

糖原作为新型基因载体的研究

邓淑豪, 赖莉, 王志清, 张慧杰*, 陈敬华

(江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为探索功能化糖原作为基因载体的可行性和有效性, 利用二乙烯三胺修饰糖原合成了氨基化的糖原衍生物($\text{NH}_2\text{-Gly}$), 利用红外光谱对其结构进行了表征; 采用凝胶电泳阻滞实验考察了 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 对 pEGFP 的负载能力和保护能力; 通过 MTT 和溶血实验考察了 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的生物相容性; 利用激光共聚焦显微镜和流式细胞术分析了 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 在 NIH 3T3 细胞内的转染效果。结果表明, 制备的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 为均匀分散的纳米粒子, 粒径约为 80 nm, 带有显著的正电荷。与相对分子质量为 25 000 的聚乙烯亚胺 (PEI 25k) 相比, $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 具有良好的生物相容性。 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 可有效络合 pEGFP 并保护其免受核酸酶的降解, 且大幅提高了 pEGFP 在 NIH 3T3 细胞中的转染效率, 几乎与 PEI 25k 相当。因此, 糖原有望作为安全高效的基因载体。

关键词: 糖原; 基因载体; 转染

中图分类号: R 944.9 文章编号: 1673-1689(2022)05-0038-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.05.005

Glycogen as Novel Gene Vector

DENG Shuhao, LAI Li, WANG Zhiqing, ZHANG Huijie*, CHEN Jinghua

(School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study aims to explore the feasibility and effectiveness of functionalized glycogen as a gene vector. Aminated glycogen ($\text{NH}_2\text{-Gly}$) was synthesized through functionalization of glycogen with diethylenetriamine. The structure of $\text{NH}_2\text{-Gly}$ was characterized by infrared spectra. The encapsulation and protection of pEGFP by $\text{NH}_2\text{-Gly}$ was studied by gel retardation assay. The biocompatibility of $\text{NH}_2\text{-Gly}$ was investigated by MTT and hemolysis assay. The transfection efficiency of $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ in NIH 3T3 cells was analyzed by confocal laser scanning microscope and flow cytometry. The results showed that the prepared $\text{NH}_2\text{-Gly}$ was uniformly dispersed with a particle size of about 80 nm and a significant positive charge. Compared with PEI 25 k, $\text{NH}_2\text{-Gly}$ had good biocompatibility. $\text{NH}_2\text{-Gly}$ could effectively encapsulate pEGFP and protect it from degradation by nuclease. $\text{NH}_2\text{-Gly}$ significantly increased the transfection efficiency of pEGFP in NIH 3T3 cells, which was almost equivalent to that of PEI 25 k. Therefore, glycogen is expected to be a safe and efficient gene vector.

Keywords: glycogen, gene vector, transfection

收稿日期: 2021-02-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(21907041)。

*通信作者: 张慧杰(1986—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事纳米医学方面的研究。E-mail: zhj0502@jiangnan.edu.cn

基因治疗是指将外源正常基因导入靶细胞,以修复有缺陷的基因或补偿基因的缺失,从而达到疾病治疗的目的。目前,基因治疗在攻克肿瘤、糖尿病、遗传性疾病和自身免疫性疾病等方面显示出极大的潜力^[1-2]。然而,未经修饰的目的基因不稳定,进入血液循环后极易被核酸酶降解。此外,目的基因在生理环境下一般带负电荷,导致其难以进入靶细胞^[3-4]。这些弊端都极大地影响到基因治疗的效果。因此,构建安全高效的递送载体对于基因治疗至关重要。

常用的基因载体主要分为两大类:病毒载体和非病毒载体^[5]。病毒载体具有较高的基因递送效率。然而,病毒载体制备过程复杂,同时,病毒载体存在免疫原性和潜在的安全性问题,这些因素严重制约了其临床应用^[6-7]。相对而言,非病毒载体制备简单、免疫原性较低,同时载体结构设计丰富多样,可有效提高目的基因的细胞转染效率。非病毒载体主要以阳离子脂质体、阳离子聚合物为代表^[8-11]。PEI 25k是目前研究最为广泛的聚阳离子非病毒载体。尽管PEI 25k可以显著提高目的基因的细胞转染效率,但其自身较高的毒性限制了其发展。近年来,随着纳米生物技术的发展,利用各种纳米材料、纳米结构等构建的基因递送系统受到了越来越多的关注。

糖原是由葡萄糖聚合而成的天然树状大分子多糖,是哺乳动物的贮备多糖,主要存在于哺乳动物的肝脏和骨骼肌中。作为内源性多糖,糖原无毒、无免疫原性。同时,糖原在体内可被淀粉酶和糖苷酶降解为葡萄糖^[12]。糖原是天然的多糖纳米材料,其粒径大小约为20~150 nm^[13-15]。糖原可溶于水,富含官能团,易通过化学修饰引入其他官能团^[4]。糖原具有密集的支链,其树状大分子纳米结构可以实现对药物以及核酸等的高效负载。基于上述优异的性能,糖原在生物医学领域的应用逐渐成为研究热点^[16-17]。

作者利用二乙烯三胺修饰糖原合成了氨基化的糖原衍生物(NH₂-Gly),并对其作为基因载体的可行性和有效性进行了评估。利用动态光散射仪和红外光谱对NH₂-Gly结构进行了表征。采用凝胶电泳实验分析其对pEGFP的负载和保护能力。通过MTT实验和溶血实验考察了NH₂-Gly的生物相容性。最后,利用流式细胞术和激光共聚焦显微镜分析了NH₂-Gly/pEGFP在NIH 3T3细胞内的转染效率。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糖原(glycogen,相对分子质量100 000~110 000):上海源叶生物科技有限公司产品;二乙烯三胺(DETA):上海安耐吉化学有限公司产品;相对分子质量25 000聚乙烯亚胺:美国Sigma-Aldrich公司产品;绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-N1):北京TIANDZ公司产品,在大肠杆菌DH5 α 中大量繁殖,使用质粒抽提试剂盒抽提并纯化;质粒抽提试剂盒:上海生工生物工程股份有限公司产品;DNase酶、质量分数4%多聚甲醛固定液:上海生工生物工程股份有限公司产品;小鼠胚胎成纤维细胞NIH 3T3:来自中国科学院上海细胞库;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、胰蛋白酶:碧云天生物技术公司产品;DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培养基、胎牛血清:美国Gibco公司产品;TAE缓冲液:武汉博士德生物公司产品;所需其他化学试剂(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器与设备

Zetasizer Nano ZS动态光散射粒度仪:英国Malvern公司;凝胶成像仪:美国BIO-RAD公司;TENSOR II型红外光谱仪:德国Bruker公司;Aduance III型全数字化核磁共振波谱仪:德国Bruker公司;透射电子显微镜:日本JEOL公司;酶标仪:美国Bio-Rad公司;流式细胞仪:美国Beckman公司;Nanodrop One超微量紫外分光光度计:美国Thermo Fisher公司;高速离心机:德国Eppendorf公司;激光共聚焦显微镜:德国Leica公司。

1.3 研究方法

1.3.1 NH₂-Gly的制备 首先按照质量比为1:1~1:10的比例分别称取相应质量的糖原和羰基二咪唑(CDI)。在惰性气体保护下,投入不同质量比的糖原与CDI,溶解于二甲基亚砜中;低温搅拌1~4 h后,随即加入一定质量的二乙烯三胺,持续反应12~36 h,得到氨基化糖原。随后将上述所得溶液用去离子水透析3~5 d以去除有机溶剂等杂质,透析后将溶液放入冰箱冷冻24 h,然后用冻干机进行干燥,即得到氨基化糖原衍生物(NH₂-Gly)。为测定二乙烯三胺在糖原上的取代程度,对NH₂-Gly进行酸碱滴定。首先用去离子水配制25 mL 1 mg/mL的NH₂-

Gly 样品溶液,然后用酸碱滴定管进行滴定。先用 HCl 溶液(0.1 mol/L)滴定样品溶液至 pH 为 2.0,随即用 NaOH 溶液(0.1 mol/L)滴定混合物,滴加的同时测量其 pH,记录 pH 随滴定体积增加的变化情况,绘制滴定曲线,得到 2 个突变点。取代度根据公式(1)计算:

$$DS = M \times \frac{(X_2 - X_1)}{m} \times c \quad (1)$$

式中:DS 为取代度; M 为二乙烯三胺的相对分子质量; c 为 NaOH 溶液的浓度, mol/L; m 为 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的质量, g; X_1 为第一个突变点的横坐标, mL; X_2 为第二个突变点的横坐标, mL。

1.3.2 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的 pH 缓冲能力测定 采用酸碱滴定法测定不同氨基化程度的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的 pH 缓冲能力及对照组 PEI 25k 在 pH 2~11 范围内的缓冲能力。样品溶液浓度为 0.5 mg/mL,溶剂为 NaCl 溶液(0.1 mol/L),先用 NaOH 溶液(0.1 mol/L)滴定样品溶液 pH 至 11 左右,然后将 HCl 溶液(0.1 mol/L)连续滴入溶液中并充分混匀,记录 pH 的变化。

1.3.3 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的溶血性实验 研究不同质量浓度 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的溶血性。取 1 mL 小鼠血液于 8 000 r/min 下离心 10 min 以分离红细胞,用 pH 7.4 的 PBS 洗涤 5 次至上清液澄清,用 PBS 稀释重悬红细胞。称取一定量 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 样品,并向不同样品中分别加入 200 μL 红细胞悬液,其中 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 样品溶液取 800 μL (12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g/mL}$)。另外,分别采用 800 μL PBS 和水作为对照, PBS 作为阴性对照(0%溶血),水作为阳性对照(100%溶血)。样品放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中孵育 4 h 后取出,2 000 r/min 离心 10 min,吸取 100 μL 上清液加入 96 孔板中,用酶标仪检测 540 nm 处吸光度。溶血率根据公式(2)计算:

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{A - A_0}{A_{100} - A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A 为聚合物与血红蛋白形成溶液的吸光度; A_0 为阴性对照溶液吸光度; A_{100} 为阳性对照溶液的吸光度。

1.3.4 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 复合物的制备 取一定质量的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 加入 PBS 中,搅拌使其充分溶解,得到相应质量浓度的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 溶液。随即按 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 与 pEGFP 的质量比(1:1、2:1、5:1、10:1、20:1)分别加入一定质量的 pEGFP 溶液,充分振荡混匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$

保存。取样品溶液 1 mL,采用动态光散射粒度仪测定 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 纳米粒子的粒径和表面电荷,测定温度均为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.5 琼脂糖凝胶电泳阻滞实验 按 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 与 pEGFP 的质量比(1:1、2:1、5:1、10:1、20:1)制备成 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 复合物, $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 含 2.5 μg 质粒将所得复合物室温静置孵育 1 h。吸取样品或 pEGFP 溶液 4 μL (1 μg),加入上样缓冲液 2 μL ,混匀。采用质量分数 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析(100 V, 30 min),用凝胶成像系统观察凝胶并拍照,考察 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 对 pEGFP 的负载能力。

1.3.6 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 的抗酶解实验 按 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 与 pEGFP 质量比为 5:1 和 10:1 制备 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 复合物,复合物含 5 μg 质粒。将所得复合物室温静置孵育 1 h。按照 DNase 说明书进行操作,取 5 μL $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 或 pEGFP 溶液进行酶处理 1 h,处理结束后将溶液低速离心,吸取底部溶液进行琼脂糖凝胶电泳,对照组为未使用 DNase 处理的 pEGFP。

1.3.7 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 的细胞相容性评价 采用 MTT 法对 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 及 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 的细胞毒性进行评价。将培养好的 NIH 3T3 细胞稀释至一定倍数,按每孔 1×10^4 个细胞取 100 μL 接种于 96 孔板中,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。细胞贴壁后吸去旧培养基,加入 100 μL 培养基。向 96 孔板中分别加入不同质量浓度的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 、 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 及 PEI,然后将 96 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 或 48 h 后吸出培养基,加入 0.5 mg/mL MTT 的培养基溶液,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 4 h。接着吸出 MTT 的培养基溶液,每孔加入 100 μL DMSO,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上以 100 r/min 避光振摇 10 min,用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度。根据公式(3)计算细胞活力:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0 - A_2} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_0 为聚合物在加入 MTT 反应后形成溶液的吸光度; A_1 为阴性对照溶液的吸光度; A_2 为阳性对照溶液的吸光度。

1.3.8 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 体外转染效率 将培养状态良好的 NIH 3T3 细胞稀释一定倍数,向 12 孔板及共聚焦小皿中接种 1 mL,密度为每孔 1×10^5 个细胞,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。分别

制备不同质量比的 $\text{NH}_2\text{-Gly/pEGFP}$ 复合物和 PEI/pEGFP 复合物,向 12 孔板的每个孔中加入 $50\ \mu\text{L}$ 复合物,补加无血清 DMEM 培养基使每个孔体积达到 $300\ \mu\text{L}$ 。放入 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养,孵育 4 h,转染完毕更换新鲜的含体积分数 10%FBS 的培养基,再继续培养 12、24、48 h。然后处理样品,用 PBS 洗涤 3 次,再用胰酶消化,以 $1\ 000\ \text{r/min}$ 离心收集细胞,加入 PBS 重悬,用流式细胞仪测定转染效率。用 PBS 冲洗 2~3 次,随后将每个培养皿加入 $500\ \mu\text{L}$ 质量分数 4% 的多聚甲醛固定液固定 10 min,再用 PBS 冲洗 2~3 次后保存于 $500\ \mu\text{L}$ PBS 中,采用激光共聚焦显微镜观察细胞转染效果。

1.3.9 统计学处理 统计学处理计数资料以平均值 $\pm$ 标准差表示,运用 SPSS 23.0 进行 t 检验或方差分析。

2 结果与讨论

2.1 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的合成与表征

采用红外光谱分析不同氨基化程度的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 结构。由图 1 可知,制备的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 在 $1\ 699\ \text{cm}^{-1}$ 处的强吸收峰不同于糖原,是酰胺的特征吸收峰,可以归结为 C=O 伸缩振动。此外, $1\ 457\sim 1\ 532\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 263\sim 1\ 291\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别为 —NH— 弯曲振动和 C—N 振动^[6]。此外, $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 在 $1\ 457\sim 1\ 532\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰较糖原明显加强,且随着氨基化程度的提高而增强。这些结果表明,糖原已成功被二乙烯三胺寡氨残基修饰,得到了不同氨基化程度的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 。

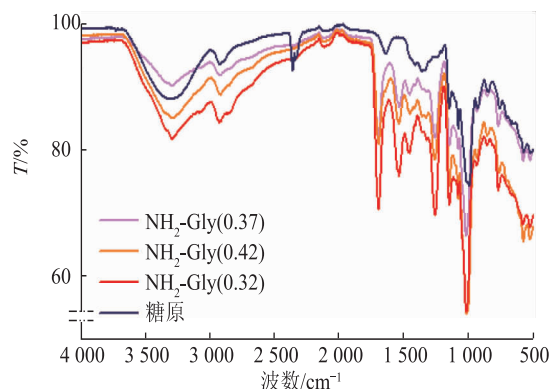


图 1 氨基化糖原红外光谱图

Fig. 1 FTIR spectra of glycogen and $\text{NH}_2\text{-Gly}$

粒径和所带电位很大程度上影响着基因载体的转染效率。采用动态光散射粒度仪测定了 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的粒径和表面电位,结果见表 1。所制备的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的水化粒径范围为 $50\sim 90\ \text{nm}$ 。通过酸碱滴定可计算出不同物料比条件下制备的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的氨基取代度。由表 1 数据可知,氨基取代度随活化剂 CDI 与糖原质量比的增加而增加。反应物料质量比为 2:5:5 所合成的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的氨基取代度最高,可达到 42.6%。同时,在此条件下得到的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 电位最高,达 $37.1\ \text{mV}$ 。据此可判断物料质量比为 2:5:5 是合成 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的较优条件。后续实验中所用到的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 均在此质量比下合成。带有强正电荷的 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 具有较好的对目的基因进行压缩包裹的能力。图 2 为糖原和 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 的透射电镜图,可以看出,糖原和 $\text{NH}_2\text{-Gly}$ 为球形纳米粒子结构,粒径均在 $50\ \text{nm}$ 左右,且粒子分散均匀,几乎无团聚现象。

表 1 糖原和氨基化糖原的粒径、电位、取代度

Table 1 Size, zeta potential and degree of substitution of $\text{NH}_2\text{-Gly}$

样品	物料质量比 $m(\text{Gly}):m(\text{CDI}):m(\text{DETA})$	粒径/nm	电位/mV	取代度/%
糖原	—	58.40 ± 1.47	-1.44 ± 0.33	0
$\text{NH}_2\text{-Gly}$ (0.22)	1:1:1	79.13 ± 3.57	$+12.90\pm 1.01$	22.56
$\text{NH}_2\text{-Gly}$ (0.37)	1:5:5	80.75 ± 6.93	$+28.80\pm 0.52$	37.21
$\text{NH}_2\text{-Gly}$ (0.42)	2:5:5	84.03 ± 5.44	$+37.10\pm 0.14$	42.60
$\text{NH}_2\text{-Gly}$ (0.32)	3:5:5	80.75 ± 2.66	$+30.90\pm 1.63$	32.30
$\text{NH}_2\text{-Gly}$ (0.33)	3:5:10	70.48 ± 8.00	$+32.00\pm 1.49$	33.18

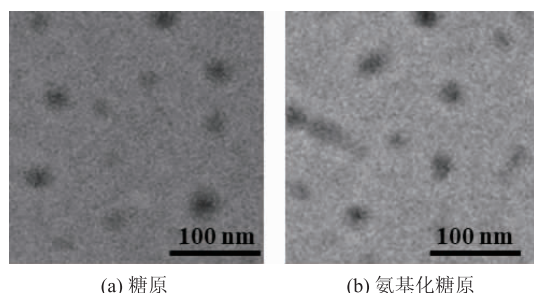


图 2 透射电子显微镜

Fig. 2 Transmission electron microscopy images

2.2 NH₂-Gly 的 pH 缓冲能力

阳离子聚合物的基因转染能力与其缓冲能力密切相关。PEI 具有“质子海绵”效应,表现出较高的缓冲能力。PEI 所具有的“质子海绵”效应能够使内吞小泡溶胀破裂,帮助 PEI/基因复合物逃逸到细胞质中,从而具有较高的基因转染能力。不同氨基化程度的 NH₂-Gly 在 NaCl 水溶液中的缓冲能力见图3。未修饰的糖原在 pH 突变时消耗 HCl (0.1 mol/L) 体积最少,缓冲性能较差,这是由于糖原自身游离的可供反应的基团较少所致。糖原被二乙烯三胺寡氨残基修饰后,pH 突变时消耗 HCl 体积有所增加,缓冲性能得到明显改善。然而,由于 NH₂-Gly 存在相对较少的氨基,其缓冲能力仍低于 PEI 25k。随着

NH₂-Gly 的氨基取代度提高,溶液的酸碱缓冲能力显著增强。NH₂-Gly 有望实现目的基因的有效转染。

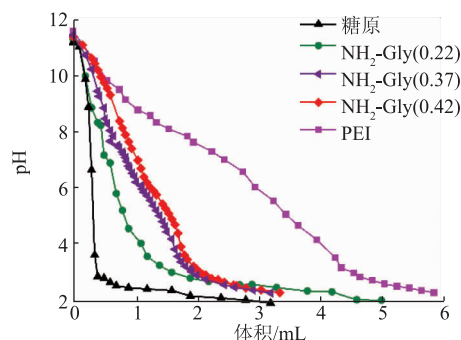


图 3 氨基化糖原和 PEI 25k 的 pH 缓冲能力

Fig. 3 Buffering capacity of NH₂-Gly and PEI 25 k

2.3 NH₂-Gly 的血液相容性评价

将不同质量浓度的 NH₂-Gly 与分离出的红细胞一起孵育后,通过观察不同质量浓度的 NH₂-Gly 的溶血现象,评估 NH₂-Gly 的血液相容性。如图 4 所示,在 NH₂-Gly 质量浓度高达 200 μg/mL 时,NH₂-Gly 的溶血率远远低于阳性对照组的溶血率,未达到阳性对照组的 5%。结果表明,NH₂-Gly 不会对红细胞造成溶胀,NH₂-Gly 具有较好的血液相容性。

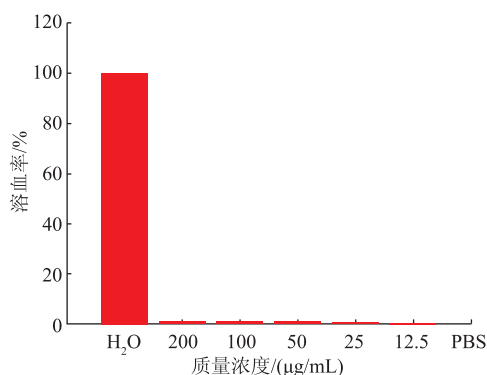
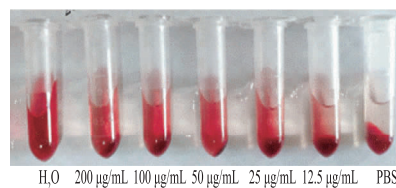


图 4 氨基化糖原的溶血活性评价

Fig. 4 Hemolysis activity of NH₂-Gly

2.4 NH₂-Gly 对 pEGFP 的压缩包载

载体能否对基因进行有效压缩包裹是实现基因递送的首要条件。采用琼脂糖凝胶电泳考察 NH₂-Gly 对目的基因 pEGFP 的压缩包裹能力。图 5 为不同质量比的 NH₂-Gly/pEGFP 复合物的琼脂糖凝胶电泳图。随着 NH₂-Gly/pEGFP 复合物质量比的升高,电场作用下迁移的 pEGFP 越来越少。当 NH₂-

Gly 与 pEGFP 质量比为 2:1 时,泳道中已观察不到迁移的 pEGFP,pEGFP 完全滞留在上样孔内,表明此时 NH₂-Gly 可完全压缩包载 pEGFP。NH₂-Gly 带有较强的正电荷,随着 NH₂-Gly 与 pEGFP 质量比的增加,NH₂-Gly 与 pEGFP 之间的静电相互作用得到增强。此结果表明,该 NH₂-Gly 对 pEGFP 具有较好的压缩包载能力,有望作为新型基因载体。

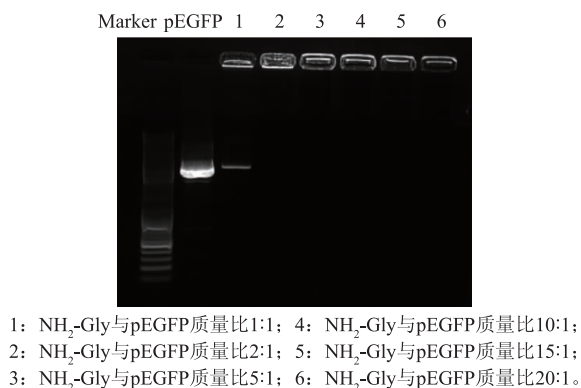


图5 pEGFP和不同质量比NH₂-Gly/pEGFP复合物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis analysis of the pEGFP and NH₂-Gly/pEGFP complex with different weight ratios

2.5 NH₂-Gly/pEGFP复合物的表征

载体/基因复合物的粒径和电位是影响其转染效率的重要因素。研究表明,适度的正电荷和合适的粒径(50~200 nm)有利于载体/基因复合物的细胞摄取和胞内运输^[19-20]。NH₂-Gly带有较强的正电荷,可与pEGFP通过静电作用组装成纳米粒子。表2为不同制备条件下得到的NH₂-Gly/pEGFP复合物的粒径与电位。当NH₂-Gly与pEGFP质量比为1:1时,复合物粒径约为100 nm,电位为负值,说明此条件下NH₂-Gly未能将pEGFP完全包载。这个结果与图5中凝胶电泳结果一致。随着NH₂-Gly比例的增加,NH₂-Gly/pEGFP复合物粒径有所增大并保持相对稳定,多分散系数(PDI)在0.2左右,表明复合物粒径比较均一。同时,NH₂-Gly/pEGFP复合物所带电荷也由负变正并保持稳定。以上结果表明,NH₂-Gly/pEGFP复合物的粒径和电位有利于细胞转染。

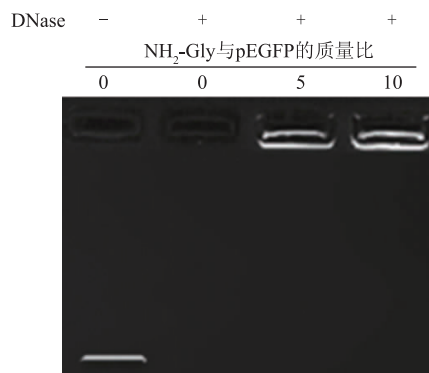
表2 NH₂-Gly/pEGFP的粒径和电位

Table 2 Size and zeta potential of NH₂-Gly/pEGFP complex

NH ₂ -Gly与pEGFP的质量比	粒径/nm	PDI	电位/mV
1:1	100.60±13.52	0.221	-5.23±0.94
2:1	166.30±4.38	0.199	13.80±3.27
5:1	140.70±12.17	0.200	19.80±0.89
10:1	154.40±7.26	0.213	23.20±0.26
15:1	156.70±1.21	0.182	24.10±0.89
20:1	164.10±13.13	0.169	+17.60±2.00

2.6 NH₂-Gly/pEGFP抗核酸酶降解能力

基因在递送过程中易被血清中的核酸酶降解,导致基因治疗的失败。为了验证NH₂-Gly对pEGFP的保护能力,将NH₂-Gly/pEGFP复合物以及pEGFP与DNase共孵育,然后进行琼脂糖凝胶电泳实验。如图6所示,NH₂-Gly/pEGFP复合物的条带清晰,表明其可以保护pEGFP免受核酸酶降解,而游离pEGFP已经被DNase降解,无法看到条带。此结果说明NH₂-Gly对pEGFP的高效包载提高了pEGFP在血清中的稳定性,是一个优良的基因载体。



+表示有核酸酶存在,-表示无核酸酶。

图6 pEGFP和NH₂-Gly/pEGFP复合物的稳定性

Fig. 6 Stability of the pEGFP and NH₂-Gly/pEGFP complex

2.7 NH₂-Gly/pEGFP的细胞毒性

阳离子基因载体的细胞毒性是影响其临床应用的主要障碍之一。选择PEI 25k作为对照,采用MTT法检测了NH₂-Gly和NH₂-Gly/pEGFP对于NIH 3T3细胞的毒性。如图7所示,培养24 h和48 h后,PEI和PEI/pEGFP在较低质量浓度下就已显现出高细胞毒性,细胞存活率低于50%。这主要是由PEI 25k所具有的较高的正电荷密度以及骨架的不可降解性所导致。相反,NH₂-Gly没有抑制NIH 3T3的增殖,表现出良好的生物相容性。这主要归因于糖原较好的生物相容性、生物可降解性以及NH₂-Gly相对较低的电荷密度。NH₂-Gly/pEGFP与细胞培养48 h后没有表现出明显毒性现象,质量浓度为30 μg/mL时相对细胞存活率为108%,50 μg/mL时相对细胞存活率为100%,100 μg/mL时存活率仍超过90%。因此,NH₂-Gly细胞毒性较低,具有较好的安全性,有望作为新型基因载体。

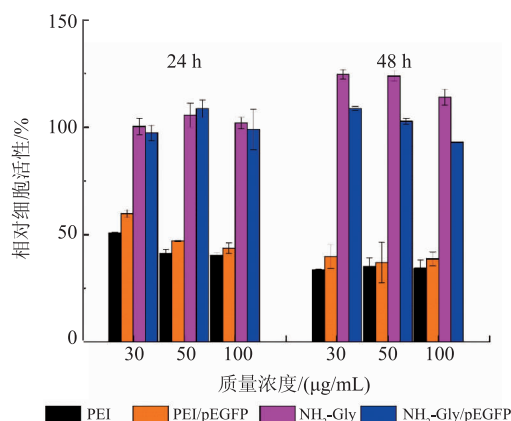


图7 NH₂-Gly 和 NH₂-Gly/pEGFP 对 NIH 3T3 细胞的毒性
Fig. 7 Cytotoxicity of NH₂-Gly and NH₂-Gly/pEGFP complex to NIH 3T3 cells

2.8 NH₂-Gly/pEGFP 体外转染效率

基因复合物能否被细胞摄取很大程度上影响着基因治疗的效果。首先利用共聚焦显微镜观察了 NH₂-Gly/pEGFP 在 NIH 3T3 细胞内的转染情况。如图 8 所示, 转染 48 h 后, NIH 3T3 细胞的细胞质和细胞核中均可见表达的 GFP 的绿色荧光, 且 GFP 荧光强度随着 NH₂-Gly 与 pEGFP 质量比的增加而增加, 说明 NH₂-Gly/pEGFP 在 NIH 3T3 细胞中的转染效果明显。其中, 质量比 10:1 时, 复合物转染的 NIH 3T3 细胞的 GFP 荧光强度最强, 细胞形态正常且生长状态好。NH₂-Gly 的转染效果与 PEI 25k 相当。而 PEI/pEGFP 复合物转染的细胞生长状态欠佳, 细胞少而分散且形态呈圆形, 细胞生长状态较差, 绿色荧光较暗。质量比为 10:1 的复合物获得高转染效率的原因主要有以下两个方面: 首先, NH₂-Gly/pEGFP 复合物细胞毒性小, 高质量比易获得高转染效率, 而 PEI 25k 的细胞毒性较大, 提高转染比例后细胞易死亡, 从而引起转染效率降低; 其次, 糖原可以被 α -D-葡萄糖苷酶从非还原性末端降解, 有利于 DNA 的释放, 可以提高转染效率。

随后用流式细胞仪定量考察了 NH₂-Gly/pEGFP 及 PEI/pEGFP 复合物在 NIH 3T3 细胞中的转染效果。由图 9 可知, 在 24 h 时, NH₂-Gly 与 pEGFP 质量比为 5:1 的复合物转染效率要明显高于 PEI/pEGFP 复合物, 说明其具有较快的转染效率。这主要因为 NH₂-Gly/pEGFP 具有较好的生物相容性。转染 48 h 后, NH₂-Gly 与 pEGFP 质量比为 10:1 的复合物转染效果与 PEI/pEGFP 复合物的转染效果

相当。综上所述, NH₂-Gly 载体具有较好的细胞转染能力, 其转染效果可接近或超过 PEI。考虑到 NH₂-Gly 载体良好的生物相容性, NH₂-Gly 有望作为载体用于基因治疗。

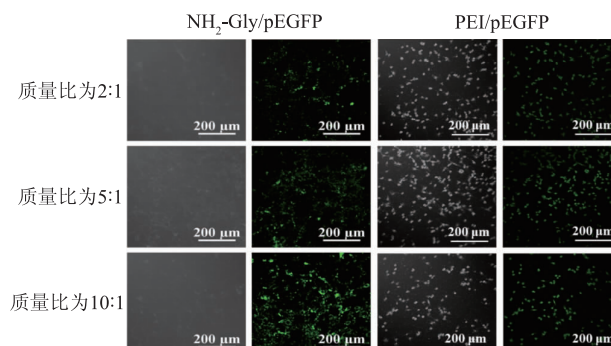


图8 NH₂-Gly/pEGFP 在成纤维细胞中的激光共聚焦显微镜图

Fig. 8 Confocal laser scanning microscopy images of the transfection of NH₂-Gly/pEGFP in NIH 3T3 cells

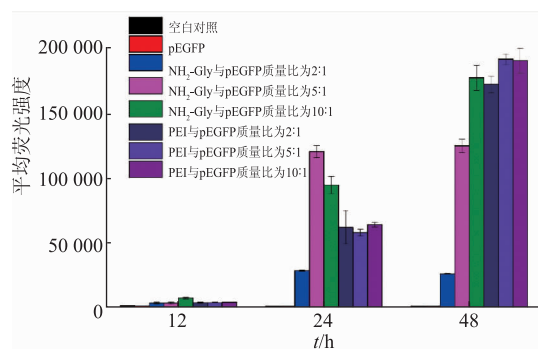


图9 NH₂-Gly/pEGFP 复合物在 NIH 3T3 中的流式分析图
Fig. 9 Flow cytometer of NH₂-Gly/pEGFP complex in NIH 3T3 cells

3 结 语

通过较为简便的方法合成了氨基化的糖原衍生物(NH₂-Gly)。NH₂-Gly 表面带有较高的正电荷, 同时具有良好的生物相容性和较好的缓冲能力。NH₂-Gly 可有效络合 pEGFP 并保护其免受核酸酶的降解。NH₂-Gly 大幅提高了 pEGFP 在 NIH 3T3 细胞中的转染效率, 其转染效率几乎与 PEI 25k 相当。同时, 与 PEI 相比, NH₂-Gly 的生物相容性更好。此外, 溶酶体内含有大量的能够分解糖原的 α -葡萄糖苷酶, NH₂-Gly/基因复合物有望在溶酶体内被 α -葡萄糖苷酶水解, 释放出所加载的基因。同时, 基于糖原易于功能化修饰的特点, 未来还可以在 NH₂-Gly

表面进一步修饰靶向基团,实现基因的靶向递送。治疗领域具有广泛的应用前景。
 综上,糖原有望作为安全高效的基因载体,在基因

参考文献:

- [1] FERREIRA T H, HOLLANDA L M, LANCELLOTTI M, et al. Boron nitride nanotubes chemically functionalized with glycol chitosan for gene transfection in eukaryotic cell lines[J]. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2015, 103(6): 2176-2185.
- [2] MOHAMMADI M, SALMASI Z, HASHEMI M, et al. Single-walled carbon nanotubes functionalized with aptamer and piperazine-polyethylenimine derivative for targeted siRNA delivery into breast cancer cells[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015, 485(1/2): 50-60.
- [3] ZHANG H, GAO X D. Nanodelivery systems for enhancing the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides[J]. **Materials Science and Engineering: C**, 2017, 70: 935-946.
- [4] WOJNIOLOWICZ M, BESFORD Q, WU Y L, et al. Glycogen-nucleic acid constructs for gene silencing in multicellular tumor spheroids[J]. **Biomaterials**, 2018, 176: 34-49.
- [5] 胡锦芳,曹端文,魏筱华,等.聚酰胺-胺-聚谷氨酸-聚乙烯亚胺共聚物的制备及作为基因载体的性能研究[J]. **药学报**, 2019, 54(5): 919-926.
- [6] LIANG X, REN X Y, LIU Z Z, et al. An efficient nonviral gene-delivery vector based on hyperbranched cationic glycogen derivatives[J]. **International Journal of Nanomedicine**, 2014, 9(1): 419-435.
- [7] 宋丽萍,朱敦皖,刘兰霞,等. N-亚甲基磷酸化壳聚糖基因纳米粒子的体外细胞毒性及基因转染实验研究[J]. **国际生物医学工程杂志**, 2012(3): 165-168.
- [8] REN T B, LI L, CAI X J, et al. Engineered polyethylenimine/graphene oxide nanocomposite for nuclear localized gene delivery[J]. **Polymer Chemistry**, 2012, 3(9): 2561-2569.
- [9] TOH E K, CHEN H Y, LO Y L, et al. Succinated chitosan as a gene carrier for improved chitosan solubility and gene transfection[J]. **International Journal of Nanomedicine**, 2011, 7(2): 174-183.
- [10] 刘洋,王月兰,宋秀梅.聚乙烯亚胺介导水通道蛋白5基因表达载体体外转染的研究[J]. **山东大学学报**, 2011, 49(8): 57-61.
- [11] 张淑芸,张晓容,宗莉,等.壳聚糖纳米粒作为基因载体的研究-影响转染效率的因素[J]. **中国新药杂志**, 2008(17): 1507-1511.
- [12] BESFORD Q A, MARCIN M, TOMOYA S, et al. Lactosylated glycogen nanoparticles for targeting prostate cancer cells[J]. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 2017, 9(20): 16869-16879.
- [13] PERRONE M, LOPALCO A, LOPEDOTA A, et al. Preactivated thiolated glycogen as mucoadhesive polymer for drug delivery[J]. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2017, 119: 161-169.
- [14] ENGELBERTH S A, HEMPEL N, BERGKVIST M, et al. Cationic dendritic starch as a vehicle for photodynamic therapy and siRNA co-delivery[J]. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2017, 168: 185-192.
- [15] MITCHELL A, FRANCISCO V, RICHARD A, et al. Nature of alpha and beta particles in glycogen using molecular size distributions[J]. **Biomacromolecules**, 2010, 11(4): 1094-1100.
- [16] ZHOU J, HAN Y N, YANG Y, et al. Phospholipid-decorated glycogen nanoparticles for stimuli-responsive drug release and synergetic chemophotothermal therapy of hepatocellular carcinoma[J]. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 2020, 12(20): 23311-23322.
- [17] HAN Y N, HU B, WANG M Y, et al. pH-Sensitive tumor-targeted hyperbranched system based on glycogen nanoparticles for liver cancer therapy[J]. **Applied Materials Today**, 2020, 20: 1-12.
- [18] ZHANG X H, ZHOU J, YING H Y, et al. Glycogen as a cross-linking agent of collagen and nanohydroxyapatite to form hydrogels for bMSC differentiation[J]. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2020, 8(4): 2016-2114.
- [19] CHEN L, TIAN H, CHEN J, et al. Multi-armed poly(L-glutamic acid)-graft-oligoethylenimine copolymers as efficient nonviral gene delivery vectors[J]. **Journal of Gene Medicine**, 2010, 12: 64-76.
- [20] MORRIS V B, SHARMA C P. Enhanced *in vitro* transfection and biocompatibility of L-arginine modified oligo(-alkylaminosiloxanes)-graft-polyethylenimine[J]. **Biomaterials**, 2010, 31(33): 8759-8769.