

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01088

· 论 著 ·

# 聚乙二醇修饰的聚精氨酸基因载体的构建及其体外评价

台宗光<sup>1,2</sup>, 孙霖<sup>2</sup>, 朱全刚<sup>1</sup>, 张玮<sup>1,3</sup>, 王晓宇<sup>1</sup>, 戴子渊<sup>1</sup>, 张丽娟<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. 解放军 92330 部队医院, 青岛 266102
- 3. 解放军 522 医院药材科, 洛阳 471003

**[摘要]** **目的** 利用聚乙二醇(PEG)修饰非病毒基因载体聚精氨酸(PLR), 考察 PEG 修饰对 PLR 的细胞毒性和 PLR 介导的 RNA 干扰效率的影响。**方法** 利用<sup>1</sup>HNMR 鉴定合成的 PLR-PEG 的结构, 确定 PEG 的修饰度, 利用凝胶电泳表征载体对 siRNA 的包裹能力, 在前列腺癌干细胞模型细胞(RC-92a/hTERT)上考察 PLR-PEG 的细胞毒性, 考察 PLR-PEG/siRNA 复合物的细胞摄取及相关基因的干扰效率。**结果** 通过结构鉴定确定 PLR-PEG 合成成功; 细胞毒性实验表明 PEG 修饰可以降低 PLR 的毒性; PEG 修饰会降低 PLR/siRNA 复合物的细胞摄取, 高 N/P 时对细胞摄取的影响不大; PEG 修饰也会降低 PLR 介导的 RNA 干扰效率, 但 PEG 修饰度在一定范围内对干扰效率的影响比较小。**结论** PEG 修饰的 PLR 作为基因载体在前列腺癌干细胞的基因治疗中有一定的应用前景。

**[关键词]** 聚精氨酸; 聚乙二醇; 基因载体; 细胞毒性; 基因干扰效率; 前列腺癌干细胞

**[中图分类号]** R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)10-1088-06

## Preparation of polyethylene glycol-modified polyarginine for gene delivery and *in vitro* evaluation

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

- 1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 2. Hospital of No. 92330 Troop of PLA, Qingdao 266102, Shandong, China
- 3. Department of Pharmacy, No. 522 Hospital of PLA, Luoyang 471003, Henan, China

**[Abstract]** **Objective** To modify polyarginine (PLR) with polyethylene glycol (PEG) and to observe the effect of PEG modification on PLR cytotoxicity and efficiency of PLR-mediated RNA interference. **Methods** <sup>1</sup>HNMR was used to characterize PLR-PEG and gel electrophoresis was adopted to determine the siRNA-packing capacity of PLR-PEG. The cytotoxicity of PLR-PEG, cellular uptake and RNA interference efficiency of PLR-PEG/siRNA complexes were investigated using prostate cancer stem-like cells(RC-92a/hTERT). **Results** <sup>1</sup>HNMR results showed the successful synthesis of PLR-PEG. It was found that PEG modification decreased cytotoxicity of PLR and reduced cellular uptake of PLR/siRNA complexes, but the reduction of cellular uptake was limited when N/P was high. The modification also inhibited the efficiency of PLR-mediated RNA interference, but the influence of PEG modification was not notable within a certain range. **Conclusion** PEG-modified PLR may be a promising vector for gene therapy targeting prostate cancer stem cells.

**[Key words]** polyarginine; polyethylene glycol; gene delivery vector; cytotoxicity; gene interference efficiency; prostate cancer stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10):1088-1093]

基因治疗是一种非常有前景的治疗方式, 其研究已经深入到遗传性疾病、肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病等各个疾病领域<sup>[1]</sup>。基因治疗主要是通过

基因载体将基因片段导入到特定细胞中而实现的, 基因载体可分为病毒类基因载体和非病毒类基因载体两大类, 前者由于带有病毒的一些特性, 容易引起

**[收稿日期]** 2014-02-20 **[接受日期]** 2014-08-30

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81272819, 81172514, 81101658). Supported by National Natural Science Foundation of China(81272819, 81172514, 81101658).

**[作者简介]** 台宗光, 硕士生. E-mail: taizongguang@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162697, E-mail: ggss99@126.com

一些不良反应,限制了其临床应用,因此近年来研究者主要将重点集中在非病毒基因载体的研究上<sup>[2]</sup>。在众多的非病毒基因载体材料中,虽然部分材料获得了较高的基因转染效率,但是这些材料并不能完全解决免疫原性、生物相容性及体内降解性等难题<sup>[3]</sup>。为了彻底解决非病毒基因载体的上述问题,最好能采用人体自身含有的成分,使材料能够接近人体的组成,从这一思路出发,氨基酸均聚与共聚材料可以是潜在的理想基因载体。精氨酸是人体必需氨基酸,天然存在的精氨酸均为 L 型,有一个胍基和氨基,在生理条件下带正电荷,大量存在于细胞膜穿透肽(MPPs)中,并且被证实是细胞膜穿透肽中发挥穿膜作用的一种氨基酸<sup>[4]</sup>。蛋白转导区域(PTDs)和人类免疫缺陷病毒(HIV)的 Tat 蛋白中也富含精氨酸,前者是能够进入细胞的阳离子肽,后者是协助 HIV 病毒进入人体细胞的一种蛋白<sup>[5-6]</sup>。聚精氨酸(PLR)由多个精氨酸上的氨基和羧基脱水聚合形成,在中性水溶液中带正电荷,能够与带负电的基因片段以静电力结合,形成的纳米级复合物能够被细胞摄取,因此聚精氨酸是一种能够跨膜转运基因片段的多肽。PLR 容易制备,有很好的生物相容性,基因转染效率较高,易于降解,降解产物为精氨酸,可以被人体利用,但 PLR 具有比较大的细胞毒性,限制了其作为基因载体的广泛应用。

目前国内非病毒基因载体的研究多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研究和应用处于起步阶段,而利用 PLR 作为可生物降解的基因载体用于肿瘤干细胞的基因治疗研究尚属空白。聚乙二醇(PEG)是一种无毒性、无刺激性的聚合物,具有良好的亲水性,与阳离子聚合物连接后,可以增加后者在血浆中的稳定性,降低其毒性和免疫原性,还可以减少阳离子聚合物被网状内皮系统(RES)清除,延长后者在血液循环中的滞留时间<sup>[7]</sup>。本实验通过在 PLR 上修饰 PEG 的方式降低了前者的细胞毒性,选择前列腺癌干细胞模型细胞系(RC-92a/hTERT)作为实验对象,探讨了 PEG 修饰对 PLR 介导的 RNA 干扰效率的影响,为广泛应用 PEG 修饰的 PLR 作为基因载体进行研究奠定了基础,也为下一步针对前列腺癌干细胞的基因治疗研究提供了依据。

## 1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂 Mercury Plus 600 MHz 超导核磁共振波谱仪(Varian 公司,美国); Zeta sizer ZS90 电位粒径分析仪(Malvern 公司,英国);全自动酶标仪(Thermo 公司,美国); FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司,美国); 直线型聚精氨酸(PLR, 相对分子质量 7 500, Sigma-Aldrich, 美国); 琥珀酰亚胺(NHS)功能化聚乙二醇(NHS-PEG, 相对分子质量 2 000, 嘉兴博美生物技术有限公司, 中国); 胎牛血清(FBS, Gibco 公司, 美国); DMEM 培养基(Gibco 公司, 美国); FAM-siRNA oligo(上海吉玛制药技术有限公司, 中国); CCK-8 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司, 中国); RC-92a/hTERT 细胞系(上海抚生生物技术有限公司, 中国)。

1.2 细胞培养 RC-92a/hTERT 是 Miki 等将人端粒酶反转录酶(hTERT)片段的真核表达质粒通过反转录病毒载体(LXSN)导入到原代培养的前列腺癌 RC-92a 细胞中而构建的具有前列腺癌干细胞特性的细胞系, RC-92a/hTERT 细胞在体外增殖侵袭、小鼠致瘤能力以及细胞内基因和蛋白的表达上都与前列腺癌干细胞接近<sup>[8]</sup>, 因此作为模型细胞来研究前列腺癌干细胞具有很强的说服力<sup>[9]</sup>。细胞培养方法参照文献<sup>[10]</sup>进行, 具体如下: 将 RC-92a/hTERT 细胞株置于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 每 2 d 换液 1 次, 每 4 d 消化传代 1 次, 当细胞生长达到 50%~80% 融合状态时, 可用于实验。

1.3 聚精氨酸-聚乙二醇(PLR-PEG)的合成 精密称取一定量 PLR, 溶解于 50 mmol/L 四硼酸钠缓冲液(pH 8.5)中, 用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤至无菌容器中, 然后一边搅拌一边缓慢加入一定量 NHS-PEG(相对分子质量 2 000), 使 NHS-PEG 与 PLR 反应的摩尔比为 1:1, 室温避光反应 24 h, 利用透析袋(截留相对分子质量为 3 500)在蒸馏水中透析 48 h, 间隔 24 h 换液 1 次, 透析后的溶液利用冻干机冻干(-50℃, 20 Pa, 48 h), 最终得到 1:1 修饰的 PLR-PEG, 产物用<sup>1</sup>H NMR 鉴定。不同 PEG 修饰度(1:3、1:5)的 PLR-PEG 合成过程同上。

1.4 PLR-PEG 的结构鉴定 将 1.3 项下合成的产物各称量 5 mg, 溶于 0.5 mL 重水, 转移至核磁管中进行 600 MHz 核磁共振波谱分析。

1.5 PLR-PEG/siRNA 复合物的制备及粒径和 Zeta 电位测定 取 siRNA 3  $\mu\text{g}$ , 分别与不同 PEG 修饰度的 PLR-PEG 溶液按照氮磷比(N/P)为 5、10、20、40 漩涡混合 30 s, 室温孵育 1 h, 即制得 PLR-PEG/siRNA 复合物, 复合物稀释成 1 mL, 通过电位粒径分析仪对复合物的粒径和 Zeta 电位进行测定, 测定条件为室温、固定角  $90^\circ$ , 每组复合物各重复测定 3 次。

1.6 PLR-PEG 的细胞毒性考察 将 RC-92a/hTERT 细胞按照 4 000/孔接种于 96 孔板,  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  继续培养 24 h, 吸去细胞培养液, 加入含不同浓度 PLR-PEG(0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的培养液, 继续培养 24 h 后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  孵育 3 h 显色, 用酶标仪测定各细胞孔在 450 nm 处的光密度(D)。以无细胞生长的培养孔为空白对照, 未加入 PLR-PEG 的细胞孔为阴性对照, 计算细胞存活率: 细胞存活率(%) =  $(D_{\text{样品}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{阴性}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.7 PLR-PEG 对 siRNA 的包裹能力测定 取 siRNA 1  $\mu\text{g}$ , 分别与不同 PEG 修饰度的 PLR-PEG 溶液 30  $\mu\text{L}$ , 按照 N/P 为 0.5、1、2、3、5、10、20 混合, 室温孵育 1 h, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 30 min(100 V, 50 A), 溴化乙啶染色后利用紫外透射仪观察并拍照。

1.8 PLR-PEG/siRNA 复合物的细胞摄取效率考察 将前列腺癌细胞 RC-92a/hTERT 按照每孔  $2 \times 10^5$  个的密度接种于 6 孔培养板中,  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  条件下培养 24 h, 给药前更换为无血清培养液, 每孔含 2 mL 培养液。取带荧光标记的 FAM-siRNA 2  $\mu\text{g}$ , 分别与不同 PEG 修饰度的 PLR-PEG 溶液按照 N/P 为 5、10、20 混合均匀, 用 PBS 稀释至 50  $\mu\text{L}$ , 室温避光孵育 1 h, 配制成 PLR-PEG/siRNA 复合物溶液, 将上述溶液分别加入到 6 孔培养板中, 避光培养 4 h, 胰酶消化收集细胞, 利用流式细胞仪定量检测成功摄取 FAM-siRNA 的细胞比例。

1.9 PLR-PEG/siBcl-2 复合物的体外干扰效率测定 将前列腺癌细胞 RC-92a/hTERT 按照每孔  $1 \times 10^5$  个的密度接种于 6 孔培养板中,  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  条件下培养 24 h, 给药前更换为每孔 2 mL 无血清培养液。取对 Bcl-2 基因表达有干扰作用的 siBcl-2 小干扰 RNA 4  $\mu\text{g}$ , 分别与不同 PEG 修饰度的 PLR-PEG 溶液按照 N/P 为 10 混合均匀, 用 PBS 稀释至 50  $\mu\text{L}$ , 室温孵育 1 h, 之后加入到 6 孔培养板的各孔中,

孵育 4 h 后, 每孔更换为 2 mL 完全培养液, 于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  条件下继续培养 24 h, 以 GAPDH 蛋白为内参照, 采用蛋白质印迹法测定 Bcl-2 蛋白的表达。

## 2 结果

2.1 PLR-PEG 的结构鉴定 由于 NHS-PEG 上的 NHS 基团可以与 PLR 表面的氨基连接, 并且该反应完全, 接近 100%, 因此根据反应投料的比例不同, 可以得到不同 PEG 修饰度的 PLR。通过  $^1\text{H}$ NMR 分析鉴定, NHS-PEG 与 PLR 完全反应, 成功合成了 PLR-PEG。化学位移为 4.7 左右的峰为  $\text{D}_2\text{O}$  溶剂峰, 峰 1、2、3、4 是 PLR 的骨架峰(图 1A、1B); 化学位移为 3.6 左右的峰 5 为 PEG 的亚甲基特征吸收峰(图 1B), 从峰面积比可以得出, PEG 的修饰度与反应的投料比一致, 分别合成了 PEG 修饰比例为 1、3、5 的 PLR-PEG (PLR-PEG1, 3, 5)。

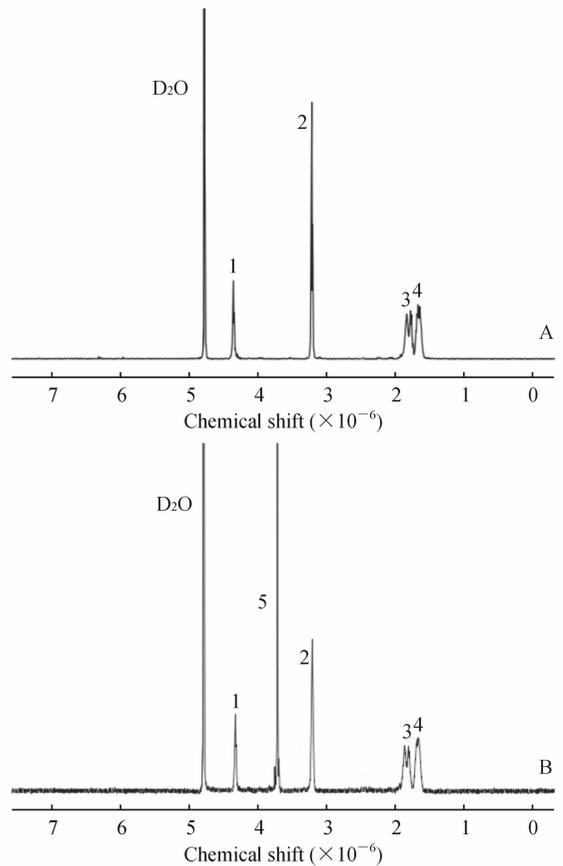


图 1 PLR(A)和 PLR-PEG1(B)的 $^1\text{H}$ NMR 谱图

Fig 1  $^1\text{H}$ NMR spectrograms of PLR(A) and PLR-PEG1(B) The signal 1-4 are attributed to protons of PLR; the signal 5 are due to protons of PEG. PLR: Polyarginine; PEG: Polyethylene glycol; PLR-PEG1: PEG modified PLR with PLR : PEG=1 : 1

2.2 PLR-PEG/siRNA 复合物的粒径和 Zeta 电位 PLR-PEG/siRNA 复合物的粒径在 80 ~ 400 nm 之间, 并且随着 N/P 的增大而降低(图 2B); Zeta 电位随着 N/P 比增大而增加(图 2A), 说明随着 N/P 的增大, 载体所带电荷增加, 使得 PLR-PEG/siRNA 复合物颗粒包裹得更加紧密; 同时随着 PEG 修饰度的增加, PLR-PEG/siRNA 的粒径增加, Zeta 电位降低, 说明 PEG 屏蔽了 PLR 表面的部分正电荷, 而 PLR 的包裹能力与其表面的正电荷有关, PEG 也降低了 PLR 对 siRNA 的包裹能力。

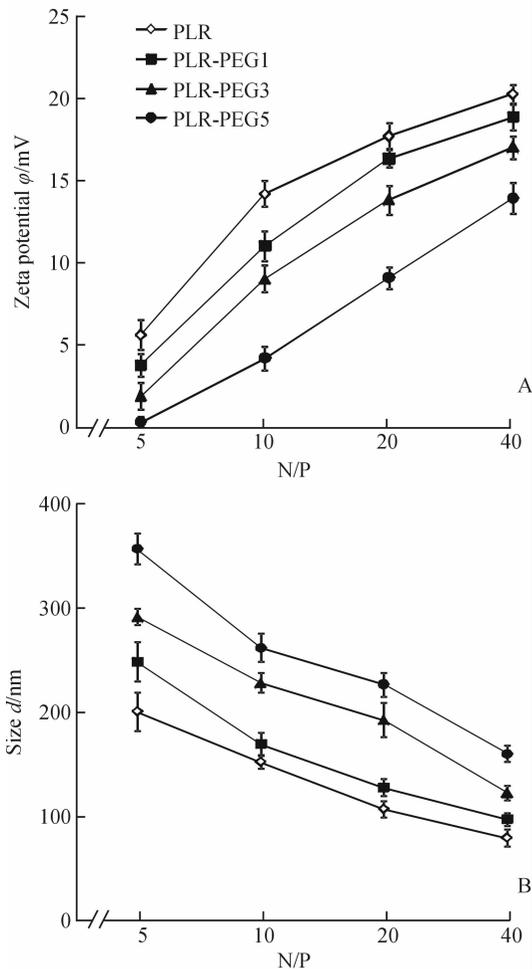


图 2 PLR-PEG/siRNA 复合物的 Zeta 电位和粒径测定结果  
Fig 2 Zeta potential and particle size of PLR-PEG/siRNA complex  
A: Zeta potential of various PLR-PEG/siRNA complexes at different N/P ratios; B: Particle size of various PLR-PEG/siRNA complexes at different N/P ratios. PLR: Polyarginine; PEG: Polyethylene glycol; PLR-PEG 1, 3, 5: PEG modified PLR with PLR : PEG = 1 : 1, 1 : 3 and 1 : 5, respectively.  $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 PLR-PEG 的细胞毒性 阳离子聚合物基因载

体的细胞毒性与载体表面的正电荷有关, 降低表面的正电荷可以降低载体的细胞毒性。从图 3 可以看出, 随着 PEG 修饰度的增加, PLR-PEG 对 RC-92a/hTERT 细胞的毒性下降, 未经 PEG 修饰的 PLR 的  $IC_{50}$  为 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时只有不到 10% 的细胞能够存活, 说明 PLR 的细胞毒性较大, 不适合直接作为基因载体应用。而经 PEG 修饰后, PEG 屏蔽了 PLR 表面的部分正电荷, 增加了 PLR 的亲水性能, 因此明显降低了其细胞毒性, 每分子 5 个 PEG 修饰的 PLR-PEG5 的  $IC_{50}$  值 > 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时仍有 70% 的细胞存活, 与相同浓度 PLR 只有 5.5% 的细胞存活率相比, 有了极大的改善。PLR-PEG5 达到了基因载体在细胞毒性方面的要求。

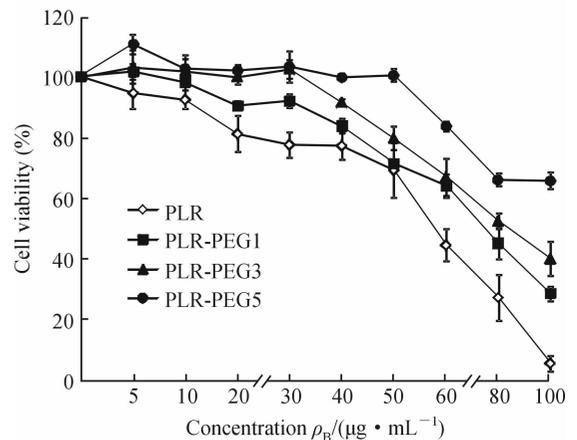


图 3 不同修饰度的 PLR-PEG 对 RC-92a/hTERT 细胞的毒性  
Fig 3 Cytotoxicity of PLR-PEG of different modification degrees on RC-92a/hTERT cells

PLR: Polyarginine; PEG: Polyethylene glycol; PLR-PEG 1, 3, 5: PEG modified PLR with PLR : PEG = 1 : 1, 1 : 3 and 1 : 5, respectively.  $n=3, \bar{x} \pm s$

2.4 PLR-PEG 对 siRNA 的包裹能力 由于 PLR-PEG 表面带正电, siRNA 表面带负电, 两者在溶液中通过静电作用缩合成团状的纳米结构, 从而滞留在凝胶上的点样孔内, 而未完全压缩的 siRNA 仍能随着电场的作用, 由负极向正极在凝胶上移动, 在紫外光照射下会显现出明亮的 siRNA 条带。PLR/siRNA 复合物的凝胶电泳结果见图 4, 最左侧条带为裸 siRNA 在琼脂糖凝胶上出现典型的 siRNA 条带, 泳道从左向右, 随着 N/P 的增加, PLR-PEG 包裹住的 siRNA 越多, siRNA 在泳道中出现的越少, 滞留在点样孔的越多。可以发现, 随着 PEG 修饰度的增加, PLR-PEG 对 siRNA 的包裹能力也在下降。PLR 在 N/P 为 2 时可以完全包裹住 siRNA

(图 4A), 而 PLR-PEG5 完全包裹住 siRNA 的 N/P 则增加到了 5(图 4D)。

2.5 PLR-PEG/siRNA 复合物的细胞摄取效率 从图 5 可以看出, 随着 N/P 的增加, RC-92a/hTERT 细胞对 PLR-PEG/FAM-siRNA 复合物的摄取效率也随之增加, 流式细胞仪检测带有荧光的细胞比例增加, 这是由于 N/P 增加后, PLR-PEG/FAM-siRNA 复合物结合的更加紧密, 复合物表面的阳离子增多, 而细胞膜带负电荷, PLR-PEG/siRNA 复合物更容易与细胞膜表面结合。还可以看出, 随着 PEG 修饰度的增加, PLR-PEG/FAM-siRNA 复合物的细胞摄取效率呈下降趋势, 在 N/P 为 5 时, PEG 修饰后细胞摄取效率下降很明显, 在 N/P 为 10 和 20 时, PEG 修饰对复合物的细胞摄取效率影响不大。未经修饰的 PLR 的基因递送入胞效率最高, 在 N/P 为 20 时, 细胞荧光阳性率最高可以达到 97.87%, PEG 修饰度为 5 的 PLR-PEG5 基因递送入胞效率最低, 在 N/P 为 5 时, 由于无法完全包裹住 siRNA, PLR-PEG5/siRNA 复合物的细胞摄取效率最低只有 35.86%。

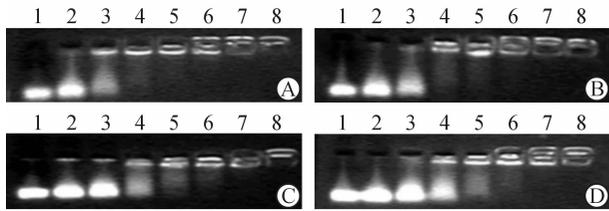


图 4 琼脂糖凝胶电泳检测

不同 PEG 修饰度的 PLR 对 siRNA 的包裹能力

Fig 4 siRNA condensation ability of PLR-PEG of different modification degrees

A: PLR; B: PLR-PEG1; C: PLR-PEG3; D: PLR-PEG5. 1: Naked siRNA; 2-8: N/P ratio is 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, respectively. PLR: Polyargine; PEG: Polyethylene glycol; PLR-PEG 1,3,5: PEG modified PLR with PLR : PEG=1 : 1, 1 : 3 and 1 : 5, respectively

2.6 PLR-PEG/siBcl-2 复合物的体外基因干扰效率 不同修饰度的 PLR-PEG/siBcl-2 纳米复合物分别与前列腺癌细胞 RC-92a/hTERT 作用 24 h 后, 对 Bcl-2 蛋白的表达均产生了干扰作用(图 6), 可以看出随着 PEG 修饰度的增加, PLR-PEG/siBcl-2 纳米复合物对蛋白合成的干扰作用呈减弱趋势, PLR-PEG1 和 PLR-PEG3 与 siRNA 形成的纳米复合物对 Bcl-2 表达的干扰作用与未经修饰的 PLR 相差不

大, 而 PLR-PEG5/siBcl-2 纳米复合物的干扰作用与 PLR 相比差距较大, 与阴性对照组 (PLR/NC-siRNA 复合物) 相比差距已经不明显。

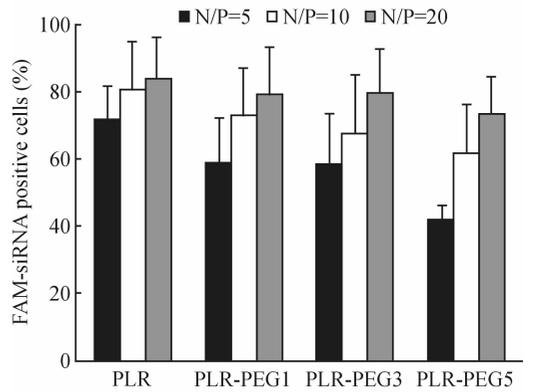


图 5 PLR-PEG/siRNA 复合物的细胞摄取效率

Fig 5 Cellular uptake efficiency of PLR-PEG/siRNA complex in different groups

PLR: Polyargine; PEG: Polyethylene glycol; PLR-PEG 1, 3, 5: PEG modified PLR with PLR : PEG=1 : 1, 1 : 3 and 1 : 5, respectively. n=3, x±s

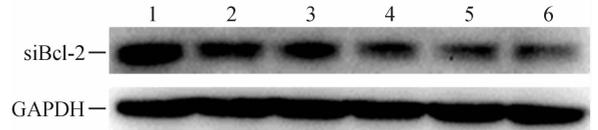


图 6 PLR-PEG/siBcl-2 复合物对 Bcl-2 表达的干扰作用

Fig 6 Interference of Bcl-2 by PLR-PEG/siBcl-2 complex

1: Untreated; 2: PLR/NC-siRNA; 3: PLR-PEG5/siBcl-2; 4: PLR-PEG3/siBcl-2; 5: PLR-PEG1/siBcl-2; 6: PLR/siBcl-2. PLR: Polyargine; PEG: Polyethylene glycol; PLR-PEG 1,3,5: PEG modified PLR with PLR : PEG=1 : 1, 1 : 3 and 1 : 5, respectively

### 3 讨论

前列腺癌的发病率不断上升, 目前已成为危害男性健康的主要肿瘤之一。前列腺癌干细胞是前列腺癌组织中少数具有无限增殖潜能的细胞, 驱动肿瘤的形成和生长, 目前已在研究中得到证实<sup>[11]</sup>。虽然前列腺癌干细胞在癌细胞中只占极少数, 但它极有可能是前列腺癌出现耐药、复发及转移等现象的根源<sup>[12]</sup>。因此, 针对前列腺癌干细胞的治疗研究有着重要的临床意义, 是治疗前列腺癌的新思路和新策略<sup>[13]</sup>。本研究利用 PEG 对可降解载体 PLR 进行改造, 在具有前列腺癌干细胞特性的 RC-92a/hTERT 细胞上, 对改造后的 PLR-PEG 载体进行了一系列评价。PLR-PEG/siRNA 复合物的粒

径根据 N/P 的不同在 80~400 nm 之间变化, PEG 修饰增大了 PLR 与 siRNA 所形成复合物的粒径, 其粒径范围仍符合载体/基因复合物在体内应用的要求; PLR-PEG/siRNA 复合物在溶液中的 Zeta 电位为正值, 因此可以有效地被细胞摄取, PEG 的修饰降低了复合物的 Zeta 电位。在 PLR 分子上引入 PEG 基因可以明显降低 PLR 的细胞毒性, 使其达到作为基因载体材料的要求, 原因可能是 PEG 可以屏蔽 PLR 的部分正电荷, 减少 PLR 与细胞膜表面的相互作用。由于 PLR 与 siRNA 之间主要通过静电力结合, PEG 修饰在降低 PLR 毒性的同时也降低了 PLR 对 siRNA 的包裹能力, PLR-PEG/siRNA 复合物表面正电荷的减弱也使得细胞摄取效率有所降低, 但在高 N/P 时依然能保持较高的细胞摄取率。在基因干扰效率方面, 随着 PEG 修饰度的增加, PLR-PEG/siBcl-2 复合物对 *Bcl-2* 基因表达的干扰效率呈下降趋势, 产生这种趋势的原因一方面是随着 PEG 修饰度的增加, 细胞对 PLR-PEG/siRNA 复合物的摄取效率下降, 导致进入细胞内的 siBcl-2 有所减少, 另一方面由于 PEG 的亲水作用, 致使 PLR-PEG/siBcl-2 复合物的内涵体逃逸能力有所减弱, 进入细胞质内的 siBcl-2 也有所减少, 而 siBcl-2 需要随载体从内涵体逃逸出来进入细胞质后才能发挥干扰作用。当修饰每分子 PLR 的 PEG 数目不超过 3 个时, 对 PLR-PEG/siRNA 复合物的基因干扰效率影响比较小。综合上述实验结果, PEG 修饰 PLR 可以降低后者的细胞毒性, 同时保持 PLR/siRNA 复合物在前列腺癌干细胞模型细胞中较高的基因干扰效率, 我们认为 PEG 修饰度为 3 的 PLR-PEG3 是本研究中最合适的基因载体。

在细胞凋亡过程中, *Bcl-2* 基因的表达起着至关重要的作用<sup>[14]</sup>, *Bcl-2* 的过表达还与肿瘤耐药有关<sup>[15]</sup>, 目前已有一些针对前列腺癌细胞 *Bcl-2* 基因的治疗研究<sup>[16]</sup>。本研究中的 PLR-PEG/siBcl-2 复合物明显减少了 RC-92a/hTERT 细胞中 *Bcl-2* 蛋白的表达, 显示出了 PLR-PEG 载体在前列腺癌干细胞基因治疗中的潜力。

#### 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] Kaufmann K B, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5: 1642-1661.

[2] Rogers M L, Rush R A. Non-viral gene therapy for neurological diseases, with an emphasis on targeted gene delivery

[J]. *J Contr Rel*, 2012, 157: 183-189.

- [3] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 329-347.
- [4] He C X, Tabata Y, Gao J Q. Non-viral gene delivery carrier and its three-dimensional transfection system [J]. *Int J Pharm*, 2010, 386(1-2): 232-242.
- [5] Lundberg M, Wikström S, Johansson M. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains [J]. *Mol Ther*, 2003, 8: 143-150.
- [6] Torchilin V P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(4-5): 548-558.
- [7] Sato A, Choi S W, Hirai M, Yamayoshi A, Moriyama R, Yamano T, et al. Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long circulatory half-life [J]. *J Contr Rel*, 2007, 122: 209-216.
- [8] Gu Y, Li H, Miki J, Kim K H, Furusato B, Sesterhenn I A, et al. Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312: 831-843.
- [9] Miki J, Rhim J S. Prostate cell cultures as *in vitro* models for the study of normal stem cells and cancer stem cells [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2008, 11: 32-39.
- [10] Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 3153-3161.
- [11] Tu S M, Lin S H. Prostate cancer stem cells [J]. *Clin Ggnetourin Cancer*, 2012, 10: 69-76.
- [12] Sun Y, Gao W Q. Human prostate cancer stem cells: new features unveiled [J]. *Asian J Androl*, 2011, 13: 355-356.
- [13] Zhou Y, Yang J, Kopeček J. Selective inhibitory effect of HP-MA copolymer-cycloamine conjugate on prostate cancer stem cells [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 1863-1872.
- [14] Raffo A J, Perlman H, Chen M W, Day M L, Streitman J S, Buttyan R. Overexpression of *bcl-2* protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 4438-4445.
- [15] Calastretti A, Gatti G, Quaresmini C, Bevilacqua A. Downmodulation of *bcl-2* sensitizes PTEN-mutated prostate cancer cells to starvation and taxanes [J]. *Prostate*, 2014, 74: 1411-1422.
- [16] Karnak D, Xu L. Chemosensitization of prostate cancer by modulating *bcl-2* family proteins [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11: 699-707.