

MPEG-PLGA 纳米胶囊在真核质粒转染细胞中的应用

涂心明¹, 郭绍芳², 胡伊乐¹

摘要:目的 验证 MPEG-PLGA 纳米胶囊在真核质粒转染细胞中应用的可行性。方法 利用直接溶解法将 MPEG-PLGA 溶解于 4℃ 双蒸水中, 加入绿色荧光载体混匀后静置于 37℃ 恒温箱中 30 min 制成 MPEG-PLGA/pEGFP-C3 纳米胶囊复合物, 检测复合物粒径大小并转染机体细胞, 通过对机体细胞绿色荧光的表达判断复合物的转染效率。结果 MPEG-PLGA/pEGFP-C3 粒径为 28.3 nm, 细胞绿色荧光显示复合物组转染率远大于裸质粒对照组。结论 MPEG-PLGA/pEGFP-C3 纳米胶囊复合物可有效提高质粒的转染率, 可作为一种新型跨膜载体在临床与研究中应用。

关键词: 纳米胶囊; 真核质粒; 细胞转染

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1672-688X(2012)03-0178-03

Application of MPEG-PLGA Nanometer Capsule in Eucaryon Plasmid Transfection Cell

TU Xin-ming, GUO Shao-fang, HU Yi-le

(Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Objective To authenticate the application of MPEG-PLGA nanometer capsule in eucaryon plasmid transfection cell. **Methods** To dissolve the MPEG-PLGA in 4℃ double-distilled water, to add green fluorescent carrier and then to place in 37℃ attemperator to prepare MPEG-PLGA/DNA nanometer capsule after 30 minutes. The MPEG-PLGA/pEGFP-C3 nanometer capsule's diameter was detected. The compound's transfection efficiency by observing the expression of green fluorescent was decided. **Results** The MPEG-PLGA/pEGFP-C3 nanometer capsule's diameter was 28.3 nm and its transfection efficiency was higher than bare plasmid control group. **Conclusion** MPEG-PLGA/pEGFP-C3 nanometer capsule can raise plasmid's transfection efficiency effectually and is neotype transmembrane carrier in clinical research.

Key words: nanometer capsule; eucaryon plasmid; cell transfection

基因治疗是近些年来兴起的通过植入外源性治疗基因片段, 治疗各种基因缺陷性疾病的一种新型疾病治疗方法。基因治疗时需将治疗性目的基因片段插入真核质粒并转入机体细胞, 通过目的基因在体内的表达纠正某些基因缺陷, 以达到治疗疾病的目的^[1]。由于大多数治疗用真核质粒携带负电荷与细胞膜自身电荷相同, 静电排斥作用使自然情况下裸质粒穿越细胞膜的几率较低, 很难达到治疗浓度^[2]。为增加真核质粒穿越细胞膜的几率, 目前常用的方法有增加细胞膜通透性的氯化钙、电击、基因

枪等方法^[3], 由于对机体细胞有损伤, 多用于实验研究, 临床应用较少。MPEG-PLGA(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)是一类可降解的功能高分子有机聚合物, 通过美国 FDA 认证, 具有良好的生物相容性、无毒、无刺激性、无免疫原性和药物缓释等特性^[4], 在临床与科研中作为化学类药物的给药载体得到广泛应用, 作为真核质粒的跨膜转运载体的研究, 目前文献报道较少。本实验利用 MPEG-PLGA 包裹绿色荧光真核质粒, 通过绿色荧光蛋白在细胞内的表达验证其作为真核质粒跨膜载体的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料 MPEG-PLGA 购自山东济南岱罡生物技术有限公司; 四季青胎牛血清、DMEM 培养基购自上海宝生物生物有限公司; pEGFP-C3 绿色荧光真核质粒与 NIH3T3 细胞由河南科技大学医学院人体解剖

收稿日期: 2012-07-10

作者单位: 1. 河南科技大学医学院, 河南洛阳 471003

2. 洛阳市中心医院药剂科, 河南洛阳 471000

作者简介: 涂心明(1957-), 男, 河南汝南人, 教授, 从事解剖学教学及疼痛基因治疗的分子学研究。

学实验室保存;6孔细胞培养板、冻存管购自郑州天根生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制 ①MPEG-PLGA水溶液的制备:用三角瓶取双蒸水20 mL,牛皮纸封口后高温蒸汽消毒,待自然冷却后置4℃冰箱过夜以备用,无菌环境下称取MPEG-PLGA 300 mg,加入已消毒的4℃双蒸水中,将三角瓶置于冰水混合物中震荡使其溶解。待溶解完全后,置4℃冰箱保存备用。②MPEG-PLGA/DNA纳米胶囊复合物的配制:取260 pg/mL的质粒300 μl加入到1 mL上述配制的MPEG-PLGA溶液中在冰水混合物中混匀,在此过程中尽量轻柔以防止破坏质粒结构,室温放置15 min,置37℃恒温箱中30 min,即可得到包裹pEGFP-C3的MPEG-PLGA/pEGFP-C3复合物。

1.2.2 复合物粒径检测 用Malvern粒度测定仪测其MPEG-PLGA/pEGFP-C3复合物的粒径。

1.2.3 细胞转染试验 ①细胞准备:液氮保存的细胞由于很多机能处于休眠状态,为获取理想的细胞活性,液氮中冻存的NIH3T3细胞复苏后需传3代以便细胞恢复正常活力,观察细胞的形态与机能恢复正常后转入6孔细胞培养板继续培养,等细胞铺满培养皿底部达75%时将其分为2组,每组9孔细胞准备转染。②细胞转染:取去内毒素的MPEG-PLGA/pEGFP-C3复合物加入第1组培养孔中;将pEGFP-C3裸质粒加入第2组培养孔中以对照,将两组混匀后静置15 min,然后在37℃ 5% CO₂培养箱中培养24 h后更换培养液继续培养。③观察与阳性细胞统计:培养48 h后在倒置荧光显微镜下观察转染效果,每孔在40倍视野下随即选取6个视野,记录每个视野中显示绿色荧光的阳性细胞的数量,取均数进行统计学分析。

2 结果

2.1 MPEG-PLGA/DNA纳米胶囊复合物的粒径测定结果如图1所示,纳米粒粒径呈单式正态分布,平均粒径为28.3 nm,多分散系数为0.21,表明纳米粒大小较均匀,分布范围窄。

3.2 细胞培养结果 荧光显微镜下观察可见,转染24 h细胞有绿色荧光表达,48 h达高峰,两组结果见图2。裸质粒组不但荧光表达弱且仅有少量阳性细胞,转染率不足3%,MPEG-PLGA/pEGFP-C3复合物组阳性细胞达15.3%,荧光表达强。结果证明MPEG-PLGA/pEGFP-C3复合物的转染效果远远大

于裸质粒。

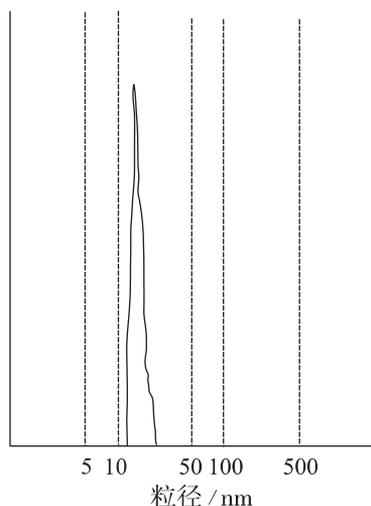


图1 MPEG-PLGA/DNA纳米胶囊复合物粒径

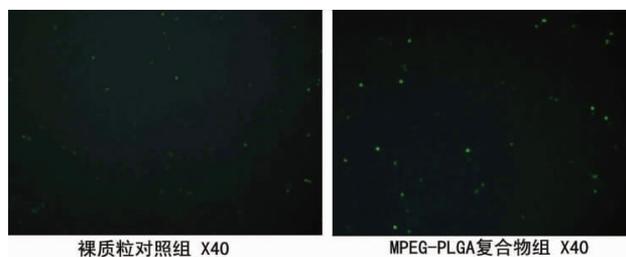


图2 两组转染效果对比图

3 讨论

MPEG-PLGA由乳酸和羟基乙酸两种单体聚合而成,具有良好的生物相容性,无毒、无刺激、无免疫原性和药物缓释等特性,特别是具有很好的中枢神经系统生物相容性,分子量0.5~20万^[5],常作为一些水溶性差、自身性质不稳定、体内代谢快、生物利用度低类化学药物的给药载体,在应用中大多采用溶剂挥发法或透析法等制备微粒胶囊,这些方法大都涉及到二氯甲烷、乙腈、丙酮等有机溶剂的使用,残留的有机溶剂不仅对人体具有很大危害,导致副作用的发生,而且容易破坏目的基因片段中DNA之间的链接,使其发生断裂,在基因治疗过程中不能正确表达治疗蛋白。为了解决这一问题,本试验利用共聚物比聚乳酸具有更大的亲水性,并且具有温敏水凝胶的特性(即其水溶液在4℃时完全溶于水,在37℃时变为水凝胶^[6])提出了一种新型制备纳米胶囊的方法——直接溶解法。该方法将MPEG-PLGA溶解于4℃的双蒸水中,加入真核质粒混合后逐渐升温至37℃,利用温敏水凝胶的特性使其在形成凝胶颗粒时包裹游离在水溶液中的真核质粒,形成具有良好生物相容性的MPEG-PLGA/真核质粒复合物,

(下转第182页)

率低,且具有低毒、低免疫原性等优点日益得到广泛关注。但真核载体携带的目的基因由于没有整合入细胞自身基因组,不具有随着细胞的分裂而增殖的能力,其在细胞内的表达能力将随细胞的增殖逐渐衰减,这决定了它们在机体内的表达具有一定的表达时效。为验证真核载体在细胞内的表达时效,为今后的临床与试验研究提供理论依据,本试验选用3种目前常用的3种绿色荧光真核载体转染机体细胞,通过细胞内绿色荧光的表达推定真核载体表达的时效,同时在 pEGFP-C3、pIRES-GFP 载体上连接前脑啡肽原基因,使其在细胞内合成亮氨酸脑啡肽(L-ENK)。由于 L-ENK 结构小,可以自由出入细胞膜,在体外细胞培养实验中,通过放免法检测细胞上清液中 L-ENK 的浓度,观察外源基因在细胞内的动态表达,进一步验证绿色荧光蛋白的表达结果。实验结果显示3种绿色荧光载体在转染 NIH3T3 细胞 24 h 后即开始表达,在 36 h 即达到高峰,随后一直持续高表达,在 35 d 后其表达开始衰减,可一直持续 2 个月以上。L-ENK 放免测定结果显示 48 h 时达高

峰,稳定表达 32 d 后开始衰减,变化规律与细胞荧光表达结果基本符合。根据试验结果可得出以下结论:在基因治疗中真核质粒连接目的基因能在机体细胞内稳定表达约 35 d,外源基因补充间隔选定为 30 d 较为合适。

参考文献:

- [1] Lee ES, Kim D, Youn YS, et al. A virus-mimetic nanogel vehicle [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(13): 2418-2421.
- [2] 胡伊乐,曹靖,任秀华,等. pEGFP-C3-PENK/NIH3T3 表达的脑啡肽对神经细胞 PKA 表达的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2010, 45(2): 269-272.
- [3] Rizzi A, Spagnolo B, Wainford RD, et al. In vitro and in vivo studies on UFP-412, a novel potent and long lasting agonist-selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor [J]. *Peptides*, 2007, 28(6): 1240-1251.
- [4] Smith RR, Martin-Schild S, Kastin AJ, et al. Decreases in endomorphin-2-like immunoreactivity concomitant with chronic pain after nerve injury [J]. *Neurosci* 2001, 105(3): 773-778.

(上接第 179 页)

该复合物穿越细胞膜后 MPEG-PLGA 凝胶颗粒在机体一些催化酶的作用下很快溶解释放出真核质粒,质粒在细胞内表达相应蛋白从而起到治疗疾病的目的,此方法在微粒胶囊制备时没有剧烈的震荡和有机溶剂的参与,可有效保护目的基因片段的完整性。本试验中利用细胞内绿色荧光蛋白的表达观察 MPEG-PLGA/真核质粒复合物的转染效率。试验结果显示 MPEG-PLGA/真核质粒复合物组转染效率(15.3%)明显高于作为对照的裸质粒组(3%),证明利用 MPEG-PLGA 包裹真核质粒可有效提高其转染效率,另外根据 MPEG-PLGA 的特性,可通过改变聚合物单体比例和分子量,调控共聚物在体内的降解速度、DNA 包封率以及基因体内释放速度。试验结果表明 MPEG-PLGA 可以作为一种新型跨膜载体在临床与研究中得以应用。

参考文献:

- [1] Glorioso JC, Fink DJ. Herpes vector-mediated gene transfer in the treatment of chronic pain [J]. *Mol Ther* 2009, 17(1): 13-18.
- [2] 宗莉,陈伶俐,张淑芸,等.壳聚糖纳米粒作为基因载体的研究:制备、特征和对 DNA 的保护 [J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36(6): 526-530.
- [3] Richardson scw, Kolbe IVJ, Duncan R, et al. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA [J]. *Im J Pharm*, 1999, 178(2): 231-243.
- [4] 曾萍,彭明利,徐溢. PLGA 微粒/纳米粒基因载体的研究进展 [J]. *药学报* 2010, 45(11): 1346-1353.
- [5] 方琴,王季石,许红玮,等.紫杉醇 mPEG2PLGA 纳米粒的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. *中国药理学杂志* 2007, 42(19): 1483-1486.
- [6] 王刚,潘丽,张永光. PLGA 纳米/微球作为核酸载体的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(12): 190-198.