基于[12]aneN₃的近红外AIE活性非病毒基因载体的合成及基因递送

唐芳, 高仪楠, 张曦, 张雨杉, 卢忠林*

北京师范大学化学学院, 放射性药物教育部重点实验室, 北京 100875

*通讯作者, E-mail: luzl@bnu.edu.cn

收稿日期: 2022-01-20; 接受日期: 2022-02-17; 网络版发表日期: 2022-04-12

国家自然科学基金(批准号: 21372032, 21778012)资助项目

摘要 荧光非病毒基因载体具有可示踪载物基因释放和载体在细胞内命运的功能, 在实现基因递送可视化和诊疗一体化等领域具有重要意义. 本文基于双[12]aneN₃设计合成了一种三苯胺衍生物TPAH, 作为近红外(NIR)聚集诱导发射(AIE)荧光型非病毒基因载体. TPAH和辅助脂质二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)混合后形成的脂质体能够将核酸压缩成纳米颗粒进行基因递送, 在多种细胞系中能够观察到质粒DNA (pDNA)和小干扰RNA (siRNA)的高效转染, 转染效率(TE)和商业的转染试剂lipofectamine 2000相近. 载体的荧光清楚地显示了载物基因的摄取、运输和细胞内释放, 提供了有关基因转染的重要时空信息.

关键词 [12]aneN₃, 非病毒基因载体, 近红外发光, 聚集诱导发光, 生物显像

1 引言

将基因递送试剂和生物成像分子进行整合, 实现治疗和诊断于一体的目标, 成为近年来研究多功能非病毒基因载体的一个重要方向^[1]. 尽管在转染效率方面, 非病毒基因载体远远落后于病毒基因载体^[2], 但是非病毒基因载体具有易于制备, 易于修饰和改造, 免疫原性低, 生物安全性高等优势, 使其成为病毒基因载体最具潜力的替代品^[3]. 有机小分子荧光团具有成本低、生物相容性好、灵敏度高以及信噪比(S/N)高^[4]等特性而成为一种具有潜力的无创造影剂. 因此, 近年来开发具有强荧光高分辨率的有机小分子荧光非病毒基因载体引起了科学家们的广泛兴趣.

波长在200~650 nm范围内的光学探针通常会遇到组织自发荧光的强干扰、高吸收和显著的光子散射等问题^[5], 因此, 荧光发射在600~900 nm范围^[6], 具有深层组织穿透性能并且能够实时进行追踪的近红外(NIR)发光小分子成为近年来的研究热点^[7,8]. 其中, 聚集诱导发射(AIE)荧光团具有可以通过与特异性的物种相互作用来激活荧光的特点, 使其最大限度的减少非特异性干扰并改善空间精确度^[9,10]. 具有NIR发射^[11]和AIE性能^[12,13]的非病毒基因载体均有报道; 兼具NIR发射和AIE性能的单个载体分子^[14,15]的设计在获得高性能治疗诊断试剂方面依然具有巨大的潜力, 但是鲜有报道. 因此迫切需要开发兼具NIR发射和AIE性能的载体分子, 并且对其进行测试和完善以获得更佳的诊

引用格式: Tang F, Gao YN, Zhang X, Zhang YS, Lu ZL. Synthesis and gene delivery properties of [12]aneN₃ based nonviral gene vector with near infrared AIE activity. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 956–962, doi: 10.1360/SSC-2022-0014

疗一体化非病毒载体。

在本研究工作中, 我们设计合成了用双[12]aneN₃修饰的NIR AIE荧光团作为新型非病毒基因载体 **TPAH** (图1)。载体分子主要由三个部分组成, 即蓝色的极性双[12]aneN₃亲水头部、红色的三苯胺衍生物荧光团部分, 以及粉色的十六烷基疏水尾部。系统的测试与转染活性相关的颗粒流体动力学尺寸、形态、zeta电位和细胞毒性等参数, 表明该载体具有较强的DNA结合能力, 能够有效地将质粒DNA (pDNA)和siRNA输送到细胞中进行转染。此外, 在激光共聚焦显微镜下可以清楚地显示有关基因转染的重要时空信息。该研究表明, **TPAH**具有成为一种有效基因递送和诊疗一体化试剂的巨大潜力。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

pUC18 DNA、琼脂糖、GoldView II、6 × 上样缓冲液(loading buffer)、小牛胸腺DNA (ctDNA)、CCK-8试剂盒、细胞核染料(DAPI)和BCA试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司(中国)。天然脂质二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)购自梯希爱(上海)公司(中国)。荧光素酶报告质粒DNA (pGL-3)、绿色荧光蛋白报告基因(pEGFP)和6-羧基荧光素(FAM)标记的双链DNA寡聚物(FAM-DNA)购自于北京睿博兴科生物技术有限公司(中国)。荧光素酶底物以及细胞裂解液(5×)购自于Promega公司(美国)。Lipofectamine 2000购自于Invitrogen公司(美国)。实验中所用到的细胞均购自于国家实验细胞资源共享服务平台(北京总部)。

核磁共振(NMR) ¹H NMR和¹³C NMR采用日本电子JOEL (400 MHz和600 MHz, 日本)测得。高分辨质谱采用Waters LCTPremier XE spectrometer仪器(美国)测得。荧光发射光谱由Agilent Technologies Cary Eclipse荧光光度计(美国)测得。紫外-可见光谱由Varian Cary 50 Conc紫外-可见分光光度计(美国)测得。凝胶电泳实验在北京伯兰特生物科技有限公司生产的BEP-600电泳系统中测得, 凝胶电泳照片拍自于UVP EC3仪器(美国), 拍照使用的是254 nm的紫外光。粒径大小由Malvern激光散射粒度仪(英国)测得, 扫描电子显微镜(SEM)照片拍自于Hitachi S-4800电镜仪(日本), 透射电子显微镜(TEM)照片拍自于FEI Talos F200S (美国)

图1 TPAH的结构式(网络版彩图)

Figure 1 Molecular structure of TPAH (color online).

高分辨透射电子显微镜。细胞流式实验测试仪器是BECKMAN COULTER CytoFLEX (美国)。细胞毒性和蛋白含量由Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (美国)仪器测得, 荧光素酶发光强度由TECAN infinity F200 (瑞士)测得, 共聚焦照片由ZEISS激光共聚焦显微镜LSM700(日本)拍得。

2.2 实验方法

TPAH的合成。如图S1(网络版补充材料)所示, **TPAH**通过多步化学反应制备得到。**F6**通过4-甲基吡啶和溴代烷烃的成盐反应制得, **F1**、**F2**和**F3**分别通过Ullmann反应、Vilsmeier-Haack甲酰化反应和三溴化硼脱甲基反应制得。**F3**和**F4**通过亲核取代反应得到**F5**, **F5**和**F6**通过Knoevenagel缩合反应得到**F7**, **F7**和含有炔丙基官能团的[12]aneN₃通过高效的Click反应, 以及最后脱除氨基保护基团得到目标产物**TPAH**。详细反应步骤和表征结果见补充材料。

TPAH的光学性质、DNA凝聚、细胞毒性、转染实验和共聚焦成像实验步骤参考文献方法进行研究^[15,16]。

3 结果与讨论

3.1 光学性质

化合物**TPAH**在25℃水溶液中有两处紫外-可见吸收峰(图2a), 其中位于301 nm处的短波吸收归因于荧光团部分共轭骨架中局部的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 而位于475 nm处的长波吸收归因于荧光团核心中大 π 体系的内部电荷转移(ICT)过程^[17]。化合物在680 nm处的最大荧光发射属于NIR荧光, 在水溶液中的斯托克位移为230 nm。尽管化合物因为具有两亲性, 在水溶液中有

图 2 (a) TPAH在水溶液中的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱。(b) TPAH在不同比例CHCl₃/DMSO溶液中的 F/F_0 对CHCl₃体积分数(%)比例的函数曲线。 F 为TPAH在特定CHCl₃比例溶液中最大荧光发射强度, F_0 为TPAH在DMSO中最大荧光发射强度, $c = 25 \mu\text{M}$, 25°C (网络版彩图)

Figure 2 (a) Ultraviolet-visible (UV-vis) and fluorescence spectra of TPAH in water. (b) The change of F/F_0 as a function of volumetric fraction of CHCl₃ in CHCl₃/DMSO mixture. F is the fluorescence intensity at a certain CHCl₃ fraction (%), F_0 is the initial fluorescence intensity, $c = 25 \mu\text{M}$, 25°C (color online).

可能形成胶束, 但由于胶束对于发色团的限域作用有限, 因此荧光几乎可以忽略。但是在氯仿(CHCl₃)和二甲亚砜(DMSO)的二元体系中, 随着不良溶剂氯仿体积的增加, 荧光逐渐增强, 并在氯仿含量为98%时最大荧光强度增强了8倍(F/F_0 , 图2b)。TPAH在CHCl₃中溶解性较差而发生聚集, 限制分子内运动, 激发态电子非辐射衰变受到抑制, 荧光得到增强。这种现象表明化合物TPAH具有AIE活性^[18], 其近红外发射和大的斯托克位移的性质有益于生物系统中成像和示踪。

3.2 DNA凝聚

AIE类非病毒基因载体可以与ctDNA共聚集进而增强载体分子的荧光^[16]。因此, 通过化合物TPAH的

ctDNA滴定荧光变化, 能够评估TPAH和DNA的结合能力。荧光滴定实验结果表明, 随着ctDNA逐步滴加到TPAH的溶液中, 溶液的荧光强度逐渐增强。荧光强度在ctDNA为60 μM 时达到平衡, 放大了10倍(图S2)。

DOPE是一种中性磷脂, 可作为辅助脂质增加脂质类非病毒基因载体的转染效率^[19]。根据我们使用DOPE的经验^[12,15,16], 将TPAH与DOPE以1:2的比例混合形成脂质体, 通过增加膜融合能力来改善转染效率(TE)。TEM照片(图S3a)和动态光散射(DLS, 图S3b)结果表明, 所制得的脂质体呈规则球型, 平均直径约140 nm, 多分散指数(PDI)小于0.25。此外, 该种脂质体在低温储存(4~8 $^\circ\text{C}$) 14天之内颗粒尺寸几乎保持不变(图S3c), 表明其在溶液中的稳定性良好。图3a中凝胶电泳结果表明, 化合物TPAH混合DOPE之后具有出色的DNA凝聚能力, 在15 μM ($N/P = 4.44$)时有效阻滞质粒pUC18 DNA迁移。除了大环多胺与核酸的静电作用外, 吡啶盐的正电荷静电作用和烷基链的疏水作用也加强了化合物与核酸的相互作用。凝聚DNA后形成的复合物纳米颗粒大小约为180 nm, 尺寸分布在相当窄的范围内, PDI为0.14 (图3b和图S4)。复合物表现出+24 mV的表面电荷, 与单独的脂质体相比表面电荷较低, 这是由于凝聚了负电的DNA中和了部分电荷。

3.3 细胞毒性

在研究细胞转染之前, 使用标准的CCK-8测定法对TPAH/DOPE脂质体不同转染浓度下的细胞毒性进行评估。实验结果发现, TPAH/DOPE在多种细胞中毒性普遍较低(图4)。例如, 当脂质体浓度小于20 μM 时, HeLa、A549和HEK293T均保持不低于80%的细胞存活率。在控制合适的转染浓度条件下, 该种脂质体复合物作为非病毒基因载体是安全的。

3.4 转染性能

使用增强型绿色荧光蛋白编码pDNA (pEGFP)在细胞中的转染效率来评估TPAH/DOPE脂质体的体外基因递送性能。实验以20 μM 脂质体和全基因空载质粒pEX-3凝聚体处理的细胞和无载体裸pEGFP质粒处理的细胞作为阴性对照组进行研究, 商业转染试剂lipofectamine 2000 (Lipo2000)作为阳性对照, 根据文献其最佳浓度选为10 $\mu\text{g/mL}$ 。流式细胞术测定结果表明, TE很大程度上取决于TPAH/DOPE脂质体的浓度,

图 3 (a) TPAH/DOPE对pUC18 DNA的电泳阻滞实验. 图片上方数字表示TPAH的浓度, 单位: μM , $[\text{DNA}] = 9 \mu\text{g/mL}$, 37°C . (b) 脂质体和pUC18 DNA凝聚形成的复合物纳米颗粒形貌TEM照片. $c = 20 \mu\text{M}$, $\text{pH } 7.4$, 37°C . 比例尺: 200 nm

Figure 3 (a) Electrophoresis image showing the retardation of the pUC18 DNA by TPAH/DOPE in the agarose gel. $[\text{pUC18 DNA}] = 9 \mu\text{g/mL}$, 37°C . Number on the top of each lane indicates the concentration of TPAH in μM . (b) A representative TEM image showing the formed nanocondensates of lipoplexes, $c = 20 \mu\text{M}$, $\text{pH } 7.4$, 37°C . Scale bar, 200 nm.

图 4 不同浓度的TPAH/DOPE脂质体在HeLa细胞、A549细胞和HEK293T细胞中的细胞毒性随脂质体浓度的变化(网络版彩图)

Figure 4 Viability of HeLa, A549, and HEK293T cells at different TPAH/DOPE concentrations (color online).

在 $20 \mu\text{M}$ 时达到最佳的转染效果, 转染效率与 Lipo2000相当(图5a和图S5), 此时在荧光显微镜下最

图 5 (a) 不同浓度的TPAH/DOPE脂质体在HeLa细胞中的绿色荧光蛋白(GFP)转染结果. $[\text{pEGFP}] = 10 \mu\text{g/mL}$. (b) 不同浓度的TPAH/DOPE脂质体在HeLa细胞中的荧光素酶定量转染结果. $*p < 0.05$ 表明相对其他实验组具有显著性较高的转染效率, $[\text{pGL-3}] = 10 \mu\text{g/mL}$, $[\text{Lipo2000}] = 10 \mu\text{g/mL}$ (网络版彩图)

Figure 5 (a) TPAH/DOPE-mediated pEGFP transfection at different concentrations. $[\text{pEGFP}] = 10 \mu\text{g/mL}$. (b) TPAH/DOPE-mediated luciferase transfection at different concentrations. $*p < 0.05$ indicates a significantly better TE than that in other experiment groups; $[\text{pGL-3}] = 10 \mu\text{g/mL}$; Lipo2000 denotes positive control group ($10 \mu\text{g/mL}$) (color online).

佳转染浓度的GFP表达也显示出同样的结果(图S6). 在HeLa细胞中对荧光素酶Gluc编码的pDNA (pGL-3) 进行的转染实验也证明了以上结论(图5b).

基于脂质体TPAH/DOPE具有良好的DNA递送能力, 我们进一步对该种脂质复合物的siRNA递送性能进行了探索. 实验结果表明, 向绿色荧光蛋白稳转细胞系HeLa-GFP中递送si-GFP RNA可以有效抑制绿色荧光蛋白的表达, 抑制效果接近Lipo2000脂质体(图6). 脂质体TPAH/DOPE向稳定表达荧光素酶(Luciferase)和红色荧光蛋白(tdTomato)的稳转细胞系A549-Luc-tdT中递送si-Luc-RNA可以靶向抑制荧光素酶的表达, 而红色荧光蛋白的表达不受影响(图S7).

图6 siGFP转染的HeLa-GFP细胞中GFP量化表达。仅用DMEM培养基处理的细胞组为空白对照组, 25 μM载体TPAH/DOPE和空载siRNA形成复合物处理的细胞为阴性对照组(N.C.); * $p < 0.05$ 表示与空白组和N.C.组相比, 绿色荧光蛋白具有显著性表达抑制; & $p < 0.05$ 表示与低于15 μM的实验组相比, 绿色荧光蛋白具有显著性表达抑制(网络版彩图)

Figure 6 Quantification of GFP expression in siGFP-transfected HeLa-GFP cells. Blank is blank control wherein cells were incubated with fresh DMEM. N.C. is negative control wherein cells were incubated with liposomes and empty siRNA. * $p < 0.05$ indicates a significantly higher luciferase suppression compared to blank and N.C. groups. & $p < 0.05$ indicates a significantly higher GFP suppression in all other groups except for TPAH/DOPE at 15 μM (color online).

3.5 细胞内示踪

AIE载体仅在结合DNA时表现出荧光, 与基因分离后荧光消失, 这种响应性荧光增强有助于最大限度地减少荧光团本身的荧光干扰, 从而提高示踪精确度^[12]。此外, AIE载体发射NIR荧光, 有利于减少生物背景的干扰^[20]。通过共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)对细胞内基因的递送进行研究: 发出绿色荧光的FAM-DNA与TPAH/DOPE脂质体复合, 然后与HeLa细胞一起孵育, 最后在预定时间点捕获CLSMLSM图像以收集基因递送时空信息。如图7所示, 脂质复合物在细胞内的命运与递送时间紧密相关。例如, 在0.5 h, 从“Merge”图可以看出, 发绿色荧光的基因和发红色荧光的载体凝聚形成亮黄色荧光点, 并主要集中在细胞膜附近, 表明复合物处于细胞摄取的初始阶段。在2 h, 细胞内黄色亮点愈发密集, 表明大量的脂质复合物进入细胞中。进一步孵育至4 h后, 可以在整个细胞质中检测到绿色荧光信号。在相同条件下, TPAH的红色通道荧光大大减弱, 表明该时间段已经有相当多的DNA从脂质复合物中分离, 导致红色荧光和黄色荧光大大减弱。随着孵育时间增加到6 h, 可以看到较弱的红色荧光(TPAH通

图7 脂质体TPAH和FAM-DNA复合物在HeLa细胞中不同时间的CLSMLSM成像(网络版彩图)

Figure 7 Time-dependent CLSM images showing the translocation and intracellular distributions of the lipoplexes (color online).

道)、更强的绿色荧光(FAM-DNA通道)和更加明显的颜色分离(合并通道), 并且可以清晰看到绿色荧光标记的DNA进入细胞核(白色箭头所示)。通过使用该种NIR AIE基因载体, 可以清晰地描述整个基因递送过程中细胞摄取、载物核酸的分离以及最终核酸入核的过程。

4 结论

本研究基于[12]aneN₃合成了三苯胺衍生物TPAH作为基因递送和细胞内荧光示踪的非病毒基因载体, 该类载体具有NIR发光和AIE性能的特性。TPAH具有强的DNA结合能力, 并且在和核酸复合时表现荧光增强的性质。通过与辅助脂质DOPE复合制备的脂质体表现出有效的DNA凝聚, 并形成尺寸均匀的球型纳米颗粒, 带有正电性, 在体外可以实现质粒DNA的转染和siRNA的递送抑制表达, 在最佳转染条件下的转染效率和Lipo2000相当。最后, 通过共定位CLSMLSM可以清晰地对基因递送过程进行实时示踪。该研究表明, 开发具有NIR和AIE性质的非病毒基因载体是一种具有吸引力的策略, 可以同时实现基因递送的可视化, 也能为精准基因递送治疗提供一种诊疗一体化的平台。

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- 1 Li Y, Liu L, Ji W, Peng H, Zhao R, Zhang X. *Nano Today*, 2020, 35: 101006
- 2 Zu H, Gao D. *AAPS J*, 2021, 23: 78
- 3 Mohammadinejad R, Dehshahri A, Sagar Madamsetty V, Zahmatkeshan M, Tavakol S, Makvandi P, Khorsandi D, Pardakhty A, Ashrafizadeh M, Ghasemipour Afshar E, Zarrabi A. *J Control Release*, 2020, 325: 249–275
- 4 Lian X, Wei MY, Ma Q. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 386
- 5 Xu Z, Jiang Y, Fan M, Tang S, Liu M, Law WC, Yang C, Ying M, Ma M, Dong B, Yong KT, Xu G. *Adv Opt Mater*, 2021, 9: 2100859
- 6 Yan C, Shi L, Guo Z, Zhu W. *Chin Chem Lett*, 2019, 30: 1849–1855
- 7 Jiang Y, Pu K. *Adv Biosys*, 2018, 2: 1700262
- 8 Chen J, Li S, Wang Z, Pan Y, Wei J, Lu S, Zhang QW, Wang LH, Wang R. *Chem Sci*, 2021, 12: 7727–7734
- 9 Fu W, Yan C, Zhang Y, Ma Y, Guo Z, Zhu WH. *Front Chem*, 2019, 7: 291
- 10 Sun C, Wang Z, Yue L, Huang Q, Cheng Q, Wang R. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 16523–16527
- 11 Sun Y, Wang D, Zhao Y, Zhao T, Sun H, Li X, Wang C, Yang B, Lin Q. *Nano Res*, 2018, 11: 2392–2404
- 12 Ding AX, Tang Q, Gao YG, Shi YD, Uzair A, Lu ZL. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 14367–14378
- 13 Wang B, Chen P, Zhang J, Chen XC, Liu YH, Huang Z, Yu QY, Zhang JH, Zhang W, Wei X, Yu XQ. *Polym Chem*, 2017, 8: 7486–7498
- 14 Huang Y, Chen Q, Lu H, An J, Zhu H, Yan X, Li W, Gao H. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 6660–6666
- 15 Tang F, Liu JY, Wu CY, Liang YX, Lu ZL, Ding AX, Xu MD. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 23384–23395
- 16 Ding AX, Tan ZL, Shi YD, Song L, Gong B, Lu ZL. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 11546–11556
- 17 Sharma D, Singh J. *Bioconjugate Chem*, 2017, 28: 2772–2783
- 18 Cao H, Yang Y, Li J. *Aggregate*, 2020, 1: 69–79
- 19 Liu JY, Liu XY, Liu R, Tang F, Yang JB, Tang Q, Lu ZL, Qiao HJ, He L. *Bioorg Chem*, 2021, 113: 104983
- 20 Liu MX, Ma LL, Liu XY, Liu JY, Lu ZL, Liu R, He L. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 42975–42987

Synthesis and gene delivery properties of [12]aneN₃-based nonviral gene vector with near infrared AIE activity

Fang Tang, Yi-Nan Gao, Xi Zhang, Yu-Shan Zhang, Zhong-Lin Lu*

Key Laboratory of Radiopharmaceuticals, Ministry of Education, College of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

*Corresponding author (email: luzl@bnu.edu.cn)

Abstract: Fluorescent nonviral gene vectors have drawn increasing research interest in trackable gene delivery, which could furnish important spatiotemporal information regarding the translocation and intracellular fate of gene cargoes, thus benefiting to understand the critical steps in determining the transfection efficiency. Herein, we report a triphenylamine derivative, **TPAH**, modified with [12]aneN₃ and a long hydrocarbon chain as a nonviral gene vector. **TPAH** bears typical near-infrared (NIR) aggregation-induced emission (AIE), and the resulting **TPAH**/dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) liposome possesses strong DNA binding ability, capable of compacting nucleic acids into nanoparticles for gene delivery. High transfection efficiency of both plasmid DNAs (pDNAs) and small interfering RNAs (siRNAs) was observed in various cell lines. Under optimal conditions, the best transfection efficiency is comparable to that of commercial transfection agent lipofectamine 2000. The vector as a deliver tracker showing on-demand reporting property was successfully applied to monitor the entire gene delivery process, providing spatiotemporal information regarding the translocation and intracellular fate of gene cargoes. This study suggests that integrating NIR AIE molecules into [12]aneN₃ is a promising strategy to achieve trackable gene delivery.

Keywords: [12]aneN₃, nonviral gene vector, near infrared emission, aggregation-induced emission, bioimaging

doi: [10.1360/SSC-2022-0014](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0014)