

肿瘤靶向 NGR/LPD 复合物对人乳腺癌裸鼠移植瘤作用的研究

王晓娟 张振中 邵彦江 权松霞 李惠翔

摘要 目的 观察肿瘤靶向 NGR/LPD 复合物对人乳腺癌裸鼠移植瘤的抑制作用。方法 抑瘤实验设有空白对照组、反义核酸组、正义 NGR/LPD 组、PEI/ASODN 组、LPD 组、NGR/LPD 组。其中,PEI/ASODN 组、LPD 组及 NGR/LPD 3 组分别设置高低浓度组(100 μ l, 200 μ l)作对照考察剂量-效应相关性。通过激光共聚焦显微镜观察药物在裸鼠体内的分布情况。RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达水平,免疫组化检测 hTERT 蛋白表达的变化。TUNEL 法观察肿瘤细胞的凋亡情况。结果 体内分布实验表明,NGR/LPD 复合物具有肿瘤靶向性,未经 NGR 修饰的 ASODN、LPD 及 PEI/ASODN 则极少分布在肿瘤组织中。NGR/LPD 组的瘤体生长最为缓慢,其最大抑瘤率与其他各组相比具有显著差异($P < 0.05$),hTERT mRNA 和端粒酶活性表达明显低于各对照组($P < 0.05$),hTERT 蛋白表达量下降,肿瘤细胞的凋亡指数明显高于各对照组($P < 0.05$)。结论 NGR/LPD 在体内有很好的肿瘤靶向性和抑制肿瘤细胞生长的作用。

关键词 肿瘤靶向治疗 脂质体-聚阳离子-DNA 复合物 端粒酶反转录酶(hTERT) MCF-7 细胞 裸鼠

The Effect of Tumor-targeted Gene Delivery of NGR/LPD Complexes on Telomerase in the MCF-7 Cells in vivo. Wang Xiaojuan, Zhang Zhenzhong, Shao Yanjiang, Quan Songxia, Li Huixiang. First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan 450052, China

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of a novel non-viral gene delivery system, tumor-targeted gene delivery of Liposome-polycation-ASODN complexes (LPD) on telomerase in the MCF-7 cells in vivo. **Methods** Human breast carcinoma cell line MCF-7 that grew logarithmically was trasplanted subcutaneously to BALB/C-nu/nu mice and model of xenoplated tumor was established. 45 mice were divided randomly into 9 groups, including free ASODN group, blank control group, NGR/Lipo/PEI/SODN control group, Lipo/PEI/ASODN (LPD) group, NGR/Lipo/PEI/ASODN (NGR/LPD) group and PEI/ASODN group. The last three groups (LPD, NGR/LPD, PEI/ASODN) were divided into high and low doses (100 μ l, 200 μ l) groups respectively in order to explore whether its efficiency of inhibiting tumor growth was correlated with dose. hTERT gene expression was detected by RT-PCR method, and hTERT protein was evaluated by immunohistochemistry. Apoptotic cells were evaluated with TUNEL assey. Distribution of drugs in nude mice was detected by laser confocal microscope. **Results** It was found that NGR/LPD could significantly inhibit tumor growth, compared with LPD, PEI/ASODN condensates and the negative control groups ($P < 0.05$). The result from confocal microscope showed that NGR/LPD could be transported into tumor tissue efficiently after administering intravenously, while the condensates and unmodified LPD couldn't enter into tumor tissue efficiently. The expression of hTERT protein was decreased significantly ($P < 0.05$). The apoptosis index of the NGR/LPD group was obviously higher than that of the other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** NGR/LPD causes remarkable inhibitory effects on the growth of human breast carcinoma cell MCF-7 in nude mice. The ideal tumor-target characteristic and strong anti-tumor activity of NGR/LPD were both proved in this study.

Key words Tumor-targeting gene therapy; Liposome-polycation-DNA complex (LPD); NGR peptides; Human telomerase reverse transcriptase (hTERT); Nude mice

端粒酶是公认的最重要的肿瘤标志物之一。端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase,

hTERT)是端粒酶的限速亚单位,它的表达量对端粒酶的活性调控起着决定性作用,因此成为抗肿瘤治疗的重要靶点之一^[1~4]。多聚阳离子聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)可与寡核苷酸通过静电作用形成纳米级复合物。为避免 PEI/DNA 纳米微粒在体内受到各种负离子的影响,消除其免疫原性和细胞毒性,利用脂质体屏蔽 PEI/DNA 复合物,可制备出脂质体

基金项目:国家自然科学基金资助项目(90406024)

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院病理科(王晓娟、权松霞、李惠翔); 450001 郑州大学药学院(张振中、邵彦江)

通讯作者:李惠翔,电子信箱:huixiang19@yahoo.cn

- 聚阳离子 - DNA 复合物 (lipid - polycation - DNA, lipopolyplexes, LPD)。单纯的 PEI/DNA 纳米微粒和 LPD 复合物进入体内后缺乏靶向分子或靶向基团,进入体内后绝大部分被肺、肝、肾截留,会直接影响体内转染效果。将与肿瘤新生血管受体 CD13 特异性结合的 NGR (N: 天冬酰氨酸, G: 氨基乙酸, R: 精氨酸) 多肽连接在纳米复合物表面,可使其具有靶向肿瘤细胞特点^[5]。本研究设计针对 hTERT mRNA 的反义寡脱氧核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotides, ASODN), 利用 PEI 缩合 ASODN 形成纳米颗粒,然后用脂质体对 PEI/ASODN 进行包裹,制成 LPD,并对其进行 NGR 靶向修饰,制成具有肿瘤靶向功能的非病毒基因载体 (NGR/LPD)。通过体内分布实验、抑瘤实验,分别观察 NGR/LPD 的体内靶向性、对人乳腺癌细胞系 MCF-7 的裸鼠皮下移植瘤的抑制作用、端粒酶活性。

材料与方法

1. 材料: (1) 细胞: 人乳腺癌 MCF-7 系由河南省医药科学研究所王庆端研究员惠赠。(2) 动物: BALB/c - nude 裸鼠 60 只, 4~6 周龄, 雌性, SPF 级, 购自中国科学院上海实验动物中心。(3) 试剂: 兔抗人 hTERT 多抗 (武汉博士德生物工程有限公司); 通用型 S-P 超敏试剂盒、DAB 显色剂 (福州迈新生物技术开发有限公司); TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒 (南京凯基科技发展有限公司); 双十二烷基二甲基溴化铵 (DDAB)、1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰胆碱 (POPC) (美国 Avanti Polar Lipids 公司); DSPE-PEG2000、DSPE-PEG2000-Maleimide (美国 Shearwater 公司)。根据 hTERT DNA 基因序列设计 ASODN, 其序列: 5'-CCGCCCTCTC-CTCGCGGCGCGAGTT-3', 另设计正义寡核苷酸序列作对照, SODN: 5'-GAGCATTAGCACC GCGGG-3'; hTERT mRNA 上游引物 5'-CACCTGCCGTCTTCACTTCC-3'; 下游引物 5'-TTACTCCACAGCAGCTCCC-3', 扩增片段长度为 285bp; 内参 β -actin 上游引物 5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3'; 下游引物 5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGG-3', 扩增片段长度为 415 bp (北京奥科)。TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (大连宝生物工程有限公司)。

2. 建立动物模型: 将对数生长期细胞制成单细胞悬液, 调整细胞浓度约为 1×10^7 /ml, 每只裸鼠前腿背侧皮下注射 0.2ml, 以皮下结节直径超过 5mm 为成瘤标准, 经待成瘤后, 随机取 12 只裸鼠用于体内分布试验, 另取 45 只成瘤裸鼠按抑瘤实验分组开始给药, 隔天给药 1 次, 连续给药 3 周, 每 3 天测定瘤体大小 1 次, 连续测定 3 周。瘤体体积 (V) = [瘤体长径 (a) $\times$ 瘤体短径平方 (b²)]/2。

3. 药物的制备及相关性质的考察: (1) 药物的制备: 将一定浓度的 ASODN 溶液加入到 pH = 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液中, 混匀, 使 ASODN 的浓度为 100 μ g/ml。按 N/P 等于 10 加

入相应量的 B-PEI, 即得 PEI/ASODN 缩合体混悬液; 取 POPC、DDAB、DSPE-PEG2000 和 DSPE-PEG200-maleimide 共 20 μ mol, 按比例用氯仿/甲醇 (2:1, v:v) 溶剂溶解, 经旋转蒸发和真空干燥后得到脂质薄膜; 加入 PEI/ASODN 缩合体混悬液, 振荡水化脂质薄膜, 待脂膜完全脱落后继续振荡 5min, 超声 30min, 即得 LPD 复合物; 用 SODN 以相同方法制备多肽修饰的正义 LPD 复合物; 在搅拌的条件下, 将一定量的多肽 CNGRCK₂HK₃HK₁₁ 溶液加入 LPD 复合物混悬液中, 使多肽与脂质体中所含的马来酰亚胺基团的摩尔比为 1:20, 室温下震荡过夜, 得到多肽修饰的 LPD 复合物 (NGR/LPD)。(2) 药物相关性质的考察: 1) NGR 对 LPD 靶向修饰的考察: 薄层层析验证 NGR 多肽与 LPD 结合的情况: 利用硅胶 (G) 层析板, 展层剂为正丁醇: 水: 乙酸 = 4:2:1, 显色剂采用 0.5% 茚三酮丙酮溶液。在活化好的薄层板上, 距一端 1.5cm 处, 按一定的间距点上 3 种样品: NGR 多肽、NGR 多肽与 LPD 混合样品、NGR/LPD 复合物。当展开剂的前沿离薄层板上端 1cm 左右时, 立即取出并标出前沿位置, 吹干再放入通风橱中, 喷洒茚三酮显色剂, 在电炉上烤 5min 使斑点显色, 标出斑点中心位置, 量出各斑点至前沿的距离, 计算出各斑点的 R_f 值。2) LPD 对 PEI/ASODN 缩合体的包封考察: 取 LPD 复合物混悬液 100 μ l, 加入含有肝素 5U, 充分震荡后取出 20 μ l 备用作为对照。向剩余混悬液中加入 DNase I 溶液, 37℃ 孵育 1h, 用 0.25mol/L 的 EDTA 溶液终止反应; 向酶切后的混悬液中加入 10% Triton X-100 溶液破坏脂质体, 再加入含肝素约 5U 充分震荡混匀。样品用 Genefinder 染色后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 凝胶成像系统分析结果。3) 形态、粒径及 zeta 电位的测定: 取 NGR/LPD 复合物混悬液适量, 用 SPM-9500 J3 原子力显微镜 (AFM) 观察各复合物的形态, 采用接触模式。用 Nano-ZS90 型激光粒度分析仪测定复合物的粒径 (以 Z 平均统计值作为测定结果, 重复测定 3 次)、测定复合物的 zeta 电位 (重复测定 3 次)。4) NGR/LPD 的稳定性考察: 将制备好的 NGR/LPD 复合物放置, 观察其状态的变化, 并不断测量其粒径和电位, 连续观察测定 2 周。用电泳分析方法考察复合物中核酸的渗出情况。

4. 抑瘤实验: 各组药物均由静脉注射: 空白对照组给予生理盐水; 反义核酸对照组给予 ASODN 溶液; NGR 靶向正义核酸 LPD 组给予以正义核酸制备的 NGR/LPD 混悬液; PEI/ASODN 高、低剂量组给予 PEI/ASODN 缩合体混悬液; LPD 组给予 LPD 复合物混悬液; NGR/LPD 组给予 NGR/LPD 复合物混悬液。PEI/ASODN、LPD 及 NGR/LPD 3 组分别设置高、低浓度组分别给药 100 μ l、200 μ l, 作对照考察剂量-效应相关性。其他各组均给予相应的制剂 200 μ l。

5. 裸鼠体内药物分布试验: 裸鼠分为 4 组, 每组 3 只, 尾缘静脉给予 5'-FAM 标记 ASODN 和 PEI/ASODN、LPD 及 NGR/LPD 各 200 μ l; 各组内小鼠分别于给药后 1、3、6h 眼眶取血后断颈处死, 取出肝、肾、肺、脾和瘤组织, 冷冻切片, 激光共聚焦显微镜观察各组组织内药物分布情况。

6. 生长检测:对裸鼠一般状况进行日常观察,观测瘤体生长情况,每隔一日测量1次瘤径,连续测定3周。计算最大抑瘤率:抑瘤率(%) = (1 - 实验组平均瘤体积/对照组平均瘤体积) × 100%。

7. 常规病理学观察:实验结束时统一采取断颈处死裸鼠,剥离出瘤体组织部分经中性甲醛固定、石蜡包埋,做常规病理HE切片,显微镜下观察。

8. 端粒酶 hTERT mRNA 检测:实验结束时统一处死裸鼠,切除部分瘤体新鲜标本放入低温冰箱以备 RT-PCR 实验所用。采用半定量反转录 PCR 法,循环参数:50℃,30min;94℃,2min;94℃,45s;57℃,45s;72℃,1min,总共35个循环,然后72℃,5min延伸,4℃保存。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析处理系统摄像,并分析计算各组灰度比值。

9. 检测肿瘤组织 hTERT 蛋白的表达:免疫组化 SP 法检测 hTERT 的表达。以胞核/胞质出现黄色颗粒为阳性着色。参照文献[6]高倍镜下随机选取5个视野。①按阳性细胞占总细胞数的百分率分4级:I级:5%~25%,II级:26%~50%,III级:51%~75%,IV级:>75%,分别记为1~4分,<5%作为阴性标准,记为0分;②按细胞的染色强度分为4级:1级:(±),2级:(+),3级:(++),4级:(+++),分别记为1~4分,以阳性对照片的染色强度定为4级作为参照。免疫组化染色得分 = ① × ②。该组织的免疫组化染色综合得分 = 5个视野的免疫组化染色得分之和 ÷ 5。

10. 肿瘤组织细胞凋亡检测:采用 TUNEL 法检测各组细胞凋亡率。在光镜下每张切片随机选5个高倍视野(400×),以细胞核着棕黄色者为凋亡细胞,每个视野计数100个细胞中凋亡细胞所占比例,凋亡指数(apoptotic index, AI) = 凋亡细胞数/肿瘤细胞总数 × 100%,以各视野 AI 均数为该标本的凋亡指数。

11. 统计学方法:实验数据用 SPSS11.0 统计软件包进行统计学处理。数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,α = 0.05 作为差别有显著性的检验水准。

结 果

1. 药物相关性质的考察:(1) NGR 对 LPD 靶向修饰的考察:薄层层析结果显示:加入 NGR 反应后的 LPD 溶液中没有 NGR 斑点,而 LPD 与 NGR 多肽的混合样品点则可见有两个斑点,说明在实验条件下 NGR 已全部与脂质体中的马来酰亚胺发生反应,结合到了脂质体的表面。NGR 与 LPD 的 R_f 值分别为 0.78、0.53。(2) LPD 对 PEI/ASODN 缩合体的包封考察:结果表明 LPD 复合物混悬液中游离缩合体的量较少,绝大部分缩合体被脂质体所包裹,说明 PEI/ASODN 缩合体已大部分被脂质双分子层所包裹,达到了预期的对其保护的效果。(3) 形态、粒径及 zeta 电位的测定:NGR/LPD 复合物为形态规整的近球形

态,平均粒径在 178nm 左右,PDI 为 0.33,平均 zeta 电位近中性。(4) NGR/LPD 的稳定性考察:NGR/LPD 复合物在放置过程中分别于第 0、1、3、5、7、9、11、13、15 天测量其粒径及 zeta 电位的变化。在放置过程中该复合物不发生聚沉现象,其粒径和 zeta 电位变化较小,没有明显变大的趋势。电泳分析显示 NGR/LPD 复合物所包裹的缩合体没有渗漏。以上结果说明 NGR/LPD 复合物在放置两周内比较稳定,能够保证对缩合体的包裹。

2. 靶向脂质体的体内组织分布结果:如第 139 页彩图 1 所示:四组药物进入体内后都部分滞留于肝、肾、肺和脾,而在瘤体中分布情况则不同:ASODN、PEI/ASODN 和 LPD 组肿瘤组织中只有微弱荧光,NGR/LPD 组的小鼠瘤体中的荧光强度则明显强于前三者。观察注射后 1、3、6h 随着时间推移瘤体内荧光强度逐渐增强,表明 NGR/LPD 可随血液循环有效进入瘤体,且复合物会不断向瘤体组织富集。

3. 各组裸鼠肿瘤生长情况与抑瘤率:核酸组及正义 NGR/LPD 组的瘤体生长曲线与空白对照组相似,其对肿瘤生长的抑制没有明显差别。注射 PEI/ASODN 缩合体和 LPD 复合物的小鼠瘤体生长曲线相对平缓,二者没有显著差异,但与注射 NGR/LPD 的小鼠比较,生长速度又相对较快。比较几组小鼠的瘤体的生长趋势可知 NGR/LPD 组的瘤体生长最为缓慢,NGR/LPD 能够有效地将其所荷载的反义核苷酸转至病变部位,抑制肿瘤的生长。

4. 瘤体常规病理形态学观察:对照组瘤细胞生长活跃,可见点、片状坏死灶。NGR/LPD 高剂量组瘤组织间质纤维化较明显,可见大片坏死灶。

5. 肿瘤组织 hTERT 蛋白表达情况:肿瘤组织中 hTERT 蛋白阳性颗粒定位于胞核/胞质,染色呈淡黄至棕褐色。与生理盐水组相比较,NGR/LPD 高剂量组 hTERT 蛋白表达明显降低($P < 0.01$),呈弱阳性表达,NGR/LPD 低剂量组 hTERT 蛋白表达也明显降低($P < 0.05$),高、低剂量组间比较有显著性差异($P < 0.05$)。NGR/LPD 与 LPD、PEI/ASODN 组相同剂量间比较有明显差异($P < 0.05$)(表 1,第 139 页彩图 2、彩图 3)。

6. 细胞凋亡率:NGR/LPD 高、低剂量组凋亡指数明显高于空白对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$),且高、低剂量组间比较有显著性差异($P < 0.05$)。NGR/LPD 与 LPD、PEI/ASODN 组相同剂量间比较有明显差异($P < 0.05$)(表 1,第 139 页彩图 4、彩图 5)。

表 1 各组凋亡指数及 hTERT 表达情况 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)		
组别	AI(%)	hTERT
生理盐水	3.20 ± 0.64	17.32 ± 0.48
ASODN	3.21 ± 0.89	17.40 ± 0.63
NGR/LPD/SODN	3.08 ± 0.80	17.36 ± 0.56
NGR/LPD 低剂量	5.99 ± 2.27 *▲	14.88 ± 1.78 *▲
NGR/LPD 高剂量	22.76 ± 4.22 #▲	10.76 ± 1.72 #▲
LPD 低剂量	3.52 ± 0.47	17.36 ± 1.78
LPD 高剂量	4.33 ± 0.84	16.56 ± 0.71
PEI /ASODN 低剂量	3.73 ± 0.98	17.12 ± 0.70
PEI /ASODN 高剂量	4.19 ± 0.76	16.92 ± 0.54

与生理盐水组相比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, 其余均 $P > 0.05$; 相同制剂高、低剂量间比较, ▲ $P < 0.05$

7. 各组裸鼠瘤组织 hTERTmRNA 检测结果: NGR/LPD 高、低剂量组 hTERTmRNA 水平与对照组比较明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 高、低剂量组间比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。NGR/LPD 与 LPD、PEI/ASODN 组相同剂量间比较有明显差异 ($P < 0.05$)。其他各组与对照组差别不明显 ($P > 0.05$) (表 2、图 1)。

表 2 各组裸鼠移植瘤的 hTERTmRNA 水平 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)	
组别	hTERTmRNA
生理盐水	0.716 ± 0.013
ASODN	0.724 ± 0.017
正义 NGR/LPD	0.726 ± 0.020
NGR/LPD 低剂量组	0.652 ± 0.058 *▲
NGR/LPD 高剂量组	0.488 ± 0.092 #▲
LPD 低剂量组	0.720 ± 0.016
LPD 高剂量组	0.674 ± 0.053
PEI /ASODN 低剂量组	0.718 ± 0.022
PEI /ASODN 高剂量组	0.708 ± 0.016

与生理盐水组相比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, 其余均 $P > 0.05$; 相同制剂高、低剂量间比较, ▲ $P < 0.05$

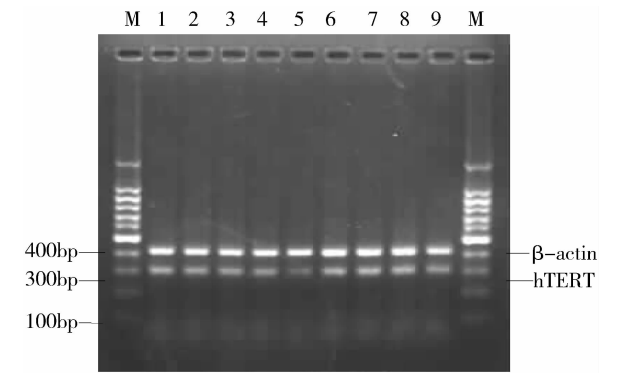


图 1 各组裸鼠移植瘤的 hTERT mRNA 的 RT-PCR 检测
M. 100bp DNA Ladder 1. 生理盐水组; 2. ASODN 组; 3. 正义 NGR/LPD 组; 4. NGR/LPD (100 μ l) 组; 5. NGR/LPD (200 μ l) 组; 6. PEI/ASODN (100 μ l) 组; 7. PEI/ASODN (200 μ l) 组; 8. LPD (100 μ l) 组; 9. LPD (200 μ l)

讨 论

乳腺癌细胞 MCF-7 具有较高端粒酶活性。利用针对 hTERT 的反义寡核苷酸可较好地抑制端粒酶活性,从而抑制肿瘤细胞增生或诱导其凋亡^[7,8]。端粒酶活性一旦被抑制,端粒就会逐渐缩短,端粒缩短造成染色体功能异常,染色体融合、断裂最终导致细胞的衰亡;针对端粒酶的反义寡核苷酸还可以下调促增生癌基因和细胞周期素的表达,激活抑癌基因,细胞的增生率下降^[9]。通过抑制端粒酶的活性,可以抑制细胞增生,诱导其凋亡。面对复杂的体内环境,要想有效地将反义核酸转运至靶组织,须使用合适的载体。非病毒基因载体具有安全、低毒、低免疫反应等特点,日渐受到研究者的重视。聚乙烯亚胺 (PEI) 可将 ASODN 缩合成纳米级的颗粒状物,使其酶稳定性和细胞摄入率均显著增加。但是体内应用时,PEI/DNA 容易受到各种负离子的影响,同时与体内的各种酸性蛋白 (如 IgD、IgM、清蛋白以及纤维蛋白原等) 结合发生聚沉或被清除^[10]。PEI/DNA 复合物静脉注射后很快聚集在肺毛细血管床,大部分被肺、肾、肝和脾所截留。而且 PEI/DNA 还会在血流中转化为成簇的多聚物,血浆中大部分 PEI/DNA 复合物会快速被肺内皮细胞、肝窦中 Kupffer 细胞及脾中的巨噬细胞清除,且 PEI/DNA 具有一定的细胞毒性,在体内应用时需要 PEI/DNA 进行屏蔽处理^[11,12]。脂质体具有易在生物体内降解、无毒性、无免疫原性等特点。利用脂质体包裹 PEI/DNA 缩合体的研究在国外少有报道,国内未见报道。本研究采用脂质体包裹 PEI/DNA,将其多余的正电荷封闭起来,避免其与血液中的多聚阴离子相互作用^[13];同时还可以减少非病毒载体与非靶细胞因电荷引起的相互作用。在制备脂质体时中又加入了 DSPE-PEG-maleimide 成分,其中的 PEG 能阻止血浆蛋白的吸附作用^[14];含巯基 (-SH) 的单克隆抗体可以和 maleimide 的双键发生加成反应连接达到靶向修饰的目的。LPD 是实心纳米颗粒,稳定性比较好;与脂质体-DNA 复合物相比,LPD 能更有效地缩合 DNA,显著提高转染率。但无论是 PEI/ASODN 缩合体还是脂质体包裹的缩合体 (LPD),由于本身不含靶向分子或靶向基团,进入体内后绝大部分被肝、肾吸收,严重影响了其作用效果。“NGR 序列”是最近研究比较多的肿瘤靶向配体,能被表达于新生血管的氨基肽酶 N (CD13) 特异性的识别,肿瘤血管生长旺盛,CD13 多表达于肿瘤组织和肿瘤细胞^[15]。

抑瘤实验中 NGR/LPD 与 PEI/ASODN 和 LPD 及对照组比较,对裸鼠移植瘤有很好的抑制作用。体内分布实验显示,NGR/LPD 可有效到达瘤体,而 PEI/ASODN 和 LPD 则不能有效地运送 ASODN 至瘤体。各组 hTERT mRNA 及蛋白表达水平说明 NGR/LPD 能有效抑制端粒酶 hTERT mRNA 及蛋白的表达。TUNEL 法原位检测细胞凋亡显示 NGR/LPD 可明显促使肿瘤细胞产生凋亡。低剂量使用 NGR/LPD 对 hTERT 抑制作用相对较弱,说明制剂对肿瘤的抑制作用具有明显的剂量依赖性。虽然体外转染已证实 LPD 和 PEI/ASODN 缩合体对细胞的抑制作用较 ASODN 显著提高,但高剂量的 LPD、PEI/ASODN 缩合体在体内应用时作用不明显,不能有效地诱导细胞凋亡,结合体内分布实验结果分析,提示载体的肿瘤靶向性修饰在体内应用中的重要性。体内分布试验显示 NGR/LPD 在进入体内后有相当一部分药物还滞留于肝、肺、肾等器官,这也是小剂量 NGR/LPD 效果不佳的原因。

参考文献

- Wang X, Xiao J, Zhao S, *et al.* Expression of telomerase subunits and its relationship with telomerase activity in nasopharyngeal carcinoma [J]. Natl Med J China, 2001, 81(9): 553 - 556
- Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, *et al.* Natural and pharmacological regulation of telomerase [J]. Nucleic Acid Res, 2002, 30(4): 839 - 865
- Kirkpatrick KL, Mokbel LK. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer [J]. Eur J Surg Onco, 2001, 27(8): 754 - 760
- Shammas MA, Koley H, Batchu RB, *et al.* Telomerase inhibition by siRNA causes senescence and apoptosis in Barretts adenocarcinoma cells mechanism and therapeutic potential [J]. Mol Cancer, 2005, 4: 24
- Curnis F, *et al.* Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. Cancer Res, 2002, 62(3): 867 - 874
- Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, *et al.* bel - 2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. Cancer Res, 1995, 15; 55(2): 237 - 241
- Zhang RG, Wang XW, Yuan JH, *et al.* Human hepatoma cell telomerase activity inhibition and cell cycle modulation by its RNA component antisense oligodeoxynucleotides [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 742 - 746
- Wang J, Zhang ZZ, Zhou TY, *et al.* Effect of nanosize delivery system for ASODN against hTERT on the expression of telomerase in the esophageal cancer EC9706 cells [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2008, 30(8): 566 - 572
- 邹琳, 罗春丽, 涂植光. 膀胱肿瘤中端粒酶逆转录酶和 c - myc 的表达研究 [J]. 临床检验杂志, 2003, 21, Suppl: 51 - 53
- A. Ho S R Schwarze, S J Mermelstein, G. Waksman, S. F. Dowdy, Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo [J]. Cancer Res, 2001, 61: 474 - 477
- 李经忠, 王青青, 曹雪涛. 新型非病毒载体聚乙烯亚胺体内应用的研究进展 [J]. 国外医学(药学分册), 2004, 31(1): 34 - 37
- M Ogris, P Steinlein, M Kursal, *et al.* Wagner, The size of DNA / transferrin - PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. Gene Ther, 1998, 5: 1425 - 1433
- Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with non - viral gene delivery systems [J]. Drug Discov Today, 2002, 7(8): 479 - 485
- Harada - Shiba M, Yamauchi K, Harada A, *et al.* Polyion complex micelles as vectors in gene therapy - pharmacokinetics and in vivo gene transfer [J]. Gene Ther, 2002, 9(6): 407 - 414
- Corti A, Ponzoni M. Tumor vascular targeting with tumor necrosis factor alpha and chemotherapeutic drugs. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1028: 104 - 112

(收稿: 2010 - 03 - 15)

微环境诱导骨髓间充质干细胞分化为内皮样细胞

何 威 杨旭辉 林秋雄 余伟华 吴伟康

摘 要 目的 通过观察人骨髓间充质干细胞(hMSCs)与成熟内皮细胞非接触共培养表达特异性内皮细胞标志物的情况,探讨微环境依赖性的、体外非接触共培养方法对 MSCs 向内皮样细胞分化的影响。**方法** 密度梯度离心法分离纯化培养的 hMSCs 与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)在 Transwell 内共培养,通过流式细胞术检测 hMSCs 表型,RT - PCR 鉴定诱导后 hMSCs 的

基金项目:“973”中医专项课题(2005CB523305)、广东省科技计划立项资助课题(0711222700104)、广东省中医药局立项课题(2007380)

作者单位:510080 广州,广东省人民医院、广东省医学科学院(何威、林秋雄);中山大学中山医学院(何威);中山大学干细胞与组织工程中心(杨旭辉、余伟华);中山大学中西医结合研究所(吴伟康)