

组氨酸修饰的聚乙二醇-聚谷氨酸-聚乙烯亚胺 作为基因载体的体外性能研究*

白 凤, 田守琴, 冯 敏
(中山大学药学院, 广东 广州 510080)

摘 要: 为了对组氨酸修饰的阳离子聚合物载体进行研究, 重点考察其基因转染效率与细胞毒性, 探讨其作为基因载体的可能性。采用自由基聚合法合成聚乙二醇-聚谷氨酸-聚乙烯亚胺-组氨酸 (PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs-HISs, GGIS) 聚阳离子载体, 用¹H-NMR 表征载体材料结构; 通过凝胶电泳实验研究载体对质粒 DNA 的压缩能力, 粒径分析仪测定载体结合 DNA 后在不同 N/P 比条件下的粒径及表面电荷; 用 MTT 法测定载体在 HEK293T, Hela, BEL7402 和 A549 等细胞株上的细胞毒性, 考察 GGIS 体外细胞转染效率。结果显示在 N/P ≤ 30 时, 载体材料的平均粒径在 100 ~ 200 nm, 表面电荷在 10 ~ 30 mV, 适合细胞吞噬。体外细胞毒性表明, GGIS 的细胞毒性较 PEI 25K 低。GGIS 具有较强的 DNA 缩合能力, 且有较好的体外基因转染能力。因此, GGIS 有较好的体外基因转染能力, 能够携带报告基因在体外有效表达, 是具有应用前景的非病毒性基因药物载体。

关键词: 基因治疗; 聚乙烯亚胺; 聚谷氨酸; 组氨酸; 基因传递; 转染效率

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2015) 03-0107-08

Vitro Properties Investigation of Histidylated PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs As Gene Carriers

BAI Feng, TIAN Shouqing, FENG Ming

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: The study mainly focuses on cell transfection efficiency and cytotoxicity of a histidylated cationic copolymer in order to explore its potential as a gene carrier. A novel histidylated cationic copolymer, PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs-HISs (GGIS), was synthesized by free radical polymerization. The chemistry structure of GGIS was confirmed by ¹H-NMR. Agarose gelelectrophoresis was performed to study the capacity of plasmid DNA condensation. Particle size and zeta potential were measured at various N/P ratios. Cytotoxicity of GGIS was determined by MTT assay in HEK 293T, Hela, BEL7402 and A549 cells lines. The transfection efficiency of GGIS was specifically evaluated and monitored by flow cytometry. When the N/P less than of 30. The size of the DNA/GGIS was approximately 100 ~ 200 nm and the zeta-potential was 10 ~ 30 mV. The MTT assay showed that the cytotoxicity of GGIS was obviously lower than PEI 25K. GGIS demonstrated significantly higher transfection efficiency than PEI 25K. Therefore, GGIS with high transfection efficiency and low cytotoxicity has great potential to be used as non-viral gene carriers.

Key words: gene therapy; PEI; poly(β -benzyl-L-glutamate); histidine; gene delivery; gene transfection

* 收稿日期: 2014-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373332); 高校基本业务费青年教师重点培育项目 (13ykzd04)

作者简介: 白凤 (1988年生), 女; 研究方向: 基因药物传递系统; 通讯作者: 冯敏; E-mail: fengmin@mail.sysu.edu.cn

基因治疗是通过载体材料将治疗基因传递到特定的组织细胞内进行适当表达以达到治疗疾病目的的方式^[1]。基因传递载体是影响基因治疗效果的关键因素, 将外源性基因导入体内必须借助于一个安全、稳定、转染效率高的载体。目前, 基因载体主要分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体由于存在安全性, 免疫原性, 体内不能反复应用等缺陷, 限制了其在临床治疗中的应用^[2]。而非病毒载体具有安全性高, 免疫原性小, 毒性低, 易于制造等优点, 故愈来愈受到人们的重视人^[3-5]。

阳离子聚合物聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI)^[6], 是目前研究较多的聚阳离子型基因载体, 具有较高的转染效率, 但也往往有较高的细胞毒性。当 PEI 相对分子质量 $\geq 25\ 000$ 时, 基因转染效率高, 同时细胞毒性也较大且不可生物降解; 相反, 低相对分子质量 PEI 细胞毒性小, 但转染效率也低。为了解决这两者之间的矛盾, 利用生理条件下可生物降解的聚谷氨酸 (PBLG) 为骨架, 链段引入小相对分子质量 PEI (800), 制备可生物降解阳离子聚合物 PLG-g-PEIs (PLGE)。

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)^[5], 是一种由环氧乙烷经阴离子开环聚合而成的聚醚类高分子化合物。由于具有亲水性, 无毒性, 无免疫原性, 生物相容性好, 延长体内循环时间等优势而得到广泛的关注。被 FDA 批准为可体内注射用高分子。通过 PEG 修饰, 可以减少生物体内蛋白质与载体材料表面的非特异性吸附和细胞黏附作用, 使载体在体内不易被免疫系统识别, 不受免疫系统的破坏, 从而延长载体在血液中循环时间, 增强其靶向给药能力。

组氨酸是组成蛋白质的 20 中氨基酸中的一种, 由于其分子结构中含有带正电的咪唑官能团 (pKa 值为 6.0), 在 pH < 6 时可发生质子化, 吸收溶液中可用的质子, 具逃逸内涵体的能力和细胞毒性低的特点^[7]。通过使用含咪唑基的组氨酸对聚乙二醇-聚谷氨酸-聚乙烯亚胺 (PEG-b-PLG-g-PEIs, GGI) 的部分氨基进行取代, 可以增强载体逃逸内涵体的能力, 从而减少载体的细胞毒性, 提高转染效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 L-谷氨酸 (L-glutamic acid, 生化试剂, 上海国药集团化学试剂有限公司), 支链型聚乙烯亚胺 PEI25K, PEI 800 (Aldrich-Sigma 公

司); 甲氧基聚乙二醇胺 (mPEG-NH₂, MW = 2000, Aldrich-Sigma 公司); L-组氨酸甲酯盐酸盐 (上海瀚鸿化工科技有限公司, 中国); DMEM 培养基, 胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 青链霉素 (Sigma 公司, 美国); 无内毒素质粒大提试剂盒 (TIANGEN 公司); 增强型绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-C1 (华西医科大学微生物实验室赠予)

1.1.2 仪器 真空干燥箱 (DZG-6020, 上海森信), 磁力搅拌器 (IKA, 德国), 旋转蒸发仪 (N-1000, EYELA, 日本), 低速离心机 (TDL-5, 上海安亭科学仪器厂), 冷冻干燥机 (ALPHA1-4 LSC, CHRIST, 德国), 超净工作台 (苏州安泰净化设备厂), 台式高速离心机 (Hettich 公司, 德国), 细胞培养箱 (Thermo 公司, 美国), 通用酶标仪 (ELX800, Bio-Tek 公司, 美国), 倒置相差显微镜 (ECLIPSE TS100, Nikon 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 聚合物 GGIS 的合成 (反应路线如图 1)

1) 聚乙二醇-b-谷氨酸苄酯 (PEG-b-PBLG) 的合成。

称取 6 g 新制的 BLG-NCA 单体于密闭容器中, 加入 120 mL 无水氯仿, 按单体 BLG (A)/引发剂 (I) 的摩尔比 50:1 加入引发剂甲氧基聚乙二醇胺, 室温搅拌下连续反应 3 d。反应结束后, 将反应液倒入 600 mL 无水乙醇中沉淀, 将白色絮状沉淀过滤, 40 °C 真空干燥, 得 PEG-b-PBLG 聚合物。

2) 聚合物 PEG-b-PLG-g-PEIs (GGI) 的合成。

称取 1 g 上述合成的 PEG-b-PBLG, 溶于 20 mL 无水处理的 N, N-二甲基甲酰胺中, 按一定比例加入 PEI800 ($Mol_{PEI}/Mol_{BLG} = 10:1$) 及催化剂 2-羟基吡啶 ($Mol_{2-HP}/Mol_{BLG} = 5:1$)。40 °C 水浴加热磁力搅拌, 反应 48 h。反应结束后, 将反应液倒入 100 mL 冰冷乙醚中混匀, 溶液分层, 分离下层浅黄色粘稠液体, 用 3 L 蒸馏水透析 72 h。透析结束后, 将透析液冷冻干燥, 制得白色疏松粉末 GGI。

3) 聚合物 PEG-b-PLG-g-PEIs-HISs (GGIS) 的合成。

称取 1 g GGI 溶于无水 DMSO 中, 加入 GGI 表面胺基 5 倍摩尔量的 2-羟基吡啶 (2-HP), 搅拌均匀后, 再加入 GGI 表面胺基 5 倍摩尔量的组氨酸甲酯盐酸盐, 磁力搅拌 40 °C 下连续反应 48 h, 然后经透析和冷冻干燥得到终产品 PEG-b-PLG-g-PEIs-HISs (GGIS)。

1.2.2 ¹H 核磁共振 (¹H-NMR) 的测定 以 ¹H-NMR 对所合成的聚合物结构进行表征。将一定量的

mPEG-NH₂、PEI 800、聚合物 GGI 和 GGIS 分别溶解在 D₂O 中, 中间产物 PEG-b-PBLG 以 CDCl₃ 为溶剂, 在核磁共振谱仪 (Varian INOVA500NB, 美国) 上测定。

1.2.3 聚合物/DNA 纳米粒复合物的制备

GGIS 聚合物溶于适当体积去离子水配制成所需浓度 (由 N/P 决定), 然后向载体溶液加入等体积质量浓度为 40 ng·μL⁻¹ 的 pEGFP-C1 质粒溶液, 涡旋 10 s, 室温孵育 30 min。为后续的凝胶阻滞实验、粒径和电位测试等实验做准备。

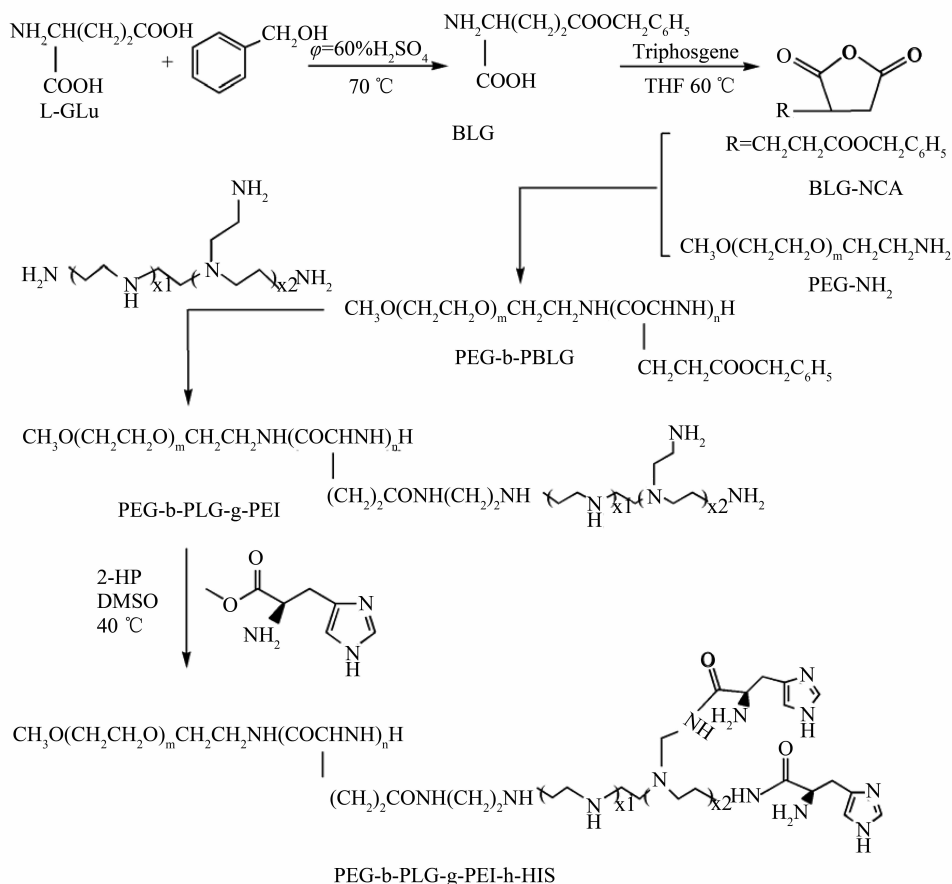


图1 GGIS的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of GGIS

1.2.4 聚合物/DNA 复合物凝胶阻滞实验 按上述方法制备聚合物/DNA 复合物, 以 PEI 25K/DNA 复合物作为对照。在不同 N/P 设计比值条件下, 将聚合物载体与 DNA 进行混合, 室温静置 30 min, 制备得到聚合物/DNA 复合物。电泳条件: $w = 1\%$ 琼脂糖 (含 0.5 μg·mL⁻¹ 溴化乙锭), 1 × TAE 缓冲液, 电压 100 V, 电泳时间为 30 min。DNA 条带用凝胶成像系统分析。

1.2.5 聚合物/DNA 复合物粒径和电位测定 聚合物/DNA 复合物的粒径和表面电位在室温下用 Zeta sizer Nano Series 90 粒径分析仪测定。复合物溶液终体积为 1.0 mL, 复合物中 DNA 质量浓度为 20 μg·mL⁻¹。每个样品重复测试 3 次。

1.2.6 MTT 实验 采用 MTT 法评价聚合物的细胞毒性, 并以 PEI 800 和 PEI 25K 作为对照。以 5 × 10³ 细胞/孔的密度将 HEK293T、Hela、Bel7402 细胞和 A549 细胞分别接种到 96 孔板中, 在 37 °C, φ = 5% CO₂ 的条件下培育 24 h, 待细胞汇合度达 80%, 以不同质量浓度的聚合物溶液 (用不含血清培养液溶解) 替代原有培养液, 分别培养 6 h, 每个浓度 3 个复孔, 以对应的培养基作为阴性对照。待培育结束后, 以含 φ = 10% 血清的培养液替换聚合物溶液继续培养。48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg·mL⁻¹) 继续培养 4 h, 吸尽上清, 每孔加入 200 μL DMSO 溶解结晶, 振荡 10 min。然后用酶标仪测试每孔的吸光值, 测试波

长选用 490 nm。每组 3 个复孔。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{490}(\text{sample})}{A_{490}(\text{control})} \times 100\%$$

1.2.7 细胞转染实验 将 5×10^5 细胞/孔的密度将 HEK293T 细胞和 Hela 细胞接种到 24 孔板上, 培养 24 h, 进行转染实验。每孔加入 100 μL 载体/DNA 复合物溶液 (含 2 μg 质粒), 每孔再加 400 μL 不含血清的 DMEM 培养液。在无血清条件下培育 6 h, 弃去转染复合物, 加入新鲜含 $\varphi = 10\%$ 胎牛血清 DMEM 培养液继续培养 48 h, 在荧光显微镜下观察 GFP 的表达, 转染率通过流式细胞仪测定。

2 结果

2.1 GGI 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱分析

图 2 为原料 mPEG-NH₂ 和 PEI 800, 中间产物 PEG-b-PBLG, 聚合物 GGI 和 GGI 的核磁氢谱以及各峰的具体指征。

如图 2 (A), 峰 a (δ 3.65) 为 PEG 嵌段的特征峰 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)。在图 2 (B), (D), (E) 中 PEG 嵌段的特征吸收峰的出现表明 PEG 嵌段存在于聚合物 PEG-b-PBLG, GGI, GGI 中。峰 b (δ 3.91, $-\text{CH}-$) 和峰 c, d (δ 1.89 ~ 2.25, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) 为 PBLG 嵌段的特征峰, 峰 f (δ 7.24, $-\text{C}_6\text{H}_5$) 和峰

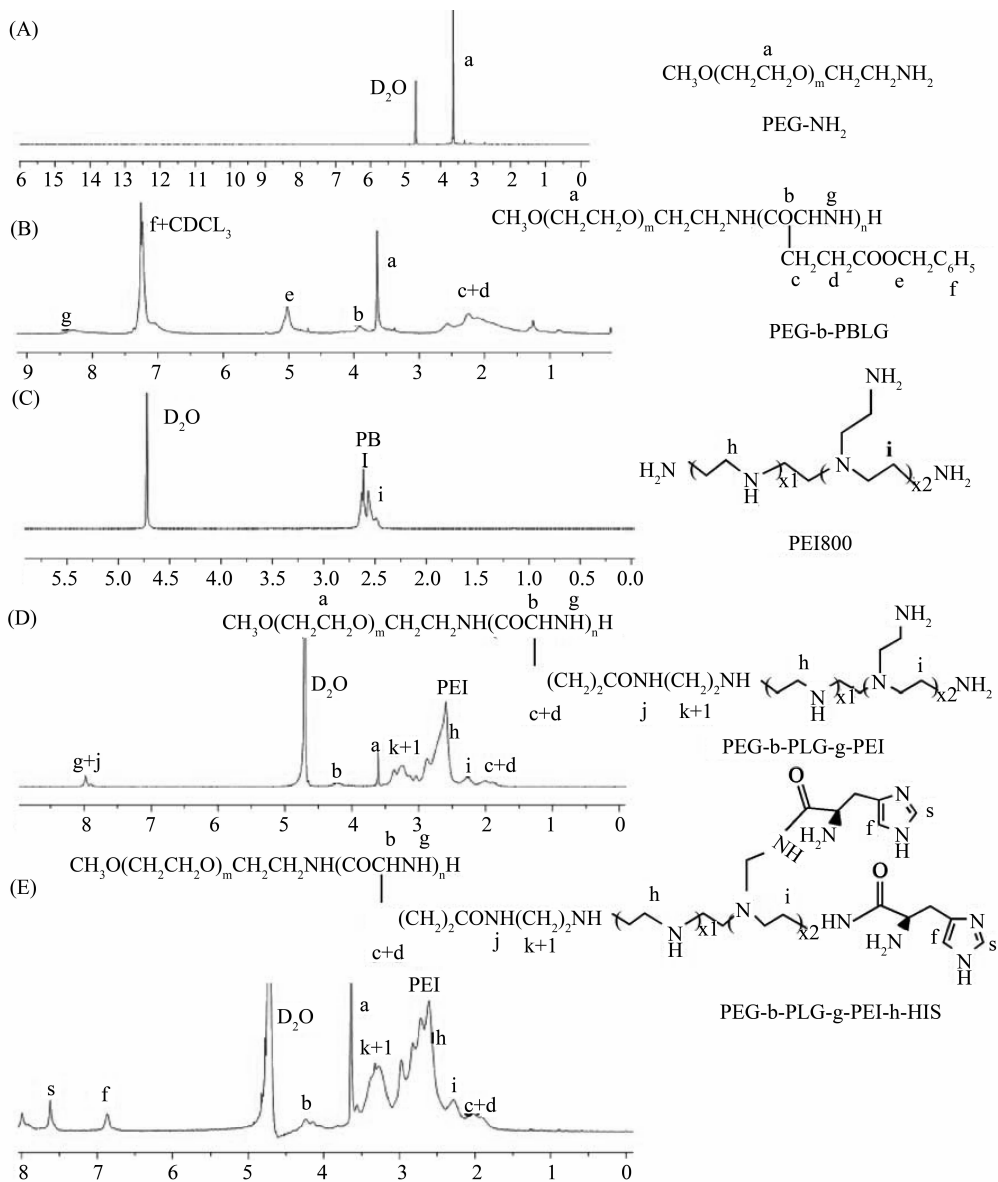


图 2 $^1\text{H-NMR}$ 核磁光谱图及对应化合物结构式

Fig. 2 The $^1\text{H-NMR}$ spectra and their assignments

A: mPEG-NH₂ (D₂O); B: PEG-b-PBLG (CDCl₃); C: PEI800 (D₂O); D: GGI (D₂O); E: GGI (D₂O)

e(δ 5.024, -CH₂Ph) 是 PBLG 上苯环与谷氨酸的保护基苄基的亚甲基峰。该峰在 GGI 中消失, 证明中间态聚合物 PEG-b-PBLG 中苄酯基在氨解反应中完全脱去, 并形成了新的酰胺基(δ 7.904, -CONH-)。在图 2 (D) 中, j 是新形成的酰胺基峰(δ 7.904, -CONH-)。聚合物 PBLG 的聚合度 (DP_{PBLG}) 可以通过对共聚物 PEG-b-PBLG 上峰 a(δ 3.54, -CH₂CH₂) 和峰 e(δ 5.02, -CH₂Ph) 积分得到, 具体公式如下: $DP_{PBLG} = (2000)/(44) \times (2e)/(a)$ 。同理, GGI 和 GGIS 各组分的比率由此方法计算可得 (如表 1)。i 和 h 为 PEI 的乙撑基吸收峰(δ 2.12 ~ 2.96, -CH₂CH₂NH-), 图 2 (D) 表明, PEI 接枝成功。图 2 (D) GGI 与图 2 (E) GGIS 相比, 增加了组氨酸咪唑环的特征峰 s 和 f, 证明组氨酸成功接枝于 GGI 上。

表 1 载体材料 GGI, GGIS 各组分相对分子质量
Table 1 Molecular Characteristics of polymer GGI and GGIS

载体材料	各部分相对分子质量			HIS	Mn
	PEG	PLG	PEI		
GGI	2 000	10 160	46 626		58 786
GGIS	2 000	8 624	23 177	6 784	40 585

2.2 琼脂糖凝胶电泳阻滞试验

如图 3, PEI 25K 压缩 DNA 的凝胶电泳结果显示, PEI 25K 在 N/P = 2.5 时完全与 DNA 形成复合物粒子, 未见 DNA 条带跑出, 并且随着 N/P 比增大, 凝胶孔口的荧光也逐渐消失。GGI 凝胶电泳显示其在 N/P 比 2.5 时就能完全压缩 DNA, 且随着 N/P 比增加, 孔内荧光减弱, 在 N/P 比为 8 时荧光完全消失。GGIS 的凝胶电泳结果显示, 其在 N/P 比为 4 时就能完全压缩 DNA, 阻滞 DNA 迁移。在随着 N/P 比增加, 孔内荧光减弱, 在 N/P 比为 8 时完全消失。

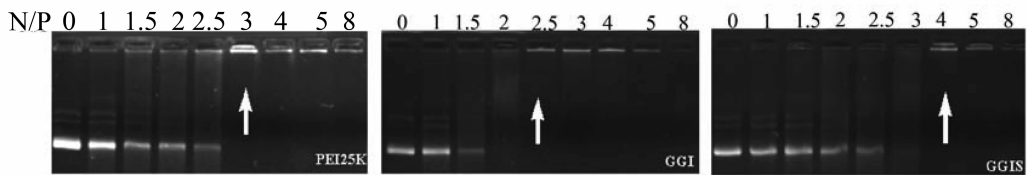


图 3 不同 N/P 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Gelretardation assay of complexes at various N/P ratios

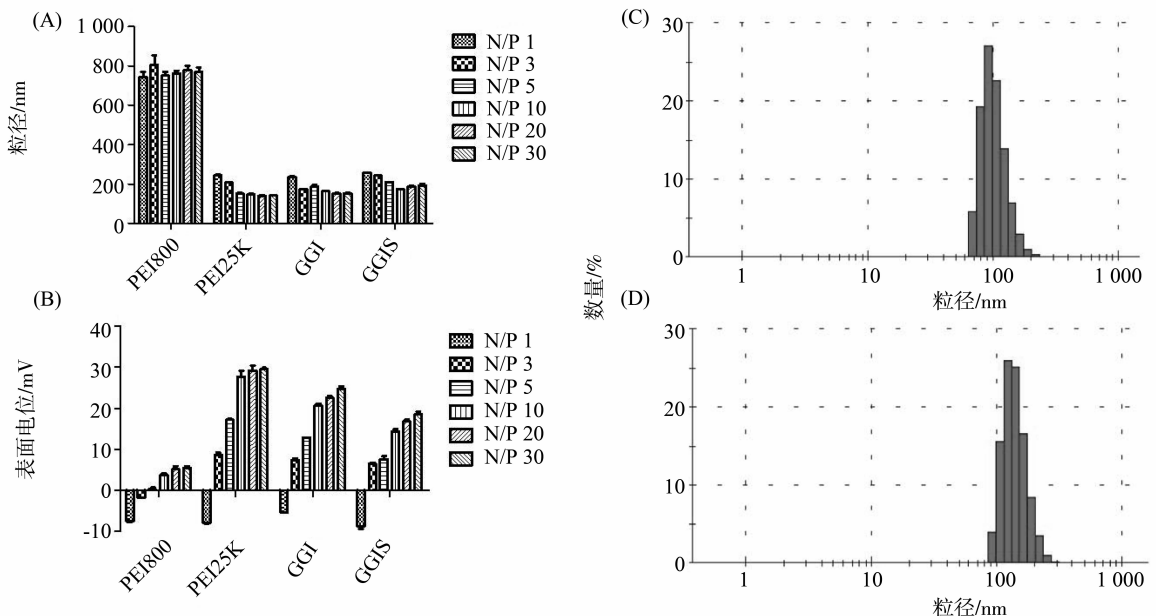


图 4 聚合物/DNA 复合物的粒径和表面电位

Fig. 4 Particle size and zeta potential of complexes

A: 聚合物/DNA 不同 N/P 比的粒径; B: 聚合物/DNA 不同 N/P 比电位; C: GGI/DNA 粒径分布图; D: GGIS/DNA 粒径分布图

2.3 粒径和电位分析

如图 4 (A) 所示, N/P 比从 1/1 ~ 30/1, PEI 800 与 DNA 形成的复合物结构疏松, 粒径较大, 都接近 800 nm。与 PEI 800 相比, PEI 25K, GGI, GGIS 与 DNA 复合的纳米的粒径都在 100 ~ 200 nm 之间。由图 4 (B) 可知, PEI 800/DNA 复合物当 N/P 比大于 5 开始呈现一定正电性, 当 N/P 比为 30 时表面电荷小于 5 mV, N/P 比从 10/1 ~ 30/1, PEI 25K/DNA 复合物电位在 30 左右, GGI/DNA, GGIS/DNA 复合物电位略低, 变化范围在 +15.4 mV 到 +27.6 mV 之间, 随着 N/P 比的增加, 复合物表面电位逐渐增加, 这是由于随着载体材料的增加, 聚合物/DNA 复合物中的氨基解离后产生过量

的正电荷。图 4 (C) 与图 4 (D) 为 GGI/DNA, GGIS/DNA 复合物在 N/P 比为 20 时候的粒径分布图, 呈正态分布趋势, 粒径分布较窄, 分散系数合格, 表明复合物不易聚集, 有利于细胞的吞噬及体内基因的转染。

2.4 细胞毒性分析

由图 5 可知, 在 HEK293T, HeLa, BEL7402 和 A549 四株细胞株上测定的载体材料的细胞毒性中, PEI 800 的细胞毒性较低, PEI 25K 的细胞毒性最大。载体 GGI 与 GGIS 的细胞毒性均显著低于 PEI 25K。在实验所测定的浓度范围中, 细胞的存活率高于 80%。

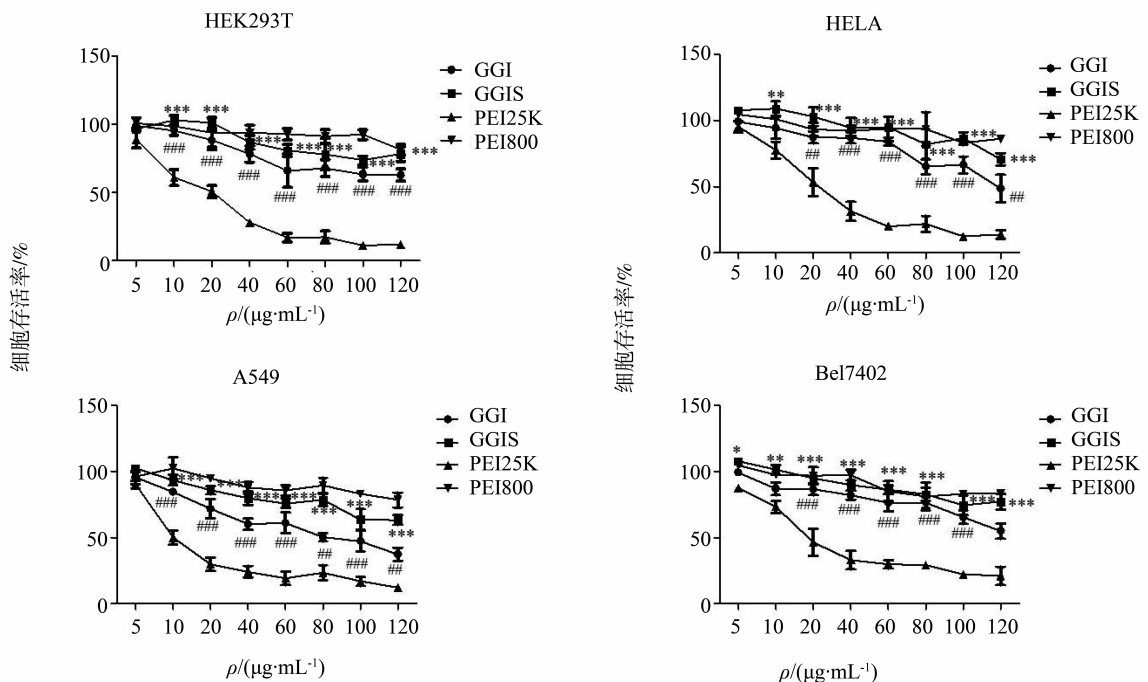


图 5 不同质量浓度聚合物在无血清条件下的细胞毒性实验

Fig. 5 Cytotoxicity assay of polymer at various concentrations

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, GGIS 对应 PEI25K; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, GGI 对应 PEI25K

2.5 基因转染效率分析

图 6 和图 7 是载体 PEI 25K, GGI, GGIS 携带 pEGFP 质粒在 HEK293 和 HeLa 细胞上的转染情况。PEI25K 与 pEGFP 质粒按最佳 N/P 比 10 形成复合物, GGI 和 GGIS 与 pEGFP 质粒按 N/P 比 10, 20, 30 形成复合物。从图 6 (A)、图 7 (A) 可看出, GGIS 在 HEK293T 与 HeLa 胞中转染效率明显优于 PEI 25K。图 6 (C), 图 7 (C) 分别是载体 GGI, GGIS 在最佳 N/P 比为 20 时的细胞转染情况, 可以看出, GGIS (N/P = 20) 转染效率显著优于 PEI

25K。且转染效率高于未经组氨酸修饰的 GGI。

3 讨论

低相对分子质量的聚乙烯亚胺转染效率低, 但毒性也低且易于被生物代谢, 因此, 以 PEG 修饰的聚谷氨酸为母体, 用低相对分子质量聚乙烯亚胺作为侧基制成 PEG-*b*-PLG-*g*-PEIs (GGI) 载体材料, 利用 PEI 800 表面的伯胺基氨解组氨酸甲酯酸盐的酯基, 将组氨酸接枝在 GGI 的侧枝 PEI 800 的表面形成 GGIS。以期得到转染效率高, 同时保

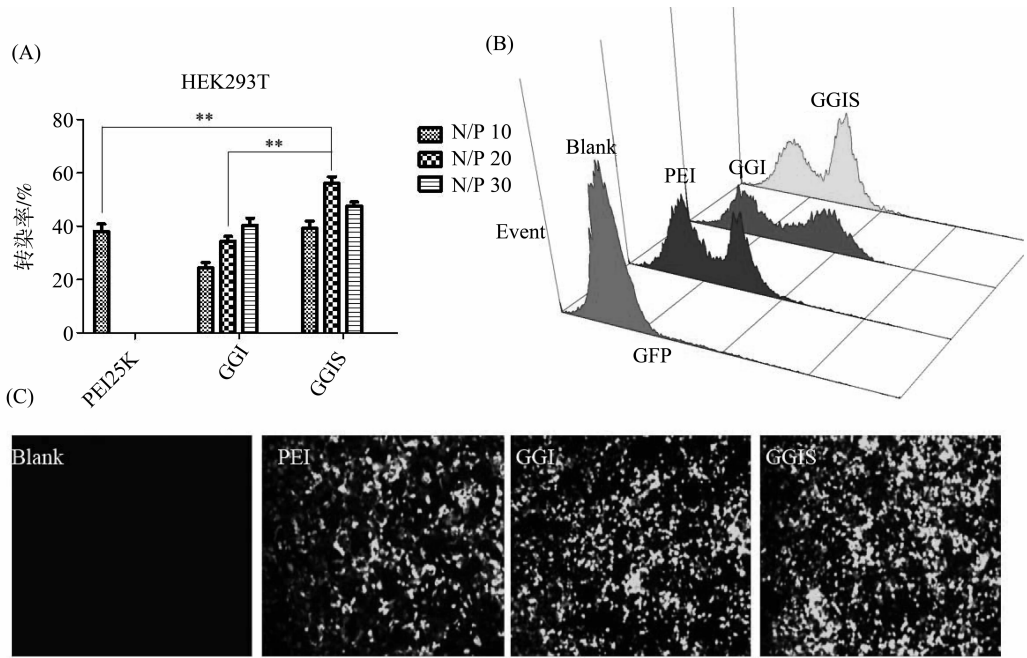


图 6 聚合物/DNA 复合物在 HEK 293T 细胞上的转染情况 ($n=3$, $**P < 0.01$)
 Fig. 6 The transfection efficiency of polymer /DNA complexes in HEK293T cells
 (Data are representative of at least three independent experiments $**P < 0.01$)

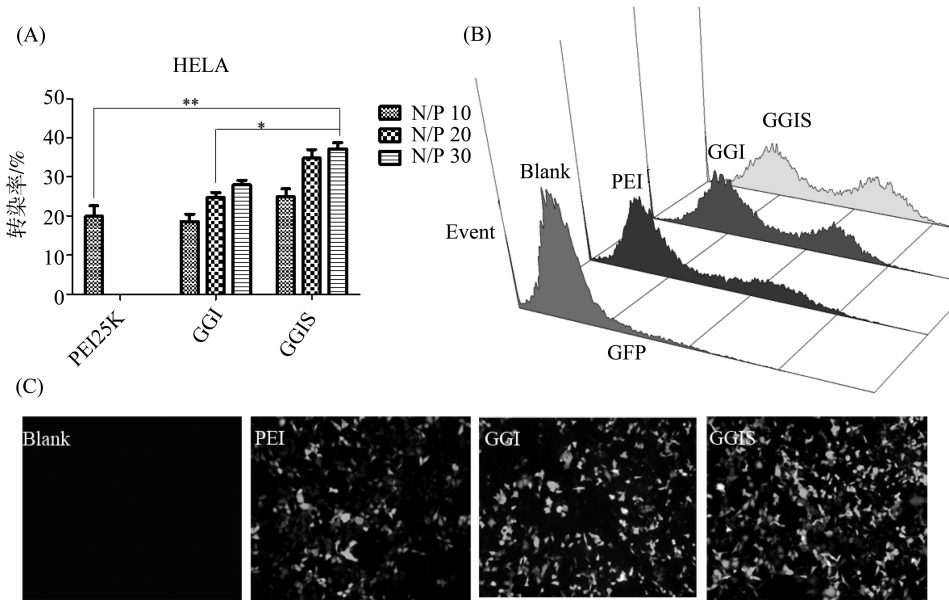


图 7 聚合物/DNA 复合物在 HELA 细胞上的转染情况 ($n=3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)
 Fig. 7 The transfection efficiency of polymer /DNA complexes HELA cells
 (Data are representative of at least three independent experiments, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)

持较低细胞毒性的基因载体。

研究用¹H 核磁共振法对所设计合成的载体材料进行了结构表征。通过凝胶阻滞实验、粒径及电位考察,对其体外生物学性质进行了表征。凝胶阻滞实验中可以看出,GGIS 压缩 DNA 的能力要比没

经组氨酸修饰的 GGI 略弱一些,这是由于组氨酸中咪唑环上氨基质子化的能力没有 GGI 上的伯胺基强,所以需要更高的 N/P 才能完全压缩 DNA。GGI/DNA 复合物 zeta 电位高于 GGIS/DNA,主要在于 GGIS 聚合物上一部分氨基被组氨酸所取代,

原来的伯胺基部分被替换为咪唑环基团,在生理 pH 值条件下,咪唑环基团的氨基质子化程度没有伯胺基强,导致形成的复合物的表面电荷降低。PEI 25K/DNA 的表面电荷高于 GGI/DNA 复合物和 GGIS/DNA 复合物。如果聚合物/DNA 复合物表面电荷过高,复合物与细胞膜作用强烈,会破坏细胞膜的正常功能,从而导致细胞死亡。PEI 25K 的细胞毒性显著高于 GGI 与 GGIS,其原因可能是由于其表面过高的正电荷导致。只有适当的表面正电荷才更利于复合物进入细胞。GGIS 与 PEI 25K 相比,zeta 电位的大小在细胞毒性与细胞效率之间有一个更好的平衡,更适合作为基因载体。在载体材料的体外基因转染实验中,GGIS 也表现出较好的转染效率,在最优 N/P 为 20 条件下,GGIS 的转染效率显著优于 GGI,其原因可能是由于 GGIS 中含有咪唑基,咪唑基的 pKa 值为 6.0,在 $\text{pH} < 6$ 时组氨酸会发生质子化,更容易使载体材料在酸性的内涵体环境中逃逸出来,释放 DNA,从而提高转染效率。但目前机理还不清楚,有待进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] BLAU H, KHAVARI P. Gene therapy: Progress, problems, prospects [J]. *Nat Med*, 1997, 3(6): 612 - 613.
- [2] GARDLIK R, PALFFY R, HODOSY J, et al. Vectors and Delivery Systems in Gene Therapy [J]. *Med Sci Monit*, 2005; 11(4): 110 - 121.
- [3] THOMAS M, KLIBANOV A M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62: 27 - 34.
- [4] NIIDOME T, HUANG L. Gene therapy Progress and Prospects: nonviral vectors [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(24): 1647 - 1652.
- [5] LI S D, HUANG L. Gene therapy progress and prospects: Non-viral gene therapy by systemic delivery [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(18): 1313 - 1319.
- [6] GODBEY W T, WU K K, MIKOS A G. Poly- (ethyleneimine) and its role in gene delivery [J]. *Control Release*, 1999, 60(2/3): 149 - 160.
- [7] MIDOUX P, MONSIGNY M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes [J]. *Bioconjug Chem*, 1999, 10(3): 406 - 411.