

# 载<sup>125</sup>I 标记三螺旋形成寡核苷酸纳米粒的制备及初步应用

朱姝 曹素娥 杨婷 邹琼 焦举 张勇

**【摘要】 目的** 构建载<sup>125</sup>I 标记反雄激素受体 (AR) 基因三螺旋形成寡核苷酸 (<sup>125</sup>I-TFO) 纳米粒, 并初步探讨其在体外对前列腺癌细胞的抑制作用。**方法** 应用 Bolton-Hunter 法对三螺旋形成寡核苷酸进行<sup>125</sup>I 标记, 通过复乳化溶剂挥发法制备包载<sup>125</sup>I-TFO 的纳米粒 (<sup>125</sup>I-TFO-NP), 测定其粒径、形态、包封率、载药量及体外释放特点。用  $\gamma$  计数器测定前列腺癌细胞 LNCaP 对<sup>125</sup>I-TFO-NP 的摄取情况, CCK-8 法检测纳米粒对前列腺癌细胞增殖的抑制作用、荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹法检测纳米粒中 AR mRNA 表达水平。**结果** 所获<sup>125</sup>I-TFO 的标记率和放射化学纯度分别为 (86.87  $\pm$  0.45)%、(96.21%  $\pm$  0.97)%。<sup>125</sup>I-TFO-NP 的平均粒径为 (298.2  $\pm$  0.5) nm, 包封率与载药量分别为 (70.6  $\pm$  6.6)% 和 (1.89  $\pm$  0.13)  $\mu$ g/mg, 缓释作用明显。前列腺癌细胞对<sup>125</sup>I-TFO-NP 的摄取率高于未包裹<sup>125</sup>I-TFO ( $P < 0.01$ )。与空白对照组及 TFO-NP 组比较,<sup>125</sup>I-TFO-NP 组中前列腺癌细胞的增殖抑制率升高 ( $P < 0.01$ ), AR mRNA 及蛋白表达水平均下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** 制备的载<sup>125</sup>I-TFO-NP 性状良好, 可通过下调 AR 的表达水平, 抑制前列腺癌细胞的增殖。纳米粒可为反基因放射治疗提供理想的载体。

**【关键词】** 前列腺癌; 纳米粒; <sup>125</sup>I 标记三螺旋形成寡核苷酸

## Preparation and primary application of <sup>125</sup>I labeled triplex-forming oligonucleotide loaded nanoparticles

Zhu Shu, Cao Sue, Yang Ting, Zou Qiong, Jiao Ju, Zhang Yong. Department of Nuclear Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Zhang Yong, E-mail: zy5040@163.com

**【Abstract】 Objective** Preparing the <sup>125</sup>I labeled anti-androgen receptor (AR) gene triplex-forming oligonucleotide loaded nanoparticles, To investigate the inhibitory effects on prostate cancer cells in vitro. **Methods** Synthesizing the <sup>125</sup>I labeled triplex-forming oligonucleotide by Bolton-Hunter Method, then preparing the <sup>125</sup>I labeled triplex-forming oligonucleotide loaded nanoparticles (<sup>125</sup>I-TFO-NP) by double emulsion solvent evaporation method. Its size, shape, embedding ratio and drug loading and release characteristics were identified. The uptake of <sup>125</sup>I-TFO-NP by prostate cancer cells was measured by  $\gamma$  radiation counter. The inhibitory effect on cells was test by CCK-8. AR gene expression was detected by Quantitative Real-time PCR and Western Blotting. **Results** The labeling efficiency and radiochemical purity were (86.87  $\pm$  0.45)% and (96.21  $\pm$  0.97)% respectively. The size of <sup>125</sup>I-TFO-NP was (298.2  $\pm$  0.5) nm in average. The embedding ratio and drug loading were (70.6  $\pm$  6.6)% and (1.89  $\pm$  0.13)  $\mu$ g/mg. The release test in vitro show significant controlled-release. The uptake of <sup>125</sup>I-TFO-NP by prostate cancer cells was significantly higher than that of non-embed <sup>125</sup>I-TFO ( $P < 0.01$ ). The cellular inhibitory rates of <sup>125</sup>I-TFO-NP were significant higher than that of blank control group ( $P < 0.01$ ). The AR mRNA expression level of <sup>125</sup>I-TFO-NP group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Comparing with blank control group and TPO-NP group, the relative expression of AR <sup>125</sup>I-TFO-NP group were decreased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The character of <sup>125</sup>I-TFO labeled nanoparticles was fine. The nanoparticles are able to inhibit the proliferation the prostate cancer cells though inhibiting androgen receptor relative gene and provide ideal carrier for genetic radiotherapy.

**【Key words】** Prostate cancer; Nanoparticle; <sup>125</sup>I labeled triplex-forming oligonucleotide

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2016.05.007

基金项目: 国家自然科学基金 (30970857); 广东省自然科学基金 (2015A030313106)

作者单位: 510630 广州, 中山大学附属第三医院核医学科

通讯作者: 张勇, E-mail: zy5040@163.com

前列腺癌是老年男性较多见的恶性肿瘤之一。2015 年,前列腺癌在美国成为男性最常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。近年来,我国前列腺癌的发病率及病死率均有明显上升的趋势。本研究前期针对雄激素受体(AR)模板 DNA 第 4 外显子 2 447~2 461 核苷酸同聚嘌呤·同聚嘧啶靶序列设计了三螺旋形成寡核苷酸(TFO),序列为 5'-GGAGAGGAAGGAGGA-3',并且利用<sup>125</sup>I 标记 TFO,成功在体内、体外水平抑制前列腺癌移植瘤的生长<sup>[2]</sup>。纳米粒由于粒径小、容易被组织细胞摄取,是应用广泛、很有前景的基因载体。本研究选择已被 FDA 批准的聚合物聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为材料,并进行聚乙二醇化(PEG)修饰,制备载<sup>125</sup>I-TFO 的纳米粒(<sup>125</sup>I-TFO-NP),并初步探讨其对前列腺癌细胞的抑制作用。

## 材料与方法

### 一、材料

人前列腺癌细胞株 LNCaP 由美国菌种保藏中心(ATCC)提供,购自南京凯基生物科技发展有限公司。PLGA-PEG(分子量 100 000),由上海丽昂化学有限公司合成。蛋白质碘化试剂 Sulfo-SHPP(水溶性, Bolton-Hunter 法)、水包油乳化剂 Pluronic F68、乳化剂 Tween 80,均购自上海西宝生物科技有限公司。TFO 由上海生工生物工程公司合成,采用全硫代磷酸修饰。兔抗人 AR 单克隆抗体、山羊抗兔二抗均由广州杰特伟生物科技有限公司提供。

### 二、方法

#### 1. TFO 的<sup>125</sup>I 标记、稳定性试验与验证

应用 Bolton-Hunter 法进行 TFO 的<sup>125</sup>I 标记,超滤离心纯化后,获得<sup>125</sup>I 标记的 TFO(<sup>125</sup>I-TFO),纸层析法测定标记率。应用含 10% 胎牛血清 1640 培养基,于 37℃ 孵育标记产物,分别于 1、2、4、6、12、24、48、72 h 后测定放射化学纯度。将标记产物进行聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳,硝酸银染色 PAGE 凝胶,并使用磷屏显像验证<sup>125</sup>I 与 TFO 的偶联。

#### 2. 复乳化溶剂挥发法制备包载<sup>125</sup>I-TFO 的纳米载体颗粒与性状测定

冰浴下,内水相(含 F68 的<sup>125</sup>I-TFO 溶液)逐滴加入有机相,超声乳化,形成初乳(W<sub>1</sub>/O);初乳逐滴加入含 Tween 80 的外水相,超声乳化,制成复乳(W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>),磁力搅拌蒸发,获得载<sup>125</sup>I-TFO 纳米粒(<sup>125</sup>I-TFO-NP),高速离心洗涤 3 次后,真

空冷冻干燥。同法,制备载 TFO 的 PLGA-PEG 纳米粒(TFO-NP)、空 PLGA-PEG 纳米粒(NP)作为对照。测定纳米颗粒的平均粒径、粒径分布,电子显微镜下观察纳米粒子的表面形态。萃取法测定纳米粒的载药量与包封率,纳米粒悬于磷酸盐缓冲液(PBS),置于超滤离心管中 37℃ 恒温气浴振荡,然后离心取滤液,用紫外分光光度计测定<sup>125</sup>I-TFO 含量。

#### 3. <sup>125</sup>I-TFO-NP 的性状及细胞摄取实验

LNCaP 细胞于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中传代培养,取对数生长期细胞,接种于细胞培养板,细胞贴壁后分别加入无血清 1640 稀释的<sup>125</sup>I-TFO-NP(含<sup>125</sup>I-TFO 50 μg/ml)和未包裹<sup>125</sup>I-TFO(50 μg/ml),每组 3 个复孔,2 h 后吸尽药物,PBS 洗 3 次。0.25% 胰酶消化细胞,离心、弃上清,用 γ 计数器检测。

#### 4. <sup>125</sup>I-TFO-NP 在体外的抗 LNCaP 细胞增殖作用检测

将对数生长期的 LNCaP 细胞接种于细胞培养板,设立空白对照组、<sup>125</sup>I-TFO 组、空白纳米粒(NP)组、载 TFO 纳米粒(TFO-NP)组及载<sup>125</sup>I-TFO 纳米粒(<sup>125</sup>I-TFO-NP)组,其中空白对照组加等体积的 1640 培养基、<sup>125</sup>I-TFO 组加等放射性活度的<sup>125</sup>I-TFO、NP 组加等质量的空白纳米粒、TFO-NP 组加等量的 TFO,每组设 3 个复孔。孵育 24 h 后,培养 48 h。CCK-8 法测定细胞增殖抑制率,实时荧光定量 PCR 测定 AR mRNA 表达水平,蛋白质免疫印迹法测定 AR 蛋白表达水平。

### 三、统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件处理数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 或 Dunnett's *T*3 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

#### 一、<sup>125</sup>I-TFO 标记率、放射化学纯度、标记化合物的稳定性及<sup>125</sup>I-TFO 偶联的验证

<sup>125</sup>I 的标记率为 86.87%,放射化学纯度为 96.21%。37℃ 孵育 1、2、4、6、12、24、48、72 h 后,放射化学纯度分别为 95.05%、93.96%、93.72%、93.68%、91.70%、90.82%、90.47%、82.05%。在 TFO 被硝酸银染色处出现了放射性浓聚显影,证明<sup>125</sup>I 与 TFO 成功偶联,见图 1。

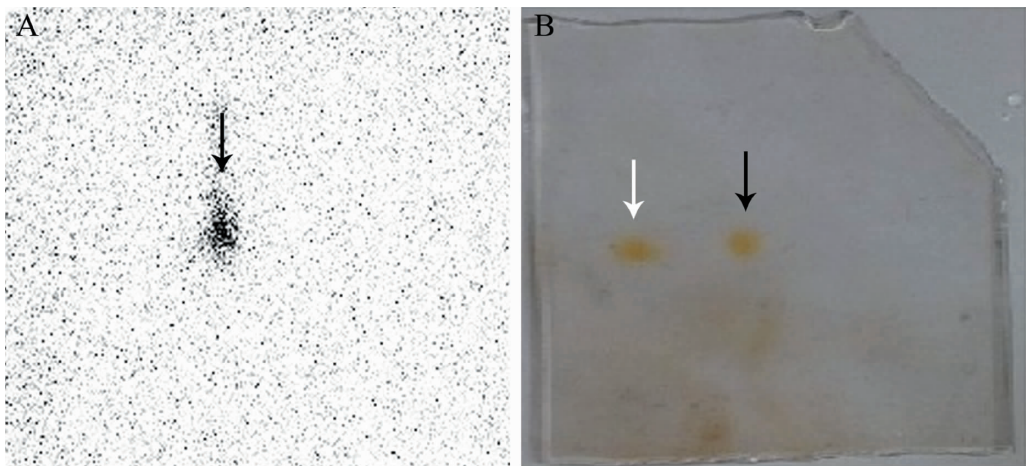


图 1 <sup>125</sup>I-TFO 偶联的验证

A: TFO 和<sup>125</sup>I-TFO (黑色箭头) 的磷屏成像图; B: TFO (白色箭头) 和 <sup>125</sup>I-TFO (黑色箭头) 的尿素-PAGE 电泳图

二、<sup>125</sup>I-TFO-NP 的表面性状、载药量、包封率

所得纳米粒的粒径为 $(298.2 \pm 0.5) \text{ nm}$ 。扫描电镜测得纳米粒呈球形, 形态较好, 见图 2。

1. <sup>125</sup>I-TFO-NP 的粒径分布及表面形态

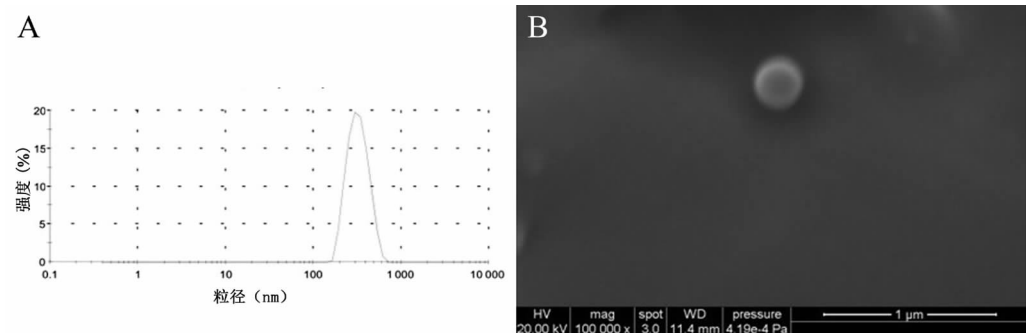


图 2 <sup>125</sup>I-TFO-NP 的粒径分布及表面形态

A: <sup>125</sup>I-TFO-NP 的粒径及分布; B: 电子显微镜下<sup>125</sup>I-TFO-NP 的粒子形态

2. <sup>125</sup>I-TFO-NP 的载药量及包封率

所得纳米粒的载药量为 $(1.89 \pm 0.13) \mu\text{g}/\text{mg}$ , 包封率为 $(70.6 \pm 6.6) \%$ 。

3. <sup>125</sup>I-TFO-NP 的缓释特性

<sup>125</sup>I-TFO-NP 在 pH 7.4、37℃ 的 PBS, 有明显的缓释特性, 在 8 h 后释放量达 24.26%, 72 h 累计释放量达 47.22%, 见图 3。

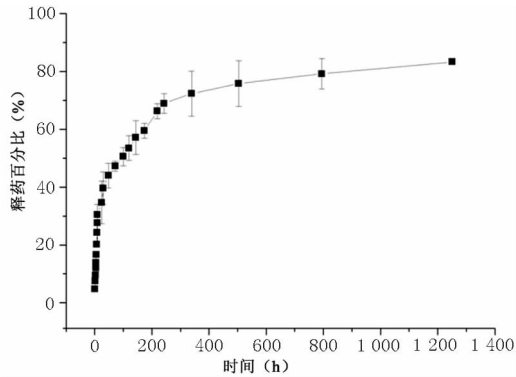


图 3 <sup>125</sup>I-TFO-NP 的药物释放曲线

三、LNCaP 对<sup>125</sup>I-TFO-NP 的摄取试验

<sup>125</sup>I-TFO-NP 组的放射性计数为 $149 \pm 3$ , 高于 NP 组及<sup>125</sup>I-TFO 组 ( $t$  分别为 37.342、35.639,  $P$  均  $< 0.001$ ), <sup>125</sup>I-TFO 组及 NP 组比较差异无统计学意义 ( $t = 1.700$ ,  $P > 0.05$ )。可见 LNCaP 对<sup>125</sup>I-TFO-NP 的摄取比例明显高于未包裹的<sup>125</sup>I-TFO, LNCaP 对未包裹的<sup>125</sup>I-TFO 摄取极少, 见图 4。

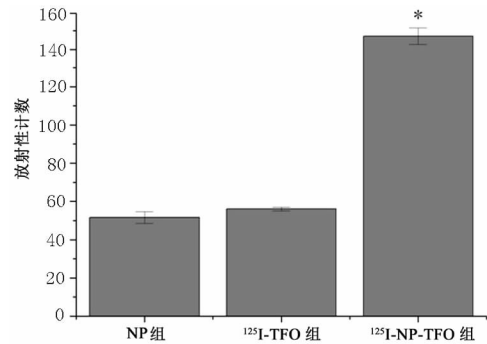


图 4 LNCaP 对<sup>125</sup>I-TFO-NP 的摄取与空白组比较, \*  $P < 0.01$

四、<sup>125</sup>I-TFO-NP 对 LNCaP 增殖抑制的影响

1. 各组 LNCaP 细胞增殖抑制率比较

TFO-NP 组与<sup>125</sup>I-TFO-NP 组的 LNCaP 细胞增殖抑制率分别为 (26.91 ± 3.57)%、(48.07 ± 2.87)%，均高于空白对照组 (*t* 分别为 16.312、9.134, *P* 均 < 0.01)，且<sup>125</sup>I-TFO-NP 组的细胞增殖抑制率高于 TFO-NP 组 (*t* = 7.185, *P* < 0.01)。<sup>125</sup>I-TFO 组与 NP 组的细胞抑制率分别为 (4.31 ± 0.71)%、(2.95 ± 0.44)%，与空白对照组比较差异均无统计学意义 (*P* 均 > 0.05)，见图 5。

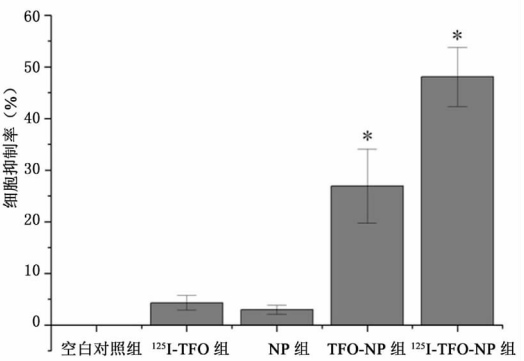


图 5 <sup>125</sup>I-TFO-NP 对 LNCaP 增殖的影响  
与空白对照组比较, \* *P* < 0.01

2. 各组 LNCaP 中 AR mRNA 表达水平的比较

<sup>125</sup>I-TFO-NP 组与 TFO-NP 组的 AR mRNA 表达水平均低于空白对照组 (*t* 分别为 -186.291、

-118.132, *P* 均 < 0.01),<sup>125</sup>I-TFO-NP 组低于 TFO-NP 组 (*t* = -45.893, *P* < 0.01)。<sup>125</sup>I-TFO 组与 NP 组的 AR mRNA 表达水平与空白对照组比较差异均无统计学意义 (*t* 分别为 -6.718、-6.049, *P* 均 > 0.05)，见图 6。

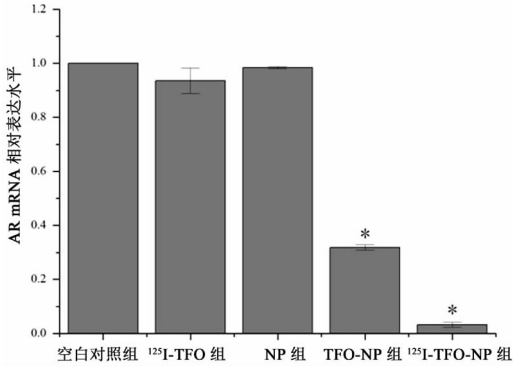


图 6 <sup>125</sup>I-TFO-NP 对 LNCaP 中 AR mRNA 表达水平的影响  
与空白对照组比较, \* *P* < 0.01

3. 各组 LNCaP 中 AR 相对蛋白表达水平比较

<sup>125</sup>I-TFO-NP 组与 TFO-NP 组 LNCaP 的 AR 相对表达水平均低于空白对照组 (*t* 分别为 -83.142、-57.113, *P* 均 < 0.01)，其中<sup>125</sup>I-TFO-NP 组的 AR 相对表达水平低于 TFO-NP 组 (*t* = -12.32, *P* < 0.05)。<sup>125</sup>I-TFO 组与 NP 组的 AR 相对表达水平与空白对照组比较差异无统计学意义 (*P* 均 > 0.05)，见图 7。

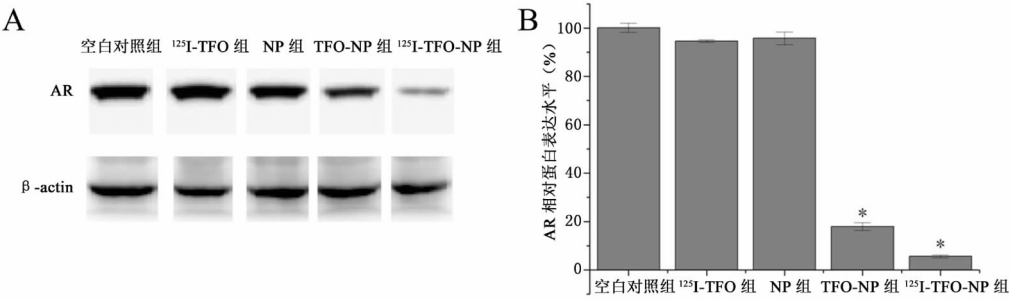


图 7 <sup>125</sup>I-TFO-NP 对 LNCaP 中 AR 相对蛋白表达水平的影响

A: 蛋白免疫印迹结果; B: 定量分析结果; 与空白对照组比较, \* *P* < 0.01

讨 论

雄激素和 AR 在男性性征的表达上起核心作用, AR 基因的突变以及 AR 功能区、DNA 结合域和配体结合区的结构改变可能是引起前列腺癌发生、发展的机制<sup>[3]</sup>。AR 被认为是治疗前列腺癌的重要靶点<sup>[4]</sup>。本研究设计靶向 AR 的 TFO, 并以<sup>125</sup>I 标记, 通过反基因治疗和放射性核素内照射方法, 协同增强对前列腺癌细胞增殖的抑制作用。放射性碘标记蛋白质或多肽的方法应用于核酸的标

记, 所得到的产物标记率较低, 使用 Bolton-Hunter 试剂, 将<sup>125</sup>I 间接地标记于 TFO 上, 获得标记率达 86.87%、放射化学纯度高达 96.21% 的反应产物。37℃ 孵育至 48 h 后, 放射化学纯度仍大于 90%, 能有效保证后续应用。<sup>125</sup>I 标记产物的核酸条带能在磷屏显像仪上显色, 说明<sup>125</sup>I 通过 BH 试剂成功偶联至 TFO 上。

PLGA 具有良好的生物相容性和安全性, 在体内被分解为正常的代谢产物, 是纳米载药系统研究中常用材料<sup>[5]</sup>。经 PLGA 纳米粒包裹的药物, 可有

效减少药物在体内环境中的降解,具有体内缓释特性,可延长其生物半衰期,提高生物利用度。纳米粒子由于体积微小,容易被组织细胞摄取,但也易被单核-巨噬细胞或网状内皮细胞清除。粒径小于 200 nm 或经 PEG 修饰后的纳米粒子可减少其被网状内皮细胞清除,延长在生物体内的半衰期<sup>[6]</sup>。本研究使用了各种外水相稳定剂,使纳米粒的粒径符合条件,且能安全地应用于后续的体内外实验。药物的包封率和载药量主要受药物在材料中的溶解性影响,鉴于主要药物<sup>125</sup>I-TFO 与 PLGA 不同的溶解性,使用复乳溶剂蒸发法制备纳米粒。此法药物易从内水相泄漏至外水相,使所得纳米粒的包封率降低,选择合适的内水相稳定剂,能提高包封率<sup>[7]</sup>。Tween80 作为外水相稳定剂可更有效地降低纳米粒的粒径,Tween80 有溶血性,但较同类产品弱,且可以通过洗涤和真空冷冻干燥去除;选择 F68 为内水相稳定剂,可有效提高纳米粒的包封率,且 F68 无生理活性、溶血性,对皮肤无刺激性,毒性小,是少数可以经静脉注射的乳化剂,作为药用辅料对人体安全性高<sup>[8]</sup>。

本研究制得的纳米粒呈均匀球形,平均粒径为 298.2 nm,<sup>125</sup>I-TFO 的包封率为 70.56%,载药量为  $(1.89 \pm 0.13) \mu\text{g}/\text{mg}$ ,在 8 h 后释放量达 24.26%,体外缓释作用可持续 30 d 以上。纳米包载的药物在短时间被大量释放,称为突释效应,本次制备的纳米粒突释量较小,原因可能是选用的材料 PLGA-PEG 分子量较大。如选择 PLGA100000-PEG3400 所制备的纳米粒可能有更强的缓释特性<sup>[9]</sup>。考虑到体内多种水解酶的存在,可以推断纳米粒在体内的突释量应比在体外更多,这为下一步的体内外抗肿瘤实验提供了保证。

<sup>125</sup>I-TFO 为水溶性分子,不易被细胞直接摄取。PLGA-PEG 纳米粒包载后,LNCaP 通过胞吞作用将<sup>125</sup>I-TFO-NP 吞噬入细胞,对<sup>125</sup>I-TFO 的摄取量显著增加。在细胞培养液内分别加未包裹<sup>125</sup>I-TFO、NP、TFO-NP、<sup>125</sup>I-TFO-NP,结果显示<sup>125</sup>I-TFO-NP 组

明显比<sup>125</sup>I-TFO 组、NP 组、TFO-NP 组有更强的抑制效果。荧光定量 PCR 结果表明,<sup>125</sup>I-TFO-NP 组内 AR mRNA 及蛋白表达水平均明显低于对照组。载<sup>125</sup>I-TFO 的纳米粒可能通过抑制 AR,抑制 LNCaP 的增殖。

综上所述,本研究通过制备标记率、放射化学纯度较高的<sup>125</sup>I-TFO,并使用复乳化溶剂挥发法制备了理想的纳米基因载体,其缓释和持续作用等特性可以作为体内反基因放射治疗的理想平台。

# 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65 (1): 5-29.
- [2] 张勇,陈维真,谢瑶,高锦辉.雄激素受体三螺旋形成寡核苷酸抗前列腺癌细胞增殖的研究. *中华核医学杂志*, 2005, 25 (2): 97-99.
- [3] Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36 (1): 3-23.
- [4] 邹旻红,焦举,邹琼,徐燕,李小平,张勇.高成瘤性前列腺癌细胞亚克隆细胞株的制备及其生物学特性的研究. *新医学*, 2013, 44 (2): 141-144.
- [5] 韦宝伟,刘布鸣.聚乳酸乙醇酸的生物降解和安全性研究进展. *现代药物与临床*, 2012, 27 (4): 422-428.
- [6] 牛玉洁,庞文浩,于敏之,邱崇,王坚成. PEG 修饰在基因递送系统中的应用:优势、不足及改善策略. *中国新药杂志*, 2016, 25 (2): 157-162.
- [7] Cun D, Jensen DK, Maltesen MJ, Bunker M, Whiteside P, Scurr D, Foged C, Nielsen HM. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 77 (1): 26-35.
- [8] Petersen S, Steiniger F, Fischer D, Fahr A, Bunjes H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 79 (1): 150-61.
- [9] Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (7): 2586-2591.

(收稿日期:2016-01-15)

(本文编辑:林燕薇)