

纳米明胶硅氧烷的制备及其负载 *p53* 基因 对肝癌抑制效果

郑妮诗^a,孙艺钦^a,赵雪芹^a,陈 岑^a,孔祥东^b,解纯刚^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:采用溶胶-凝胶法制备明胶硅氧烷纳米颗粒(GS NPs),分析反应中的不同 pH 值盐酸溶液对 GS NPs 的影响,并通过粒径、电位和形貌对 GS NPs 进行表征。结果表明:pH 值 3.0 盐酸溶液为制备的最佳条件,制备的 GS NPs 呈无规则球状,分散性较好,平均粒径为 250 nm 左右且分布集中,表面 Zeta 电位为 38 mV。为评估其作为基因载体的可行性及负载 *p53* 基因对肝癌的抑制效果,采用凝胶电泳实验检测 GS NPs 对 pDNA 的负载率和释放性,CCK-8 法检测其生物相容性和激光共聚焦观察细胞内摄取情况以及 MTT 法、Western blot 综合评价其携带 pEGFP-C1-*p53* 对肝癌细胞的抑制效果,结果显示:GS NPs 可有效负载 pDNA 且最适负载量比为 200:1,在盐溶液下表现出一定的释放性;此外 GS NPs 具有良好的生物相容性,可携带 pDNA 逃逸出溶酶体的吞噬,携带 pEGFP-C1-*p53* 后对肝癌细胞 Hep-3b 表现出显著的抑制效果,并介导 GFP-*p53* 融合蛋白的表达。研究结果表明所制备的 GS NPs 可作为一种基因载体,负载 *p53* 基因对肝癌细胞具有一定的抑制效果。

关键词:明胶硅氧烷;肝癌;*p53*;抑制作用

中图分类号: Q279

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2018)09-0605-08

0 引 言

原发性肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是一种高度恶性肿瘤,是世界上第五大常见癌症,也是世界上癌症死亡率较高的主要疾病之一^[1],在发展中国家,HCC 发生率超过 80%并在男性发病率中居第二位^[2]。目前,治疗肝癌有许多方法,包括手术切除、化疗、局部消融和肝移植,但大多患者发现时已发展成为晚期不适合手术,且这些方法也存在显著的毒性和高复发风险^[3-5]。目前在大多数国家中仍缺乏有效的治疗方法,HCC 的死亡率几乎等于发病率^[6]。因此,开发一种在提高肝癌患者预后能力和尽量减少与治疗相关的毒性的治疗方法是非常迫切的。

基因治疗作为一种新兴的治疗方法,是依赖某种载体递送核酸如质粒 DNA、siRNA 和 miRNA 等进入患者细胞从而达到治疗目的^[7],现已被广泛认

为是治疗许多疾病的有效方法,如心血管^[8]、遗传性疾病^[9]、神经性疾病^[10]、恶性肿瘤^[11]以及多基因诱导疾病如血友病^[12]和肌肉萎缩症^[13]等。迄今为止,近 2600 个基因治疗临床试验已经完成并在全球获得批准^[14]。近年来,随着分子生物学的快速发展以及人类基因组工程的完成,人类疾病 DNA 基因组学的深入研究,通过基因治疗手段来治愈疾病的新模式策略也越来越为人所接受,但选择一种高效、安全的基因载体和治疗基因仍然是成功基因治疗的巨大挑战。

p53 蛋白作为肿瘤抑制因子可参与多种细胞反应,在调节细胞周期阻滞、细胞凋亡、DNA 修复、自噬、代谢、mRNA 翻译和反馈机制等方面起着重要作用^[15]。*p53* 基因的突变在肿瘤的发生发展中起着重要作用,超过 50%的癌症(包括 HCC)是由 *p53* 基因突变引起的^[16]。用腺病毒作为基因载体重新引入野生型 *p53* 基因已经达到临床水平,其中也包

收稿日期:2018-04-28 网络出版日期:2018-07-02

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY18C100002)

作者简介:郑妮诗(1991-),女,浙江台州人,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

括对 HCC 的治疗^[17-18]。脂质体^[15]和阳离子聚合物^[19]的非病毒载体也越来越多地被用于 *p53* 基因传递治疗 HCC, 引入野生型 *p53* 诱导肿瘤细胞发生凋亡而成为癌症基因治疗的一种新手段。

明胶硅氧烷纳米颗粒(Gelatin siloxane nanoparticles, GS NPs)具有低毒性、可降解性、表面易吸附、易修饰性以及易重复合成等优点, 作为生物材料已被广泛用于骨组织工程^[20]、脑疾病治疗^[21-22]和基因药物载体^[23-24]等研究。由于 GS NPs 表面带有大量的正电荷, 可作为一种潜在的基因载体材料, 介导目的基因进入细胞并表达, 但对于 GS NPs 负载治疗基因对癌细胞的效果却鲜有报道。本文采用溶胶-凝胶法探究不同的 pH 值盐酸溶液对纳米明胶硅氧烷制备的影响及其作为基因载体负载 *p53* 基因对肝癌细胞的抑制效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

a) 材料: pEGFP-C1-*p53* (*p53*) 质粒为本实验室所保存, 明胶(100 g, 美国 BBI 公司), GPSM(3-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷, 分析纯, 美国 ACROS ORGANICS 公司)、APTMS((3-氨丙基)三甲氧基硅烷, 分析纯, 美国 ACROS ORGANICS 公司), FITC(异硫氰酸荧光素, 10 mg, 美国 Sigma 公司), CCK-8 试剂盒、MTT 粉末、PI(碘化丙啶)粉末、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(均购自上海碧云天公司), LysoTracker Blue DND-22、BCA 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司), *p53* 抗体(0.1 mL, 美国 Novus 公司), β -actin 抗体(0.1 mL, 美国 Affinity 公司), 鼠二抗、ECL 试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司)。

b) 仪器: 场发射扫描电镜(ZEISS-ULTRA55, 日本 Hitachi 公司), 动态光散射仪(LB-550 V, 英国 Malvern 公司), 数显控温磁力搅拌器(78HW-3, 杭州仪表电机有限公司), 凝胶成像仪(GGM/D2, GeneGenius 公司), 酶标仪(ELx 800, BioTek 公司), 激光共聚焦显微镜(LSM710 3-channel, 德国 Zeiss 公司)。

1.2 不同 pH 值条件下纳米明胶硅氧烷的制备及表征

首先分别向 20.0 mL 的 pH 值 2.0、3.0、4.0 和 5.0 盐酸溶液中加入 0.15 g 的明胶, 40 °C 下加热溶解, 配成明胶溶液为 0.75%。再向明胶溶液中分别加入 0.20 g GPSM(185 μ L), 于 60 °C, 500 r/min

的磁力恒温搅拌器上搅拌 30 min。然后向反应体系中加入 0.08 g APTMS(75 μ L), 于 60 °C 下继续搅拌 8~10 h。最后停止搅拌, 以 14000 r/min, 20 °C 离心 20 min, 获取白色沉淀, 超声分散水洗三遍后, 以 10.0 mL 的 ddH₂O 超声波重新悬浮, 即得到约 4 mg/mL GS NPs 悬浮液。

用场发射扫描电镜(FE-SEM)对颗粒形貌进行观察, 动态光散射仪(DLS)分析其粒径和表面 Zeta 电位。

1.3 纳米明胶硅氧烷对 *p53* 基因的封装性

选取 pH 值 3.0 盐酸溶液为反应基础, 新鲜制备好的 GS NPs 重悬超声分散, 浓度为 4 mg/mL, 分别与 pEGFP-C1-*p53* 以 10 : 1、30 : 1、50 : 1、100 : 1、150 : 1 和 200 : 1 的质量比均匀混合, 用 ddH₂O 补齐体系, 涡旋 15 s, 室温孵育静置 60 min, 即得到 GS-*p53* 纳米复合物。采用琼脂糖凝胶电泳法检测 GS-*p53* 复合物中是否有 pDNA 溢出, 评价纳米颗粒对 *p53* 的封装效率。

1.4 纳米复合物 GS-*p53* 的粒径和表面 Zeta 电位分析

取新鲜制备的 GS-*p53* 纳米复合物悬液, 用 ddH₂O 稀释后加入 1.2 mL 至样品池中, 置于动态光散射仪上测定其粒径和 Zeta 电位。

1.5 对 *p53* 基因的释放性

按 1.3 中方法制备复合物悬液(质量比为 200 : 1), 分成 3 等份, 离心分离(14 000 r/min, 20 °C, 20 min)后, 弃上清液, 分别超声重悬于相同体积的 50、150 mmol/L 和 300 mmol/L 的 NaCl 溶液中, 并均置于 200 r/min, 37 °C 的摇床中振荡 30、60 min 和 120 min 后, 每组取出等体积的复合物悬浮液离心分离, 进行凝胶电泳检测上清液中是否有 *p53* 溢出。

1.6 纳米明胶硅氧烷的生物相容性

本文采用 CCK-8 试剂盒检测 GS NPs 对肝细胞的毒性。纳米颗粒的无菌处理: 将新鲜制备的 GS NPs, 14 000 r/min, 20 °C, 离心 20 min 后弃上清, 75%酒精超声重悬至相同浓度, 消毒 30 min 后, 离心分离(14 000 r/min, 20 °C, 20 min), 用无菌水水洗三次, 超声分散到无血清培养基中, 得到 1 mg/mL 的使用液, 使用时根据实验浓度要求稀释。

取对数生长期的人肝正常细胞 L-02 以每孔 100 μ L, 细胞密度为 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 并放置于 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁生长良好后更换为含有不同浓度(0、0.1、

0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)GS NPs 的无血清培养基,其中每个浓度设 5 个复孔。分别共培养 24、48 h 和 72 h 后,吸除旧培养液并用 PBS 洗两次,加入 100 μ L 新鲜培养基。避光加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 1~2 h 后,酶标仪测定波长在 450 nm 处的各孔吸光值(OD 值),并根据式(1)计算细胞存活率:

$$X/\% = \frac{OD_2 - OD_0}{OD_1 - OD_0} \times 100 \quad (1)$$

其中: X 为细胞存活率; OD_2 为实验组的 OD 值; OD_1 为对照组的 OD 值; OD_0 为 Blank 组的 OD 值。

1.7 GS-p53 细胞内摄取情况

荧光标记的纳米颗粒(FITC-GS NPs)的制备:取新鲜制备的 GS NPs 重悬于 pH 值 8.0 的磷酸缓冲液中配成 2~5 mg/mL 的浓度。以 GS NPs/FITC 的比例为 300:1 加入 FITC 溶液,避光室温振荡反应 1~2 h。14,000 r/min,20 $^{\circ}$ C 离心 20 min 后,弃上清,ddH₂O 超声洗涤三次,得到 FITC-GS NPs。荧光标记的 FITC-GS/p53-PI 纳米复合物的制备:先将 p53 用 PI 进行标记,将质粒 p53 与 PI 以 1:1 比例混匀,室温避光孵育 20 min 后,即得到 PI-p53 质粒。然后将 FITC-GS NPs 与 PI-p53 质粒按 1.3 中的方法混合后离心弃上清(质量比为 200:1),即得到 FITC-GS/p53-PI 纳米复合物。激光共聚焦样品制备:取 1.0 mL 对数生长期、 5×10^4 个/mL 的 Hep-3b 细胞接种于 35 mm 玻底培养皿(共聚焦专用培养皿)中,待细胞贴壁生长良好后,PBS 洗涤两次,更换为 900 μ L 无血清 DMEM 培养基,避光加入 100 μ L 新鲜制备、2 mg/mL 的 FITC-GS/p53-PI 纳米复合物悬液,分别共培养 6 h 和 24 h。吸去旧培养液,PBS 清洗两次。更换为 1.0 mL 新鲜 DMEM 培养基,加入 50 μ L 1 μ mol/L LysoTracker Blue(标记溶酶体)染色液继续孵育 2 h。去除旧培养基,PBS 洗涤三次,每次清洗 3~5 min。加入 1.0 mL 4%多聚甲醛室温固定 15 min。去除固定液,PBS 洗涤三次。于玻底滴加一滴抗荧光淬灭封片剂,4 $^{\circ}$ C 黑暗环境下短时间保存。所有操作均需避光。激光共聚焦显微镜下观察:绿色代表 GS NPs,红色代表 p53 质粒,蓝色代表溶酶体细胞器。

1.8 GS-p53 对肝癌细胞的抑制效果

本文采用 MTT 法检测 GS-p53 处理后,肝癌细胞的存活率情况。取生长状态良好的肝癌细胞 Hep-3b 消化计数后调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,培养 24 h 后,弃掉旧培

液,加入不同处理组的无血清培养液:裸 p53、GS NPs、GS-p53(每孔纳米颗粒的终浓度为 600 μ g/mL, p53 浓度 3 μ g/mL),继续共培养 24、48 h 后,PBS 清洗两次,更换新鲜培养液,每孔加入 20 μ L 浓度为 5 mg/mL MTT 溶液,培养箱内继续孵育 4 h 后,小心吸除每孔内培养基,加入 150 μ L DMSO,轻微振荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 处的吸光值。计算细胞存活率。

1.9 Western blot 检测 p53 蛋白表达水平

GFP-p53 融合蛋白的收集:取对数生长期 Hep-3b 细胞以每孔 2.0 mL 培养基和 2×10^5 个细胞接种于六孔培养板,待细胞贴壁良好后,更换为无血清 DMEM 培养基,分别加入等量的 p53 和 GS-p53(纳米颗粒终浓度为 1 mg/mL),于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中共培养 48 h 后,弃尽旧培养液并用 PBS 清洗两次,每孔加入 100 μ L RIPA 裂解液,冰上充分裂解 30 min 后收集并加入 $6 \times$ loading buffer 于 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min,用于 SDS-PAGE 电泳或 -20 $^{\circ}$ C 短期保存。

SDS-PAGE 电泳:本文采用 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,按试剂盒操作说明配制 SDS-PAGE。每孔加入 50 μ g 蛋白样品,Marker 5 μ L,于 80 V 电压下电泳至浓缩胶分离胶分界处时,加大电压至 120 V,电泳约 1.5 h。转膜:电泳结束后以负胶正膜(负极-海绵-滤纸-凝胶-PVDF 膜(甲醇活化 20 s,正面朝下)-滤纸-海绵-正极)的顺序组装好并置入电转槽中,加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的转膜缓冲液,于冰上转膜,电压 100 V,时间 90 min。封闭:转膜结束后,TBST 清洗三次,每次 5 min,置于 5% 脱脂奶粉封闭液中,119 r/min 室温封闭 2 h。抗体孵育并显影:弃掉封闭液,加入 10.0 mL 一抗溶液(p53 抗体以 1:1000 比例稀释,内参 β -actin 以 1:3000 比例稀释),119 r/min 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 清洗四次,每次 15 min,加入鼠二抗溶液(以 1:5000 比例稀释),119 r/min 室温孵育 2 h。TBST 清洗四次后置于超灵敏化学发光成像仪中曝光检测。

2 实验结果与分析

2.1 不同 pH 值条件下的 GS NPs 制备

为了探究溶胶-凝胶法制备 GS NPs 过程中盐酸溶液 pH 值的影响,本实验以不同 pH 值盐酸溶液为反应基础,分别研究 pH 值 2.0、3.0、4.0 和 5.0 盐酸溶液条件对 GS NPs 粒径、表面 Zeta 电位和形貌的影响,结果如表 1 和图 1 所示。表 1 结果显示:

pH 值 2.0 盐酸溶液中,反应难以形成乳白色悬浊液即 GS NPs;当在 pH 值为 3.0、4.0 和 5.0 盐酸溶液中,反应 8~10 h 均可得到乳白色悬浊液,因此采用溶胶-凝胶法合成 GS NPs 过程中,必须在 pH 值大于 2.0 的弱酸环境中进行,GPMS 中环氧基团才能和明胶的氨基反应以形成明胶-GPMS 化合物。随着 pH 值的增大,纳米颗粒的平均粒径由 255 nm 增大到 316 nm,分散性系数由 0.21 增大到 0.31,粒径分布如图 1 所示;pH 值越小,粒径分布越均匀,pH 值 3.0 和 4.0 盐酸条件下主要分布在 200~400 nm,pH 值 5.0 时分布较宽;Zeta 电位并未因粒径分布发生较大变化,稳定在 37~40 mV(表 1)。以上结果表明,当其他反应条件不变时,盐酸溶液的酸性越弱,制备的 GS NPs 平均粒径越大,分布越宽,而对表面组成无较大影响,仍带正电荷。

表 1 不同 pH 值体系下 GS NPs 的粒径、Zeta 电位和分散性系数

pH 值	粒径大小/nm	Zeta 电位/mV	分散性系数
2.0	—	—	—
3.0	255.4±4.7	39.6±0.9	0.21
4.0	269.1±3.4	38.9±0.3	0.25
5.0	316.5±2.4	37.6±0.7	0.31

注:pH 值 2.0 盐酸溶液下,未形成乳白色悬浊液即 GS NPs。

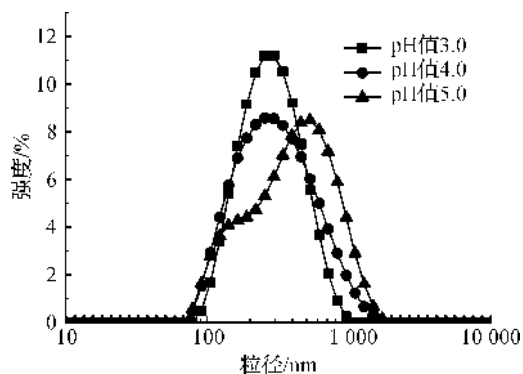


图 1 不同 pH 值盐酸溶液下 GS NPs 的粒径分布

图 2 为不同 pH 值盐酸溶液下 GS NPs 的场发射扫描电镜图。图 2(a)~(c)显示,pH 值大于 2.0 盐酸环境下制备的 GS NPs 呈不规则的球形形貌,分散性较好,存在一种粒径均一约 50~100 nm 的小颗粒。pH 值越大,纳米颗粒粒径越大,盐酸溶液 pH 值 5.0 时形成的粒径约 300 nm 以上明显比 pH 值 3.0 时大,pH 值 3.0 和 pH 值 4.0 时形成的 GS NPs 粒径较均一,约 250~300 nm 间,且 pH 值 3.0 下形成的较小颗粒相对于 pH 值 4.0 较多,可能导致 pH 值 3.0 平均粒径相对较小。与粒径 DLS 结果综合分析,pH 值 3.0 盐酸溶液下制备的 GS NPs 分散性较好,平均粒径较小,粒径分布集中,表面带有一定的正电位。

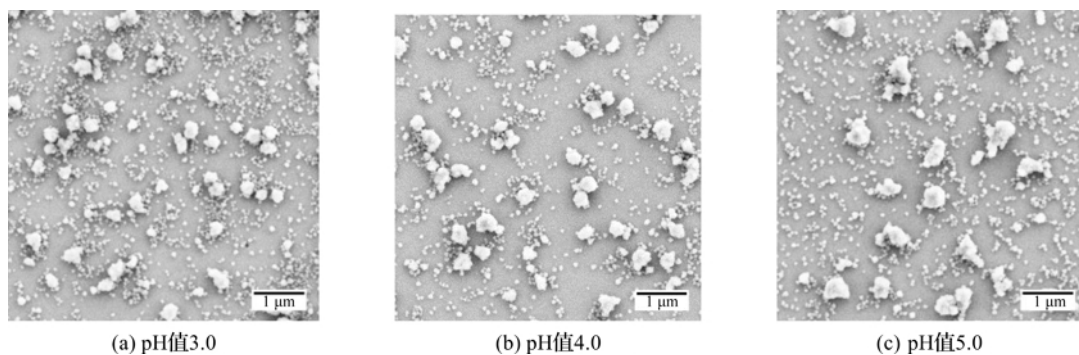


图 2 不同 pH 值盐酸溶液下 GS NPs 的 FE-SEM 图

2.2 纳米明胶硅氧烷对 p53 基因的封装性

为了定性分析 GS NPs 对 pEGFP-C1-p53 的包裹能力,对纳米复合物进行凝胶电泳检测,结果如图 3 所示,随着质量比的逐渐增大,条带亮度逐渐减弱,点样孔的亮度逐渐增强,表明游离的 p53 逐渐减少,而在点样孔中滞留的 p53 逐渐增多,说明纳米颗粒的包裹能力随着其含量的增加而增强。其中 GS NPs 在质量比为 30 : 1 时,未出现明显条带,表明 GS NPs 以 30 : 1 的质量比能很好地包裹住 p53。

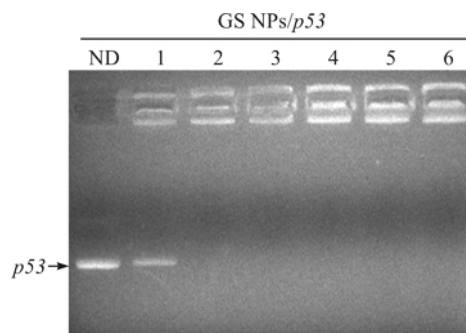


图 3 GS NPs 对 pEGFP-C1-p53 的封装性检测

注:泳道 ND 为裸 p53;泳道 1~6 分别为 GS NPs/p53 质量比为 10 : 1、30 : 1、50 : 1、100 : 1、150 : 1、200 : 1。

2.3 GS-*p53* 的粒径和表面 Zeta 电位

对于非病毒基因载体来说,其粒径和表面电位是影响细胞内化效率和进入细胞方式的重要影响因素^[25]。通过对 GS-*p53* 纳米复合物的粒径和表面电位分析,分析其最适进入细胞的质量比复合,结果如图 4 所示。图 4 表明:GS NPs 与 *p53* 复合后,表面电位呈现明显的下降,其原因是纳米颗粒负载 *p53* 质粒是通过正负电荷静电吸附作用使 pDNA 结合到纳米颗粒表面,屏蔽纳米颗粒表面的正电荷,导致了其表面电位的下降。GS NPs 粒径明显呈现先增后降的趋势,当复合物表面电位为 0 左右,粒径达到微米以上,说明复合物呈现明显的团聚现象,此时质量比 30 : 1,结合图 3 中的 GS NPs 的封装性,推测其原因可能是当质量比为 30 : 1 时,GS NPs 刚好能最大比包裹住质粒 *p53*,从而导致复合物呈电中性,复合物间的同种电荷排斥力减弱,而呈现明显的团聚。由图 4 还可知,随着纳米颗粒质量比的增加,复合物表面电位大体呈现逐渐增大趋势,最后趋于稳定,这表明随着纳米粒子的增多,其吸附能力越强,当达到一定包裹比例后,pDNA 含量不会显著影响其表面电位。而当复合物表面电位稳定于 30 mV 左右时,其粒径仍有一定程度的增大,但总体小于 400 nm,表明粒径的增大主要是由于 pDNA 结合到纳米颗粒表面引起的。纳米颗粒进入细胞主要是由于表面正电荷与细胞膜表面带负电荷分子的静电相互作用而使其与膜结合,因此对于纳米颗粒复合物来说,维持一定的正电荷是很有必要的,且在纳米颗粒与 *p53* 质量比为 200 : 1 的条件下 GS-*p53* 具有较小的粒径和一定的正电位,因此在后续研究中,GS NPs 按此质量比条件包裹 *p53* 质粒,作为纳米复合物。

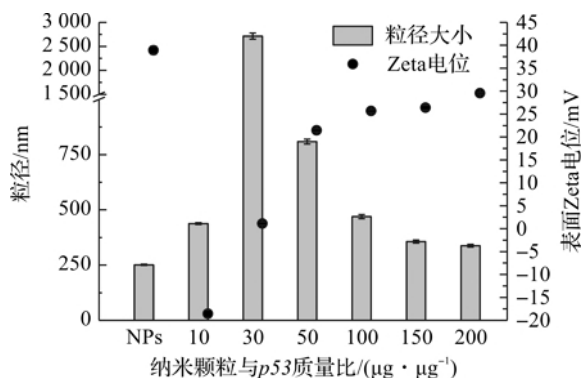


图 4 以不同质量比复合的 GS-*p53* 纳米复合物粒径和表面电位分析

2.4 GS-*p53* 体外对 *p53* 基因的释放性

图 5 为 GS-*p53* 纳米复合物在 50、150 mmol/L 和 300 mmol/L NaCl 溶液中体外对 *p53* 基因的释

放性。图 5 显示:120 min 时,随着 NaCl 浓度的增加,*p53* 电泳带的亮度逐渐增加,表明 *p53* 释放量的增加。纳米复合物在 300 mmol/L 的 NaCl 溶液中有明显的 *p53* 电泳带,且随着振荡时间的延长,条带亮度增加,表明对 *p53* 的释放作用增强。其原因可能是盐溶液环境中,纳米颗粒对 *p53* 的静电作用被盐离子竞争性破坏,因此随着盐浓度的增加和时间的延长,离子竞争效应增强,从而导致 *p53* 释放增大。

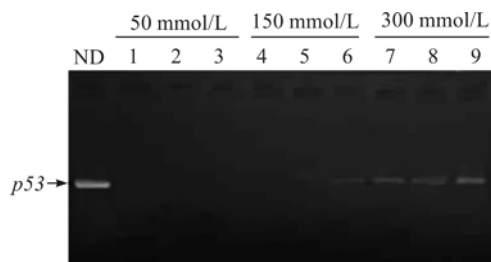


图 5 GS-*p53* 对 *p53* 的释放性

注:泳道 ND 为裸 *p53*;泳道 1—9 分别代表 GS-*p53* 纳米复合物在 50 mmol/L NaCl 溶液中 37 °C 恒温振荡 30、60 min 和 120 min(泳道 1、2、3),150 mmol/L NaCl 溶液中 37 °C 振荡 30、60 min 和 120 min(泳道 4、5、6),300 mmol/L NaCl 溶液中 37 °C 振荡 30、60 min 和 120 min(泳道 7、8、9)。

2.5 纳米明胶硅氧烷的生物相容性

为了进一步研究纳米明胶硅氧烷作为基因载体的可行性,对其生物相容性进行检测,图 6 为 GS NPs 在 0.1~1.0 mg/mL 范围内,不同处理时间对肝正常细胞 L-02 的细胞毒性结果。图 6 显示:GS NPs 对肝细胞的毒性随浓度的增加和处理时间的延长,细胞生长受抑制比较明显,表现出轻微的细胞毒性,当浓度小于 0.6 mg/mL 时,其细胞存活率仍达到 80% 以上,总体而言,所制备的 GS NPs 具有良好的生物相容性,具备一个基因载体所必需的生物安全性,为其后续抑癌效果研究奠定基础。

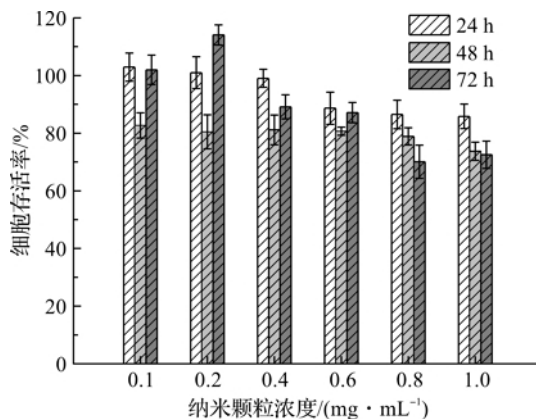


图 6 GS NPs 的生物相容性

2.6 GS-p53 细胞内摄取研究

为探究纳米明胶硅氧烷作为基因载体携带 pDNA 进入细胞后在胞内的摄取情况,本文通过 FITC 标记 GS NPs, PI 标记 p53, 共培养 6 h 和 24 h 后,对溶酶体进行染色,激光共聚焦观察,结果如图 7 所示。由图 7 可知,当共培养 6 h 时,GS-p53 荧光点基本与溶酶体荧光点重叠,表明 GS NPs 携

载 p53 进入细胞后首先被溶酶体所吞噬。24 h 后,有少量荧光点(见图 7 中的 Merge 图)单独存在,表明随着共培养时间的延长,少部分 GS NPs 携带 p53 开始逃逸出溶酶体的吞噬进入细胞质及细胞核中。以上结果表明 GS NPs 作为基因载体进入细胞后对溶酶体的逃逸情况存在一定的时间依赖性。

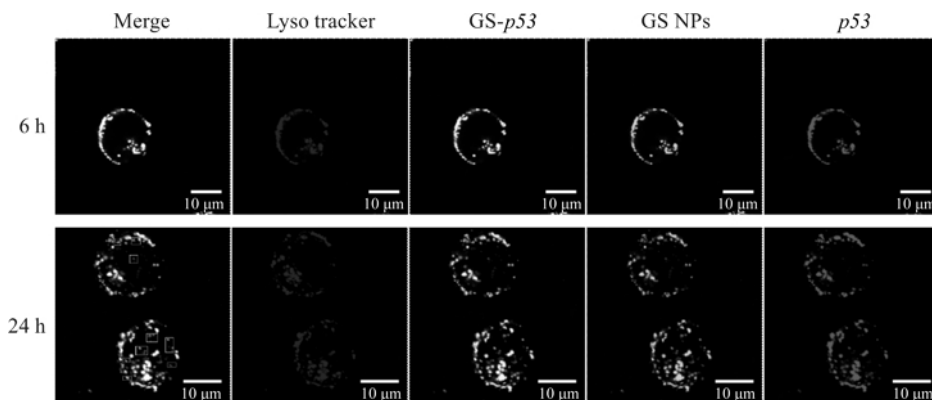


图 7 激光共聚焦显微镜观察 GS-p53 进入 Hep-3b 细胞后细胞内摄取情况

2.7 GS-p53 对肝癌细胞的抑制效果

图 8 为纳米颗粒终浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ (p53 终浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$) 的不同处理组对肝癌细胞 Hep-3b 分别处理 24 h 和 48 h 的抑制效果。从图 8 中可以看出 GS NPs 对肝癌细胞具有较好的生物相容性,其细胞存活率达到 80% 以上。GS NPs 携带 p53 后对肝癌细胞 Hep-3b 具有较显著的抑制效果;相对于裸 p53 质粒,GS-p53 表现出极显著的抑制作用,具有统计学意义。在培养 24 h 和 48 h 后,加入 GS-p53 纳米复合物组细胞存活率分别为 69.7% 和 63.3%,说明随着处理时间的延长,肝癌细胞的存活率有所降低,在 48 h 时表现出更强的抑制作用。推测可能是随着时间的延长,更多的 GS NPs 携带 p53 逃逸出溶酶体的吞噬,从而进行下一步转染的原因。

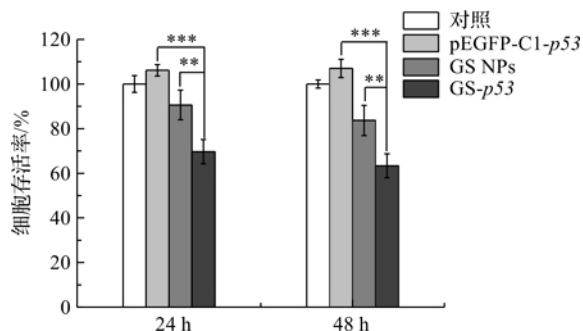


图 8 GS-p53 对肝癌细胞 Hep-3b 的抑制效果

注:**表示 $p < 0.01$,对 GS 组和 GS-p53 组进行统计学分析;***表示 $p < 0.001$,对 pEGFP-C1-p53 组和 GS-p53 组进行统计学分析。

2.8 Western blot 检测 p53 蛋白的表达水平

本文以 β -actin 蛋白为内参蛋白,用 Western blot 检测 GFP-p53 融合蛋白的表达情况,结果如图 9 所示,由图 9 可知,内参 β -actin 蛋白表达水平基本一致,而 GFP-p53 呈现不同的表达,说明在上样量相同的情况下,对于肝癌细胞 Hep-3b,裸 p53 没有融合蛋白的表达,而在有载体 GS NPs 的介导下, Hep-3b 细胞内能成功表达融合蛋白。因此,GS NPs 作为一种基因载体可成功携带 p53 进入肝癌细胞 Hep-3b 转染并使 GFP-p53 融合蛋白表达,从而促进肝癌细胞凋亡,达到一定的抑制效果。

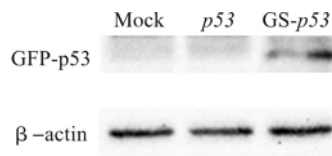


图 9 Hep-3b 细胞 p53 蛋白表达检测

3 结论

本文采用溶胶-凝胶法制备纳米明胶硅氧烷,探讨反应中不同 pH 值盐酸溶液的影响,并对其表征分析;通过凝胶电泳实验检测其对 pDNA 的负载率及释放性;CCK-8 法检测其生物相容性;激光共聚焦观察纳米复合物进入细胞后在胞内的摄取情况;MTT 法和 Western blot 实验综合评估其负载 p53 基因对肝癌细胞的抑制效果。主要结论如下:

a) 采用溶胶-凝胶法制备 GS NPs 过程中,必须是在 pH 值大于 2.0 的弱酸环境下,反应才能进行从而合成 GS NPs;随着 pH 值的增大,纳米颗粒的平均粒径由 255 nm 增大到 316 nm,粒径分布变宽,但其形貌不会产生较大影响,仍呈无规则球状颗粒,分散性较好,且表面带有一定的正电荷。GS NPs 是以 pH 值 3.0 的盐酸溶液为反应基础条件下获得,其粒径约 250 nm 左右、表面 Zeta 电位 38 mV。

b) GS NPs 在 30 : 1 时可有效负载 *p53*,但作为基因载体其在 200 : 1 的质量比时合成的纳米复合物 GS-*p53* 粒径较小,表面带有一定的正电位,最适合细胞膜的胞吞作用。此外,GS NPs 在盐溶液条件下可实现对 *p53* 的释放。

c) GS NPs 对人正常肝细胞 L-02 的毒性较低,具有良好的生物相容性。携带 *p53* 进入细胞后少部分纳米复合物可逃逸出溶酶体的吞噬,从而进行转染使 GFP-*p53* 融合蛋白在肝癌细胞 Hep-3b 内成功表达,促进肝癌细胞的凋亡,对肝癌细胞具有显著的抑制效果。

参考文献:

- [1] Terry K, Copur M S. Molecular targeted therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Cancer Therapy, 2013,4(2):426-439.
- [2] Yang J D, Roberts L R. Hepatocellular carcinoma: A global view[J]. Nature Reviews Gastroenterol Hepatol, 2010,7(8):448-458.
- [3] Bruix J, Gores G J, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: Clinical frontiers and perspectives[J]. Gut, 2014,63(5):844-855.
- [4] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update[J]. Hepatology, 2011,53(3):1020-1022.
- [5] Chen K, Man K, Metselaar H J, et al. Rationale of personalized immunosuppressive medication for hepatocellular carcinoma patients after liver transplantation[J]. Liver Transpl, 2014,20(3):261-269.
- [6] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet[J]. Lancet, 2012,379(9822):1245-1255.
- [7] Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy[J]. Gene, 2013,525(2):162-169.
- [8] Wolfram J A, Donahue J K. Gene therapy to treat cardiovascular disease [J]. Journal of the American Heart Association, 2013,2(4):e000119.
- [9] Mingozzi F, High K A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges[J]. Nature Reviews Genetics, 2011,12(5):341-355.
- [10] Whiting R E H, Jensen C A, Pearce J W, et al. Intracerebroventricular gene therapy that delays neurological disease progression is associated with selective preservation of retinal ganglion cells in a canine model of CLN2 disease[J]. Experimental Eye Research, 2016,146:276-282.
- [11] Harris A L, Fox S, Bicknell R, et al. Gene therapy through signal transduction pathways and angiogenic growth factors as therapeutic targets in breast cancer [J]. Cancer, 2015,74(S3):1021-1025.
- [12] Nathwani A C, Reiss U M, Tuddenham E G D, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B[J]. New England Journal of Medicine, 2014,371(21):1994-2004.
- [13] Mendell J R, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, et al. Gene therapy for muscular dystrophy: Lessons learned and path forward[J]. Neuroscience Letters, 2012,527(2):90-99.
- [14] Ginn S L, Amaya A K, Alexander I E, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update [J]. Journal of Gene Medicine, 2018:e3015.
- [15] Fischer M. Census and evaluation of *p53* target genes [J]. Oncogene, 2017,36(28):3943-3956.
- [16] Ventura A, Kirsch D G, McLaughlin M E, et al. Restoration of *p53* function leads to tumour regression in vivo[J]. Nature, 2007,445(7128):661-665.
- [17] Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-*p53* agent for treatment of cancers [J]. Human Gene Therapy, 2005,16(9):1016-1027.
- [18] Chen S, Chen J, Ma G, et al. Clinical therapeutic effect and biological monitoring of *p53* gene in advanced hepatocellular carcinoma[J]. American Journal of Clinical Oncology, 2014,37(1):24-29.
- [19] Xu Q, Leong J, Chua Q Y, et al. Combined modality doxorubicin-based chemotherapy and chitosan-mediated *p53* gene therapy using double-walled microspheres for treatment of human hepatocellular carcinoma[J]. Biomaterials, 2013,34(21):5149-5162.
- [20] Dashnyam K, Perez R A, Singh R K, et al. Hybrid magnetic scaffolds of gelatin-siloxane incorporated with magnetite nanoparticles effective for bone tissue engineering[J]. Rsc Advances, 2014,4(77):40841-40851.
- [21] 张龙,胡洋,林晓宁,等. Tat-TTA1-PEG 共修饰明胶-硅氧烷纳米粒跨血脑屏障及对胶质瘤的靶向性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2014,34(8):43-46.

- [22] 王志刚, 罗勇, 陈吕安, 等. 修饰性明胶-硅氧烷纳米粒介导降钙素基因相关肽基因转染对蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的预防作用[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(12): 3206-3206.
- [23] Tian X H, Wei F, Wang T X, et al. In vitro and in vivo studies on gelatin-siloxane nanoparticles conjugated with SynB peptide to increase drug delivery to the brain [J]. International Journal of Nanomedicine, 2012, 7 (9): 1031-1041.
- [24] Wang T X, Shang T, Ren L H S, et al. Uptake pathways and subsequent nucleus targeting of tat-conjugated gelatin-siloxane nanoparticles as nonviral gene vector[J]. Journal of Experimental Nanoscience, 2014, 9(7): 739-748.
- [25] He C, Hu Y, Yin L, et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles[J]. Biomaterials, 2010, 31 (13): 3657-3666.

Preparation of nano-gelatin siloxane and inhibition effect of its loaded *p53* gene on the hepatocellular carcinoma

ZHENG Weishi^a, SUN Yiqin^a, ZHAO Xueqin^a, CHEN Cen^a, KONG Xiangdong^b, XIE Chungang^a

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

Abstract: Gelatin siloxane nanoparticles (GS NPs) were prepared with sol-gel method, and the effect of hydrochloric acid solution with different pH on GS NPs was discussed. GS NPs were characterized through particle size, potential and morphology. The results showed that, hydrochloric acid solution with the pH value of 3.0 was the optimal condition to prepare GS NPs. The GS NPs with good dispersion presented irregular spherical. The average particle size was about 250 nm with concentrated distribution and the surface Zeta potential was 38 mV. To evaluate its feasibility as a gene carrier and the inhibition effect of loaded *p53* gene to liver cancer, gel electrophoresis was used to test the load rate and release of GS NPs on pDNA. CCK-8 method was applied to detect the biocompatibility and laser scanning confocal microscopy (LSCM) to observe intracellular uptake. The inhibition effect of GS NPs loaded with pEGFP-C1-*p53* on hepatocellular carcinoma cells was evaluated by using MTT and Western blot. The results showed that GS NPs could effectively load pDNA with the optimal load ratio of 200 : 1 and showed certain release in the salt solution. In addition, GS NPs had good biocompatibility and could carry pDNA to escape from the phagocytosis of lysosomes. After carrying pEGFP-C1-*p53*, it showed significant inhibition effect on hepatoma cells Hep-3b and mediated expression of GFP-*p53* fusion protein. The results of this study indicated that GS NPs could be used as a gene carrier and the loaded *p53* gene had certain inhibition effect on liver cancer cells.

Key words: gelatin siloxane; hepatocellular carcinoma; *p53*; inhibition effect

(责任编辑: 唐志荣)