

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00117

MicroRNA 基因递送系统抗激素非依赖型前列腺癌增殖作用研究

姚 翀¹, 武 鑫², 台宗光¹, 朱全刚³, 王晓宇¹, 张丽娟¹, 高 申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院药理学部, 上海 200433
2. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200080
3. 上海中医药大学附属岳阳医院药剂科, 上海 200437

[摘要] **目的** 采用支化的聚乙烯亚胺(BPEI)、线型聚乙烯亚胺(LPEI)和树枝状聚合物聚酰胺-胺(PAMAM)与具有抑制激素非依赖型前列腺癌细胞 PC3 增殖的 microRNA(miRNA)-15a 和 miRNA-16-1 质粒结合, 构建了 miRNA 基因递送系统。考察形成的 3 种纳米复合物的粒径、zeta 电位、细胞内摄取, 以及对 PC3 细胞的抑制作用。 **方法** 利用粒径分析仪测定形成的 3 种纳米复合物的粒径和电位, 凝胶电泳实验测定 3 种材料对 miRNA 的结合能力; 利用 FAM 标记的 NC-miRNA 考察 PC3 细胞对 3 种复合物的摄取情况; 通过 CCK8 法测定 3 种材料与 miRNA-15a 和 miRNA-16-1 形成的复合物对 PC3 细胞的抑制作用; PCR 法测定 3 种材料与 miRNA-15a 和 miRNA-16-1 结合后对 PC3 细胞中 Bcl-2、Cylin D₁ 和 Wnt3a 表达的阻滞作用。 **结果** BPEI、LPEI 和 PAMAM 与 miRNA 可结合形成稳定的纳米级复合物, 在 N/P=5 时, PC3 细胞对 BPEI/miRNA-FAM 的摄取高于 LPEI/miRNA-FAM 和 PAMAM/miRNA-FAM, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。BPEI、LPEI 和 PAMAM 都可以携带 miRNA-15a 和 miRNA-16-1 进入 PC3 细胞, 并且阻滞 PC3 细胞中 Bcl-2、Cylin D₁ 和 Wnt3a 蛋白的表达。 **结论** BPEI、LPEI 和 PAMAM 包裹 miRNA-15a 和 miRNA-16-1 可对激素非依赖型前列腺癌细胞 PC3 细胞产生抑制作用, 并可以有效阻滞 PC3 细胞中 Bcl-2、Cylin D₁ 和 Wnt3a 蛋白的表达。

[关键词] 微 RNAs; 前列腺肿瘤; 基因疗法; 基因递送系统

[中图分类号] R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)02-0117-07

MicroRNA delivery system inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer

YAO Chong¹, WU Xin², TAI Zong-guang¹, ZHU Quan-gang³, WANG Xiao-yu¹, ZHANG Li-juan¹, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmaceutics, First People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China
3. Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

[Abstract] **Objective** To prepare a microRNA (miRNA) delivery system using the branched polyethyleneimine (BPEI), linear polyethyleneimine (LPEI) and polyamidoamine dendrimers (PAMAM) loaded with miRNA-15a and miRNA-16-1, which can inhibit prostate cancer PC3 cell proliferation, and to examine the zeta potential, intracellular uptake, and the inhibition effect on PC3 cells of the three constructed nano-complexes. **Methods** Particle size analyzer was used to determine the size and potential of the three kinds of nano-complexes, and the miRNA affinity capability of them was determined by agarose gel electrophoresis retardation assay. The uptake efficiency of the nano-complexes by PC3 cells was examined by NC-miRNA labeled with FAM. CCK8 method was used to determine the inhibitory effect of the nano-complexes loaded with miRNA-15a and miRNA-16-1 against PC3 cells, and PCR was used to analyze their inhibitory effect on expression of Bcl-2, Cylin D₁ and Wnt3a gene in PC3 cells. **Results** BPEI, LPEI and PAMAM loaded with miRNA could form stable nano-complexes. When N/P=5, the intracellular uptake of BPEI/miRNA-FAM by PC3 cells was significantly higher than that of LPEI/miRNA-FAM and

[收稿日期] 2014-07-10 **[接受日期]** 2014-10-14

[基金项目] 国家自然科学基金 (81302212, 81372762, 81272819). Supported by National Natural Science Foundation of China (81302212, 81372762, 81272819).

[作者简介] 姚 翀, 硕士生. E-mail: smmuyc@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162697, E-mail: liullk@126.com

PAMAM/miRNA-FAM ($P < 0.05$). BPEI, LPEI and PAMAM could all carry miRNA-15a and miRNA-16-1 into PC3 cells and block Bcl-2, Cylin D₁ and Wnt3a expression in PC3 cells. **Conclusion** BPEI, LPEI and PAMAM loaded with miRNA-15a and miRNA-16-1 can suppress proliferation of prostate cancer PC3 cells and block Bcl-2, Cylin D₁ and Wnt3a expression.

[Key words] microRNAs; prostatic neoplasms; gene therapy; gene delivery system

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(2): 117-123]

前列腺癌是一种常见的男性生殖系统的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在全球范围内逐年上升^[1]。据统计,在美国男性中每年约有23万人被确诊为前列腺癌,其中的约3.2万人死亡^[2]。近年来,随着人们生活水平的提高、人口老龄化、以及前列腺膜抗原(PSA)筛查的普及,我国前列腺癌的发病率也日益上升。早期前列腺癌一般为激素依赖型,对雄激素全阻断为主的内分泌治疗敏感,然而许多患者在接受雄激素全阻断治疗后最终会发展为激素非依赖型前列腺癌。此时患者对内分泌疗法产生耐受,肿瘤不断增殖、转移,最终导致患者死亡。基因治疗是目前研究的热点,可将外源正常基因导入靶细胞,以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病。

基因治疗的关键在于寻找合适的载体来实现高效递送基因进入体内并稳定表达。常用的载体可以分成病毒载体和非病毒载体。病毒载体虽然具有较强的靶向作用但同时具有免疫原性,目前研究中多用非病毒载体,其具有稳定性好、无免疫原性、末端具有活性基团便于进一步修饰等优点。在非病毒载体中具有代表性的是阳离子聚合物,此类聚合物除了具有非病毒载体共有的优点外,其表面往往带有较多氨基,在生理pH的条件可以质子化带正电荷,从而压缩DNA或者RNA以达到包裹基因的目的。此外阳离子聚合物与DNA或RNA会形成一种核壳结构,外壳是亲水的阳离子片段,内部疏水的核则是部分被中和的DNA或RNA。这一结构可以提高其稳定性,从而避免被DNA酶降解。本研究拟选用阳离子聚合物中3种具有代表性的载体,支化的聚乙烯亚胺(branched-polyethylenimine, BPEI)、线型的聚乙烯亚胺(linear-polyethylenimine, LPEI)和树枝状聚合物聚酰胺-胺(polyamidoamine, PAMAM)来包载具有抑制前列腺癌细胞PC3增殖的miRNA-15a和miRNA-16-1,从而构建microRNA基因递送系统。考察形成的3种复合物粒径、zeta电位、细胞摄取,以及对PC3细胞的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 激光粒度测定仪 Z90 (Malvern 公司, 英国); 莱卡倒置荧光显微镜 (Leica 公司, 德国); FACSCalibur 流式细胞仪 (BD 公司, 美国); miRNA-15a 质粒 (Pre-miRNA-15a; pre-5'-UAG CAG CAC AUA AUG GUU UGU G-3'), miRNA-16-1 质粒 (Pre-miRNA-16-1; pre-5'-UAG CAG CAC GUA AAU AUU GGC G-3'); NC-miRNA 质粒 (Pre-NC-miRNA; pre-5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UUT T-3'); NC-miRNA 质粒 (Pre-NC-miRNA-FAM; 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UUT T-3'-FAM) (英为信公司, 上海); BPEI ($M_w = 25\ 000$, Sigma 公司, 美国); LPEI ($M_w = 25\ 000$), PAMAM (G5.0, $M_w = 28\ 826$); BCA Protein Assay kit (Thermo, 美国); TRIzol, M-MLV 反转录酶、荧光定量 PCR 试剂盒 (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen, 美国); 所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 细胞培养 原代培养前列腺癌细胞 PC3 方法参照文献进行^[3]。使用含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养, 48~72 h 更换培养基, 用显微镜观察细胞生长至 80% 融合状态时用于实验。

1.3 复合物制备及粒径、zeta 电位测定 BPEI、PAMAM 和 LPEI 分别与含有 1 μg 的 NC-miRNA 溶液按照载体与 NC-miRNA 的 N/P 比为 1:1、5:1 和 10:1 旋涡混合 15 s, 制备 BPEI/NC-miRNA、LPEI/NC-miRNA 和 PAMAM/NC-miRNA 复合物。通过激光粒度测定仪 Z90 (Malvern, 英国) 测定制备的不同 N/P 的复合物粒径和 zeta 电位。

1.4 复合物凝胶阻滞电泳分析 采用 1% (W/V) 琼脂糖凝胶 (含 0.5% EB)、TAE 缓冲液 (1×), 在电压为 100 V, 时间为 60 min 的条件下通过琼脂糖凝胶电泳考察上述制备的不同 N/P 的复合物中 BPEI、

PAMAM 和 LPEI 与 miRNA 的结合情况。用紫外投射仪(上海复日科技有限公司)观察并拍照。

1.5 定性观察前列腺癌细胞 PC3 对不同复合物摄取情况 前列腺癌细胞 PC3 按照 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔培养板中培养 48 h, 然后更换培养基为无血清培养液。以 $1 \mu\text{g}$ NC-miRNA-FAM/孔, 制备各复合物(方法同 1.3), 将各复合物加入后在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的孵箱中培养 2 h, 采用倒置荧光显微镜观察绿色荧光(激发波长为 492 nm, 发射波长为 518 nm)并拍照。

1.6 定量观察前列腺癌细胞 PC3 对不同复合物摄取情况 前列腺癌细胞 PC3 同 1.2 中培养, 按照 1×10^5 /孔的密度接种于 12 孔培养板中培养 24 h。以 $1.3 \mu\text{g}$ NC-miRNA-FAM/孔, 制备各复合物(方法同 1.3), 将各复合物加入培养板后在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下孵育 3 h, 弃去原有培养基, PBS 洗 2 次, 收集细胞, 并以空白细胞为阴性对照, 使用流式细胞仪定量检测 FAM 的阳性率。

1.7 复合物抗前列腺癌细胞 PC3 增殖效果 前列腺癌细胞 PC3 同 1.2 中培养, 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h。使用无血清 RPMI 1640 培养基新鲜配制 4 种纳米复合物 BPEI/miRNA、LPEI/miRNA、PAMAM/miRNA、BPEI/NC-miRNA (miRNA 为 miR-15-a : miR-16-1 = 1 : 1 混合)。按照 15、20、30、50、80、100、170、300、550、700 nmol/L 稀释备用。取稀释好的复合物按照 $100 \mu\text{L}$ /孔加至 96 孔板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的孵箱中培养 3 h 后, 弃去含纳米复合物的培养基。按照 $100 \mu\text{L}$ /孔更换为含有 $10\% \text{FBS}$ 的 RPMI 1640 培养基并继续培养至 48 h。取出培养板, 以 $10 \mu\text{L}$ /孔加入 CCK-8 试剂并继续培养 3 h。取出培养板, 震荡并用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的光密度(D)值。每组重复 3 孔, 以未接种细胞的孔为空白孔、未加入纳米复合物的孔为对照孔, 其细胞存活率设定为 100% 。细胞存活率 = $[1 - (\text{实验组} - \text{空白组}) / (\text{对照组} - \text{空白组})] \times 100\%$ 。

1.8 不同复合物对 PC3 细胞中 Bcl-2、Cylin D₁ 和 Wnt3a 抑制效果考察 前列腺癌细胞 PC3 同 1.2 中培养, 将新鲜配制的 6 种纳米复合物(BPEI/miRNA、LPEI/miRNA、PAMAM/miRNA、BPEI/NC-miRNA、PAMAM/NC-miRNA 和 LPEI/NC-miRNA)稀释到 100 nmol/L 浓度备用。将稀释好的纳

米复合物材料按照 1 mL/孔加至备用的 6 孔培养板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养 3 h, 吸去纳米复合物, 按照 $100 \mu\text{L}$ /孔更换含 $10\% \text{FBS}$ 的 RPMI 1640 培养液, 继续培养 48 h。小心吸去培养液, 用 PBS 清洗细胞 3 次, TRIzol 抽提总 RNA, 取 $2 \mu\text{g}$ 总 RNA, 并依据试剂盒(M-MLV First Strand Kit, Invitrogen)说明书进行反转录。使用试剂盒 Platinum SYBR Green qPCRSuperMix-UDG kit (Invitrogen)进行相应的荧光定量 PCR 实验。反应体系为 $12.5 \mu\text{L}$ 的 $2 \times$ Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG, $2.5 \mu\text{L}$ 的上游引物($2 \mu\text{mol/L}$), $2.5 \mu\text{L}$ 的下游引物($2 \mu\text{mol/L}$), $2 \mu\text{L}$ 的 cDNA, $6.5 \mu\text{L}$ 的 ddH₂O。Cyclin D₁ 的引物序列为 Forward: $5' \text{-CCGTCCATGCGGAAGATC-3}'$, Reverse: $5' \text{-GTCACACTTGATCTGG-3}'$ ^[4]; Bcl-2 的引物序列为 Forward: $5' \text{-CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3}'$, Reverse: $5' \text{-GCCGGTTCAGGTACTIONACTCAGTCA-3}'$ ^[5]; Wnt3a 的引物序列为 Forward: $5' \text{-CAGGGTGAAGACATGCTGGTG-3}'$, Reverse: $5' \text{-CGAGGCGCTGTCTACTTGT-3}'$ ^[6]; β -actin 的引物序列为 Forward: $5' \text{-GATGACCCAGATCATGTTTGA-3}'$, Reverse: $5' \text{-ATGAGGTAGTCAGTCAGGTCC-3}'$ ^[7]。反应条件: 95°C 1 min, 95°C 30 s, 50°C 30 s, 70°C 延伸 2 min, 读板, 共 30 个循环熔解曲线分析: 温度 $50 \sim 95^\circ\text{C}$, 升温速率 1°C/s , 读板 1 次/s。以依次稀释 10 倍的 cDNA 为模板, 使用相应的引物进行基因标准曲线的制定。选择管家基因 β -actin 作为内参, 以纯水代替模板序列为阴性对照。利用荧光定量 PCR 仪自带软件 Opticon Monitor-3.1 分析各目的基因的 Ct 值, 相对定量靶基因。结果用实验待测基因与其内参基因 β -actin 的比值除以对照组待测基因与其内参基因 β -actin 的比值, 表示各种基因相对于对照组的转录水平。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 ANOVA 方差分析, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 不同 N/P 时复合物粒径和 zeta 电位 从图 1 中可以看出, 3 种复合物粒径均随着 N/P 比的增大而降低, 当 N/P 比为 10 时 3 种复合物的粒径最好, 在 $100 \sim 150 \text{ nm}$ 。而 zeta 电位则随着 N/P 比的增大

而增加(图2)。这说明随着 N/P 比的增加,载体所携带电荷增加,其结合 miRNA 的能力也就越强。当 N/P 比为 5 时, PAMAM/miRNA 粒径与 BPEI/miRNA 和 LPEI/miRNA 差异有统计学意义($P < 0.05$)。这可能是由于 PAMAM 自身所携带的电荷少于 BPEI 和 LPEI,造成其结合 miRNA 的能力相对较弱,导致最终形成的复合物粒径也较大。

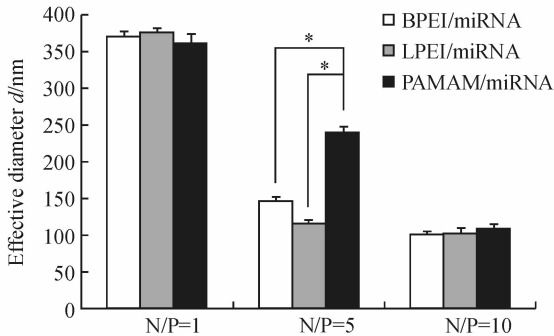


图1 不同 N/P 时 3 种复合物的粒径

Fig 1 Sizes of BPEI/miRNA, LPEI/miRNA and PAMAM/miRNA nano-complexes at various N/P ratios

BPEI: Branched-polyethylenimine; LPEI: Linear-polyethylenimine; PAMAM: Polyamidoamine; miRNA: MicroRNA; N/P: Nitrogen/phosphorus. $n=3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$

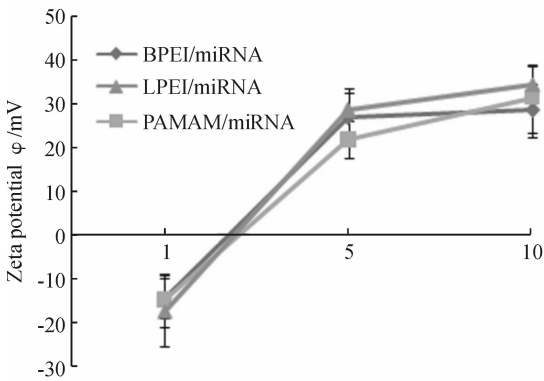


图2 不同 N/P 时 3 种复合物的电位

Fig 2 Zeta potentials of BPEI/miRNA, LPEI/miRNA and PAMAM/miRNA nano-complexes at various N/P ratios

BPEI: Branched-polyethylenimine; LPEI: Linear-polyethylenimine; PAMAM: Polyamidoamine; miRNA: MicroRNA; N/P: Nitrogen/phosphorus. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 不同复合物凝胶阻滞电泳 从图3中可以看出,当 N/P=1 时, miRNA 不能与 3 种载体材料完全结合,可在电场的作用下发生迁移,与荧光染料溴化乙锭结合后在紫外灯的照射下可以看到清晰的条带。当 N/P=5 时,未见条带显出,说明此时 miRNA 完全与载体结合,不能在电场中发生迁移。

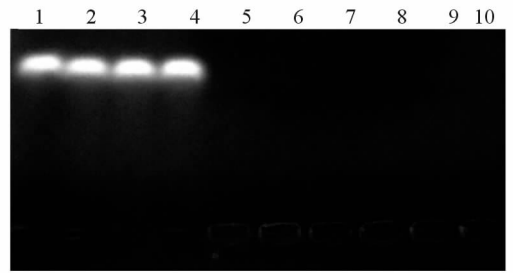


图3 不同 N/P 时 3 种复合物的琼脂糖凝胶阻滞电泳分析结果

Fig 3 Results of agarose gel electrophoresis retardation assay of nano-complexes at various N/P ratios

1: Naked miRNA; 2, 5, 8: BPEI/miRNA; 3, 6, 9: LPEI/miRNA; 4, 7, 10: PAMAM/miRNA. 2, 3, 4: N/P=1; 5, 6, 7: N/P=5; 8, 9, 10: N/P=10. N/P: Nitrogen/Phosphorus; miRNA: MicroRNA; BPEI: Branched-polyethylenimine; LPEI: Linear-polyethylenimine; PAMAM: Polyamidoamine

2.3 定性观察和定量检测细胞摄取情况 荧光显微镜和流式细胞仪(图4、图5)的检测结果显示,前列腺癌细胞 PC3 对 3 种复合物的摄取随着 N/P 的增加而增加。从图4的荧光图片以及图5可以看出,当 N/P=5 时,细胞对 BPEI/NC-miRNA-FAM 的摄取明显高于 LPEI/NC-miRNA-FAM 和 PAMAM/NC-miRNA-FAM ($P < 0.05$)。这可能是由于 BPEI 呈分支状,带有电荷的程度较高,更容易与 NC-miRNA-FAM 形成紧密的复合物。同时由于形成的纳米复合物正电性较强,也更容易同带有负电荷的 PC3 细胞结合并形成内吞,故 PC3 细胞对 BPEI/NC-miRNA-FAM 的摄取较强。但是当 N/P 为 10 时,细胞对 BPEI/miRNA-FAM 的摄取反而降低,与 LPEI/miRNA-FAM 和 PAMAM/miRNA-FAM 相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。这可能是由于随着 BPEI 的量增加,形成的纳米复合物的毒性增强,细胞部分死亡脱落,最终造成摄取能力的降低。

2.4 不同复合物抗前列腺癌细胞 PC3 增殖效果 3 种纳米复合物抗 PC3 细胞增殖作用的结果经 GraphPad 5.0 软件处理后,得出 3 条细胞增殖抑制曲线(图6), BPEI/miRNA、LPEI/miRNA 和 PAMMA/miRNA 的 IC_{50} 值分别为 135、158、141 nmol/L, BPEI/NC-miRNA 为 610 nmol/L, 3 组纳米复合物的 IC_{50} 值都低于阴性对照组,说明 PAMAM、BPEI 和 LPEI 都可以携带 miRNA-15a 和 miRNA-16-1 进入细胞并有效抑制前列腺癌细胞 PC3 的增殖。

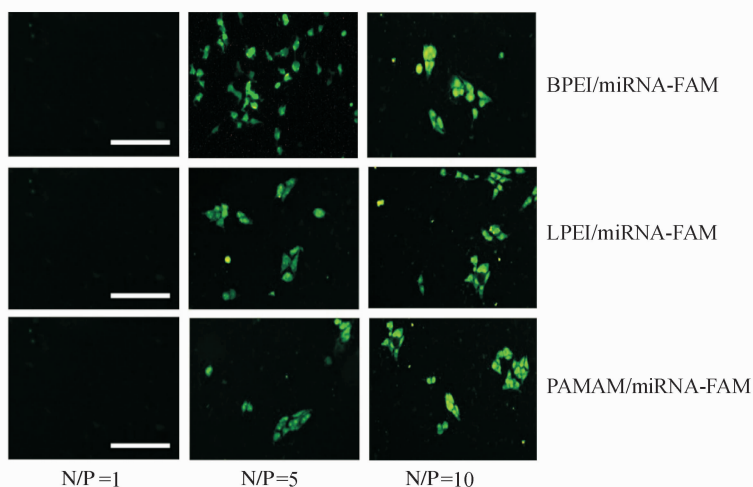


图 4 荧光显微镜观察不同 N/P 时前列腺癌细胞 PC3 对 3 种不同纳米复合物的摄取情况

Fig 4 Uptake of three kinds of nano-complexes by PC3 cells at various N/P ratios as observed under fluorescence microscope (scale bar 50 μm)

BPEI; Branched-polyethylenimine; LPEI; Linear-polyethylenimine; PAMAM; Polyamidoamine; miRNA; MicroRNA; N/P; Nitrogen/Phosphorus

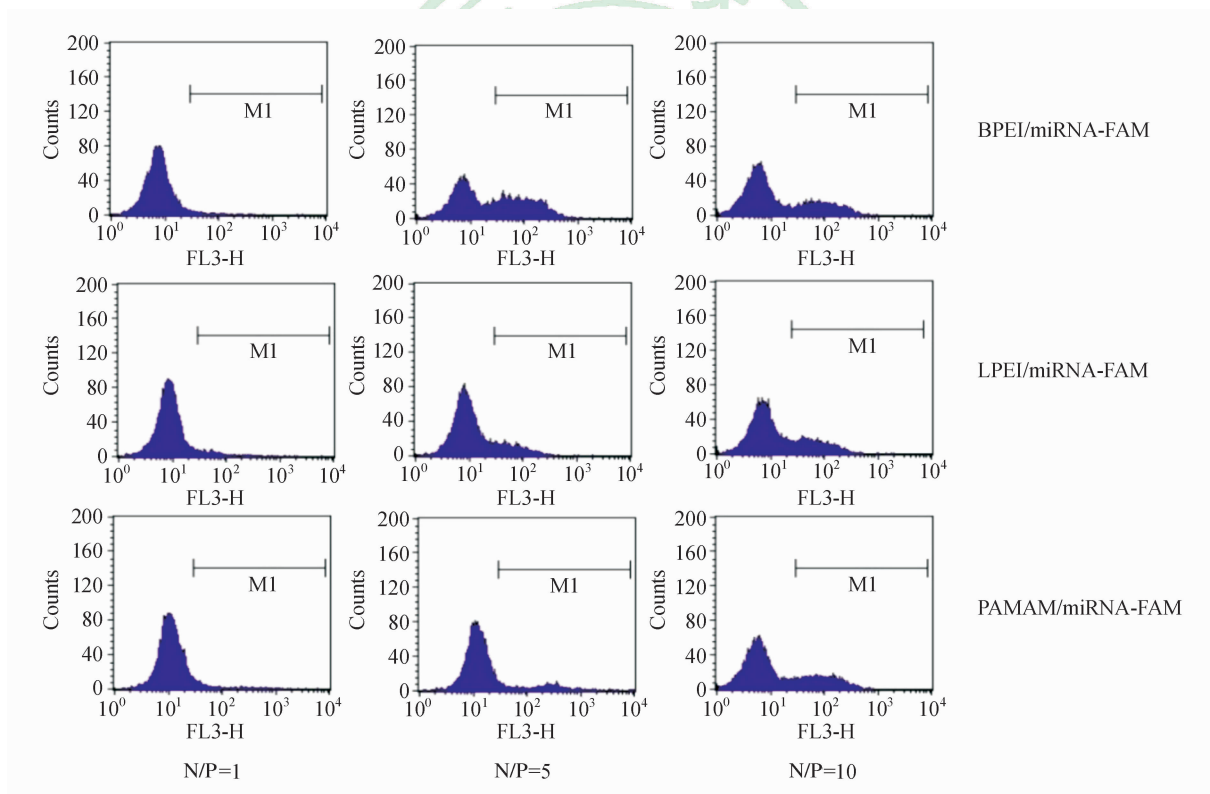


图 5 流式细胞仪观察不同 N/P 比时前列腺癌细胞 PC3 对 3 种纳米复合物的摄取情况

Fig 5 Uptake of three kinds of nano-complexes by PC3 cells at various N/P ratios as observed by flow cytometry

BPEI; Branched-polyethylenimine; LPEI; Linear-polyethylenimine; PAMAM; Polyamidoamine; miRNA; MicroRNA; N/P; Nitrogen/Phosphorus.

2.5 不同复合物对 PC3 细胞中 Bcl-2、Cyclin D₁ 和 Wnt3a 表达的抑制效果 本研究中, 3 组纳米复合物分别与 PC3 细胞作用后, 如图 7, 分析数据后可以发现用实验组待测基因与内参基因(β -actin)的比值

除以对照组待测基因与内参基因(β -actin)的比值后结果均小于 1, 说明 3 组纳米复合物中包载的基因药物 miR-15-a 和 miR-16-1 起到了抑制前列腺癌细胞 PC3 中 Bcl-2、Cyclin D₁ 和 Wnt3a 表达的作用, 从

图 7 中可以看出 BPEI 对 Cyclin D₁ 和 Wnt3a 的抑制作用强于 LPEI 和 PAMAM ($P < 0.05$), 而 LPEI 对 Bcl-2 的抑制作用强于 BPEI 和 PMAMA ($P < 0.05$)。因此, 3 种纳米复合物可以起到抑制 PC3 细胞增殖的作用。

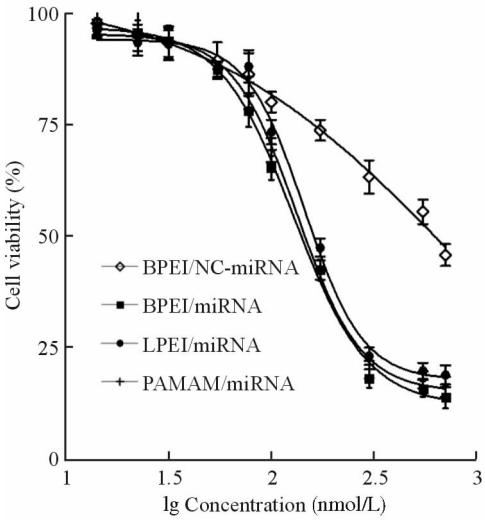


图 6 3 种复合物抑制前列腺癌细胞 PC3 增殖作用考察

Fig 6 Effect of three kinds of nano-complexes on the proliferation of PC3 cells

BPEI: Branched-polyethylenimine; LPEI: Linear-polyethylenimine; PAMAM: Polyamidoamine; miRNA: MicroRNA; NC-miRNA: Negative control miRNA. $n=3, \bar{x} \pm s$

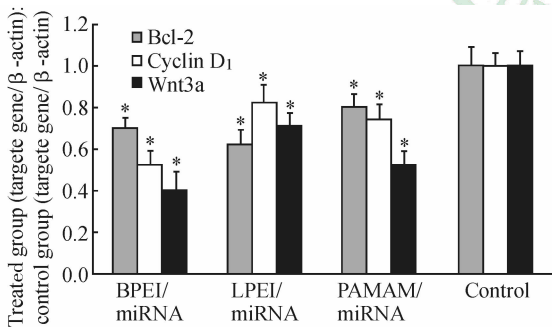


图 7 3 种复合物对 PC3 细胞中 Bcl-2、Cyclin D₁ 和 Wnt3a 表达的影响

Fig 7 Effect of three kinds of nano-complexes on Bcl-2, Cyclin D₁, and Wnt3a expression in PC3 cells

BPEI: Branched-polyethylenimine; LPEI: Linear-polyethylenimine; PAMAM: Polyamidoamine; miRNA: MicroRNA.

* $P < 0.05$ vs control group. $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

阳离子聚合物所带的正电荷使其具有很强的压缩 DNA 或 RNA 的能力。在众多阳离子聚合物中,

相对分子质量为 25 000 的 PEI 是非病毒载体中进行基因转染的推荐选择^[8]。线型 PEI 和支化 PEI 除了制备方法不同外, Wightman 等^[9]的研究指出,二者与 DNA 形成的复合物在不同浓度的盐溶液中的稳定性也不同。但无论是线型 PEI 还是支化 PEI,都具有强大的缓冲能力,能够在不同的 pH 环境中发挥质子海绵效应抑制晚期内吞小泡的酸化,导致其肿胀并引起内吞小泡膜的破裂,从而将内吞的 DNA 或者 RNA 释放到细胞质或细胞核中表达^[10]。然而 PEI 的缺点是随着其相对分子质量的升高,细胞中的线粒体易遭到破坏^[11],从而造成细胞的死亡,以及 PEI 在体内无法被生物降解等,这些都阻碍了其进一步应用。PAMAM 是球形呈树枝状的化合物,低毒、带正电荷、具有特定的三维结构、分子尺寸和构型可控等使其具备了作为载体的条件。更为特殊的是,4~6 代的 PAMAM 具有口袋状的结构,该结构在不同 pH 环境下大小会发生变化,从而产生类似于 PEI 的质子海绵效应。利用这一特性,Shcharbin 等^[12]实现了将 PAMAM 作为化疗药物的载体并达到了药物缓释的目的。但是 PAMAM 的缺点是在不加任何基团修饰的情况下基因转染效率并不高,这可能与 PAMAM 和基因形成的复合物的形状、进入细胞的方式等有关^[13]。

本研究发现, BPEI、LPEI、PAMAM 在氮磷比大于 5 时可以与 miRNA 形成较为稳定的复合物。该复合物可有效进入前列腺癌细胞 PC3。氮磷比为 5 时, PC3 细胞对 3 种纳米复合物的摄取差异有统计学意义,其中对 BPEI/NC-miRNA-FAM 的摄取最高,而当氮磷比增至 10 时, PC3 细胞对 3 种纳米复合物的摄取差异无统计学意义。这可能是由于支化的 BPEI 更容易与 miRNA 形成复合物,但是,随着氮磷比增加到 10 时, BPEI 的量增多,毒性增强,表现为细胞对 BPEI/NC-miRNA-FAM 的摄取降低。细胞毒性试验 CCK-8 的结果显示, 3 种载体材料都可以有效携带 miRNA 进入 PC3 细胞并抑制其增殖。

Bcl-2 蛋白是 bcl-2 原癌基因的编码产物,其能阻止细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质,从而抑制了细胞凋亡^[14]。Cyclin D₁ 是细胞周期调节因子,其过度表达可使细胞 G₁ 期缩短,加快细胞增殖,许多肿瘤中均可以检测到 Cyclin D₁ 的过度表达^[15]。而

Wnt3a 是一种信号传导的启动因子,可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而影响肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[16]。PCR 的结果显示,miRNA-15a 和 miRNA-16-1 的表达对 PC3 细胞中的 Cyclin D₁、Bcl-2 和 Wnt3a 具有抑制作用。因此,可以通过阻滞这 3 种蛋白的表达来实现抑制 PC3 细胞的增殖、侵袭和转移。

良好的基因给药系统除了大幅提高基因进入细胞的效率外,还应具备提高基因表达的性质。但是有研究显示,可以携带 DNA 进入细胞并较好表达的载体虽然也能携带 siRNA 进入细胞,但是却不一定能产生干扰作用^[17]。本研究证明,BPEI、LPEI 和 PAM-AM 可以包裹 miRNA-15a 和 miRNA-16-1 进入 PC3 细胞并表达,通过降低调控其增殖的 Cyclin D₁、Bcl-2 和 Wnt3a 的表达,实现抑制 PC3 细胞增殖的目的。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60: 277-300.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62: 10-29.
- [3] Milowsky M I, Nanus D M, Kostakoglu L, Sheehan C E, Vallabhajosula S, Goldsmith S J, et al. Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors [J]. J Clin Oncol, 2007, 25: 540-547.
- [4] Jones C D, Darnell K H, Warnke R A, Zehnder J L. CyclinD1/CyclinD3 ratio by real-time PCR improves specificity for the diagnosis of mantlecell lymphoma [J]. J Mol Diagn, 2004, 6: 84-89.
- [5] Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, Vessella B, Zangemeister-Wittke U, et al. A novel antisense oligonucleotide inhibiting several antiapoptotic Bcl-2 family members induces apoptosis and enhances chemosensitivity in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4: 1689-1698.
- [6] 官文华, 杨 堃, 赵文君, 刘希双, 王秀娟. Wnt3、Wnt3a 在胃癌组织中的表达及意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21: 624-628.
- [7] Sawyer R T, Fontenot A P, Barnes T A, Parsons C E, Tooker B C, Maier L A, et al. Beryllium-induced TNF- α production is transcription-dependent in chronic beryllium disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36: 191-200.
- [8] Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 60: 247-266.
- [9] Wightman L, Kircheis R, Rössler V, Carotta S, Ruzicka R, Kurska M, et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. J Gene Med, 2001, 3: 362-372.
- [10] Wang X, Wu X, Fan W, Ding B, Wang X, Zhang W, et al. Surface modification with pluronic P123 enhances transfection efficiency of PAMAM dendrimer [J]. Macromol Res, 2012, 20: 162-167.
- [11] Hunter A C, Moghimi S M. Cationic carriers of genetic material and cell death: a mitochondrial tale [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1797: 1203-1209.
- [12] Shcharbin D, Pedziwiatr E, Bryszewska M. How to study dendriplexes I: Characterization [J]. J Control Release, 2009, 135: 186-197.
- [13] Xiang S, Tong H, Shi Q, Fernandes J C, Jin T, Dai K, et al. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery [J]. J Contr Rel, 2012, 158: 371-378.
- [14] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, Adams J M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15: 49-63.
- [15] Ahmed R A, Shawky Ael-A, Hamed R H. Prognostic significance of cyclin D1 and E-cadherin expression in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2014, 20: 625-633.
- [16] Lee M A, Park J H, Rhyu S Y, Oh S T, Kang W K, Kim H N. Wnt3a expression is associated with MMP-9 expression in primary tumor and metastatic site in recurrent or stage IV colorectal cancer [J]. BMC cancer, 2014, 14: 125.
- [17] Medina S H, El-Sayed M E. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents [J]. Chem Rev, 2009, 109: 3141-3157.