

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.11.1353

## 可生物降解多肽基因载体的构建与体外评价

胡楚玲<sup>1</sup>, 顾芬芬<sup>1</sup>, 台宗光<sup>1</sup>, 方季惟<sup>2</sup>, 高原<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. 上海市浦东新区周浦医院药剂科, 上海 201318

**[摘要]** **目的** 制备一种应用于基因递送系统的硫辛酸修饰的聚精氨酸多肽纳米复合物, 并考察其对人胚肾细胞系 HEK293 细胞的转染效率及细胞毒性。**方法** 以不同量的半胱氨酸作为交联剂, 合成 4 种不同交联度的还原性硫辛酸修饰的交联聚精氨酸组氨酸(LHRss), 利用 <sup>1</sup>H NMR 和凝胶色谱鉴定合成的 LHRss。取质粒 DNA (pDNA) 和 LHRss 以不同氮磷比(N/P)自组装形成纳米复合物, 用粒度测定仪测定复合物的粒径和 zeta 电位, 凝胶阻滞电泳测定载体 LHRss 对 pDNA 的包裹能力。用 LHRss/pDNA 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摄取情况及相关基因转染情况, 并测定不同纳米复合物对 HEK293 细胞的细胞毒性。**结果** 通过结构鉴定确定 LHRss 多肽合成成功。组装形成的纳米复合物粒径分布均匀, N/P $\geq$ 40 时 LHRss3/pDNA 及 LHRss4/pDNA 复合物的 zeta 电位均大于 30 mV。凝胶阻滞电泳结果显示 N/P 值为 5 时, LHRss3 可完全包裹 pDNA。当 N/P 值为 40 时, HEK293 细胞对 LHRss3/pDNA 的摄取及转染效率高于其他 3 种复合物及单体硫辛酸修饰的聚精氨酸组氨酸(LHR); 其中 LHRss3/pGL3 复合物的平均荧光强度约为 LHR/pGL3 复合物的 3.98 倍, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。细胞毒性实验显示 LHR/pGL3 及不同交联度 LHRss/pGL3 转染 HEK293 细胞 24 h 后, 细胞存活率均在 80% 以上, 其毒性作用均低于 bPEI-25K (20  $\mu$ g/mL bPEI-25K 转染细胞 24 h 后细胞存活率为 25% 左右,  $P < 0.05$ )。**结论** 制备的硫辛酸修饰的聚精氨酸多肽纳米复合物有望成为一种高效的基因载体。

**[关键词]** 聚精氨酸多肽; 质粒 DNA; 转染; 基因转移技术**[中图分类号]** R 349.83**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2016)11-1353-07

### Preparation and *in vitro* evaluation of biodegradable polypeptide gene vector

HU Chu-ling<sup>1</sup>, GU Fen-fen<sup>1</sup>, TAI Zong-guang<sup>1</sup>, FANG Ji-wei<sup>2</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, GAO Shen<sup>1\*</sup>

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

2. Department of Pharmacy, Zhoupu Hospital of Shanghai Pudong New District, Shanghai 201318, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare a lipoic acid modified polyarginine polypeptide nanocomplex for gene delivery system, and to observe its transfection efficiency and cytotoxicity on HEK293 cells. **Methods** We synthesized four disulfide cross-linked lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine (LHRss) at different cross-linked degrees using different mol fraction of L-cysteine as cross-linking agent. The construction of LHRss was characterized by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) and gel permeation chromatography. The LHRss/plasmid DNA (pDNA) nanocomplexes were self-assembled with LHRss and pDNA at different nitrogen/phosphorus (N/P) ratios. The size and zeta potential of LHRss/pDNA nanocomplexes were characterized by particle size analyzer, and the pDNA enrichment capability was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMAS). Then, the intracellular uptake and gene transfection efficiency of LHRss/pDNA nanocomplexes in HEK293 cells were investigated. CCK-8 method was used to determine the cytotoxicity of LHRss/pDNA nanocomplexes on HEK 293 cells. **Results** <sup>1</sup>H NMR results showed that LHRss was successfully synthesized. The nanocomplexes had a uniform distribution of particle size, and the zeta potential of LHRss3/pDNA and LHRss4/pDNA nanocomplexes were more than 30 mV when N/P $\geq$ 40. EMAS results showed that pDNA could be completely wrapped by LHRss3 when N/P=5. When N/P=40, the intracellular uptake and transfection efficiency of LHRss3/pDNA nanocomplex by HEK293 cells was significantly higher than that of other three nanocomplexes and lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine (LHR)/pDNA; the mean fluorescence intensity of LHRss3/pGL3 nanocomplexes was approximately 3.98 times that of the LHR/pGL3 nanocomplex ( $P < 0.05$ ). Cytotoxicity results showed that the cell survival rates were more than 80% at 24 h after transfected with LHR/pGL3 and LHRss/pGL3, and its toxicity was significantly lower than that of bPEI-25K, with the cell survival rates

**[收稿日期]** 2016-04-21 **[接受日期]** 2016-09-01**[基金项目]** 国家自然科学基金(81172514, 81372762). Supported by National Natural Science Foundation of China (81172514, 81372762).**[作者简介]** 胡楚玲, 硕士生. E-mail: chuchu20112@163.com

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

being about 25% at 24 h after transfected with 20 μg/mL bPEI-25K ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The prepared liponic acid modified polyarginine polypeptide nanocomplex is expected to become an efficient gene vector.

**[Key words]** polyarginine polypeptide; plasmid DNA; transfection; gene transfer techniques

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(11): 1353-1359]

近年来基因治疗已发展为一种非常有前景的治疗方式。基因治疗是将外源性正常基因导入靶细胞,纠正或补偿因基因缺陷、异常引起的疾病,达到治疗目的。外源基因的导入必须借助一定的方法或载体<sup>[1]</sup>,而良好的基因载体要求材料具有较好的生物相容性、无免疫原性及体内可降解性<sup>[2]</sup>。

多肽类载体是指各种细胞穿透肽,主要为各种人体必需的氨基酸。多肽类载体在基因治疗中因其具有高效传递、低毒性和易制备的特点而在过去 20 多年中成为研究热点<sup>[3]</sup>。研究发现,多肽类载体中的精氨酸表面富集的正电荷可有效地吸附带负电荷的基因物质,形成粒径小、结构稳定而可被细胞摄取的载体/基因复合物,从而成为一种能跨膜转运基因物质的载体<sup>[4-6]</sup>。

纳米复合物通过细胞内吞作用进入细胞后被内吞体吞噬,进而与溶酶体融合,而基因药物在进入溶酶体后容易被溶酶体中的酶降解,因此,基因物质只有在内吞体和溶酶体中逃逸出来才能发挥作用<sup>[7]</sup>。研究发现,组氨酸因“质子海绵效应”而具有内吞体逃逸的能力<sup>[8]</sup>,因此本研究采用精氨酸与组氨酸相连的序列连接方式,以达到复合物高效转染、有效逃逸出内吞体的目的。

目前国内非病毒基因载体的研究主要集中于不可生物降解的合成或天然材料,可生物降解的基因载体的研究仍处于起步阶段<sup>[9-10]</sup>。硫辛酸(lipoic acid, LA)是一种具有分子内五元环二硫键结构和末端羧基的两亲性物质。其分子内二硫键可在半胱氨酸条件下聚合形成具有内部空腔的交联大分子物质,与细胞膜的脂质双分子层亲和力强,具有较好的包载脂溶性药物的作用;且其二硫键可在细胞还原性条件下裂解,为药物在肿瘤部位的有效释放提供条件<sup>[11-12]</sup>。本研究在聚精氨酸-聚组氨酸( $R_6H_3$ )的组氨酸末端氨基上修饰 LA,并通过 LA 二硫键的交联形成聚合大分子载体,同时选择人胚肾细胞系 HEK293 细胞作为实验对象,探讨 LA 修饰的聚精氨酸载体的 DNA 转染能力,旨在寻找一种转染能力强、生物相容性好、毒性低的基因载体。

## 1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 Zeta sizer ZS90 粒度测定仪(Malvern 公司,英国);JEM-2010 透射电镜

(JEOL 公司,日本);全自动酶标仪(Thermo 公司,美国);荧光显微镜(Leica 公司,德国);FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司,美国),GloMax 20/20 发光检测仪(Promega 公司,美国);L-组氨酸盐酸盐、L-精氨酸和 LA[生工生物工程(上海)股份有限公司];pEGFP、pGL3 质粒(上海英为信生物科技有限公司);bPEI(相对分子质量 25 000;Sigma 公司,美国);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Thermo 公司,美国);DMEM 培养液、胎牛血清(Gibco 公司,美国),其他试剂均为分析纯。

1.2 还原性 LA 修饰的交联聚精氨酸组氨酸(disulfide cross-linked liponic acid modified polyarginine peptide and histidine, LHRss)多肽的合成与表征 ( $L-R_6$ )(RRRRRR)和  $H_3$ (HHH)肽及 LA 在使用苄氧羰基保护的前提下用固相多肽合成法合成,并用反相高效液相色谱法(HPLC)进行纯化。采用半胱氨酸盐酸盐进行交联合成 LHRss;将 LA 修饰的聚精氨酸组氨酸(LHR)多肽溶于甲醇中,加入 10 mg/mL 的半胱氨酸盐酸盐,在室温下聚合 12 h,  $N_2$  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。为了优化 LHRss 的合成,本实验选择 4 种不同摩尔分数的半胱氨酸(2.5%、5.0%、10.0%、20.0%),所得产物分别命名为 LHRss1、LHRss2、LHRss3、LHRss4。用核磁共振氢谱( $^1H$  NMR; 600 MHz)和凝胶色谱(GPC)进行产物分析。

1.3 LHRss/pDNA 纳米复合物的合成与表征 取 2 μg pDNA(pGL3)和 LHRss 以不同氮磷比(N/P)自组装形成 LHRss/pDNA 纳米复合物(图 1),取适量复合物溶于 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS; 19 mmol/L, pH 7.4)中,室温下孵育 30 min。用 Zeta sizer ZS90 粒度测定仪测定纳米复合物的粒径和电位。

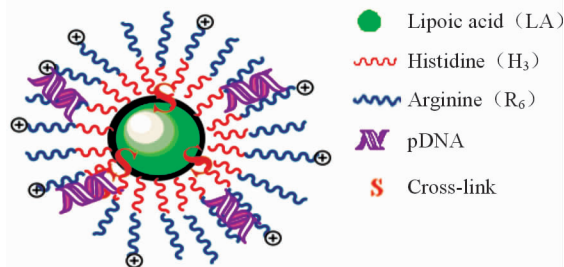


图 1 LHRss/pDNA 纳米复合物示意图

**Fig 1 Diagrammatic sketch of LHRss/pDNA nanocomplex** LHRss: Disulfide cross-linked liponic acid modified polyarginine peptide and histidine; pDNA: Plasmid DNA

1.4 LHRss3/pDNA 纳米复合物的凝胶阻滞电泳分析 多肽的结合能力用琼脂糖凝胶测定。选择粒径电位分布较为均匀的 LHRss3 作为研究对象, 制备 N/P 值为 0、0.1、1、2.5、5、10、15、20 的 LHRss3/pGL3 纳米复合物, 孵育 30 min 后, 将含 1  $\mu\text{g}$  pDNA 的多肽加入含 1% 琼脂糖凝胶的 TAE 缓冲液的孔中, 100 V 条件下电泳 30 min, 在紫外光下显像。

1.5 LHRss/pDNA 纳米复合物的细胞摄取能力的测定 用 HEK293 细胞(美国 ATCC)测定 LHRss/pDNA 纳米复合物的细胞摄取能力。细胞培养液为含有青霉素、链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^\circ\text{C}$  培养箱中培养。取 HEK293 细胞按  $3 \times 10^5$ /孔的密度接种于 12 孔板, 培养 24 h 后更换为无血清培养液。之后每孔加入含 0.75 nmol YOYO-1 标记的 pDNA(pGL3)的纳米复合物(N/P=40)。培养 4 h 后去除培养液, 消化、离心, 并将细胞重悬于 300  $\mu\text{L}$  PBS 中, 用流式细胞仪检测细胞摄取情况。以 N/P 值为 10 的 bPEI-25K/pGL3 进行同样处理作为对照。

1.6 LHRss/pDNA 纳米复合物的基因转染情况检测 取 HEK293 细胞按  $1 \times 10^5$ /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  $\mu\text{g}$  pDNA(pEGFP 或 pGL3)的不同 N/P 值的纳米复合物。培养 4 h 后, 换成含 10% 胎牛血清的培养液。pEGFP 转染细胞 48 h 后, 消化细胞并悬浮于 300  $\mu\text{L}$  PBS 中, 用流式细胞仪检测细胞的荧光强度。而 pGL3 转染细胞 48 h 后用 PBS 冲洗, 加入 200  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液(Promega 公司, 美国)处理 30 min; 取 20  $\mu\text{L}$  细胞裂解物, 加入 100  $\mu\text{L}$

底物, 用 GloMax 20/20 发光检测仪检测荧光素酶活性。以 N/P 值为 10 的 bPEI-25K/pDNA (pEGFP 或 pGL3)进行同样处理作为对照。

1.7 LHRss/pDNA 纳米复合物的细胞毒性实验 采用 CCK-8 法评价 LHRss/pGL3 纳米复合物对 HEK293 细胞的细胞毒性。取 HEK293 细胞按  $1 \times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板, 孵育 24 h。每孔加入不同 N/P 值的复合物多肽, 孵育 24 h 后更换为含 10% CCK-8 溶液的新鲜培养液, 继续孵育 1 h。用酶标仪检测每孔在 450 nm 处的光密度(D)值。取未经处理的细胞作为对照, 并将其存活率记为 100%。细胞存活率计算公式: 细胞存活率(%) =  $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.8 统计学处理 应用 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( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 LHRss3 多肽的  $^1\text{H}$  NMR 和 GPC 检测结果 取合成的多肽类载体 LHR 溶于  $\text{D}_2\text{O}$  中, 利用 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR 检测, 选取交联程度较为合适的 LHRss3 进行分析, 图 2 为合成的 LHRss3 的谱图, 其中化学位移约为 4.8 的是  $\text{D}_2\text{O}$  溶剂峰; 峰 a、b、c、e、d、f、l 归属于 LA 部分; 峰 d、h 归属于精氨酸亚甲基; 峰 j、k 来源于组氨酸的咪唑基。不同 LHRss 的合成条件及相对分子质量如表 1 所示, 随着半胱氨酸比例的增加, LHRss 的相对分子质量逐渐增大, 表明复合物多肽成功合成。

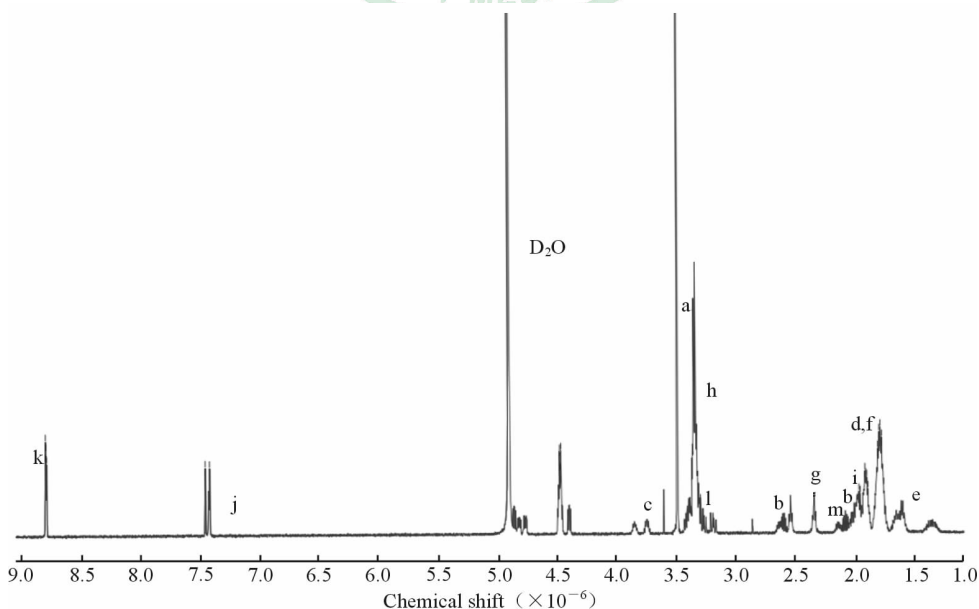


图 2 LHRss3 的  $^1\text{H}$  NMR 谱图

Fig 2  $^1\text{H}$  NMR spectrum of LHRss3

LHRss: Disulfide cross-linked lipolic acid modified polyarginine peptide and histidine;  $^1\text{H}$  NMR:  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance; a, b, c, e, f, l: Lipolic acid; d, h:  $-\text{CH}_2-$  of arginine; g: Hydrogen on the methylene group of the carbonyl group; i, m: Tertiary carbon in arginine and histidine; j, k: Imidazole in histidine



表 1 不同 LHRss 的合成条件及相对分子质量

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

Polymers	LHR m/mg	Cysteine m/mg	Feed ratio <sup>a</sup> (%)	M <sub>r</sub> <sup>b</sup> (×10 <sup>3</sup> )
LHR	—	—	—	1.555
LHRss1	50	0.098	2.5	17.2
LHRss2	50	0.195	5.0	18.8
LHRss3	50	0.390	10.0	22.9
LHRss4	50	0.780	20.0 </tr	

<sup>a</sup>: Molar ratio of LHR to cysteine; <sup>b</sup>: Data obtained by gel permeation chromatography. LHR: Lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; LHRss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine

2.2 不同交联度条件下不同 N/P 值复合物的粒径与 zeta 电位 不同交联度纳米复合物的粒径随着 N/P 值的增大而降低,当 N/P 值大于 2.5 时,LHR/pGL3 及不同交联度的 LHRss/pGL3 纳米复合物的粒径均小于 300 nm;当 N/P 值为 20、40 时,LHRss1~3/pGL3 纳米复合物的平均粒径最好,在 70~100 nm 之间(图 3A),差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。不同交联度纳米复合物多肽的 zeta 电位则随着 N/P 值的增大而增加(图 3B),可能是由于 N/P 值的增加,导致载体表面的正电荷增加,其包载 DNA 的能力也随之增强。当  $N/P \geq 40$  时,LHRss3/pGL3 及 LHRss4/pGL3 纳米复合物的 zeta 电位在 30~40 mV 之间,符合包载要求。综合粒径、电位的结果可以看出 LHRss3 在  $N/P=40$  时具有较好的粒径电位分布。

2.3 不同 N/P 值 LHRss3/pGL3 纳米复合物的凝胶阻滞电泳 当 N/P 值为 0.1~2.5 时,pGL3 不能与 LHRss3 有效结合,可在电场作用下观察到清晰的条带;而当 N/P 值为 5 时未见明显的条带,提示 pGL3 在电场作用下未发生迁移,表明此时 LHRss3 能较好地包载 pGL3(图 4)。

2.4 LHRss/pDNA 纳米复合物的细胞摄取能力 利用流式细胞仪观察 HEK293 细胞对 LHRss/YOYO-1 pGL3/pGL3 的摄取能力,结果(图 5)显示,HEK293 细胞对不同交联度的纳米复合物均具有较好的摄取效率。HEK293 细胞

对 LHRss2/pGL3、LHRss3/pGL3 的摄取高于 bPEI-25K 和 LHR,其中 LHRss3/pGL3 复合物的平均荧光强度约为 LHR/pGL3 复合物的 3.98 倍( $P < 0.05$ )。LHRss1/pGL3、LHRss2/pGL3、LHRss3/pGL3 和 LHRss4/pGL3 复合物的平均荧光强度分别是 LHR/pGL3 复合物的 1.28、3.71、3.98、1.22 倍。

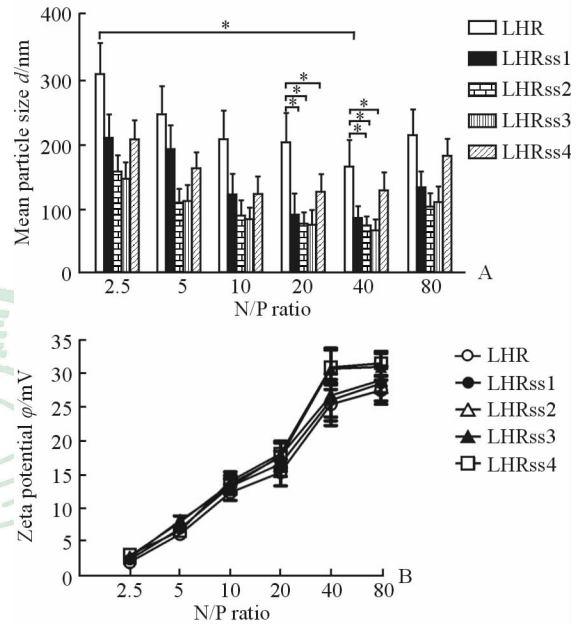


图 3 不同 N/P 值 LHRss/pGL3 复合物的粒径和 zeta 电位

Fig 3 The size (A) and zeta potential (B) of LHRss/pGL3 nanocomplexes at different N/P ratios

N/P: Nitrogen/phosphorus; LHR: Lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; LHRss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; pGL3: Plasmid GL3. \*  $P < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

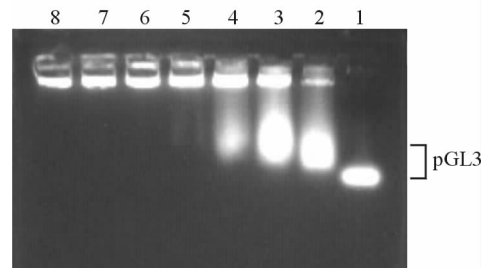


图 4 不同 N/P 值时 LHRss3/pGL3 复合物的琼脂糖凝胶阻滞电泳图

Fig 4 Agarose gel electrophoresis retardation diagram of LHRss3/pGL3 nanocomplexes at different N/P ratios

1: Naked pGL3; 2-8: LHRss3/pGL3 ( $N/P=0.1, 1, 1, 2.5, 5, 10, 15$ , and  $20$ , respectively). N/P: Nitrogen/phosphorus; LHRss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; pGL3: Plasmid GL3

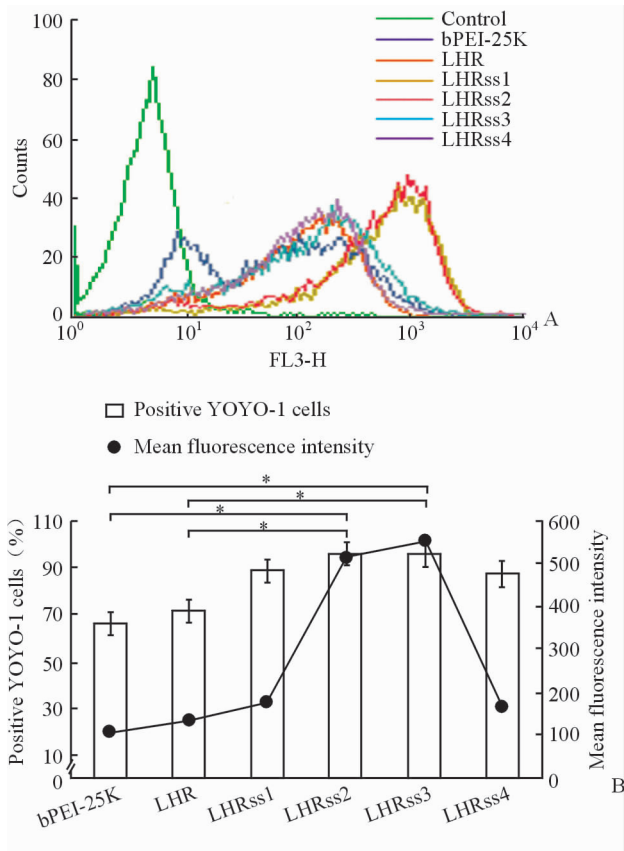


图 5 HEK293 细胞对 LHRss/pGL3 复合物的摄取情况

Fig 5 Cellular uptake of LHRss/pGL3 nanocomplexes by HEK293 cells

A: Flow cytometry figure; B: The percentage of positive YOYO-1 cells and mean fluorescence intensity of LHRss/pGL3 nanocomplexes when N/P=40. LHR: Lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; LHRss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; bPEI-25K: Branched polyethylenimine ( $M_r=25\ 000$ ); pGL3: Plasmid GL3; N/P: Nitrogen/phosphorus. \*  $P<0.05$ ,  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

2.5 LHRss/pDNA 纳米复合物的基因转染情况 荧光显微镜下观察 LHRss/pEGFP 纳米复合物的基因转染情况(图 6A),可见单体 LHR 组细胞的荧光强度较弱,而随着交联度的增加,LHRss/pEGFP 复合物作用的细胞的荧光强度逐渐增强,LHRss3/pEGFP 组与 LHRss4/pEGFP 组细胞的荧光强度与 bPEI-25K 相近。BCA 法考察蛋白表达情况,结果显示所合成的纳米载体具有较高的转染效率;其中,在不同 N/P 条件下时,LHRss3/pGL3 组细胞的荧光素酶表达量高于未交联的 LHR/pGL3,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,图 6B)。

2.6 LHRss/pDNA 纳米复合物的细胞毒性 与 bPEI-25K 相比,LHR 和不同交联度 LHRss 空白载体的细胞毒性均较低 ( $P<0.05$ ),在浓度达到

200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时仍具有较高的细胞活性,且各组间差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图 7A)。经 LHR/pGL3 或不同交联度 LHRss/pGL3 纳米复合物转染 HEK293 细胞 24 h 后,均未见明显的细胞毒性作用;而 bPEI-25K 浓度达到 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,经 bPEI-25K/pGL3 转染的细胞活性已降至 25%(图 7B),与合成的载体毒性相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。表明所合成载体具有良好的生物相容性。

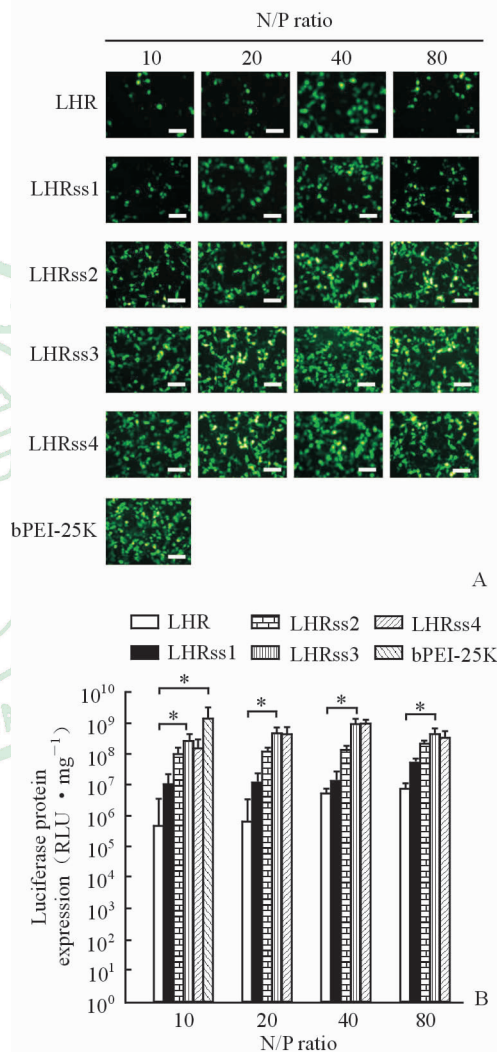


图 6 LHRss/pDNA 复合物的体外基因转染效率

Fig 6 *In vitro* transfection efficiency of LHRss/pDNA nanocomplexes

A: Fluorescence images of transfection efficiency of LHRss/pEGFP nanocomplexes at different N/P ratios on HEK293 cells; B: Luciferase assay of LHRss/pGL3 nanocomplexes on HEK293 cells. N/P: Nitrogen/phosphorus; LHR: Lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; LHRss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; bPEI-25K: Branched polyethylenimine ( $M_r=25\ 000$ ); pGL3: Plasmid GL3; pEGFP: Plasmid EGFP; RLU: Relative light unit. Bar=250  $\mu\text{m}$ . \*  $P<0.05$ ,  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$

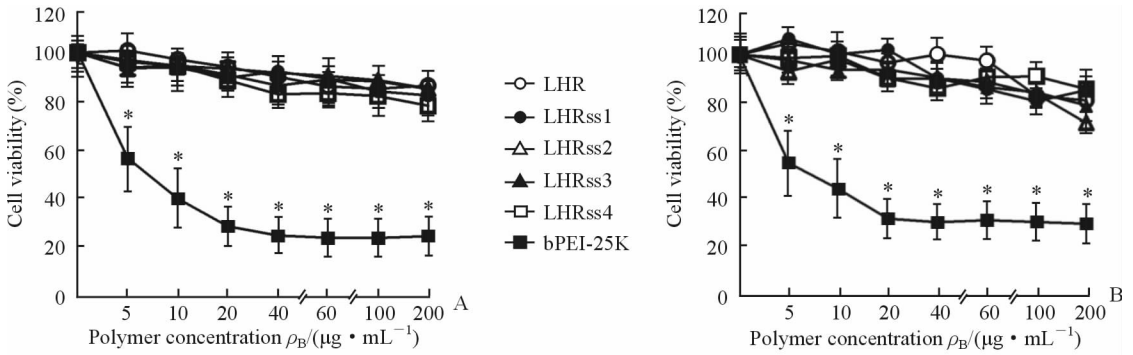


图7 空白载体(A)和LHRss/pGL3复合物(B)对HEK293细胞的细胞毒性

Fig 7 Cytotoxicity of blank polymer (A) and LHRss/pGL3 nanocomplexes (B) on HEK293 cells

LHR: Lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; LHRss: Disulfide cross-linked lipoic acid modified polyarginine peptide and histidine; bPEI-25K: Branched polyethylenimine ( $M_r=25\ 000$ ); pGL3: Plasmid GL3. \*  $P<0.05$  vs LHR group and LHRss groups.  $n=3, \bar{x}\pm s$

### 3 讨论

阳离子多肽因其安全性好、转染效率高而成为研究热点。在我们前期研究的基础上,本研究设计合成了一种高效的基因载体,其由6-L-精氨酸、3-L-组氨酸和1-LA通过LA二硫键交联而成;并用这种载体包载DNA,评价DNA是否能被摄取与转染。设计合成的载体LHRss/pDNA复合物粒径根据N/P值及LA交联度的不同而在70~300 nm间变化。与未交联的单体LHR相比,交联纳米复合物的粒径明显减小,这可能是由于随着载体的交联,复合物亲脂性内核结构更加紧密。LA交联度的不同影响复合物的粒径,当半胱氨酸摩尔分数为10%时,复合物具有较为合适的粒径,符合载体/基因复合物在体内应用的要求<sup>[13-14]</sup>。LHRss/pDNA复合物的zeta电位在N/P值 $\geq 2.5$ 时均为正值,可保证基因物质通过静电相互作用被载体包裹;而交联度对复合物的zeta电位影响不大。本研究制备的纳米复合物稳定性好、粒径大小均匀,此粒径大小可充分利用肿瘤的增强渗透滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR),使纳米复合物富集于靶区<sup>[15-16]</sup>。在细胞摄取方面,当半胱氨酸量为2.5%~10.0%时,LA交联度显著增加了细胞对复合物的摄取能力,可能是因为LA的交联增强了载体与细胞膜的亲和力,使其更容易进入胞体<sup>[17]</sup>;而当半胱氨酸量达到20.0%时,细胞的摄取下降,可能是由于交联度的增加促使其细胞毒性增加。在基因转染方面,随着LA交联度的增加,LHRss/pEGFP纳米复合物作用的细胞的荧光强度

显著增强,绿色荧光蛋白酶的表达也显著升高,其中LHRss3/pGL3在N/P=40时的细胞荧光素酶表达接近于bPEI-25K在N/P=10时的荧光素酶表达,可能是由于LA五元环的交联增加了载体/基因复合物与细胞膜的亲和力,同时二硫键在细胞内还原性条件下裂解释放基因药物,从而达到有效运输和高效释放的目的<sup>[18]</sup>。对空白载体和载体/基因复合物进行细胞毒性考察,结果发现空白载体和载体/基因复合物均具有较低的细胞毒性。载体质量浓度达到200 µg/mL时,其细胞存活率仍有80%左右;而当bPEI-25K浓度达到20 µg/mL时,其细胞存活率已下降至25%左右。上述研究表明LA的交联可以提高细胞的摄取和基因转染能力,其中LHRss3是本研究中最合适的基因载体。

综上所述,LA修饰提高对于聚精氨酸多肽载体的基因转染能力具有一定的意义。LHRss在体外被证明可有效压缩DNA形成纳米复合物;其在体外培养的HEK293细胞中具有促进pDNA跨膜转运和内吞体逃逸,并最终在细胞内降解的作用,且具有较低的细胞毒性。本研究表明LHRss适合作为一种基因载体应用于多种疾病的研究中,后期我们将进一步开展LHRss作为基因载体包载治疗基因在抗乳腺癌方面的研究。

### [参考文献]

[1] NIIDOME T, HUANG L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors[J]. Gene Ther, 2002, 9: 1647-1652.  
 [2] GOVERDHANA S, PUNTEL M, XIONG W,



- ZIRGER J M, BARCIA C, CURTIN J F, et al. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges[J]. *Mol Ther*, 2005, 12: 189-211.
- [3] SKOTLAND T, IVERSEN T G, TORGERSEN M L, SANDVIG K. Cell-penetrating peptides: possibilities and challenges for drug delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. *Molecules*, 2015, 20: 13313-13323.
- [4] ZHANG C, TANG N, LIU X, LIANG W, XU W, TORCHILIN V P. siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene[J]. *J Control Release*, 2006, 112: 229-239.
- [5] ZHAO Z X, GAO S Y, WANG J C, CHEN C J, ZHAO E Y, HOU W J, et al. Self-assembly nanomicelles based on cationic mPEG-PLA-*b*-Polyarginine (R<sub>15</sub>) triblock copolymer for siRNA delivery[J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 6793-6807.
- [6] LUNDBERG M, WIKSTROM S, JOHANSSON M. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains [J]. *Mol Ther*, 2003, 8: 143-150.
- [7] HART S L. Multifunctional nanocomplexes for gene transfer and gene therapy[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2010, 26: 69-81.
- [8] LEE E S, SHIN H J, NA K, BAE Y H. Poly (*L*-histidine) - PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization[J]. *J Control Release*, 2003, 90: 363-374.
- [9] LI S, HUANG L. Nonviral gene therapy: promises and challenges[J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 31-34.
- [10] GAO X, KIM K S, LIU D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next[J/OL]. *AAPS J*, 2007, 9: E92-E104. doi: 10.1208/aapsj0901009.
- [11] ZHONG Y, ZHANG J, CHENG R, DENG C, MENG F H, XIE F, et al. Reversibly crosslinked hyaluronic acid nanoparticles for active targeting and intelligent delivery of doxorubicin to drug resistant CD44<sup>+</sup> human breast tumor xenografts[J]. *J Control Release*, 2015, 205: 144-154.
- [12] XU X, JIAN Y, LI Y, ZHANG X, TU Z, GU Z. Bio-inspired supramolecular hybrid dendrimers self-assembled from low-generation peptide dendrons for highly efficient gene delivery and biological tracking [J]. *ACS Nano*, 2014, 8: 9255-9264.
- [13] JIANG W, KIM B Y, RUTKA J T, CHAN W C. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent[J]. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3: 145-150.
- [14] LUNDQVIST M, STIGLER J, ELIA G, LYNCH I, CEDERVALL T, DAWSON K A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 14265-14270.
- [15] MAEDA H, WU J, SAWA T, MATSUMURA Y, HORI K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. *J Control Release*, 2000, 65: 271-284.
- [16] FERRARI M. Nanovector therapeutics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, 9: 343-346.
- [17] 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.
- [18] MIYATA K, KAKIZAWA Y, NISHIYAMA N, HARADA A, YAMASAKI Y, KOYAMA H, et al. Block catiomer polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 2355-2361.