

肠三叶因子壳聚糖纳米粒的制备与特征及转染效率研究

孙勇 张帅 彭曦 龚震宇 李晓鲁 袁志强 李颖 张大伟 彭毅志

基因传递是指将基因 DNA 导入目的细胞,并转录翻译成相应蛋白的过程。基因传递载体包括病毒载体和非病毒载体,病毒载体转染效率较高,但存在引起免疫反应、病毒突变和潜在致癌作用等隐患。因此,基因传递载体的研究重心已逐渐向非病毒载体转移。壳聚糖,即聚(1,4)-2-氨基-2-去氧-β-D-葡萄糖胺,是一种极具潜力的天然阳离子多聚糖,提取自海洋甲壳类生物,是甲壳素脱乙酰化的产物。作为纯天然的高分子材料,壳聚糖对细胞和机体无毒无害,同时因其表面带有正电荷,具有将带负电荷的 DNA 包裹于其内,防止体内 DNA 酶、胃肠道酸碱内容物、细菌对 DNA 降解的作用。肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是一种具有潜在药用价值的小分子多肽,基因互补 DNA 全长 222 bp,共编码 73 个氨基酸,其中前 14 个为信号肽,后 59 个为成熟氨基酸。大量研究表明,ITF 可显著减轻各种致伤因素导致的胃肠黏膜损伤,促进受损黏膜修复,但作为一种具有广泛应用前景的药物前体,却因制备过程复杂、产量低下而使其应用受限。本研究利用壳聚糖包裹 ITF 基因制备纳米粒,检测其理化特征,并转染入人胚肾细胞株 HEK 293 中验证转染效率。

1 材料与方法

1.1 壳聚糖-质粒纳米粒的制备

取 100 μL 不同浓度的壳聚糖溶液和 100 μL 固定浓度的质粒基因溶液,分别于 55 °C 水浴 20 min。之后将两者迅速在涡旋振荡混合器上混合 30 s,室温静置 30 min,即得基因壳聚糖纳米粒溶液。取少量新鲜制备的壳聚糖纳米粒溶液,轻轻滴于铺有碳膜的铜网上,静置 5 min 后用滤纸吸干多余液滴,于透射电镜下观察纳米粒形态。

1.2 壳聚糖-质粒纳米粒特征

在 pH 值为 5.5 时制备不同氮磷比(分别为 0.5:1.0、1.0:1.0、3.0:1.0、5.0:1.0、7.0:1.0、9.0:1.0)的壳聚糖纳米粒,立即检测表面 Zeta 电位。固定氮磷比为 3.0:1.0 时,将 200 μL 壳聚糖纳米粒加入不同 pH 值(分别为 5.5、6.5、7.0、7.5)的 Tris 缓冲液,立即检测 Zeta 电位。在 pH 值为 5.5 时制备不同氮磷比(同上)的壳聚糖纳米粒,将纳米粒进行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,观察纳米粒与 DNA 的结合情况。制备氮磷比为 3.0:1.0 的壳聚糖纳米粒,加入 DNA 酶 I,37 °C

孵育 15 min 后再加入壳聚糖酶(10 mg/mL),进行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳。在 pH 值为 5.5 时制备不同氮磷比(同上)的壳聚糖纳米粒,30 min 后于 4 °C、26 000 × g 离心 30 min,收集上清液,紫外分光光度法检测上清液中质粒含量,计算包封率和载药量。在 pH 值为 5.5 时制备不同氮磷比(同上)的壳聚糖纳米粒,其后 20、40、60、80、100 和 120 h 分别以 4 °C、26 000 × g 离心 30 min,沉淀以等体积 PBS 重新悬浮,收集上清液,紫外分光光度仪测定质粒浓度,绘制释放曲线。

1.3 壳聚糖-质粒纳米粒的转染效率

将 HEK 293 细胞培养于 24 孔板,待生长达 70% 融合后,制备氮磷比为 3.0:1.0 的纳米粒,30 min 后进行转染。每孔加入含 2.5 μg 质粒的纳米粒,培养 48 ~ 72 h,以利于外源蛋白表达;另以脂质体 2000 和单纯质粒转染分别作为阳性和阴性对照。转染 48 h 后行 4',6-二脒基-2-苯吡啶盐酸染色。倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)表达情况。采用流式细胞仪检测转染效率,蛋白质印迹法检测细胞 ITF 表达情况。

2 结果

纳米粒形态近似球形,在混悬液中分布均匀,粒径集中在 300 ~ 500 nm,且呈窄分布。纳米粒的 Zeta 电位均为正值,且随氮磷比增加而增加,当氮磷比为 9.0:1.0 时,Zeta 电位约为 +18 mV;当氮磷比降至 0.5:1.0 时,Zeta 电位接近 0 mV。纳米粒的 Zeta 电位随 pH 值的增加而降低,当 pH 值为 5.5 时,Zeta 电位为 +18 mV;当 pH 值升至 7.5 时,Zeta 电位降至 -20 mV。由于纳米粒中带正电荷的壳聚糖包裹带负电荷的质粒,使纳米粒显示出阳性的 Zeta 电位,且随着氮磷比的增加,Zeta 电位逐渐增加。壳聚糖包裹质粒后,纳米粒被阻滞于加样孔中,质粒无法迁移;纳米粒可以保护内部基因免受 DNA 酶 I 的降解。包封率随着氮磷比的增加而增加,当氮磷比大于 1.0:1.0 时,其包封率接近 100%;载药量则随着氮磷比的增加而减小。纳米粒中质粒的释放速度随着氮磷比的增加而减慢,当氮磷比为 0.5:1.0 时释放最快,120 h 后约 100% 的质粒被释放;当氮磷比为 9.0:1.0 时释放最慢,120 h 后约 70% 的质粒被释放。另外,所有纳米粒在 20 h 内释放速度较快(暴发期),20 h 后速度明显降低(平台期)。

倒置荧光显微镜观察显示,HEK 293 细胞经壳聚糖纳米粒转染后可见 GFP 表达,其转染率约为 80%,与阳性对照(脂质体)的转染效率相似,而阴性对照(单纯质粒)转染未见 GFP 表达。细胞转染 3 d 后行流式细胞仪检测转染效率,阳性对照和壳聚糖纳米粒转染细胞之间转染效率无明显差异,但均显著高于阴性对照细胞。蛋白质印迹法结果显示,

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.01.035

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(孙勇现在解放军第九十七医院烧伤整形科,221004)

通信作者:彭毅志,Email:yizhipen@sina.com,电话:023-68754175

纳米粒转染后细胞上清液中出现 1 条显色带,而阴性对照细胞则未出现,表明表达产物能与抗 ITF 的单克隆抗体结合,具有抗原性。

3 讨论

本研究采用复凝法,利用壳聚糖包裹重组质粒制备纳米粒。一般认为,小粒径的复合物可瞬间打开上皮细胞间的紧密连接,渗透至黏膜下层或组织深部,而大粒径者只能滞留于局部上皮表面,不能被组织细胞摄取。有报道,粒径大小为 300 nm 的粒子最适于基因转染,在研究中制备的纳米粒径集中在 300 ~ 500 nm,可以用于细胞转染。Zeta 电位为纳米粒的表面电位,当 Zeta 电位为正时,可以和带负电位的细胞膜通过静电吸引相结合,以利于细胞吞噬。本实验制备的纳米粒 Zeta 电位均为正值,而且随氮磷比增加而增加。在 pH 值对 Zeta 电位影响的研究中观察到,酸性环境中 Zeta 电位为正值,且酸度越高 Zeta 电位越大。凝胶阻滞实验提示,当氮磷比大于 1.0:1.0 时,质粒完全被阻滞于加样孔内,说明制备的壳聚糖纳米粒可以完全包裹质粒。众所周知,机体内存在着大量的 DNA 酶用以分解 DNA,这也是基因治疗必须解决的一个问题。DNA 保护实验说明,壳聚糖纳米粒完全可以保护内部的质粒,使其免受 DNA 酶的消化。氮磷比是壳聚糖纳米粒中壳聚糖氨基和 DNA 磷酸根之间的摩尔分数之比,只有氮磷比在一定范围内时才能形成稳定有效的复合物。氮磷比过低,形成的复合物不稳定容易被破坏;氮磷比越大,复合物结合越紧密,对 DNA 保护效果越好, DNA 的酶解减少从而提高转染效率。因此,必须选择合适的氮磷比的壳聚糖纳米粒用于转染,本研究选择常用参数即氮磷比为

3.0:1.0 的纳米粒进行研究。作者观察到,纳米粒的封装率随着氮磷比的增加而增加,当氮磷比大于 1.0:1.0 时,其封装率接近 100%,说明该纳米粒具有强大的基因包裹能力。另一方面载药量随着氮磷比的增加而减小,其原因是由于壳聚糖的增加,而质粒的量并未增加,因此载药量相对下降,说明随着氮磷比的增加,纳米粒的载药空间会更大。体外释放实验显示,所有纳米粒在 20 h 内释放速度较快(暴发期),20 h 后速度明显降低(平台期)。这种释放速度既避免了纳米粒未到达靶细胞而过快释放被降解,又避免了到达靶细胞后过慢释放影响基因表达。在成功制备壳聚糖纳米粒、检测物理表征之后,作者又将其转染 HEK 293 细胞,以检验壳聚糖纳米粒的转染效率,同时以商品化的转染载体——脂质体 2000 作为阳性对照。倒置荧光显微镜及流式细胞仪检测证明,壳聚糖纳米粒的转染效率和脂质体基本一致,且远远高于单纯质粒转染。然而从价格上比较,壳聚糖远远低于脂质体,具有极大的经济效益。RT-PCR 和蛋白质印迹法检测从转录和翻译的水平证实,壳聚糖纳米粒转染后可以成功地表达 ITF,并顺利地分泌至细胞培养液中,符合其细胞外发挥生理作用的特点。综上所述,作者制备的壳聚糖 ITF 纳米粒,能保护内部基因免受核酸酶的降解,其细胞转染效率和脂质体类似。该研究为 ITF 的基因治疗提供了一条新思路。

[本文已以英文发表,全文见“Sun Y, Zhang S, Peng X, et al. Preparation, characterization and transfection efficacy of chitosan nanoparticles containing the intestinal trefoil factor gene. Mol Bio Rep, 2012, 39(2):945-952.”]

(收稿日期:2012-11-22)

(本文编辑:梁光萍)

· 消息 ·

2013 年全军烧伤外科专业学术年会征文通知

为促进军内外烧伤专业的发展及创面修复领域的合作交流,全军第九届烧伤专业委员会定于 2013 年 7 月 25—30 日在塞外煤都山西省大同市召开“2013 年全军烧伤外科专业学术年会”。会议将邀请全国烧伤、创面修复及整形与修复重建等领域的专家做专题报告,为全体与会代表提供一个高水平的医学科学交流平台。

1. 会议组织机构:主办单位为全军第九届烧伤外科专业委员会,承办单位为北京军区解放军第三二二医院。
2. 会议时间及地点:2013 年 07 月 25 日 30 日,山西省大同市。
3. 征文内容:烧伤流行病学、急救,烧伤早期损害和脏器保护、烧伤休克,烧伤感染与免疫、营养与代谢,烧伤护理理论与实践,烧伤后整形、功能重建、康复,瘢痕研究和治疗,创面处理。
4. 征文要求:本次学术会将编辑会议论文集,请作者将论文摘要及论文全文于 2013 年 4 月 20 日前发送电子邮件至 sfsslx@sohu.com。纸质稿件请寄往:山西省大同市解放军第三二二医院烧伤科石富胜收邮编:037006。
5. 联系电话:地方线为 0352-5387421、5387422、5387423,军线为 0261-87421、87423、87422;石富胜主任为 13327429595、18935244879(军线直拨),陶白江秘书长为 18910883407,010-66343407。

全军烧伤外科专业委员会秘书组