

## TLS9a 核酸适配体对小鼠肝癌细胞的靶向作用研究

魏莉平<sup>1</sup>,王镀锌<sup>2</sup>,邹甜甜<sup>1</sup>,费安兴<sup>1△</sup>

(1.湖北省黄石市妇幼保健院团城山院区检验科 435000;2.湖北省黄石市中心医院检验科 435000)

**[摘要]** 目的 探讨 TLS9a 核酸适配体对小鼠肝癌细胞的靶向作用。方法 制备马来酰亚胺修饰的装载阿霉素的脂质体(liposome),合成 FITC 荧光及巯基修饰的 TLS9a 核酸适配体,并将其偶联到脂质体表面。紫外分光光度法检测阿霉素包封率。动态光散射法(DLS)测纳米粒子粒径大小及电位分布,倒置荧光显微镜观察小鼠肝癌细胞对阿霉素摄入及用流式细胞技术检测平均荧光强度,评估小鼠肝癌细胞对药物摄入量。四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活性。结果 流式细胞术检测 TLS9a 核酸适配体与 BNL.1ME.A.7R.1 小鼠肝癌细胞结合率为 54.1%,TLS9a 耦联的脂质体平均粒径分布在(116.0±5.0)nm。TLS9a-liposome/DOX 在 pH 5.0 的环境中可以快速释放化疗药物 DOX,72 h 药物释放量超过 70%。TLS9a-liposome/DOX 在体外能够有效抑制小鼠肝癌细胞 BNL.1ME.A.7R.1 生长。结论 TLS9a 核酸适配体可以特异性与小鼠肝癌细胞 BNL.1ME.A.7R.1 结合,可用于检测小鼠肝癌细胞。

**[关键词]** 肝肿瘤;核酸适配体;TLS9a;靶向治疗;小鼠肝癌细胞**[中图分类号]** R73-36**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)26-3623-03

## Targeting effect of TLS9a nucleic acid aptamer on mice hepatic cancer cells

Wei Liping<sup>1</sup>,Wang Dujin<sup>2</sup>,Zou Tiantian<sup>1</sup>,Fei Anxing<sup>1△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Tuanchengshan Branch Hospital, Huangshi Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Huangshi, Hubei 435000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Huangshi Municipal Central Hospital, Huangshi, Hubei 435000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the targeting effect of TLS9a nucleic acid aptamer on mice hepatic cancer cells. **Methods** The liposome modified with maleimide and loading doxorubicin(DOX) was prepared, then TLS9a nucleic acid aptamer modified by FITC fluorescence and sulfydryl was synthesized, which was coupled to the liposome surface. The entrapment efficiency of DOX was detected by UV spectrophotometry. The dynamic light scattering(DLS) was applied to measure the particle size of nanoparticles and the potential distribution. The uptake of DOX in mice hepatic cancer cells was detected by the Nikon inverted microscope and the mean fluorescence intensity of liposome/DOX and TLS9a-liposome/DOX was detected by flow cytometry. The cells activity was detected by MTT. **Results** Flow cytometry assay showed that the binding rate of TLS9a nucleic acid aptamer with BNL.1ME.A.7R.1 mice hepatic cancer cells was 54.1%. TLS9a-liposome particle size distribution was in (116.0±5.0)nm. TLS9a-liposome/DOX released DOX quickly at pH 5.0, and the release amount in 72 h was more than 70% of the total release amount. TLS9a-liposome/DOX effectively inhibited the growth of mice hepatic cancer cells BNL.1ME.A.7R.1. **Conclusion** TLS9a nucleic acid aptamer could specifically combined with mice hepatic cancer cells BNL.1ME.A.7R.1, which could be used to detect mice hepatic cancer cells.

**[Key words]** liver neoplasms; nucleic acid aptamer; TLS9a; targeted therapy; mice hepatic cancer cells

尽管化疗药物广泛应用于癌症治疗,但由于他们不具备肿瘤特异性,而在临床的应用中受到限制。因此,发展有效且具有主动靶向功能的化疗药物运输平台成为纳米医药领域研究的热点。寡核苷酸适配体不仅能提供与抗体类似的结合效率,同时具备低免疫原、高稳定、合成简单和易改等优点,是应用于靶向药物释放的一种较好的选择。TLS9a 适配体是由 Shang-guan 等<sup>[1]</sup>于 2008 年利用 cell-SELEX 技术筛选出的一种核酸适配体,其序列为 5'-AGT CCA TTT TAT TCC TGA ATA TTT GTT AAC CTC ATG GAC-3',能够特异性地与小鼠肝癌细胞系 BNL.1ME.A.7R.1 结合,而与小鼠胚胎肝细胞 BNL.CL.2 结合能力弱,是一种具有潜在应用价值的靶向分子。本研究将荧光标记的 TLS9a 核酸适配体应用于流式细胞技术来检测游离单个小鼠肝癌细胞,为小鼠肝癌细胞的检测和诊断提供了新的思路。同时,本课题组利用 TLS9a 核酸适配体作为主动靶向分子,成功构建 TLS9a 核酸适配体耦联的脂

质体,并在体外考察其药物释放及抗小鼠肝癌细胞效应。

**1 材料与方****1.1 材料**

**1.1.1 主要试剂** 棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (PEG2000-DSPE)、 $\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -tocopherol)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺(MAL-PEG2000-DSPE)购自美国 Avanti 公司;FITC 与巯基双标的 TLS9a 核酸适配体购自上海生物工程股份有限公司;阿霉素(DOX)购自美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。其他试剂为实验室常用分析纯级。

**1.1.2 细胞** BNL.1ME.A.7R.1 小鼠肝癌细胞系, BNL.CL.2 小鼠胚胎肝细胞系购自 ATCC 中国代理公司。

**1.2 方法**

**1.2.1 流式细胞术检测核酸适配体与小鼠肝癌细胞结合率**

收集对数期生长的 BNL. 1ME. A. 7R. 1 和 BNL. CL. 2 细胞 ( $1 \times 10^6$ ), 重悬在 50  $\mu$ L 清洗缓冲液中 [4.5 g/L 葡萄糖和 5 mmol/L  $MgCl_2$  的磷酸盐缓冲液 (PBS)], 同时加入 40  $\mu$ L 黏附缓冲液 [0.2 mg/mL 转移核糖核酸酵母 (yeast tRNA) 和 2.0 mg/mL 牛血清蛋白 (BSA) 的清洗缓冲液] 和 10  $\mu$ L 胎牛血清。加入 FITC 标记的 TLS9a 适配体, 使其终浓度为 25 nmol/L。4  $^{\circ}C$  孵育 30 min。用清洗缓冲液清洗 3 次, 最后细胞重悬在 500  $\mu$ L 清洗缓冲液中上流式细胞仪检测。

**1.2.2 马来酰亚胺修饰的脂质体 (TLS9a-liposome) 制备** 10  $\mu$ m 脂质体 (POPC : PEG2000-DSPE :  $\alpha$ -tocopherol : MAL-PEG2000-DSPE 物质质量比例为 1.0 : 1.0 : 0.1 : 0.1) 溶解在 1 mL 氯仿中。加到圆底烧瓶中, 在旋转蒸发仪上抽真空 10 min 使氯仿完全挥发。室温真空干燥 4 h, 取出加入 1 mL 的 D-Hank's 缓冲液 (pH 6.5) 超声波恒温水浴 5 min, 使其形成脂质体悬液, 将上述溶液加入挤推器中的玻璃注射器中, 分别过孔径为 200 nm 及 100 nm 的聚碳酸酯膜各 20 次以上, 即得到马来酰亚胺修饰的脂质体。

**1.2.3 TLS9a 核酸适配体耦联的脂质体制备** 将 TLS9a 和 MAL-PEG2000-DSPE (1 : 10) 加入到上述制备的马来酰亚胺修饰的脂质体中, 混匀, 氮气保护下 4  $^{\circ}C$  孵育 24 h, 最后产物用超滤浓缩管 (3 500 MWCO) 清洗 3 次, 去除未结合的小分子物质, 产物 4  $^{\circ}C$  保存备用。

**1.2.4 TLS9a-liposome 包封 DOX** 将脂质体 pH 值调整到 7.5, 与脂质体按照质量比例为 1 : 10 加入, 37  $^{\circ}C$  振荡孵育 4 h, 透析去除未包封的 DOX, 终产物 4  $^{\circ}C$  保存备用。紫外分光光度法检测上清液中 DOX 水平, 计算包封率。

**1.2.5 适配体修饰的脂质体粒径电位检测** 利用动态光散射法 (DLS) 测量纳米材料的粒径和电位分布图。取适量脂质体溶于 1 mL 去离子水, 25  $^{\circ}C$  环境下检测纳米材料粒径和电位分布, 重复 3 次。

**1.2.6 纳米材料体外药物释放考察** 分别配置 pH 7.4 和 pH 5.0 的 PBS, 将载药脂质体浓度调整到 1 mg DOX/mL 浓度, 加入到透析袋中 (截留相对分子质量为 3 500), 分别置于 30 mL pH 7.4 和 pH 5.0 的 PBS 中。在避光条件下, 37  $^{\circ}C$  100 r/min 水浴振荡。在预定的时间取 500  $\mu$ L 透析液用荧光光度计测算药物释放量。重复 3 次计算平均值。

**1.2.7 评估 DOX 摄入量** 在 6 孔板内接种 BNL. 1ME. A. 7R. 1 ( $3 \times 10^5$ /孔) 细胞, 培养 24 h, 分别加入终浓度为 10  $\mu$ g/mL 的 liposome/DOX、TLS9a-liposome/DOX, 37  $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  培养 1 h, 收集细胞, PBS 洗 3 次, 500  $\mu$ L 重悬, 流式细胞仪检测每组收集的 10 000 细胞, 得到 DOX 荧光强度。分别收集上述细胞  $1 \times 10^6$ , PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.2 mg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色 15 min, PBS 重悬, 1 000 r/min 离心 6 min, 清洗 3 次, 倒置荧光显微镜下观察小鼠肝癌细胞对 DOX 的摄入量。

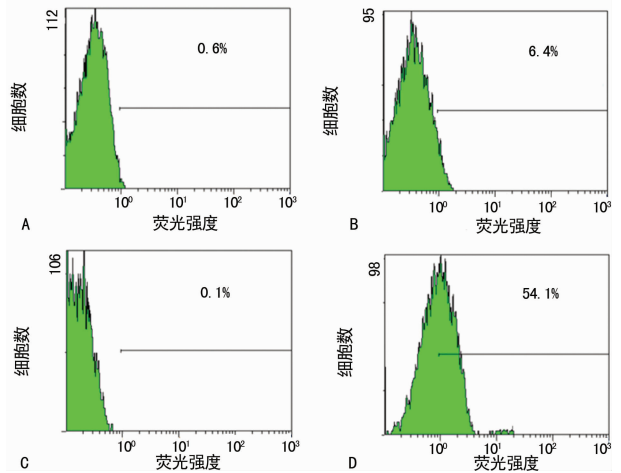
**1.2.8 MTT 法评估靶向药物体外杀伤效果** BNL. 1ME. A. 7R. 1 细胞 ( $1 \times 10^4$ /孔) 接种于 96 孔板, 每组重复 8 孔, 37  $^{\circ}C$  5%  $CO_2$  培养 24 h, 分别加入不同浓度的 DOX、liposome/DOX、TLS9a-liposome/DOX, 再培养 24 h, 移除培养液, 加入 100  $\mu$ L 不含血清的 DMEM 细胞培养液, 20  $\mu$ L MTT 液, 培养 4 h, 吸弃上清液, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 100 r/min 室温摇床振荡 10 min。酶标仪上 490 nm 波长处检测吸光度值。计算细胞活力。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm$

$s$  表示, 组间采用双尾非配对  $t$  检验的方法进行比较。检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

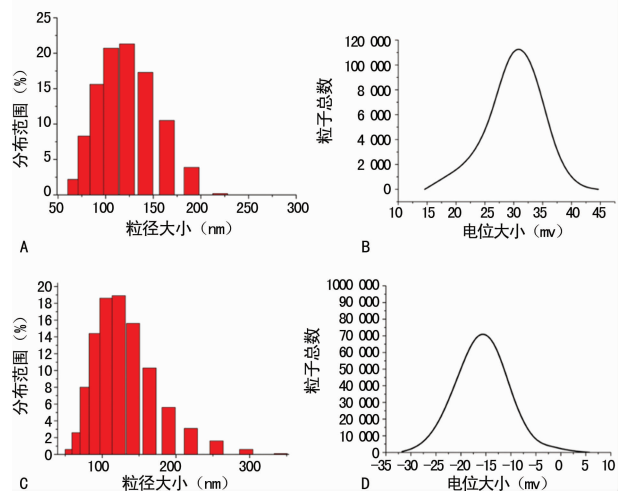
**2.1 TLS9a 用于检测小鼠肝癌细胞** TLS9a 核酸适配体可以特异性地与 BNL. 1ME. A. 7R. 1 小鼠肝癌细胞结合, 25 nmol/L 时的结合率为 54.1%, 而与正常的小鼠胚胎肝细胞 BNL. CL. 2 的结合率只有 6.4%, 见图 1。



A: BNL. CL. 2 细胞 (对照); B: BNL. CL. 2 细胞与 25 nmol/L FITC 标记的 TLS9a 核酸适配体; C: BNL. 1ME. A. 7R. 1 细胞 (对照); D: BNL. 1ME. A. 7R. 1 细胞与 25 nmol/L FITC 标记的 TLS9a 核酸适配体

图 1 流式细胞仪检测 TLS9a 与小鼠肝癌细胞的结合率

**2.2 TLS9a 核酸适配体耦联的脂质体表征** 本实验中制备的 TLS9a-liposome 粒径和电位分布如图 2 所示。liposome 纳米材料粒径分布在  $(109.0 \pm 3.1)$  nm, TLS9a-liposome 纳米材料粒径分布在  $(116.0 \pm 5.0)$  nm; liposome 电位分布在 +30 mV 左右, TLS9a-liposome 电位分布在 -23 mV 左右, 见图 2。



A: liposome 粒径分布图; B: liposome 电位分布图; C: TLS9a-liposome 粒径分布图; D: TLS9a-liposome 电位分布图

图 2 DLS 检测 liposome 及 TLS9a-liposome 纳米粒子粒径和电位分布图

**2.3 TLS9a-liposome 体外药物释放测定** TLS9a-liposome 在 pH 7.4 的环境中 72 h 内药物释放不超过 20%, 而在 pH 5.0 的环境中累积释放超过 70%, 人体液循环中的 pH 值接近 7.4, 肿瘤微环境中 pH 值处于酸性环境, 见图 3。

**2.4 TLS9a-liposome 靶向释放药物测定** 修饰后 TLS9a-li-

posome 能明显提高小鼠肝癌细胞对 DOX 的摄入量。图 4A 中蓝色为细胞核,红色为 DOX,可见耦联 TLS9a-liposome 组红色荧光明显强于未修饰靶向分子组;TLS9a-liposome 组细胞内 DOX 荧光曲线明显右移,见图 4B。

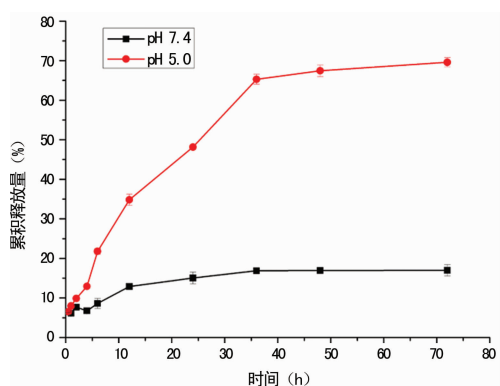
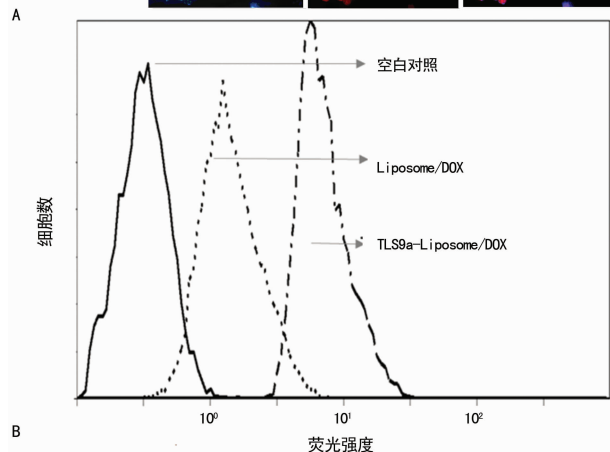
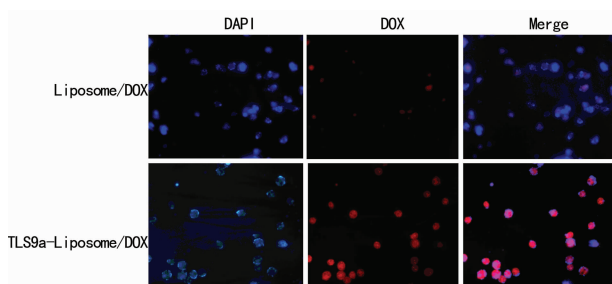
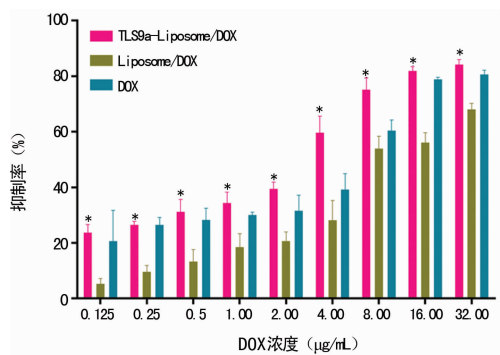


图 3 TLS9a-liposome/DOX 纳米材料在不同 pH 值下药物释放结果



A: 荧光显微镜检测 DOX 摄入量; B: 流式细胞术检测药物摄入量

图 4 BNL 1ME A 7R.1 小鼠肝癌细胞 DOX 摄入效果评估



\*:  $P < 0.05$ , 与 liposome/DOX 比较

图 5 MTT 法检测结果

2.5 MTT 法检测不同浓度的 TLS9a-liposome/DOX 对小鼠肝癌细胞抑制率 TLS9a-liposome/DOX 比 liposome/DOX 对小鼠肝癌细胞抑制能力更强,见图 5。

### 3 讨论

核酸适配体在生物传感、生物检测和生物靶向治疗方面受到越来越多的重视<sup>[2-6]</sup>。适配体是小的 DNA 或 RNA 链,免疫原性极低,对人体无毒副作用。现今的技术可以筛选得到很多针对人肝癌的特异性适配体,将其应用到生物医药靶向诊治领域前景极其广阔,必将产生极大的社会和经济效应。利用核酸适配体构建各种新型的生物传感器用于肿瘤检测的研究也给临床诊断带来了新的希望<sup>[7-8]</sup>。

本研究在核酸适配体 TLS9a 上修饰 FITC 荧光基团,通过流式细胞术可以用于检测 BNL 1ME A 7R.1 小鼠肝癌细胞。相对于传统的检测方法,核酸适配体价格低廉、合成简单、易于修饰,为肿瘤的临床诊断与检测方法提供了新的思路<sup>[9]</sup>。脂质体是一种已经应用于临床的传统纳米材料,具有很好的生物相容性,被广泛应用于生物医药领域<sup>[10-11]</sup>。DOX 因其极大的不良反应而在临床上受到极大限制<sup>[12-13]</sup>。本实验通过在脂质体表面修饰 TLS9a 核酸适配体,实现化疗药物的主动靶向释放,使小鼠肝癌细胞对化疗药物的摄入量增加,从而提高化疗药物对小鼠肝癌细胞的杀伤效果。同时本研究发现 TLS9a-liposome/DOX 在模拟体内 pH7.4 环境时药物释放量很低,而在肿瘤局部酸性环境下可以快速持久释放药物,这说明 TLS9a-liposome 纳米材料在体循环中能保持相对稳定状态,并能减少化疗药物在到达肿瘤部位前的泄露,从而避免化疗药物对人体产生较大的不良反应。伴随着生物靶向治疗的兴起,适配体修饰的各种靶向载体必将不断涌现<sup>[14-15]</sup>,这为生物靶向治疗提供了很好的发展契机。

综上所述,标记荧光基团的 TLS9a 核酸适配体可以用于小鼠肝癌细胞的检测,并且 TLS9a-liposome/DOX 纳米载体可以有效靶向释放化疗药物,从而提高化疗药物对小鼠肝癌细胞的杀伤能力。随着筛选方法的不断创新,新型的适配体也将源源不断出现,这将给临床对肿瘤的诊断检测和纳米医药领域的发展提供新的机遇。

### 参考文献

- [1] Shanguan D, Meng L, Cao ZC, et al. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells[J]. Anal Chem, 2008, 80(3): 721-728.
- [2] Yeom JH, Lee B, Kim D, et al. Gold nanoparticle-DNA aptamer conjugate-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively eliminates intracellular Salmonella enterica serovar Typhimurium[J]. Biomaterials, 2016 (104): 43-51.
- [3] Sefah K, Shanguan D, Xiong X, et al. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX[J]. Nat Protoc, 2010, 5(6): 1169-1185.
- [4] Lyu Y, Chen G, Shanguan D, et al. Generating cell targeting aptamers for nanotheranostics using Cell-SELEX[J]. Theranostics, 2016, 6(9): 1440-1452.
- [5] Kashfi-Kheyraadi L, Mehrgardi MA, Wiechec E, et al. Ultrasensitive detection of human liver hepatocellular carcinoma cells using a label-free aptasensor[J]. Anal Chem, 2014, 86(10): 4956-4960.

工作等,这些往往会加重他们的焦虑、抑郁的情绪。Ostler 等<sup>[11]</sup>的研究表明,心智化疗法可有效降低其毒品使用行为,改善负性情绪,解决人际关系问题等。本研究也发现,经心智化疗法干预后,试验组贝克焦虑量表、贝克抑郁量表得分下降较对照组明显,说明心智化疗法干预对甲基苯丙胺成瘾戒毒人员焦虑、抑郁情绪的改善有明显效果。

药物渴求为毒品成瘾复吸事件链上重要的一环,是导致成瘾者戒毒后复吸的主要因素。相关研究证实,吸毒会使个体对吸毒情景和感受产生深刻记忆,进而不断地强化机体对毒品的渴求,而渴求的主要中枢神经基础是中脑边缘多巴胺系统,提示有可能通过生物学、心理学手段对渴求进行干预<sup>[12]</sup>。本次研究结果显示,心智化疗法干预后甲基苯丙胺成瘾试验组与干预前相比,药物渴求量表各因子得分均有明显下降,且干预后试验组较对照组得分低,这也与 Ostler 等<sup>[11]</sup>的研究结果相似,说明通过心智化疗法干预,可以使甲基苯丙胺成瘾者正确认识渴求,有效提高其识别和应对渴求的技能,进而减少复吸行为的发生。

总体来说,心智化疗法可以在一定程度上改善甲基苯丙胺成瘾人员的焦虑、抑郁等负性情绪,并减轻其对毒品的慢性渴求状况,但本研究也存在一些不足和局限,如样本量小,单盲得不到保证,未评估不同类型成瘾人群的应用效果等,这值得本课题组进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] 樊盼英,汪宁.新型毒品滥用对艾滋病流行的影响[J].中华流行病学杂志,2010,31(3):340-343.
- [2] 王会,苏中华.冰毒所致精神障碍患者的空间认知功能损害及治疗转归[J].中国心理卫生杂志,2011,25(9):679-680.
- [3] 王春光,袁明,李勇辉,等.甲基苯丙胺成瘾者对成瘾相关线索的注意偏向特征:字词情绪 Stroop 任务的研究[J].

中国药物依赖性杂志,2015,24(5):391-395.

- [4] 郑健荣,黄炽荣,黄洁晶,等.贝克焦虑量表的心理测量学特性、常模分数及因子结构的研究[J].中国临床心理学杂志,2002,10(1):4-6.
- [5] 肖杨,顾红,丁芳,等.动机-技能-脱敏-心理能量模式对戒毒人员慢性渴求和抑郁的干预效果[J].中国药物依赖性杂志,2012,21(3):211-215.
- [6] 罗勇.戒毒人员脱毒期药物渴求的调查研究[D].重庆:西南师范大学,2004.
- [7] Marsch LA, Dallery J. Advances in the psychosocial treatment of addiction the role of technology in the delivery of evidence-based psychosocial treatment [J]. Psych Clin North Am, 2012, 35(2): 481-493.
- [8] 王玮.认知行为疗法对甲基苯丙胺成瘾患者负性情绪及复吸倾向的干预效果[J].山东医药,2015,55(47):4-6.
- [9] Bateman AW, Fonagy P. Mentalization-based treatment of BPD[J]. J Pers Disord, 2004, 18(1): 36-51.
- [10] Charles-Walsh K, Upton DJ, Hester R. Examining the interaction between cognitive control and reward sensitivity in substance use dependence[J]. Drug Alcohol Depend, 2016, 166(16): 235-242.
- [11] Ostler T, Bahar OS, Jessee A. Mentalization in children exposed to parental methamphetamine abuse: relations to children's mental health and behavioral outcomes[J]. At-ta Hum Dev, 2010, 12(3): 193-207.
- [12] 杨龙雨,张辉,曾军莉,等.甲基苯丙胺依赖者躯体脱毒后慢性渴求及其相关因素分析[J].中国药物依赖性杂志,2015,24(3):218-223.

(收稿日期:2017-02-15 修回日期:2017-06-06)

(上接第 3625 页)

- [6] Lee JH, Yigit MV, Mazumdar D, et al. Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(6): 592-605.
- [7] Jiang F, Liu B, Lu J, et al. Progress and challenges in developing aptamer-functionalized targeted drug delivery systems[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10): 23784-23822.
- [8] Lee H, Lytton-Jean AK, Chen Y, et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery[J]. Nat Nanotechnol, 2012, 7(6): 389-393.
- [9] Lu B, Wang J, Zhang J, et al. Screening and verification of ssDNA aptamers targeting human hepatocellular carcinoma[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(2): 128-135.
- [10] Kaneda Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system [J]. Adv Drug Deliv Rev,

2000, 43(2/3): 197-205.

- [11] Wagner A, Platzgummol M, Kreismayr G, et al. GMP production of liposomes: a new industrial approach[J]. J Liposome Res, 2006, 16(3): 311-319.
- [12] Batist G, Barton J, Chaikin P, et al. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy [J]. Expert Opin Pharmacother, 2002, 3(12): 1739-1751.
- [13] Straubinger RM, Arnold RD, Zhou R, et al. Antivascular and antitumor activities of liposome-associated drugs[J]. Anticancer Res, 2004, 24(2): 397-404.
- [14] Meng L, Yang L, Zhao X, et al. Targeted delivery of chemotherapy agents using a liver cancer-specific aptamer[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e33434.
- [15] Parashar A. Aptamers in therapeutics [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(6): BE01-06.

(收稿日期:2017-02-18 修回日期:2017-06-06)