

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.02.0144

· 论 著 ·

还原性多肽共载基因和化学治疗药载体的构建与体外评价

宫春爱¹, 夏清明¹, 胡楚玲², 顾芬芬³, 强磊¹, 高申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

2. 嘉兴市妇幼保健院药学部, 浙江 314050

3. 上海交通大学医学院附属新华医院药学部, 上海 200093

[摘要] **目的** 制备一种共载基因和化学治疗药的硫辛酸(LA)修饰的以非内吞机制进入细胞的固有无序蛋白-细胞质定位的内化肽6(CL)的纳米复合物(LA-CL), 并考察其在人胚肾细胞系 HEK293 细胞的转染效率、细胞摄取情况及其体外释放规律。**方法** 以不同比例(2.5%、5%、10%、20%)半胱氨酸作为交联剂, 合成4种不同交联度的 LA-CLss, 分别命名为 LA-CLss1~LA-CLss4, 并用核磁共振氢谱(¹H NMR)和凝胶色谱鉴定。取增强型绿色荧光蛋白质粒(pEGFP)和 LA-CLss 以不同氮磷比(N/P, 2.5、5、10、20、40、80)自组装形成纳米复合物, 用激光粒度测定仪测定复合物的粒径和 zeta 电位, 琼脂糖凝胶电泳测定载体 LA-CLss 对 pEGFP 的包裹能力和保护能力。用超声乳化法制备载多西他赛(DTX)的载药胶束, 并用苾荧光探针光谱法测定 LA-CLss3 的临界胶束浓度。将 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物与 HEK293 细胞共同培养, 考察不同交联度复合物的细胞转染情况。**结果** ¹H NMR 结果确定 LA-CLss 合成成功。N/P=40 时, HEK293 细胞对 LA-CLss3/pEGFP 的转染效率高。LA-CL、LA-CLss1、LA-CLss2、LA-CLss4 与 pEGFP 形成的复合物。超声乳化法制备的载药胶束包封率为(85.25±0.04)%, 载药量为(8.81±0.02)%。细胞摄取结果表明, 该载体可以有效地将基因递送至细胞内。体外释放实验结果表明, 该多肽胶束具有还原性条件敏感释药行为。**结论** 制备的 LA-CLss/DTX/pEGFP 纳米复合物有望成为一种高效的共载基因和化学治疗药的载体。

[关键词] 细胞质定位的内化肽6; 绿色荧光蛋白; 基因治疗; 化学治疗; 多西他赛; 共载**[中图分类号]** R 943**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2018)02-0144-08

Preparation and *in vitro* evaluation of redox-sensitive polypeptide vector for co-delivery of gene and chemotherapeutic drugs

GONG Chun-ai¹, XIA Qing-ming¹, HU Chu-ling², GU Fen-fen³, QIANG Lei¹, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, Jiaying Maternity and Child Health Care Hospital, Jiaying 314050, Zhejiang, China

3. Department of Pharmacy, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200093, China

[Abstract] **Objective** To prepare a lipoic acid (LA) modified intrinsically disordered protein-cytosol-localizing internalization peptide 6 (CL) nanocomplex (LA-CL) entering cells by non-endocytosis mechanism for co-delivery of gene and chemotherapeutic drugs, and to investigate its transfection efficiency and cellular uptake on human embryonic kidney cell line HEK293 cells and its release behavior *in vitro*. **Methods** We synthesized four disulfide cross-linked lipoic acid modified LA-CLss(1-4) at different cross-linked degrees using different mass fractions (2.5%, 5%, 10% and 20%) of cysteine as cross-linking agent. The construction of LA-CLss was characterized by ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and gel permeation chromatography. The LA-CLss/plasmid enhanced green fluorescent protein (pEGFP) nanocomplexes were self-assembled with LA-CLss and pEGFP at different nitrogen/phosphorus (N/P) ratios (2.5, 5, 10, 20, 40 and 80). The size and zeta potential of LA-CLss/pEGFP nanocomplexes were determined by particle size analyzer, and the pEGFP enrichment capacity of LA-CLss was determined by agarose gel electrophoresis. The docetaxel (DTX)-loaded micelles were prepared by

[收稿日期] 2017-06-20**[接受日期]** 2017-11-23

[基金项目] 国家临床重点专科-临床药理学军队建设项目, 国家自然科学基金(81672516), 军事医学创新工程(16JS005), 上海市卫生和计划生育系统重要薄弱学科建设计划(2016ZB0303). Supported by Military Construction Project of National Key Specialty-Clinical Pharmacy, National Natural Science Foundation of China (81672516), Military Medical Innovation Project (16JS005), and Important Weak Subject Construction Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2016ZB0303).

[作者简介] 宫春爱, 硕士生. E-mail: gongchunai@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873715, E-mail: ggss99@126.com

ultrasonic emulsification, and the critical micelle concentration of LA-CLss3 was determined by pyrene fluorescence probe spectroscopy. The LA-CLss/pEGFP nanocomplexes were co-cultured with HEK293 cells, and the transfection efficiencies of LA-CLss/pEGFP nanocomplexes at different cross-linked degrees were investigated. **Results** ¹HNMR results showed the LA-CLss was successfully synthesized. When N/P ratio was 40, the transfection efficiency of LA-CLss3/pEGFP nanocomplex by HEK293 cells was significantly higher than that of LA-CL/pEGFP, LA-CLss1/pEGFP, LA-CLss2/pEGFP and LA-CLss4 nanocomplexes. The encapsulation efficiency and drug loading of docetaxel-loaded micelles prepared by ultrasonic emulsification were $(85.25 \pm 0.04)\%$ and $(8.81 \pm 0.02)\%$, respectively. Cellular uptake test showed that the gene could be effectively delivered into the HEK293 cells by the LA-CLss micelles. *In vitro* release experiments showed that the LA-CLss micelles had redox-responsive drug release behavior. **Conclusion** The prepared LA-CLss/DTX/pEGFP nanocomplex is expected to become an efficient vector for co-delivery of gene and chemotherapeutic drugs.

[Key words] cytosol-localizing internalization peptide 6; green fluorescent protein; gene therapy; chemotherapy; docetaxel; co-delivery

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(2): 144-151]

由于肿瘤治疗的难度和复杂性, 化学治疗药物和基因药物的协同传递系统成为近年来肿瘤治疗研究的热点。共递送系统可克服单一疗法的不足, 进而可减少化学治疗药物的剂量, 增加药物在靶器官的分布量、减轻毒副作用, 从而提高抗肿瘤效果; 同时保护携带基因的稳定性 and 完整性, 提高了基因的转染效率, 以达到减轻毒副作用和提高疗效的目的^[1]。因此, 选择共递送系统的载体需考虑以下几个特点: (1) 有效包载化学治疗药物并保护核苷酸不被降解; (2) 减少网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 清除, 发挥高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR); (3) 载体能有效跨膜摄取; (4) 保护基因不受内涵体溶酶体的破坏降解, 使基因和化学治疗药物有效释放^[2]。

多肽类载体主要是指各种细胞穿透肽。在基因治疗方面其因高效传递基因药物的能力及低毒性、容易制备而在过去 20 多年中成为研究热点。固有无序蛋白 (intrinsically disordered protein, IDP) 是一类在天然状态下具有不确定的三维结构, 但是依然能够行使正常生物学功能的蛋白质, 在分子识别、细胞周期调控、细胞信号转导、细胞内调节等生理活动中具有关键作用^[3]。许多细胞穿膜肽 (cell penetrating peptide, CPP) 的穿膜效应依赖于其 α -螺旋和 β -折叠的空间构象, 然而这种空间结构一方面加速其进入细胞, 另一方面也会引起膜裂解行为, 在一定程度上限制了 CPP 的应用。虽然 CPP 跨过细胞膜涉及很多机制, 但是至今已应用的 CPP 负载药物跨膜都以内吞作用

为主, 而内吞作用跨膜时存在内吞体捕获和溶酶体降解的问题。故寻找一种低裂解性并通过非吞噬作用进入细胞膜的 CPP 将会给肿瘤的治疗带来新的机遇。有研究发现了一种通过跨细胞膜易位就可以直接穿过细胞膜的 IDP-细胞质定位的内化肽 6 (cytosol-localizing internalization peptide 6, CL), 其结构中发挥作用的是谷氨酸, 通过非内吞体途径进入细胞; 富含的精氨酸可赋予其穿膜效应和载 DNA 或 RNA 能力; D-脯氨酸使其蛋白酶水解稳定性比较高, 可见 CL 有望成为递送细胞穿透能力弱和易发生溶酶体降解的药物分子进入细胞并稳定存在于细胞中的载体^[4]。

细胞内含有较高浓度 (约 2~10 mmol/L) 的谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 是细胞外 (约 2~20 μ mol/L) 的 100~1 000 倍; 而肿瘤细胞内的 GSH 浓度是正常细胞的 4 倍^[5]。携带药物的纳米胶束进入肿瘤细胞后, 其可断裂的二硫键在高浓度 GSH 作用下被打开, 使载体降解, 纳米胶束在胞内释放药物发挥药效^[6]。硫辛酸 (lipoic acid, LA) 是一种具有分子内五元环二硫键结构且末端为羧基的两亲性物质, 与细胞膜脂质双分子层有较好的亲和力^[7], 具有较好的包载化学治疗药物作用, 且其二硫键可在细胞内还原性条件下裂解, 为药物在肿瘤部位的有效释放提供条件^[8-9]。

基于上述理论, 本实验构建了一种 LA 修饰的细胞质定位的内化肽 (LA-CL), 克服了当前多肽类载体存在内吞体捕获、溶酶体降解、引入基因片段进入细胞能力不强、基因转染效率不高、不可降解的不足。将此多肽载体通过半胱氨酸进行

交联,利用 LA 的含有二硫键的五元环形成疏水性空腔包裹疏水性化学治疗药多西他赛 (docetaxel, DTX),二硫键可以响应肿瘤细胞内还原性条件触发释放的化学治疗药,再利用具有穿膜效应的 IDP 上面富有的带正电的精氨酸载增强型绿色荧光蛋白质粒 (plasmid enhanced green fluorescent protein, pEGFP),见图 1。并初步对该载体共载基因和化学治疗药的性能进行体外评价。

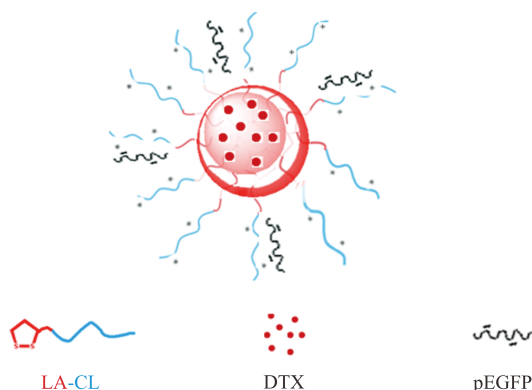


图 1 LA-CLss/DTX/pEGFP 纳米复合物示意图

Fig 1 Sketch of LA-CLss/DTX/pEGFP nanocomplex

LA: Lipoic acid; CL: Cytosol-localizing internalization peptide 6; LA-CLss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified intrinsically disordered protein-cytosol-localizing internalization peptide 6; DTX: Docetaxel; pEGFP: Plasmid enhanced green fluorescent protein

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂 ZS90 型激光粒度测定仪 (英国 Malvern 公司),倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司),透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司),全自动酶标仪 (美国 Thermo 公司)。LA [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], pEGFP (上海英为信生物科技有限公司),支化聚乙烯亚胺 (branched polyethyleneimine, bPEI; 相对分子质量为 25 000; 美国 Sigma 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Thermo 公司),胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 二硫键交联的 LA 修饰的交联 CL (LA-CLss) 多肽的合成与表征 本研究采用固相合成法合成 LA 修饰的多肽单体,序列为 LA-KVRVRVRV^DPTRVRERVK (^DP 是 D-脯氨酸),

并用反相高效液相色谱法 (HPLC) 纯化。采用半胱氨酸盐酸盐进行交联合成 LA-CLss: 将多肽单体溶于甲醇中,加入比例分别为 2.5%、5%、10%、20% 的半胱氨酸盐酸盐进行交联,在室温下聚合 12 h, N₂ 吹干甲醇;产物用去离子水经透析膜 (截留相对分子质量为 3 500) 纯化 12 h、冻干,去除多余单体。所得产物分别命名为 LA-CLss1、LA-CLss2、LA-CLss3、LA-CLss4。取合成好的多肽聚合物 5 mg 溶于 0.5 mL D₂O,用 600 MHz 核磁共振氢谱 (¹H NMR) 仪和凝胶色谱法进行产物分析。

1.3 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物构建与表征 取 2 μg pEGFP 和 LA-CLss 以不同氮磷比 (N/P, 2.5、5、10、20、40、80) 自组装形成的复合物溶于 1 mL PBS (pH 7.4) 中,涡旋 30 s,室温下孵育 30 min。用 ZS90 型激光粒度测定仪测定粒径和 zeta 电位。

1.4 琼脂糖凝胶电泳考察载体 LA-CLss 对 pEGFP 的包裹能力和保护能力 包裹能力: 制备 N/P 值为 0.5、1、2、3、4、5、10、20 的 LA-CLss3/pEGFP 纳米复合物,孵育 30 min 后将含 1 μg pEGFP 的纳米复合物加入含 1% 琼脂糖凝胶的 TAE (Tris 碱、乙酸、EDTA 配制) 缓冲液的孔中,100 V 电泳 30 min,在紫外光下显像。

保护能力: 通过耐肝素竞争置换实验考察。制备浓度分别为 5、10、20、50 μg/mL 的肝素水溶液,分别加入 LA-CLss3/pEGFP 纳米复合物 (N/P=10),共孵育 1 h 后取样进行凝胶电泳分析,以 bPEI-25k/pEGFP (N/P=10 时肝素水溶液浓度为 20、50 μg/mL) 作为对照。

1.5 荧光探针光谱法测定 LA-CLss3 的临界胶束浓度 以丙酮为溶剂配制 6×10^{-6} mol/L 的芘溶液,将丙酮自然挥发,然后在含微量芘的容量瓶中加入空白胶束溶液,最后定容,配制 LA-CLss3 浓度为 $1 \times 10^{-5} \sim 2.0$ mg/mL 的一系列溶液 (1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0),25 °C 下避光孵育 2 h 以上,用 F-7000 型荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司) 测定各溶液的荧光光谱图。荧光扫描的激发波长为 333 nm,激发狭缝设置为 5.0 nm,发射狭缝设置为 2.5 nm,扫描速度为 500 nm/min。记录 373 nm (I_1) 和 383 nm (I_3) 波长处的荧光值,以空白载体浓度对数值为横坐标, I_1/I_3 为纵坐

标绘图。

1.6 超声乳化法制备载 DTX 胶束 取 1 mg DTX 溶于 1 mL 二氯甲烷中,将 20 mg 与半胱氨酸交联后的载体 (LA-CLss3) 溶于 1 mL 二氯甲烷中。将上述 2 种溶液混合后与 8 mL 纯水混合,在冰浴条件下用超声探头进行超声处理,功率 200 W,时间 30 s。将乳化完全的 LA-CLss3/DTX 混合溶液迅速转移至磁力搅拌器上盛有 10 mL 蒸馏水的烧杯里,搅拌 5 h,除去溶液中的二氯甲烷。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤溶液除去未封装的 DTX 颗粒。

采用 HPLC 测定 DTX 浓度。高效液相仪: Agilent 1260 型,美国 Agilent Technologies 公司;流动相为乙腈:水 (60:40, 体积比);流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长为 230 nm;色谱柱为 C₁₈ 柱 (Diamondsil, 5 μm , 250 mm $\times$ 4.6 mm);柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,载药量和包封率计算公式为:载药量 (%) = (胶束中药物的质量/载药胶束质量) $\times$ 100%,包封率 (%) = (胶束中药物的质量/投入药物的质量) $\times$ 100%。

1.7 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物 HEK293 细胞摄取能力的测定 取 HEK293 细胞 (ATTC[®] CRL-3216, 中国科学院生物化学与细胞生物研究所) 按 3×10^5 /孔的密度接种于 12 孔板,在 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后更换为无血清培养液。之后每孔加入含 0.75 nmol 羟基荧光素 (FAM) 标记的 siRNA 的 N/P=40 的纳米复合物。培养 4 h 后弃培养液,消化、离心,重悬于 300 μL PBS 中,用流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测细胞摄取情况。

1.8 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物基因转染情况的检测 取 HEK293 细胞按 1×10^5 /孔的密度接种于 48 孔板,培养 24 h,转染前更换为无血清培养液。每孔加入含 0.5 μg pEGFP 的不同 N/P 值 (10、20、40、80) 的纳米复合物。培养 4 h 后换含 10% FBS 的培养液。pEGFP 转染细胞 48 h 后,用荧光显微镜观察,确定最佳半胱氨酸盐酸盐交联度,并拍照。

1.9 透析袋法考察载 DTX 胶束的体外释放情况 选取截留相对分子质量为 3 500 的透析袋,透析介质为 pH=7.4 含有 0.5% (质量百分比浓度) 的吐温-80 的 PBS,分别加入 DTT (用来模拟肿瘤细胞内高 GSH 还原性条件,0.05 mol/L) 和不加 DTT,37 $^{\circ}\text{C}$ 进行考察。按 1.6 项下方法制备 LA-

CLss3/DTX 纳米胶束。取 2 mL LA-CLss3/DTX PBS 于透析袋中,放置于 50 mL PBS 中,100 r/min 下磁力搅拌,37 $^{\circ}\text{C}$,分别于 2、4、6、8、10、12、24、48、72 h 时间点取 1 mL 外液,并补加 1 mL 释放介质,按 1.6 项下方法行 HPLC 测定其浓度。绘制体外释放曲线。

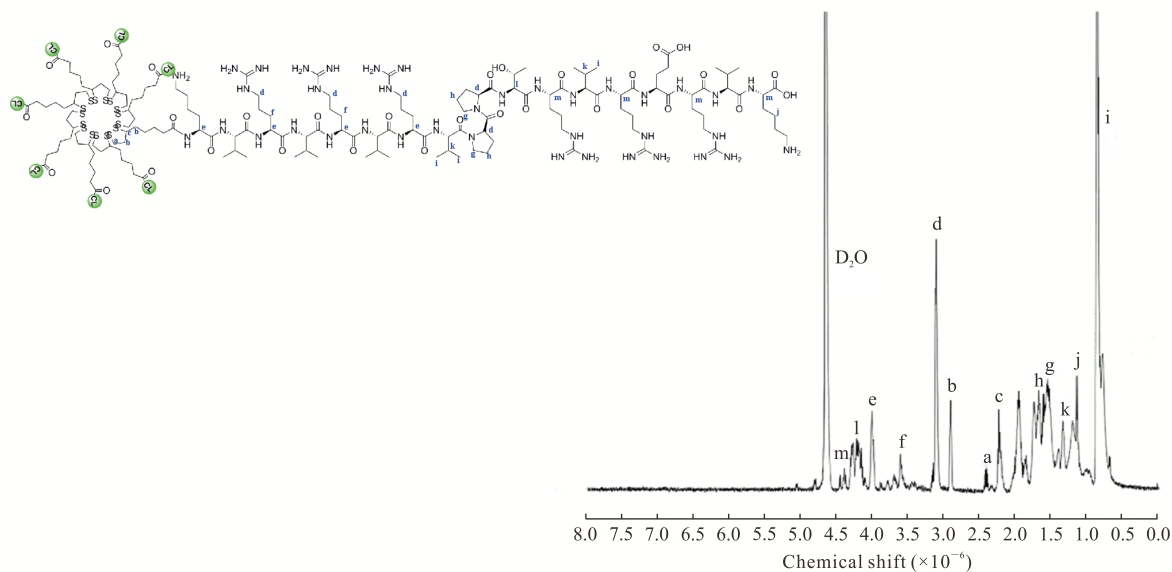
1.10 统计学处理 用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析 (ANOVA)。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结 果

2.1 多肽聚合物 LA-CLss 结构鉴定和凝胶色谱检测结果 图 2 为合成的 LA-CLss 的谱图,化学位移为 2.25~3.16 (峰 a、b 和 c) 归属于 LA 的质子峰,3.13 (峰 d)、3.63 (峰 f) 和 4.06 (峰 e) 为精氨酸中邻近叔碳的 $-\text{CH}_2-$ 峰。0.82 (峰 i) 和 1.32 (峰 k) 分别归属于缬氨酸伯碳和叔碳上的氢。1.53~1.74 (峰 g 和 h) 归属于脯氨酸上的 $-\text{CH}_2-$ 。1.14 (峰 j) 归属于赖氨酸的仲碳。4.23 (峰 l) 归属于 LA-CLss 的叔碳质子峰。4.40 (峰 m) 归属于精氨酸中胍基附近的 $-\text{CH}_2-$ 。不同交联度 LA-CLss 的合成条件和相对分子质量如表 1 所示,随着半胱氨酸比例的增加 LA-CLss 的相对分子质量逐渐增大,表明复合物多肽合成成功。

2.2 不同交联度条件下不同 N/P 值纳米复合物的粒径与 zeta 电位 交联度不同的纳米复合物的粒径随着 N/P 值的增大而降低,交联之后的纳米复合物的粒径明显小于未交联的纳米复合物;当 N/P 值大于 10 时,纳米复合物 LA-CLss1~3/pEGFP 的粒径都在 200 nm 以内 (图 3A)。不同交联度纳米复合物的 zeta 电位均随着 N/P 值的增大而增加 (图 3B),当 N/P 值为 40 和 80 时,LA-CLss3/pEGFP 和 LA-CLss4/pEGFP 的 zeta 电位在 30 mV 左右。

2.3 琼脂糖凝胶电泳 当 N/P 值为 0~3 时 pEGFP 不能被 LA-CLss3 有效地压缩包裹,电场作用下可观察到清晰的条带;而当 N/P 值为 4 时未见明显的条带,表明此时 pEGFP 被 LA-CLss3 有效地包载 (图 4A)。耐肝素竞争置换实验也表明,LA-CLss3 可有效保护 pEGFP 不被肝素置换,当肝素浓度达 50 $\mu\text{g/mL}$ 时才有清晰条带出现 (图 4B)。

图2 LA-CLss的¹H NMR谱图Fig 2 ¹H NMR spectrum of LA-CLss

LA-CLss: Disulfide cross-linked liponic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; a, b, c: Liponic acid; d, e: $-\text{CH}_2-$ of arginine; i, k: $-\text{CH}_3-$ and $-\text{CH}-$ of valine; g, h: $-\text{CH}_2-$ of proline; j: $-\text{CH}_2-$ of lysine; l: Tertiary carbon in LA-CLss; m: $-\text{CH}_2-$ near the guanidine group in arginine

表1 不同交联度 LA-CLss 的合成条件及相对分子质量

Tab 1 Synthesis conditions and relative molecular mass of LA-CLss at different cross-linked degrees

Polymer	LA-CL m/mg	Cysteine m/mg	Ratio ^a (%)	$M_r^b (\times 10^3)$
LA-CL	—	—	—	2.418
LA-CLss1	50	0.087 5	2.5	13.2
LA-CLss2	50	0.175 0	5.0	14.8
LA-CLss3	50	0.350 0	10.0	16.6
LA-CLss4	50	0.700 0	20.0	18.4

^a: Molar ratio of cysteine to LA-CL; ^b: Data obtained by gel permeation chromatography; LA-CL: Liponic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; LA-CLss: Disulfide cross-linked liponic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6

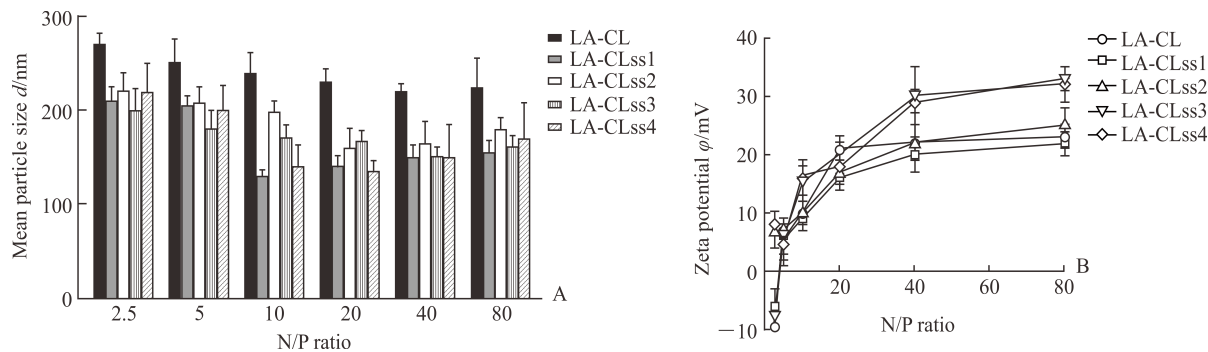


图3 不同 N/P 值 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物的粒径 (A) 和 zeta 电位 (B)

Fig 3 The particle size (A) and zeta potential (B) of LA-CLss/pEGFP nanocomplexes at different N/P ratios

LA-CLss: Disulfide cross-linked liponic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; pEGFP: Plasmid enhanced green fluorescent protein; N/P: The ratio of nitrogen to phosphorus. $n=3, \bar{x} \pm s$

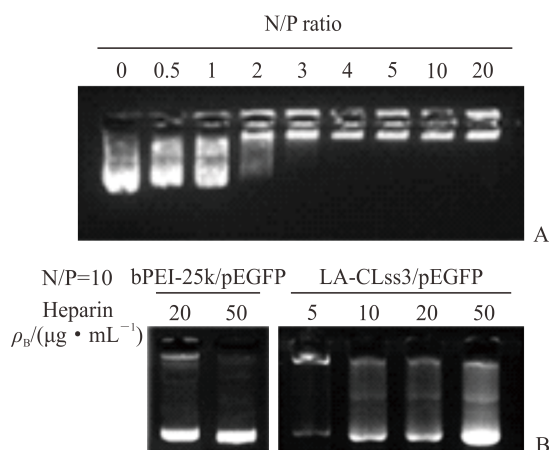


图4 不同 N/P 值时 LA-CLss 3/pEGFP 纳米复合物 (A) 和耐肝素竞争置换 (B) 的电泳图

Fig 4 Electrophoresis diagram LA-CLss 3/pEGFP nanocomplexes at different N/P ratios (A) and protection of LA-CLss3 to pEGFP against pEGFP heparin (B)

N/P: The ratio of nitrogen to phosphorus; LA-CLss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; bPEI: Branched polythyleneimine; pEGFP: Plasmid enhanced green fluorescent protein

2.4 临界胶束浓度的测定 荧光光谱如图 5 所示, 可以看出 I_1/I_3 值随 LA-CLss3 浓度的变化有突变点, 突变点处的聚合物浓度为 3.27 mg/L, 可以确定 LA-CLss3 的临界胶束浓度为 3.27 mg/L, 该胶束具有较强的抗血液稀释能力。

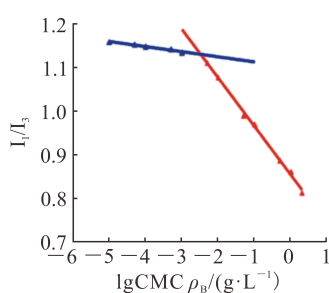


图5 芘荧光探针光谱法测定 LA-CLss3 的 CMC

Fig 5 CMC values of LA-CLss3 evaluated by pyrene fluorescence spectroscopy

LA-CLss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; CMC: Critical micelle concentration; I_1/I_3 : The ratio of fluorescence intensity in the wavelength of 373 nm to 383 nm

2.5 载药量和包封率 计算得 LA-CLss/DTX 胶束的载药量为 $(8.81 \pm 0.02)\%$, 包封率为

$(85.25 \pm 0.04)\%$ 。

2.6 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物的细胞摄取能力 如图 6 所示, 随着 N/P 值的增加, HEK293 细胞对 LA-CLss3/pEGFP 的摄取逐渐增加, 在 N/P 值为 40 和 80 时, 平均荧光强度分别约为 N/P=10 时的 1.98 和 1.21 倍, 为 N/P=20 时的 1.60 和 1.73 倍 (P 均 < 0.05); 摄取的阳性细胞比例均达 80% 左右, 高于 N/P=20 的阳性细胞比例 (P 均 < 0.05)。

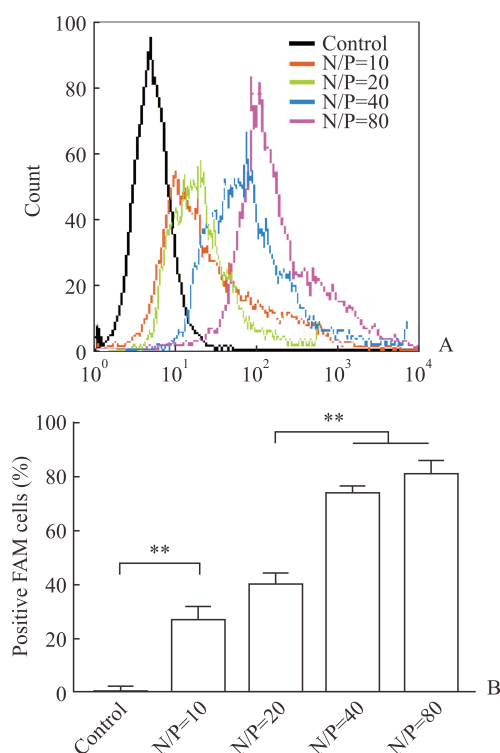


图6 HEK293 细胞对 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物的摄取情况

Fig 6 Cellular uptake of LA-CLss/pEGFP nanocomplex by HEK293 cells

A: Flow cytometry figure; B: The percentage of positive FAM cells at different N/P ratios. LA-CLss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; FAM-siRNA: Fluorescein labeled small interfering RNA; N/P: The ratio of nitrogen to phosphorus. ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.7 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物的基因转染情况 由图 7 可见, 随着交联度的增加, LA-CLss/pEGFP 纳米复合物作用细胞的荧光强度逐渐增强, LA-CLss3/pEGFP 组在 N/P=40 时荧光细胞的荧光强度比其他组强, 且荧光强度与 bPEI-25k 相近。考虑到 N/P 值越大载体的毒性会相应增大, 由此筛选出交联度为 10% 的 LA-CLss3 (N/P=

40) 为后续实验所用。

2.8 体外释放 如图 8 所示, 48 h 后 LA-CLss/DTX 在含有 DTT 的环境下释放接近 80% 的 DTX, 而在不含有 DTT 的环境下仅仅释放 60% 左右, 显示了

LA-CLss/DTX 胶束具有还原性敏感, 可以在 DTT 模拟的肿瘤细胞内的还原性条件下释放化学治疗药 DTX。

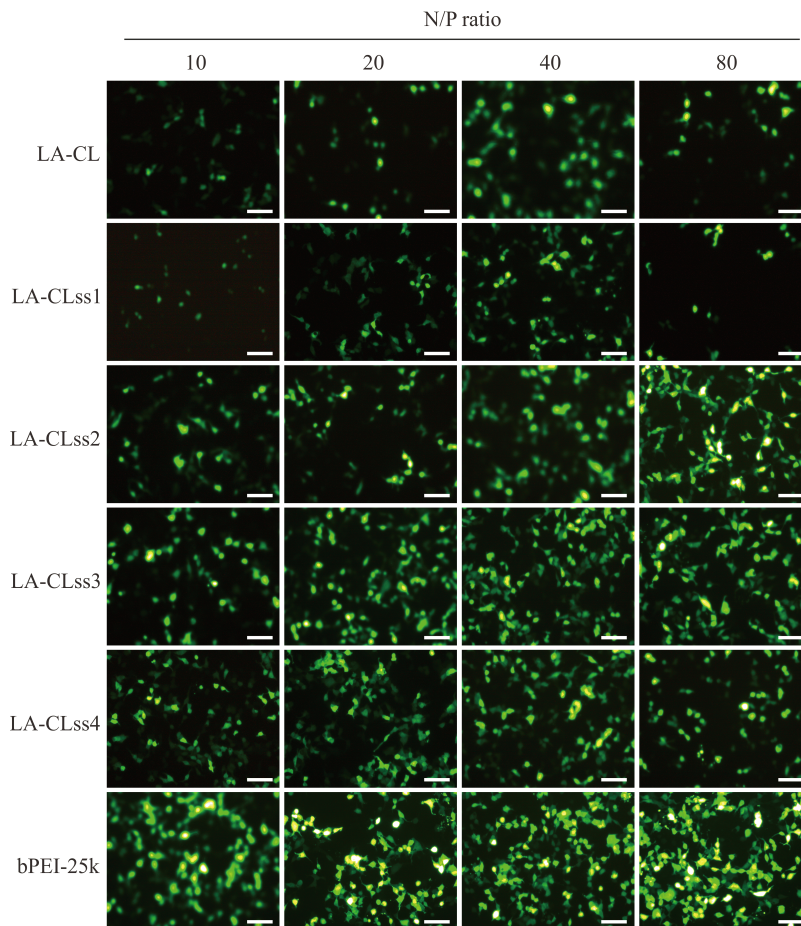


图 7 不同 N/P 值时 LA-CLss/pEGFP 纳米复合物的体外基因转染效率

Fig 7 *In vitro* transfection efficacy of LA-CLss/pEGFP nanocomplexes at different N/P ratios

N/P: The ratio of nitrogen to phosphorus; LA-CLss: Disulfide cross-linked lipioic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; pEGFP: Plasmid enhanced green fluorescent protein; bPEI: Branched polyethyleneimine. Scale bar = 250 μ m

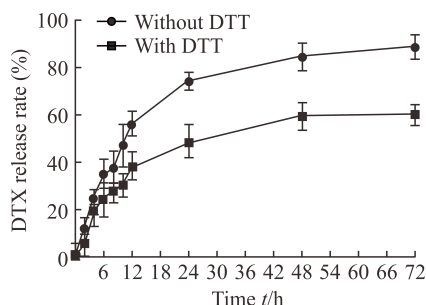


图 8 LA-CLss/DTX 体外释放曲线

Fig 8 *In vitro* release curve of LA-CLss/DTX

LA-CLss: Disulfide cross-linked lipioic acid modified cytosol-localizing internalization peptide 6; DTX: Docetaxel; DTT: Dithiothreitol. $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

非病毒基因载体自身对机体无免疫原性, 在保持高转染效率的同时也可以保护基因药物免受核酸酶的破坏和降解, 还能克服组织屏障使细胞摄取效果良好, 利于将 DNA 导入到细胞内, 是一种较理想的基因递送载体。在前期研究基础上, 本研究设计合成了一种高效的基因载体, 由 LA 修饰的非内吞机制进入细胞质定位的内化肽 LA-CL, 形成共载化学治疗药和基因的纳米胶束载体。本研究通过粒径、zeta 电位对不同交联度的载体与 pEGFP 形成的纳米复合物的表征进行筛选, 主要是通过转

染实验对载体进行筛选,综合结果表明,在半胱氨酸比例为 10.0% (LA-CLss3) 且 N/P=40 时形成的纳米复合物的粒径为 150 nm 左右, zeta 电位在 30 mV 左右,且转染效率最高,细胞摄取实验结果也得到了一致的结论。其中 LA-CLss3/pEGFP 纳米复合物在 N/P=40 时转染的效果接近于 bPEI-25k 在 N/P=10 时的荧光素酶表达,可能是由于 LA 五元环增加了载体/基因复合物与细胞膜的亲和力,同时二硫键在细胞内 GSH 还原性条件下断裂释放基因药物,从而达到有效运输和高效释放的目的^[10]。交联之后的纳米复合物粒径变小,可能是交联后 LA 五元环形成的亲脂性内核结构更加紧密所致。琼脂糖凝胶电泳实验结果表明,在 N/P $\geq$ 4 时 LA-CLss3 成功压缩包裹基因,且 N/P=10 时纳米复合物的耐肝素竞争置换实验结果也表明该载体具有较好的耐肝素竞争性质。体外释放结果表明,该多肽载体具有还原性条件敏感行为,为抗肿瘤药物在肿瘤微环境中释放提供了条件。

综上所述,LA 修饰的固有无序多肽有望成为一种理想的共载基因和化学治疗药的载体,用于联合化学治疗药和基因药物协同抗肿瘤。后期将用 LA-CLss3 作为共载化学治疗药和基因药物的共载体系,进一步开展体外细胞学评价以及体内药效、体内靶向性等研究。

[参考文献]

- [1] KOMAROVA N L, BOLAND C R. Cancer: calculated treatment[J]. *Nature*, 2013, 499: 291-292.
- [2] SHIM M S, KWON Y J. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo*[J]. *Febs J*, 2010, 277: 4814-4827.
- [3] THEILLET F X, BINOLFI A, FREMBGEN-KESNER T, HINGORANI K, SARKAR M, KYNE C, et al. Physicochemical properties of cells and their effects on intrinsically disordered proteins (IDPs)[J]. *Chem Rev*, 2014, 114: 6661-6714.
- [4] MEDINA S H, MILLER S E, KEIM A I, GORKA A P, SCHNERMANN M J, SCHNEIDER J P. An intinsically disordered peptide facilitates non-endosomal cell entry[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 3369-3372.
- [5] CHEN W, ZHONG P, MENG F, CHENG R, DENG C, FEIJEN J, et al. Redox and pH-responsive degradable micelles for dually activated intracellular anticancer drug release[J]. *J Control Release*, 2013, 169: 171-179.
- [6] YAO C, LIU J, WU X, TAI Z, GAO Y, ZHU Q, et al. Reducible self-assembling cationic polypeptide-based micelles mediate co-delivery of doxorubicin and microRNA-34a for androgen-independent prostate cancer therapy[J]. *J Control Release*, 2016, 232: 203-214.
- [7] HU C, GU F, TAI Z, YAO C, GONG C, XIA Q, et al. Synergistic effect of reduced polypeptide micelle for co-delivery of doxorubicin and TRAIL against drug-resistance in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 61832-61844.
- [8] TUDOSE M, CULITA D C, MUSUC A M, SOMACESCU S, GHICA C, CHIFIRIUC M C, et al. Lipoic acid functionalized SiO₂@Ag nanoparticles. Synthesis, characterization and evaluation of biological activity[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 79: 499-506.
- [9] WEI R, CHENG L, ZHENG M, CHENG R, MENG F, DENG C, et al. Reduction-responsive disassemblable core-cross-linked micelles based on poly(ethylene glycol)-*b*-poly(N-2-hydroxypropyl methacrylamide)-lipoic acid conjugates for triggered intracellular anticancer drug release[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 2429-2438.
- [10] MIYATA K, KAKIZAWA Y, NISHIYAMA N, HARADA A, YAMASAKI Y, KOYAMA H, et al. Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 2355-2361.

[本文编辑] 尹 茶