

PBCA纳米粒介导的 hTERT反义寡核苷酸对 A549细胞的抑制作用

张艳艳¹, 付春景¹, 张振中^{2*}

(郑州大学 1. 基础医学院, 2. 药学院, 河南 郑州 450052)

摘要: 目的 以聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒 (polybutylcyanoacrylate nanoparticles, PBCA-NPs, NPs) 作为端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, ASODN) 载体转染 A549 细胞, 研究其对 A549 细胞的影响。方法 采用 MTT 法检测 NPs 的细胞毒性和细胞增殖情况; 流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测 5'-FITC 标记的 ASODN (FASODN) 转染细胞后胞内荧光强度和 ASODN 各组 (ASODN1-NP, ASODN2-NP 和 ASODN3-NP) 转染细胞后细胞周期的变化; 倒置显微镜观察 A549 细胞生长状态; 免疫细胞化学法检测 hTERT 蛋白表达。结果 NPs 质量浓度超过 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞毒性较大。转染 24 h 后, FASODN-NP 组较 FASODN 组胞内荧光明显增强 ($P < 0.01$)。与空白对照组和正义寡核苷酸 (sense oligodeoxynucleotide-nanoparticle, SODN-NP) 组相比, ASODN-NP 处理后 A549 细胞形态改变, 细胞增殖减慢; 各组细胞生长抑制率随时间延长而增高, 72 h 时 ASODN1-NP, ASODN2-NP, ASODN3-NP 各组最高抑制率分别可达 62.4%, 44.6% 和 36.4%; 细胞周期改变, 细胞被阻滞于 G₁ 期, S 期细胞明显减少 ($P < 0.01$); 且 hTERT 蛋白表达明显减少。结论 NPs 介导的 hTERT ASODN 能有效抑制 A549 细胞增殖, 改变细胞周期及降低 hTERT 蛋白表达, 对该细胞生长有明显抑制作用。

关键词: 聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒; 端粒酶逆转录酶; 反义寡核苷酸; A549 细胞

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)05 - 0446 - 06

Inhibition of A549 cells by polybutylcyanoacrylate nanoparticles loaded with antisense oligodeoxynucleotide of hTERT mRNA

ZHANG Yan-yan¹, FU Chun-jing¹, ZHANG Zhen-zhong^{2*}

(1. Basic Medical Sciences College, 2. Pharmaceutical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: **Aim** To investigate the effect of nanoparticles for antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) of hTERT mRNA on A549 cells. **Methods** The cationic polybutylcyanoacrylate nanoparticles (NPs) were prepared by an emulsion polymerization process in the presence of DEAE-dextran. Antisense oligodeoxynucleotides were loaded on the particles by adsorption. The cytotoxicity of NPs and proliferation of A549 cells were detected by MTT assay. Intracellular fluorescence intensity after transfecting the 5'-FITC-labelled ASODN (FASODN) and cell cycles were determined by flow cytometry (FCM). Inverse microscope was used to observe the modality of A549 cell transfecting by NPs for ASODN. The protein expression of hTERT was measured by immunocytochemistry. **Results** The cytotoxicity increased evidently with the increasing concentration of NPs over $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The intracellular fluorescence in FASODN-NP group was obviously stronger than that in FASODN group (NPs free) after transfection for 24 h ($P < 0.01$). The inhibitory rate for cell modality change and proliferation after the treatment with ASODN-NP at 72 h reached peak, 62.4%, 44.6% and 36.4% for ASODN1-NP group, ASODN2-NP group and ASODN3-NP group, respectively; The cell cycle in ASODN-NP group varied observably compared with control group and sense oligodeoxynucleotide-nanoparticle (SODN-NP) group and the cell cycle was blocked in G₁ phase, the cell number in S phase decreased obviously ($P < 0.01$); The hTERT protein expression of ASODN-NP group reduced clearly. **Conclusion** ASODN-NP of hTERT can inhibit

收稿日期: 2005-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371695).

* 通讯作者 Tel: 86 - 371 - 66658080, Fax: 86 - 317 - 66658088, E-mail: zhenzhongz@hotmail.com

the proliferation of A549 cells effectively and cause the change of cell cycle, restraint of protein expression of hTERT and cell viability.

Key words: polybutylcyanoacrylate nanoparticle; human telomerase reverse transcriptase; antisense oligodeoxynucleotide; A549 cells

端粒酶 (telomerase) 是一种具有逆转录酶功能的核糖核蛋白, 在细胞衰老、永生化和癌变过程中具有重要作用。研究表明, 85% 以上的恶性肿瘤细胞中端粒酶为阳性表达, 而在正常体细胞中一般为阴性^[1], 因此, 端粒酶与肿瘤关系密切。端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 是端粒酶的重要组成部分, 是端粒酶激活的限速决定因素^[2]。因此, 近年来国内外提出了许多针对 hTERT 的肿瘤治疗策略, 其中反义核酸技术逐渐成为此类研究的热点, 为了克服反义核酸被核酸酶降解的缺点, 常常采用硫代修饰反义核酸的方法, 但硫代修饰价格昂贵, 难以在临床上应用。纳米技术的出现, 利用纳米粒作为载体, 不仅可降低药物与血浆蛋白结合率, 增强药物的肝、脾脏器靶向性和延缓释药^[3], 还能够很好地解决反义核酸被核酸酶降解的问题, 提高反义核酸在细胞内的稳定性, 以确保其长期的生物学效应^[4]。本研究利用人工合成的反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, ASODN), 以 hTERT mRNA 为靶点, 以聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒 (PBCA-NPs, NPs) 作为载体转染肺腺癌 A549 细胞, 观察 hTERT ASODN 对该细胞生长的影响, 为肺腺癌基因治疗提供理论基础和实验依据。

材料与方 法

主要试剂与仪器 氰基丙烯酸丁酯 (BCA) 为广州白云医用胶有限公司产品, 二乙胺基乙基葡聚糖 (DEAE-dextran) 和右旋糖苷-70 (dextran-70) 为 Pharmacia 公司产品。RPMI-1640 培养基和胰蛋白酶 (trypsin) 均为 Gibco 公司产品。胎牛血清 (FCS) 为 TBD 公司产品。四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 和碘化丙啶 (PI) 为 Sigma 公司产品。鼠抗人 hTERT 单克隆抗体、鼠 SP 免疫组化染色试剂盒和 DAB 显色剂均为北京中杉生物技术有限公司产品。其他化学试剂均为国产分析纯。IX71-22PH 型倒置显微镜为日本 OLYMPUS 产品, FACSCalibur 型流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 为美国 BD 公司产品。

NPs 的制备 采用乳化聚合法^[5,6], 称取 DEAE-dextran 0.12 g, dextran-70 0.18 g, 将其溶于 pH 为 2.0 的盐酸溶液 25 mL 中, 在搅拌条件下向上述混

合溶液中滴加 BCA (2 滴·min⁻¹) 0.19 mL 后, 继续搅拌 6 h; 用孔径 0.3 μm 的垂熔玻璃漏斗过滤, 用 1 mol·L⁻¹ NaOH 调至 pH 5.5, 即得阳离子纳米粒混悬液, 其表征有文献^[7]报道。向该混悬液中加入一定量的正义或反义寡核苷酸, 涡旋混匀, 即得 SODN-NP/ASODN-NP 复合物。

寡核苷酸的设计及合成 hTERT ASODN 根据 hTERT mRNA 基因序列 (AF015950) 设计, 其序列分别为: ASODN1: 5'-GCA CGG CTC GGC AGC GGG GA-3'; ASODN2: 5'-GGA GCG CGC GGC ATC GCG GG-3'; ASODN3: 5'-GGT AGA GAC GTG GCT CTT GA-3'。5 端 FITC 标记的反义寡核苷酸 (FASODN) 序列同 ASODN3。另设计正义寡核苷酸 (SODN) 序列为 5'-CCC GCG ATG CCG CGC GCT CC-3' 作对照。已知正义序列及反义序列与 hTERT 以外的人类基因无同源性。以上寡核苷酸均由北京赛百盛基因技术有限公司合成, -20 °C 保存备用。

细胞培养 肺腺癌细胞株 A549 购于中国典型培养物保藏中心。用含 10% 胎牛血清, 100 u·mL⁻¹ 青霉素和 100 u·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中常规培养, 实验选用对数生长期细胞。

NPs 的细胞毒性实验 在 96 孔板上按每孔 5 × 10³ 个细胞接种 A549 细胞, 24 h 后吸弃旧培养基, 分别取 NPs 1 μL 和 RPMI-1640 培养基 99 μL 加于细胞上, 置 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 24 h, 向每孔加入 MTT 溶液 20 μL 继续培养 4 h。吸弃上层液体, 向每孔中加入二甲基亚砷 150 μL, 振荡 10 min, 待结晶完全溶解后, 用酶标仪在 490 nm 波长处测各孔的吸收度 (A), 并计算 NPs 对细胞的毒性, 以细胞的生长抑制率表示。抑制率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%。

NPs 介导的转染 转染前一天 96 孔、24 孔和 6 孔细胞培养板分别按每孔 5 × 10³, 2 × 10⁴ 和 1 × 10⁵ 个细胞接种。倒置显微镜下观察细胞生长情况, 当培养板中细胞汇合度达 60% 左右时开始转染。

SODN-NP 组和 ASODN-NP 组混合转染液的配制见“NPs 的制备”方法, 室温放置 2 h 后, 向混合转染液中分别加入一定量的培养液, 制备成寡核苷酸

终浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的转染稀释液。转染前用 PBS 洗培养板一次, SODN-NP 组和 ASODN-NP 组取转染液稀释液分别加入各孔细胞上, ASODN 组加入与 ASODN-NP 组等量的 ASODN, 空白对照组只加入培养液。置于 37°C , 5% CO_2 细胞培养箱中继续培养。

FASODN 的细胞摄入实验 本实验分 4 组: 空白细胞对照组、单纯载体组 (NPs 组)、FASODN 组和 FASODN-NP 组。按“NPs 介导的转染”方法, 用 FASODN 和 FASODN-NP 转染细胞, NPs 组加入 NPs 和培养液, 空白细胞对照组只加入培养液。培养 24 h 后, 0.25% 胰酶常规消化各组细胞, PBS 漂洗 3 次 ($1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min), 去除游离荧光。分别取 1×10^6 个细胞上 FCM, 测定各组细胞内平均荧光强度。

转染后细胞各个指标的检测

形态学观察 转染寡核苷酸后, 在细胞培养状态下, 用倒置显微镜观察细胞的形态学改变。

细胞周期的测定 转染后 72 h, 将各组细胞用 0.25% 胰酶常规消化, PBS 漂洗 3 次 (离心 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 弃上清液, 加入 70% 乙醇 1 mL 振荡混匀, 30 min 后离心弃上清液, 用 PBS 漂洗 3 次, 采用 PI 避光染色 30 min, 用 FCM 进行细胞周期分析。

MTT 法测定细胞的生长抑制率 转染后各组细胞分别培养 24, 48, 72 和 96 h, 参考“NPs 的细胞毒性实验”方法用酶标仪在 490 nm 波长处测各孔的吸收度 (A), 并计算细胞生长抑制率。

转染后 hTERT 蛋白表达的检测 在 24 孔板内放置多聚赖氨酸处理的盖玻片, 以 $2 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种细胞, 转染 72 h 后利用 SP 免疫组化染色试剂盒, 按说明书进行免疫细胞化学染色, 苏木素复染后中性树胶封片。胞质被染成棕黄色为阳性细胞, 胞质不着色为阴性细胞。每张片子计数 200 个细胞, 确定阳性细胞数的百分率。

统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 统计学数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异用 *t* 检验或方差分析, 检验标准以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

结果

1 NPs 的细胞毒性实验

MTT 法检测 NPs 的细胞毒性结果显示 (图 1): 浓度小于 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NPs 对细胞的生长抑制率均较小, 浓度超过 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NPs 对细胞的生长抑

制率明显增强, 细胞毒性也增大。

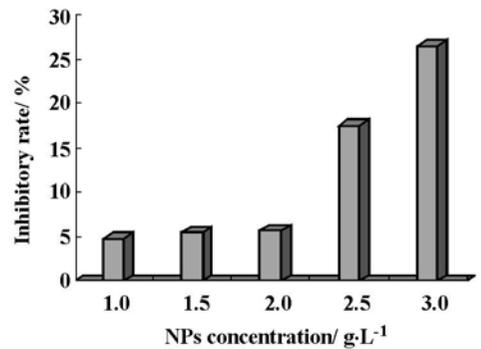


Figure 1 The inhibitory rate detected by MTT assay of A549 cells treated with different concentrations of blank polybutylcyanoacrylate nanoparticles (NPs) for 24 h

2 FASODN 的细胞摄入实验

FCM 检测细胞荧光摄入结果显示 (图 2): 空白对照组、NPs 组、FASODN 组和 FASODN-NP 组的胞内荧光道数分别为 140.06, 142.01, 150.40 和 500.06。NPs 组、FASODN 组与空白对照组胞内平均荧光道数比较无明显差异 ($P > 0.05$)。而 FASODN-NP 组较 FASODN 组、NPs 组和空白对照组相比差异性均非常显著 ($P < 0.01$)。

3 转染后 A549 细胞的形态学观察

倒置显微镜下观察 (图 3), 空白对照组、NPs 组和 SODN-NP 组细胞呈多角型贴壁生长, 细胞间结构紧密, 状态良好, 培养基中很少有漂浮细胞。ASODN-NP 各组细胞, 均可观察到贴壁细胞部分变圆, 细胞内颗粒增多, 细胞间结构变疏松, 少数细胞漂浮, 随着时间的增加细胞增殖减慢, 漂浮细胞及细胞周围碎片增多。

4 ASODN 对 A549 细胞周期的影响

转染 72 h 后, NPs 组与 SODN-NP 组及空白对照组相比, 细胞各周期无明显变化 ($P > 0.05$); ASODN-NP 各组与空白对照组相比, G_0/G_1 期细胞均有明显增加, S 期下降, 差异非常显著 ($P < 0.01$) (表 1)。

5 ASODN 对 A549 细胞生长抑制率的影响

转染 72 h 后, NPs 组、SODN-NP 及 ASODN 各组与空白对照组相比, A549 细胞生长无明显变化 ($P > 0.05$); ASODN-NP 各组与空白对照组相比, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 同时组间比较亦无显著性差异 ($P > 0.05$)。ASODN-NP 各组对 A549 细胞生长抑制作用随时间的延长而增强, 72 h 均达到高峰, 96 h 后略有下降 (表 2)。

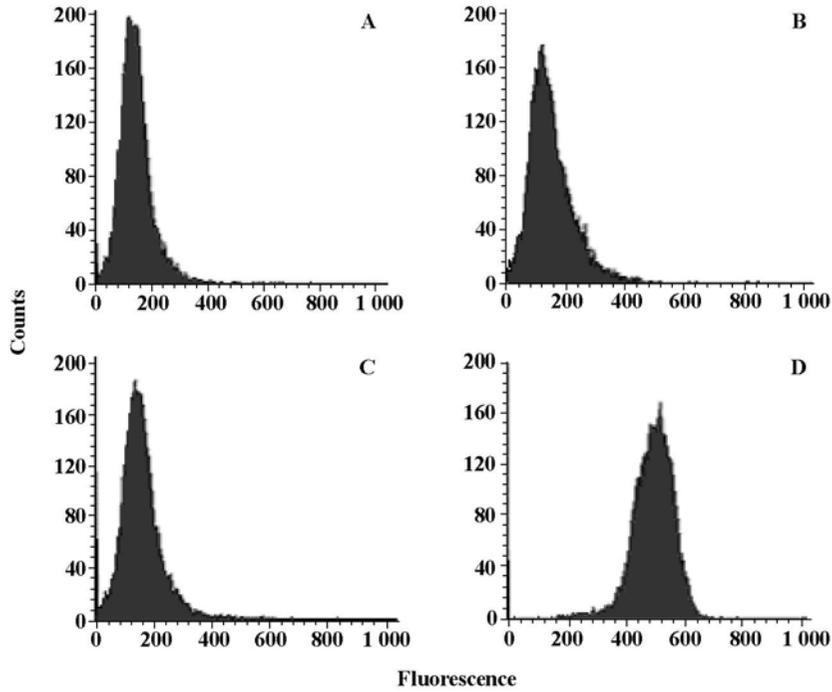
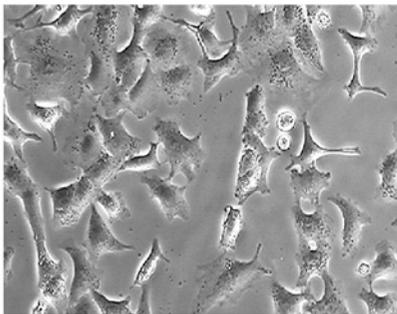
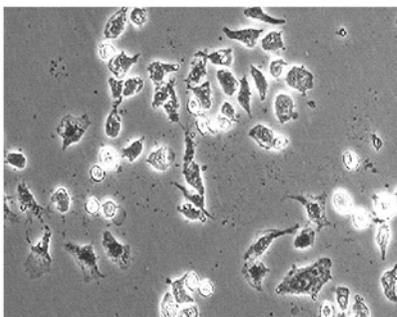


Figure 2 The intracellular fluorescence detected by FCM of the ingestion by A549 cells after treated with different samples at $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h. A: Control (blank cell); B: NPs (polybutylcyanoacrylate nanoparticles); C: FASODN ($5'$ -FITC-labelled ASODN); D: FASODN-NP ($5'$ -FITC-labelled ASODN-nanoparticle)



Untreated with ASODN-NP ($\times 200$)



Treated with ASODN-NP ($\times 200$)

Figure 3 Cell modality of A549 cells treated with ASODN-NP at $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 72 h by inverse microscope

6 ASODN对 A549细胞 hTERT蛋白表达的影响
免疫细胞化学法检测结果显示: 空白对照组细

Table 1 Cell cycle analysis of A549 cells after treated with different samples at $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 72 h by FCM ($n = 5$)

Group	Cell cycle analysis / %		
	G_0 / G_1	S	G_2 / M
Control	37.1 ± 1.6	59.5 ± 1.1	3.42 ± 0.04
NPs	37.7 ± 0.8	58.8 ± 1.3	3.5 ± 0.5
SODN-NP	37.5 ± 0.9	59.0 ± 2.4	3.6 ± 0.7
ASODN1	39.2 ± 0.6	55.48 ± 0.23	5.3 ± 0.6
ASODN2	38.5 ± 1.0	57.0 ± 0.9	4.5 ± 0.8
ASODN3	38.0 ± 0.7	58.0 ± 1.4	3.92 ± 0.18
ASODN1-NP	$67.6 \pm 2.6^{**}$	$23.9 \pm 2.6^{**}$	8.5 ± 1.0
ASODN2-NP	$66 \pm 4^{**}$	$33.1 \pm 1.6^{**}$	1.07 ± 0.12
ASODN3-NP	$57.6 \pm 2.1^{**}$	$38.6 \pm 0.9^{**}$	3.8 ± 0.4

$\bar{x} \pm s$, $** P < 0.01$ vs control group. Control: Blank cell; NPs: Polybutylcyanoacrylate nanoparticles; SODN-NP: Sense oligodeoxynucleotide-nanoparticle; ASODN1: Antisense oligodeoxynucleotide 1; ASODN2: Antisense oligodeoxynucleotide 2; ASODN3: Antisense oligodeoxynucleotide 3; ASODN1-NP: Antisense oligodeoxynucleotide 1-nanoparticle; ASODN2-NP: Antisense oligodeoxynucleotide 2-nanoparticle; ASODN3-NP: Antisense oligodeoxynucleotide 3-nanoparticle

胞阳性率为 (96.3 ± 2.0)%, NPs组为 (92 ± 4)%, SODN-NP组为 (93.6 ± 2.4)%,后两组较空白对照组无明显差异 ($P > 0.05$); ASODN1, ASODN2 和 ASODN3 各组细胞阳性率分别为 (86 ± 4)%, ($90 \pm$

Table 2 Inhibitory rate on A549 cells after treated with different samples at $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ by MTT assay

Group	24 h		48 h		72 h		96 h	
	A	Inhibitory rate / %						
Control	0.359 ± 0.021	-	0.47 ± 0.04	-	0.856 ± 0.008	-	0.97 ± 0.03	-
NPs	0.341 ± 0.018	5.0	0.460 ± 0.020	1.3	0.83 ± 0.03	2.4	0.966 ± 0.024	0.2
SODN-NP	0.36 ± 0.03	0.3	0.462 ± 0.023	0.8	0.86 ± 0.08	0	0.97 ± 0.04	0
ASODN1	0.340 ± 0.010	5.3	0.41 ± 0.04	11.2	0.718 ± 0.025	16.1	0.865 ± 0.022	10.9
ASODN2	0.35 ± 0.04	2.2	0.423 ± 0.013	9.2	0.773 ± 0.017	9.7	0.872 ± 0.018	10.2
ASODN3	0.35 ± 0.03	1.7	0.457 ± 0.024	1.9	0.82 ± 0.03	3.7	0.91 ± 0.05	6.7
ASODN1-NP	$0.27 \pm 0.04^{**}$	24.5	$0.32 \pm 0.03^{**}$	32.0	$0.320 \pm 0.028^{**}$	62.4	$0.41 \pm 0.06^{**}$	57.3
ASODN2-NP	$0.290 \pm 0.026^{**}$	19.2	$0.356 \pm 0.027^{**}$	28.3	$0.47 \pm 0.03^{**}$	44.6	$0.653 \pm 0.021^{**}$	32.5
ASODN3-NP	$0.309 \pm 0.022^{**}$	14.0	$0.371 \pm 0.023^{**}$	25.3	$0.541 \pm 0.020^{**}$	36.4	$0.68 \pm 0.10^{**}$	29.6

$n = 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control. Control: Blank cell; NPs: Polybutylcyanoacrylate nanoparticles; SODN-NP: Sense oligodeoxynucleotide-nanoparticle; ASODN1: Antisense oligodeoxynucleotide 1; ASODN2: Antisense oligodeoxynucleotide 2; ASODN3: Antisense oligodeoxynucleotide 3; ASODN1-NP: Antisense oligodeoxynucleotide 1-nanoparticle; ASODN2-NP: Antisense oligodeoxynucleotide 2-nanoparticle; ASODN3-NP: Antisense oligodeoxynucleotide 3-nanoparticle

5%)%和(91.2 ± 1.9)% ,较空白对照组亦无明显差异($P > 0.05$) ;而 ASODN1-NP, ASODN2-NP和 ASODN3-NP各组细胞阳性率分别为(39.6 ± 2.0)% , (42 ± 4)%和(54.2 ± 2.8)% ,较空白对照组均有明显降低($P < 0.01$)。

讨论

端粒酶催化亚单位组分 hTERT是端粒酶最重要的组成部分, hTERT mRNA与端粒酶活性显著相关,在调节端粒酶活性中起决定作用^[8], hTERT成为封闭端粒酶活性的良好靶位点。利用反义核酸技术,人工合成特定互补 mRNA的反义核酸,导入靶细胞,多途径阻止特定基因的复制、转录和翻译,从而调控基因表达,在分子生物学的基础研究和基因治疗等领域有广泛的应用前景^[9]。

近年来在载体系统的研究方面已做了大量工作,传统的病毒载体存在许多难以克服的缺点。在新型的非病毒载体中,纳米载体具有无毒、无免疫原性等优势,且能够很好地解决反义核酸被核酸酶降解的问题,提高反义核酸在细胞内的稳定性,且经阳离子表面活性剂修饰改变纳米粒的表面性质,其表面正电荷可与核苷酸的带负电的磷酸根形成复合物,使其有效避免巨噬细胞的吞噬,并增加药物包封率和载药量,与脂质体相比具有很大的价格优势,因此具有良好生物学特性的纳米粒成为基因转运和基因治疗中很有发展潜力的非病毒载体。

本文采用阳离子表面活性剂 DEAE-dextran修饰的 NPs作为转染的基因载体,细胞毒性实验表明:小于 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 NPs对细胞的生长抑制

率较低,毒性较小,随着 NPs浓度的增高抑制率呈增高趋势。NPs质量浓度从 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 增至 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对细胞的抑制率却增加了 68.75%,说明超过了 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度的 NPs会明显增加其细胞毒性,因此选用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度的纳米粒。NPs能够吸附反义核酸形成反义核酸和 NPs的复合物,防止核酸酶对反义核酸的降解,并提高反义核酸的细胞摄入率。FASODN的细胞摄入实验可以看出:单独转染 FASODN较空白细胞细胞内荧光强度仅增强 7.4%,而 FASODN-NP较单独转染 FASODN,胞内荧光强度增强了 232.5%,在各个检测指标中,单纯 NPs对细胞均无抑制作用,表明 NPs只扮演了载体的角色,增加了 A549细胞对寡核苷酸的摄入,与 Zimmer^[6]报道的 FASODN的细胞摄入实验结果一致。

根据 hTERT mRNA序列设计互补的 3条反义寡核苷酸链,转染终浓度均为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,以 NPs作为基因载体分别转染 A549细胞。转染后与空白对照组相比,ASODN-NP各组细胞的增殖受到抑制,生长抑制率随时间延长有增高趋势,72 h均达到最高值,而相同浓度的 SODN-NP作用于细胞相同的时间后,与对照组相比无明显差异,说明该抑制是特定碱基序列而非核苷酸骨架的作用,具有序列特异性,这与许多学者的研究结果相似。72 h后 ASODN-NP对细胞的生长抑制作用虽然存在,但是略有下降,可能是由于随着时间的延长 ASODN被不断的代谢失活,提示反义核酸的作用具有时间依赖性,多次转染有助于增强其效应。ASODN-NP处理细胞后,S期细胞数明显减少,G₀/G₁期细胞明显增多,细胞的增

殖周期发生改变。以上结果均说明 ASODN 确有抑制 A549 细胞增殖的能力。ASODN 抑制细胞增殖可能有 3 方面的原因: ①抑制端粒酶活性, 使缩短的端粒得不到补偿, 细胞发生老化和退行性变, 细胞分裂和增殖减慢及停止, 细胞发生衰亡; 且端粒酶活性与细胞周期关系密切^[10], 端粒酶活性的下降直接影响到细胞周期发生变化; ②端粒缩短导致染色体功能异常, 染色体融合、降解和基因异常, 导致细胞死亡; ③端粒酶 ASODN 可能下调促增殖癌基因的表达, 激活抑癌基因^[11], 因而出现增殖速率下降。在检测 ASODN1, ASODN2 及 ASODN3 这 3 条反义寡核苷酸对 A549 细胞抑制作用的实验中, ASODN1 是其中抑制作用最强者。ASODN-NP 处理的 A549 细胞 hTERT 蛋白表达下降, 表现为细胞阳性率较空白对照组均有明显降低 ($P < 0.01$)。表明 hTERT ASODN 进入 A549 细胞后, 发挥其特定功能, 在细胞质内与 hTERT mRNA 特异性结合, 形成 DNA-RNA 二聚体, 使靶 mRNA 不能与核蛋白体结合, 阻止 hTERT mRNA 翻译为蛋白质, 还可激活 RNase H 的活性, 迅速降解 hTERT mRNA, 使其翻译功能减弱或消失, 不能产生有效蛋白。最终表现为 hTERT 蛋白表达的下降。

这些结果证实由 NPs 介导能明显提高反义核酸的细胞摄入, 使反义寡核苷酸更明显地发挥其生物学作用, 有效改变 A549 细胞的增殖周期, 抑制该细胞中 hTERT 蛋白的表达, 影响细胞的增殖, 对肺腺癌细胞的生长有明显的抑制作用。为肺腺癌基因治疗提供了有力证据。

References

- [1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266: 2011 - 2015.
- [2] Ito H, Kyo S, Kanaya T, et al. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4: 1603 - 1608.
- [3] Zhang XN, Zhang Q, Wen H, et al. Preparation of albendazole polybutyrcyanocrylate nanoparticles and study on its pharmaceutical properties and tissue distribution [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 38: 462 - 466.
- [4] Bennett WP, Hollstein MC, Hsu IC, et al. Mutational spectra and immunohistochemical analysis of p53 in human cancer [J]. *Chest*, 1992, 101: 19S - 20S.
- [5] Chavany C, Le Doan T, Couvreur P, et al. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides [J]. *Pharm Res*, 1992, 9: 441 - 449.
- [6] Zimmer A. Antisense oligonucleotide delivery with polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers [J]. *Methods*, 1999, 18: 286 - 295.
- [7] Liu W, Zhang HL, Zhou TY, et al. Study on preparation of antisense oligodeoxynucleotides-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles and its loading [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2005, 40: 1312 - 1315.
- [8] Yan P, Coindre JM, Benhattar J, et al. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology and proliferative activity [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 3166 - 3170.
- [9] Cho-Chung YS. Antisense DNAs as targeted therapeutics for cancer: no longer a dream [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3: 934 - 939.
- [10] Lebeau J, Fouchet P, Ory K, et al. Down regulation of telomerase activity after progesterone treatment of human breast cancer cells: essential role of the cell cycle status [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22: 2161 - 2166.
- [11] Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, et al. Antisense telomerase treatment induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation [J]. *FASEB J*, 1998, 12: 801 - 811.