

氧化铁磁性纳米颗粒介导缺氧诱导因子 1 α shRNA 质粒转染逆转 A549/CDDP 细胞对顺铂耐药的实验研究*

涂 馨** 闵凌峰** 陈 琼*** 谢明萱 何玲玲

(中南大学湘雅医院老年医学科, 呼吸内科, 长沙 410008)

摘要 评价了氧化铁磁性纳米颗粒作为缺氧诱导因子 1 α shRNA (HIF-1 α shRNA) 重组质粒载体进行体内体外转染的可行性及其逆转人肺腺癌耐药细胞株(A549/CDDP)顺铂耐性的效果, 并初步探讨相关机制. 在成功构建 HIF-1 α shRNA 重组质粒后, 分别利用氧化铁磁性纳米颗粒及脂质体介导质粒转染 A549/CDDP 细胞及其移植瘤裸鼠动物模型, 荧光显微镜检测转染效率, RT-PCR 及细胞免疫化学检测转染后 A549/CDDP 细胞 HIF-1 α 、多药耐药相关蛋白 1(multidrug resistance 1, MRP1)、肺耐药相关蛋白(lung resistance-related protein, LRP) mRNA 及蛋白质表达, 免疫组化检测转染后 A549/CDDP 移植瘤 HIF-1 α 、MRP1 及 LRP 蛋白表达, MTT 法检测转染 HIF-1 α shRNA 前后 A549/CDDP 细胞对顺铂的耐药性, 并检测转染 HIF-1 α shRNA 后 A549/CDDP 细胞移植瘤的肿瘤生长指数, HE 染色检测纳米颗粒转染对裸鼠肝、肾及脑的组织学毒理作用. 结果显示, 氧化铁磁性纳米颗粒介导转染相对效率高于脂质体介导($P < 0.01$), HIF-1 α shRNA 转染 A549/CDDP 细胞后 HIF-1 α 、MRP1、LRP mRNA 及蛋白质表达下降, 逆转 A549/CDDP 细胞对顺铂耐性 82%, 纳米颗粒介导 HIF-1 α shRNA 转染 A549/CDDP 细胞移植瘤裸鼠动物模型后, 移植瘤组织中 HIF-1 α 、MRP1 及 LRP 蛋白表达下降, 转染 HIF-1 α shRNA 后抑制移植瘤的生长, 且与顺铂有协同效应, 纳米颗粒转染后裸鼠肝、肾及脑组织无坏死. 这些结果说明, 纳米颗粒介导 HIF-1 α shRNA 的体内体外转染效率高于脂质体, RNA 干扰技术封闭 HIF-1 α 基因可较大程度逆转耐顺铂人肺腺癌细胞的耐药性及其抑制瘤的生长, 其作用可能与 HIF-1 α shRNA 降低 HIF-1 α 、MRP1 及 LRP 表达有关, HIF-1 α 基因可作为逆转肺癌耐药治疗的有效靶点, 磁性纳米颗粒介导 HIF-1 α shRNA 质粒转染具有一定的生物安全性.

关键词 氧化铁磁性纳米颗粒, 肺肿瘤, 基因转染, 缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α), RNA 干扰

学科分类号 R730.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00208

缺氧诱导因子 1(HIF-1)是一种在低氧条件下广泛存在于人和动物肿瘤细胞内的转录因子, 由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基组成, HIF-1 α 是主要的氧调节亚基和功能亚基^[1]. HIF-1 α 在常氧下迅速降解, 在缺氧时稳定表达并活化, 并与 HIF-1 β 结合形成有活性的 HIF-1. HIF-1 α 与肿瘤耐药之间的关系最近几年引起了关注, 肝癌细胞、肾癌细胞及神经母细胞瘤在缺氧 24 h 后, 肿瘤组织中 HIF-1 α 表达增加, 且获得耐药性^[2]. 有学者研究发现, 通过 RNAi 技术降低人肺腺癌 SPCA-1 细胞中 HIF-1 α 的表达后, 就可增加 SPCA-1 细胞对放射治疗的敏感性^[3]. 由此, 我们设想如果通过 RNAi 技术抑制肺癌 HIF-1 α 表达, 将有可能逆转肺癌化疗耐药.

RNAi 技术是目前基因治疗主要方法之一, 具有特异性高、操作简便等优点^[4]. RNAi 技术可以通过人工合成双链小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和构建 RNAi 载体来“敲低”目的基因^[5]. 其中, 构建载体介导 RNAi 可改善 siRNA 在研究操作中易降解的缺点, 因其稳定性高而倍受研究者重视. 在基因导入系统上, 脂质体介导是经典

* 湖南省自然科学基金资助项目(07JJ3055).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0731-89753056, E-mail: qiongch@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-17, 接受日期: 2010-07-05

的基因转染方法, 但脂质体具有一定的细胞毒性, 且本身会参与细胞生理活动, 引起基因表达的上调或下调, 易造成效果评价的误差^[6]. 针对这些缺点, 近年来国内外许多研究报道了生物可降解性的纳米颗粒或者微粒作为基因转染载体的可行性^[7]. 然而, 至今尚未有利用纳米颗粒介导 HIF-1 α RNAi 技术逆转肺癌耐药性的体内体外研究报道. 我们针对 HIF-1 α 靶点应用脂质体以及纳米颗粒转染的方法, 将 HIF-1 α shRNA 重组质粒转染入人肺腺癌耐顺铂细胞(A549/CDDP)及其移植瘤模型小鼠中, 对脂质体转染和纳米颗粒转染进行比较, 以评价纳米颗粒转染 HIF-1 α shRNA 的可行性, 及其逆转 A549/CDDP 细胞对顺铂耐性的效果, 同时初步探讨 HIF-1 α shRNA 逆转耐药性可能的机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞与实验动物. pGensile 1.1 质粒购自武汉晶赛生物公司; 耐顺铂人肺腺癌细胞株 A549/CDDP 购自中南大学湘雅医学院细胞中心; BALB/CA-nu 裸小鼠(雌雄各半)购自湘雅医学院实验动物中心, 4~6 周龄, 体重 17~22 g, SPF 合格.

1.1.2 试剂. 限制性内切酶 *Xho* I 及 *Eco*R I 购自 MBI 公司; 磁性氧化铁纳米颗粒 pll-DCIONP (polyMAG500)购自 Chemicell GmbH 公司; 脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; Trizol 试剂盒、反转录试剂盒和 Taq 酶购于 Fermentas 公司; 质粒提取试剂盒为天根公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组质粒设计、构建及鉴定. 根据人类基因库中人 HIF-1 α 基因(NM_001530)的 mRNA 序列及参考文献[8]设计 RNA 干扰作用靶点, 其靶序列为 AAGAGGTGGATATGTCTGG. 设计的 HIF-1 α shRNA 的 DNA 引物序列如下: 正义链(5' CACC-AAGAGGTGGATATGTCTGGTTCAAGACGCCA-GACATATCCACCTCTTTTTTTTG 3'), 反义链(5' AGCTCAAAAAAAAAAGAGGTGGATATGTCTG-GCGTCTTGAACCAGACATATCCACCTCTT 3'); 阴性对照 DNA(pKB1.1)引物序列如下: 正义链(5' CACCTTTTTTCAAGACGGATGAAGTTTCAGG-GTCAGCTTTTTTG 3'), 反义链(5' AGCTCAAA-AAAGCTGACCCTGAAGTTCATCCGCTTTGAAA-AAA 3'). 采用试剂盒抽提合成筛选出的质粒, 所

得质粒用 *Xho* I 及 *Eco*R I 酶切鉴定; 对酶切鉴定出的阳性质粒进行测序以确保插入序列的正确, 如图 1 所示.

1.2.2 细胞培养. 耐顺铂人肺腺癌细胞株 A549/CDDP 置于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中在 5% CO₂、37℃ 条件下培养, 细胞培养液中 DDP 的维持浓度为 6 μ mol/L 以保持 A549/CDDP 的顺铂耐性; 每 2~3 天换液或消化传代一次.

1.2.3 基因体外转染实验. 将 5 $\times$ 10⁴ 的 A549/CDDP 细胞接种于 6 孔板中, 24 h 后用无血清 DMEM 培养基洗 2 次开始实验. 实验分组: a. 未转染组(control); b. HIF-1 α shRNA 纳米颗粒转染组, 转染前先将 pll-DCIONP 与 HIF-1 α shRNA 质粒混匀后置于磁铁上室温 20 min, pll-DCIONP 与 HIF-1 α shRNA 质粒的质量浓度均为 4 mg/L; c. pKB1.1 质粒纳米颗粒转染组(pll-DCIONP 与 pKB1.1 质粒的质量浓度为 4 mg/L); d. HIF-1 α shRNA 脂质体转染组, 按照操作说明书进行转染, 脂质体 LipofectamineTM 2000 浓度为 10 mol/L, 质粒质量浓度为 4 mg/L; e. pKB1.1 质粒脂质体转染组(脂质体 LipofectamineTM 2000 浓度为 10 mol/L, 质粒质量浓度为 4 mg/L). 转染 4~6 h 后更换培养基, 改用含有 15% 小牛血清的 DMEM 培养基培养, 于转染 24 h 后使用荧光显微镜检测转染效率, 并于第 48 h 收集细胞进行后续 RT-PCR 实验.

1.2.4 RT-PCR 分析. 提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以此为模板行 PCR 扩增以检测 HIF-1 α 、MRP1、LRP 的 mRNA 的表达: HIF-1 α mRNA 上游引物(5' CAGAAGATACAAGTAGCCTC 3'), 下游引物(5' CTGCTGGAATACTGTAAGT 3'); MRP1 上游引物(5' CAGTGACCTCTGGTCCCT-TAAACAA 3'), 下游引物(5' TTGGCGCATTCC-TTCTTCC 3'); LRP 上游引物(5' TTCTGGATTTG-TGGACG 3'), 下游引物(5' ACTTCTCTCCCTT-GACCA 3'); β -actin mRNA 上游引物: (5' CTGG-CACCACACCTTCTACAATGAGC 3'), 下游引物(5' GGGATAGCACAGCCTGGATAGCAACG 3'). 将 PCR 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶数字成像系统扫描分析扩增产物条带.

1.2.5 免疫细胞化学检测 HIF-1 α 、MRP1、LRP 蛋白表达. 取未转染组(control)、对照质粒组(pKB1.1)脂质体转染组、对照质粒组(pKB1.1)纳米颗粒转染组、HIF-1 α shRNA 脂质体转染组以及 HIF-1 α shRNA 纳米颗粒转染组的细胞爬片后, 冷 PBS 漂

洗3次, 4%多聚甲醛固定30 min. PBS漂洗3次, 3% H_2O_2 室温孵育10 min, 以消除内源性过氧化氢酶的活性. 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min×3次, 滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育10 min, 倾去血清. 滴加单克隆抗体 HIF-1 α 、LRP、MRR1, 浓度为1:100, 4℃过夜. PBS冲洗5 min×3次, 滴加生物素标记的山羊抗兔工作液, 37℃孵育30 min. PBS冲洗5 min×3次, 滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液, 37℃孵育30 min. PBS冲洗5 min×3次, 取1 ml蒸馏水, 滴加试剂盒中A、B、C试剂各一滴, 混匀后加20 μ l至细胞玻片上, 充分覆盖细胞层, 室温显色, 镜下控制反应时间. 自来水充分冲洗, 苏木素轻度复染, 1%盐酸酒精分色, 中性树胶封片. 分析 HIF-1 α 、MRP1、LRP 蛋白表达积分, 判断标准: 以染成棕黄色或棕褐色为阳性细胞, 并通过图像分析系统比较图片中棕黄色区域的累积光密度值及积分光密度值(每组各选10个视野分析), 积分光密度(IOD)是阳性细胞的平均光密度和其面积的乘积, 可以反映蛋白质表达量(IOD值越高, 其蛋白质含量越高).

1.2.6 MTT 法. 将 A549/CDDP 细胞作为对照组、对照质粒 pKB1.1 脂质体转染组及纳米颗粒转染组作为阴性对照、HIF-1 α shRNA 脂质体转染组及 HIF-1 α shRNA 纳米转染组作为实验组. 以 5×10^3 / 孔细胞数接种于 96 孔板, 分别设置并加入 0、10、20、40、80、160、320 μ mol/L 7 个浓度级别的顺铂, 每组设 4 个复孔. MTT 比色法按文献方法进行^[8]. 顺铂作用 72 h 后, 每孔加入 MTT 应用液 (5 g/L) 10 μ l, 继续培养 4 h. 加入 200 μ l / 孔 DMSO, 置振荡仪上振荡 10 min, 使甲臞蓝颗粒完全溶解. 置酶标仪上以 570 nm 波长检测每孔吸光度值(A), 并按公式[细胞生长抑制率 = (1 - 实验组 A_{570} / 对照组 A_{570}) × 100%] 求出各组细胞的生长抑制率, 并利用直线加权回归方程分别求得各组对顺铂的中效浓度 (IC_{50})^[9]. 实验重复 4 次. 相对逆转率 = (对照组 IC_{50} - 处理组 IC_{50}) / 对照组 IC_{50} .

1.2.7 动物模型的建立. 将已培养好基本长满瓶壁的 A549/CDDP 细胞弃培养瓶内培养基, 用 PBS 液冲洗培养瓶 2 次, 加入胰蛋白酶数滴消化, 将消化好的细胞吸入离心管内, 600 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入不含小牛血清的 DMEM 培养基 3 ml, 吸管吹打混匀 (取适量计数细胞), 再离心, 弃上清, 按每只裸小鼠皮下接种细胞数 5×10^7 加入无血清 DMEM 培养基调整浓度. 准备好的 A549/CDDP

细胞悬液经台盼蓝染色活细胞数占 95% 以上, 按每只 0.2 ml 细胞悬液注射于消毒后的裸鼠皮下 (共 45 只), 观察肿瘤移植成功率.

1.2.8 动物实验分组. 将荷瘤成功的 35 只小鼠, 在肿瘤最长径达到 10 mm 时, 随机分成 7 组 (每组 5 只). a. 对照组 (control): 加 0.5 ml 的生理盐水予以尾静脉注射; b. 顺铂组 (CDDP 组): 按 1 mg/kg 体重的顺铂予以尾静脉注射; c. 纳米颗粒介导 pKB1.1 空质粒转染组 (KB 组); d. 脂质体转染组, 脂质体转染 HIF-1 α shRNA 组 (LH 组): 配制脂质体介导的 HIF-1 α shRNA 复合物加入到 0.5 ml 的生理盐水, 尾静脉注射; e. 脂质体转染 HIF-1 α shRNA + CDDP 组 (LH + CDDP, LD 组): 配制脂质体介导的 HIF-1 α shRNA 复合物, 以及 1 mg/kg 体重的顺铂加入到 0.5 ml 的生理盐水予以尾静脉注射; f. 纳米颗粒介导 HIF-1 α shRNA 转染组 (NH 组): 配制纳米颗粒介导的 HIF-1 α shRNA 复合物加入到 0.5 ml 的生理盐水, 尾静脉注射; g. 纳米颗粒介导 HIF-1 α shRNA 转染 + 顺铂处理组 (NH + CDDP, ND 组): 配制纳米颗粒介导的 HIF-1 α shRNA 复合物, 以及 1 mg/kg 体重的顺铂加入到 0.5 ml 的生理盐水, 尾静脉注射. 质粒的注射剂量按 25 mg/kg 体重给予^[10], 纳米颗粒 pII-DCIONP 与质粒的质量比为 1:1 混合, Lipo 注射量根据脂质体转染说明书与质粒比为 2 μ l:1 μ g 的注射量给予, 混合后 4℃放置 1 h, 每 5 天注射一次, 共 3 次, 第 18 天时处死裸鼠. 含有纳米颗粒 pII-DCIONP 的实验组在瘤体表面部位施加磁场 (将裸鼠稍作固定用强力胶带将小磁铁紧贴于瘤体表面部位), 至处死时撤去磁场. 取移植瘤测量肿瘤最长径 a 和最短径 b , 称瘤重, 按公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积, 按以下公式计算肿瘤生长指数: $(V_{\text{治疗后}} - V_{\text{治疗前}}) / V_{\text{治疗前}}$.

1.2.9 免疫组化. 移植瘤标本用 4% 中性甲醛溶液固定、石蜡包埋、组织切片 (5 μ m). 组织切片免疫组化染色检测 HIF-1 α 、MRP1、LRP 的表达. 采用免疫组化 SP 法检测, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行 (皆为 1:50 稀释为工作液), 用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照. 判定标准: 高倍镜下计数 100 个细胞. 肿瘤细胞质和细胞核周围, 呈棕黄色颗粒的阳性细胞 < 10% 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性. 通过 Motic 医学图像分析系统比较 3 组图片中棕黄色区域的累积光密度值及积分光密度值 (每组各选 10 个视野分析). 处死纳米颗粒转染的裸鼠后, 取肝、肾及脑组织行 HE 染色, 以观察纳米颗

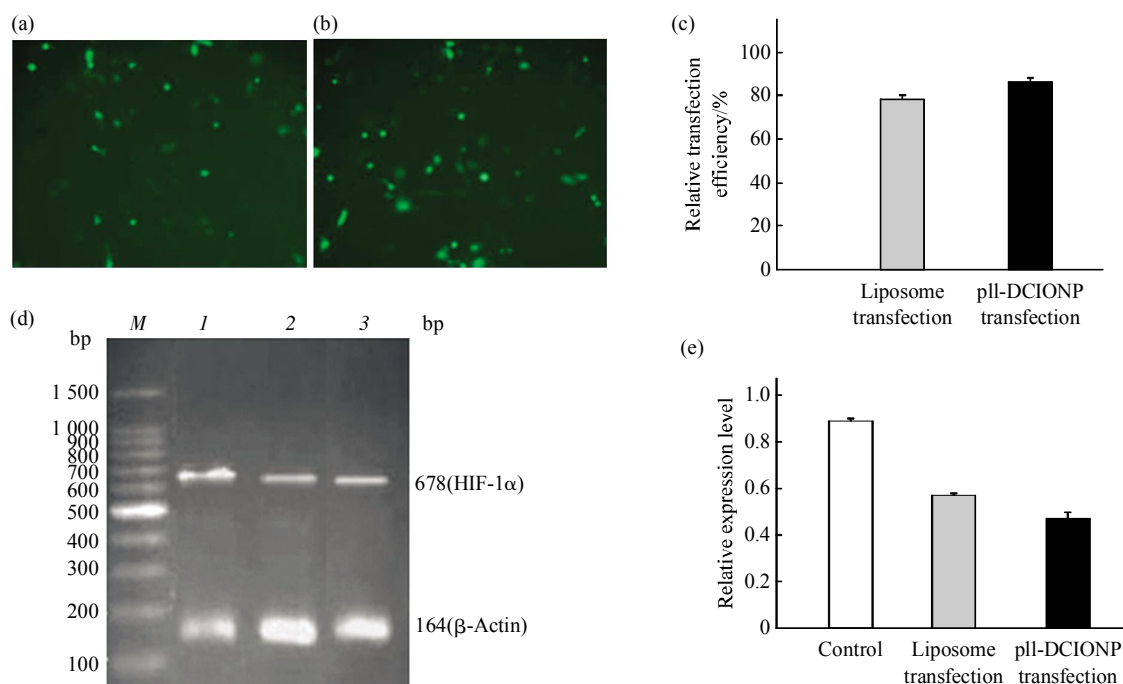


Fig. 2 The HIF-1 α shRNA was transfected into A549/CDDP *in vitro* by pll-DCIONP and by lipo2000 to compare the transfection efficiency and the expression level of HIF-1 α mRNA after transfection

(a) The fluorescence image after liposome transfection. (b) The fluorescence image after pll-DCIONP transfection. (c) Bar chart depicting the transfection efficiency of liposome transfection and pll-DCIONP transfection, each bar represents the $\bar{x} \pm s$ of 3 samples. (d) mRNA expression of HIF-1 α was assayed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method after transfected by pll-DCIONP and by lipo2000, M: 100 bp DNA marker, 1: Control; 2: pll-DCIONP transfection; 3: Liposome transfection. (e) Bar chart depicting the mRNA expression level of HIF-1 α after liposome transfection and pll-DCIONP transfection, each bar represents the $\bar{x} \pm s$ of 3 samples.

2.3 转染 HIF-1 α shRNA 对 A549/CDDP 顺铂耐药性的影响

经 MTT 法检测, 顺铂对 A549/CDDP 细胞作用 72 h 的 IC_{50} 为 $(412.87 \pm 14.81) \mu\text{mol/L}$. 转染了对照质粒 pKB1.1 的 A549/CDDP 细胞(脂质体转染法及纳米颗粒转染法)的 IC_{50} 分别为 (413.75 ± 8.63) 及 $(407.91 \pm 10.89) \mu\text{mol/L}$, 差异均无统计学意义. 脂质体转染 HIF-1 α shRNA 到 A549/CDDP 细胞后, 对顺铂 IC_{50} 降到了 $(108.86 \pm 3.36) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$), 脂质体转染 HIF-1 α shRNA 对 A549/CDDP 细胞顺

铂耐药性的相对逆转率为 73%. 纳米颗粒转染 HIF-1 α shRNA 到 A549/CDDP 细胞后, 对顺铂 IC_{50} 降到了 $(74.42 \pm 2.31) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$), 纳米颗粒转染 HIF-1 α shRNA 对 A549/CDDP 细胞顺铂耐药性的相对逆转率为 82%, 且纳米颗粒组转染比脂质体转染组对顺铂 IC_{50} 更低, 差异有显著性 ($P < 0.01$) (表 1). 说明转染 HIF-1 α shRNA 可增加 A549/CDDP 细胞对化疗药物顺铂的敏感性, 且纳米颗粒转染较脂质体转染有更好的逆转效果.

Table 1 Impact of HIF-1 α shRNA on the sensitivity to cisplatin of A549/CDDP

Groups	IC_{50}	Relative reverse rate
Control(A549/CDDP)	412.87 ± 14.81	—
Liposome transfection with pKB1.1	413.75 ± 8.63	—
pll-DCIONP transfection with pKB1.1	407.91 ± 10.89	—
Liposome transfection with HIF-1 α shRNA	$108.86 \pm 3.36^{1)}$	73%
pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA	$74.42 \pm 2.31^{1, 2, 3)}$	82%

¹⁾ Compared with the group of liposome transfection with pKB1.1, $P < 0.01$; ²⁾ Compared with the group of pll-DCIONP transfection with pKB1.1, $P < 0.01$; ³⁾ Compared with the group of liposome transfection with HIF-1 α shRNA, $P < 0.01$, $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

2.4 A549/CDDP 细胞转染 HIF-1 α shRNA 后 MRP1、LRP 基因 mRNA 表达水平比较

转染后 48 h, 不同处理组 MRP1 及 LRP mRNA 表达相对量的结果见图 3 所示: 5 组均有 mRNA 表达, 转染 pKB1.1(脂质体转染组及纳米颗粒转染组)后 MRP1、LRP mRNA 表达无差异, 转染

HIF-1 α shRNA 后(脂质体转染组及纳米颗粒转染组)都能有效抑制 A549/CDDP 中 MRP1 及 LRP mRNA 的表达($P < 0.01$), 而且纳米颗粒转染组中 MRP1 及 LRP mRNA 的表达低于脂质体介导组($P < 0.01$).

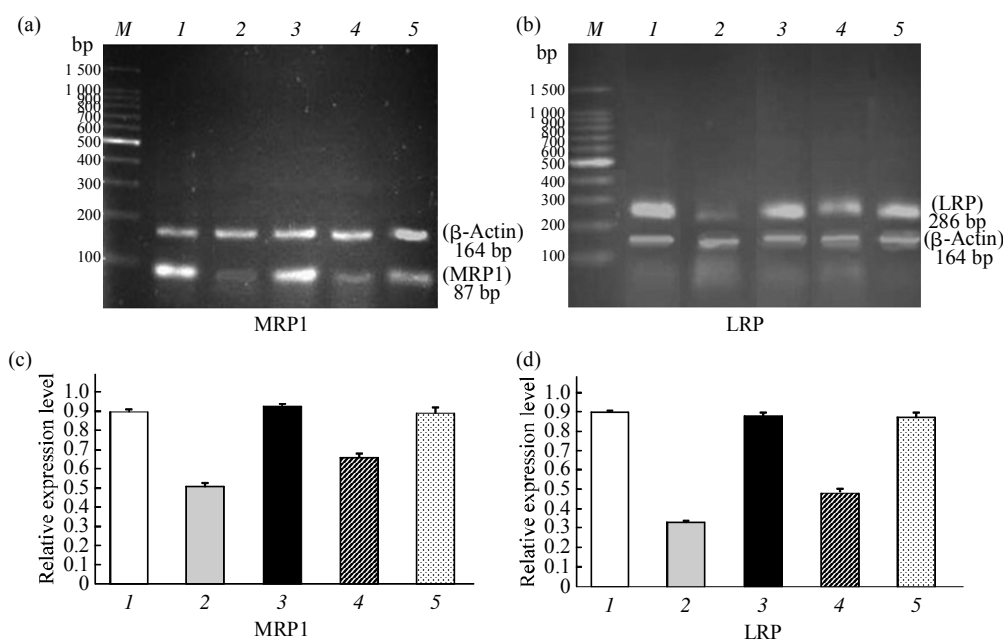


Fig. 3 The expression level of MRP1 and LRP mRNA after transfected with HIF-1 α shRNA and pKB1.1

(a, b) mRNA expression of MRP1 and LRP were assayed by RT-PCR method after transfected with HIF-1 α shRNA and pKB1.1. (c, d) Bar chart depicting the mRNA expression level of MRP1 and LRP, each bar represents the $\bar{x} \pm s$ of 3 samples. M: 100bp DNA marker; 1: Control; 2: The group of pHIF-1 α shRNA transfection with HIF-1 α shRNA; 3: The group of pKB1.1 transfection with HIF-1 α shRNA; 4: The group of liposome transfection with HIF-1 α shRNA; 5: The group of liposome transfection with pKB1.1.

2.5 细胞免疫化学法检测不同转染组中 HIF-1 α 、MRP1、LRP 蛋白表达

A549/CDDP 细胞经不同处理后, 其 HIF-1 α 、MRP1 及 LRP 蛋白表达的结果见图 4. 免疫细胞化学观察显示: pHIF-1 α shRNA 转染(脂质体转染组及纳米颗粒转染组)能有效抑制 A549/CDDP 中 HIF-1 α 蛋白的表达($P < 0.01$), 且纳米颗粒转染组 HIF-1 α 蛋白表达低于脂质体转染组($P < 0.01$), 而转染阴性对照 PKB1.1 质粒(脂质体转染组及纳米颗粒转染组)对 HIF-1 α 蛋白的表达无明显影响($P > 0.05$). pHIF-1 α shRNA 转染后 MRP1、LRP 蛋白表达均降低($P < 0.01$), 且纳米颗粒转染组 MRP1、LRP 蛋白表达低于脂质体转染组($P < 0.01$), 而阴性对照 PKB1.1 质粒(脂质体转染组及纳米颗粒

转染组)对 MRP1、LRP 的表达无明显影响($P > 0.05$).

2.6 转染 HIF-1 α shRNA 对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

45 只裸鼠中共有 36 只成瘤, 成瘤成功率为 80%. 分组并加不同处理后, 各组裸鼠生长、饮食、活动情况良好, 未观察到血便及体质量明显减轻等症状. 移植瘤生长良好, 外观呈球形大瘤结节或数个小的瘤结节簇生. 在 ND 组中肿瘤生长指数明显小于对照组及 LD 组($P < 0.01$), NH 组中肿瘤生长指数明显小于对照组及 LH 组($P < 0.01$), 而 KB 组中肿瘤生长指数与对照组比较无差异, 见表 2. 说明转染 HIF-1 α shRNA 可抑制 A549/CDDP 移植瘤的生长, 与顺铂有协同效应, 且纳米颗粒转染较脂质体转染有更好的抑制移植瘤生长的效果.

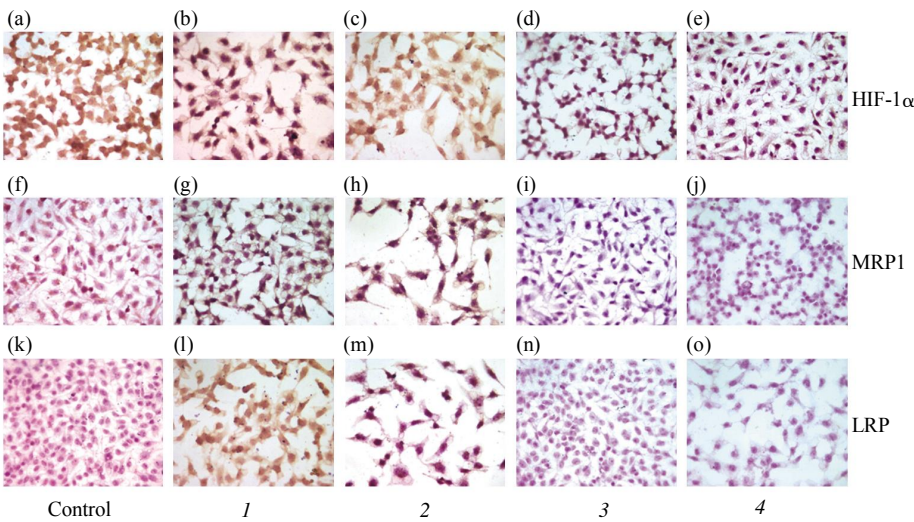


Fig. 4 The expression level of HIF-1 α , MRP1 and LRP in A549/CDDP after different treatment
(a, b, c, d, e) Immunocytochemistry analysis of HIF-1 α gene expression levels of A549/CDDP in different treatment group. (f, g, h, i, j) Immunocytochemistry analysis of MRP1 gene expression levels of A549/CDDP in different treatment group. (k, l, m, n, o) Immunocytochemistry analysis of LRP gene expression levels of A549/CDDP in different treatment group. (a, f, k) Control; (b, g, l) Liposome transfection with pKB1.1; (c, h, m) pll-DCIONP transfection with pKB1.1; (d, i, n) Liposome transfection with HIF-1 α shRNA; (e, j, o) pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA. 1: Liposome transfection with pKB1.1; 2: pll-DCIONP transfection with pKB1.1; 3: Liposome transfection with HIF-1 α shRNA; 4: pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA.

Table 2 Impact of HIF-1 α shRNA on the growth index of A549/CDDP xenograft	
Groups	Growth index of A549/CDDP xenograft
Control	5.273 $\pm$ 2.012
CDDP	2.991 $\pm$ 2.310 ¹⁾
KB	5.132 $\pm$ 1.812
LH	1.866 $\pm$ 1.308 ^{1,2)}
LH+CDDP(LD)	1.267 $\pm$ 0.250 ^{1,2,3)}
NH	1.432 $\pm$ 0.864 ^{1,2,3)}
NH+CDDP(ND)	0.958 $\pm$ 0.228 ^{1,2,3,4)}

¹⁾ Compared with control, $P < 0.01$; ²⁾ Compared with CDDP group, $P < 0.01$; ³⁾ Compared with KD group, $P < 0.01$; ⁴⁾ Compared with LH group, $P < 0.01$. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$.

2.7 免疫组化法检测脂质体转染与纳米颗粒转染对肿瘤组织 HIF-1 α 蛋白表达的影响

人 A549/CDDP 移植瘤小鼠经不同转染组处理后，其移植瘤组织中 HIF-1 α 蛋白免疫组化的结果见图 5。脂质体转染与纳米颗粒转染 HIF-1 α shRNA 均能有效抑制 HIF-1 α 蛋白的表达，且纳米

颗粒转染组 HIF-1 α 蛋白表达低于脂质体转染组，并且转染 HIF-1 α shRNA 与顺铂治疗有协同效应。

2.8 免疫组化法检测不同转染组中肿瘤组织 MRP1、LRP 蛋白表达

人 A549/CDDP 移植瘤小鼠经不同处理后，其移植瘤组织中 MRP1 及 LRP 蛋白免疫组化的结果见图 6。纳米颗粒转染 HIF-1 α shRNA 后能有效抑制 MRP1 及 LRP 蛋白的表达，且与顺铂治疗有协同效应。Spearman 相关分析显示 HIF-1 α 表达与 MRP1、LRP 的表达在蛋白质水平(相关系数 $r^2=0.918$ 、 0.906 , $P < 0.01$)均显著相关。

2.9 氧化铁磁性纳米颗粒转染对肝肾脑的组织学影响

氧化铁磁性纳米颗粒转染组小鼠的肝脏切片经 HE 染色后，如图 7a 所示，肝细胞无水肿，排列正常，没有明显的肝细胞坏死现象。肾脏切片经 HE 染色后，如图 7b 所示，肾小管未见明显扩张、间质水肿与炎性细胞浸润，没有明显的肾细胞坏死现象。脑部组织切片经 HE 染色后，如图 7c 所示，脑组织未出现明显的炎性细胞浸润、胶质细胞增多、亦无灶性坏死等病理改变。

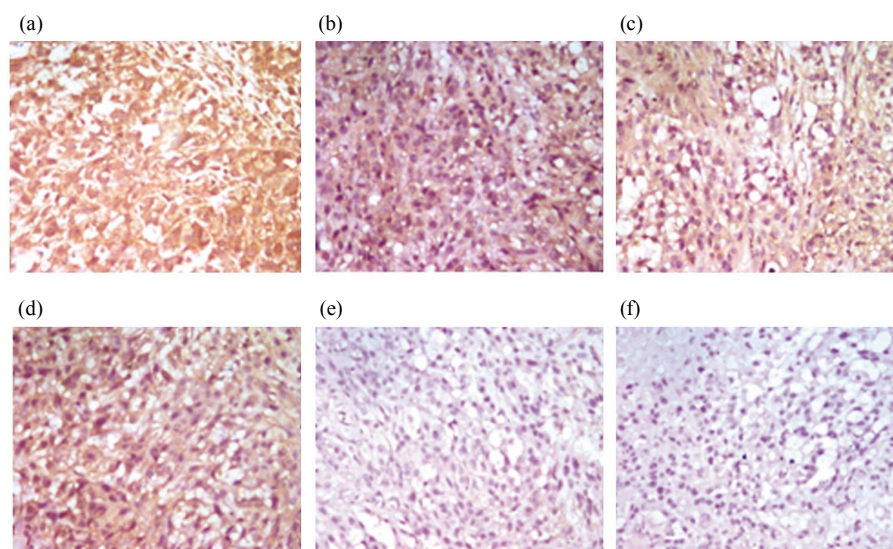


Fig. 5 The HIF-1 α shRNA was transfected into A549/CDDP xenograft *in vivo* by pll-DCIONP and by lipo2000 to compare the expression level of HIF-1 α after transfection

(a, b, c, d, e, f) Immunohistochemical analysis of HIF-1 α gene expression levels of transplanted tumors in different treatment group. (a) Control. (b) Cisplatin treatment alone. (c) Liposome transfection with HIF-1 α shRNA treatment alone. (d) pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA treatment alone. (e) Liposome transfection with HIF-1 α shRNA and cisplatin treatment. (f) pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA and cisplatin treatment.

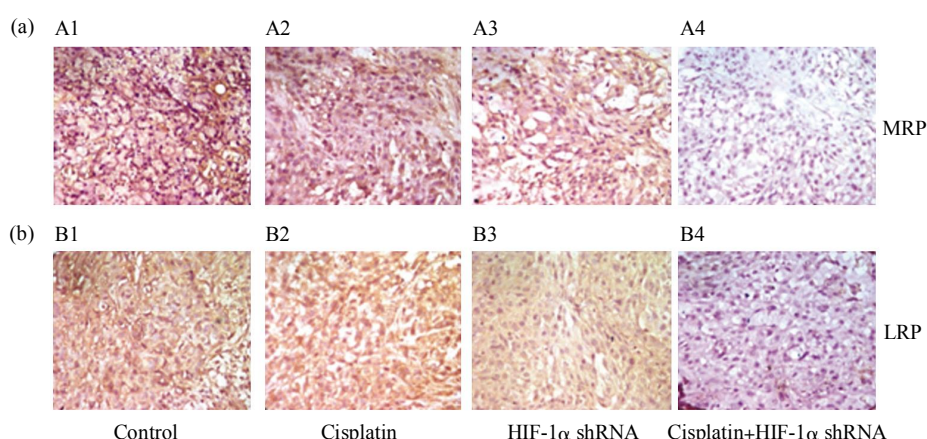


Fig. 6 The expression level of MRP1 and LRP in A549/CDDP xenograft after different treatment

(a) Immunohistochemical analysis of MRP1 gene expression levels of transplanted tumors in different treatment group. A1: Control; A2: Cisplatin treatment alone; A3: pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA treatment alone; A4: pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA and cisplatin treatment. (b) Immunohistochemical analysis of LRP gene expression levels of transplanted tumors in different treatment group. B1: Control; B2: Cisplatin treatment alone; B3: pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA treatment alone; B4: pll-DCIONP transfection with HIF-1 α shRNA and cisplatin treatment.

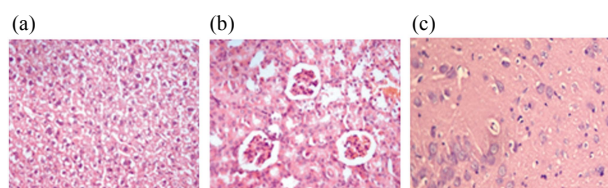


Fig. 7 The impact of magnetic iron oxide nanoparticles transfection on the liver, kidney and brain tissue

(a) HE staining of liver tissue of nude mice after magnetic iron oxide nanoparticles transfection. (b) HE staining of kidney tissue of nude mice after magnetic iron oxide nanoparticles transfection. (c) HE staining of brain tissue of nude mice after magnetic iron oxide nanoparticles transfection.

3 讨 论

RNA 干扰技术所遇到的最主要难题是如何有效地使基因穿过细胞膜, 进入细胞质中的 RNAi 通路介导序列特异性的靶 mRNA 降解, 目前 RNA 干扰技术广泛采用的是脂质体转染法, 但是脂质体本身可参与 PKC 通路调节, 抑制 ATP 酶的活性, 易产生细胞毒性及脱靶效应^[1]. 近年来出现的磁性纳米材料作为新型基因转染载体, 为更安全的基因转

染提供了可能. 磁性纳米颗粒能够通过细胞的摄粒作用将基因治疗分子带入细胞, 并在磁场的作用下实现安全有效的靶向治疗^[2]. 本研究所选用的表面修饰多聚赖氨酸的氧化铁磁性纳米颗粒(pII-DCIONP), 粒径 60~80 nm, 因表面用多聚赖氨酸修饰氧化铁纳米颗粒, 可与带负电的 DNA 良好结合, 保护质粒免受核酸酶的降解, 防止质粒在进入体内或者细胞内时被降解, 有利于质粒从溶酶体逸出并进入核内表达, 对提高转染效率有非常重要的意义. 磁性纳米颗粒特有的超顺磁性, 在外加磁场的作用下, 转染效率可提高 5~10 倍^[13-14]. 本研究发现, 纳米颗粒组相对转染率大于脂质体组, 两组差异有统计学意义($P < 0.05$), 且纳米颗粒转染组 HIF-1 α mRNA 表达下调更为显著. 可以说, 纳米颗粒 pII-DCIONP 介导 HIF-1 α shRNA 重组质粒载体进行转染是可行的, 且优于脂质体.

肺癌的耐药性与多个基因有关, 其中 MRP1、LRP 蛋白与肺癌的多药耐药性关系密切. MRP1 能通过转运 GSH-X 复合物及参与胞质囊泡运输, 增加药物外流, 从而降低细胞内的药物浓度产生耐药^[5]. LRP 蛋白影响药物的胞内转运和分布, 致靶点药物有效浓度下降而耐药, LRP 蛋白表达阳性的肺癌细胞耐药谱更广, 且对顺铂有较强的耐药性. 耐药细胞 A549/CDDP 与亲代 A549 细胞相比, 其耐药蛋白 MRP1 和 LRP 表达均增高^[16], 降低 MRP1 和 LRP 表达有可能逆转 A549/CDDP 细胞的耐药性. 肿瘤微环境的相对缺氧状态可造成 HIF-1 表达增加, 并可进一步地导致 MRP1 和 LRP 表达的增高^[17], HIF-1 在 MRP1 与 LRP 蛋白表达的调控中扮演了重要的角色. 通过 RNA 干扰技术抑制肿瘤 HIF-1 α 的表达, 可以阻碍活性 HIF-1 的形成^[18], 降低 MRP1 和 LRP 的表达, 有可能达到逆转肿瘤耐药的目的. 本研究利用纳米颗粒 pII-DCIONP 把 HIF-1 α shRNA 重组质粒转染入 A549/CDDP 细胞后, 发现 HIF-1 α 的 mRNA 及蛋白质表达下降, MTT 实验证实 HIF-1 α shRNA 重组质粒转染组对顺铂敏感性明显提高, 这表明 HIF-1 α 表达的降低与 A549/CDDP 细胞对顺铂的敏感性提高有关. 进一步的研究发现, HIF-1 α 表达降低的同时 MRP1 及 LRP 的表达也下降, 且 Spearman 相关分析显示, A549/CDDP 细胞中 HIF-1 α 表达与 MRP1 及 LRP 的表达在 mRNA 水平(相关系数 $r^2 = 0.900$ 、 0.915 , $P < 0.01$)及蛋白质水平(相关系数 $r^2 = 0.901$ 、 0.896 , $P < 0.01$)均显著相关. 我们推测 A549/CDDP

细胞 HIF-1 α 表达下调可能通过某种机制使得 MRP 与 LRP 的表达下调, 从而提高了 A549/CDDP 细胞对顺铂的敏感性.

为从整体上评价磁性纳米颗粒介导 HIF-1 α shRNA 质粒转染在肿瘤治疗和耐药逆转中的作用, 本研究参照 Anderson 等^[19]及 Peer 等^[20]的耐药移植瘤动物模型构建, 采用皮下接种法建立耐药细胞 A549/CDDP 的移植瘤模型, 成功构建 A549/CDDP 细胞的移植瘤动物模型(成瘤率 80%), 应用纳米颗粒将 HIF-1 α shRNA 重组质粒转染 A549/CDDP 细胞移植瘤动物模型, 发现能提高移植瘤对顺铂的敏感性, 降低移植瘤的生长指数, 纳米颗粒转染的抑制作用要明显强于脂质体转染, 且抑制 HIF-1 α 的同时也抑制了 MRP1、LRP 蛋白的表达(相关系数 $r^2 = 0.918$ 、 0.906 , $P < 0.01$). 可见磁性纳米颗粒介导 HIF-1 α shRNA 质粒转染不但在体外可以下调 HIF-1 α 、MRP1、LRP 的表达, 在一定程度上逆转 A549/CDDP 的顺铂耐性, 在体内也具有同样的作用.

磁性纳米颗粒的药代动力学模型研究中发现: 纳米粒由于其粒度小, 易穿过各种生理屏障. 它们容易被肝、脾、肺、骨髓等网状内皮系统的巨噬细胞吞噬, 被吞噬而存于此类器官中, 其中肝富集最多. 但通过使用物理靶向法, 即通过外加磁场的导向作用, 可使得磁性纳米颗粒主动富集于靶部位^[21]. 本实验过程中通过在裸鼠荷瘤部位局部施加磁场, 加强了磁性纳米颗粒在移植瘤部位的靶向主动性. 本研究的实验过程中裸鼠未出现明显的急性毒性及死亡情况, 亦未发现明显的肝、肾及脑组织毒性. 有研究表明, 在对超顺磁性 Fe_3O_4 的磁流体制剂的急性毒性试验中, 按照最大用量法对小鼠灌胃治疗, 测定小鼠血生化指标无明显异常, 说明了超顺磁性 Fe_3O_4 具有良好的生物相容性. Weissleder 等^[22]在含 Fe_3O_4 的磁流体制剂的急、慢性毒性试验中, 给小鼠或狗体内注射 Fe_3O_4 的剂量达到 168 mg/kg 时无明显的副作用出现, 肝、肾、肺、心、脑等器官的组织病理学研究也无明显变化. 本实验给小鼠静脉注射的剂量远低于上述剂量, 所以可以认为给裸鼠注射该剂量的氧化铁纳米制剂是安全的.

参 考 文 献

- [1] Jiang B H, Semenza G L, Bauer C, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O_2 tension. *Am J Physiol*, 1996, **271**(4 Pt 1): C1172-C1180

- [2] Hyun J Y, Chun Y S, Kim T Y, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated resistance to phenolic anticancer. *Chemotherapy*, 2004, **50**(3): 119-126
- [3] 任瑞美, 于金明, 宋现让, 等. RNA 干扰 HIF-1 α 增强人肺腺癌 SPCA-1 细胞放射敏感性的研究. *中华放射肿瘤学杂志*, 2005, **14**(6): 503-506
Ren R M, Yu J M, Song X R, *et al.* *Chin J Radiation Oncology*, 2005, **14**(6): 503-506
- [4] Mahairaki V, Xu L, Farah M H, *et al.* Targeted knock-down of neuronal nitric oxide synthase expression in basal forebrain with RNA interference. *J Neurosci Methods*, 2009, **179**(2): 292-299
- [5] Dykxhoorn D M. RNA interference as an anticancer therapy: a patent perspective. *Expert Opin Ther Pat*, 2009, **19**(4): 475-491
- [6] Beavis A D. On the inhibition of the mitochondrial inner membrane anion uniporter by cationic amphiphiles and other drugs. *J Biol Chem*, 1989, **264**(3): 1508-1515
- [7] Xin J, Yang D Z, Ji W W, *et al.* Preparation and characterization of fluorimetric folate-coupled chitosan nano-carrier. *J Central South University (Science and Technology)*, 2010, **41**(1): 161-165
- [8] 司徒镇强, 吴军政, 刘 斌, 等. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 1996: 186-187
Situ Z Q, Wu J Z, Liu B, *et al.* *Cell Culture*. Xi'an: World Book's Publishing Company 1996: 186-187
- [9] Milacic V, Chen D, Ronconi L, *et al.* A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res*, 2006, **66**(21): 10478-10486
- [10] Jiang J, Xia X B, Xu H Z, *et al.* Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1 α and VEGF. *J Cell Physiol*, 2009, **218**(1): 66-74
- [11] Ramesh R, Saeki T, Templeton N S, *et al.* Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector. *Mol Ther*, 2001, **3**(3): 337-350
- [12] Datiles M J, Johnson E A, Mccarty R E. Inhibition of the ATPase activity of the catalytic portion of ATP synthases by cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1777**(4): 362-368
- [13] Lambert G, Fattal E, Pinto-Alphandary H, *et al.* Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharm Res*, 2000, **17**(6): 707-714
- [14] 向娟娟, 聂新民, 唐敬群, 等. 磁性氧化铁纳米颗粒用于体外基因的转染及其外加磁场对于转染效率的影响. *中华肿瘤杂志*, 2004, **26**(2): 71-74
Xiang J J, Nie X M, Tang J Q, *et al.* *Chin J Oncology*, 2004, **26**(2): 71-74
- [15] 夏 曙, 于世英, 袁响林, 等. 乏氧对肺腺癌 A549 细胞 P 糖蛋白和多药耐药相关蛋白表达的影响. *中华医学杂志*, 2004, **84**(8): 663-666
Xia S, Yu S Y, Yuan X L, *et al.* *National Med J Chin*, 2004, **84**(8): 663-666
- [16] Wang W, Liu X, Tang C. The difference between multi-drug resistant cell line A549/Gem and its parental cell A549. *Chin Ger J Clin Oncol*, 2009, **8**(4): 190-194
- [17] Kubo T, Sugita T, Shimose S, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br*, 2008, **90**(3): 364-370
- [18] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**(10): 721-732
- [19] Anderson K, Lawson K A, Simmons-Menchaca M, *et al.* Alpha-TEA plus cisplatin reduces human cisplatin-resistant ovarian cancer cell tumor burden and metastasis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004, **229**(11): 1169-1176
- [20] Peer D, Dekel Y, Melikhov D, *et al.* Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res*, 2004, **64**(20): 7562-7569
- [21] Voltairas P A, Fotiadis D I, Michalis L K. Hydrodynamics of magnetic drug targeting. *J Biomech*, 2002, **35**(6): 813-821
- [22] Weissleder R, Stark D D, Engelstad B L, *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol*, 1989, **152**(1): 167-173

Study on Using Magnetic Iron Oxide Nanoparticles as HIF-1 α shRNA Gene Carrier to Reverse Cisplatin Resistance of A549/CDDP Cell Lines*

TU Xin**, MIN Ling-Feng**, CHEN Qiong***, XIE Ming-Xuan, HE Ling-Ling

(Department of Geriatric Medicine, Department of Respiratory, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract To evaluate the feasibility of using magnetic iron oxide nanoparticles (pll-DCIONP) as HIF-1 α shRNA gene carrier for transfection *in vitro* and *in vivo*, and the effect of HIF-1 α targeted RNA interference for reversing cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma A549/CDDP. The HIF-1 α shRNA was constructed and transfected into A549/CDDP and its xenograft animal model by pll-DCIONP and lipo2000, respectively. Fluorescent microscopy was employed to compare the transfection efficiency *in vitro*. The expression levels of HIF-1 α , MRP1 and LRP after transfection were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry analysis. Immunohistochemical analysis was performed to compare the levels of HIF-1 α , MRP1 and LRP in transplanted tumors among different groups. In order to calculate the cisplatin resistant, MTT assay was performed to detect the cell half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}). The growth index of transplanted tumors after transfection were detected among groups. Additionally, HE staining of liver, kidney and brain tissues was used after magnetic iron oxide nanoparticles transfection. The method of pll-DCIONP was more efficient on transferring plasmid into cells than the lipids examined *in vitro* ($P < 0.01$). The mRNA and protein levels of HIF-1 α , MRP1 and LRP of A549/CDDP were decreased after transfection with HIF-1 α shRNA, and the resistance to cisplatin of A549/CDDP was reversed by 82%. The protein levels of HIF-1 α , MRP1 and LRP in A549/CDDP transplanted tumors were decreased after transfection with HIF-1 α shRNA; also, the growth of A549/CDDP transplanted tumors were inhibited by HIF-1 α shRNA, cooperating with the synergistic effect of cisplatin. No necrosis of liver, kidney and brain tissue were observed after magnetic iron oxide nanoparticles transfection. The pll-DCIONP could be used as one of the ideal gene carriers for HIF-1 α shRNA gene delivery *in vitro* and *in vivo*. HIF-1 α can be an effective target for reversing cisplatin resistance in lung cancer, the mechanism underlying may be related to the decreased expression levels of HIF-1 α , MRP1 and LRP after transfection with HIF-1 α shRNA, and magnetic nanoparticle-mediated HIF-1 α shRNA transfection has biological safety to some extent.

Key words magnetic iron oxide nanoparticles, lung neoplasms, genes transfection, HIF-1 α , RNA interference

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00208

*This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of Hunan Province(07JJ3055).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-89753056, E-mail: qiongch@yahoo.com.cn

Received: April 17, 2010 Accepted: July 5, 2010