

[文章编号] 1003—4684(2019)05-0028-04

PBAE 447 的合成鉴定及其基因传递效率

王润杨, 张紫怡, 段海潇, 刘滨磊, 胡 翰, 汪 洋

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] PBAE 447 是一种能够携带负电 DNA 进入细胞进行表达的阳离子聚合物。通过 4-氨基-1-丁醇和 1,4-丁二醇二丙烯酸酯进行加成反应,并加入 1-(3-氨丙基)-4-甲基哌嗪封端合成 PBAE 447,所得产物数均分子量大小为 17586,并使用 ICP4、LoVo、B16R、CT-26 做为转染用细胞系,绿色荧光蛋白(GFP)为报告基因。结果表明,PBAE 447 能够携带基因进入多种肿瘤细胞系进行表达。

[关键词] 聚(β -氨基酯);阳离子聚合物;报告基因;细胞毒性

[中图分类号] R153 [文献标识码] A

基因治疗^[1]不单单能够减轻症状,并且能从根本上对疾病进行治疗^[2]。基因传递的载体种类繁多,主要分为病毒类载体和非病毒类载体^[3-5]。通常来说,非病毒类载体在基因传递能力上无法与病毒载体媲美,但是,病毒类载体基因插入位置的不确定性可能会造成潜在的生物学风险^[6]。而与病毒类载体相比,非病毒类载体具有易于合成、可批量化生产、无生物学风险等多种特点^[7],并且经过多肽、抗体修饰的非病毒类载体可以特异性的靶向给药位置,因此具有广阔的应用空间。

聚(β -氨基酯)(PBAEs)是一类线性的阳离子聚合物^[8-9],能与带负电的 DNA 结合,并将压缩成直径小于 250 nm 的复合物。PBAE 447 在细胞中可以通过酯基的水解进行降解,具有合成条件简单,无需溶剂、催化剂,无副产物的特点^[10]。目前,已经合成了 2200 多个具有独特架构的 PBAE,多数与 DNA 结合之后细胞摄取效率并不好,且有一些 PBAE/DNA 复合物虽摄取效果比较好,但会引起较高的细胞毒性。

本研究合成并鉴定了一种 PBAE 447,评估其携带基因进入不同细胞的能力,并考察了相应的细胞毒性。

1 材料与方法

1.1 PBAE 447 的制备

合成采取两步法^[11]进行。具体步骤如下:准确

称取 4-氨基-1-丁醇 1.00 g,1,4-丁二醇二丙烯酸酯^[12]2.56 g,其中胺单体与酯单体物质的量之比为 1.1:1,按照酯单体、胺单体的顺序加入试管中,用磁力搅拌器搅拌,800 r/min,95℃油浴 24h,加热搅拌的步骤需避光进行。

取反应后的聚合物 2.30 g 溶解于 2 mL 四氢呋喃(THF)中,加入到溶解有 786 mg 1-(3-氨丙基)-4-甲基哌嗪的 13 mL 四氢呋喃中,800 r/min,室温搅拌 2 h,进行封端。完成后加入 5 倍体积的乙醚(75 mL)清洗,静置 30 min,除去未反应的小分子,收集聚合物,除去上清。之后再加入 2 倍体积的乙醚(30 mL)重复洗涤,除去上清。

对收集的聚合物于室温进行真空干燥,48 h 后将获得的聚合物溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,终浓度为 100 mg/mL,保存于-20℃冰箱中备用。

1.2 PBAE 447 的鉴定

聚合物的分子量采用渗透凝胶色谱(GPC)进行鉴定,流动相为 1%的哌啶、5%的 DMSO、94%的 THF。将样品缓慢通过层析柱,数均分子量和重均分子量采用聚苯乙烯标准品进行测定,流量设置为 1 mL/min。聚合物的纯度通过核磁共振氢谱进行确认,由四甲基硅烷作为内参,样品溶于氘代二甲基亚砜中。

1.3 电泳阻滞实验

将 0.5 g 的琼脂糖溶于 50 mL TAE 电泳缓冲液中,加热溶解琼脂糖,待温度降至 40℃左右时,加

[收稿日期] 2019—03—13

[第一作者] 王润杨(1994—),男,湖北黄冈人,湖北工业大学硕士研究生,研究方向为发酵工程

[通信作者] 刘滨磊(1962—),男,湖北武汉人,湖北工业大学教授,研究方向为生物制药

入 5 mg/mL 的溴化乙锭,使其终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每孔取 1 μg 的质粒,分别按照 PBAE/DNA 质量比为 0 : 1,5 : 1,15 : 1,30 : 1,45 : 1,60 : 1,75 : 1,90 : 1,90 : 0 混合,室温放置 10 min,取所得复合物电泳,设定电压为 80 V,电泳 40 min 后,停止电泳。于凝胶成像系统上观察结果、拍照。

1.4 转染效率鉴定

1.4.1 细胞铺板 实验前一天,对细胞进行消化,将 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板中,细胞密度为 $1\times 10^5/\text{mL}$,在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 环境中培养。

1.4.2 细胞转染 转染时分别按照 PBAE/DNA 质量比为 30,60,90 制备转染复合物,以质量比 30 为例,取 0.3 μg 的 pd34.5-cmv-GFP 质粒溶解于 25 m mol,pH 为 5.0 的醋酸钠缓冲液中,终体积为 50 μL 。同时取 0.9 μL 浓度为 100 mg/mL 的 PBAE 447 溶解于同样醋酸钠缓冲液中,终体积为 50 μL ,将上述稀释好的质粒 DNA 和 PBAE 447 等体积混合,室温静置 10 min,将复合物加入到铺好的 96 孔板中混匀,每孔 20 μL 。将细胞放入恒温培养箱中孵育 2 h,然后将其中的转染混合物/完全培养基吸出,更换新鲜的完全培养基,48 h 后观察实验结果。同时设置空白组与 Lipofectamine 3000 对照组,Lipofectamine 3000 用量以及实验操作步骤参考试剂说明书。

1.4.3 细胞表达 GFP 检测 首先对将要测试的 96 孔板中加入 30 μL 胰酶进行细胞消化脱壁,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置 3~5 min,在显微镜下观察到细胞变圆脱落后,立即加入 170 μL 含有 2% 的胎牛血清(FBS)的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液终止消化反应。将样品转移至 1.5 mL EP 管中,1500 r/min 离心 5 min 后,弃去上清溶液。余下细胞沉淀用 300 μL 流式细胞术缓冲液将细胞重悬(含有 PBS、1 : 50 FBS、1 : 200 PI),然后上流式细胞仪进行检测,碘化吡啶(PI)用于排除死亡细胞,最终结果 GFP 阳性率=GFP 阳性细胞/所有活细胞。

1.5 细胞毒性鉴定

细胞铺板及转染方法与 1.4.1 和 1.4.2 一致,毒性检测实验方法如下:转染 48 h 后,弃去 96 孔板中的上层培养液,尽量不要戳到细胞,以免影响实验结果。每孔加入 20 μL 的噻唑蓝(MTT)溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),将细胞放回培养箱中,继续培养 4 h,弃去各孔中的液体(为使孔内甲瓟沉淀完全溶解,尽可能将各孔液体弃除干净),再加入 150 μL 的 DMSO,用锡箔纸保住孔板,在摇床上震荡 10 min 之后用多功能酶标仪以波长 492 nm 测量各孔的吸光值。

2 结果

2.1 pbAE447 的鉴定

2.1.1 PBAE 447 的分子量鉴定 作为本次研究的主要聚合物,由 GPC 结果可得出,PBAE 447 的数均分子量(Number-averaged molecular weights, M_n)为 17586,重均分子量(weight-averaged molecular weights, M_w)为 35276,多分散系数(the polydispersity index, PDI)为 2.01,本次实验所得聚合物分子量大小要高于 Antonella 等前期的报道^[13]。Green 等前期研究已表明,通过增高 PBAE 聚合物的分子量能够促进聚合物与 DNA 分子的结合,从而提升基因的传递效率^[14]。

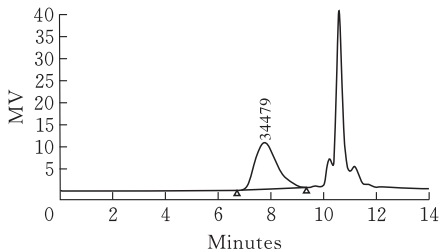


图 1 PBAE 447 样品的 GPC 图

2.1.2 PBAE 447 纯度鉴定 聚合物的纯度通过核磁共振氢谱进行检测,图 2 展示了 PBAE 447 的特征峰,图 2b 中的字母与图 2a 中对应,核磁共振氢谱的结果与 Green 等前期所报道的结果相一致^[15-16]。

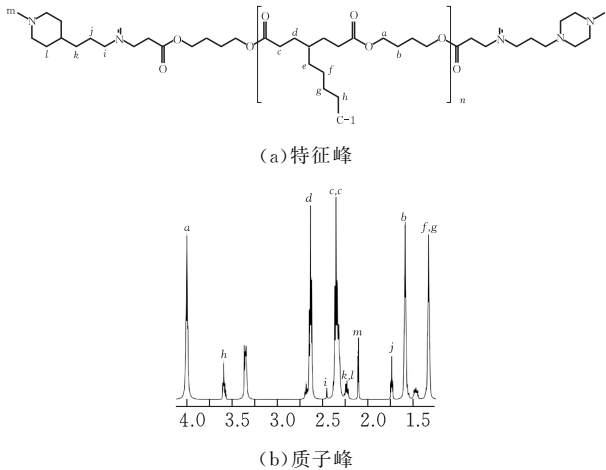


图 2 PBAE 447 的核磁共振氢谱峰图

2.2 电泳阻滞实验

PBAE 447 与质粒 DNA 能通静电包衣,形成球状的二元复合物(图 3),PBAE 447 对质粒 DNA 的包裹能力使用电泳阻滞实验来进行验证(图 4),当 PBAE 447 和质粒的质量比为 5 : 1 和 15 : 1 进行结合时,电泳时可以观察到部分裸 DNA 的条带,说明聚合物无法完全包裹住质粒 DNA。而当 PBAE 447 和质粒 DNA 的质量比达到 30 : 1 时,聚合物能够通过静电结合大部分质粒 DNA,但不能完全对其

压缩,因此电泳槽内仍能观察到信号。当 PBAE 447 和质粒 DNA 的质量比超过 60 : 1 时,聚合物能够完全压缩质粒 DNA,在电泳槽内完全观察不到信号。

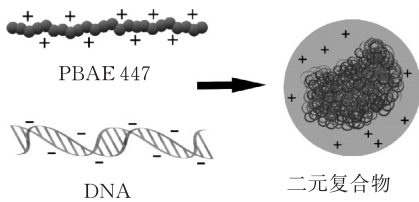


图 3 PBAE 447 和 DNA 结合

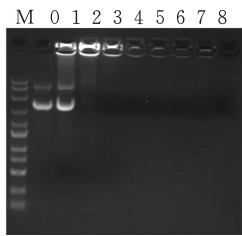


图 4 电泳阻滞实验

2.3 细胞毒性鉴定

使用 MTT 法评估转染材料对不同细胞的毒性。与细胞孵育 48 h 之后,检测细胞的存活率。从图 5 可见,在转染效率最佳的时候,PBAE 447 对细胞造成的毒性均低于 Lipofectamine 3000 ($P<0.05$)

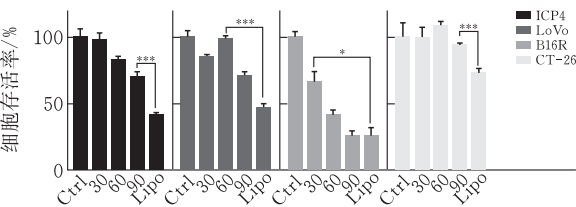


图 5 转染 24 h 后不同细胞的存活率

2.4 转染效率鉴定

不同种类的细胞由于自身细胞膜的结构各不相同,因而在转染效率上会存在差异。选取了 4 种不同的细胞系做为研究对象(ICP4,LoVo,B16R,CT-26),考察 PBAE 447 与质粒 DNA 在不同质量比结合的情况下的转染效率。从 GFP 的成像情况(图 6)和流式细胞仪的定量结果(图 7)来分析,PBAE 447 在细胞中的转染效率大小顺序为 $ICP4>LoVo>B16R>CT-26$ 。与市面上常用的 Lipofectamine 3000 相比,PBAE 447 在 LoVo,B16R 和 CT-26 中的转染效率均大于 Lipofectamine 3000($P<0.05$)

3 结论

1)本研究合成了 PBAE 447 阳离子聚合物并对其进行了分子量和纯度鉴定,所得 PBAE 447 数均分子量为 19047,重均分子量为 38387,核磁共振氢

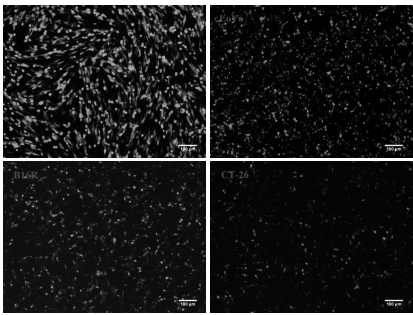


图 6 显微镜观察不同细胞系 GFP 表达情况

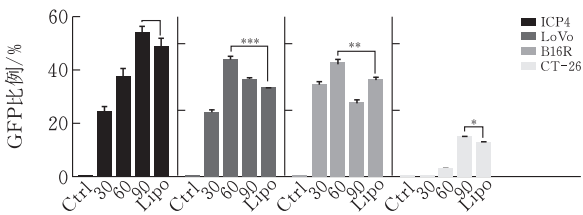


图 7 不同细胞系转染的 GFP 表达比例

谱结果与 Green 等所报道的结果一致。

2)PBAE 447 对质粒 DNA 具有包裹能力,且 PBAE 447 用量越多,对 DNA 的包裹程度越高。

3)PBAE 447 能够携带质粒 DNA 进入不同的肿瘤细胞系进行表达,且在转染效率最佳的时候,PBAE 447 对细胞造成的毒性均低于 Lipofectamine 3000。

PBAE 447 在体外转染中具有优异的基因传递能力,但在体内转染中的相关报道较少。未来我们将进一步考察 PBAE 447 在体内的转染效率,研究 PBAE 447 携带自杀基因或药物有效杀伤肿瘤细胞的可能性,并探索阳离子聚合物用于基因治疗的潜能。

[参 考 文 献]

[1] Ledley F D. Nonviral Gene Therapy: The promise of genes as pharmaceutical products[J]. Human Gene Therapy, 1995, 6(9):1129.

[2] Merdan T, Kopecek J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54(5):715-758.

[3] Kozielski K L, Tzeng S Y, Hurtado D M B A, et al. Bioreducible cationic polymer-based nanoparticles for efficient and environmentally triggered cytoplasmic sirna delivery to primary human brain cancer cells[J]. ACS Nano, 2014, 8(4):3232-3241.

[4] Zhou J, Patel T R, Sirianni R W, et al. Highly penetrative, drug-loaded nanocarriers improve treatment of glioblastoma[J]. Proceedings of the National Academy

of Sciences, 2013, 110(29):11751-11756.

[5] Ryuta S, Bringas J R, Mcknight T R, et al. Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging.[J]. Cancer Research, 2004, 64(7):2572-2579..

[6] Ning J, Wakimoto H. Oncolytic herpes simplex virus-based strategies: toward a breakthrough in glioblastoma therapy[J]. Frontiers in Microbiology, 2014:5.

[7] Bhise N S, Gray R S, Sunshine J C, et al. The relationship between terminal functionalization and molecular weight of a gene delivery polymer and transfection efficacy in mammary epithelial 2-D cultures and 3-D organotypic cultures[J]. Biomaterials, 2010, 31(31): 8088-8096.

[8] Breunig M, Hozsa C, Lungwitz U, et al. Mechanistic investigation of poly (ethylene imine)-based siRNA delivery: Disulfide bonds boost intracellular release of the cargo[J]. Journal of Controlled Release, 2008, 130 (1):57-63.

[9] Matsumoto S, Christie R J, Nishiyama N, et al. Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(1):119-127.

[10] Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery [J]. Bioconjugate Chemistry, 2007, 18(5):1391-1396.

[11] Smith T T, Stephan S B, Moffett H F, et al. In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers[J]. Nature Nanotechnology, 2017, 12(8):813.

[12] Green J J, Langer R, Anderson D G. A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery [J]. Accounts of Chemical Research, 2008, 41(6):749-759.

[13] Mangraviti A , Tzeng S Y , Kozielski K L , et al. Polymeric nanoparticles for non-viral gene therapy extend brain tumor survival in vivo[J]. ACS Nano, 2015, 9 (2).

[14] Bishop C J, Ketola T M, Tzeng S Y, et al. The effect and role of carbon atoms in poly (β -amino esters) for DNA binding and gene delivery[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(18):6951-6957.

[15] Sunshine J C, Akanda M I, Li D, et al. Effects of base polymer hydrophobicity and end-group modification on polymeric gene delivery[J]. Biomacromolecules, 2011, 12(10):3592-3600.

[16] Alfredo Quiñones Hinojosa, Tzeng S Y, Martinez E E, et al. Non-viral gene delivery nanoparticles based on Poly (β -amino esters) for treatment of glioblastoma [J]. Biomaterials, 2011, 32(23):5402-5410.

Synthesis and Identification of PBAE 447 and Its Gene Delivery Efficiency

WANG Runyang, ZHANG Ziyi, DUAN Haixiao, LIU Binlei, HU Han, WANG Yang

(School of Biological Engineering and Food Science , Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China)

Abstract: PBAE 447 is a cationic polymer that can carry negatively charged DNA into cells for expression. In this experiment, an addition reaction was carried out by 4-amino-1-butanol and 1, 4-butanediol diacrylate. PBAE 447 was synthesized by an addition of 1-(3-aminopropyl)-4-methylpiperazine. The number-average molecular weight of the obtained product was 17586. ICP4, LoVo, B16R, CT-26 were used as transfection cell lines, and green fluorescent protein (GFP) was used as a reporter gene. The results show that PBAE 447 is capable of carrying genes into a variety of tumor cell lines for expression.

Keywords: poly (β -amino ester); cationic polymer; reporter gene; cytotoxicity

[责任编辑: 张 众]