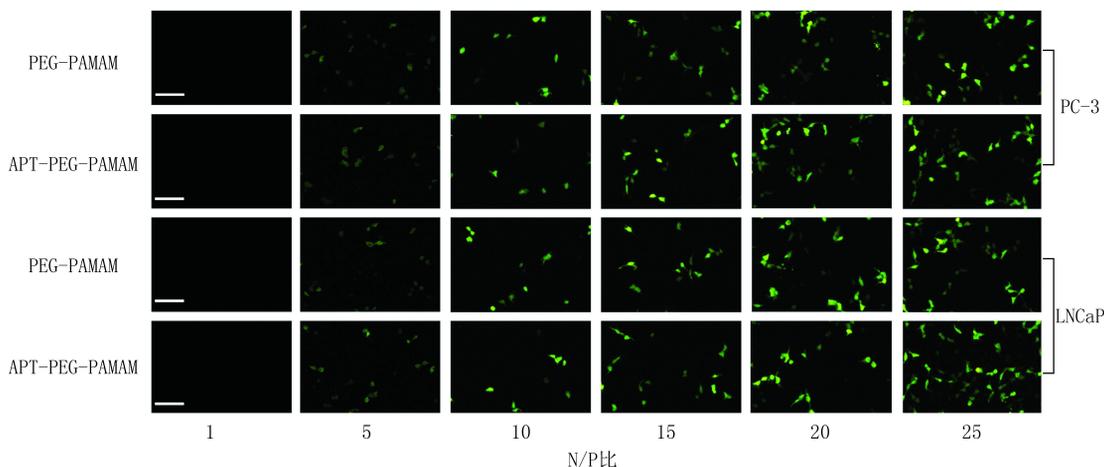


图 4 不同纳米复合物在前列腺癌细胞 PC-3 和 LNCaP 中的 pEGFP-N2 蛋白表达效果

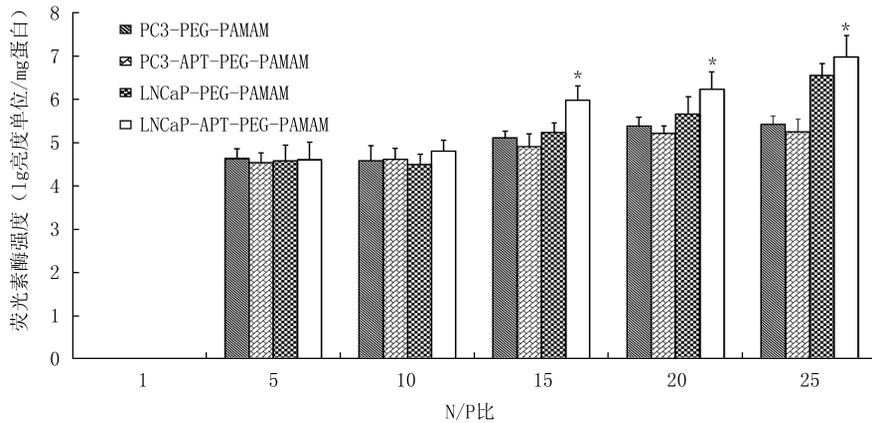


图5 不同纳米复合物在前列腺癌细胞 PC-3 和 LNCaP 中的 pGI-3 蛋白表达效果
* $P \leq 0.05$, 与 LNCaP-PEG-PAMAM 比较

转染效率显著增加,但 PC3 (PSMA⁻) 细胞转染效率反而有所下降,表明经 APT 修饰,能提高基因在 PSMA 阳性的前列腺癌细胞内的表达效率(图5)。

2.4 miRNA-34a 纳米复合物抗前列腺癌细胞增殖效果考察 3种纳米复合物对 LNCaP 细胞作用结果经 GraPhpad 5.0 软件拟合后,得出3条细胞 IC₅₀ 曲线(图6),与阴性对照组相比,2组纳米复合物的 IC₅₀ 值都低于阴性对照组,说明 miRNA-34a 对前列腺癌细胞 LNCaP 具有抑制作用;PEG-PAMAM/miRNA 的 IC₅₀ 值高于 APT-PEG-PAMAM/miRNA,说明 APT 的存在可以增加 miRNA-34a 进入细胞的总量,增强抑制前列腺癌细胞 LNCaP 增殖的效果。

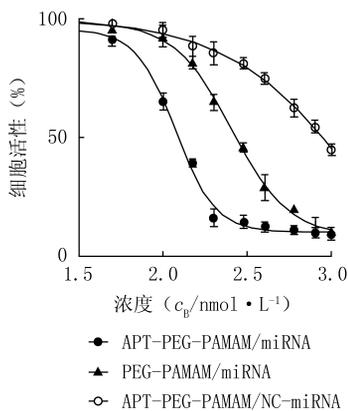


图6 3种复合物抑制前列腺癌细胞 LNCaP 增殖效果考察 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

PAMAM 是一类高度枝化、具有特定三维结构、分子大小和构型高度可控的树枝状大分子,其表面带有正电荷,可以与基因形成纳米复合物。PAMAM 的枝状结构特殊,随着代数的增加,在

4~6 代的 PAMAM 中,出现了类似口袋的特殊结构,它可以随着 pH 值的变化而张开或关闭,由于细胞内外 pH 值不同,PAMAM 在进入细胞后会形成质子海绵效应。近年来有研究利用 PAMAM 这一特性,将其作为化疗药物载体,利用进入细胞内外的 pH 值变化,实现化疗药物的缓释^[7]。本实验选用第五代 PAMAM,利用具有双功能活化的 PEG 修饰 PAMAM,不仅能增加 PAMAM 分子结构的柔性,同时可降低 PAMAM 的毒性,实现长循环作用^[9]。

具有 PSMA 靶向作用的适体 A10 是一种单链的 RNA 核苷酸,由于碱基之间存在错配,在体内会形成特定的三维结构,并与 PSMA 结合,从而发挥靶向作用。A10 没有明显的免疫原性,其介导的靶向药物注入人体内不会引发免疫反应。因此,本实验选用 A10 与 PEG-PAMAM 连接,构建 APT-PEG-PAMAM 基因靶向载体,以实现前列腺癌细胞的靶向作用。

根据 NMR 结构鉴定结果显示,APT-PEG-PAMAM 的合成是成功的。利用其包裹可表达 miRNA-34a 的质粒,可形成带有正电荷的纳米复合物。利用定性及定量考察其对 PC-3 和 LNCaP 细胞的转染效率发现,PEG-PAMAM 载体经 APT 修饰后,PSMA 高表达的 LNCaP 细胞转染效率显著增加,同时,PSMA 低表达的 PC3 细胞转染效率却发生下降,结果提示 APT 对 PAMAM 修饰后,会对载体进入细胞的途径产生影响,导致载体转染及入胞过程发生改变,对于 PSMA 阳性 LNCaP 细胞,APT 的存在有利于 miRNA 的表达,但对于 PSMA 阴性 PC-3 细胞,由于 APT 带有负电荷,会降低 PAMAM-PEG 表面的正电荷,导致细胞非特异性

吸附降低,表现为转染效率降低。CCK-8 抗 LNCaP 细胞增殖实验也证明, APT-PEG-PAMAM/miRNA-34a 对前列腺癌细胞的抗增殖作用优于 PEG-PAMAM/miRNA-34a,可能是由于 APT 的存在,增加了 miRNA-34a 质粒进入 LNCaP 的数量,以及在细胞内的表达效果,导致 miRNA-34a 在细胞中的表达量增加,进而增强了其抑制前列腺癌细胞的增殖效果。

综上所述,本研究为以适配体 APT 为靶头,靶向具有 PSMA 表达前列腺癌细胞的聚阳离子载体纳米基因给药系统提供了实验依据,并为临床应用 miRNA-34a 治疗激素依赖型前列腺癌增殖提供了方法借鉴。

【参考文献】

[1] 陈万青,郑荣寿,曾红梅,等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2015,24(1):1-10.
[2] 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. 临床肿瘤学杂志,2013,18(4):330-334.

[3] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al.* Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2014,64(1):9-29.
[4] Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI, *et al.* Transcriptional control of gene expression by microRNAs[J]. Cell,2010,140(1):111-122.
[5] Gong MC, Chang SS, Sadelain M, *et al.* Prostate specific membrane antigen (PSMA)-specific monoclonal antibodies in the treatment of prostate and other cancers[J]. Cancer Metastasis Rev,1999,18:483-490.
[6] Nery AA, Wrenger C, Ulrich H. Recognition of biomarkers and cell-specific molecular signatures: aptamers as capture agents[J]. J Sep Sci,2009,32(10):1523-1530.
[7] 武鑫,蔡涛,朱全刚,等. YPSMA-1 单克隆抗体修饰的树突状高分子前列腺癌靶向基因递送载体[J]. 中国药学杂志,2012,47(6):418-422.
[8] Wu X, Ding B, Gao J, *et al.* Second-generation aptamer-conjugated PSMA-targeted delivery system for prostate cancer therapy[J]. Int J Nanomedicine,2011,6:1747-1756.
[9] Hinson DL, Webber RJ. Miniaturization of the BCA protein assay[J]. Biotechniques,1988,6(1):14-19.
[收稿日期] 2014-12-16 [修回日期] 2015-04-23
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 507 页)

the risk of serious arrhythmia: a population-based study[J]. Clin Infect Dis,2012,55:1457-65.
[8] Adefurin A, Sammons H, Jacqz-Aigrain E, *et al.* Ciprofloxacin safety in paediatrics: a systematic review [J]. Arch Dis Child,2011,96:874-80.
[9] Schaad UB. Will fluoroquinolones ever be recommended for common infections in children? [J]. Pediatr Infect Dis J,2007,26:865-867.
[10] Pichichero ME, Arguedas A, Dagan R, *et al.* Safety and efficacy of gatifloxacin therapy for children with recurrent acute otitis media (AOM) and/or AOM treatment failure[J]. Clin Infect Dis,2005,41:470-478.
[11] Seeger JD, West WA, Fife D, *et al.* Achilles tendon rupture and its association with fluoroquinolone antibiotics and other potential risk factors in a managed care population [J]. Pharmacoeconom Drug Safe,2006,15:784-792.
[12] Wise BL, Peloquin C, Choi H, *et al.* Impact of age, obesity, and steroid use on quinolone-associated tendon disorders [J]. Am J Med,2012,125:23-28.
[13] Mandell LA, Ball P, Tillotson G. Antimicrobial safety and tolerability: differences and dilemmas [J]. Clin Infect Dis,2001,32(Suppl):72-79.
[14] Paterson JM, Mamdani MM, Manno M, *et al.* Fluoroquinolone therapy and idiosyncratic acute liver injury: a population-

based study [J]. CMAJ,2012,184:1565-1570.
[15] Etminan M, Forooghian F, Brophy JM, *et al.* Oral fluoroquinolones and the risk of retinal detachment [J]. JAMA,2011,307:1414-1419.
[16] Albini TA, Karakousis PC, Abbey AM, *et al.* Association between oral fluoroquinolones and retinal detachment [J]. Am J Ophthalmol,2012,154:919-921.
[17] Christ W, Lehnert T, Ulbrich B. Specific toxicologic aspects of the quinolones [J]. Rev Infect Dis,1988,10:141-146.
[18] Kato M, Onodera T. Morphological investigation of cavity formation in articular cartilage induced by ofloxacin in rats [J]. Fundam Appl Toxicol,1988,11(1):110-119.
[19] Grady R. Safety profile of quinolone antibiotics in the pediatric population [J]. Pediatr Infect Dis,2003,22(12):1128-1132.
[20] van der Linden PD, Sturkenboom MC, Herings RM, *et al.* Fluoroquinolones and risk of achilles tendon disorders: case-control study [J]. BMJ,2002,324(7349):1306-1307.
[21] Shaughnessy MK, Amundson WH, Kuskowski MA, *et al.* Unnecessary antimicrobial use in patients with current or recent Clostridium difficile infection [J]. Infect Control Hosp Epidemiol,2013,34:109-116.
[收稿日期] 2014-03-03 [修回日期] 2014-06-26
[本文编辑] 李睿旻