

## · 分子靶向诊断与治疗 ·

# 骨髓间充质干细胞介导 NIS 基因及金纳米颗粒治疗乳腺癌的实验研究

张璐<sup>1</sup> 郭睿<sup>1</sup> 郑本超<sup>2</sup> 苗莹<sup>1</sup> 张春富<sup>2</sup> 李彪<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科 200025; <sup>2</sup> 上海交通大学 Med-X 研究院、生物医学工程学院 200030

通信作者:李彪, Email: lb10363@rjh.com.cn

**【摘要】目的** 制备转染治疗基因早期生长反应蛋白 1(Egr1)-钠碘同向转运体(NIS)并携带金纳米颗粒(AuNPs)的骨髓间充质干细胞(BMSCs),探讨 Egr1 对 NIS 表达的促进和 AuNPs 的辐射增敏作用。**方法** 采用慢病毒(Lv)-Egr1-NIS-巨细胞病毒(CMV)-绿色荧光蛋白(GFP)及 Lv-Egr1-GFP 颗粒对 BMSCs 进行基因转染,制备 BMSCs-Egr1-NIS 及 BMSCs-Egr1-GFP(对照)。通过摄碘实验验证在不同放射性浓度碘诱导下 NIS 基因的表达;用激光共聚焦显微镜观察 BMSCs 吞噬 AuNPs 的最佳温育时间、质量浓度;进行细胞毒性实验,分析 AuNPs 对 BMSCs-Egr1-NIS 细胞活性的影响;通过摄碘实验研究 BMSCs-Egr1-NIS 吞噬和未吞噬 AuNPs 对基因表达的影响;用细胞迁移实验验证 BMSCs-Egr1-NIS 在吞噬和未吞噬 AuNPs 的情况下对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外靶向性;探索不同质量浓度 AuNPs 对<sup>131</sup>I 杀伤乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的辐射增敏作用。采用单因素方差分析及 Dunnett t 检验比较多组间数据差异。**结果** 成功制备转染治疗基因 Egr1-NIS 的 BMSCs(非稳转),即 BMSCs-Egr1-NIS。在辐射诱导下 Egr1 可以增加 NIS 的表达,BMSCs-Egr1-NIS 较 BMSCs-Egr1-GFP 摄碘能力提高 2.5~5 倍或更高;BMSCs 吞噬 AuNPs 的最佳温育条件是 AuNPs 0.20 g/L 温育 24 h 或者 0.10 g/L 温育 48 h;AuNPs 的细胞毒性非常低,对细胞的摄碘能力和体外靶向性没有影响;BMSCs-Egr1-NIS 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 具有体外靶向性;AuNPs 对<sup>131</sup>I 的辐射增敏实验示,各<sup>131</sup>I 杀伤组与无<sup>131</sup>I 的空白对照组活细胞染色吸光度( $A_{570}$ )差异有统计学意义( $F=60.670, P<0.01$ ),AuNPs 质量浓度为 0.20 和 0.40 g/L 的实验组<sup>131</sup>I 对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用高于 0 g/L 组, $A_{570\text{ nm}}$ 值分别为 0.87±0.05、0.41±0.07 和 1.39±0.11(均  $P<0.01$ )。**结论** BMSCs 可转染治疗基因 Egr1-NIS 并携带 AuNPs,作为靶向乳腺癌的载体,在放射性碘的作用下增强 NIS 基因表达,同时 AuNPs 可作为<sup>131</sup>I 治疗的辐射增敏剂。

**【关键词】** 间质干细胞;骨髓;转染;早期生长反应蛋白;钠碘转运体;金属纳米粒子;乳腺肿瘤;肿瘤细胞,培养的

基金项目:国家自然科学基金(81471686, 81671715)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20191210-00291

## Vitro experiment of bone marrow mesenchymal stem cells mediated NIS gene and gold nanoparticles in the treatment of breast cancer

Zhang Lu<sup>1</sup>, Guo Rui<sup>1</sup>, Zheng Benchao<sup>2</sup>, Miao Ying<sup>1</sup>, Zhang Chunfu<sup>2</sup>, Li Biao<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Nuclear Medicine, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; <sup>2</sup> School of Biomedical Engineering & Med-X Research Institute, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Corresponding author: Li Biao, Email: lb10363@rjh.com.cn

**【Abstract】 Objective** To prepare bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transfected with therapeutic gene early growth reactive protein 1 (Egr1)-sodium/iodine symporter (NIS) and carrying gold nanoparticles (AuNPs), and to investigate the feasibility of Egr1 in promoting NIS expression and the radiosensitization effect of AuNPs. **Methods** BMSCs transfected with lentivirus (Lv)-Egr1-NIS-cytomegalovirus (CMV)-green fluorescent protein (GFP) in the experimental group and Lv-Egr1-GFP in the control group were prepared and the expression of NIS induced by radioiodine was verified by iodine uptake determination. The optimal incubation time and concentration of AuNPs were observed with laser confocal microscopy. The cytotoxicity of AuNPs suspension liquid was investigated using cytotoxicity test. Iodine uptake assay was performed to investigate NIS gene expression of BMSCs-Egr1-NIS incubated with AuNPs. In vitro chemotaxis of BMSCs-Egr1-NIS incubated with/without AuNPs to breast cancer cells were verified by cell migration experiment. The radiosensitization effect of AuNPs for <sup>131</sup>I on killing breast cancer cells MDA-MB-231 were ex-

plored. The one-way analysis of variance and Dunnett *t* test were used for data analysis. **Results** BMSCs-Egr1-NIS (unstable transformation) was successfully prepared. Egr1 could promote NIS expression with the induction of radioiodine. The iodine uptake capacity in BMSCs-Egr1-NIS increased by 2.5–5 times or even higher compared with BMSCs-Egr1-GFP. The better incubation conditions of AuNPs for BMSCs phagocytosis were 0.20 g/L(24 h) or 0.10 g/L(48 h). The cytotoxicity of AuNPs was low in appropriate incubation time and concentration, and there was no effect on iodine uptake and chemotaxis. The chemotaxis to MDA-MB-231 of BMSCs-Egr1-NIS was identified. AuNPs radiosensitization assay showed that absorbance ( $A_{570\text{ nm}}$ ) of MDA-MB-231 cells were significantly different in  $^{131}\text{I}$  killing groups and blank control group without  $^{131}\text{I}$  ( $F=60.670$ ,  $P<0.01$ ), and the cytotoxicity of  $^{131}\text{I}$  to MDA-MB-231 cells in the  $^{131}\text{I}$  killing groups with 0.20 g/L AuNPs and 0.40 g/L AuNPs ( $A_{570\text{ nm}}$  values:  $0.87\pm0.05$ ,  $0.41\pm0.07$ ) was significantly higher than that in the group with 0 g/L AuNPs ( $A_{570\text{ nm}}=1.39\pm0.11$ ; both  $P<0.01$ ). **Conclusions** BMSCs, transfected with therapeutic gene Egr1-NIS and incubated with AuNPs, can be used as a carrier to target breast cancer. NIS gene expression of BMSCs-Egr1-NIS was highly promoted in the presence of radioiodine. At the same time, AuNPs can be used as a radiation sensitizer for  $^{131}\text{I}$  treatment.

**【Key words】** Mesenchymal stem cells; Bone marrow; Transfection; Early growth response protein 1; Sodium/iodide symporter; Metal nanoparticles; Breast neoplasms; Tumor cells, cultured

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China(81471686, 81671715)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20191210-00291

将钠碘同向转运体(sodium/iodide symporter, NIS)导入恶性肿瘤基因组中,基因过表达后可利用跨膜钠离子浓度梯度作为驱动力将碘离子转运入细胞,据此可通过放射性碘内照射治疗恶性肿瘤<sup>[1-4]</sup>。早期生长反应蛋白1(early growth response protein 1, Egr1)存在于多种细胞中(如成纤维细胞、上皮细胞、B细胞等),其作为辐射敏感启动子,可被电离辐射诱导激活并启动其下游基因转录<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究证实,将NIS治疗基因连接在Egr1下游可起到调控NIS表达及增强疗效的作用,但在短时间内放射性碘会从肿瘤细胞内排出,导致NIS基因治疗达不到预期效果<sup>[1,6]</sup>。金纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)有独特的光学性质、良好的组织相容性和易控的表面修饰性<sup>[7-8]</sup>,其在接受X射线或γ射线照射后,可产生较强的光电吸收效应和二次电子<sup>[9]</sup>,增强射线对周围组织的杀伤力,进而弥补核素滞留时间短所致疗效受限这一不足。

治疗基因及纳米材料的体内靶向递送也是肿瘤治疗研究的重要科学问题。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)可趋向肿瘤细胞分泌的多种细胞因子,进而靶向肿瘤组织<sup>[10-11]</sup>。本课题组前期研究已证实BMSCs在体内可向脑胶质瘤迁移,达到靶向抑瘤作用,并通过核素显像实时监测基因治疗疗效<sup>[12-14]</sup>。本研究拟构建表达治疗基因Egr1-NIS并携带AuNPs的BMSCs,探讨AuNPs对BMSCs-Egr1-NIS细胞活性、目的基因表达和靶向性的影响,以及AuNPs在 $^{131}\text{I}$ 治疗乳腺癌细胞MDA-MB-231中的辐射增敏作用。

## 材料与方法

### 1. 主要材料与仪器。慢病毒(Lentivirus, Lv)-

Egr1-NIS-巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和Lv-Egr1-GFP颗粒制备服务由上海西图生物科技有限公司提供。大鼠BMSCs购自中国科学院细胞库/干细胞库(上海),本实验室冻存有乳腺癌MDA-MB-231细胞。AuNPs由上海交通大学Med-X研究院生物医学工程学院提供,粒径约1 nm,具有荧光特性(最大激发波长为460 nm,最大发射波长为580 nm)。 $\text{Na}^{125}\text{I}$ 及 $\text{Na}^{131}\text{I}$ 购自上海欣科医药有限公司,其中 $\text{Na}^{125}\text{I}$ 主要用于体外实验中诱导基因表达, $\text{Na}^{131}\text{I}$ 主要用于肿瘤细胞的杀伤实验。倒置荧光显微镜为日本奥林巴斯CKX41型;激光共聚焦显像仪品牌型号为德国徕卡TCS SP5型;台式高速冷冻离心机、细胞培养箱购自德国Heraeus公司;自动酶标检测仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DFM96型多管放射免疫计数仪购自合肥众成机电技术开发有限公司。

2. 构建表达目的基因的BMSCs。大鼠BMSCs接种于直径为10 cm的培养皿中,再置于37 °C、含体积分数5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。以50的感染复数(multiplicity of infection, MOI)转染Lv-Egr1-NIS-CMV-GFP和Lv-Egr1-GFP,培养48 h后观察细胞内的绿色荧光。转染后的细胞分别记为BMSCs-Egr1-NIS和BMSCs-Egr1-GFP(对照)。

3. 检测AuNPs的细胞毒性。将BMSCs-Egr1-NIS接种在96孔板,用含不同质量浓度(0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 g/L)AuNPs的完全培养液加入各孔,每个质量浓度组设置5个复孔,于温育24、48、72、96 h后吸出培养液,每孔加入10 μl细胞增殖-毒性检测液(cell counting kit-8, CCK-8),培养1 h

后测定 450 nm 处吸光度 (absorbance,  $A$ ) , 即  $A_{450\text{ nm}}$ 。

4. 探索 AuNPs 温育最佳条件。将 BMSCs-Egr1-NIS 接种于激光共聚焦专用培养皿中, 以不同质量浓度 (0.01、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 g/L) AuNPs 混悬液与 BMSCs-Egr1-NIS 共温育不同时间 (12、24、36、48 h), 然后用质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 Hoechst 33258 染色液染色 5 min, 采用激光共聚焦显微镜观察细胞内荧光。以 AuNPs 浓聚明显时的质量浓度和温育时间为最佳温育条件。

5. 验证目的基因表达。(1) 目的基因表达。将 BMSCs-Egr1-NIS 和 BMSCs-Egr1-GFP 接种于 24 孔板, 配制放射性浓度梯度为 0.23、0.46、0.93、1.85、3.70、7.40、14.80 kBq/L 的  $\text{Na}^{125}\text{I}$  溶液, 每个放射性浓度组设置 3 个复孔, 作用 36 h 后吸出  $\text{Na}^{125}\text{I}$  溶液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered solution, PBS) 清洗 3 次。进行摄碘实验, 每孔加入含 3.7 kBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$  及 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  NaI 的 Hank 平衡盐溶 (Hank's balanced salt solution, HBSS), 温育 30 min 后用预冷 HBSS 洗 3 次, 加入 1 mol/L NaOH 溶液裂解细胞, 再用  $\gamma$  计数仪测定放射性计数 ( $\text{min}^{-1}$ )。

(2) AuNPs 对目的基因表达的影响。将 BMSCs-Egr1-NIS 接种在 24 孔板, 与不同质量浓度 (0.01、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 g/L) AuNPs 混悬液温育 24 h, 每组 3 个复孔, 以 3.7 kBq/L 的  $\text{Na}^{125}\text{I}$  溶液内照射 36 h 后进行摄碘实验; 将 BMSCs-Egr1-NIS 和 BMSCs-Egr1-GFP 接种在 24 孔板, 每组设置 6 个复孔, 每孔加入含 3.7 kBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$  的培养液, 作用 36 h 后吸出溶液, 以 PBS 清洗 3 次。在每组的 3 个复孔中加入 0.20 g/L 的 AuNPs 溶液, 另外 3 孔作为对照, 温育 24 h 后进行摄碘实验。

6. 研究体外靶向性。将 MDA-MB-231 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 放入 Transwell 小室, 将吞噬、未吞噬 AuNPs 的 BMSCs-Egr1-NIS 分别接种于上层小室内 ( $5 \times 10^4$  个), 同时设置下方无 MDA-MB-231 的未吞噬 AuNPs 空白对照组, 每组 3 个复孔, 共温育 24 h 后取出小室, 用质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min, 质量分数 0.1% 结晶紫染色 20 min, 然后用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, 在光学显微镜下观察细胞迁移情况并拍照, 用质量分数 33% 乙酸溶液脱色 15 min, 测  $A_{570\text{ nm}}$ 。

7. 探究 AuNPs 的辐射增敏作用。将不同质量浓度 (0、0.05、0.10、0.20、0.40 g/L) AuNPs 与 MDA-MB-231 细胞共温育, 每孔加入 11.1 kBq/L 的  $^{131}\text{I}$ , 另设无  $^{131}\text{I}$  的空白对照。作用 48 h 后撤出培养液, 用甲醇

固定 30 min, 质量分数 0.1% 结晶紫染色 20 min, 质量分数 33% 乙酸溶液脱色 15 min, 测每孔  $A_{570\text{ nm}}$ 。

8. 统计学处理。采用 GraphPad Prism7.0 软件, 符合正态分布的定量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析及 Dunnett  $t$  检验进行多组间差异分析及进一步的两两比较, 以配对  $t$  检验和两样本  $t$  检验比较 2 组间差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 表达目的基因的 BMSCs。Lv-Egr1-NIS-CMV-GFP 和 Lv-Egr1-GFP 转染 BMSCs 后, 于荧光显微镜下观察到细胞内有明显绿色荧光 (图 1), 表明转染成功。

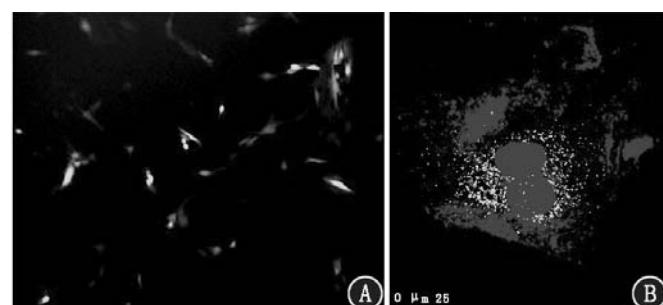


图 1 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 转染基因后的绿色荧光蛋白 (GFP) 表达检测图。A. 转染后 48 h 荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光 ( $\times 100$ ); B. 激光共聚焦显微镜下观察到细胞质内 GFP

2. 目的基因表达增强情况。体外摄碘实验结果 (图 2) 显示, 随着  $^{125}\text{I}$  放射性浓度的增加, BMSCs-Egr1-NIS 和 BMSCs-Egr1-GFP 摄碘均逐渐增加; 当  $^{125}\text{I}$  放射性浓度  $\geq 1.85$  kBq/L 时, BMSCs-Egr1-NIS 摄碘可较 BMSCs-Egr1-GFP 提高 2.5~5 倍甚至更高, 差异有统计学意义 (1.85 kBq/L 组:  $t = 3.668$ ,  $P < 0.05$ ; 3.70 kBq/L 组:  $t = 20.980$ ,  $P < 0.01$ ; 7.40 kBq/L 组:  $t = 18.770$ ,  $P < 0.01$ ; 14.80 kBq/L 组:  $t = 22.850$ ,  $P < 0.01$ )。

3. AuNPs 对 BMSCs-Egr1-NIS 的细胞毒性及最佳温育条件。CCK8 实验结果显示 AuNPs 温育质量浓度不超过 0.40 g/L 时, 温育时间不超过 96 h, 没有明显细胞毒性 (图 3)。激光共聚焦显微镜显示细胞吞噬的 AuNPs 主要集中在 BMSCs-Egr1-NIS 细胞质内, 呈现橙黄色荧光, 0.20 g/L AuNPs 温育 24 h 或 0.10 g/L AuNPs 温育 48 h 时, 细胞内可以观察到大量 AuNPs (图 4A), 部分细胞内可聚集呈团 (图 4B)。

4. AuNPs 对 BMSCs-Egr1-NIS 摄碘的影响。不同质量浓度 AuNPs (0.01、0.02、0.04、0.08、0.10、0.20、

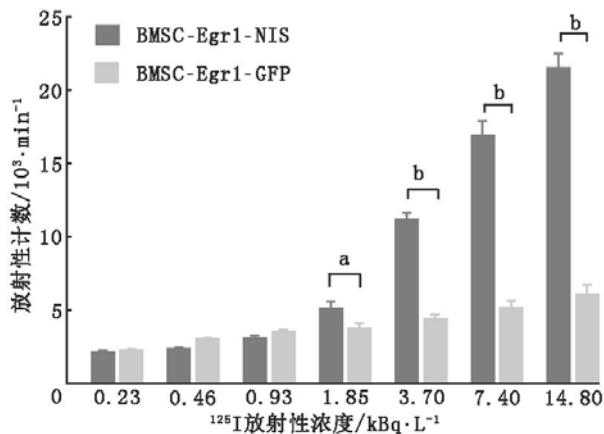


图 2 不同放射性浓度  $^{125}\text{I}$  照射后细胞摄碘情况 ( $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$ )。BMSCs 为骨髓间充质干细胞, Egr1 为早期生长反应蛋白 1, GFP 为绿色荧光蛋白, NIS 为钠碘同向转运体

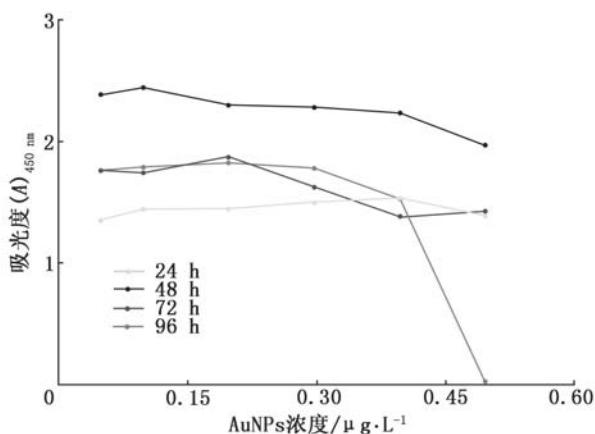


图 3 不同质量浓度金纳米颗粒 (AuNPs) 对大鼠 BMSCs-Egr1-NIS 的毒性检测结果。温育时间不超过 96 h, 质量浓度低于 0.40 g/L, 对细胞活性没有明显影响

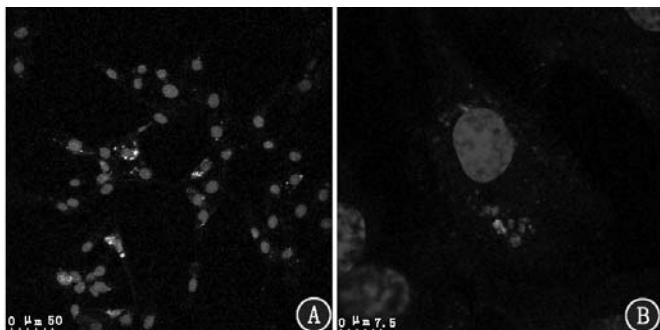


图 4 BMSCs-Egr1-NIS 吞噬的 AuNPs。激光共聚焦显微镜下观察, 聚集在细胞内的 AuNPs 显示为橙黄色荧光 (A), 部分呈团簇状聚集 (B)

0.40 g/L) 与 BMSCs-Egr1-NIS 共温育并经  $^{125}\text{I}$  内照射诱导后, 细胞放射性计数 ( $\text{min}^{-1}$ ) 分别为  $11\ 793 \pm 942$ 、 $10\ 611 \pm 982$ 、 $12\ 195 \pm 1\ 068$ 、 $11\ 863 \pm 1\ 453$ 、 $10\ 473 \pm 1\ 173$ 、 $10\ 496 \pm 413$ , 摄碘差异无统计学意义 ( $F = 1.702$ ,  $P > 0.05$ )。吞噬、未吞噬 AuNPs 的 BMSCs-Egr1-NIS 放射性计数 ( $\text{min}^{-1}$ ) 分别为  $10\ 092 \pm 622$  和  $9\ 654 \pm 476$  ( $t = 1.093$ ,  $P < 0.01$ ), 吞噬、未吞噬 AuNPs 的 BMSCs-Egr1-GFP 放射性计数 ( $\text{min}^{-1}$ ) 分别为  $3\ 219 \pm$

$160$  和  $3\ 189 \pm 132$  ( $t = 1.728$ ,  $P < 0.01$ ), 是否吞噬 AuNPs 对细胞摄碘没有影响。

5. AuNPs 对 BMSCs 靶向 MDA-MB-231 细胞的影响。Transwell 实验结果显示无 MDA-MB-231 且未吞噬 AuNPs 的空白对照组、有 MDA-MB-231 且未吞噬 AuNPs 的 BMSCs-Egr1-NIS 组、有 MDA-MB-231 且吞噬 AuNPs 的 BMSCs-Egr1-NIS 组  $A_{570\text{ nm}}$  分别为  $0.23 \pm 0.03$ 、 $0.84 \pm 0.05$  和  $0.74 \pm 0.03$ , 3 组间差异有统计学意义 ( $F = 193.900$ ,  $P < 0.01$ ); 其中空白对照组与 MDA-MB-231 组的迁移细胞数差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ), 吞噬与未吞噬 AuNPs 的 2 组 (有 MDA-MB-231) 间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。迁移细胞结晶紫染色后的光学显微镜下观察图见图 5。

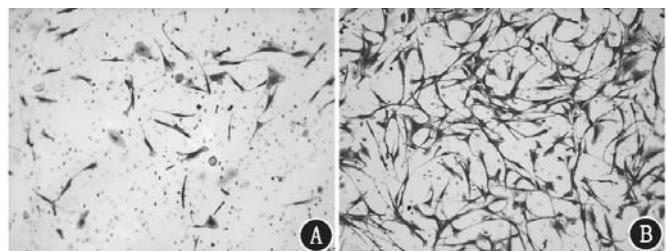


图 5 光学显微镜下观察到的 BMSCs 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外靶向性 (结晶紫  $\times 40$ )。A. 无肿瘤细胞组迁移细胞较少; B. 有肿瘤细胞组迁移细胞多

6. AuNPs 对  $^{131}\text{I}$  的辐射增敏作用。 $^{131}\text{I}$  杀伤组 (0.05、0.10、0.20、0.40 g/L AuNPs 与 MDA-MB-231 细胞共温育组) 活细胞少于无  $^{131}\text{I}$  的空白对照组,  $A_{570\text{ nm}}$  分别  $1.39 \pm 0.11$ 、 $1.37 \pm 0.15$ 、 $1.20 \pm 0.18$ 、 $0.87 \pm 0.05$ 、 $0.41 \pm 0.07$  和  $2.41 \pm 0.24$ , 组间差异具有统计学意义 ( $F = 60.670$ ,  $P < 0.01$ ); 各  $^{131}\text{I}$  杀伤组与空白对照组两两比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 在  $^{131}\text{I}$  杀伤的 5 组中, AuNPs 质量浓度  $\geq 0.20$  g/L 的 2 组活细胞少于 0 g/L 组 (均  $P < 0.01$ ), 而 AuNPs 质量浓度  $< 0.20$  g/L 的 2 组与 0 g/L 组差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

## 讨 论

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种非造血的多能细胞, 可以有多种不同的来源, 较易从体内分离并扩增<sup>[15]</sup>。由于具有绕过宿主免疫监视的能力<sup>[16-17]</sup>, 其可在体内迁移到多种肿瘤部位, 表达并释放多种细胞因子和趋化因子受体<sup>[18-19]</sup>, 因此 MSCs 可作为靶向肿瘤递送治疗药物或其他生物制品的良好载体。此前已有研究报道 MSCs 可靶向乳腺肿瘤组织<sup>[20-22]</sup>。BMSCs 属于其中的一种, 具有成骨、成脂的定向分化能力。本研究通

过体外趋化性实验验证了 BMSCs 具有向乳腺癌细胞靶向迁移的特性。

基因治疗是恶性肿瘤治疗的重要研究方向。已有多项研究证实辐射敏感的 Egr1 启动子具有被射线诱导并启动其下游基因转录的特性<sup>[1-2,6,12]</sup>。结果显示,将治疗基因 NIS 连接在 Egr1 下游后,在<sup>131</sup>I 的诱导下,Egr1 被激活并启动下游连接的 NIS 基因,增加细胞<sup>131</sup>I 摄取,这又进一步激活 Egr1 启动子,诱导更多的 NIS 蛋白表达,提高肿瘤部位的放射性摄取;同时,可借助 NIS 基因进行核素显像,监测基因治疗情况<sup>[1,13-14]</sup>。本研究中构建了携带治疗基因 Egr1-NIS 的 BMSCs,摄碘实验结果显示随着<sup>125</sup>I 内照射浓度升高,细胞摄碘逐渐增加,当超过 3.7 kBq/L 时,BMSCs-Egr1-NIS 组与 BMSCs-Egr1-GFP 组摄碘差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),放射性浓度越高,差异越明显,这也说明 NIS 蛋白的表达与核素内照射剂量相关,且当核素浓度到达一定阈值时,即触发基因表达开关,NIS 的表达开始显著增加。但是,即使细胞摄取<sup>131</sup>I 不断增加,<sup>131</sup>I 仍然会不断流出,最后达到平衡,造成细胞内难以维持高碘状态,对肿瘤的治疗作用降低,因此需要借助其他方法提高对肿瘤细胞的杀伤力来弥补这一缺陷。

AuNPs 是一种有前途的新型放疗增敏药物,因为其可在  $\gamma$  射线或 X 射线照射下强吸收并高效率产生二次电子,增强了射线对周围组织的杀伤力<sup>[23-24]</sup>。本研究中的 AuNPs 粒径约为 1 nm,不易在肝脾蓄积,肾脏清除率高,激光共聚焦显像可观察到在一定时间和浓度范围内其可被 BMSCs 吞噬,CCK8 实验显示吞噬 AuNPs 后,只要浓度不超过 0.40 g/L,温育时间不超过 96 h,没有明显的细胞毒性,激光共聚焦显像观察到 0.20 g/L AuNPs 温育 24 h 或 0.10 g/L AuNPs 孵育 48 h,细胞内可以观察到大量 AuNPs;由于 BMSC 倍增时间约 3 d,应尽可能在较短时间内吞噬较多 AuNPs,综合实验结果可以得出本研究中 BMSCs 吞噬 AuNPs 的最佳实验条件为 0.20 g/L,温育 24 h。摄碘实验结果显示 AuNPs 温育后对细胞的摄碘也没有影响。因此可知,AuNPs 可以被安全地用于细胞递送及体内治疗,并且 Traswell 实验显示 AuNPs 对 BMSCs-Egr1-NIS 的体外靶向性没有影响。<sup>131</sup>I 杀伤实验结果表明,<sup>131</sup>I 可以杀灭乳腺癌肿瘤细胞,在加入 AuNPs 后,对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用增加,当 AuNPs 质量浓度  $\geq 0.20$  g/L 时,在<sup>131</sup>I 杀伤 MDA-MB-231 中具有辐射增敏作用。研究认为大粒径 AuNPs 辐射增敏

效果优于小粒径 AuNPs<sup>[23]</sup>,但小粒径 AuNPs 具有无肝脾蓄积,肾清除率高的优势<sup>[24-25]</sup>。本研究应用的是小粒径 AuNPs,但是笔者观察到其被 BMSCs 吞噬后部分可以在细胞内聚集成团(图 4B),一定程度上增加了纳米团直径,推断可能会提高辐射增敏作用。

MSC 携带 AuNPs 的方式有吞噬或连接,此前有报道载干细胞吞噬超顺磁氧化铁包覆 AuNPs 后靶向肝损伤及肝细胞癌并可在体外被 MRI 检测到<sup>[26]</sup>。此外 AuNPs 还可以携带治疗基因及靶向配体到达肿瘤细胞发挥治疗作用,例如携带 siRNA 及葡萄糖靶向配体的 AuNPs 可以靶向 MDA-MB-231 肿瘤组织<sup>[27]</sup>。但是鲜见有关于 BMSCs 同时携带治疗基因及 AuNPs 靶向肿瘤组织的报道,而本研究利用 BMSCs 可以靶向肿瘤组织的特性,通过体外实验构建转染治疗基因并携带 AuNPs 的 BMSCs,探索了吞噬 AuNPs 的最佳温育条件及吞噬后对基因治疗的影响,利用 BMSCs 作为载体同时携带治疗基因 Egr1-NIS 和辐射增敏材料 AuNPs 靶向乳腺癌细胞 MDA-MB-231,为体内靶向性治疗研究的开展奠定了基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Guo R, Zhang R, Pan Y, et al. Feasibility of a novel positive feedback effect of <sup>131</sup>I-promoted Bac-Egr1-hNIS expression in malignant glioma through baculovirus: a comparative study with Bac-CMV-hNIS[J]. Nucl Med Commun, 2011, 32(5): 402-409. DOI:10.1097/MNM.0b013e328344a1ad.
- [2] Shi S, Zhang M, Guo R, et al. Feasibility of lentiviral-mediated sodium iodide symporter gene delivery for the efficient monitoring of bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation and survival[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(6): 1547-1554. DOI:10.3892/ijmm.2014.1970.
- [3] Zhou X, Li B, Wang J, et al. The feasibility of using a baculovirus vector to deliver the sodium-iodide symporter gene as a reporter[J]. Nucl Med Biol, 2010, 37(3): 299-308. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2009.12.007.
- [4] 杨珂,林岩松.分化型甲状腺癌钠碘转运体功能的影响因素[J].中华核医学与分子影像杂志,2015,(6): 512-516. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.06.024.  
Yang K, Lin YS. Influencing factors on the function of sodium iodide symporter in differentiated thyroid cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2015, (6): 512-516. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.06.024.
- [5] Ahmed MM. Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2004, 4(1): 43-52. DOI:10.2174/1568009043481704.
- [6] Guo R, Tian L, Han B, et al. Feasibility of a novel positive feedback effect of <sup>131</sup>I-promoted Bac-Egr1-hNIS expression in malignant

- glioma via baculovirus [J]. *Nucl Med Biol*, 2011, 38(4): 599-604. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2010.11.005.
- [7] Hu X, Gao X. Multilayer coating of gold nanorods for combined stability and biocompatibility [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13(21): 10028-10035. DOI:10.1039/c0cp02434a.
- [8] Liu W, Zhu Z, Deng K, et al. Gold nanorod@chiral mesoporous silica core-shell nanoparticles with unique optical properties [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(26): 9659-9664. DOI:10.1021/ja312327m.
- [9] Conde J, Doria G, Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer [J]. *J Drug Deliv*, 2012, 2012: 751075. DOI:10.1155/2012/751075.
- [10] Horton JA, Hudak KE, Chung EJ, et al. Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(10): 2231-2241. DOI:10.1002/stem.1483.
- [11] Zhao M, Sachs PC, Wang X, et al. Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(9): 782-792. DOI:10.4161/cbt.20561.
- [12] 石朔, 张敏, 郭睿, 等. 经钠碘同向转运体监测骨髓间充质干细胞向颅内脑胶质瘤迁移的实验研究 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2015; 35(5): 346-350. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.05.003.
- Shi S, Zhang M, Guo R, et al. Monitoring the migration of bone marrow derived mesenchymal stem cells to intracranial glioma by sodium iodide symporter [J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 35(5): 346-350. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2015.05.003.
- [13] Shi S, Zhang M, Guo R, et al.  $^{131}\text{I}$  therapy mediated by sodium/iodide symporter combined with kringle 5 has a synergistic therapeutic effect on glioma [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2): 691-698. DOI: 10.3892/or.2015.4420.
- [14] Shi S, Zhang M, Guo R, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-mediated dual-gene therapy for glioblastoma [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(1): 106-117. DOI: 10.1089/hum.2018.092.
- [15] Bieback K, Kern S, Kocaömer A, et al. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood [J]. *Biomed Mater Eng*, 2008, 18(1 Suppl): S71-76.
- [16] Dwyer RM, Khan S, Barry FP, et al. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1(3): 25. DOI:10.1186/scrt25.
- [17] Momin EN, Vela G, Zaidi HA, et al. The oncogenic potential of mesenchymal stem cells in the treatment of cancer: directions for future research [J]. *Curr Immunol Rev*, 2010, 6(2): 137-148. DOI:10.2174/157339510791111718.
- [18] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 1030-1041. DOI:10.1634/stemcells.2005-0319.
- [19] Sherman LS, Condé-Green A, Sandiford OA, et al. A discussion on adult mesenchymal stem cells for drug delivery: pros and cons [J]. *Ther Deliv*, 2015, 6(12): 1335-1346. DOI:10.4155/tde.15.80.
- [20] Dwyer RM, Potter-Birne SM, Harrington KA, et al. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(17): 5020-5027. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-0731.
- [21] Dwyer RM, Ryan J, Havelin RJ, et al. Mesenchymal stem cell-mediated delivery of the sodium iodide symporter supports radionuclide imaging and treatment of breast cancer [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(7): 1149-1157. DOI:10.1002/stem.665.
- [22] Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(19): 5832-5844. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-1092.
- [23] Zhang XD, Wu D, Shen X, et al. Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(27): 6408-6419. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.05.047.
- [24] Zhang XD, Chen J, Luo Z, et al. Enhanced tumor accumulation of sub-2 nm gold nanoclusters for cancer radiation therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3(1): 133-141. DOI:10.1002/adhm.201300189.
- [25] Zhang XD, Luo Z, Chen J, et al. Ultrasmall Au (10-12) (SG) (10-12) nanomolecules for high tumor specificity and cancer radiotherapy [J]. *Adv Mater*, 2014, 26(26): 4565-4568. DOI: 10.1002/adma.201400866.
- [26] Zhao J, Vyková J, Abdelsalam M, et al. Stem cell-mediated delivery of SPIO-loaded gold nanoparticles for the theranosis of liver injury and hepatocellular carcinoma [J]. *Nanotechnology*, 2014, 25(40): 405101. DOI:10.1088/0957-4484/25/40/405101.
- [27] Yi Y, Kim HJ, Zheng M, et al. Glucose-linked sub-50-nm unimer polyion complex-assembled gold nanoparticles for targeted siRNA delivery to glucose transporter 1-overexpressing breast cancer stem-like cells [J]. *J Control Release*, 2019, 295: 268-277. DOI:10.1016/j.jconrel.2019.01.006.

(收稿日期:2019-12-10)