

纳米羟基磷灰石颗粒负载 $p53$ 基因 对肝癌干细胞抑制效果

何欢,董文韬,郑妮诗,孔祥东,陈岑,解纯刚

(浙江理工大学生命科学院,杭州 310018)

摘要:为评估纳米羟基磷灰石颗粒负载 $p53$ 基因对肝癌干细胞的抑制效果,采用化学沉淀法制备羟基磷灰石,对其进行表征,并检测其生物相容性。通过成球培养法获得肝癌干细胞,用经聚乙烯亚胺(PEI)修饰的纳米羟基磷灰石颗粒(HP)负载 $p53$ 基因(HP- $p53$)处理肝癌干细胞,用MTT法、hoechst 33258染色综合评估杀伤效果。结果表明:所制备的纳米颗粒主要成分和晶型为羟基磷灰石,呈短棒状,长径为20~50 nm,短径约为20 nm,并具有良好的生物相容性和降解性;HP- $p53$ 处理后的肝癌干细胞存活率显著下降;用Hoechst 33258染色观察到HP- $p53$ 处理后的肝癌干细胞细胞核出现高亮光斑,细胞密度降低,表明所制备的纳米羟基磷灰石负载 $p53$ 基因对肝癌干细胞具有显著的抑制效果。

关键词:羟基磷灰石;肿瘤干细胞; $p53$;抑制作用

中图分类号: Q279

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2017)02-0270-07

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,以其高复发和高转移率,成为死亡率居全球第三的疾病^[1-2]。尽管随着诊断和治疗的方法与手段的不断进步,当前的治疗对癌症初始阶段颇有成效,然而肿瘤复发和转移导致的死亡率仍居高不下。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)与肿瘤复杂的生物学特性相关,在肿瘤的起始、演进、转移、复发和多药耐药中扮演着重要角色^[3-6]。1997年,Bonnet和Dick通过分离白血病细胞亚群,发现肿瘤干细胞的存在^[7]。随后,相继有研究发现在脑癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌和肝癌等实体瘤中有CSCs的存在^[8-13]。CSCs具有多种抗凋亡蛋白和ABC泵等蛋白高表达的特性,从而使其对化疗^[14]和放疗具有更高的抗性^[15]。

$p53$ 基因的突变在肿瘤干细胞的形成起重要作用。在甲状腺癌中, $p53$ 基因突变出现在低分化

肿瘤中^[16]。而且,一个呈不同分化程度的肿瘤中, $p53$ 过表达限制肿瘤内分化程度较低的区域。此外,大量研究表明 $p53$ 基因突变与CSCs的形成和预后差存在紧密联系^[16-18]。胚胎干细胞(enbryonic stem cell, ESCs)和低分化肿瘤例如乳腺、脑和膀胱等恶性肿瘤中,表达相同的特异性基因时,出现相似的转录因子^[19]。另外,在乳腺癌和肺癌中发现, $p53$ 蛋白的出现与“干性”维持密切相关^[20]。

羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAp)是脊椎动物牙齿和骨骼的主要成分,以其优越的生物相容性和生物降解性受到广泛关注。HAp表面带正电,使其能通过静电吸附与带负电的基因片段结合。HAp负载基因具有改善肿瘤治疗现状的巨大潜能^[21]。但HAp负载基因是否能有效杀伤肿瘤中的CSCs尚未可知,本文旨在探索经PEI修饰的纳米羟基磷灰石颗粒(HP)负载 $p53$ 基因(HP- $p53$)对肝癌干细胞的杀伤效果。

收稿日期:2016-06-13 网络出版日期:2017-01-03

基金项目:国家自然科学基金项目(50942023,51272236)

作者简介:何欢(1990-),女,湖南郴州人,硕士研究生,主要从事生物材料方面的研究。

通信作者:解纯刚,E-mail:chungxie@126.com

1 实验材料与方法

1.1 材料

Huh7 肝癌细胞购自中科院上海细胞库,胎牛血清、B27、EGF、bFGF、低糖 DMEM-F12 培养基和 Accutase 细胞消化液均购自美国 Gibco 公司,高糖 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。

1.2 HP 的制备

量取 50 mL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液,冷却至 0°C ;将 50 mL $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 以 20 滴/min 的滴速逐滴加入到冷却至 0°C 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中,维持 200 r/min 搅拌以及 0°C 反应温度;待滴加完成后,立即滴加 200 μL 0.05 g/mL NaHCO_3 溶液,并继续搅拌 30 min;用氨水缓慢调节 pH 值为 10~13;逐滴滴加 100 μL 聚乙二醇(PEG-400),并持续搅拌 30 min;将温度升至 90°C ,维持 1 h;停止反应,将反应悬液转移到离心管中,8000 r/min 离心 3 min,弃上清,用去离子水洗两遍,随后无水乙醇洗两遍; 60°C 无尘鼓风干燥箱中烘干,研磨,得 HAp 粉末。去离子水重悬纳米 HAp 粉末,加入所取 HAp 质量的 0.3~0.5 倍聚乙烯亚胺(PEI)溶液,涡旋震荡,得到 HP 混合液,室温静置 0.5~5.0 h;8000 r/min 离心 3 min,去上清,两遍水洗,再以去离子水重悬,得到被 PEI 包被的纳米 HAp,即 HP 纳米颗粒。

1.3 纳米羟基磷灰石颗粒的生物相容性

MTT 法检测 HAp 和 HP 与人肝正常细胞系 L-02、人肝癌细胞系 Huh-7 和 Hep-3B 以及人乳腺癌细胞系 MCF-7 的生物相容性。

1.4 羟基磷灰石颗粒体外降解研究

取 pH 值为 5.6、6.5 和 7.4 的 PBS 溶液 10 mL,分别加入 50 mg HP 粉末,超声 15 min 后震荡混匀,转移至 37°C 恒温水浴摇床中,120 r/min 震荡。分别在第 10、20、30、40、50、60、70、80 d 和 90 d 时,8000 r/min 离心 5 min,收集上清溶液并测定上清溶液中钙离子的浓度,然后弃掉上清,再更换相应 pH 值的新鲜 PBS 溶液。

1.5 HP 值对 p53 基因的负载

将等量的 HP 与 2.4、6、8、10 μg 携带 p53 基因的重组质粒 pEGFP-C1-p53 (大小 5.0 kb 左右)室温混匀,静置 20 min 后,采用加有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳。观察电泳后的条带,并与 DNA marker 比较,以确定 HP 对 p53 质粒的负载量。

1.6 成球培养富集肝癌干细胞

低糖 DMEM-F12 培养液内加入 B27 (1:50)、

EGF(终浓度 20 ng/mL) 和 bFGF(终浓度 20 ng/mL),获得肝癌干细胞分化培养液^[22]。利用上述培养液将 Huh-7 细胞密度调整为 1000 个/mL,置于超低吸附六孔板中, 37°C 下于 5% 二氧化碳培养箱内培养 5~7 d,分别于第 1、3、5d 和 7 d 观察细胞形态,同时利用 ACCUTASE™ 消化细胞,再以 1000 个/mL 密度接种到玻璃培养瓶中 反复 3 次以上培养得到肝癌干细胞样细胞球用于后续实验。

1.7 肝癌干细胞相关基因的检测

Western blot 检测 NANOG、STAT 3 和 Albumin 肝癌干细胞相关蛋白的表达。

1.8 MTT 法检测 HP-p53 对肝癌干细胞杀伤效果

检测 HP-p53 对 CSCs 处理不同时间的杀伤效果,以及浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HP-p53 对 Huh-7 细胞和 CSCs 处理相同时间的杀伤效果。

1.9 Hoechst 33258 染色检测 HP-p53 诱导肝癌干细胞凋亡

将贴壁 Huh-7 和肝癌干细胞球消化成单个细胞,用 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液将成球培养细胞和 Huh-7 细胞,调整细胞密度至 4×10^4 个/mL。按 0.5 mL 每孔向 48 孔板中加入细胞悬液, 37°C 二氧化碳培养箱培养 24 h。将 HP-p53 和对照组分别按 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加至肝癌干细胞组和 Huh-7 细胞组的板孔中, 37°C 二氧化碳培养箱培养 48 h。用 Hoechst 33258 细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行染色,在倒置荧光显微镜下观察,并拍照记录。

1.10 统计学方法

应用 SPSS 11.0 for windows 软件进行统计分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,组间比较采用 t 检验。以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果与分析

2.1 HP 的表征

采用化学沉淀法制备纳米羟基磷灰石颗粒,通过场发射扫描电子显微镜、傅立叶红外光谱、X 射线衍射和热重分析对其进行表征,结果如图 1 所示。从图 1(a)可看出,HP 为短棒状结构,长径约为 20~50 nm,短径约 20 nm。将 X 射线衍射(图 1(c))结果与羟基磷灰石的标准粉末 XRD 数据(JCPDS # 86-0740)对比分析表明,制备的纳米 HP 颗粒主要为羟基磷灰石晶相,具有(211)、(002)等羟基磷灰石特征峰,但结晶度稍差,晶型多样;以 FTIR 进一步分析(图 1(b))发现,874.54、1454.27、1419.50 cm^{-1} 是

CO_3^{2-} 的吸收峰, 3428.96 cm^{-1} 是 OH^- 的吸收峰, $604.53, 568.45\text{ cm}^{-1}$ 为 PO_4^{3-} 中的 ν_4 吸收峰, 其中 CO_3^{2-} 的峰值可能为空气中的 CO_2 或者加入的 NaHCO_3 造成的干扰。进一步与 XRD 结果综合分析可知, 制备的纳米 HP 主要为羟基磷灰石。TG 结果

(图 1 (d)) 显示, 在温度从 20°C 升至 130°C 的过程中, 质量损失为 7.87% , 该部分主要为自由水的蒸发。继续升温至 480°C 左右, 有机物分解, 损失的有机物为聚乙二醇(PEG)和 PEI。温度升至 800°C , 质量稳定, 与 XRD 结果综合分析表明, HP 主要成分为羟基磷灰石。

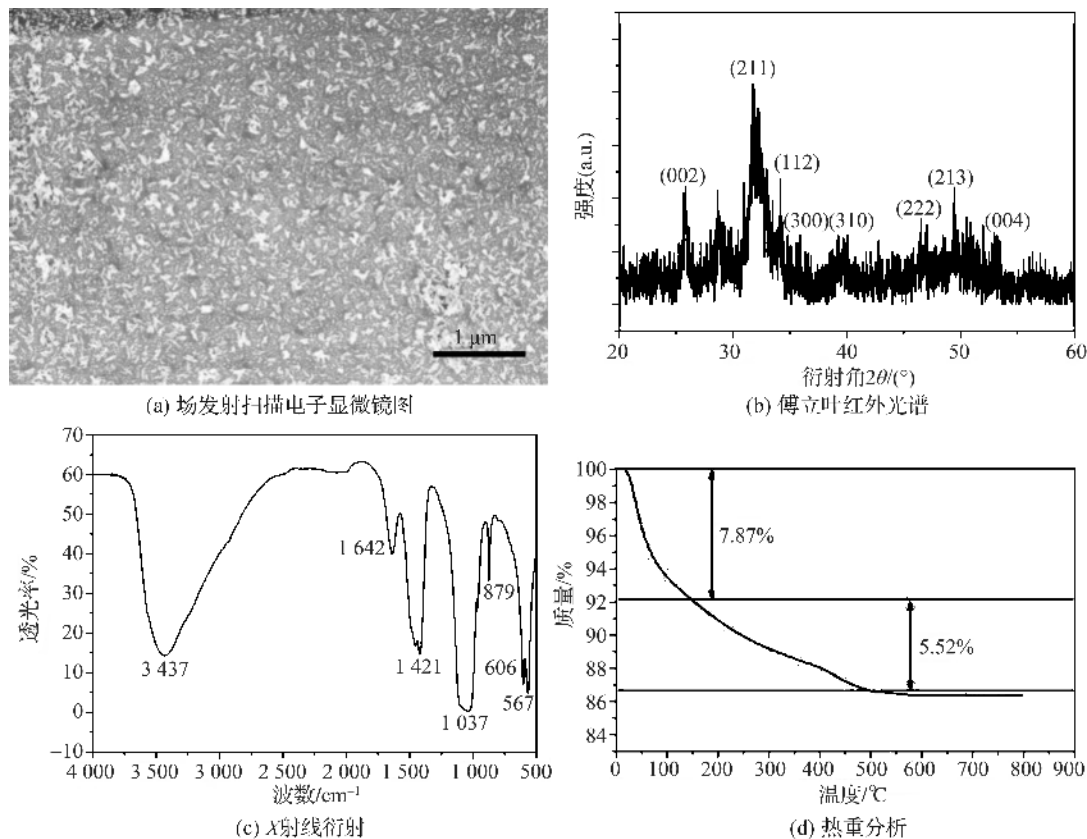
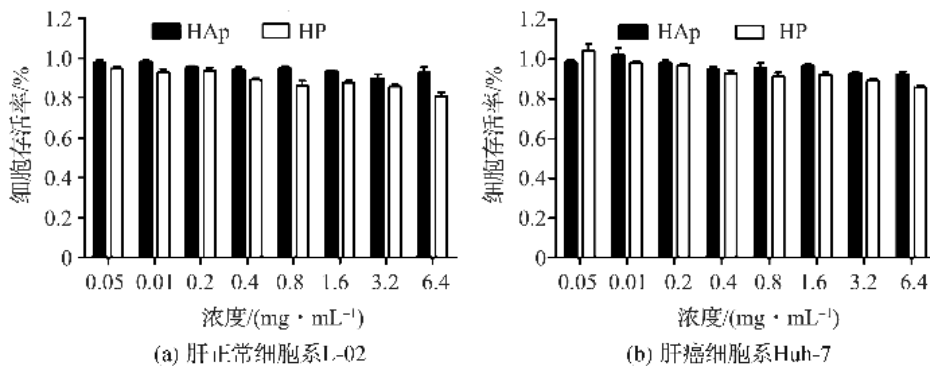


图 1 HP 纳米颗粒的表征

2.2 纳米羟基磷灰石颗粒的生物相容性

本实验用 MTT 法检测 HAp 和经 PEI 修饰的 HP 纳米颗粒与人肝正常细胞系 L-02、人肝癌细胞系 Huh-7 和 Hep-3B 以及人乳腺癌细胞系 MCF-7 的生物相容性。图 2(a)–(d) 分别为 HAp 和 HP 在终浓度为 0.05 至 $6.4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 梯度时对 L-02、Huh-7、Hep-3B 和 MCF-7 细胞系的活性影响。从图 2 中可看出随着颗粒浓度的升高, HAp 对各细

胞系活性几乎未表现出任何影响, 总体存活率维持在 95% 以上。而 HP 浓度升高时则表现出微弱的细胞毒性, 但当浓度达 $6.4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时总体存活率仍在 85% 以上。综合而言, 经 PEI 修饰的 HP 对人正常细胞系和癌症细胞系均表现出良好的生物相容性。因此, 实验制备的 HAp 和 HP 均具有可靠的生物安全性, 为其作为基因传送载体奠定了基础。



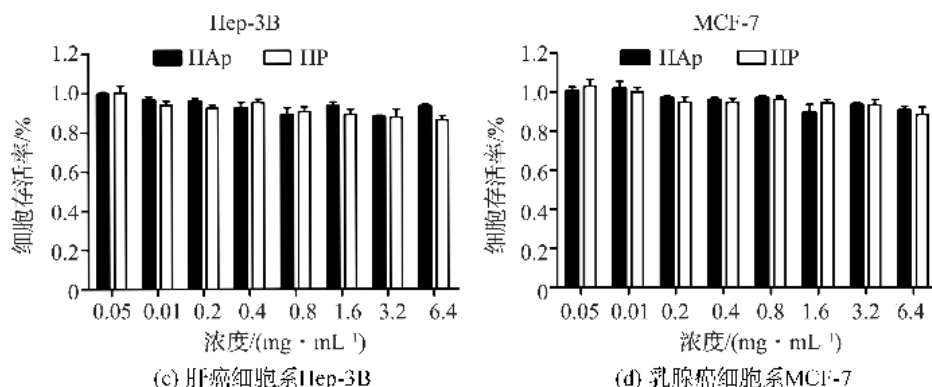


图 2 不同浓度梯度的 HAp 和 HP 对不同细胞系的活性影响

2.3 羟基磷灰石颗粒体外降解研究

为了研究 HP 的体外降解特性,本文选用 3 个不同 pH 条件来评价不同天数的降解率。从图 3 可知,HP 在 pH 值为 5.6、6.5 和 7.4 环境下降解率随着时间逐渐降低,在降解的第 90 天,降解率分别为 78.6%、57.9% 和 54.2%。HP 在 pH 值为 5.6 环境下降解率显著高于 pH 值为 6.5 和 7.4 两组。实验表明,HP 具有优良的体外降解能力,可大大降低作为基因药物载体滞留于体内而引发炎症反应的风险,具备作为基因和药物载体的基本条件。

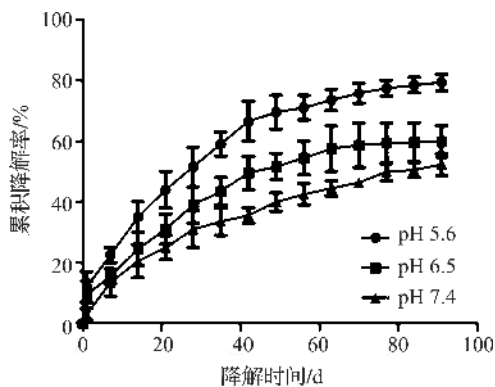
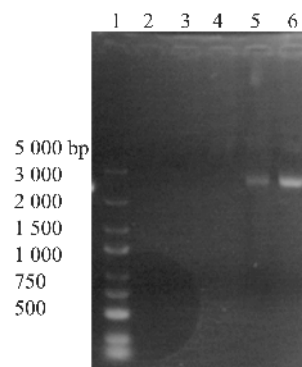


图 3 HP 在不同 pH 下降解曲线

2.4 HP 对 *p53* 基因的负载研究

HP 对 *p53* 基因的负载结果如图 4 所示。从图 4 中可看出,HP 与 6 μ g 的 *p53* 结合,未出现条带,8 μ g 处出现微弱的条带,10 μ g 处有明显条带。有微弱条带说明有少量与羟基磷灰石颗粒结合的 *p53* 质粒,因吸附不牢固或者未被吸附而随着电泳方向迁移,从而出现条带;在 6 μ g 处,未出现条带,则表明 *p53* 质粒被完全吸附,从而得出 10 μ g HP 对 *p53* 质粒的吸附量为 6 μ g。

图 4 HP 对 pEGFP-C1-*p53* 质粒负载结果

注:第 1 泳道为 DNA marker(M);第 2、3、4、5 和 6 泳道分别为 HP 负载 2、4、6、8 μ g 和 10 μ g 的 *p53* 质粒的电泳条带。

2.5 成球培养富集肝癌干细胞

肝癌干细胞的富集采用微球体培养法,如图 5 所示。图 5 中 a、b、c 和 d 分别是微球体培养的 Huh-7

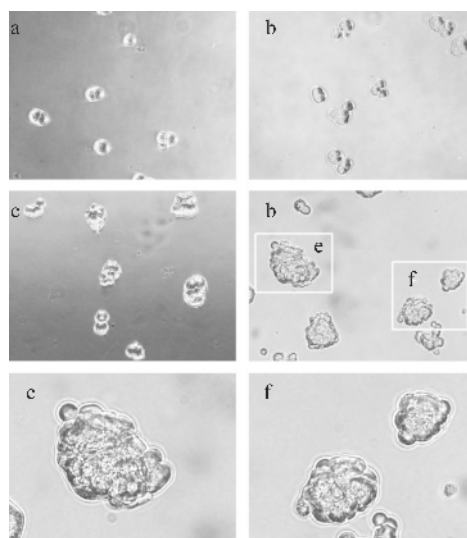


图 5 成球培养富集的肝癌干细胞的形态

注:a、b、c 和 d 分别是微球体培养的 Huh-7 细胞在第 2、4、6d 和 8d 时的细胞形态(明场,10 \times 20 倍荧光镜);e 和 f 为 d 图中细胞微球放大图。

细胞在第2、4、6和8 d,于荧光倒置显微镜下 10×20 倍镜下,明场拍摄的细胞形态,e和f培养为第8 d细胞微球的放大图。Huh-7细胞在体外悬浮培养的第4 d,开始出现球状细胞团,到第8 d细胞微球直径约 $100\sim 200\ \mu\text{m}$,几十到几百个具有肿瘤干细胞特征的细胞相互连接一起形成。其原理是胰岛素-转铁蛋白-硒-X添加剂(ITS-X)作为低糖DMEM-F12培养液的营养添加剂,为细胞提供代谢所必需的营养物质;EGF和bFGF在无血清培养液中起到促进细胞增殖的作用;B27主要作用是维持CSCs的“干性”,从而使CSCs细胞逐渐聚集成球。

2.6 Western blot 检测肝癌干细胞相关基因的表达

为了进一步确定微球培养获得的细胞是否为肝癌干细胞,选取STAT3、Albumin和Nanog三个转录因子作为特征性标志分子进行检测。从Western blot检测肝癌干细胞相关蛋白的表达结果(图6)可知,Nanog等转录因子在CSCs中发挥重要的作用,因而在肝癌CSCs中含量高于普通肝癌细胞;同时,作为成熟肝癌细胞的标志物,Albumin在CSC应呈低表达,说明体外悬浮培养的Huh-7细胞球具有肿瘤干细胞特性。

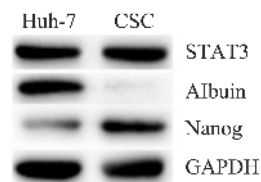


图6 Western blot检测肝癌干细胞相关蛋白的表达结果
注:图示为STAT3、Albumin和Nanog三个转录因子分别在Huh-7细胞和肝癌干细胞(CSC)中的表达量。

2.7 MTT法检测HP-p53对肝癌干细胞杀伤效果

为了测试负载p53基因的HP是否能有效杀伤肝癌干细胞(CSCs),进行了MTT实验。图7(a)为不同浓度HP-p53处理CSCs后第1、3和5 d的细胞存活率。总体而言,CSCs的存活率随着HP-p53浓度的增加而大幅度降低,与细胞作用时间越长,杀伤效果越显著。HP-p53处理CSCs的第1 d和第3 d,细胞的存活率随浓度增加明显降低,而第5 d HP-p53浓度达 $0.4\ \mu\text{g/mL}$ 后,浓度继续增加,细胞相对活力相对稳定,在HP-p53浓度为 $0.6\ \mu\text{g/mL}$ 时略微回升,随后以缓慢趋势继续降低;当HP-p53达 $2\ \mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率低至25%。图7(b)为 $1\ \mu\text{g/mL}$ 的HP-p53对Huh-7细胞和CSCs处理48 h后的杀伤效果。结果表明,HP-p53处理后,无论是对于肝癌细胞Huh-7还是肝癌干细胞CSCs,均有显著的杀伤效果,细胞存活率分别为65%和60%。

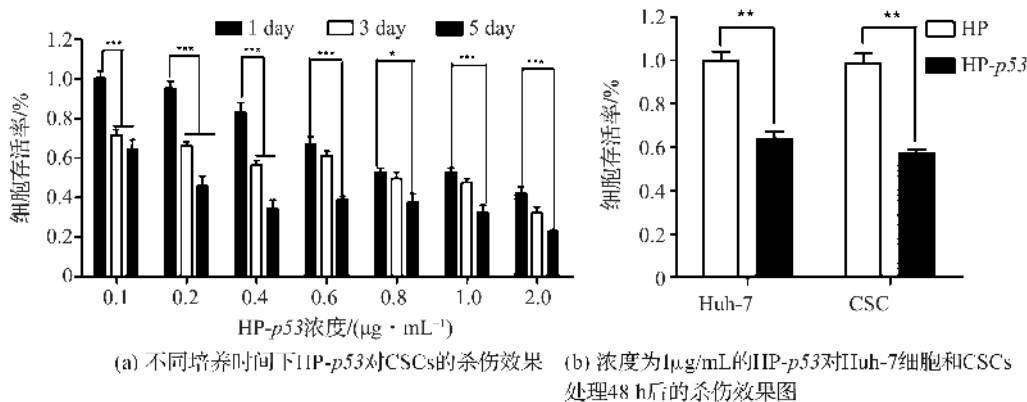


图7 HP-p53对CSCs的杀伤效果。

2.8 Hechst 33258染色检测HP-p53诱导肝癌干细胞的凋亡

为进一步探索HP-p53对Huh-7细胞及Huh-7-CSCs的杀伤机制,用Hoechst 33258细胞凋亡染色实验探索HP-p53是否通过诱导Huh-7细胞和CSCs发生凋亡,从而抑制其生长。图8(a)为HP-p53浓度分别为0、0.2和 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ 的实验组与

对照组处理48 h后的Huh-7细胞。随着HP-p53浓度增加,HP组无明显变化;HP-p53浓度增加,细胞密度减少,细胞核呈现高亮斑点,且细胞核轮廓模糊;HP-p53浓度达 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ 时,细胞更为稀疏,细胞凋亡性状愈加显著。图8(b)为HP-p53浓度分别为0、 $0.2\ \mu\text{g/mL}$ 和 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ 的实验组与对照组处理48 h后的CSCs细胞。对照组中Huh-7-

CSCs 相对于 Huh-7, 细胞密度较小; 随着 HP-*p53* 浓度增加, HP 组仍然无明显变化, 在浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时无明显凋亡现象, 细胞密度也无变化; HP-*p53* 组与在 Huh-7 细胞中结果类似, 细胞核轮廓模糊, 高亮斑点突出, 细胞减少。

在对照组中, Huh-7-CSCs 细胞密度低于 Huh-7 细胞的原因可能是 CSCs 生长较为缓慢, 增殖速度低于普通癌细胞。HP-*p53* 处理的两种细胞均有细胞凋亡现象, 说明 HP 作为基因载体成功将 *p53* 转移进入细胞内, 并使 *p53* 表达, 促进细胞凋亡。

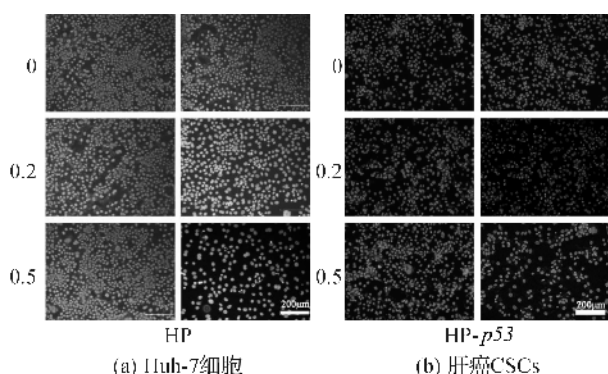


图8 Hoechst 33258 染色检测 HP-*p53* 诱导细胞凋亡图

3 结论

a) 采用化学沉淀法成功制备了羟基磷灰石纳米颗粒, 该纳米颗粒呈短棒状, 长径为 20~50 nm, 短径约 20 nm, 纯度较高、分散性良好, 具有良好的可降解性和细胞生物相容性。

b) 经聚乙烯亚胺(PEI)修饰的纳米羟基磷灰石颗粒(HP)对 *p53* 基因具有良好的负载能力。

c) 负载 *p53* 基因的纳米羟基磷灰石颗粒(HP-*p53*)对肝癌肿瘤干细胞具有显著的杀伤作用, Hoechst 33258 染色初步证实其杀伤机理是诱导肝癌干细胞发生凋亡。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] TSCHAHARGANEH D F, XUE W, CALVISI D F, et al. *p53*-dependent nestin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver cancer [J]. Cell, 2014, 158(3): 579-592.
- [3] NORTON K A, POPEL A S. An agent-based model of cancer stem cell initiated avascular tumour growth and metastasis: the effect of seeding frequency and location

- [J]. J R Soc Interface, 2014, 11(100): 432-438.
- [4] CLEVERS H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. Nature Medicine, 2011, 17(3): 313-319.
- [5] NGUYEN L V, VANNER R, DIRKS P, et al. Cancer stem cells: an evolving concept [J]. Nature Reviews Cancer, 2012, 12(2): 133-143.
- [6] ANTONIOU A, HEBRANT A, DOM G, et al. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? [J]. Cell Cycle, 2013, 12(24): 3743-3748.
- [7] BONNET D, DICK J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nature Medicine, 1997, 3(7): 730-737.
- [8] SINGH S K, CLARKE I D, TERASAKI M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [9] AL-HAJJ M, WICHA M S, BENITO-HEMNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [10] O'BRIEN C A, POLLTEE A, GALLINGER S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110.
- [11] LI C, LEE C J, SIMEONE D M. Identification of human pancreatic cancer stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2009, 568(568): 161-173.
- [12] ZHANG S, BALCH C, CHAN M W, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors [J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4311-4320.
- [13] TOMULEASA C, SORITAU O, RUS-CIUCA D, et al. Isolation and characterization of hepatic cancer cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD, 2010, 19(1): 61-67.
- [14] LI X, LEWIS M T, HUANG J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2008, 100(9): 672-629.
- [15] DIEHN M, CHO R W, LOBO N A, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells [J]. Nature, 2009, 458(7239): 780-783.
- [16] DONGHI R, LONGONI A, PILOTTI S, et al. Gene *p53* mutations are restricted to poorly differentiated

- and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland [J]. The Journal of Clinical Investigation, 1993, 91(4): 1753-1760.
- [17] HUH J W, KIM H R, KIM Y J. Prognostic role of *p53* messenger ribonucleic acid expression in patients after curative resection for stage I to III colorectal cancer: association with colon cancer stem cell markers [J]. Journal of the American College of Surgeons, 2013, 216(6): 1063-1069.
- [18] ALONI-GRINSTEIN R, SHETZER Y, KAUFMAN T, et al. *p53*: the barrier to cancer stem cell formation [J]. Febs Lett, 2014, 588(16): 2580-2589.
- [19] HEUBLEIN S, PAGE S K, MAYR D, et al. *p53* determines prognostic significance of the carbohydrate stem cell marker TF1 (CD176) in ovarian cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(6): 1163-1170.
- [20] CHENG C Y, HWANG C I, COMNEY D C, et al. miR-34 cooperates with *p53* in suppression of prostate cancer by joint regulation of stem cell compartment [J]. Cell Reports, 2014, 6(6): 1000-1007.
- [21] KOLMAS J, KRUKOWSKI S, LASKUS A, et al. Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications [J]. Ceram Int, 2016, 42(2): 2472-2487.
- [22] SEO E J, WIENCH B, HAMM R, et al. Cytotoxicity of natural products and derivatives toward MCF-7 cell monolayers and cancer stem-like mammospheres [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2015, 22(4): 438-443.

Inhibition Effect of *p53* Gene Loaded by Hydroxyapatite Nanoparticles on Hepatic Cancer Stem Cells

HE Huan, DONG Wentao, ZHENG Weishi, KONG Xiangdong, CHEN Cen, XIE Chungang
(College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To evaluate the inhibition effect of *p53* gene loaded by hydroxyapatite nanoparticles on hepatic cancer stem cells (CSCs), the hydroxyapatite nanoparticles were prepared by chemical precipitation method and then characterized to test biocompatibility. Hepatic cancer stem cells were obtained in spheric culture condition. *p53* gene loaded by hydroxyapatite nanoparticles modified by polyethylenimine (PEI) (HP-*p53*) was used to treat hepatic cancer stem cells. The inhibition effect was tested by MTT assay and Hoechst 33258 staining. The experiments suggest that HP is short rod-like nanoparticle with length ranged from 20 to 50 nm and width of approximately 20 nm and its main component is hydroxyapatite. HP has excellent biocompatibility and degradability. The survival rate of hepatic cancer cells treated by HP-*p53* decreased significantly. Hoechst 33258 staining results shows that bright spots appeared in the hepatic cancer stem cell nucleus, and cell density decreased. This indicates *p53* gene loaded by hydroxyapatite nanoparticles has significant inhibition effect on hepatic cancer stem cells.

Key words: Hydroxyapatite; hepatic cancer stem cells; *p53*; inhibition effect

(责任编辑: 许惠儿)