

· 论著 ·

# 聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒载 P16 a 基因的制备及在喉癌细胞中的表达

周 焱<sup>1</sup>, 赵德安<sup>1</sup>, 骆启聪<sup>2</sup>

(1 福建医科大学附属厦门第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 福建 厦门 361003 2 厦门大学生命科学院)

**摘要:**目的 制备携带 P16a 基因的聚氰基丙烯酸正 酯纳米粒并在喉癌细胞中进行表达。方法 选用乳化聚合法制备 PBCA - NPs, 以激光粒度分析仪及透射电子显微镜分析纳米粒的形态和粒径。用阳离子表面活性剂十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB) 对纳米粒进行表面修饰。构建真核表达载体 pRES2-EGFP-P16a 经过酶切鉴定及测序后与 PBCA - NPs 连接, 转染喉癌细胞 Hep- 2 荧光显微镜检测转染效率, 蛋白印迹法检验 P16a 基因的表达, 流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 所制 PBCA - NPs 粒径均匀、Zeta 电位较高, 较为理想; 重组质粒 pRES2-EGFP- P16a 经过酶切鉴定及测序后, 表明真核表达载体构建正确; PBCA - NPs 可以介导 pIRES2-EGFP- P16a 高效转染喉癌细胞, 蛋白印迹检测表明转染后喉癌细胞能够表达外源 P16a 基因, 在其介导下 P16a 能有效抑制喉癌细胞的增殖并能诱导细胞凋亡。结论 聚氰基丙烯酸正 酯纳米粒可以作为一种良好的基因载体, 为喉癌的基因治疗提供了新思路。

**关键词:**聚氰基丙烯酸正 酯纳米粒; P16 a 基因; 喉癌细胞

## Construction of polybutyrcyanocrylate nanoparticles (PBCA - NPs) loaded P16a gene and expression in Hep- 2 cell

Zhou Yi<sup>1</sup>, Zhao De-an<sup>1</sup>, Luo Qi-cong<sup>2</sup>

(The Affiliated Xiamen First Hospital of Fujian Medical University)

**Abstract** **【Objective】** To prepare polybutyrcyanocrylate nanoparticles (PBCA - NPs) loaded P16a gene as the gene delivery system, and to express the P16a protein in Hep- 2 cell line **【Method】** PBCA - NPs were prepared by the emulsion polymerization method. Surface of PBCA - NPs was surveyed by transmission electron micrographs (TEM), the grain distribution and zeta potentials of PBCA - NPs were determined with the laser grain analyzer. The PBCA - NPs surface was modified by the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Construct the eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-P16a and the recombinant plasmid were extracted and purified. After verification by double enzyme digestion and sequencing, the constructed eukaryotic expression plasmid was transfected to Hep- 2 line. Transfection efficiency was observed by fluorescence microscope and the expression of P16a gene was detected by Western blot. Apoptosis was detected by flow cytometry. **【Results】** Nps with even size and smooth surface were successfully obtained, holding the higher zeta electric potential. The new constructed vector was confirmed by restricted enzyme and sequencing. pIRES2-EGFP- P16 can be mediated by PBCA - NPswith high transfection efficiency. Exogenous P16a gene can be expressed in transfected Hep- 2 cell line detected by Western blot. P16a mediated by Nps can effectively inhibit the proliferation of Hep- 2 cell and induce Hep- 2 cell apoptosis in vitro **【Conclusions】** PBCA - NPs could be a good vector and provided a new way for gene therapy of laryngocarcinoma

**Key words** polybutyrcyanocrylate nanoparticles; P16a gene; Hep- 2 cell

研究证明, 喉癌的发生、发展是一个长时间、多

阶段的过程, 在细胞癌变的过程中, 细胞周期中的多种调节因子参与细胞的癌变。在这众多分子变化中, p16 基因的改变最为突出。目前的研究已确定, p16 基因的失活在喉癌中发生频率很高, 是喉癌发生发展的重要机制之一。也有大量实验表明, 外源

基金项目: 厦门市卫生局科研立项专项资金 (序号 wsk09) 资助

通信作者: 赵德安, 博士, Email: 66wuguank@sina.com

收稿日期: 2009-11-14

P16 基因的表达, 可以抑制多种肿瘤细胞的增殖<sup>[1]</sup>。

聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 ( polybutylcyanoacrylate nanoparticles PBCA - NPs NPs) 是一种新型非病毒基因载体, 具有高效、无免疫原性、安全、廉价、可生物降解、稳定等其它基因载体不具备的优势。本研究制备了携带 P16a 基因的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒并在喉癌细胞中进行表达从而为喉癌的基因治疗提供了新的方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Tecnai- F30 投射电镜系统 ( 荷兰 Philips- FEI 公司 ), 激光粒度分析仪 ( 英国马尔文公司 NanoZS90 ), *n*- 氰基丙烯酸正丁酯 ( *n*- butyl- 2- cyanoacrylate *n*- BCA ) 购自广州白云医用胶公司, Dextran- 70 Tween- 80 CTAB 购自 Sigma 公司, Hep- 2 细胞, 质粒载体 pRES2- EGFP 大肠杆菌 E. coli DH5 $\alpha$  均由厦门大学李博安实验室保存; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自大连宝生公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Invitrogen 公司, 质粒小量抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 PBCA 纳米粒的制备 参照文献<sup>[2]</sup>采用乳化聚合法进行 PBCA - NPs 的制备: 向 pH 值为 2.5 的 0.1N 的 HCl 中缓慢添加 BCA 单体至终浓度 1%, 表面活性剂为 1% 的 Dextran- 70 添加 0.6% 的 Tween- 80 作为添加剂, 搅拌速率为 1 000 r/min, 室温下搅拌 2 h 用 0.1N 的 NaOH 调节 pH 值为 6.5, 将制得的纳米粒 40 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 2 h 弃上清, 沉淀用超纯水重悬洗涤, 溶于 0.25% CTAB 溶液, 1 000 r/min, 20 $^{\circ}$ C 搅拌 2 h 重复离心洗涤过程, 用 0.22  $\mu$ m 的滤芯滤过除菌 2 遍, 所得纳米粒 4 $^{\circ}$ C 储存备用。测定其 Zeta 电位, 激光粒度分析仪测定其粒度分布, 用透射电镜观察其形态。

1.2.2 P16a 真核表达载体的构建 根据 GenBank 提供的 P16 基因已知序列 (NM 058195), 应用 Primer5 软件设计部分 CDS 区引物, 5 端引物: CGGAATTCGACCGGAGGAAGAAAGAGG; 3 端引物: CGGATCCTGATGATCTAAGTTTCCC 均由上海英俊工程公司合成 (下划线分别表示引入的酶切位点 EcoR I 和 BamH I)。以人细胞 cDNA 为模板, 用 KOD plus 高保真酶 (东洋坊生物科技有限公司) 进行 PCR 扩增。PCR 体系为: 1  $\times$  KOD buffer, 0.2 mM dNTP,

1mM MgSO<sub>4</sub> 引物各 15 $\mu$ M, KOD plus 酶 1U, dNAT 1uL, H<sub>2</sub>O 补至 50 $\mu$ L。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C, 变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C, 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C, 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C, 延伸 45 s, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增得到 560 bp (p16a) 基因片段, 经琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收, 然后与载体 pRES2- EGFP 分别经限制性内切酶 EcoR I/BamH I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收, 得到的片段用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑选单克隆小量提质粒后进行酶切鉴定, 阳性质粒送往 invitrogen 公司测序。

1.2.3 PBCA 纳米粒 - 真核表达载体复合物的制备 参照文献<sup>[2]</sup>, 在 pH 值为 7.0 条件下按 PBCA 纳米粒与真核表达载体质量比 9:1 将 PBCA 纳米粒与质粒 pRES2- EGFP 及 P16a- pRES2- EGFP 分别混合, 涡旋混匀, 室温静置 30 min, 20 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 弃上清, 沉淀用超纯水重悬洗涤, 用 0.22  $\mu$ m 的滤芯滤过除菌, 所得复合物 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2.4 PBCA - p16a 真核表达载体转染 Hep- 2 细胞及表达检测 Hep2 细胞以 1640 培养基 (含有 10% FBS, 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素), 在 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中培养。胰酶消化对数生长的 Hep2 细胞, 铺 6cm 培养皿, 20~24 h 至细胞融合度达 80%, 细胞换液 (用 2.5 mL 无血清无抗的培养基换液)。加入 PBCA - P16a - pRES2 - EGFP 复合体, 对照组加入 PBCA - pRES2 - EGFP 复合体, 在 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4 h 后更换为完全培养基 (含 10% FBS, 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素), 继续培养, 分别于 24 h, 48 h 在绿色荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 (GFP) 表达并拍照。

Western blot 检测 P16a 蛋白表达: 转染后 48 h 的细胞, 弃去培养液, 经预冷的 PBS 漂洗 2 遍, 3 000 r 离心 5 min, 加入裂解液, 超声, 13 000 r/min 离心 15 min, 考马斯亮蓝法测蛋白浓度, 各组提取等量蛋白, 经 10% SDS - PAGE 凝胶电转到 PVDF 膜, 封闭液 (含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液) 室温封闭 1 min, 一抗 anti- p16 (p16 $\alpha$ ), (1:2 000 购自密里博公司) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 羊抗鼠二抗 (1:10 000 购自皮尔斯公司) 室温孵育 1 min, 增强型化学发光剂 (ECL) 显影曝光。

1.2.5 流式细胞仪 PI 单染色法检测细胞周期分布及凋亡 分别收集转染后 24 h, 48 h, 72 h 的细胞培养基到 15 mL 离心管中, 加 1 mL PBS 缓冲液清洗一次, 将 PBS 加入 15 mL 离心管, 胰酶消化细胞收集于

上述离心管中, 1 mL PBS 缓冲液清洗剩余细胞一次, 清洗液加入离心管。800 g 离心 5 min 去上清。加入 1mL PBS 缓冲液清洗细胞, 再次 800 g 离心 5 min 去上清。用 300 uL PBS 重悬细胞, 逐滴加入 700 uL 预冷的无水乙醇。乙醇终浓度为 70%。4 °C 固定过夜。800 g 离心 10 min 去上清。PBS 洗 2 次。重悬于 400 uL PBS 中, 加入 10 uL 5 mg/mL RNaseA, 37 °C 消化 1 h, 加入 50 uL 1 mg/mL PI 37 °C 避光孵育 1 h。以 PI 荧光读数为横坐标, 细胞数目为纵坐标, 在流式细胞仪上分析细胞周期。

1.2.6 统计学方法 实验数据用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学处理, 组间和组内差异采用 *t* 检验和方差分析。

## 2 结果

### 2.1 PBCA 纳米粒的制备

采用乳化聚合法按照上述条件制得的纳米粒较为理想, 粒径较小 (平均粒径约为 100nm), Zeta 电位较高 (约为 +46.9mV)。投射电镜见图 1。

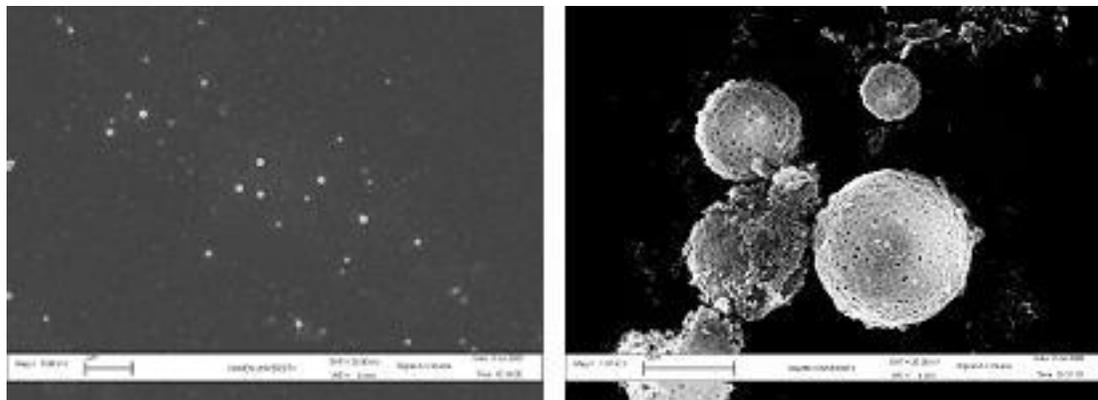


图 1 纳米粒投射电镜图片

### 2.2 P16a 真核表达载体的构建

所构建的 pIRES2-EGFP-P16a 用 *Sma*I 酶切可切出 5.718 Kb 及 195 bp 大小两条带。酶切电泳

显示 1、3 产物和预期一致 (图 2), 即阳性菌落质粒。取一定剂量的阳性菌落质粒送 Invitrogen 公司测序证实所含目的基因序列准确无误 (测序图谱略)。

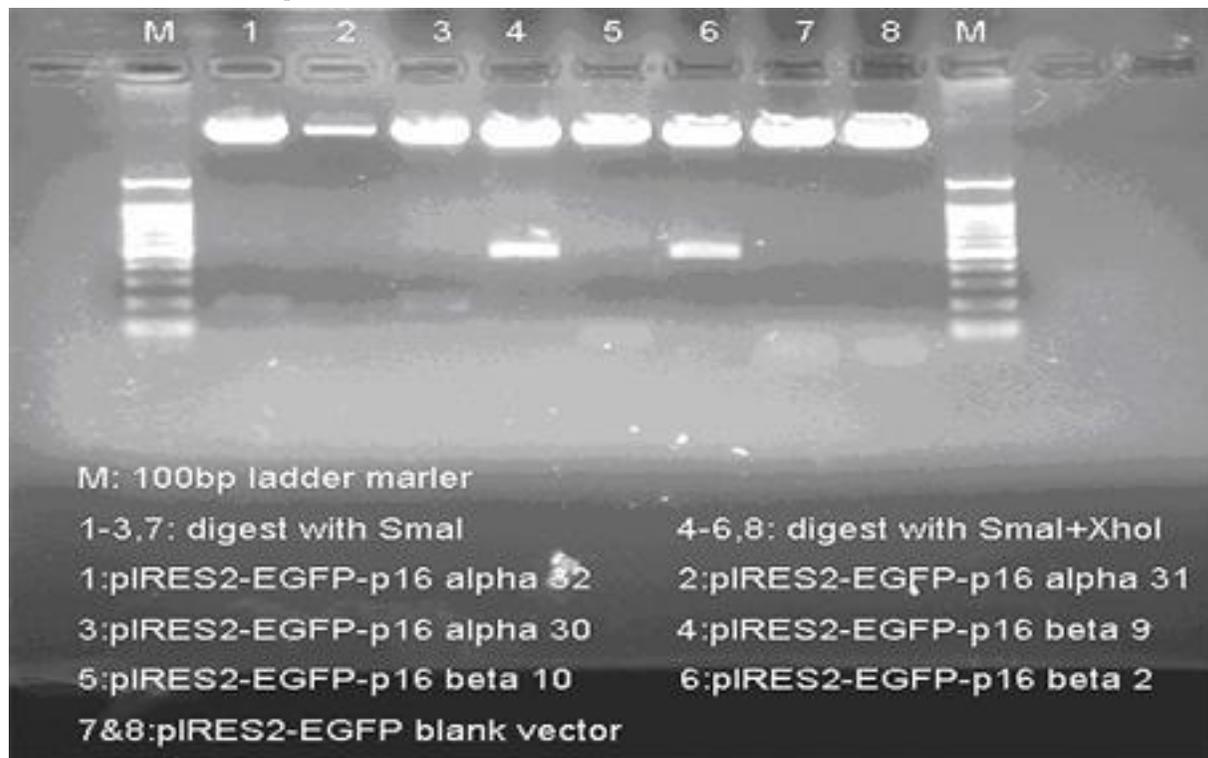


图 2 酶切电泳结果

### 2.3 PBCA-p16α 真核表达载体转染 Hep-2 细胞

转染 Hep-2 细胞后 24 h、48 h 倒置荧光显微镜下所见 (图 3), 可见 PBCA 纳米粒可高效介导 P16α 真核表达载体转染喉癌细胞系。

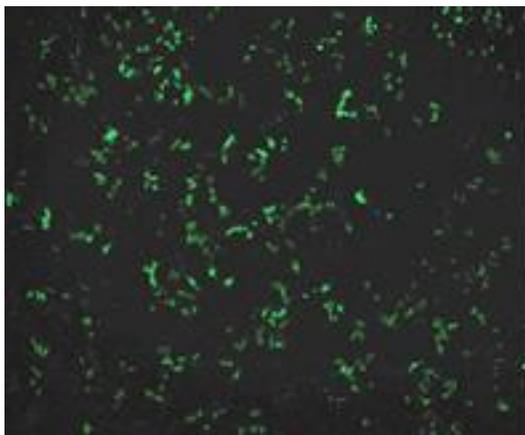


图 3a 为转染后 24 h 绿色荧光显微镜下所见 (×100)

转染后 48 h 收集细胞蛋白, 将收集到的蛋白用 Western blot 法检测 P16α 蛋白的表达变化, 在转染 P16α 的 Hep-2 细胞中得到 P16α 蛋白的强表达条带 (图 4)。

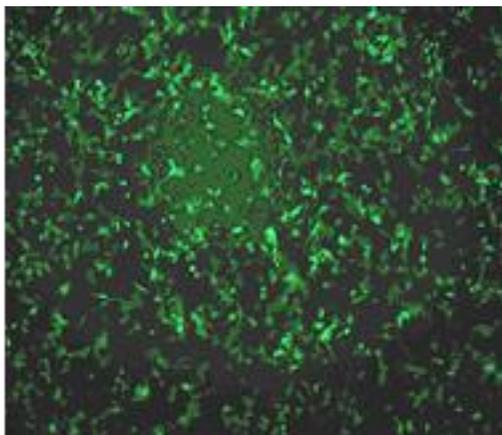
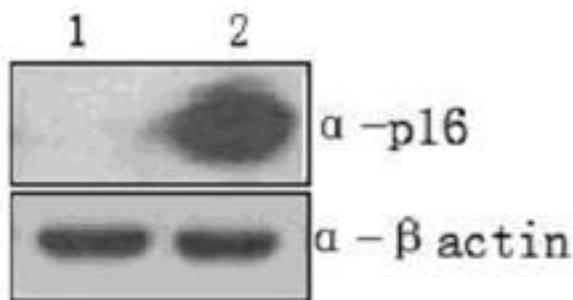


图 3b 为转染后 48 h 绿色荧光显微镜下所见 (×100)

图 3 PBCA-P16α-pRES2-EGFP 转染 Hep-2 细胞



1 转染空载体组; 2 转染 P16α 真核表达载体组

图 4 Western blot 检测 P16α 蛋白表达结果

### 2.4 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡

Hep-2 细胞在 PBCA-pRES2-EGFP-P16α 复合体转染之后 48 h 出现了明显的凋亡。如 (图 5) 所示, 转染后 24 h 凋亡率为 (3.20 ± 0.09)%, 与空载体对照组凋亡率 (3.09 ± 0.12)% 相比, 结果无统计学意义 ( $t = -1.76, P > 0.05$ )。而转染后 48 h 凋亡出现上升, 其凋亡率为 (24.31 ± 1.40)%, 明显高于空载体对照组结果 (3.15 ± 0.14)%, 其差别具有统计学意义 ( $t = -36.95, P < 0.05$ ); 转染后 72 h 凋亡率出现明显上升, 其检测结果为 (36.68 ± 3.79)%, 明显高于空载体对照组检测结果 (10.99 ± 1.53)%, 其差别具有统计学意义 ( $t = -15.41, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

基因治疗的关键技术是基因转移, 即如何将外源基因特异高效地导入靶细胞。传统的基因转载体分为病毒载体介导系统和非病毒载体介导系统两大

类。病毒载体转染效率最高可达 90% 以上<sup>[3]</sup>, 但该系统有毒性、免疫原性、致瘤性等安全隐患, 使其应用受到很大限制。传统的非病毒载体包括裸 DNA、脂质体、磷酸钙等<sup>[4]</sup>, 该类载体虽然安全、低毒、低免疫反应原性, 但存在稳定性差、转导效率低和难以获得有意义的基因表达等问题。近年来, 新型非病毒载体在基因治疗中日益受到重视<sup>[5]</sup>, 在这些载体中, 可生物降解的纳米粒能有效的结合和传递寡核苷酸, 保护没有修饰的寡核苷酸, 防止被降解, 表现出良好的应用潜力<sup>[6]</sup>。由于纳米生物材料的诸多良好的生物学特性, 从而成为制备高效、靶向的基因治疗载体系统的良好介质。纳米生物技术与基因治疗相结合, 显示出良好的应用前景。

P16 基因定位于人类第 9 号染色体短臂 (9p21) 上, p16 基因座编码 2 个不同的翻译产物, 它们共享外显子 2、3 而有不同的外显子 1 (1α 或 1β), α 翻译产物为 p16 蛋白, β 翻译产物功能目前还不清楚<sup>[7]</sup>。p16 蛋白, 是细胞周期素依赖激酶 (CDK4) 的抑制蛋白, p16 蛋白在 “cyclinD1-CDK4/CDK6-PRb-E2F” 环路中起负反馈调节作用, 在细胞增殖过程中起检查点的作用, p16 基因的任何变异都会导致上述环路无限制地进行, 细胞过度增殖, 使 G1 期末充分发育的细胞提前进入 S 期, 导致癌症发生<sup>[8]</sup>。目前的研究表明约 50% 以上的喉鳞状细胞癌患者存在 p16 基因的失活<sup>[9]</sup>。导入外源野生型 p16 基因可抑制喉癌细胞恶性增殖<sup>[10]</sup>。且由于其作用于 CDK4 的特异性强, 基因小易于操作, 因此成

为进行喉癌基因治疗的靶基因之一<sup>[11]</sup>。

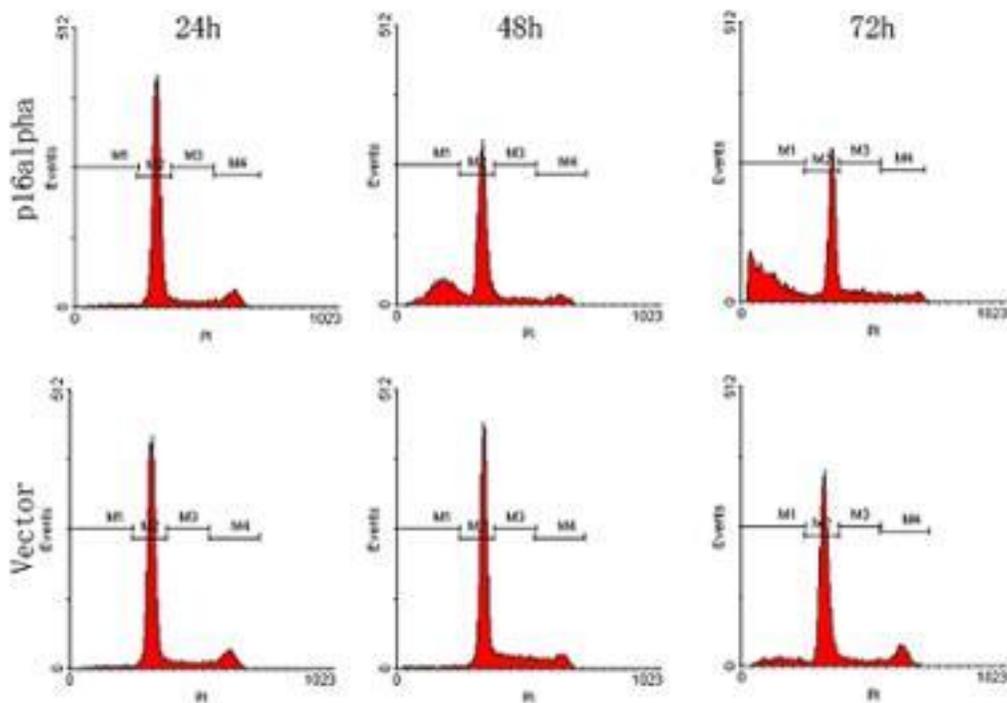


图 5 流式细胞仪检测细胞周期分布

本研究利用氰基丙烯酸丁酯 (BCA), 以乳化聚合法制备 PBCA - NP<sub>s</sub> 用阳离子表面活性剂十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB) 对纳米粒进行表面修饰, 制得的纳米粒较为理想, 粒径较小 (平均粒径约为 100 nm), Zeta 电位较高 (约为 +46.9 mV), 与真核表达载体 pRES2-EGFP-P16a 连接后可高效转染喉癌细胞系, 属于较理想的非病毒基因载体。转染后 48h, 用 Western blot 法可检测到 P16 蛋白的强表达条带, 证明外源 P16 基因可正确在喉癌细胞系中表达。流式细胞仪分析, 转染 pRES2-EGFP-P16a 后 48 h, Hep-2 细胞开始出现不同程度的凋亡和坏死, G1 峰前出现明显的凋亡峰, 而对照组凋亡和坏死不明显。

本研究表明聚氰基丙烯酸丁酯纳米粒作为一种非病毒基因载体, 具有高效、无免疫原性、安全、廉价、可生物降解、稳定等其它基因载体不具备的优势。可与 P16a 真核表达载体 pRES2-EGFP-P16a 连接并高效转染喉癌细胞系, 从而在细胞内实现 P16 蛋白的表达, 诱导细胞凋亡进而阻断肿瘤细胞的无限增值, 为喉癌的基因治疗提供了新的思路。

参 考 文 献:

[ 1 ] 陈慧, 周梁. 喉癌的基因治疗进展 [ J ]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2008, 21(11): 1005-1008  
[ 2 ] ZHANG YD, SUN Y. Preparation of polybutyryanoacrylate nano-

particles gene delivery system and study on its characteristics in vitro [ J ]. China Journal of Modern Medicine, 2004, 14(1): 1-11  
[ 3 ] WU X, LI Y, CRISE B, BURGESS SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration [ J ]. Science, 2003, 300(5626): 1749-1751.  
[ 4 ] Brown MD, Schatzkin AG, Udiegbu E. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers [ J ]. Int J Pharm, 2001, 229(1-2): 1-21.  
[ 5 ] 胡云霞, 原续波, 张晓金, 等. 阳离子多聚物纳米基因载体系统的研究进展 [ J ]. 北京生物医学工程, 2003, 22(4): 299-302  
[ 6 ] Wong SC, Yu H, Moolhalla SM, et al. Antisense telomerase induced cell growth inhibition, cell cycle arrest and telomerase activity down-regulation in gastric and colon cancer cells [ J ]. Anticancer Res, 2003, 23(1A): 465-469  
[ 7 ] DE CASTRO IP, BENET M, JMENEZ M, et al. Mouse p10, an alternative spliced form of p15<sup>INK4a</sup>, inhibits cell cycle progression and malignant transformation [ J ]. Cancer Res, 2005, 65: 3249-3256  
[ 8 ] AUERKARI E I. Methylation of tumor suppressor genes p16 (INK4a), p27 (Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis [ J ]. Oncol, 2006, 42: 5-13  
[ 9 ] NADAL A, CARDESA A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma [ J ]. J Cell Physiol, 2002, 192: 286-293.  
[ 10 ] 孙永柱, 崔鹏程, 陈文弦, 李贵泽, 朱春生. 外源性 p16 基因稳定转染对喉癌细胞周期和增殖的影响 [ J ]. 第四军医大学学报, 2003, 24(4): 331-335.  
[ 11 ] 付志婕, 潘新良. p16 基因和蛋白与喉癌关系的研究进展 [ J ]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 21(12): 573-575.  
(魏泽峰 编辑)