

闵莉静,李敬芬. 低分子量树枝状聚乙烯亚胺-g-黄秋葵多糖作为基因药物合成载体的构建[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):39-42.

低分子量树枝状聚乙烯亚胺-g-黄秋葵多糖作为基因药物合成载体的构建

闵莉静,李敬芬

(湖州师范学院生命科学学院,浙江湖州 313000)

摘要:通过合成设计,获得 1 种转染率高、细胞毒性低、生物相容性好的基因药物合成载体。用水煮醇沉法提取黄秋葵多糖,纯化,键合树枝状聚乙烯亚胺(bPEI,分子量为 600、1 200 u),获得 bPEI-g-黄秋葵多糖复合物,并对复合物进行系列理化生表征。¹HNMR 结果表明复合物合成成功;凝胶阻滞电泳结果表明,在复合物与质粒 DNA 重量比在 5:1 时,复合物能与质粒 DNA 牢固结合,且在投射电镜下观察到,复合物包裹质粒 DNA 成直径约为 200 nm 的核状;细胞毒性试验表明,该复合物毒性远低于 PEI-25 ku,而细胞转染效率试验结果表明,该复合物转染效率较高,当重量比为 70:1 时,与 PEI-25 ku 接近。说明 bPEI-g-黄秋葵多糖复合物是一种高转染、低毒、生物兼容的基因药物合成载体。

关键词:低分子量;树枝状;聚乙烯亚胺;黄秋葵多糖;合成载体

中图分类号: Q782 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0039-04

基因治疗有望解决一些内源性疾病,该过程中基因药物载体具有极其重要的作用。目前,临床应用的基因药物载体主要为病毒性载体,具有易引起免疫反应和基因突变的潜在危险^[1],所以,人工合成的非病毒基因药物载体成为研究热点。其中,基于聚乙烯亚胺(PEI)的阳离子非病毒载体由于其结构中的胺基能与 DNA 很好地结合,保护 DNA 不被酶降解而获得更多的重视。PEI 的转染效率与其分子量成正比,高分子量的 PEI 具有高转染率,但细胞毒性也高。目前研究表明,PEI-25 ku 具有最高的转染效率,但毒性也最大;低分子量的 PEI 虽然细胞毒性较低,但几乎没有转染率^[2-4]。目前,大家都在寻求通过修饰 PEI 的结构获得低毒、高效的基因药物载体。黄秋葵多糖是从药食两用的植物——黄秋葵果实中提取的一种天然植物多糖,具有降脂、降压、抗癌、抗热应激性、抗疲劳等生理活性^[5]。其结构中存在大量的—OH,可以与低分子量 PEI 中的胺基通过酯键偶合成高分子量复合物。一方面,高分子量的复合物结构将大大提高其细胞转染效率;另一方面,该复合物易生物降解,且降解后的产物低毒,细胞兼容性好。

1 材料与方法

1.1 试剂

树枝状聚乙烯亚胺(bPEI,分子量为 1 200、600 u)、三乙胺、甲基噻唑基四唑(MTT)、胰蛋白酶均购自 Sigma-Adrich 公司;N,N'-羰基二咪唑(CDI,分子量为 162.15 u)购自 Pierce 公司;NMR 溶剂-重水购自北京腾远科技有限公司;DMEM(高糖)培养基购自吉诺生物有限公司;胎牛血清(FBS)和小牛血清(FCS)均购自浙江杭州四季青生物工程材

料有限公司;绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-N1 均为上海市肿瘤研究所惠赠;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。COS-7 细胞(非洲绿猴肾上皮细胞)培养于含有 10% 小牛血清的 1640 培养基中,由浙江大学肿瘤免疫所赠送。MTT 溶液:5 mg/mL 甲基噻唑基四唑×PBS 液,过滤除菌,避光,20 ℃ 保存;磷酸缓冲液(PBS)溶液:8.0 g NaCl、3.478 5 g Na₂HPO₄·12H₂O/2.9 g NaH₂PO₄、0.2 g KCl、0.2 g KH₂PO₄ 溶于 1 000 mL 蒸馏水;Tris-乙酸(TAE)缓冲液:Tris 碱 242 g、冰乙酸 57.1 mL、EDTA 18.612 g 溶于 0.01 mol/L PBS 溶液中,加水定容至 1 000 mL。

1.2 仪器

透析膜(分子量 8 000~14 400 u)购自 Pierce 公司;FD-1 冰冻干燥机;瓦里安 400 MHz 核磁共振仪;U-2800 紫外分光光度计;JEM-2100HR 透射电镜;Series II 细胞培养箱;BIO-RAD680 酶标仪;Tanon Epo 凝胶电泳仪;JS-380A 自动凝胶图像分析仪;Nikon Eclipse TE200 倒置荧光显微镜;LB9507 荧光素酶检测仪;恒温摇床(Thermo Forma);-80 ℃ 冰箱(Sony)。

1.3 方法

1.3.1 黄秋葵多糖的提纯 称取黄秋葵果实若干,加水,浸泡过夜,100 ℃ 回流 4 h(×4),过滤,取滤液,3 次重复操作,合并滤液,浓缩,按体积比 1:3 滴加乙醇,4 000 r/min 离心,取沉淀,加水溶解,转移入透析膜(分子量:8 000~14 400 u),透析过夜,4 000 r/min 离心,取上清,烘干得粗品,蒽酮-硫酸法测糖含量。将粗品溶于水后,过柱(Sephadex HW-40C),冻干成粉末,GPC 测定分子量,色谱条件:Agilent 1100,SEDEX75 型蒸发光散射检测器(ELSD),Tsk-GeL 3000PWXL(7.8 mm×300 mm),流动相水/氮气,流速 1 mL/min。

1.3.2 复合物的合成 精确称取黄秋葵多糖,溶于 10 mL 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)中,加入 0.1 mL 三乙胺,氮气保护,搅

收稿日期:2013-02-18

作者简介:闵莉静(1981—),女,浙江湖州人,硕士,研究方向为天然产物的提取分析及结构修饰。E-mail:mlinjing@hutc.zj.cn.

拌,1.5 h 内缓慢均匀滴加 N,N' -羰基二咪唑/ CH_2Cl_2 ;氮气保护,避光,搅拌,加入 0.1 mL 三乙胺,1.5 h 内分别缓慢均匀滴加 bPEI-1 200 u、bPEI-600 u;氮气保护,避光,搅拌,反应过夜;将反应液转移入透析膜(分子量 8 000 ~ 14 400 u),透析 48 h,4 000 r/min 离心,取上清,冻干。

1.3.3 复合物的化学表征

1.3.3.1 核磁共振 称取 10 mg 样品溶于 0.5 mL 重水中,溶液装入核磁玻璃管,高度大于 3 cm,核磁共振光谱仪测定。

1.3.3.2 热重分析 扫描温度范围 25 ~ 600 $^{\circ}\text{C}$,升温速度 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,样品用量 10 mg。

1.3.4 复合物的生物学表征

1.3.4.1 琼脂糖阻滞电泳 复合物/质粒 DNA 按不同重量比分别配制成为 20 μL 的复合物/质粒 DNA 混合液,每份含 1.0 μg 质粒 DNA,混合 30 min,进行琼脂糖凝胶电泳试验,紫外灯下观察质粒电泳条带分布。电泳条件:1% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溴化乙锭),1 TAE 缓冲液,电压 100 mV,电泳时间为 40 min。

1.3.4.2 透射电镜测定粒径大小 复合物/质粒 DNA 按不同重量比,配成复合物/质粒 DNA 混合液,振荡 1 min,静置 30 min,取少量复合物溶液,滴在电镜观测所需的铜网上,待溶液晾干后,将样品放在透射电镜下观测。

1.3.4.3 细胞毒性 将 COS-7 细胞接种到 96 孔板上,接种的细胞密度为 5 000 个/孔,培养 24 h。吸去各孔中残留培养液,各种复合物在含 10% FCS 的 DMEM 中配制成浓度梯度为 2.5、8、10、15、20、30、50、75、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。加入不同浓度的复合物培养液 0.15 mL/孔,3 次平行。复合物与细胞共培养 4 ~ 8 h 后,吸去残留培养液,加入 0.15 mL/孔含 10% 血清的培养液,MTT 法检测细胞的代谢活动。吸去培养

液,加入 100 μL /孔含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MTT 的无血清 DMEM (5 mg/mL MTT 10 mL 加入到 90 μL DMEM 中),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h。翻板法弃去液体,加入 100 μL /孔 DMSO,振荡 10 min。在酶标检测仪上 570 nm 波长处测定吸光度 D ,PEI-25 ku 作阳性对照。

1.3.4.4 体外转染 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,从 CO_2 培养箱中取出 1 瓶 COS-7 细胞,胰酶消化细胞约 5 min,加 10% FCS 的 DMEM 培养液中中止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,取 20 mL 培养液悬浮细胞,稀释 10 倍,滴加在细胞计数板上计数(一大格细胞数控制在 50 ~ 100 个)。按 2.5 万个/孔的细胞密度铺 48 孔板,体积为 30 μL /孔,再加入培养液培养 24 h,待细胞丰度为 60% 时转染。48 孔板转染 1 μg /孔质粒 pEGFP-N1,复合物按照与质粒 DNA 不同重量比配成复合物/质粒 DNA 混合物,振荡,混匀。吸去 48 孔板细胞上的培养液,加入 0.7 mL/孔无血清的 DMEM。将复合物/质粒 DNA 混合物加入细胞中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 培养箱中培养 4 ~ 6 h;吸去转染液,加入含 10% 血清的培养液 0.75 mL/孔,继续培养 36 h;用 0.01 mol/mL PBS 清洗细胞,加入细胞裂解液 75 μL /孔,-80 $^{\circ}\text{C}$ 下至少冻存 1 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 融化,测定荧光素酶的表达。3 次平均,以空白为对照,以 PEI-25 ku 作阳性对照。

2 结果与分析

2.1 黄秋葵多糖的提纯

分离得到淡黄色黄秋葵多糖,粗糖含量约 46%,纯化后,经 GPC 测定,分子量约为 190 000 u。

2.2 复合物的合成

反应经 2 步完成,第 1 步,CDI 活化糖链 C3—的—OH;第 2 步,糖链与 PEI 的连接,具体如图 1 所示。

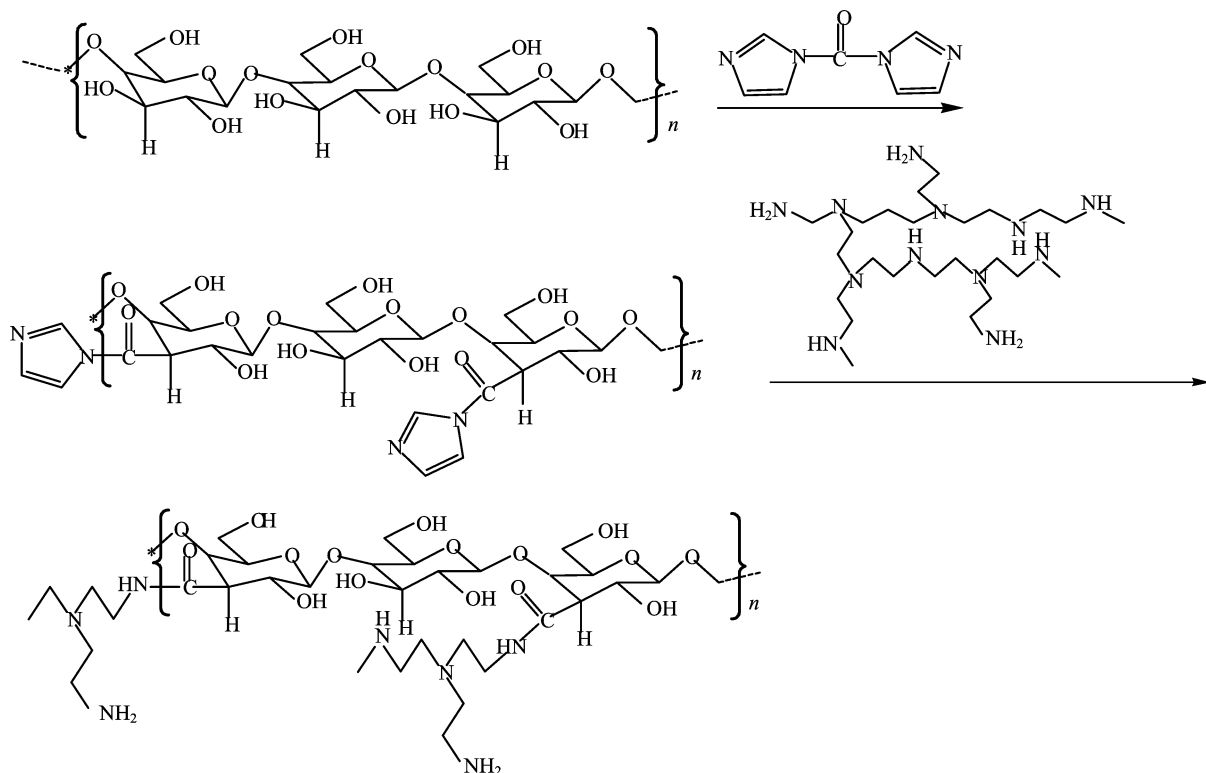


图1 bPEI-g-黄秋葵多糖复合物的合成反应式

2.3 复合物的化学表征

2.3.1 核磁共振 观察图 2-a 为聚乙烯亚胺结构,其中—NH—NH₂ 上的 H 主要在 δ 2.4 左右出现。图 2-b 为黄秋葵多糖结构,1 号位上的 H 由于相邻 2 个 O,所以位移出现在 δ 4.9 左右,其他位上的 H 在 δ 3~4 之间,图 2-c、图 2-d 为合成复合物结构,对照图 2-b 发现化学位移向高场移动,在

δ 2~3 之间出现一组峰,而原来 δ 3~4 之间的峰信号降低,这一变化可能是聚乙烯亚胺取代了糖链上的活泼—OH。另外,由于 1 号位上的 H 受干扰影响较小,故 1 号位上的 H 信号几乎不变,但由于每种多糖链由不同的单糖单元构成,所以对于糖链上羟基取代量的确定存在一定的不确定性,所以在后面的表征中选择重量比来代替复合物上聚乙烯亚胺的接入量。

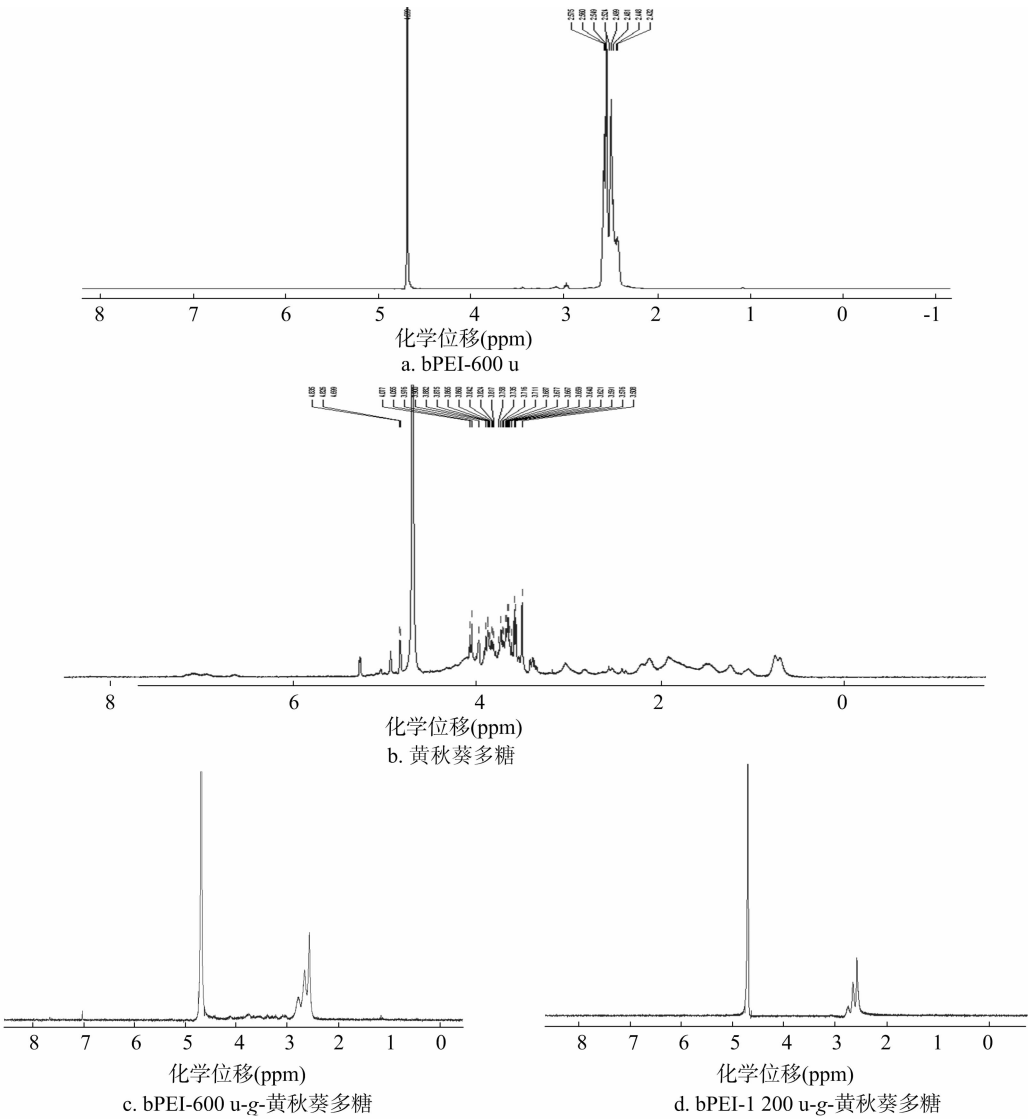


图2 几种化合物的¹H NMR 谱图示

2.3.2 热重分析 图 3 中的 3 条曲线从上到下依次为 bPEI-600 u、黄秋葵多糖、复合物,三者热裂解曲线有明显区别,其中 bPEI-600 u 只在 300℃ 附近出现 1 个梯度,说明在此温度处 PEI 开始分解失重;植物多糖在 250℃ 附近出现梯度,说明黄秋葵多糖出现糖链断裂;而复合物在 100、225℃ 附近出现 2 个明显的梯度,说明这个复合物随着温度升高出现了 2 处断键。

2.3 复合物的生物学表征

2.3.1 琼脂糖阻滞电泳 图 4 发现,复合物与质粒 DNA 在重量比为 5:1 左右时,很好结合。

2.3.2 透射电镜 由图 5 可知,复合物能很好地包裹质粒 DNA,形成一个核状结构。且经过测量发现,该结构的直径约

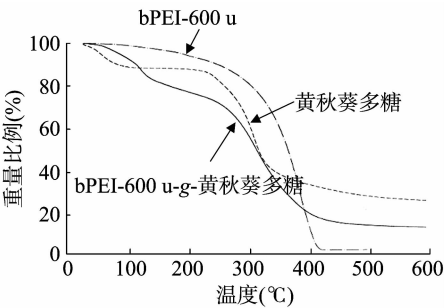
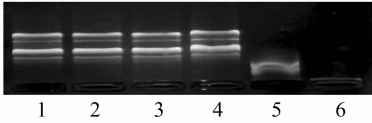
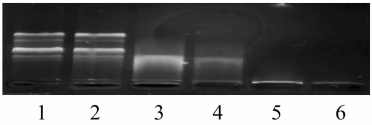


图3 热裂解曲线

为 200 nm,便于通过核孔进入细胞核,为后面的细胞试验提供了可行性。



1~6—复合物/质粒DNA 重量比为 0 : 1(DNA only)、1 : 1、2 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1

图4 琼脂糖凝胶阻滞电泳

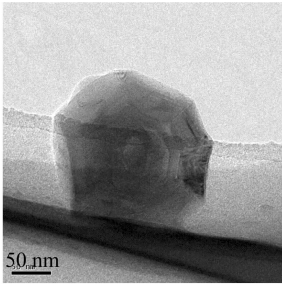


图5 bPEI-600 u-g-黄秋葵多糖粒径大小

2.3.3 细胞毒性 由图 6 可知, bPEI - 600 u - g - 黄秋葵多糖曲线平稳, 几乎没有毒性, 在高浓度下, 细胞依然能存活。PEI - 25 ku 具有较高的细胞毒性, 低浓度下能刺激细胞分化; 在浓度为 25 nmol/孔时, 细胞达到最高生存点; 然后随 PEI - 25 ku 浓度的增大, 细胞开始大量死亡。而复合物在浓度较低时, 存在细胞死亡现象, 但到一定浓度后, 反而促进细胞生长, 这可能是由于复合物降解后的黄秋葵多糖给细胞提供了营养, 有助于细胞生长。

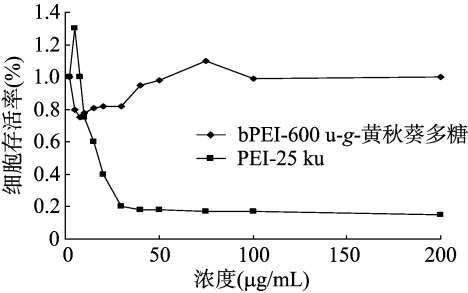
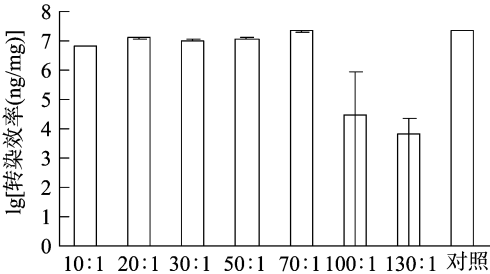
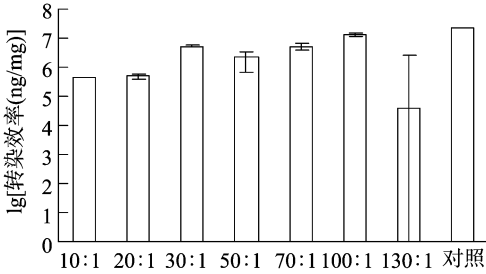


图6 细胞毒性试验结果

2.3.4 体外转染 图 7 为复合物在 COS - 7 细胞上的转染结果, 复合物随着浓度的增大, 转染效率逐渐提高, 达到最高值后, 由于一些细胞死亡, 转染效率又略有下降, 黄秋葵多糖与 bPEI - 600 u、bPEI - 1 200 u 的重量比均为 70 : 1 时, 转染



$m_{\text{黄秋葵多糖}} : m_{\text{bPEI-1 200 u}}$



$m_{\text{黄秋葵多糖}} : m_{\text{bPEI-600 u}}$

图7 复合物在COS-7细胞上转染状况

效率最高。

3 结论

本试验中, 从黄秋葵种子中提取黄秋葵多糖。经过纯化, 以 CDI 为交联剂, 耦合树枝状 PEI - 600 u/1 200 u, 合成复合物 bPEI - g - 黄秋葵多糖, 经化学表征说明 bPEI 与黄秋葵多糖以酯键连接, 且该复合物与质粒 DNA 在重量比为 5 : 1 时能与质粒 DNA 牢固结合, 且包裹质粒 DNA 形成直径约为 200 nm 的核状聚合物, 帮助质粒 DNA 有效进入细胞核。说明该复合物在有效提高低分子量 PEI 转染效率的同时, 具有较低的细胞毒性。今后, 笔者将探讨解决复合物靶向问题, 需要在后期的工作中对其结构进行进一步修饰。

参考文献:

[1] 戴非寒, 田培坤, 顾健人. 基因治疗中的病毒载体[J]. 实用肿瘤杂志, 2000, 15(1): 64 - 67.

[2] de Laporte L, Rea J C, Shea L D. Design of modular non - viral gene therapy vectors[J]. Biomaterials, 2006, 27(7): 947 - 954.

[3] Zhong Z Y, Feijen J, Lok M C, et al. Low molecular weight linear polyethylenimine - b - poly (ethylene glycol) - b - polyethylenimine triblock copolymers: synthesis, characterization, and *in vitro* gene transfer properties [J]. Biomacromolecules, 2005, 6 (6): 3440 - 3448.

[4] 李 欣, 王玉英. 介绍一种药食同源的蔬菜——黄秋葵[J]. 名优特新, 2012(10): 50.