论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0922-04

光化学作用增强阳离子聚合物介导EGFP转染结肠癌

肖卫东[1],陈 炜[2],陈祖林[1],刘 嘉[1],葛海燕[1] (第三军医大学:[1]新桥医院普通外科,重庆 400037,[2]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察光化学基因转染技术对阳离子聚合物介导目的DNA转染结肠癌细胞效率的影响。**方法** 以结肠癌细胞SW480、HT29为靶细胞,激光共聚焦显微镜观察光敏剂$TPPS_{2a}$的胞内分布,MTT法观察基于$TPPS_{2a}$的光化学作用对结肠癌细胞的生长抑制作用,同时以阳离子聚合物PEI为DNA载体,EGFP质粒为目的DNA,通过流式细胞技术对比观察光化学作用对阳离子聚合物介导EGFP质粒转染结肠癌细胞的影响。**结果** $TPPS_{2a}$在2种结肠癌细胞系呈颗粒状分布于细胞质;基于$TPPS_{2a}$的光动力效应对结肠癌细胞的生长抑制作用随光照剂量增大而逐渐加大,SW480细胞取得IC_{50}的光照时间为约6 min,而HT29取得IC_{50}的光照时间为约12 min;与单纯质粒转染组和阳离子聚合物转染组相比,光化学作用可将阳性细胞率分别提高至(29.61±1.15)(SW480细胞)和(23.47±0.62)(HT29细胞)($P<0.05$)。**结论** $TPPS_{2a}$的胞内分布与内吞密切相关;基于$TPPS_{2a}$的光化学细胞毒性作用呈剂量依赖性;与单纯质粒转染组和阳离子聚合物转染组相比,光化学作用可明显提高阳离子聚合物介导转染目的DNA的阳性细胞率。

关键词:光敏剂;光动力疗法;阳离子聚合物;转染
中图法分类号:R394.2;R730.59;R735.35 **文献标识码**:A

Photochemical effect increases gene transfection of EGFP plasmids mediated by polycation

XIAO Wei-dong[1], CHEN Wei[2], CHEN Zu-lin[1], LIU Jia[1], GE Hai-yan[1] ([1]Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of photochemical gene transfection on colon cancer cells mediated by polycation. **Methods** Based on SW480 and HT29 colon carcinoma cell culture, the intracellular localization of meso-tetraphenylporphine disulfonate ($TPPS_{2a}$) were observed by laser confocal scanning microscopy (LCSM). Photochemically induced cytotoxicity of $TPPS_{2a}$ on SW480 and HT29 cell lines was evaluated by MTT assay. By flow cytometry, the light-induced transfection of EGFP plasmids mediated by PEI was studied. **Results** $TPPS_{2a}$ exhibited typical vesicular localization in two colon carcinoma cell lines. The photochemical cytotoxicity based on $TPPS_{2a}$ increased with light dose. The light dose of IC_{50} was 22 mW/cm^2 for 6 min for SW480 cells and for 12 min for HT29 cells (wavelength: 405 nm). The light treatment based on $TPPS_{2a}$ induced an increase in transfection efficiency to (29.61±1.15) for SW480 cells and (23.47±0.62) for HT29 cells ($P<0.05$) as compared with that of other groups. **Conclusion** Endocytosis is involved in intracellular localization of $TPPS_{2a}$. The inhibition of photochemical cytotoxicity based on $TPPS_{2a}$ depends on the light dose. Photochemical effect could significantly increase the transfection efficiency of target DNA mediated by polycation.

Key words: photosensitizer; photodynamic therapy; polycation; transfection

基因治疗为结肠肿瘤治疗提供了新的前景,而目的基因载体在靶细胞的转染效率则是基因治疗的关键之一。阳离子聚合物是一种相对安全、高效的基因载体,在基因治疗领域有着广阔的应用前景。阳离子聚合物与DNA形成的复合物(polyplexes)主要是通过内吞途径进入细胞。因此提高polyplexes从内吞体(endosome)或溶酶体中完整释放是增加其基因转染的有效途径之一[1]。光化学基因转染(photochemical gene transfection, PCGT)是一种全新的基因转染技术,它通过光化学反应,导致内吞泡膜损伤,释放泡内转染基因。本研究以两种结肠癌细胞系为靶细胞,观察了光化学作用对阳离子聚合物介导增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因转染效率的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(30200056,30271481)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30200056,30271481)
作者简介:肖卫东(1975-),男,内蒙古自治区呼和浩特市人,博士研究生,主治医师,主要从事光动力治疗消化道肿瘤方面的研究。电话:(023)68774605, E-mail:weidong.xiao@126.com
通讯作者:葛海燕,E-mail: haiyange@163.com
收稿日期:2005-07-12;**修回日期**:2005-12-06

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞系　　人结肠腺癌 SW480 及 HT29 细胞系均购自第四军医大学实验动物中心细胞库。

1.1.2　主要仪器　　卤素灯滤波光照射器由我科与重庆光学仪器厂共同研制；Leica LCS NT 激光共聚焦显微镜（laser confocal scanning microscopy，LCSM）及 BD FACStar PLUS 流式细胞仪由第三军医大学高原军事医学系中心实验室提供；Leica 荧光显微镜及 Beckman DU800 紫外分光光度计由新桥医院实验中心提供。

1.1.3　主要试剂　　中介四-（对苯基磺酸）-卟吩钠（meso-tetraphenylporphine with two sulfonate groups on adjacent phenyl rings，$TPPS_{2a}$）由挪威 Radium Hospital 的 Hogset 博士惠赠，pEGFP-C1 质粒购自 Clontech 公司，聚乙烯基亚胺（polyetheneimine，PEI）及 GenElute™ Plasmid Miniprep Kit 小量质粒抽提试剂盒购自 Sigma 公司，大肠杆菌 DH-5α 由本室保存。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　SW480 细胞及 HT29 细胞系均为贴壁生长，常规培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 完全培养液中，培养 3～4 d 传代。

1.2.2　光化学细胞毒性实验　　通过 MTT 实验观察 $TPPS_{2a}$ 对结肠癌细胞的光化学细胞毒作用。分为 4 组：A 组，光动力（photodynamic therapy，PDT）组（细胞光敏化，光照）；B 组，单纯光敏剂组（细胞光敏化，不照光）；C 组，单纯照光组；D 组空白调零组（不加入细胞及光敏剂，只加入培养液）。将结肠癌细胞 SW480 及 HT29 按分组分别接种于 96 孔板，培养 24 h 后加入 $TPPS_{2a}$（终浓度 2 μg/ml）及无酚红完全培养液，避光孵育 16～18 h 后，弃去培养液，PBS 洗 3 次，加入新培养液，分别按不同光照剂量进行光照（光照参数：光照波长 405 nm，功率密度 22 mW/cm^2），光照后继续避光孵育 24 h，每孔加 MTT（5 mg/ml）20 μl，孵育 4 h，吸去培养液，每孔加入二甲亚砜 150 μl，摇床低速摇荡 10 min，酶标仪检测（波长 490 nm）。

1.2.3　质粒抽提纯化及质粒转染复合物的制备　　pEGFP-C1 质粒扩增及抽提纯化按质粒抽提试剂盒说明进行，DU800 紫外分光光度计检测抽提质粒浓度及纯度，琼脂糖电泳验证质粒片段大小。质粒转染复合物的制备[1]：取 PEI 储存液（10 mmol/L）2.55 μl 稀释入 50 μl 无菌水中，轻轻混匀后室温孵育10 min，与质粒稀释液（5 μg 质粒稀释入 50 μl 无菌水）混合，室温孵育 30 min，加无血清培养液到 1 ml，加入细胞。

1.2.4　光化学转染实验　　在转染实验前 1 d，将 SW480 及 HT29 细胞分别接种入 6 孔板，细胞密度 10^5/孔，培养过夜后加入 $TPPS_{2a}$（终浓度 2 μg/ml），避光孵育 16～18 h 后移去，PBS 洗涤细胞 2 次后加入质粒转染复合物（质粒转染复合物制备同前），孵育 4 h，更换完全培养液后 405 nm 光照射；照光后细胞继续避光培养48 h 后行荧光显微镜及流式细胞仪观察。分为4 组：A 组：光化学转染组；B 组：阳离子聚合物转染组（无光敏剂及光照，余同 A 组）；C 组：单纯质粒转染组（仅加入质粒转染）；D 组：单纯光化学组（不加入质粒，加入光敏剂孵育后行与 A 组相同剂量光照）。

1.2.5　激光共聚焦显微镜观察光敏剂的胞内分布　　将 SW480 细胞分别接种入 6 孔培养板，细胞密度 10^5/孔，培养过夜后加入 $TPPS_{2a}$（终浓度 2 μg/ml），避光孵育 16～18 h 后移去，PBS 洗涤细胞 2 次后，激光共聚焦显微镜观察。采用 63 倍油镜，由光电倍增管接收信号并传输入计算机成像。使用氩离子激光器 405 nm 激发光敏剂，通过 600 nm 发射滤波片通道检测光敏剂荧光，单纯细胞荧光图像作为对照。图像经计算机采集存储后，分析荧光图像。

1.2.6　流式细胞仪观察检测转染细胞荧光　　通过 488 nm 波长光激发观测转染细胞的 EGFP 绿色荧光，通过 BD 公司 CELLQuset 软件进行数据分析。

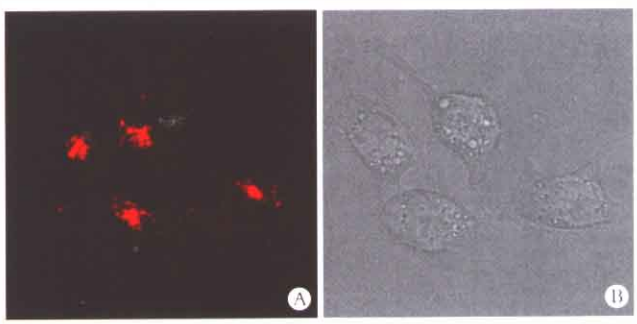
1.3　统计学处理

所有实验结果均重复 3 次，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件进行各组间方差分析。

2　结果

2.1　激光共聚焦显微镜观察 $TPPS_{2a}$ 的细胞内分布

在与细胞孵育 16～18 h 后，$TPPS_{2a}$ 在 2 种结肠癌细胞系呈现出相同的胞内分布，呈颗粒状分布于细胞质（图 1）。



A：$TPPS_{2a}$ 在细胞中的荧光分布图像；B：同一视野下 SW480 细胞常规图像

图 1　$TPPS_{2a}$ 在结肠癌 SW480 细胞中的胞内分布　（LCSM ×630）

2.2　光化学作用对结肠癌细胞的毒性作用及剂量评估

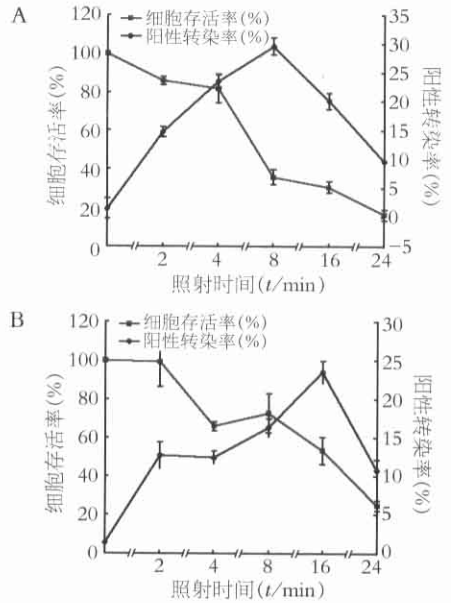
光化学作用对细胞具有一定的毒性作用，因而评估转染光照剂量、优化转染条件，从而在提高转染效率与降低细胞毒性之间取得平衡非常重要。本实验通过 MTT 实验观察 $TPPS_{2a}$ 对两种结肠癌细胞系的光化学毒性作用，结果表明，与对照组相比，$TPPS_{2a}$ 光动力作用可明显抑制 SW480 和 HT29 细胞生长（$P<0.05$）。在同一光照剂量下，SW480 细胞较 HT29 细胞对光化学毒性作用更加敏感，SW480 细胞取得 IC_{50} 的光照时间为约 6 min，而 HT29 取得 IC_{50} 的光照时间为约 12 min。

2.3　流式细胞仪检测转染 EGFP 荧光

本实验通过流式细胞仪检测表达 EGFP 细胞的绿色荧光，对成功转染 EGFP 的阳性细胞率（阳性细胞数与活细胞的比率）做定量观察，结果表明，单纯使用 PEI 的转染率为（14.21 ± 0.95），光化学作用可分别将阳性细胞率提高至（29.61 ± 1.15）（SW480 细胞）和（23.47 ± 0.62）（HT29 细胞），与单纯质粒转染组和阳离子聚合物转染组相比，光化学作用可明显提高 PEI 介导转染的阳性细胞率（$P<0.05$）。

在一定光照剂量范围内，随着光照剂量的增加，阳性细胞在活细胞中的比率呈上升趋势，而随着光照剂量的进一步增

大，细胞存活率明显下降，而阳性细胞率也呈明显下降趋势，同时结果还显示，在相同光敏剂浓度及光照剂量下，不同细胞系对光化学作用表现出不同的敏感性，转染细胞率明显不同，SW480 在照射 8 min 时的阳性细胞率最高，但此时的细胞存活率仅为约 30%，而 HT29 则在照射 12 min（细胞存活率为约 50%）时取得最高阳性细胞率。而单纯的光化学作用不能增加质粒的转染效率（图 2）。



A：PDT 对 SW480 细胞生存率及转染率的影响；B：PDT 对 HT29 细胞生存率及转染率的影响

图 2 光照时间对结肠癌存活及 EGFP 转染率的影响

3 讨论

基因治疗为肿瘤治疗提供了一种全新的手段，目前基因治疗载体种类很多，但都存在着包括生物安全性、体内转染效率等方面的限制，多数基因载体被靶细胞胞吞后大部分只能滞留在内吞泡中最终被溶酶体降解，只有少数能从内吞泡中逸出进入细胞质，这样就大大影响了转染效率，难以达到预期目的[2]。

阳离子聚合物是一种相对安全、高效的基因载体。与阳离子脂质体和 DNA 形成的复合物（lipoplexes）相比，阳离子聚合物与 DNA 所形成的复合物（polyplexes）具有更大的可变性，表现在可以通过对阳离子聚合物的结构修饰来改变它的理化性质、提高转染效率、增加稳定性和靶向释放[3]。

Polyplexes 主要是通过内吞途径进入细胞。因此提高 polyplexes 从内体或溶酶体中完整释放的效率是增加其基因转染的有效途径之一，通常认为 PEI 可通过“质子海绵机制”（proton sponge mechanism）可有效的进行内吞释放，但有研究表明：PEI 的内吞释放作用仍不充分，特别是在低剂量下，有人认为这与 PEI/DNA 复合物的体积有关，而具体的机制仍不清楚[4]。

PCGT 也称为“光化学内化”（photochemical internalization），是新近发展起来的一种基因转染技术，它通过特定波长的光激活位于靶细胞内吞泡的光敏剂，启动光化学反应，产生单态氧和三态氧等活性氧成分，这样，通过光化学反应导致内吞泡膜损伤，释放泡内转染基因进入细胞质，从而顺利入核内转染[5]。

光敏剂是诱发细胞内光化学反应的基础，其胞内分布特点决定不同的作用位点。$TPPS_{2a}$为一种两亲性光敏剂，易于接触内吞泡和溶酶体膜的内表面，它的亲水部分伸入这些小体的膜中[6]。在光照活化后，$TPPS_{2a}$产生的单态氧与膜成分反应，造成内吞泡损伤破裂，从而诱导内吞逃逸。LCSM 观察可以发现，$TPPS_{2a}$主要以荧光颗粒的形式分布于细胞质，这表明 $TPPS_{2a}$的分布与内吞体密切相关，而我们的前期实验也表明：$TPPS_{2a}$与内吞指示剂 FITC-dextran 的共分布观察可见，二者共同以颗粒形式分布于细胞质内部，这也证实了上述结果；激发 $TPPS_{2a}$光敏化的细胞，可见内吞的荧光颗粒向周围弥散。出现胞内荧光再分布的主要原因，可能是光化学作用损伤内吞泡，内吞的大分子 FITC-dextran 逃逸出内吞体，重新分布到细胞质[7]。

本实验结果表明，在一定的光照剂量范围内，PCGT 可明显促进阳离子聚合物的转染效率。不使用 PEI，单纯的光化学效应不能促进质粒 DNA 转染，这表明：①PCGT 技术可促进阳离子聚合物的基因转染效率，而其作用机制与 PCGT 对基因载体的内吞释放作用密切相关，也在一定程度上表明 PEI 的内吞释放仍是不充分的；②PCGT 技术仍需要一种载体将靶基因运送到细胞内部，阳离子聚合物有潜力做为 PCGT 的理想载体。PCGT 改善内吞释放的技术特点决定了二者联合应用的互补性。

光化学作用通常可产生细胞毒性作用，降低细胞存活率，而在一定剂量范围内活细胞中这种光化学毒性效应通常是可逆转的，在光处理后 24 h 内即可恢复正常生长特性[8]。因而如何优化转染条件从而在提高转染效率与降低细胞毒性之间取得平衡非常重要。本实验结果表明：PCGT 的转染效率具有光照剂量依赖性。为了诱导内吞膜损伤，使用一定剂量的光照是必需的。在剂量阈值范围内，增加光照剂量可明显提高转染效率，但剂量过大，导致细胞存活率下降，转染效率明显降低。研究显示：在杀死 50% 细胞的光照剂量通常可取得最大转染效率，而低于此剂量也可明显提高转染效率，从而降低细胞死亡率。同时，在移除光敏剂后适当推迟照光时机也可降低光化学作用对质膜的损伤，研究表明 4 h 左右的间隔时间即可有效降低光化学损伤，增强转染[5,8]。本实验通过观察两种结肠癌细胞系发现：细胞存活率在 50% ~70% 时可取得较好的转染效率，但具体的转染条件仍应进一步优化。

此外，PCGT 也依赖于细胞系类型，这与不同细胞

系对光化学作用的敏感性不同有关。本实验所采用的两种人源结肠癌细胞系具有不同的分化特征，HT29 细胞是一种中分化腺癌细胞，而 SW480 细胞则是一种相对低分化的腺癌细胞。研究表明：肿瘤细胞的分化程度与细胞对光化学反应的敏感性密切相关[9,10]。本实验结果显示：SW480 较 HT29 细胞对光化学作用敏感，而相同条件下，SW480 的转染效率均高于 HT29。这表明肿瘤细胞的分化程度与基因转染效率有关。

PCGT 对两种结肠癌细胞均有不同程度的转染增强作用，表明了 PCGT 在结肠肿瘤基因治疗领域的应用前景。PCGT 与常规方法比较转染效率更高，可有效降低转染分子的剂量，减少副作用，这对肿瘤基因治疗中所使用针对癌细胞的细胞毒性分子以及病毒载体非常有意义。同时 PCGT 是基于光动力治疗（photodynamic therapy，PDT）原理发展而来的，如果能充分利用肿瘤光敏剂选择性聚集在肿瘤、肿瘤血管以及肿瘤附近的正常组织血管床的特点，有可能提高转染基因在肿瘤细胞的表达。

参考文献：

[1] HUTH S, LAUSIER J, GERSTING S W, *et al*. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer [J]. J Gene Med, 2004, 6(8): 923 - 936.

[2] WAGNER E, OGRIS M, ZAUNER W. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 30(3): 97 - 113.

[3] OGRIS M, WALKER G, BLESSING T, *et al*. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes [J]. J Control Release, 2003, 91(1 - 2): 173 - 181.

[4] BIEBER T, MEISSNER W, KOSTIN S, *et al*. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes [J]. J Control Release, 2002, 82(3): 441 - 454.

[5] BERG K, SELBO P K, PRASMICKAITE L, *et al*. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol [J]. Cancer Res, 1999, 59(6): 1180 - 1183.

[6] SAILER R, STRAUSS W S, EMMERT H, *et al*. Plasma membrane associated location of sulfonated meso-tetraphenylporphyrins of different hydrophilicity probed by total internal reflection fluorescence spectroscopy [J]. Photochem Photobiol, 2000, 71(4): 460 - 465.

[7] 肖卫东，陈　炜，陈祖林 等. 光化学作用对肿瘤细胞内吞大分子的释放. 中国激光医学杂志，2006，15(1)：1 - 5.

[8] BONSTED A, ENGESAETER B O, HOGSET A, *et al*. Transgene expression is increased by photochemically mediated transduction of polycation-complexed adenoviruses [J]. Gene Ther, 2004, 11(2): 152 - 160.

[9] 肖卫东，葛海燕，陈祖林. 5-ALA 光动力疗法对人结肠腺癌 SW480 细胞的抑制作用[J]. 激光杂志，2004，24(4)：87 - 88.

[10] ORTEL B, SHARLIN D, O'DONNELL D, *et al*. Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells [J]. Br J Cancer, 2002, 87(11): 1321 - 1327.

（编辑　栾　嘉）

（上接 915 页）

热；术后 3 d 体温仍大于 38 ℃，首先检查切口，除外创面感染，其次，应考虑为肺部感染。

3.2.2　视力观察[12]　自制监测灯术后 72 h 每 2 小时观察 1 次，了解患者视力变化，并准确记录时间，及时报告医生。

3.2.3　脑脊液鼻漏护理　保持半坐卧位，防止脑脊液返流，观察并记录量及颜色，防填塞、抠鼻，保持清洁，防止感染。

3.2.4　预见性护理　患者清醒后，抬高床头 15 ~ 30°，缓解脑及眼眶组织水肿，降低颅内压和眶内压。保持呼吸道通畅，持续低流量吸氧，鼓励患者咳嗽排痰，定时翻身，拍背，超声雾化，尽可能让患者早期下床作适量的活动。控制输液速度及输液量，成人每日静脉补充液体量不超过 3 000 ml，除脱水剂外，液体速度控制在 60 ~ 80 滴/min，防止脑水肿、心衰。加强基础护理，禁食者易发生口臭、口腔溃疡等，每日早晚用 1∶5 000 呋喃西林液漱口，直到正常饮食为止。3 d 后仍不能进食者需鼻饲饮食，给予营养支持。

3.3　健康教育

饮食指导：应给予高热量、高蛋白、高维生素、易消化食物。实眼护理指导：在日间应带太阳镜或眼罩保护，晚间用干净湿纱布覆盖。流泪时，用干净的卫生纸或手帕擦拭。眼睛干燥时用眼药水滴眼。视力障碍患者指导：卧床休息，勿下地单独活动。用眼罩保护角膜，使双眼得到休息，促进视力视野改善。

3.4　出院指导

安全防护：外出有专人陪护。出院带药：抗癫痫药物一定根据医嘱按时服用。头痛的处理：可适当服用止痛药。但头痛剧烈、呕吐频繁时，应及时就诊。常规 3 个月后复查，病情变化及时就诊。

4　讨论

由于显微外科新技术的应用，大大提高了本病治愈率，减少了并发症发生。为了配合这些新技术的应用，护理也提出了新的要求。除传统护理方法外，更要实行护理多元化，包括神经科、眼科及基础护理，进行预见性护理，健康教育和出院指导[13]。根据肿瘤大小、手术方法、并发症及预见性并发症制定新的护理措施，使患者并发症明显减少。

关键词：颅-眶沟通瘤；护理

中图法分类号：R473.74　　文献标识码：B

参考文献：

[1] CLEARY M, WALTER G, HUNT G. The experience and views of mental health nurses regarding nursing care delivery in an integrated, inpatient setting[J]. Int J Ment Health Nurs, 2005, 14(2): 72 - 77.

[2] 赵　荷，张艳玲. 颅眶沟通性神经鞘瘤切除术的护理[J]. 中华护理杂志，2000，35(8)：507 - 508.

[3] PIZZO B. New directions in oncology nursing care: focus on gefitinib in patients with lung cancer[J]. Clin J Oncol Nurs, 2004, 8(4): 385 - 392.

（编辑　龙　亮）