

阿司匹林为配体的聚阳离子复合材料作为 非病毒基因载体的研究

王中仁^{1,2}, 陈丹¹, 周峻¹, 汤谷平¹

(1. 浙江大学化学生物和药物研究所, 浙江 杭州 310028;

2. 浙江大学材料与化学工程学院, 浙江 杭州 310013)

[摘要] 目的:以阿司匹林为配体的聚乙烯亚胺- β -环糊精(PEI- β -CyD)生物复合材料,观察其理化特性和转基因功能。方法:通过N,N'-羰基二咪唑(1,1'-carbonyldiimidazole, CDI)将阿司匹林偶联到PEI- β -CyD载体材料上,制成PEI- β -CyD-ASP复合材料。用¹H-NMR、FT-IR、UV和XRD对合成的载体材料进行了化学表征,用凝胶电泳阻滞实验观察PEI- β -CyD-ASP浓缩质粒DNA的能力,用MTT法在A293、B16、Hela细胞上对载体的细胞毒性进行评价,以及体外转染实验。结果:成功合成了以阿司匹林为配体的聚乙烯亚胺- β -环糊精复合材料,在N/P为4:1时其能有效浓缩质粒DNA;而且其在A293、B16、Hela细胞上的毒性较低,在B16肿瘤细胞上表现出较高的转染效率。结论:以阿司匹林为配体的聚乙烯亚胺- β -环糊精复合材料是低毒、选择性高的非病毒基因载体。

[关键词] 聚乙烯亚胺; 遗传载体; 转染; 质粒; β 环糊精类; 阿司匹林; 阳离子; 聚合物; 基因疗法
[中图分类号] R 730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2009)01-0046-07

Aspirin-PEI- β -CyD as a novel non-viral vector for gene transfer

WANG Zhong-ren, CHEN Dan, ZHOU Jun, TANG Gu-ping (*Institute of Chemical Biology and Pharmaceutical Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China*)

[Abstract] **Objective:** To develop a novel non-viral gene delivery vector based on PEI- β -CyD as backbone modified with aspirin, and to identify its physicochemical characters. **Methods:** 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) was used to bind aspirin onto PEI- β -CyD to form PEI- β -CyD-ASP. ¹H-NMR, FT-IR, UV and XRD were used to confirm the polymer structure. The ability of condensation was demonstrated by gel retardation assay. MTT assay was used to test the cell viability in B16, Hela and A293 cell lines. Transfection efficiency of the polymer was tested in B16 cells. **Results:** The structure of PEI- β -CyD-ASP was confirmed by ¹H-NMR, FT-IR, UV and XRD, which efficiently condensed plasmid DNA at the N/P ratio of 4. The copolymer showed low cytotoxicity and high transfection efficiency in B16 cells. **Conclusion:** The synthesized aspirin

收稿日期: 2008-10-08 修回日期: 2008-12-15

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA03Z355); 国家重点基础研究规划(973)项目(2004CB518802); 国家自然科学基金项目(30571068)。

作者简介: 王中仁(1987-), 男, 本科。

通讯作者: 汤谷平(1961-), 男, 博士, 化学生物学教授, 博士生导师, 主要从事生物材料、药物控制释放和非病毒性基因药物载体研究; E-mail: tangguping@yahoo.com.cn.

-PEI- β -CyD might be a potential gene delivery vector.

[Key words] Polyethyleneimine; Genetic vectors; Transfection; Plasmids; beta-Cyclodextrins; Aspirin; Cations; Polymers; Gene therapy

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2009, 38(1):46-52.]

“基因治疗”概念的提出使传统的根据症状给药转变成根据病因给药,为医药模式的进步注入了新的希望。基因治疗的基本思路是将正常的外源性基因植入人体靶细胞以取代有缺陷的基因,恢复该基因的功能或是提供一种新的治疗功能以改善相关症状。

阿斯匹林(aspirin)是一种古老的解热、镇痛、抗炎药。近年来随着前列腺素研究的深入,对阿斯匹林有了新的认识,最近的流行病学研究提示,阿斯匹林及其它非类固醇类抗炎药物可以减少患结直肠癌的危险,其原理可能是该类药物能抑制环氧化酶,藉此阻滞前列腺素的分泌。相关研究显示,阿司匹林对肿瘤细胞诸如SMMC-7721、SGC-7901等具有直接抑制作用^[1-2],与阿那曲唑联用可起到抑制MCF-7细胞的作用^[3],与奥沙利铂联用可起到抑制A549细胞的生长^[4],并可增强 γ 8T细胞杀伤肿瘤细胞的作用^[5]。研究认为该类药物有可能被发展为一种新型抗肿瘤类药物。为此,本研究将阿司匹林偶联到聚乙烯亚胺- β -环糊精上,制成控制释放药物,同时以阿司匹林作为协同用药的配体,以起到协同、加强基因治疗效果的作用。实验成功地将阿司匹林偶合到聚乙烯亚胺- β -环糊精载体材料上,并对其结构进行了化学和生物学表征,对其结合质粒DNA能力、细胞毒性及体外细胞转染作了初步的评价。

1 材料与方法

1.1 材料 树枝状PEI 600 Da, β -环糊精(β -CyD),阿司匹林(aspirin, ASP),甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT),N,N'-羰基二咪唑(N,N'-carbonyldiimidazole, CDI)购自Aldrich-Sigma公司。萤火虫荧光素酶真核表达质粒pCAG(带有pCMV启动子)购自Promega公司。绿色荧光蛋白真核表达质粒的

真核表达质粒由增强绿色荧光蛋白(enhanced green green fluorescent protein, pEGFP)插入pcDNA3.1-myc-His B构建而成,带有CMV启动子和SV40启动子,在TOP 10菌株中扩增为高拷贝质粒。RPMI 1640培养基购自杭州吉诺公司。A293、Hela、B16、COS-7细胞系由浙江大学免疫所保种。其它实验所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 聚乙烯亚胺- β -环糊精-阿司匹林(PEI- β -CyD-ASP)的合成: PEI- β -CyD的合成方法按照文献^[6-8],步骤为:将聚乙烯亚胺- β -环糊精复合材料(57 mg)溶于5 ml DMSO/水混合溶剂(DMSO:水约为9:1)备用;另将CDI配制溶液(0.02 mmol/ml, 3 ml DMSO),与阿司匹林DMSO溶液(0.01 mmol/ml, 6 ml)一起加入50 ml圆底烧瓶中,避光、充氮气保护,再加入100 μ l三乙胺为催化剂,反应1.5 h。逐渐将已配好的聚乙烯亚胺- β -环糊精溶液滴入上述反应体系,在氮气保护避光条件下反应过夜。次日,将反应液取出,用MW 8 000~14 000透析膜在流动纯水中透析48 h。冷冻干燥3 d,得到产物。

1.2.2 核磁共振氢谱(1 H-NMR)分析: 分别称取PEI- β -CyD、PEI- β -CyD-ASP、ASP 5~8 mg,用700 μ l D₂O溶解。室温下用Bruker Avance 400 DMX核磁共振光谱仪进行分析。

1.2.3 红外光谱(FT-IR)分析: 分别取PEI- β -CyD、PEI- β -CyD-ASP 1~2 mg制成KBr盐片红外扫描分析(室温下用Thermo Nicolet AVATAR 330傅立叶红外光谱仪进行分析)。

1.2.4 紫外吸收光谱(UV)分析: 分别取一定量的PEI- β -CyD、PEI- β -CyD-ASP、ASP配置成稀溶液,在220~340 nm波段的紫外光下进行扫描分析(室温下用UV-2401紫外-可见分光

光度计)。取浓度分别为0.133 mg/ml、0.1 mg/ml、0.05 mg/ml、0.025 mg/ml、0.0125 mg/ml的ASP乙醇/水溶液进行吸光度测定,制作ASP标准曲线。测定PEI- β -CyD-ASP吸光度,以确定PEI- β -CyD-ASP中ASP的含量。

1.2.5 粉末衍射分析(XRD):将PEI- β -CyD、PEI- β -CyD-ASP和阿司匹林在D/Max-2550Pc上进行粉末X-衍射谱分析。

1.2.6 凝胶电泳阻滞实验:将PEI- β -CyD和PEI- β -CyD-ASP与pCAG-luc(浓度为1 μ g/ μ l DNA)按一定的N/P(PEI的氮元素摩尔数:DNA中磷元素摩尔数)混合,加入1%琼脂糖(含有0.5 μ g/ μ l 溴化乙锭)制备的凝胶孔中,在1 $\times$ TAE缓冲液中80 V、电泳45 min。

1.2.7 MTT法测定细胞毒性:将A293、B16、Hela细胞接种到96孔板上,细胞数为12 000细胞/孔,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养24 h。PEI- β -CyD、PEI- β -CyD-ASP、PEI 25 kDa分别用无血清的培养液1640配制成浓度梯度(2.5、7.5、12.5、17.5、22.5、27.0 μ g/ml)的溶液。吸去每孔中培养液,加入含不同聚合物浓度的培养液,每孔0.2 ml,3复孔,共温育4 h后,吸去培养液,加入含有10% MTT(0.5 mg/ml)的有血清培养液100 μ l,培养3 h后翻板弃去培养液,每孔加入100 μ l DMSO检测细胞的代谢活动。细胞活性=样本(吸光度)/对照组(吸光度) $\times$ 100。

1.2.8 体外转染:将A293细胞接种到48孔板上,5 $\times$ 10⁴细胞/孔,铺于48孔板,孵箱中培养24 h,待细胞密度为70%~80%时进行转染实验。将载体材料及对照材料与表达荧光素酶质粒(1 μ g)按照一定的N/P(PEI的氮元素摩尔数:DNA中磷元素摩尔数)值混合形成共聚物/DNA复合物,加入各孔中。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养。6 h后,吸去培养液,每孔加入500 μ l含10%血清的新鲜培养液继续培养36 h。实验均为3复孔,培养48 h后用PBS洗涤一次,细胞培养板每孔加入200 μ l PBS,-80 $^{\circ}$ C冻存至少1 h,然后37 $^{\circ}$ C融化,取25 μ l细胞裂解液,采用荧光素酶检测试剂盒测定荧光素酶活性。pEGFP质粒转染用荧光倒置显微镜观察荧光强度。

2 结果

2.1 PEI- β -CyD-ASP的合成(图1) 溶剂的

选择是偶合反应的重要因素,阿司匹林易溶于DMSO,故选择DMSO为溶解溶剂,而PEI- β -CyD则在DMSO/水复合溶剂中溶解,两者比例为9:1。在反应投料比例中阿司匹林和CDI的摩尔比为1:1.2,而活化后阿司匹林与PEI- β -CyD单体的摩尔比例为1:1。为使反应完全,反应的滴加速度需控制,以防止局部过浓现象。从反应物形状来看,所得产物为黄色的絮状物。

2.2 化学表征

2.2.1 ¹H-NMR:为确定PEI- β -CyD-ASP的结构,实验用¹H-NMR对其进行了表征。从图2A看阿司匹林在化学位移7.1~7.7处有苯环的特征吸收峰;图2B是PEI- β -CyD的图谱,在化学位移2.5~2.8和4.8范围内有环糊精上亚甲基和次甲基(-CH₂、-CH-)的吸收峰;图2C是PEI- β -CyD-ASP的图谱,从图上可以发现,其保持着PEI- β -CyD特征吸收峰外,在化学位移7.0~7.5处有吸收峰信号,但峰位略有移动,其为阿司匹林的苯环特征峰,说明其已经成功偶联于载体材料上。

2.2.2 FT-IR:图3是PEI- β -CyD和PEI- β -CyD-ASP的红外光谱图。从图3A PEI- β -CyD的红外图谱中可以发现在1704.10 cm⁻¹处有羰基峰,这是偶联剂CDI联结PEI和 β -CyD时的羰基吸收峰;图3B是PEI- β -CyD-ASP的红外吸收图谱,由图可知,除1700.72 cm⁻¹CDI上的羰基外,在1652.72 cm⁻¹处出现了明显的新羰基峰,其为ASP偶联到PEI- β -CyD上后形成的酯羰基峰,从红外图谱吸收峰可以说明,阿司匹林已经成功偶联到载体材料上。

2.2.3 UV:图4是PEI- β -CyD、PEI- β -CyD-ASP和ASP的紫外吸收光谱图。PEI- β -CyD基本无紫外吸收谱带;阿司匹林在288 nm处有苯环的K吸收带;而PEI- β -CyD-ASP在290 nm处有苯环的吸收谱带出现,说明阿司匹林已经偶合于PEI- β -CyD上,但最大吸收谱峰略有位移。根据阿司匹林的标准曲线($A=7.600C-0.012$, $n=5$, $r=0.99$)可以计算,所合成的PEI- β -CyD-ASP中阿司匹林的接入率为7.32%。

2.2.4 XRD:图5是PEI- β -CyD、PEI- β -CyD-ASP和ASP的粉末衍射曲线。从曲线分析可以发现,阿司匹林为结晶型化合物,PEI- β -CyD为

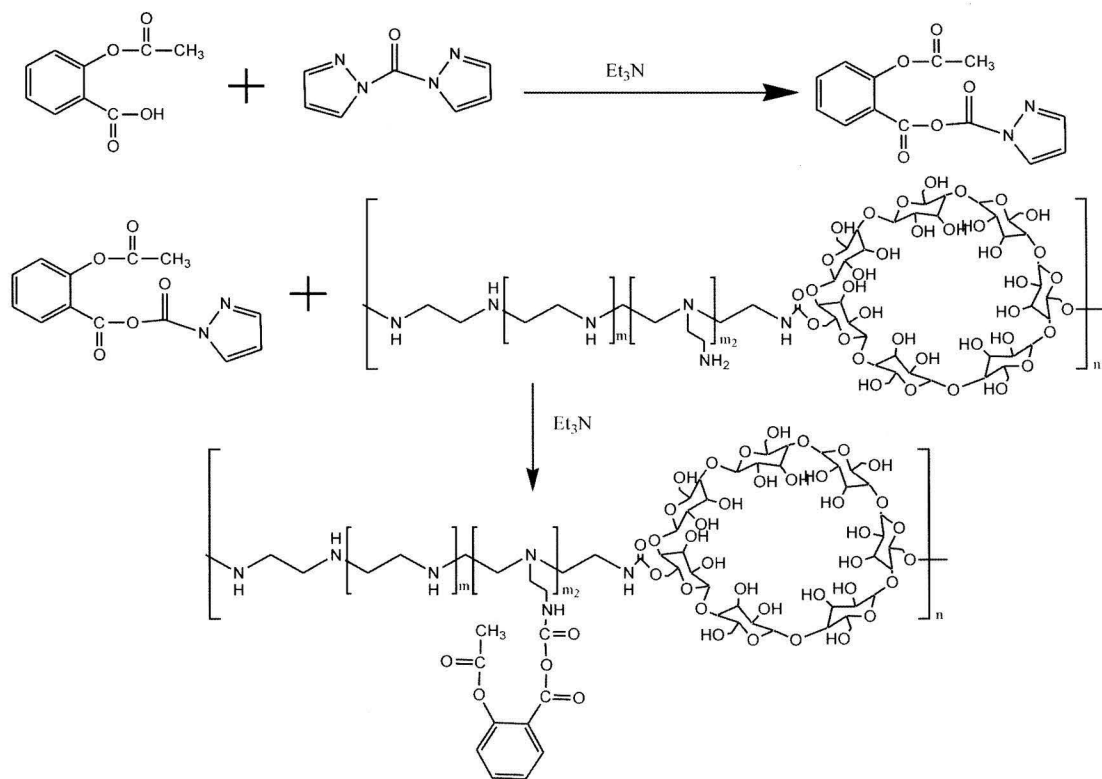


图1 PEI-β-CyD-ASP的合成线路示意图

Fig. 1 Synthesis route of PEI-β-CyD-ASP

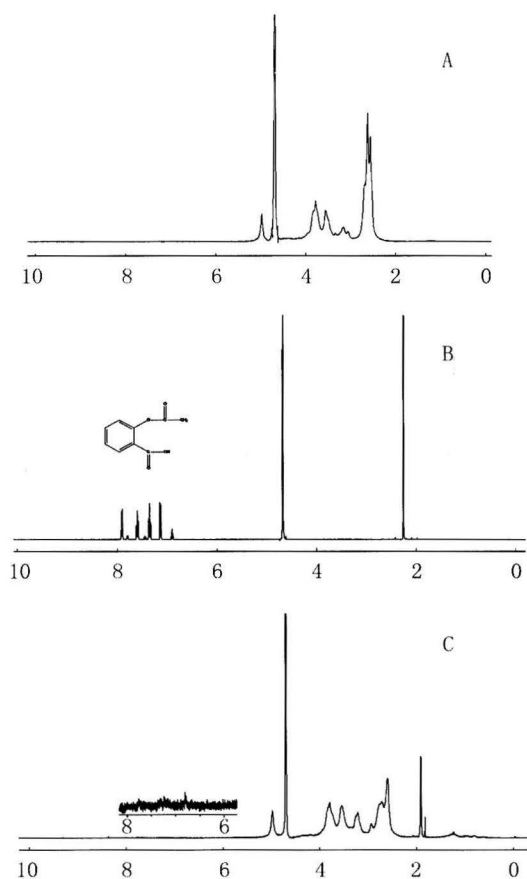
无定型结构,且 2θ 为 18.3° 度,当阿司匹林偶合于PEI-β-CyD上后,形成PEI-β-CyD-ASP共聚物,从粉末衍射曲线上分析其也是无定型结构,但 2θ 为 18.6° ,峰宽变宽,无定型程度增加,峰形中无阿司匹林的吸收峰,说明阿司匹林是偶合于载体材料。

2.3 凝胶电泳阻滞实验 图6是PEI-β-CyD和PEI-β-CyD-ASP的琼脂糖凝胶电泳照片。实验结果显示,PEI-β-CyD在N/P为3:1时可以缩合DNA,而PEI-β-CyD-ASP则在N/P为4:1时可以缩合DNA。因此可以推测,当阿司匹林偶合于PEI-β-CyD载体材料上后,载体材料表面的氨基数减少,同时,由于阿司匹林的接入使PEI-β-CyD-ASP/DNA微粒的致密程度有所减小,从而使PEI-β-CyD-ASP结合DNA的能力略有减弱。

2.4 MTT 细胞毒性实验 是反映载体材料生物相容性的重要方法和手段。实验选用PEI-β-

-CyD和PEI-β-CyD-ASP两种载体材料对A293、Hela和B16细胞株进行细胞毒性实验,并以PEI 25 kDa作为阳性对照。图7是MTT的实验结果,由图可知,当PEI-β-CyD/DNA和PEI-β-CyD-ASP/DNA复合物的N/P为5:1~55:1时,两种载体材料对A293、Hela和B16细胞株的存活率均在80%以上,而对照组PEI 25 kDa的细胞毒性远高于实验材料,当N/P为55:1时,细胞存活率在20%以下。说明PEI-β-CyD和PEI-β-CyD-ASP在实验条件下几乎没有毒性,这为载体材料的转染实验提供了依据。

2.5 体外转染实验 图8是PEI-β-CyD和PEI-β-CyD-ASP载体材料在B16、Hela、A293和COS-7细胞上的体外细胞转染实验结果。从转染实验结果来看,PEI-β-CyD-ASP载体材料有一定的细胞选择性,在Hela、A293和COS-7细胞上,随着N/P的增加PEI-β-CyD-ASP载体材料的转染效率略有增加,但低于未偶合阿司



A: PEI-β-CyD; B: 阿司匹林; C: PEI-β-CyD-ASP

图 2 PEI-β-CyD、PEI-β-CyD-ASP 和阿司匹林的核磁共振氢谱

Fig. 2 ^1H -NMR spectra of PEI-β-CyD, PEI-β-CyD-ASP and aspirin

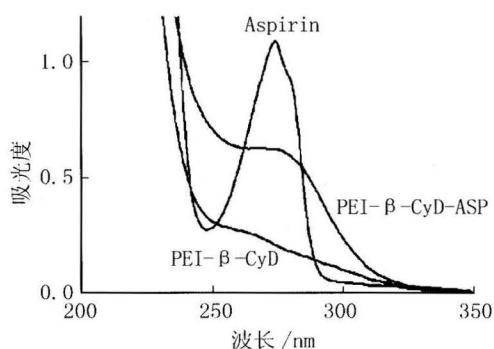
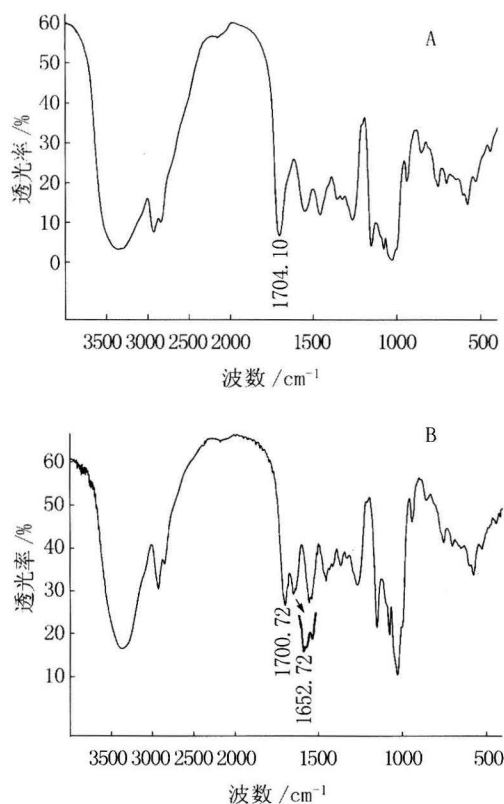


图 4 紫外吸收光谱分析

Fig. 4 UV absorption spectra



A: PEI-β-CyD; B: PEI-β-CyD-ASP

图 3 PEI-β-CyD 和 PEI-β-CyD-ASP 的红外光谱

Fig. 3 FT-IR spectra of PEI-β-CyD and PEI-β-CyD-ASP

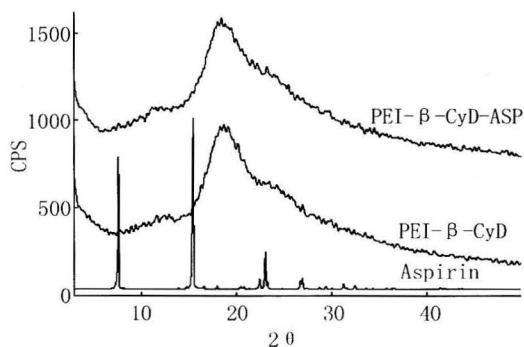


图 5 PEI-β-CyD-ASP、PEI-β-CyD 和阿司匹林的粉末衍射分析图谱

Fig. 5 XRD image of PEI-β-CyD-ASP, PEI-β-CyD and aspirin

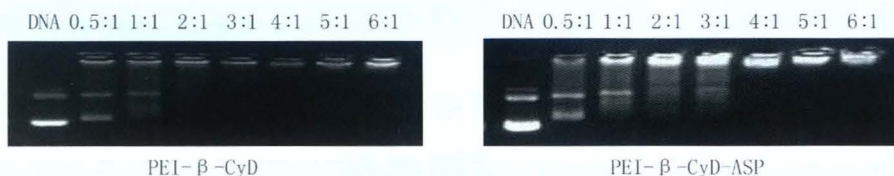


图6 PEI-β-CyD 和 PEI-β-CyD-ASP 凝胶阻滞实验结果

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis retardation of PEI-β-CyD and PEI-β-CyD-ASP

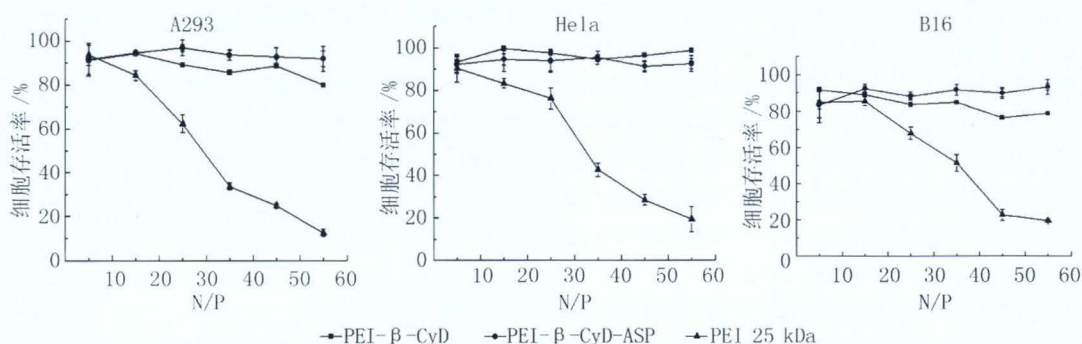


图7 PEI-β-CyD 和 PEI-β-CyD-ASP 的细胞毒性实验结果

Fig. 7 Cytotoxicity of PEI-β-CyD and PEI-β-CyD-ASP by MTT assay

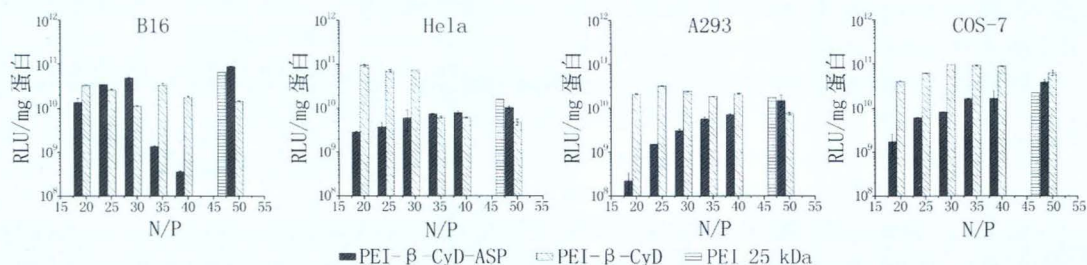


图8 PEI-β-CyD/DNA 和 PEI-β-CyD-ASP/DNA 复合物在体外细胞转染

Fig. 8 Transfection efficiency of PEI-β-CyD/DNA and PEI-β-CyD-ASP/DNA complexes

匹林的PEI-β-CyD 材料。在B16 细胞中,转染情况不同,随着N/P 的增加,PEI-β-CyD-ASP 的转染效率明显提高,当N/P 为50:1 时,PEI-β-CyD-ASP/DNA 的转染效率是PEI-β-CyD/DNA 的3 倍,说明偶合阿司匹林后,PEI-β-CyD-ASP 载体材料在B16 细胞上的选择性。图9 是PEI-β-CyD-ASP/DNA 复合物在B16 细胞株上的绿色荧光照片,从照片上可以发现,其在该细胞株上的转染效率约为30%。

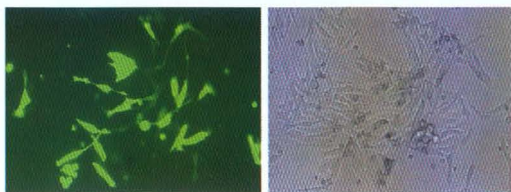


图9 PEI-β-CyD-ASP/DNA 复合物在B16 细胞株上绿色荧光照片

Fig. 9 EGFP image of PEI-β-CyD-ASP/DNA complexes in B16 cell lines

3 讨 论

本实验采用文献报道方法^[6-8]合成了 PEI- β -CyD-ASP,并通过一系列化学表征手段确定了其结构组成。在 PEI- β -CyD-ASP 的合成过程中,阿司匹林的量应根据 PEI- β -CyD 链上的氨基数量而定,本实验采取和主链氨基等摩尔量的阿司匹林进行投料,相应的 CDI 量也与主链氨基量一致。PEI- β -CyD 在 DMSO 中溶解性一般,故需采取混合溶剂溶解(DMSO:水=9:1)。活化后的阿司匹林需缓速滴入,若速度过快则易引起原料沉淀,影响反应进程。主链的非线性将在一定程度上产生空间位阻,使得阿司匹林的接入率无法达到理论值(与主链氨基 1:1 偶联)。而表征阶段所反映出的信息也印证了空间位阻的存在,阿司匹林的接入率仅为 7.32%。阿司匹林对细胞具有一定的刺激性,因此阿司匹林的接入率直接影响到载体的毒性水平。从毒性测试结果来看,所得载体的接入率是比较合适的。

本实验成功地合成了阿司匹林-聚乙烯亚胺- β -环糊精复合材料,而且证明了其对细胞具有低毒性和选择性的特性,进一步的实验研究正在进行中。

References:

- [1] TANG Li-ping, TANG Cheng-wei, WANG Chun-hui(汤丽平,唐承薇,王春晖). Inhibiting effects of aspirin on the growth of human hepatocellular carcinoma [J]. **Chin J Hepatol**(中华肝病杂志), 2002, 10(4): 290-292. (in Chinese)
- [2] WANG Chun-hui, TANG Cheng-wei(王春晖,唐承薇). Inhibition effect of aspirin on the growth of gastric cancer and the mechanism there-in involved [J]. **J Sichuan Univ: Med Sci Edi**(四川大学学报:医学版), 2003, 34(3): 468-471. (in Chinese)
- [3] ZHANG Yan, WANG Yang, YAN Xiu-xi(张岩,王杨,闫秀欣). Effect of aspirin and celecoxib on proliferation of breast cancer cell line MCF-7 [J]. **Journal of Jilin University: Medicine Edition**(吉林大学学报:医学版), 2007, 33(5): 901-904. (in Chinese)
- [4] LIU Guo-hua, CHEN Yan-ming, FENG Yi-zhong(刘国华,陈燕明,冯一中). Experimental study on inhibitive effects of aspirin on the proliferation of human lung cancer cells [J]. **Cancer Research on Prevention and Treatment**(肿瘤防治研究), 2005, 32(11): 695-698. (in Chinese)
- [5] CHEN Fu-xing, LIU Jun-quan, FENG Xia, et al(陈复兴,刘军权,冯霞,等). Cytotoxic effects of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells on the tumor cells of digestive system in vitro [J]. **World Chinese Journal of digestology**(世界华人消化杂志), 2007, 202: 1591-1595. (in Chinese)
- [6] TANG G P, GUO H Y, ALEXIS F, et al. Low molecular weight polyethylenimines linked by β -cyclodextrin for gene transfer into the nervous system [J]. **Gene Med**, 2006, 8(6): 736-744.
- [7] ROBERT A B, SHEN M, SANTHAKUMAR V, et al. Parallel synthesis of tri- and tetrasubstituted ureas from carbamoyl imidazolium salts [J]. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 2002, 5: 219-232.
- [8] ROBERT A B, SANTHAKUMAR V, CHIAKI Y I, et al. An efficient new protocol for the formation of unsymmetrical tri- and tetrasubstituted ureas [J]. **Tetrahedron Letters**, 1998, 39: 6267-6270.

[责任编辑 黄晓花]