

构建 HMGB1/PEI 非病毒载体介导高效 基因传递的研究*

沈媛^{1,2}, 彭辉³, 冯敏^{1,2}, 邓晶晶^{1,2}, 温玉婷^{1,2}, 罗昕^{1,2},
曾昕^{1,2}, 潘仕荣^{3,4}, 吴传斌^{1,2}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510080;

2. 广东省高校创新药物制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510080;

3. 中山大学医学院, 广东 广州 510080;

4. 中山大学附属第一医院心血管研究室, 广东 广州 510080)

摘要: 研究了以聚乙烯亚胺(PEI)为骨架复合高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的复合型载体 HMGB1/PEI 的性能, 以期提高非病毒基因载体的转染效率。透射电镜观察 pDNA/HMGB1/PEI 复合物粒子形态呈球形; 动态光散射法测定粒径与表面电位, 结果显示复合 HMGB1 后, 复合物粒径降低, 且随 HMGB1 加入量的增大表面电位有增大的趋势; 凝胶电泳阻滞试验表明 HMGB1 可协助 PEI 与 pDNA 结合; MTT 试验结果显示 HMGB1/PEI 复合载体的细胞毒性低于 PEI; HMGB1/PEI 复合载体的转染率较 PEI 的转染率增大 2.9~4.0 倍, 且 HMGB1 可以弱化血清对转染的阻碍作用。所以 HMGB1 被证实能有效提高 PEI 的体外转染效率。

关键词: 聚乙烯亚胺; HMGB1; 基因传递

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579(2009)05-0091-06

High Mobility Group B1- Polyethylenimine as Combined Carrier for Gene Delivery *in Vitro*

SHEN Yuan^{1,2}, PENG Hui³, FENG Min^{1,2}, DENG Jingjing^{1,2}, WEN Yuting^{1,2}, LUO Xin^{1,2}, ZENG Xin^{1,2},
PAN Shirong^{3,4}, WU Chuanbin^{1,2}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. K&D Center of Pharmaceutics of Guangdong Province, Guangzhou 510080, China;

3. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

4. Cardiovascular Laboratory, The First Affiliated Hospital,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: This study investigates the properties of a combined carrier, which is comprised of polyethylenimine (PEI) and a nuclear peptide, high mobility group box 1 (HMGB1), in order to obtain higher transfection efficiency of non-viral carriers. The pDNA/HMGB1/PEI combined polyplexes are spherical particles observed by transmission electron microscopy. Compared with using PEI alone, improved HMGB1 complexation is observed for smaller particle size of polyplexes and higher surface charge by dynamic light scattering. Gel electrophoresis retardation assays show that HMGB1 could help PEI to bind and condense pDNA. The results of cell viability by MTT assays suggest lower cytotoxicity for HMGB1/PEI than PEI. The transfection efficiencies for pDNA/HMGB1/PEI combined polyplexes show more than 2.9~4.0 times higher than for pDNA/PEI polyplexes, moreover, HMGB1 could weaken the inhibitory

* 收稿日期: 2008-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600789); 广东省自然科学基金资助项目(5300666)

作者简介: 沈媛(1984年生), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 冯敏; E-mail: minfeng77@yahoo.com.cn

effects of serum on complexes. Thus, the combined carrier HMGB1/PEI which consists of the cationic polymer and the nuclear peptide is proved to enhance transfection efficiency of PEI *in vitro*.

Key words: polyethylenimine; HMGB1; gene delivery

安全、有效的载体系统是基因治疗成功的关键因素之一,普遍使用的载体系统包括病毒载体和非病毒载体两类,非病毒载体较病毒载体的安全性有了明显的提高,但到目前为止非病毒型载体的低转染率一直是研究急需解决的问题。对非病毒载体进行化学改性^[1],偶联配体^[2]或复合功能性多肽^[3]是目前提高其转染效率的主要手段。

本研究以近年研究最为广泛的非病毒载体—阳离子多聚物聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)为骨架,复合高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 构建 HMGB1/PEI 复合载体。HMGB1 为一种核蛋白,分子结构中含有核定位信号(NLS)功能的片段,在细胞内能寻找到与核膜合适结合的位点,快速穿梭于细胞核^[4]。该复合载体的结构设计以期突破基因传递的三道主要屏障:PEI 部分其表面正电荷可与细胞膜负电荷相互作用,吞噬进入细胞,突破细胞膜屏障^[5];其次,PEI 的质子海绵效应可突破吞噬小体膜屏障,进入细胞质^[6];最后, HMGB1 部分可携带 DNA 突破核膜屏障,将 DNA 快速转移入细胞核,在核区内完成 DNA 的复制及转录^[4]。本研究探讨了 HMGB1/PEI 复合载体的细胞毒性,复合载体与 pDNA 的复合作用,以及 pDNA/HMGB1/PEI 复合物的体外转染效率。以期获得高转染效率的非病毒载体,并为优化阳离子多聚物为骨架的基因传递系统提供了一种方法。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

透射电子显微镜(JEM-2010HR, 日本),粒度/Zeta 电位分析仪(Malvern Zetasizer Nano Series 90, 英国),细胞培养箱(Thermo Forma Series II, 美国),倒置显微镜(Nikon T1-SM, 日本),正置相差荧光显微镜(Olympus BX51, 日本),流式细胞仪(BeckmanCoulter ESP ELITE, 美国),凝胶成像系统(UVP Biolmaging System GDS-8000 System, 美国),酶联免疫检测仪(Bio-Tek Elx 800, 美国)。

人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞(ATCC No. CCL-2.1),真核表达质粒编码增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, pEGFP-C1, 华

西医科大学惠赠), RPMI Medium 1640 培养基(GIBCO 公司),支链型聚乙烯亚胺(b-PEI, $M_w = 25\ 000$, Aldrich 公司),直链型聚乙烯亚胺(l-PEI, $M_w = 25\ 000$, Polysciences 公司),高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1, Sigma-Aldrich 公司),琼脂糖(Agarose, BIOWEST 公司)。

1.2 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的制备

(1) 将 b-PEI 或 l-PEI 与 pEGFP-C1 分别在磷酸盐缓冲液(PBS pH = 7.4)中配成一定浓度的溶液,按转染质粒剂量为 $2\ \mu\text{g}/\text{孔}$,分别按不同的 N/P 混合,涡漩 10 s,室温温育 30 min 即得 pEGFP-C1/PEI 复合物;

(2) 按 HMGB1/pEGFP-C1 的质量比为 0.01, 0.1, 1, 10 和 100 的不同比例分别在 PBS 中混合,涡漩 10 s,室温温育 15 min;然后再按不同的 N/P 加入适当浓度的 b-PEI 或 l-PEI 溶液混合,涡漩 10 s,室温温育 30 min 即得 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物

1.3 透射电镜观察复合物结构形态

$100\ \mu\text{L}$ 按 1.2 项下新鲜制得的 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物与 $w = 2\%$ 磷钨酸进行负染 1 min,然后将负染复合物液滴加到 200 目的超薄喷碳铜网上,沉淀 1 min,用滤纸吸取铜网上多余的液体,重复沉淀 3 次。干燥后在透射电镜上观察复合物的形态及测量其粒径。

1.4 粒径和表面电位测定

按 1.2 项下新鲜制得的复合物,使 pDNA 的终质量浓度为 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$,在粒径电位分析仪上,测定粒径及表面电位。

1.5 琼脂糖凝胶电泳阻滞试验

采用琼脂糖凝胶电泳阻滞试验考察 HMGB1 是否参与 pDNA 的压缩复合,用裸质粒作为对照。电泳条件:1.2 项下新鲜制得的复合物 $10\ \mu\text{L}$, $w = 1\%$ 琼脂糖(含 $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭), $0.5 \times \text{TAE}$ 电泳缓冲液,电压 80 V,电泳时间 60 min。电泳结束后于凝胶成像系统下进行分析。

1.6 细胞毒性测定(MTT 法)

取 HeLa 单细胞悬液以细胞数 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板, $37\ ^\circ\text{C}$ 、 $\varphi = 5\% \text{CO}_2$ 、100% 相对湿度条件下培养细胞 24 h 至贴壁完全;吸弃培养液,加入按 1.2 项下新鲜制得的复合物溶液,继续

培养 4 h; 吸弃培养液, 加入含 $w = 10\%$ 小牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养 24 h; 再加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h; 然后吸弃含 MTT 的培养液, 加入 DMSO 150 μL ; 酶联免疫检测仪检测各孔 OD 值 (检测波长为 570 nm), 记录结果, 以未经加样的细胞同法操作, 作为对照; 按下式计算细胞存活率 (Cell Viability, CV/%), 通过细胞存活率来表征复合物的毒性。

$$\text{CV}/\% = \text{样品吸收值}/\text{对照吸收值} \times 100\%$$

1.7 细胞转染试验

取处于对数生长期的 HeLa 单细胞悬液以细胞数 7.5×10^4 个/mL 接种于 12 孔培养板, 培养待细胞汇合度 $\geq 70\%$, 转染前用 PBS 洗细胞两次, 加入不含血清或含 $w = 10\%$ 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 800 μL , 再加入按 1.2 项下新鲜制得的复合物溶液 200 μL , 培养 4 h 后终止转染, 移去介质, 加入含 $w = 10\%$ 小牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养 40 ~ 48 h, 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达。转染试验细胞培养结束后用 PBS 冲洗一遍, 再用 $w = 0.25\%$ 胰酶/EDTA 消化液将细胞消化下来, 再用 500 μL PBS 重新悬浮细胞, 转染率通过在流式细胞仪上测定每 10 000 个细胞中发荧光的细胞百分数获得。

2 结果和讨论

2.1 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的结构形态

由电镜图可见 b-PEI 与 HMGB1 和 pDNA 形成的复合物粒子均为规则紧密的球形结构, 边缘清晰, 分散性良好, 粒径在 20 ~ 50 nm 范围 (图 1: A); pEGFP-C1/HMGB1/l-PEI 复合物粒子形态呈较不规则球状结构, 粒径大小差别较大, 分散性较好 (图 1: B)。电镜结果显示复合载体均能有效压

缩 pDNA 形成纳米级大小的粒子, 其中 HMGB1/b-PEI 压缩 pDNA 的能力强于 HMGB1/l-PEI。这可能是因为 b-PEI 比 l-PEI 具有更多一级胺, 能更有效地与 pDNA 相互作用, 形成紧密的粒子^[7-8]。

2.2 复合物的粒径和表面电位

本研究测定 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的粒径和表面电位, 考察了复合 HMGB1 后对 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的粒径和表面电位的影响。结果如图 2 所示, 随 HMGB1/pDNA 质量比的增大, pEGFP-C1/HMGB1/b-PEI 复合物纳米粒粒径变化不明显; 而 pEGFP-C1/HMGB1/l-PEI 复合物纳米粒粒径明显减小。HMGB1 的结构具有蛋白质的两性特征, N 端由富含带正电荷的赖氨酸和精氨酸等氨基酸残基组成的碱性区域; C 端主要由带负电荷的谷氨酸和天冬氨酸组成的酸性区域。因此, HMGB1 与带负电荷的 pDNA 和带正电荷的 PEI 均可发生静电结合作用。已有文献报道 HMGB1 具有和 DNA 非特异性结合的结构域^[9]。因而推测 HMGB1 可协同 PEI 压缩 pDNA 形成结构更紧密的纳米粒。这种协同作用可使结构较为疏松的 l-PEI 的 DNA 复合物的粒径由 224 nm 减小到 70 nm。

考察纳米粒的表面电位发现 (如图 3), pEGFP-C1/HMGB1/b-PEI 复合物纳米粒随着 HMGB1 浓度的增大, 其 Zeta 电位略有增加; pEGFP-C1/HMGB1/l-PEI 复合物纳米粒的表面电位随着 HMGB1/pDNA 质量比的增大而增大的趋势较明显。Zeta 电位的变化可能是由于 HMGB1 参与了与 pDNA 的结合, 使 PEI 带正电荷的氨基过剩, HMGB1 的浓度越高, PEI 过剩的正电荷氨基就越多, 从而导致复合物纳米粒的 Zeta 电位随着 HMGB1 的加入量的增加而增加。

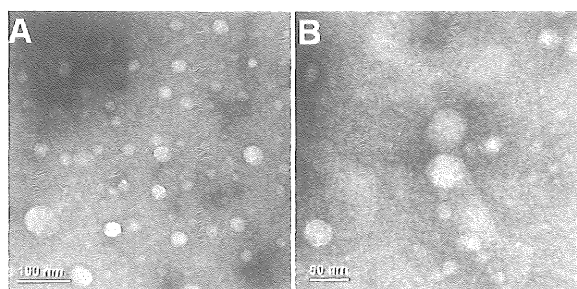


图 1 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的透射电镜图

Fig. 1 TEM images of pEGFP-C1/HMGB1/PEI combined polyplexes

A: pEGFP-C1/HMGB1/b-PEI 复合物;

B: pEGFP-C1/HMGB1/l-PEI 复合物

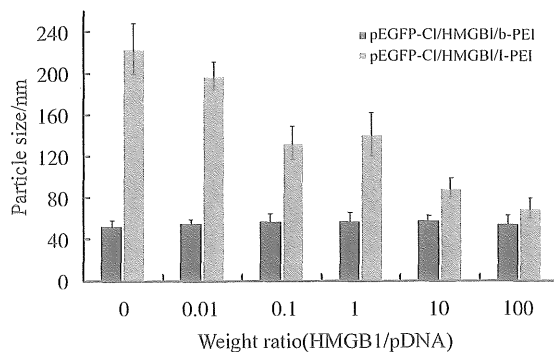


图 2 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的粒径

Fig. 2 Particle size of pEGFP-C1/HMGB1/PEI combined polyplexes

2.3 HMGB1/PEI 复合载体与 pDNA 的复合作用

基因载体能有效保护和传递 pDNA 的一个基本条件就是能与 DNA 形成压缩复合物, PEI 是经典的阳离子多聚物, 其与 pDNA 的压缩复合作用已多

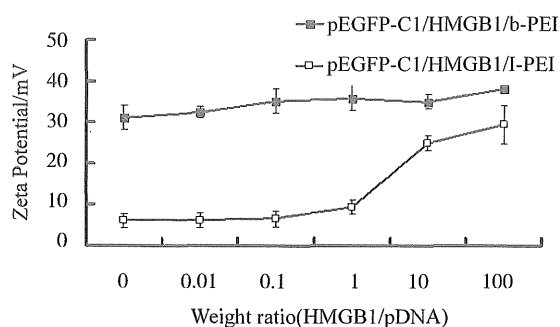


图 3 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的表面电位

Fig. 3 Zeta potential of pEGFP-C1/HMGB1/PEI combined polyplexes

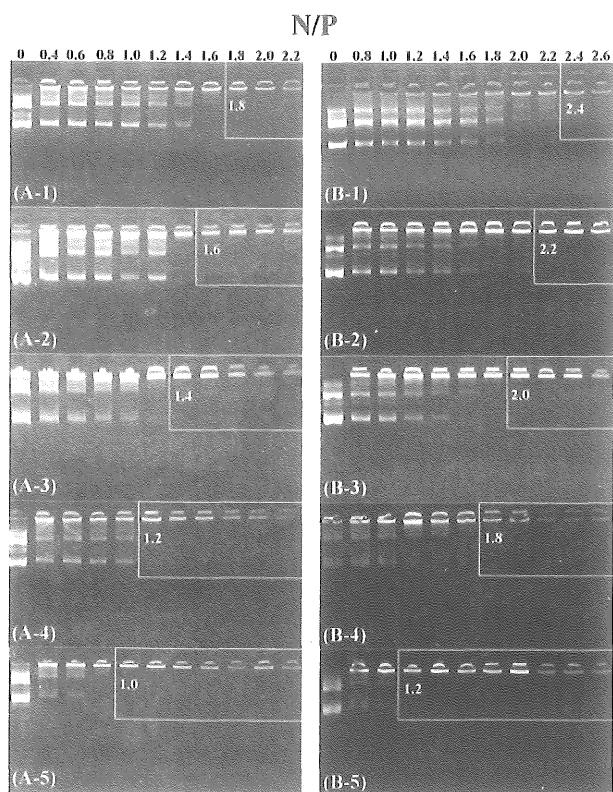


图 4 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of pEGFP-C1/HMGB1/PEI combined polyplexes

(A-1 ~ A-5: 分别为 pEGFP-C1/HMGB1/b-PEI 复合物, HMGB1/pDNA (w/w) = 0.01, 0.1, 1, 10, 100; B-1 ~ B-5: 分别为 pEGFP-C1/HMGB1/l-PEI 复合物, HMGB1/pDNA (w/w) = 0.01, 0.1, 1, 10, 100)

有报道^[10-11]。上述粒径和电位考察推断 HMGB1 与 pDNA 可能存在静电作用, 鉴此本研究利用凝胶电泳阻滞试验来验证 HMGB1 是否能协同 PEI 压缩 pDNA。试验结果显示, b-PEI 完全阻滞 DNA 的 N/P 为 1.8, 随着 HMGB1/pDNA 质量比增加 (图 4: A-1 ~ A-5), HMGB1/b-PEI 复合载体阻滞 pDNA 的 N/P 逐渐减小, 在 HMGB1/pDNA 质量比为 100 时, HMGB1/b-PEI 阻滞 DNA 的 N/P 仅为 1.0; l-PEI 完全阻滞 pDNA 的 N/P 为 2.4, 当 HMGB1/pDNA 质量比由 0.01 增加至 100 时 (图 4: B-1 ~ B-5), 可观察到阻滞 N/P 比由 2.4 逐渐下降至 1.2。阻滞电泳试验的结果验证了 HMGB1 能够协同 b-PEI 和 l-PEI 压缩 pDNA。但在复合物的粒径和电位测定时发现复合不同量的 HMGB1 对 b-PEI 的 DNA 复合物的粒径和表面电位的影响不大, 这可能是由

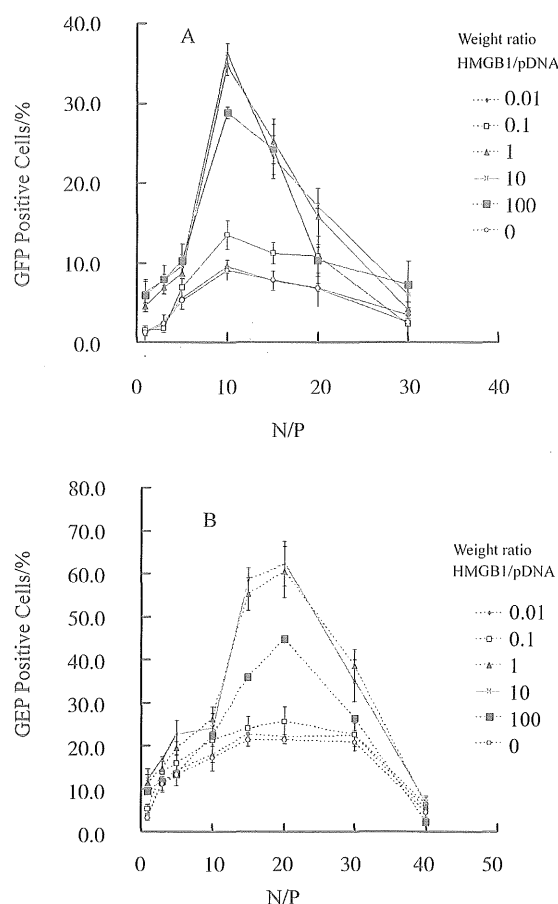


图 5 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物在无血清条件下转染 HeLa 细胞的转染效率

Fig. 5 The transfection efficiency of pEGFP-C1/HMGB1/PEI combined polyplexes in the serum free medium

(A: pEGFP-C1/HMGB1/b-PEI 复合物;
B: pEGFP-C1/HMGB1/l-PEI 复合物)

于 b-PEI 压缩 pDNA 的能力远强于 HMGB1, 掩盖了 HMGB1 压缩 pDNA 后引起的粒径和电位的变化。

2.4 HMGB1 对转染效率的影响

复合 HMGB1 后对 PEI 转染效率的影响如图 5 所示。与 b-PEI 和 l-PEI 相比, HMGB1/b-PEI 和 HMGB1/l-PEI 复合载体在不同条件下的转染效率都有一定程度增加。在最优 N/P (b-PEI 为 $N/P = 10$; l-PEI 为 $N/P = 20$) 条件下, HMGB1/pDNA 质量比为 0.01 时, 复合 HMGB1 对 b-PEI 和 l-PEI 转染效率提高不明显; 当 HMGB1/pDNA 质量比大于 0.1 时, 复合 HMGB1 使 b-PEI 和 l-PEI 的转染率提高的幅度增大。在 $N/P = 10$, HMGB1/pDNA 质量比为 10 时, pDNA/HMGB1/b-PEI 复合物达到转染的最佳效果, 转染率为 36.3%, 为未加入 HMGB1 时的 4.0 倍; 在 $N/P = 20$, HMGB1/pDNA 质量比为 10 时, pDNA/HMGB1/l-PEI 复合物转染率达到最高值为 62.3%, 为未加入 HMGB1 时的 2.9 倍。

2.5 血清对转染效率的影响

DNA/阳离子载体复合物在体内应用时, 由于

血清中大量带负电荷的蛋白可结合 DNA 复合物, 使复合物的结构特征发生改变, 进而使复合物中的 DNA 处于易被核酸酶降解的构象, 从而导致转染率降低^[12]。本研究考察了 HMGB1/PEI 复合载体在含血清条件下的转染效率, 同样以 PEI 作为对照。相对于无血清的培养液, 培养液中的血清成分对复合载体介导的基因转染有阻碍作用, 结果显示无血清组的转染率约为含 $w = 10\%$ 血清组的 4~5 倍 (图 6: A1、B1)。比较在含 $w = 10\%$ 血清环境下的转染率与无血清环境下转染率的比值发现 (图 6: A2、B2), 随着 HMGB1/pDNA 质量比的增加, 该比值逐渐增大, 且各均数的两两比较有显著性差异, P 均小于 0.05。说明 HMGB1 有减弱血清阻碍基因传递的作用。这可能是由于 HMGB1 和 PEI 皆可压缩 pDNA, 达到双重保护 pDNA 免受核酸酶降解的作用^[13], 因而降低血清中带负电荷的蛋白成分对基因传递的影响, 有利于 HMGB1/PEI 复合载体在体内转染的应用。

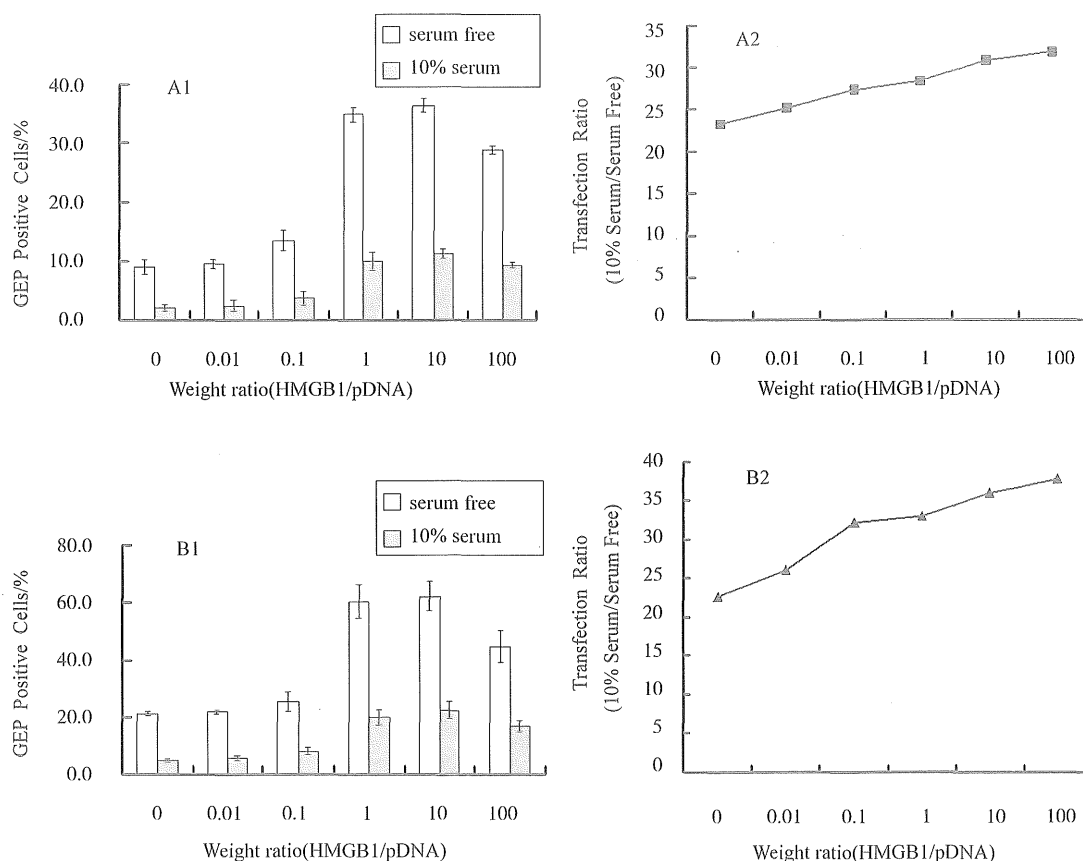


图 6 pEGFP-C1/HMGB1/PEI 复合物在有血清条件下转染 HeLa 细胞的转染效率

Fig. 6 The transfection efficiency of pEGFP-C1/HMGB1/PEI combined polyplexes in the present of serum medium

(A: pEGFP-C1/HMGB1/b-PEI 复合物, $N/P = 10$; B: pEGFP-C1/HMGB1/l-PEI 复合物, $N/P = 20$)

2.6 细胞毒性

基因载体的毒性是决定载体能否推广使用的一个关键因素。PEI 作为经典的阳离子聚合物载体,其主要缺陷在于细胞毒性较大^[14]。本研究采用 MTT 法,考察了 HMGB1/PEI 复合载体以及 pEG-FP-C1/HMGB1/PEI 复合物的细胞毒性。结果如图 7 所示, N/P = 10 和 N/P = 20 分别为复合载体 HMGB1/b-PEI 和 HMGB1/l-PEI 最优转染效率时的 N/P。与 l-PEI 和 b-PEI 相比,加入 HMGB1 后的复合载体其细胞毒性均有减小的趋势,这可能是由于没有细胞毒性的大分子 HMGB1 掩蔽了部分 PEI 链段,从而减弱了 PEI 对细胞的毒性。

3 结 论

本研究以 PEI 为骨架复合核蛋白 HMGB1,构建了 HMGB1/PEI 复合载体。复合载体中 HMGB1 能协助 PEI 压缩 pDNA 形成球形纳米粒,降低 PEI 的细胞毒性,显著提高 PEI 的转染效率,并且能弱化血清对转染的阻碍作用。HMGB1/PEI 复合载体有望成为新型的高效低毒非病毒基因载体。

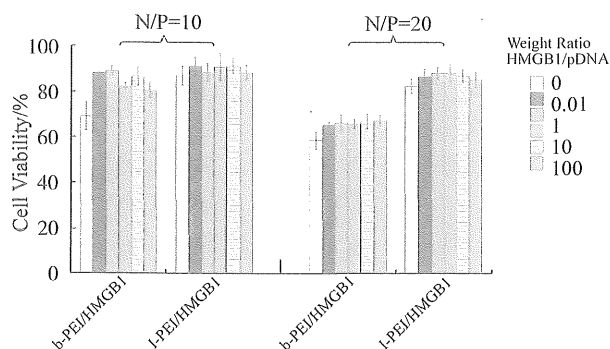


图 7 HMGB1/PEI 复合载体的细胞毒性

Fig. 7 Cytotoxicity studies of HMGB1/PEI combined carriers

参考文献:

- [1] NEU M, FISCHER D, KISSEL T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(8): 992 - 1009.
- [2] LU Y, LOW P S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(5): 675 - 693.
- [3] KLEEMANN E, NEU M, KELEL N, et al. Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG-PEI [J]. *J Control Release*, 2005, 109(1-3): 299 - 316.
- [4] HABERLAND A, BOTTGER M. Nuclear proteins as gene-transfer vectors [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2005, 42(Pt 2): 97 - 106.
- [5] BOUSSIF O, LEZOUALCH F, ZANTA M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92(16): 7297 - 7301.
- [6] CHARWAN H, WIGHTMAN L, KIRCHEIS R, et al. Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA) [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(9): 810 - 817.
- [7] TANG M X, SZOKA F C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes [J]. *Gene Ther*, 1997, 4(8): 823 - 832.
- [8] CHOOSAKOONKRIANG S, LOBO B A, KOE G S, et al. Biophysical characterization of PEI/DNA complexes [J]. *J Pharm Sci*, 2003, 92(8): 1710 - 1722.
- [9] ANDERSSON U, ERIANSSON-HARRIS H, YANG H, et al. HMGB1 as a DNA-binding cytokine [J]. *J Leuk Biol*, 2002, 72: 1084 - 1091.
- [10] DUNLAP D D, MAGGI A, SORIA M R, et al. Nano-scopic structure of DNA condensed for gene delivery [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(15): 3095 - 3101.
- [11] BLOOMFIELD V A. DNA condensation [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, 6(3): 334 - 341.
- [12] ESCRIOU V, CIOLINA CLACROIX F, et al. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1368(2): 276 - 288.
- [13] STOTT K, TANG G S, LEE K B, et al. Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA [J]. *J Mol Biol*, 2006, 360(1): 90 - 104.
- [14] 李经忠, 王青青, 余海. 新型非病毒载体聚乙烯亚胺介导基因转染参数的研究 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2006, 25(4): 481 - 487.

LI Jingzhong, WANG Qingqing, YU Hai. Gene transfer by the new type nonviral vector polyethylenimine [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2006, 25(4): 481 - 487.