

纳米羟基磷灰石携载 lefty-1 基因 对人乳腺癌细胞的杀伤效应

钟云平^a,姚晨雪^a,宋国龙^a,赖文^b,陈岑^a,解纯刚^a,孔祥东^a

(浙江理工大学,a. 生命科学学院;b. 材料与纺织学院,杭州 310018)

摘要:采用聚乙烯亚胺为调控剂,氯化钙和磷酸氢二钠为原料,共沉淀法合成一种长梭状纳米羟基磷灰石。通过场发射扫描电镜、X 射线粉末衍射、红外吸收光谱和热重分析仪对材料性能进行表征。体外降解实验表明羟基磷灰石颗粒具有可降解性,在弱酸性条件下更容易降解,具有 pH 值响应性。颗粒与质粒 DNA 体外负载曲线及基因释放曲线结果表明,长梭状羟基磷灰石颗粒能够有效地携载并且表现对质粒 DNA 的持续释放。体外转染实验证实颗粒携载 pEGFP-C1-lefty-1 质粒后在细胞中成功表达绿色荧光蛋白。MTT 结果表明所制备的羟基磷灰石颗粒对人乳腺上皮细胞表现极低的细胞毒性,具有良好的生物相容性,携载 pEGFP-C1-lefty-1 质粒后对人乳腺癌细胞具有良好的杀伤效果。

关键词:羟基磷灰石;lefty-1;人乳腺癌细胞;杀伤效应;聚乙烯亚胺

中图分类号: Q279 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2016) 03-0450-08 **引用页码:** 050704

0 引言

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAp)是人体骨骼和牙齿的主要无机成分,具有良好的生物相容性而不会引起机体的免疫反应^[1]。通过某些蛋白质,例如丝素蛋白等调控合成纳米 HAp^[2-3],负载药物时具有负载率高、缓释性好等药物载体性能^[4];作为基因载体,纳米 HAp 具有生物可降解性、易于实现靶向性和保护 DNA 等的优势^[5-6]。通常质粒 DNA 进入细胞后很快被核酸酶消化降解,但 HAp 颗粒有保护 DNA 功能,能够与质粒 DNA 形成致密的结构,使质粒 DNA 不被核酸酶消化降解^[7]。HAp 颗粒的表面电荷和粒径是影响转染效率的重要因素^[8-9]。Chen 等^[10]用 12-氨基十二烷酸对颗粒进行修饰使其表面带有正电荷,转染成骨细胞时发现转染效率明显提高。Gao 等^[11]发现粒径小于 40 nm 的颗粒,由于细胞直接吞噬作用,其转染效率有了明

显的提高。采用聚乙烯亚胺(PEI)对 HAp 颗粒进行表面修饰,可提高其携载质粒 DNA 的能力^[12]和转染效率^[13]。Murankami 等^[14]在 HAp 颗粒表面包裹上 PEI 涂层,发现颗粒对 ADP、AMP 和 ATP 的吸附力明显提高。Peng 等^[15]以聚乙二醇(PEG)和 PEI 为调控剂,共沉淀法合成一种 PEG-PEI/Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒,发现对质粒 DNA 具有高负载效率。

乳腺癌的发病率近年来不断提高,2013 年美国乳腺癌的新发病例达到了 23 万例^[16];在中国乳腺癌的年龄标化发病率(ASR)为 21.6 例/10 万人,并且新发病增长率是世界水平的 2 倍^[17]。乳腺癌的发生是一个多因素、多基因参与的过程。Strizz 等^[18]发现乳腺癌中 Nodal 蛋白的表达量增加。Kirsammer 等^[19]发现 Nodal 信号在乳腺癌中呈高水平表达,通过激活 ERK 信号,促进肿瘤的浸润性和转移性。Lefty 基因表达的 lefty 蛋白由 lefty-1

收稿日期:2015-12-23

基金项目:国家自然科学基金项目(50942023,51272236);浙江理工大学 521 人才培养计划资助项目(1610032521302)

作者简介:钟云平(1990-),男,浙江湖州人,硕士研究生,主要从事生物材料方面的研究。

通信作者:孔祥东,E-mail:kongxiangdong@gmail.com

和 lefty-2 蛋白组成^[20], 在肿瘤组织中呈极低水平表达; 研究证明两种蛋白均抑制 Nodal 信号通路^[21-22], 促进恶性肿瘤细胞的凋亡, 显示出抗肿瘤活性。

本文通过采用氯化钙和磷酸氢二钠为原料、PEI 为调控剂, 通过共沉淀法合成出一种纳米 HAp 颗粒, 研究其携载 lefty-1 基因后对人乳腺癌细胞的杀伤效应。

1 材料与表征方法

1.1 实验材料与仪器

材料: 聚乙烯亚胺、氯化钙(CaCl_2)和磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)购自于 sigma 公司, pEGFP-C1-lefty-1 质粒由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 无水乙醇为市售分析纯, 去离子水由 Milipore 纯水仪制备。

仪器: Nicolet 5700 傅立叶变换红外光谱仪(Thermo Electron 公司), ARL-X'TRA 型 X-射线粉末衍射仪(美国热高公司), ZEISS-ULTRA55 场发射扫描电镜(日本 Hitachi 公司), Pyris 1 TGA 热重分析仪(美国铂金-埃尔默公司), 集热式恒温加热磁力搅拌器(杭州惠创仪器设备有限公司), ELx 800 酶标仪(BioTek 公司), Nanodrop 2000(Thermo 公司), INTEGRA 真空安全吸液器(VACUSAFE 公司)。

1.2 P-HAp 颗粒的合成

P-HAp 颗粒的制备方法按照以下步骤:

a) 分别配制 0.1 mM 的 CaCl_2 、 Na_2HPO_4 溶液和 0.1 mM 的 PEI 水溶液;

b) 在 30 mL Na_2HPO_4 溶液中加入 210 mL 去离子水, 200 r/min 匀速搅拌 10 min, 反应在 70 °C 集热式恒温加热磁力搅拌器里进行;

c) 加入 10 mL PEI 水溶液, 用 NaOH 溶液调节 pH 值为 10, 200 r/min 搅拌 30 min;

d) 滴加 50 mL CaCl_2 溶液, 速度为 20 滴/min, 滴加过程中调节反应温度、搅拌速度, pH 值保持不变;

e) 滴加完毕后, 继续搅拌反应 4 h, 将反应完成后的颗粒 8 000 r/min 沉淀离心收集, 再用去离子水和无水乙醇分别洗涤 3 次;

f) 将离心后得到的沉淀以两种方式保存, 一种保存在无水乙醇溶液中, 以备后续的 FE-SEM 等测试; 另一种 60 °C 恒温干燥箱中干燥 48 h 后收集, 以备后续的 FT-IR, XRD, TGA 等测试; 将合成的颗粒记为 P-HAp。

1.3 P-HAp 颗粒的表征测试

1.3.1 场发射扫描电镜(FE-SEM)

将保存在无水乙醇中的 P-HAp 颗粒超声分散后滴加一滴至清洗干净的硅片表面, 待无水乙醇挥发后将硅片粘贴到导电胶上, 采用 FE-SEM(加速电压为 3.0 kV)对颗粒形貌进行观察。

1.3.2 X 射线粉末衍射仪(XRD)

将干燥后的 P-HAp 颗粒研磨成粉末状, 均匀地置于载玻片表面, 采用 X-射线粉末衍射仪(管电压 40 kV, 管电流 35 mA, 扫描速度为 5 °/min, 扫描范围 $2\theta=10^\circ\sim 60^\circ$)进行物相和结晶性能分析。

1.3.3 红外吸收光谱仪(FT-IR)

采用溴化钾压片法, 将干燥后的 P-HAp 颗粒研磨成粉末与溴化钾混合, 质量比约为 1 : 100, 充分研磨后将混合物进行压片(30 MPa, 45s)。利用傅立叶变换红外光谱仪(扫描范围为 4500 ~ 400 cm^{-1})对样品进行分析。

1.3.4 热重分析仪(TGA)

将干燥后的 P-HAp 颗粒研磨成粉末状, 采用热重分析仪(加热速度 10 °C/min, 升温范围为 20 ~ 800 °C)对水分和有机物含量进行分析。

1.4 P-HAp 颗粒体外降解实验

1.4.1 P-HAp 颗粒的降解

将磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)设置 4 个不同 pH 值, pH 值分别为 4.5、5.6、6.5 和 7.4。将 50 mg P-HAp 颗粒重悬于 10 mL 的 PBS 溶液中, 使 P-HAp 悬液浓度达到 5 mg/mL。4 组颗粒悬液放置在水浴恒温振荡器中, 振荡速率为 120 r/min, 温度为 37 °C; 分别在降解 1、3、5、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77、84 d 和 91d 后, 10 000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 并重新补足 10 mL PBS 溶液, 振荡重悬, 继续降解。

1.4.2 钙离子浓度测定方法

钙离子浓度测定操作方法参照钙离子浓度试剂盒(DICA-500, Bioassay Systems), 取 5 μL 样品加入到 96 孔板中, 加入 200 μL 工作液, 充分混合, 室温孵育 3 min, 用酶标仪读取 OD 612 nm 的值, 对照钙离子浓度标准曲线计算出对应的钙离子浓度, 最后计算出 P-HAp 颗粒的降解百分比。

1.5 P-HAp 颗粒与 pEGFP-C1-lefty-1 质粒负载曲线

将干燥后的 P-HAp 颗粒于超净工作台紫外灭菌 24 h 后, 配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10 mg/mL 的悬液, 并室温下 30 kHz 的频率超声 5 min。将 100 μg pEGFP-C1-lefty-1 质粒加入到 200 μL 不同浓度的 P-HAp 悬液, 混合均匀后, 37 °C 水浴条件下孵育 2 h;

将形成的 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 复合物 4℃ 条件下 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, Nanodrop 2000 测量上清液中 DNA 浓度, 计算出不同浓度 P-HAp 悬液对 pEGFP-C1-lefty-1 质粒的负载效率。

1.6 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 的基因释放曲线

按照步骤 1.5 取 1 mg/mL P-HAp 悬液组, 离心吸取上清液后, 在沉淀中分别加入 200 μL pH 值为 5.6 和 7.4 的 PBS 溶液, 置于 37℃ 水浴条件下, 分别在 0.5、1、2、12、24、48、72、96、120、144、168 h 后吸取 5 μL 上清液, 同时补足等量的 PBS。Nanodrop 2000 测量上清液中 DNA 浓度, 计算出在不同时间段质粒 DNA 释放百分比。

1.7 P-HAp-pEGFP-C1 体外转染细胞

在 2 mL 无血清 DMEM 培养基中加入 25 μL 1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液, 使培养基中的 Ca²⁺ 浓度达到 10 mmol/L, 再分别加入 500 μL 400 μg/μL 质粒 DNA 和 200 μL 1 mg/mL 的 HAp 悬液, 混合均匀置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 20 min 后备用。将处于对数生长期的 MCF-7 细胞(人乳腺癌细胞株)和 MDA-MB-231 细胞(人乳腺癌细胞株), 以每孔 2×10⁴ 个细胞的密度接种 24 孔细胞培养板中, 每孔加入 1 mL 培养基, 置于细胞培养箱中培养 24 h 后, 将配置好 p-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 复合物加入到 24 孔板中, 每孔加入 200 μL, 继续培养 48 h 和 72 h 后荧光倒置显微镜观察并拍照。

1.8 P-HAp 颗粒生物相容性

将处于对数生长期的 Hs 578bst 细胞(人乳腺上皮细胞株)以每孔 5 000 个细胞的密度铺于 96 孔细胞培养板中, 将 96 孔板置于细胞培养箱下培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL 不同浓度梯度的 P-HAp 悬液, 在分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT(3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐)溶液, 继续培养 4 h 后用真空安全吸液器吸去培养液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷溶液(DMSO), 平板振荡器上振荡 10 min 后, 酶标仪 OD 490 nm 处读取各孔的吸光值, 按照公式:

$$\text{细胞生存率} = \frac{(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{调零孔}})}{(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{调零孔}})} \times 100\% \quad (1)$$

计算出细胞生存率, 以颗粒浓度为横坐标、细胞生存率为纵坐标绘制细胞生长活力图。

1.9 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 对乳腺癌细胞的杀伤效应

将处于对数生长期的 MCF-7、MDA-MB-231 和 Hs 578bst 细胞铺于 96 孔细胞培养板中, 细胞密

度为 5 000 个每孔; 将 96 孔板置于细胞培养箱下培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 复合物, 分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后用真空安全吸液器吸去培养液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 平板振荡器上振荡 10 min 后, 酶标仪 OD 490 nm 处测量各孔的吸光值, 按照步骤 1.8 中的公式计算出细胞生存率。

2 实验结果与分析

2.1 P-HAp 颗粒的表征

图 1 为 P-HAp 颗粒在的场发射扫描电镜图。从图中可以观察到, 所合成的 P-HAp 颗粒形貌呈两端细长, 中间较粗的长梭状结构; 颗粒长度为 300~400 nm, 中间长度为 30~40 nm, 颗粒的分散性好, 粒径大小比较均匀。

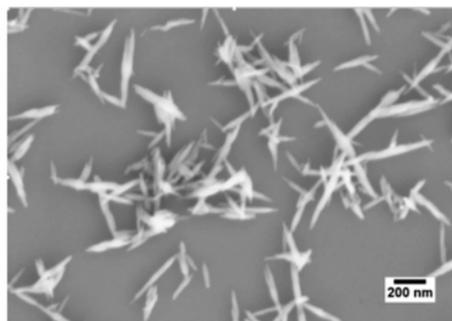


图 1 P-HAp 颗粒场发射扫描电镜照片

图 2(a) 为 P-HAp 颗粒的 X 射线粉末衍图。通过与 HAp 的标准粉末衍射数据(JCPDS # 9-432) 进行衍射峰对比分析, 制备的 P-HAp 颗粒主要晶型为羟基磷灰石。

图 2(b) 为 P-HAp 颗粒的红外吸收光谱图。图中 3420 cm⁻¹ 处吸收峰和 1650 cm⁻¹ 处吸收峰分别为—OH 伸缩振动吸收峰和结合水的吸收峰; 879 cm⁻¹ 处吸收峰和 1440 cm⁻¹ 处吸收峰分别为 CO₃²⁻ 的 ν₂ 和 ν₃ 吸收峰, 表明所合成的 P-HAp 颗粒中含有 CO₃²⁻, 原因是合成过程中空气中的 CO₂ 参与了反应; 1040 cm⁻¹ 处吸收峰对应 PO₄³⁻ 中的 ν₃ 吸收峰, 608 cm⁻¹、565 cm⁻¹ 处吸收峰是 PO₄³⁻ 中 P-O 的 ν₄ 吸收峰; 结合 XRD 结果, 表明所合成的 P-HAp 颗粒为羟基磷灰石。

图 2(c) 为 P-HAp 颗粒的 X 射线能谱图(EDS)。从图中可以观察到, 钙、磷和氧元素都被检测出来, 这与羟基磷灰石的元素组成相符合; 少量钠元素被检测出来, 说明合成原料磷酸氢二钠

有残留; 碳元素也被检测出来, 说明合成过程中空气中的 CO_2 参与的反应, 生成了部分的 CaCO_3 沉淀。

图 2(d) 为 P-HAp 颗粒的热重分析结果。图中曲线表明 P-HAp 颗粒热失重分为两步, 第一步

是 150°C 以下质量比为 2.55% 的热失重, 其原因是结合水的失去; 第二步为 $150\sim 600^\circ\text{C}$ 质量比为 8.96% 的热失重, 其原因是有机物 PEI 的分解, 说明所合成的 P-HAp 颗粒中有机物 PEI 的含量为 8.96%。

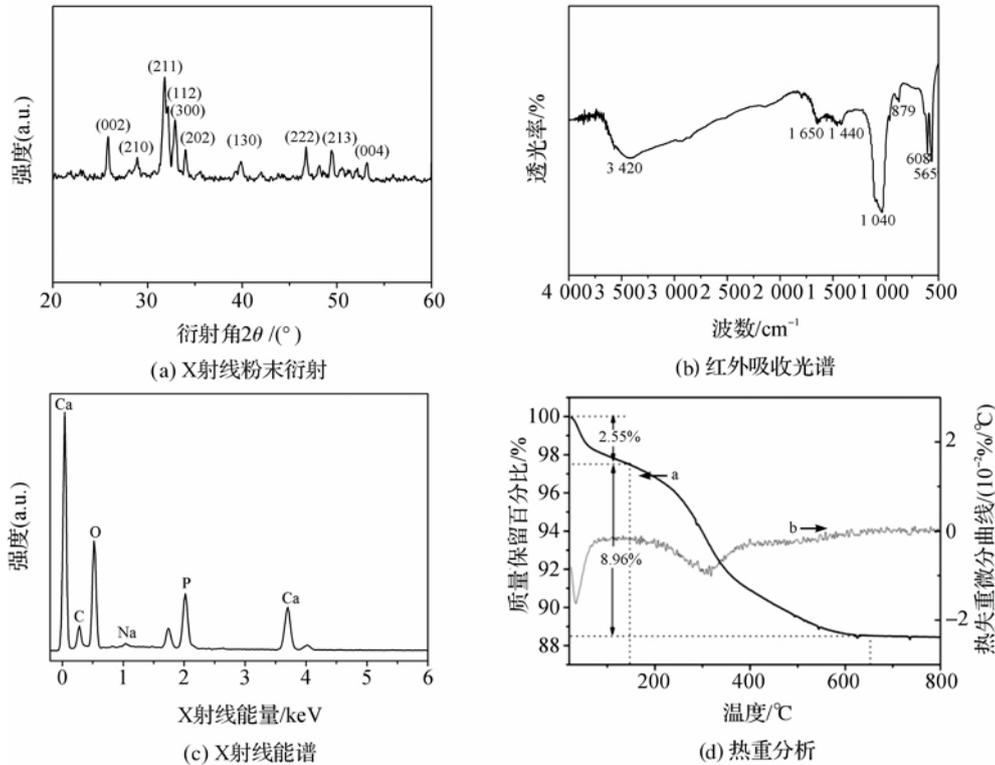


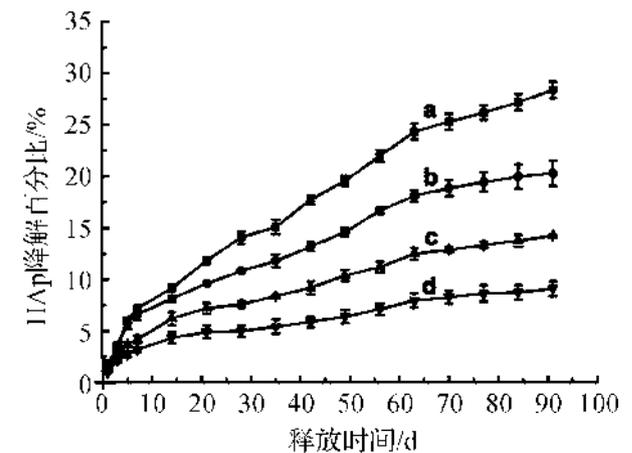
图 2 P-HAp 颗粒材料性能表征结果

2.2 P-HAp 颗粒的体外降解曲线

P-HAp 颗粒体外降解曲线选取降解天数为横坐标, 降解百分比为纵坐标, 如图 3 所示。在 pH 值为 4.5 的 PBS 溶液中, P-HAp 颗粒降解速度最快, 降解百分比最大, 降解 91 d 后, 其降解百分比达到 56.7%; 随着 pH 值的增大, 颗粒的降解速度逐渐变小, 降解百分比也变小; 在 pH 值为 5.6 的条件下, 91 d 后颗粒的降解百分比达到 40.6%; 而在 pH 值为 6.5 和 7.4 的条件下, 91 d 后颗粒的降解百分比分别为 28.5% 和 18.2%, 表明 P-HAp 颗粒的体外降解具有 pH 值响应性。从生物安全性和恶性肿瘤酸性微环境这两点考虑, HAp 颗粒在弱酸性 pH 值下缓慢降解性这一特征, 为其作为缓释性基因载体提供基础依据。

2.3 P-HAp 与 pEGFP-C1-lefty-1 质粒体外负载曲线

图 4 为 P-HAp 与 pEGFP-C1-lefty-1 质粒的体外负载曲线。从图 4 中可以观察到, 随着 P-HAp 悬液浓度的增加, 与颗粒结合的质粒 DNA 的量也逐渐



a. pH=4.5, b. pH=5.6, c. pH=6.5, d. pH=7.4

图 3 P-HAp 颗粒体外降解曲线图

增加; 在颗粒浓度为 0.1 mg/mL 时, 质粒 DNA 结合百分比为 25.9%; 而当浓度为 10 mg/mL 时, 质粒 DNA 结合百分比达到 90.8%。说明经 PEI 调控合成的 HAp 颗粒具有很好的基因负载效率, 体外能够有效地结合质粒 DNA。

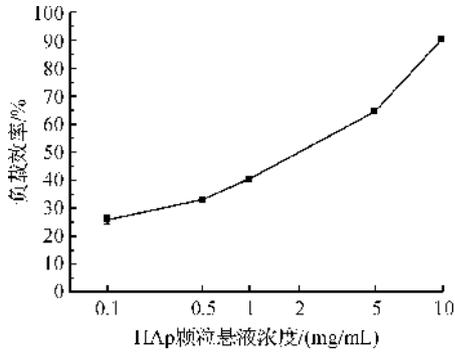


图4 P-HAp与质粒DNA结合曲线

2.4 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 体外基因释放曲线

图5为P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1在pH值为5.6(曲线a)和7.4(曲线b)PBS溶液中体外基因释放曲线。在pH值为5.6的条件下,前6h内其基因释放量呈指数增长,6~144h时间段里呈类线性增长,并且在144h后达到平台期,其最大释放量为18.3%;在pH值为7.4的条件下,前6h内其基因释放量呈指数增长,其后基因缓慢释放,并且在96h后达到平台期,其最大释放量为9.8%。说明与HAp颗粒结合的质粒DNA在弱酸性pH值下更容易释放,进一步为其作为缓释性基因载体提供基础依据。

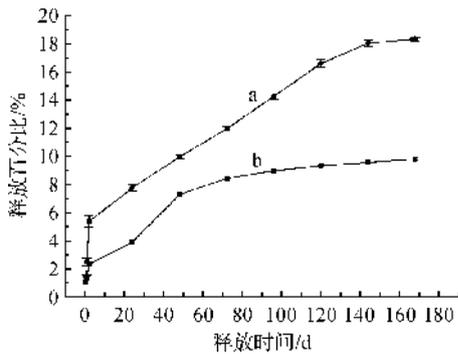


图5 P-HAp-pEGFP-C1 基因释放曲线

2.5 P-HAp-pEGFP-C1 的体外转染实验

图6为P-HAp颗粒、pEGFP-C1质粒和P-HAp-pEGFP-C1复合物的体外转染人乳腺癌细胞(MCF-7、MDA-MB-231)48h和72h后的荧光图。pEGFP-C1质粒带有绿色荧光蛋白基因,表达的绿色荧光蛋白在蓝光激发下会发出绿色荧光。从图6中可以观察到,Mock组(P-HAp颗粒)由于没有携带pEGFP-C1质粒,无论是MCF-7细胞还是MDA-MB-231细胞,整个视野中都没有检测到绿色荧光;pEGFP-C1质粒组对于两种细胞的转染效率都很低,在转染48h和72h后,整个视野中只有极少数的细胞表达绿色荧光蛋白。图6(a)中与pEGFP-C1组相比,P-HAp-pEGFP-C1对MCF-7细胞具有更

高的转染效率,整个视野中观察到更多绿色荧光蛋白,这是由于PEI带正电荷,细胞膜表面带负电荷,这样细胞能够有效地吸附P-HAp-pEGFP-C1复合物,提高转染效率,并且在转染72h后绿色荧光蛋白的表达量更多。但对于MDA-MB-231细胞,P-HAp-pEGFP-C1组的转染效率没有明显变化。图6(b)中与pEGFP-C1组相比,在转染48h和72h后,视野中观察到的绿色荧光蛋白量并没有显著的差异,仍保持着较低转染水平。

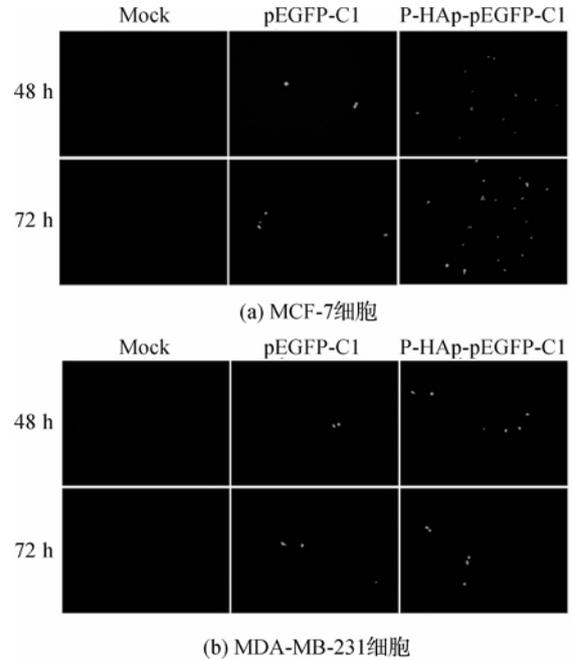


图6 荧光显微镜检测 P-HAp-pEGFP-C1 转染荧光图

2.6 P-HAp 颗粒的生物相容性

图7为P-HAp颗粒对Hs 578bst细胞毒性实验结果,P-HAp悬液的终浓度为0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg/mL。随着P-HAp悬液浓度的增加,Hs 578bst细胞的存活率并没有显著的变化,且细胞存活率都在80%以上。不同时间处理组(24、48、72h)的细胞存活率也都在80%以上,表明P-HAp颗粒对Hs 578bst细胞表现出极低的细胞毒性。

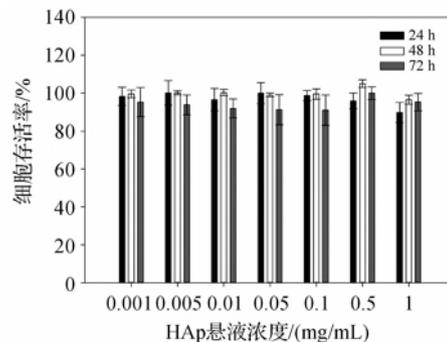


图7 P-HAp 生物相容性结果

2.7 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 对乳腺癌细胞的杀伤效应

图 8 为 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 复合物对乳腺癌细胞的杀伤效果图。从图 8 中可以观察到终浓度为 0.1 mg/mL 的 P-HAp 悬液对 MCF-7 细胞、MDA-MB-231 细胞和 Hs 578bst 细胞均表现出极低细胞毒性, 三种细胞的细胞存活率在培养 24、48、72 h 后也没有显著的变化, 且都在 80% 以上。P-HAp 颗粒携带 pEGFP-C1-lefty-1 质粒后对人乳腺癌细胞(MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞)具有较显著杀伤效果, 但对人乳腺上皮细胞(Hs 578bst 细胞)不表现杀伤作用。对于 MCF-7 细胞, 加入 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 复合物后, 在培养 24 h 和 72 h 后其细胞存活率分别为 65.3% 和 50.4%; 而对于 MDA-MB-231 细胞, 在培养 24 h 和 72 h 后细胞存活率分别为 72.9% 和 62.8%, 说明 P-HAp-pEGFP-C1-lefty-1 的杀伤作用随着时间的延长而增强, 且对 MCF-7 细胞具有更强的杀伤作用, 推测是 P-HAp-pEGFP-C1 对 MCF-7 细胞具有更高的转染效率的原因。Cavallar 等^[23]发现 lefty 蛋白能够有效促进人肝癌细胞(HepG2)的凋亡。Topczewska 等^[24]在研究 Nodal 信号和恶性黑色素瘤的发生关系时, 发现 lefty 蛋白能够降低黑色素瘤细胞的浸润性和集落形成。本实验研究首次证实了纳米 HAp 颗粒携带 lefty-1 基因对乳腺癌细胞的杀伤效果。

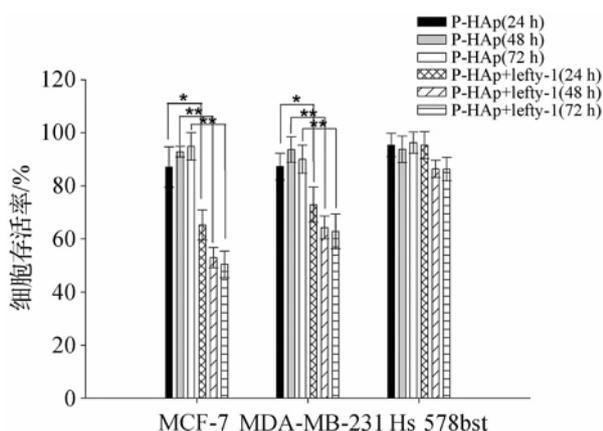


图 8 P-HAp-pEGFP-C1 对人乳腺癌细胞杀伤结果

3 结论

a) 以有机物 PEI 为模板调控合成了主要晶型为羟基磷灰石的纳米颗粒, 其形貌为长梭状, 长度为

300~400 nm, 中间宽度为 30~40 nm, 颗粒分散性好, 尺度均匀。

b) 合成的纳米 HAp 颗粒可有效吸附质粒 DNA, 在弱酸性 pH 条件下可实现对质粒 DNA 的持续释放, 具有一定的 pH 响应性。

c) 纳米 HAp 颗粒对人乳腺上皮细胞表现出极低的细胞毒性, 具有良好的生物相容性, 携带 pEGFP-C1-lefty-1 质粒后, 可成功转染人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231, 并在细胞内表达绿色荧光蛋白标记的 lefty-1 蛋白, 对人乳腺癌细胞的杀伤效率达到 40% 左右。本研究首次证明了人源 lefty-1 基因对人乳腺癌细胞的杀伤效应, 纳米 HAp 携带 lefty-1 基因用于乳腺癌治疗研究有望成为乳腺癌基因治疗的一个新方向。

参考文献:

- [1] HAHN B D, LEE J M, PARK D S, et al. Enhanced bioactivity and biocompatibility of nanostructured hydroxyapatite coating by hydrothermal annealing[J]. *Thin Solid Films*, 2011, 519(22): 8085-8090.
- [2] REN Y J, SUN X D, CUI F Z, et al. Preparation and characterization of Antheraea pernyi silk fibroin based nanohydroxyapatite composites[J]. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2007, 22(5): 465-474.
- [3] PAN M L, KONG X D, CAI Y R, et al. Hydroxyapatite coating on the titanium substrate modulated by a recombinant collagen-like protein[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2011, 126(3): 811-817.
- [4] GAO C, CAI Y R, KONG X D, et al. Development and characterization of injectable chitosan-based hydrogels containing dexamethasone/rhBMP-2 loaded hydroxyapatite nanoparticles [J]. *Materials Letters*, 2013, 93(1): 312-315.
- [5] XU S J, KONG X D, ZHAO R B, et al. New gene therapy vector nanohydroxyapatite [J]. *Material Sciences*, 2013, 3(1): 11-15.
- [6] 赵瑞波, 杨新燕, 韩华锋, 等. 基于纳米羟基磷灰石基因载体转染效率及靶向性的研究进展[J]. *材料导报*, 2014, 28(9): 124-128.

- [7] OLTON D, LI J H, WILSON M E, et al. Nanostructured calcium phosphates (nanocaps) for nonviral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(6): 1267-1279.
- [8] NADRA I, BOCCACCINI A R, PHILIPPIDIS P, et al. Effect of particle size on hydroxyapatite crystal-induced tumor necrosis factor alpha secretion by macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 196(1): 98-105.
- [9] WANG J W, CHEN C Y, KUO Y M. Preparation and characterization of chitosan-coated hydroxyapatite nanoparticles as a promising nonviral vector for gene delivery[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2011, 121(6): 3531-3540.
- [10] CHEN L, MCCRATE J M, LEE J C, et al. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells[J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(10): 105-114.
- [11] GAO H J, SHI W D, FREUND L B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(27): 9469-9474.
- [12] WU X W, DING D L, JIANG H Y, et al. Transfection using hydroxyapatite nanoparticles in the inner ear via an intact round window membrane in chinchilla[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, 14(1): 1-13.
- [13] ZHAO R B, YANG X Y, CHEN C, et al. The anti-tumor effect of p53 gene-loaded hydroxyapatite nanoparticles in vitro and in vivo [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2014, 16(4): 1-15.
- [14] MURANKAMI Y, SUGO K, HIRANO M, et al. Surface chemical analysis and chromatographic characterization of polyethylenimine-coated hydroxyapatite with various amount of polyethylenimine[J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1298-1303.
- [15] PENG J, ZOU F, LIU L, et al. Preparation and characterization of PEG-PEI/Fe₃O₄ nano-magnetic fluid by co-precipitation method [J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2008, 18(2): 393-398.
- [16] DESANTIS C, MA J M, BRYAN L, et al. Breast cancer statistics, 2013[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2014, 64(1): 52-62.
- [17] FAN L, WEIPPL K S, LI J J, et al. Breast cancer in China[J]. *The Lancet Oncology*, 2014, 15(7): e279-e289.
- [18] STRIZZI L, HARDY K M, MARGARAN N V, et al. Potential for the embryonic morphogen nodal as a prognostic and predictive biomarker in breast cancer [J]. *Breast Cancer Research*, 2012, 14(3): 75-86.
- [19] KIRSAMMER G, STRIZZI L, MARGARYAN N V, et al. Nodal signaling promotes a tumorigenic phenotype in human breast cancer[C]// *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 2014, 29: 40-50.
- [20] CONSTAN D B, ROBERTSON E J. Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/spcl during embryonic turning and heart looping [J]. *Development*, 2000, 127(2): 245-254.
- [21] HAMADA H. In search of turing in vivo: understanding nodal and lefty behavior [J]. *Developmental Cell*, 2012, 22(5): 911-912.
- [22] SAKUMA R, OHSNISHI Y I, MENO C, et al. Inhibition of nodal signalling by lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion[J]. *Genes to Cells*, 2002, 7(4): 401-412.
- [23] CAVALLARI C, FONSATO V, HERRERA M B, et al. Role of lefty in the anti tumor activity of human adult liver stem cells[J]. *Oncogene*, 2013, 32(7): 819-826.
- [24] TOPCZEWSKA J M, POSTOVIT L M, MARGARYAN N V, et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via nodal signaling: role in melanoma aggressiveness[J]. *Nature Medicine*, 2006, 12(8): 925-932.

Killing Effect of Nano-hydroxyapatite Loading Lefty-1 Gene on Human Breast Carcinoma Cells

ZHONG Yunping^a, YAO Chenxue^a, SONG Guolong^a, LAI Wen^b, CHEN Cen^a, XIE Chungang^a, KONG Xiangdong^a

(a. College of Life Sciences; b. College of Materials and Textile,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In this study, the co-precipitation method had been used to synthesize a long spindle nano-hydroxyapatite by using polyethylenimine (PEI) as a regulating agent, calcium chloride and sodium hydrogen phosphate as raw materials. The material properties were characterized by using field emission scanning electron microscope (FE-SEM), X-ray powder diffraction pattern (XRD), infrared absorption spectrum (FT-IR) and thermogravimetric analysis (TGA). As indicated in the degradation experiment in vitro, HAP particles is degradable, can be degraded more easily in acidic conditions and has pH-responsiveness. The result of in vitro load curve and gene release curve of particles and plasmid DNA shows that the long spindle HAP particles can more effectively load and continuously release plasmid DNA. The results of in vitro transfection experiment indicate that green fluorescent protein was successfully expressed in cells after particles loading pEGFP-C1-lefty-1 plasmid. According to the MTT result, the prepared HAP particles show an extremely low cytotoxicity to mammary epithelial cells and a good biocompatibility. After pEGFP-C1-lefty-1 plasmid is loaded, the HAP particles has a good killing effect on human breast carcinoma cells.

Key words: hydroxyapatite; lefty-1; human breast carcinoma cell; killing effects; polyethylenimine

(责任编辑: 许惠儿)