

叶酸/聚酰胺-胺作为 miR-7 基因载体的胶质瘤靶向性研究

刘振林¹, 李 罡¹, 苏治国¹, 王骏飞¹, 赵玉军², 陈 镭¹, 刘洪良¹, 姜忠敏³, 刘晓智¹

Study of Targeting Ability of Folic Acid/polyamide-amine As miR-7 Vector to Glioma

Liu Zhenlin¹, Li Gang¹, Su Zhiguo¹, Wang Junfei¹, Zhao Yujun², Chen Lei¹, Liu Hongliang¹, Jiang Zhongmin³, Liu Xiaozhi¹

1. Department of Neurosurgery, The Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300162, China, 2. Department of Neurology, 3. Department of Pathology

Corresponding Author: Liu Xiaozhi, E-mail: lxx0907@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To explore the gene transfection efficiency of folic acid/polyamide-amine as miR-7 vector and its targeting ability for glioma, so as to lay the foundation to develop an efficient delivery of small molecule drugs targeting glioma. **Methods** FA/PAMAM composites compound was prepared by dialysis method. The transmission electron microscope was performed to observe the morphology of the nanoparticles. After transfecting miR-7 gene into U251 glioma cell line, fluorescence microscope was used to detect the gene transfection efficiency, quantitative RT-PCR was used to detect the miR-7 level. The intracranial glioma model was established in de-thymus mice, the nanoparticles were transplanted by the way of vena caudalis, internal carotid artery, and tumor situ. After 48 hours, the frozen section was obtained to observe the aggregation extent. And immunocytochemistry and western blot methods were used to test the protein expression of EGFR and PCNA. **Results** The nanoparticle, with sphere morphology, may transfer efficiently the miR-7 gene into U251 glioma cells, and increase the miR-7 level. And it can be found in tumor situ, in spite of by different transplant ways. The aggregation extent was the vena caudalis way less than the internal carotid artery way, and furthermore less the tumor situ way ($P < 0.05$). The protein level of EGFR and PCNA in FA/PAMAM/miR-7 group both lower than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** FA/PAMAM can transfect effectively miR-7 into glioma both *in vivo* and *in vitro*, and is expected to become an efficient delivery of small molecule drugs targeting glioma.

Key words: Glioma; microRNA; Epidermal growth factor receptor; Gene therapy

摘要:目的 检测叶酸/聚酰胺-胺(FA/PAMAM)作为 miR-7 基因载体的细胞转染效率及其胶质瘤靶向功能,为研发高效小分子靶向投递药物奠定基础。**方法** 透析法制备 FA/PAMAM 络合物,透射电子显微镜观察粒子形貌;以其为载体转染 miR-7 至人脑胶质瘤细胞系 U251,荧光显微镜观察络合物转染效率,qRT-PCR 方法检测 miR-7 水平;制作去胸腺小鼠颅内 U251 胶质瘤模型,分别经尾静脉、颈内动脉及肿瘤原位进行络合物移植,48 h 后取脑制作冰冻切片,荧光显微镜观察络合物在肿瘤内的聚集程度;蛋白印记(Western blot)法检测 miR-7 靶基因 EGFR 和细胞增殖活性抗原(PCNA)的蛋白表达。**结果** 粒子形貌规整,与 U251 细胞共培养 48 h 后可获得高效转染,并显著提高 miR-7 水平。经尾静脉、颈内动脉及肿瘤原位三种途径移植后获得的冰冻切片中均可发现络合物粒子在肿瘤部位的聚集,但聚集程度为尾静脉<颈内动脉<肿瘤原位。Western blot 结果示 EGFR 和 PCNA 水平较对照组均有不同程度下降($P < 0.05$)。**结论** FA/PAMAM 能够高效投递 miR-7 基因至体内、外胶质瘤细胞,有望成为一种新的高效小分子靶向投递药物进行胶质瘤基因治疗。

关键词: 胶质瘤;微小 RNA;表皮生长因子受体;基因治疗

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)01-0001-05

收稿日期:2011-05-31;修回日期:2011-09-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000901);天津市自然科学基金资助项目(09JCYBJC09500)

作者单位:1. 300162 天津,天津市第五中心医院神经外科,2. 神经内科,3. 病理科

通信作者:刘晓智, E-mail: lxx0907@yahoo.com.cn

作者简介:刘振林(1967-),男,硕士,副主任医师,主要从事胶质瘤基因治疗的基础与临床研究

0 引言

微小 RNA(microRNA, miR)被认为是最具应用前景的胶质瘤基因治疗药物之一,但由于血脑屏障、胶质瘤细胞间连接通讯缺失等因素的存在,使常规给药途径,如口服及静脉输注等,很难达到预期治疗效果,严重限制了其实际应用^[1]。因此寻找一种

转染效率高、靶向性强的药物投递系统至关重要。

聚酰胺-胺(polyamide-amine, PAMAM)具有广阔的“容积”和大量表面功能基团,凭借其高增溶、药物缓释、低毒性等优势成为现代药物投递系统的优选之一^[2]。本研究利用胶质瘤细胞高表达叶酸受体(folic acid receptor, FR)、低表达 miR-7 的特点,以叶酸(folic acid, FA)/FR 为靶向轴,以 PAMAM 为载体,介导 miR-7 转染人脑胶质瘤细胞系 U251,利用体内、外实验检测 PAMAM 作为药物投递材料的转染效率、靶向特征及其在肿瘤局部发挥的实际作用,为研发高效小分子靶向投递药物奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株 U251 胶质瘤细胞系由天津市神经病学研究所馈赠。

1.1.2 试剂 PAMAM(G5)、FA(美国 Sigma 公司),miR-7 序列由 22 个碱基组成,为 5'-UUGUUU-UAGUGAUCAAGAAGGU-3',无义链序列为 5'-GT-GAATGCGATGCCCTCCGAGG-3',其 5'端由 FITC 荧光标记,EGFR 的 miRNA 靶序列为:(1)5'-TTACTTCAATGGGCTCTTCCA-3'(位于 EGFR 3'-UTR 区第 357-377 碱基对),(2)5'-AGCACAAGC-CACAAGTCTTCCA-3'(位于 EGFR 3'-UTR 区第 442-464 碱基对),(3)5'-GACTGACTTGTGTTGTC-CTTCCA-3'(位于 EGFR 3'-UTR 区第 726-747 碱基对)。主要试剂有:胎牛血清(杭州四季青),DMEM 培养液、胰蛋白酶(美国 Invitrogen 公司);山羊抗人表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)单克隆抗体(美国 Chemicon 公司),兔抗人增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.1.3 动物 雄性 80 g 去胸腺小鼠 72 只,购自中国军事医学科学院动物中心,饲养于天津医科大学动物实验中心,饲养条件为温度 20℃~25℃,湿度(50±5)%(京动许字 0195)。

1.2 方 法

1.2.1 FA/PAMAM 络合物制备与透射电子显微镜观察 参考李瑞^[3]和任玉^[4]等的实验方法制备 FA/PAMAM 络合物,FA 通过两个连续的步骤连接到 PAMAM-D 上。0.032 78 g FA 在室温下与 0.199 79 g EDC 溶于 20 ml DMSO 中充分反应后,FA 的活化酯溶液被逐滴滴加到 PAMAM 的甲醇和 DMSO 的混合溶液中。透射电子显微镜下观察络合物形貌。

1.2.2 细胞培养与基因转染 细胞于含 10%胎牛血清的 DMEM 中常规培养,培养条件为 37℃、5%

CO₂且饱和湿度。隔天换液,每 3 d 传代 1 次。实验分组:(1)FA/PAMAM/无义序列组,(2)FA/PAMAM/miR-7 组,(3)U251 正常对照组。细胞生长至 60%~70%融合时,降低血清浓度至 5%,将 PAMAM 与 miR-7 或无义序列以 16:1 的配比加入 U251 细胞中,37℃、5%CO₂培养箱培养 4 h 后,将培养液换成含 10%胎牛血清的全培养液继续培养 48 h 后收获细胞。荧光显微镜下检测阳性细胞的比率,从而获得转染率。

1.2.3 qRT-PCR 检测 miR-7 表达 提取转染后 48 h 细胞总 RNA,反转录酶转录后进行 PCR 循环反应。miR-7 上游引物:5'-AAAAAGAACACGTGGAAG-GATAG-3',下游引物:5'-CCGCCTAACGTAC-CGCGAATTT-3'。反应条件如下:94℃ 3 min 后连续 45 个循环,每个循环内 94℃ 30 s、60℃ 45 s、72℃ 30 s。内参照为人 18 rRNA Taqman 探针,上游引物:5'-AACTTTCGATGGTAGTCGCCG-3',下游引物:5'-CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT-3'。

1.2.4 小鼠颅内胶质瘤模型制作与药物接种 实验分组同前,小鼠 72 只。取对数生长期 U251 胶质瘤细胞,充分悬浮,制成单细胞悬液备用。按 3.0 ml/kg 注射 10%水合氯醛进行小鼠腹腔麻醉;超净台上用立体定向注射仪固定小鼠,鼠脑右侧尾状核头部共接种 5 μl 含 1×10⁶ 个 U251 细胞的细胞悬液,注射时间不少于 5 min,留针至少 3 min,切口缝合。细胞移植后第 8 d 开始药物接种,给药途径分:(1)尾静脉给药;(2)颈动脉给药;(3)肿瘤位点。每次每只接种含 5 μg 无义序列或 miR-7 寡核苷酸的 FA/PAMAM 溶液 10 μl。

1.2.5 络合物在肿瘤内部的聚集情况检测 于细胞移植后第 10 d,即药物接种后第 48 h,动物断头取脑,制作含肿瘤组织的冰冻切片。荧光显微镜下观察各种给药途径下 FA/PAMAM/miR-7 络合物在肿瘤内部的聚集情况。

1.2.6 Western blot 方法进行 EGFR 和 PCNA 表达定量 提取各分组情况下组织总蛋白,Bradford 法蛋白定量。电泳后考马斯亮蓝染色,蛋白分离满意后转膜,Western 封闭液 37℃ 封闭 2 h,PBS 充分漂洗后滴加相应一抗,抗体稀释度分别为 EGFR(1:500)和 PCNA(1:1 000),4℃ 水平摇床过夜,次日使用辣根酶标记的 1:500 稀释二抗 37℃ 下作用 2 h。化学发光试剂盒显影,Bio-Rad 凝胶成像系统扫描吸光度值,Quantity One 软件分析。

1.3 统 计 学 方 法

应用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FA/PAMAM 络合物形貌观察

FA-PAMAM 为密实的实心球体, 粒子分布均匀, 粒径大小在 50 nm 左右; PAMAM 与 miR-7 或无义序列以 16:1 配比形成的复合物粒径大小在 60~80 nm, 小球分布均匀。

2.2 基因转染效率

在绿色激发光视野下, 可见到 FITC 标记的复合物微粒呈现绿色荧光, 呈串珠状或点片状散在分布于 U251 细胞胞膜或胞质内。随机观察 10 个高倍视野, 细胞阳性标记率为 $(87.6 \pm 7.8)\%$, 见图 1。

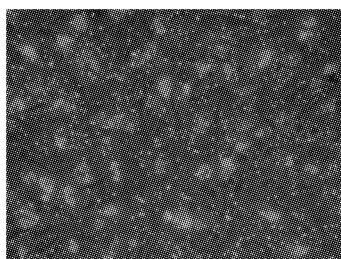
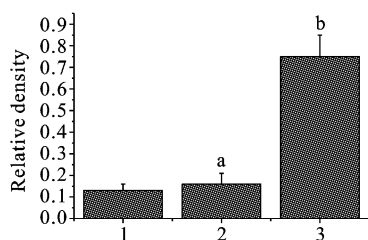


图 1 FA/PAMAM 介导 miR-7 转染 U251 胶质瘤细胞情况观察 ($\times 200$)

Figure 1 The test of miR-7 gene transfection into U251 glioma cells induced by FA/PAMAM ($\times 200$)

2.3 基因转染后 miR-7 表达水平变化

U251 正常对照组和 FA/PAMAM/无义序列组 miR-7 表达程度均较低, 二者间比较差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), FA/PAMAM/miR-7 组 miR-7 表达程度明显增高, 与前两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



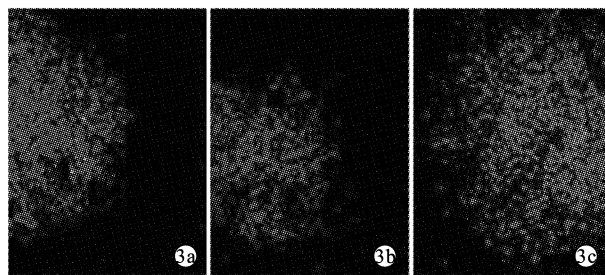
1: control group; 2: FA/PAMAM/nonsense sequence group; 3: FA/PAMAM/miR-7 group. Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with FA/PAMAM/nonsense sequence group, ^b $P < 0.05$

图 2 FA/PAMAM 介导 miR-7 转染 U251 后 miR-7 变化情况
Figure 2 The test of miR-7 level in U251 glioma cells after the miR-7 gene transfection induced by FA/PAMAM

2.4 络合物在肿瘤内部的聚集

在绿色激发光下, FITC 标记的复合物微粒呈绿色荧光, 图 3 显示不同给药途径下 FA/PAMAM/miR-7 络合物在肿瘤内部的聚集情况。可见经尾静脉接种组脑肿瘤内部有少量绿色荧光标示的阳性信号, 随机观察 10 个高倍视野, 得其阳性

率为 $(15.3 \pm 3.7)\%$, 脑内其余部分未见该种阳性信号; 经颈动脉接种组脑肿瘤内部的绿色荧光信号较尾静脉接种组明显增强、增多 ($P < 0.05$), 阳性率为 $(27.4 \pm 5.4)\%$, 脑内非肿瘤组织亦未见该种阳性信号; 肿瘤原位接种组肿瘤内部积聚有最高强度的阳性信号, 阳性率为 $(91.7 \pm 6.1)\%$, 与前两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



3a: only a small amount of green fluorescence signal was found via vena caudalis; 3b: only a small amount of green fluorescence signal was found via internal carotid artery; 3c: a large number of green fluorescent signal was found via tumor situ

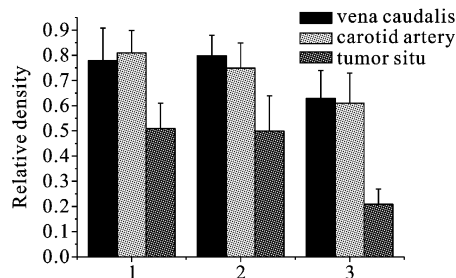
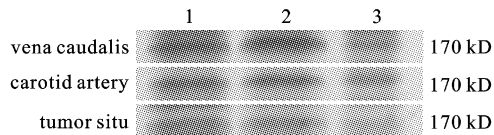
图 3 不同给药途径下 FA/PAMAM/miR-7 络合物在肿瘤内部的聚集 (蓝色为 hoechst33258 标记肿瘤细胞核, 绿色为 FITC 标记的络合物 $\times 100$)

Figure 3 The gathering of FA/PAMAM/miR-7 in tumor bed through different ways

(blue: the nuclei of tumor cells labelled by hoechst33258, green: the complex labelled by FITC $\times 100$)

2.5 miR-7 对 EGFR 沉默效果

Western blot 结果显示三种接种途径转染 FA/PAMAM/miR-7 后, EGFR 蛋白表达量较对照组和转染无义序列组均有明显下降 ($P < 0.05$), 原位接种组与另两组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但尾静脉接种组与颈动脉接种组间比较差异不明显 ($P > 0.05$), 见图 4。

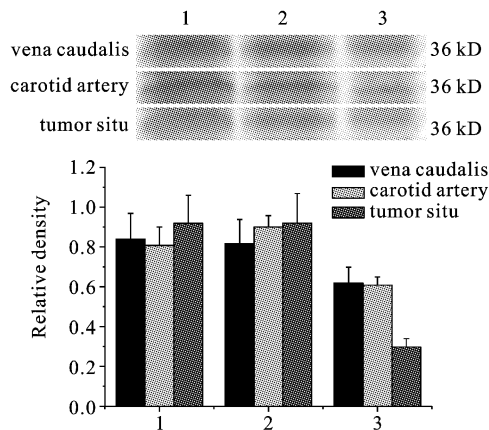


1: control group; 2: FA/PAMAM/nonsense sequence group; 3: FA/PAMAM/miR-7 group

图 4 不同接种途径转染 miR-7 后 EGFR 沉默效应
Figure 4 The comparison of gene silence effect of miR-7 in tumor bed through different ways

2.6 肿瘤细胞增殖活性比较

Western blot 结果显示三种接种途径转染 FA/PAMAM/miR-7 后,PCNA 阳性表达率较对照组和转染无义序列组均有明显下降($P < 0.05$),原位接种组与另两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但尾静脉接种组与颈动脉接种组间比较差异不明显($P > 0.05$),见图 5。



1: control group; 2: FA/PAMAM/nonsense sequence group; 3: FA/PAMAM/miR-7 group

图 5 不同接种途径转染 miR-7 后 PCNA 表达水平比较

Figure 5 The comparison of protein level of PCNA in tumor bed through different ways

3 讨论

胶质瘤本质上是一种基因异常疾病,靶向胶质瘤恶性演变基因通路中的关键责任基因是其治疗根本。miR 通过与靶基因 3'-UTR 区的完全或不完全互补结合,引起 mRNA 的降解或翻译抑制,在转录后水平调控细胞分化、增殖和凋亡等众多病理生理过程^[5]。Kefas 等^[6]在 2008 年首次报道 miR-7 的基因序列与胶质瘤 EGFR 基因 3'-UTR 区存在至少 3 个区域的不完全互补,并推测这种广泛性的序列互补将成为胶质瘤特定基因靶向治疗的一种选择方法。我们在近期工作中对国人胶质瘤标本及细胞系中 miR-7 的表达和功能进行了系统性研究,证实了其作为靶向敲低胶质瘤责任基因 EGFR 蛋白表达,进而抑制胶质瘤恶性演进的重要意义和良好的应用前景。

工作中发现经 miR-7 基因转染的胶质瘤细胞系增殖活性受到明显抑制,并可部分沉默 EGFR 的转录后翻译过程,降低其生物活性和功能^[7]。但在动物实验中发现经脂质体和腺病毒转染的 miR-7 均不能有效降低胶质瘤荷瘤鼠的动物生存率,仅表现出生存期的部分延长。后续实验中发现,由于血脑屏障的存在和胶质瘤细胞间通讯连接的缺失,使得最终聚集于瘤床内部的目的基因量极其有限,极大程度上限制了其功能发挥。因此寻找一种能够跨越血脑屏障,且不依

赖于细胞间通讯连接的基因投递材料意义非常。

PAMAM 是一种树状大分子,具有规整结构和可精确控制的表面功能基团,内部的空腔可包裹小分子化合物,并在一定条件下实现其可控性释放;其高度支化的结构和特有的单分散特性,使其末端官能团通过引入阴离子、阳离子及疏水基团,显著提高其生物相容性、生物利用度和靶向性。此外其高增溶性、低毒性等优势也使其成为现代药物投递系统的优选之一^[8]。FR 在大多数新生正常组织中的表达仅限于一些难以进入血循环的上皮细胞顶膜,但在多种肿瘤细胞中高度表达,且同肿瘤的恶性程度呈正相关,因此使其成为肿瘤细胞追踪的靶标选择之一。

本研究利用胶质瘤细胞高表达 FR 的特点,以 FA/FR 为靶向轴,以 PAMAM 为载体,介导 miR-7 转染人脑胶质瘤细胞系 U251,利用体内、外实验检测 PAMAM 作为药物投递材料的转染效率、靶向特征,及其在肿瘤局部发挥的实际作用,旨在为研发高效小分子靶向投递药物奠定实验基础。

通过实验发现,利用 FA/PAMAM 可以有效转染 miR-7 进入体外培养的胶质瘤细胞系 U251 胞质,并显著提高 miR-7 水平。随后本研究重点对该种靶向材料的体内效能进行了实验研究。当 FA/PAMAM/miR-7 通过小鼠尾静脉、颈动脉和原位接种后,最终均能聚集于颅内肿瘤床,而瘤周非肿瘤组织未见,表明由 FA/FR 轴介导的靶向性良好;经尾静脉、颈动脉和原位接种最终聚集于肿瘤床的阳性率分别达到 $(15.3 \pm 3.7)\%$ 、 $(27.4 \pm 5.4)\%$ 和 $(91.7 \pm 6.1)\%$,与脂质体作为 miR-7 载体相比较,转运效率均有显著提高,显示出 FA/PAMAM 作为小分子药物载体的靶向性和高效性优势。通过数据对比可以发现,上述不同接种途径最终聚集于肿瘤床的药物量存在很大差别,尾静脉接种组最低,颈动脉组次之,原位接种组最高。推测上述药物通过机体部分器官和组织时依然存在较大遗留效应,如何减少这种遗留效应对于日后开发适用于脉管输注的小分子靶向药物将是一个新课题。

为检测 FA/PAMAM 作为 miR-7 载体在体内肿瘤床发挥的实际治疗效果,我们对 miR-7 的靶标基因 EGFR 和肿瘤细胞增殖活性指标 PCNA 的蛋白表达量进行了检测,发现经 miR-7 转染后的胶质瘤细胞 EGFR 蛋白表达量明显下降,同时细胞增殖活性也明显下降,表明 FA/PAMAM 作为 miR-7 载体不会影响其携带药物的治疗效果。总之,通过本研究我们发现并检验了 FA/PAMAM 作为 miR-7 载体在治疗颅内胶质瘤方面的先进性,同时也出现了一些未能解决的遗留问题,有待于进一步深入解析。

参考文献:

- [1] Kang CS, You YP, Pu PY. Role of miRNA in diagnosis and treatment of malignant tumors[J]. Chin J Neuro-Oncol, 2007, 5(2):138-141. [康春生, 尤永平, 浦佩玉. miRNA 在恶性肿瘤诊断与治疗中的进展[J]. 中国神经肿瘤杂志, 2007, 5(2): 138-141.]
- [2] Yang H. Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis[J]. Pharm Res, 2010, 27(9):1759-1771.
- [3] Li R, Zhang JX, Shi L, et al. Study on the inhibitory effect of a new ultramicrocarrier FA-PAMAM-mediated hTERT-siRNA on human cerebral glioma cell line U251 in vitro[J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg, 2008, 8(4):339-314. [李瑞, 张军霞, 石磊, 等. 新型超微载体 FA-PAMAM 介导 hTERT-siRNA 对人脑胶质瘤细胞系 U251 抑制作用的体外研究[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2008, 8(4):339-344.]
- [4] Ren Y, Zhou X, Yuan XB, et al. Antisense micro RNA-21 enhances U251 human glioma cell chemo-sensitivity to 5-Fluorouracil[J]. Chin J Neurosury, 2010, 26(5):463-467. [任玉, 周旋, 原续波, 等. 反义 miR-21 增加 U251 脑胶质瘤细胞对 5-氟尿嘧啶化疗敏感性的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2010, 26(5):463-467.]
- [5] Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(10):704-714.
- [6] Kefas B, Godlewski J, Comeau L, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(10):3566-3572.
- [7] Liu ZL, Qiu J, Jiang ZM, et al. Effect of epidermal growth factor receptor gene silence by miR-7 on inhibiting glioma cell cycle[J]. Chin J Neurosury, 2010, 26(11):1035-1038. [刘振林, 邱瑾, 姜忠敏, 等. miR-7 沉默表皮生长因子受体对胶质瘤细胞周期的影响[J]. 中华神经外科杂志, 2010, 26(11): 1035-1038.]
- [8] Sun W, Zhu H. Progress of Folate-PAMAM dendrimer conjugates as drug carriers in targeted drug delivery system[J]. Chin J Pharmaceut, 2010, 41(7):538-542. [孙武, 朱宏. 叶酸-聚酰胺-胺聚合物靶向给药系统的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(7):538-542.]

[编辑:安 凤;校对:黄园玲]

• 简讯 •

本刊启事

《肿瘤防治研究》杂志为进一步扩大学术影响,更好地服务于广大作者,经研究决定,从 2012 年 1 月 1 日起,所有来稿均不再收取论文审稿费,专家审稿费由本刊独立承担。

《肿瘤防治研究》编辑部