

# 透明质酸/聚酰胺-胺三元纳米基因复合物的构建及其体外评价

王晓宇<sup>1,2</sup>, 孙李平<sup>2</sup>, 朱全刚<sup>1</sup>, 张 玮<sup>1,3</sup>, 张 敏<sup>1</sup>, 张丽娟<sup>1</sup>, 戴子渊<sup>1</sup>, 高 申<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

2. 成都军区司令部直属工作部, 成都 610000

3. 解放军 522 医院药材科, 洛阳 471003

**[摘要]** **目的** 在聚酰胺-胺(polyamidoamine, PAMAM)树状大分子与 DNA 形成复合物的基础上添加透明质酸(hyaluronic acid, HA)形成三元纳米复合物, 研究其基因递送性能的改变。**方法** 配制不同电荷比的三元纳米复合物, 测定其粒径和电位; 选择 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞进行转染效率的测定, 选择 B16 和 MCF-7 细胞进行细胞毒性的测定。**结果和结论** 形成的三元纳米复合物大小均一, 结构稳定。与单纯的 PAMAM 载体相比, 增加 HA 提高了转染效率, 降低了细胞毒性, 适合用于基因的递送和转染。

**[关键词]** 聚酰胺-胺; 透明质酸; 三元纳米复合物; 转染效率

**[中图分类号]** R 915.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)12-1288-05

## Construction and *in vitro* evaluation of hyaluronic acid/polyamidoamine ternary nano-gene polyplex

WANG Xiao-yu<sup>1,2</sup>, SUN Li-ping<sup>2</sup>, ZHU Quan-gang<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1,3</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Li-juan<sup>1</sup>, DAI Zi-yuan<sup>1</sup>, GAO Shen<sup>1\*</sup>

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

2. Subordinate Service Department, Headquarters of PLA Chengdu Military Area Command, Chengdu 610000, Sichuan, China

3. Department of Pharmacy, No. 522 Hospital of PLA, Luoyang 471003, Henan, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare the ternary nano-gene polyplex by adding hyaluronic acid (HA) into DNA/polyamidoamine (PAMAM) binary nano-gene polyplex, and to probe into its gene transfection ability. **Methods** DNA and HA were mixed with PAMAM dendrimer in different charge ratios to form ternary nano-gene polyplex, and the size and zeta potential of the polyplex were measured. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were used for transfection efficiency test; B16 and MCF-7 cells were used for cell viability assay. **Results and conclusion** The prepared ternary nano-gene polyplex has even size and stable structure. HA can enhance the gene transfection efficiency and reduce the cell toxicity compared with pure PAMAM, making it suitable for gene delivery and transfection.

**[Key words]** polyamidoamine; hyaluronic acid; ternary nano-gene polyplex; transfection efficiency

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12):1288-1292]

由于外源性 DNA/RNA 在体内易降解, 难以透过细胞膜, 因此需要基因载体的协助才能发挥基因的调控作用<sup>[1]</sup>。以阳离子聚合物为代表的非病毒载体是当前研究的热点, 相比于病毒载体, 其具有安全性好、免疫原性低、基因容量大的优点<sup>[1]</sup>。

聚酰胺-胺 (polyamidoamine, PAMAM) 树状大分子是一种树状高分子材料, 分子表面有大量氨基, 带正电荷, 能有效压缩吸附负电荷的 DNA 或 RNA,

相比于聚乙烯亚胺 (polyethylene imine, PEI) 等经典的阳离子聚合物, PAMAM 具有较高的转染效率和较低的细胞毒性, 适合作为基因载体。本课题组在前期的研究中通过对其表面修饰, 如链接单抗<sup>[2]</sup>、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和普朗尼克等分子<sup>[3]</sup>, 进一步增强其转染效率, 降低其毒性。

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是一种线性大分子黏多糖, 具有良好的水溶性、生物相容性、生物

**[收稿日期]** 2012-06-13 **[接受日期]** 2012-08-27

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81172514, 81101658)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81172514, 81101658)。

**[作者简介]** 王晓宇, 硕士生。E-mail: scncwxy@163.com

\* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-31173715, E-mail: liullk@126.com

可降解性和肿瘤细胞的靶向性的特点,适合作为基因载体<sup>[4]</sup>。在本研究中,先将聚阳离子材料 PAMAM 与 DNA 形成二元纳米复合物,再与带负电荷的 HA 通过电荷吸附形成三元纳米复合物,然后对其作为非病毒基因载体的各方面性质进行考察。

## 1 材料和方法

1.1 材料 PAMAM( $G5, M_w = 28\ 826$ )购于美国 Sigma 公司;HA( $M_w = 7\ 000$ )购于山东福瑞达生物化工有限公司;MCF-7、MDA-MB-231 和 B16 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;pGL-3 购于北京普洛麦格生物技术有限公司;pEGFP 由第二军医大学基础部遗传学教研室提供;BCA 蛋白检测试剂盒、琼脂糖和溴化乙啶购于上海生工生物工程技术有限公司;Gibco DMEM 培养液、RPMI 1640 培养液、胎牛血清(FBS)和胰酶购于美国 Life Technologies 公司;感受态菌购于北京天根生化科技有限公司;质粒大量提取试剂盒购于美国 Omega 公司;荧光素酶检测系统和  $5\times$  细胞裂解液购于美国 Promega 公司;CCK-8 试剂盒购于日本同仁化学株式会社。

1.2 仪器 ZS-90 激光粒度电位测定仪(英国 Malvern 公司);DMI4000B 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);E6080 生物发光检测器(美国 Promega 公司);Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);CO<sub>2</sub> 细胞孵箱(美国 Forma Scientific 公司)。6K 系列冷冻干燥机(美国 VIRTIS 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 三元纳米复合物的构建 在复合物中,HA、PAMAM、DNA 之间依靠电荷吸附聚集在一起,按照三者电荷比即带电荷基团的相对量确定投料量。我们定义 HA 的 1 个双糖单位的羧基带 1 个单位的负电荷,PAMAM 分子表面的 1 个氨基带 1 个单位的正电荷,DNA 分子的 1 个磷酸根带 1 个单位的负电荷。以蒸馏水为溶剂,按照 4 种电荷比(1:5、1:10、1:15 和 1:20)将 PAMAM 与 DNA 混合涡旋 15 s,室温静置 30 min,再加入适量 HA,混合涡旋 30 s,室温静置 60 min。

1.3.2 三元纳米复合物粒径和电位的测定 将制备的三元纳米复合物用激光粒度电位测定仪测定粒径和电位,测定条件:室温、固定角 90°。每组复合物平行测量 3 次。将配制的三元纳米复合物冷冻再融化后按照上述方法测定粒径和电位。

1.3.3 细胞培养 MCF-7 细胞在含 10% FBS 和 1 mg/ml 牛胰岛素的 DMEM 培养液中培养,3~4 d 换液,1 周传代一次。MDA-MB-231 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养液中培养,2 d 传代一次。B16 细胞在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中培养,2 d 传代一次。细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育。

1.3.4 三元纳米复合物转染效率的测定 将 MDA-MB-231 细胞以每孔  $5\times 10^4$  个的密度、MCF-7 细胞以每孔  $1\times 10^5$  个的密度接种于 24 孔板,每孔含 500  $\mu$ l 培养液。培养 24 h,转染前换成无血清培养液。按照上述方法配制 4 种电荷比的 pEGFP/PAMAM/HA 三元纳米复合物(500  $\mu$ l/孔的三元纳米复合物中包含 3  $\mu$ g 质粒 DNA),将其加入培养板中转染细胞。每种复合物重复做 3 孔,孵育 4 h 后换含 10% FBS 的培养液继续培养 2 d。吸出培养液,用 PBS 漂洗 3 次,在倒置荧光显微镜中用蓝色光激发,观察绿色荧光。

按照上述方法配制 4 种电荷比的 pGL-3/PAMAM/HA 三元纳米复合物(500  $\mu$ l/孔的三元纳米复合物中包含 3  $\mu$ g 质粒 DNA),用其转染 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞,培养 2 d 后用虫荧光素酶检测试剂盒进行分析,用生物发光检测器测定光子数量;并用 BCA 蛋白定量试剂盒校正。

1.3.5 三元纳米复合物细胞毒性的测定 将 B16 细胞和 MCF-7 细胞分别以每孔 5 000 个和每孔 8 000 个的密度接种于 96 孔板,继续培养 24 h。实验前,分别加入 100  $\mu$ l 浓度为 10、20、30、50、80、100、120、150、200  $\mu$ g/ml 的三元纳米复合物继续培养 48 h,同浓度的复合物平行重复 6 孔。每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 试剂,孵育 3 h,在波长 450 nm 的酶标仪上测定光密度( $D$ )值,按照公式计算细胞毒性:细胞生存率(%) =  $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 18.0 软件进行  $t$  检验和方差分析,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 三元纳米复合物的粒径和电位测定结果 DNA 与 PAMAM 按照 4 种电荷比例(1:5、1:10、1:15、1:20)构建,再加入 HA 形成三元纳米复合物,粒径和电位测定结果见图 1。

从图 1A 可知,DNA 与 PAMAM 形成的二元纳

米复合物平均粒径均在 200 nm 以下,随着 DNA 与 PAMAM 电荷比的增加,复合物粒径降低,zeta 电位随着电荷比的增加而逐渐升高。图 1B 是加入 HA 形成的三元纳米复合物的粒径和电位。电荷比为 1 : 5 : 5 时,粒径为 (212±10) nm,由于 HA 的负电性,zeta 电位由正变负,随着 PAMAM 和 HA 量的增加粒径逐渐减小。

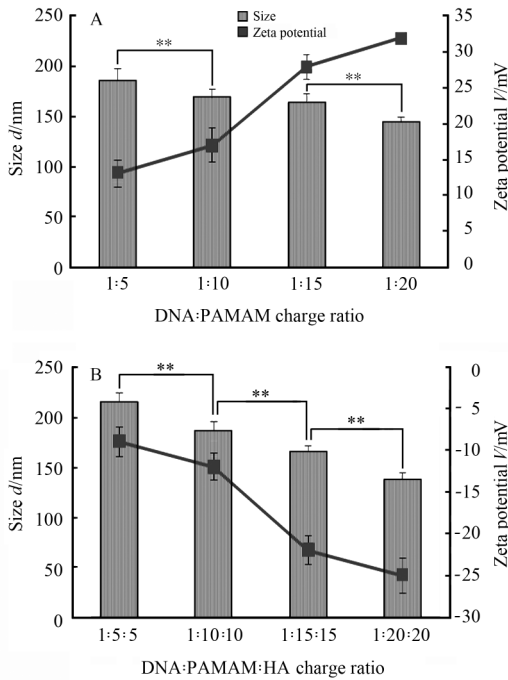


图 1 DNA/PAMAM 二元纳米复合物 (A) 和 DNA/PAMAM/HA 三元纳米复合物 (B)

Fig 1 DNA/PAMAM binary nano-gene complex (A) and DNA/PAMAM/HA ternary nano-gene complex (B)

PAMAM; Polyamidoamine; HA; Hyaluronic acid. \*\*  $P < 0.01$ ;  $n=3, \bar{x} \pm s$

本实验还考察了三元纳米复合物冻融对于粒径的影响,从结果(图 2)可知,DNA 与 PAMAM 形成的二元纳米复合物粒径经历冻融之后增大,而加入 HA 形成的三元纳米复合物粒径基本维持不变。

2.2 三元纳米复合物转染效率测定结果 对 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞分别转染 pEGFP, 让其在细胞内表达出绿色荧光蛋白,根据荧光强弱定性评价载体的转染效率。从结果(图 3)可知,当电荷比 1 : 10 以上时,pEGFP/PAMAM 二元纳米复合物和 pEGFP/PAMAM/HA 三元纳米复合物可以使 2 种细胞都表达出绿色荧光蛋白,并随着电荷比的增加,荧光亮度增强。我们发现对于

MCF-7 细胞,二元纳米复合物和三元纳米复合物的转染效率大致相同,而对于 MDA-MB-231 细胞,三元纳米复合物的转染效率要高于二元纳米复合物。转染 pEGFP 表达的绿色荧光蛋白只能定性观察转染效率的高低,采用虫荧光素酶报告基因可对转染效率进行定量考察,报告基因的测定值以相对光单位(relative light unit, RLU)/毫克蛋白的形式表示,从结果(图 4)可知,pGL-3/PAMAM 二元纳米复合物和 pGL-3/PAMAM/HA 三元纳米复合物转染效率都随着电荷比的增高而增强,PAMAM 载体转染 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞结果相似,表明 PAMAM 载体对 2 种细胞无选择性。而加入 HA 后载体对 MDA-MB-231 细胞的转染效率强于 MCF-7 细胞 ( $P < 0.01$ ),表现出一定的转染特异性。

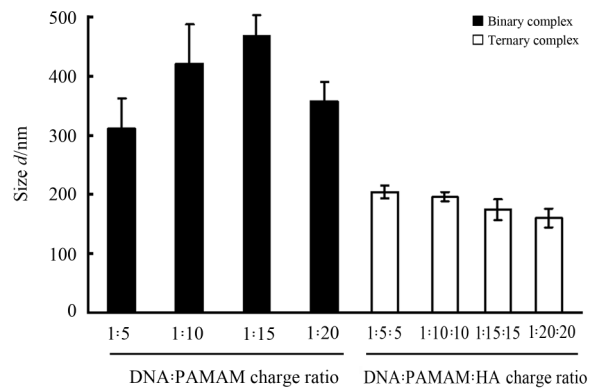


图 2 DNA/PAMAM 二元纳米复合物与 DNA/PAMAM/HA 三元纳米复合物冻融后粒径  
Fig 2 Diameter of DNA/PAMAM binary nano-gene complex and DNA/PAMAM/HA ternary nano-gene complex after freezing-thawing

PAMAM; Polyamidoamine; HA; Hyaluronic acid. There was significant difference in size between the binary nano-gene complex group and ternary nano-gene complex group when they were composed by the same DNA/PAMAM charge ratio ( $P < 0.01$ ).  $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 三元纳米复合物细胞毒性测定结果 阳离子聚合物的细胞毒性是由于其对细胞膜有较强的亲和黏附所致,细胞毒性与阳离子聚合物浓度呈正相关,细胞毒性是限制聚阳离子载体发展的重要原因。本实验通过 CCK-8 法测定聚合物材料的毒性,从结果(图 5)中我们发现转染材料对 MCF-7 细胞和 B16 细胞的细胞毒性相似,增加 HA 后载体在 200  $\mu\text{g/ml}$  时细胞存活率也保持在 70% 以上,而在此浓度下单纯的 PAMAM 载体细胞存活率仅为 30%。

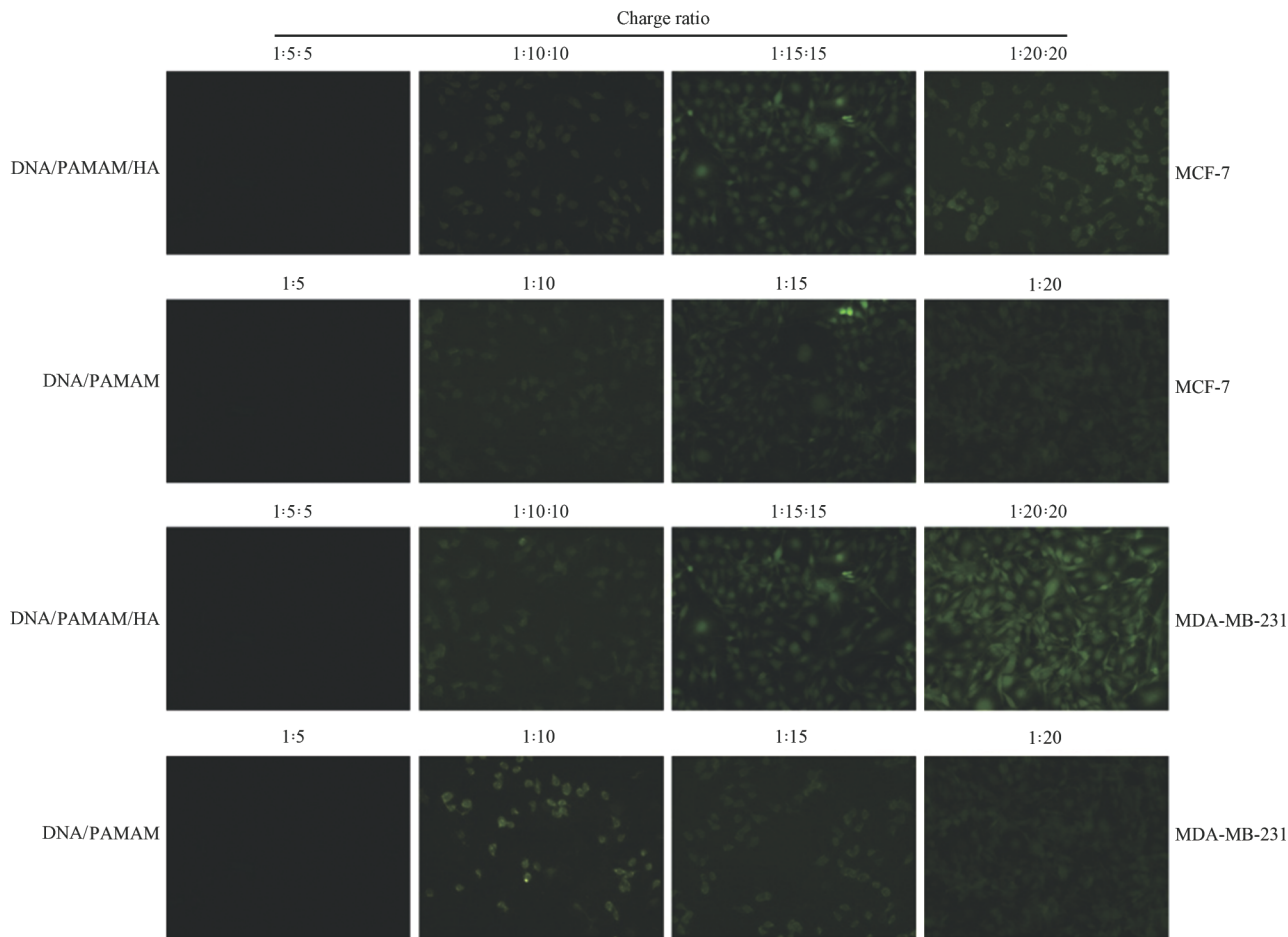


图 3 4 种电荷比的纳米复合物转染 pEGFP 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中的表达

Fig 3 Expression of pEGFP nano-gene complexes with four different charge ratios in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

PAMAM: Polyamidoamine; HA: Hyaluronic acid

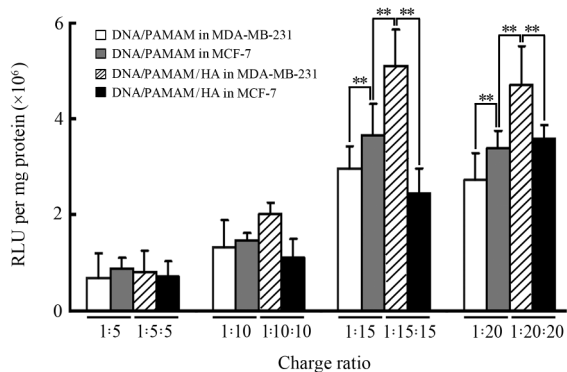


图 4 4 种电荷比的纳米复合物转染 pGL-3 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中的表达

Fig 4 Expression of pGL-3 nano-gene complexes with four different charge ratios in MCF-7

and MDA-MB-231 cells

PAMAM: Polyamidoamine; HA: Hyaluronic acid; RLU: Relative light unit. \*\*  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

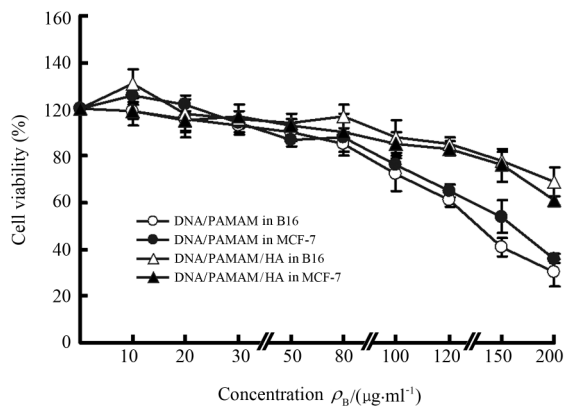


图 5 不同浓度的聚合物载体对细胞生存率的影响

Fig 5 Cell viability under different complex concentrations

PAMAM: Polyamidoamine; HA: Hyaluronic acid. There was significant difference in cell viability between DNA/PAMAM group and DNA/PAMAM/HA group in two cell lines ( $P < 0.01$ ).  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

由于三元纳米复合物之间是依靠电荷聚集在一起,因此三者之间电荷比对于复合物的性质有很大的影响。Ito 等<sup>[5]</sup>研究发现,三元纳米复合物中,HA 与聚阳离子材料之间的电荷比为 0.5~2 时构建的结构最稳定,转染效率最好。因此,本研究构建三元纳米复合物时选择 HA 与聚阳离子材料 PAMAM 之间电荷比为 1。DNA 与 PAMAM 按照 4 种电荷比例(1:5、1:10、1:15、1:20)构建,再加入 HA 形成三元纳米复合物。最终三元纳米复合物中 DNA、PAMAM、HA 之间的电荷比为 1:5:5、1:10:10、1:15:15、1:20:20,复合物溶液透明澄清。

当前的基因转染试剂均为现配现用,无法长期保存。因为 DNA 与聚阳离子材料形成的二元纳米复合物经历冷冻再融化的过程后复合物之间容易聚集,粒径增大,基因失活,同时转染效率降低。而加入 HA 形成三元纳米复合物之后,在外层形成的带负电荷的 HA 水化层可以更好地保护复合物,即使经历冻融过程也能较为均一地分散在溶液中<sup>[6]</sup>,为基因纳米复合物的长期保存提供了可能。

从转染效率的实验结果可以发现,DNA/PAMAM/HA 三元纳米复合物相比于二元纳米复合物表现出一定的转染特异性。可能的原因是 MDA-MB-231 细胞表面高表达 CD44 受体<sup>[7]</sup>,HA 作为其配体通过受体介导内吞提高了 DNA/PAMAM/HA 三元纳米复合物的转染效率。而 MCF-7 细胞由于表面低表达 CD44<sup>[8]</sup>,HA 难以发挥靶向内吞作用,相反其负电荷在一定程度上还阻碍 PAMAM 载体阳离子与细胞表面的阴离子相互作用,基因转染效率比单纯的 PAMAM 略低。说明在高浓度时,HA 表现出了明显的保护作用。

当前,非病毒基因载体大多是聚阳离子载体与核苷酸电荷吸附形成二元纳米复合物,带很强的正电荷,与带负电荷的细胞膜亲和,通过胞饮、胞吞等方式进入细胞发挥基因调控作用。与此同时,其所带的正电荷产生很大的细胞毒性,在体内给药时,也容易被清除。一般对聚阳离子材料表面修饰 PEG 或者单抗等靶向分子来降低载体的毒性和增强基因递送的选择性,而在本实验中,通过加入 HA,与 DNA/PAMAM 进一步吸附压缩,一方面降低了载

体的正电性,降低了毒性;另一方面,在 DNA/PAMAM 二元纳米复合物外层形成亲水性的保护层,增强了纳米复合物的稳定性,经历冻融过程也不聚集,还赋予纳米复合物一定的选择性。HA 与 DNA/PAMAM 的结合仅为电荷吸附,无需化学反应,简化了制备过程。因此,我们认为增加 HA 形成三元纳米复合物是一种有效的提高转染效率、降低细胞毒性的方法,适用于基因的递送和转染,但这还需要进一步研究。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Al-Dosari M S, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress[J]. AAPS J, 2009, 11: 671-681.
- [2] 武鑫, 蔡溱, 朱全刚, 王翔, 王晓宇, 叶丽华, 等. YPSMA-1 单克隆抗体修饰的树突状高分子前列腺癌靶向基因递送载体[J]. 中国药学杂志, 2012, 47: 418-422.
- [3] 王翔, 丁雪鹰, 武鑫, 丁宝月, 范伟, 高静, 等. 用于基因递送的普朗尼克化聚酰胺-胺树状聚合物研究[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32: 991-995.  
Wang X, Ding X Y, Wu X, Ding B Y, Fan W, Gao J, et al. Research on pluronic P123ylated polyamidoamine dendrimers for gene delivery[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32: 991-995.
- [4] Oh E J, Park K, Kim K S, Kim J, Yang J A, Kong J H, et al. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives [J]. J Control Release, 2010, 141: 2-12.
- [5] Ito T, Koyama Y, Otsuka M. Analysis of the surface structure of DNA/polycation/hyaluronic acid ternary complex by Raman microscopy[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51: 268-272.
- [6] Ito T, Yoshihara C, Hamada K, Koyama Y. DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice[J]. Biomaterials, 2010, 31: 2912-2918.
- [7] Hornof M, de la Fuente M, Hallikainen M, Tammi R H, Urtti A. Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells[J]. J Gene Med, 2008, 10: 70-80.
- [8] Draffin J E, McFarlane S, Hill A, Johnston P G, Waugh D J. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells[J]. Cancer Res, 2004, 64: 5702-5711.

[本文编辑] 尹茶