

缓释核壳结构利用基因传递用于骨缺损的研究

包丹丹¹,林福星²,汪漠贞²,葛学武²,赵宇¹

摘要 目的 利用巯基烷基化壳聚糖(TACS)与质粒形成纳米粒子,在其外围包裹羟丁基壳聚糖(HBC)用以增加纳米粒子稳定性,并赋予其缓释的功能。方法 利用骨形态发生蛋白4(BMP4)-绿色荧光蛋白(EGFP)融合基因的负电性与TACS的正电性相互作用形成核结构(TACS-pBMP4-EGFP),再与HBC相互作用形成核壳结构(TACS/HBC-pBMP4-EGFP)。利用动态光散射,透射电镜,凝胶电泳,体外转染,Western blot及动物成骨实验验证TACS、HBC对pBMP4-EGFP的包裹及缓释。结果 随着氮磷比增加,TACS-pBMP4-EGFP直径逐渐减小。当氮磷比大于8时,TACS-pBMP4-EGFP直径小于200 nm,包裹HBC后,TACS/HBC-pBMP4-EGFP粒径小幅度增加且电势趋于中性,易于被细胞转染表达出BMP4。流式细胞仪和Western blot结果均显示随着转染时间增加,核壳结构转染率逐渐增高。兔桡骨缺损修复过程中,X线片可见携带核壳结构的缺损处骨密度明显增高,皮质骨连续性较好,呈骨性愈合。结论 TACS/HBC-pBMP4-EGFP具有良好的缓释功能和成骨能力

关键词 壳聚糖;骨形态发生蛋白;转染;缓释;骨缺损;修复
中图分类号 R 33;R 318.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0358-05

骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein4, BMP4)现已成为研究成骨诱导的热点,外源性植入BMP4虽然可以诱导骨形成,但持续时间短。因此基因治疗成为骨缺损研究有效可行的方法。近年来,基因治疗在治疗艾滋病,癌症以及基因紊乱等疾病引起了人们广泛的兴趣^[1]。成功的基因治疗依赖于载体能否将基因成功的运输到细胞内部^[2]。虽然病毒载体转染效率较高,但在病毒再生,免疫性以及致癌性方面存在潜在风险^[3]。壳聚糖的衍生物作为新型的转染试剂,有较高的转染效率,较好的生物相容性以及生物可降解性。利用BMP4-绿色荧光蛋白(enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP)融合基因的负电性与巯基烷基化壳聚糖(thiolated N-alkylated chitason, TACS)的正电性相互作用形成核结构(TACS-pBMP4-EGFP),再与羟丁基壳聚糖

(hydroxylbutyl chitason, HBC)相互作用形成核壳结构(TACS/HBC-pBMP4-EGFP),核壳结构可以很好的将质粒传递到细胞内部并有较好的表达效果,因其包裹有壳结构的HBC,稳定性较好,可以防止质粒提前释放,给予核壳结构缓释的功能及基因治疗骨缺损的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料 人肾上皮细胞(293T细胞)由安徽医科大学免疫实验室提供。pBMP4-EGFP质粒由上海吉凯基因公司完成。质粒抽取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;DMEM高糖培养基、澳洲胎牛血清(FBS)购于美国Invitrogen公司;BMP4抗体购于英国Abcom公司;FuGENE HD转染试剂购于美国Promega公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。仪器由安徽医科大学免疫实验室提供。实验动物由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 TACS和HBC的制备 壳聚糖经碱化、溴代十二烷取代后,丙酮、乙醚和去离子水分别洗涤后干燥,得到TACS^[4]。然后与巯基乙酸混合,缩合、避光反应3 d,透析、冷冻干燥即可制备HBC。

1.2.2 核壳结构的制备 根据TACS以及质粒的结构,TACS平均163分子量含有一个胺基(即氮),质粒平均325分子量含有一个磷,于是在质粒含量一定的情况下调控加入的TACS的质量不同就可以调控最终的氮磷比。按照一定的氮磷比,将TACS与pBMP4-EGFP混合于PBS缓冲液中,室温静置30 min形成TACS-pBMP4-EGFP^[5]。再加入与TACS等量的HBC,室温静置30 min, HBC即被吸附至TACS-pBMP4-EGFP表面形成核壳结构^[6]。

1.2.3 凝胶电泳 制备出氮磷比为0.5、1、2、4、8、16的核及核壳结构备用,以每孔均含0.4 μg质粒的核及核壳结构加入0.8%琼脂糖凝胶中,120 V电压下电泳50 min。再将琼脂糖凝胶置于5 μg/ml溴化乙锭溶液中,20 min后取出凝胶,紫外透射仪观察并记录结果。

1.2.4 体外转染 将293T细胞以 3×10^4 /孔接种于24孔板,待细胞融合80%,弃去培养液,每孔加

2015-12-08 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81171829)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

²中国科学技术大学材料与化学研究部,合肥 230031

作者简介:包丹丹,女,硕士研究生;

赵宇,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: zhaoyuzj@aliyun.com

入含 2 μg 质粒的氮磷比为 16 的核壳结构与不含血清的培养液, TACS-pBMP4-EGFP 作为对照组。4 h 后, 弃去培养液, 加入含血清的培养液。观察转染 1、3、5 d 时荧光显微镜、流式细胞仪以及 Western blot 结果。

1.2.5 Western blot 分别收集转染 1、3、5 d 的细胞, PIRA 裂解液冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 吸取上清液。以 BCA 方法进行蛋白定量, 每孔上样量 30 μg 。BMP4 抗体 1 : 1 000 稀释, 二抗羊抗鼠 IgG (H + L) 1 : 5 000 稀释。ECL 法曝光, 保存图像。图像用 Image J 软件计算各条带密度灰度值, 以目的蛋白的与 β -actin 的比值作为蛋白表达相对含量。

1.2.6 细胞毒性试验 将 96 孔板分 4 组, 每组 5 个复孔, 重复实验 3 次。种板 24 h 后, 弃培养基, 实验组 1 中加入含 1.2 μg 质粒的 TACS-pBMP4-EGFP 的纳米粒子, 实验组 2 中加入含 1.2 μg 质粒的 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 纳米粒子, 对照组中加入含等质量质粒的 promega/pBMP4-EGFP 作为阳性对照组, 全细胞培养液作为阴性对照组以及另设一调零孔。温箱孵育 24 h, 弃去培养基, 每孔加 100 μl 培养基和 10 μl MTT 溶液 (5 mg/ml), 继续培养 4 h。每孔加入 100 μl Formazan 溶剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h。于 570 nm 波长处测吸光度 (optical density, OD) 值, 并计算细胞相对增殖率 (relative growth ratio, RGR), $\text{RGR}(\%) = (\text{OD 实验组值} - \text{OD 空白组值}) / (\text{OD 对照组值} - \text{OD 空白组值}) \times 100\%$ 。

1.2.7 动物模型的制备及成骨检测 将 3 月龄新西兰雄性白兔 12 只麻醉满意后, 消毒铺巾, 于双侧前肢充分暴露桡骨中段, 用咬骨钳形成 18 mm 长的桡骨完全性骨缺损。实验组骨缺损处植入含 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 的脱细胞骨材料, 对照组只植入脱细胞骨材料。分别于术后 0、4、8 周拍摄双前肢 X 线, 观察缺损部位成骨情况。

2 结果

2.1 核及核壳结构的形态结构表征 利用透射电镜观察核及核壳结构形态。氮磷比为 16 时, TACS-pBMP4-EGFP 粒径约 100 nm, 且分布较均一, 见图 1A。TACS/HBC-pBMP4-EGFP 表面可见一层厚度约为 20 nm 的壳结构, 见图 1B。

2.2 动态光散射 氮磷比为 0.5 时, TACS-pBMP4-EGFP 粒径约为 2 000 nm, 电势为 -17.2 mV, 此时 TACS-pBMP4-EGFP 不能完全压缩质粒。增加 TACS, 氮磷比逐渐增大, TACS-pBMP4-EGFP 粒径减

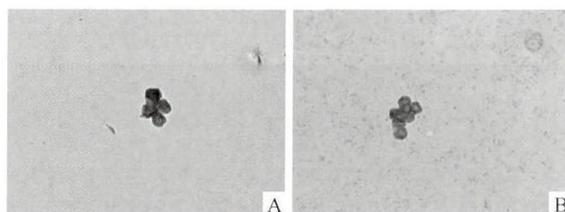


图1 透射电镜图 SP $\times 50\ 000$

A: TACS-pBMP4-EGFP; B: TACS/HBC-pBMP4-EGFP

小。氮磷比为 4 时, TACS-pBMP4-EGFP 电势变为正值, 且粒径小于 500 nm。氮磷比为 16 时, TACS-pBMP4-EGFP 粒径为 124 nm, 此时适合细胞内吞。加入 HBC 形成核壳结构后, 粒径稍增大, 电势更趋近中性, 意味着核壳结构稳定性增加。见图 2。

2.3 凝胶电泳实验 当氮磷比大于等于 4 时, TACS-pBMP4-EGFP 和 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 可以较好得压缩质粒。见图 3。

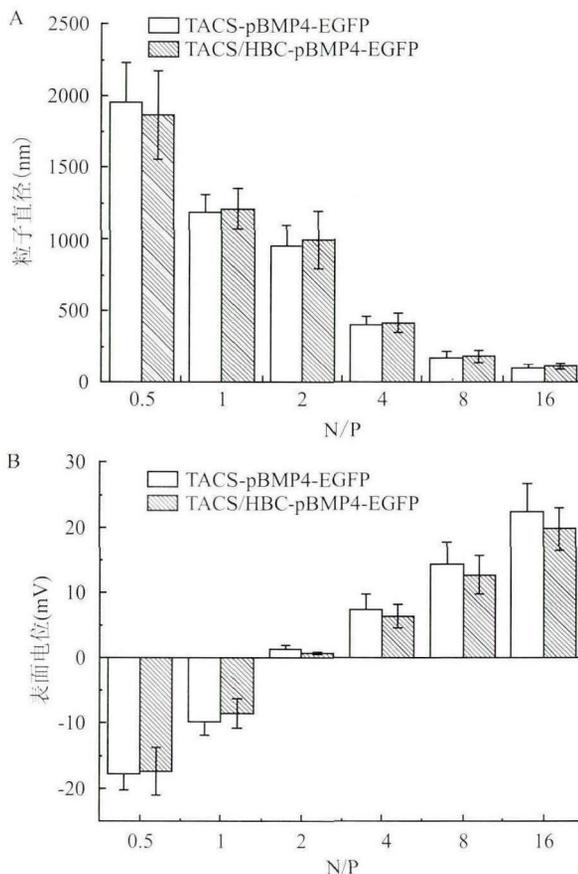


图2 动态光散射结果

A: TACS-pBMP4-EGFP、TACS/HBC-pBMP4-EGFP 在不同氮磷比的直径变化情况; B: TACS-pBMP4-EGFP、TACS/HBC-pBMP4-EGFP 在不同氮磷比的表面电位变化情况

2.4 体外转染 TACS-pBMP4-EGFP 在 1、3、5 d 的绿色荧光点没有明显差别, TACS/HBC-pBMP4-EGFP 的绿色荧光点逐渐增加, 见图 4。流式细胞仪显

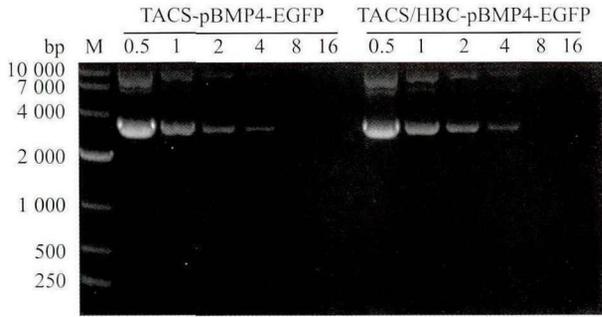


图3 TACS-pBMP4-EGFP 和 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 不同氨磷比时的凝胶电泳实验结果

M: DNA Marker DL 10 000

表明了核壳结构的缓释作用。

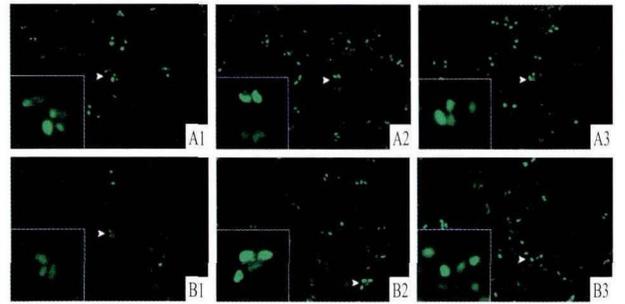


图4 TACS-pBMP4-EGFP 和 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 在转染 1,3,5 d 时的绿色荧光蛋白图片 SP x 100

1: 1 d; 2: 3 d; 3: 5 d; A: TACS-pBMP4-EGFP; B: TACS/HBC-pBMP4-EGFP

示, TACS/HBC-pBMP4-EGFP 在 1 d, 3 d, 5 d 的流式结果分别为 3.16%, 11.25% 和 20.6%, 见图 5。这

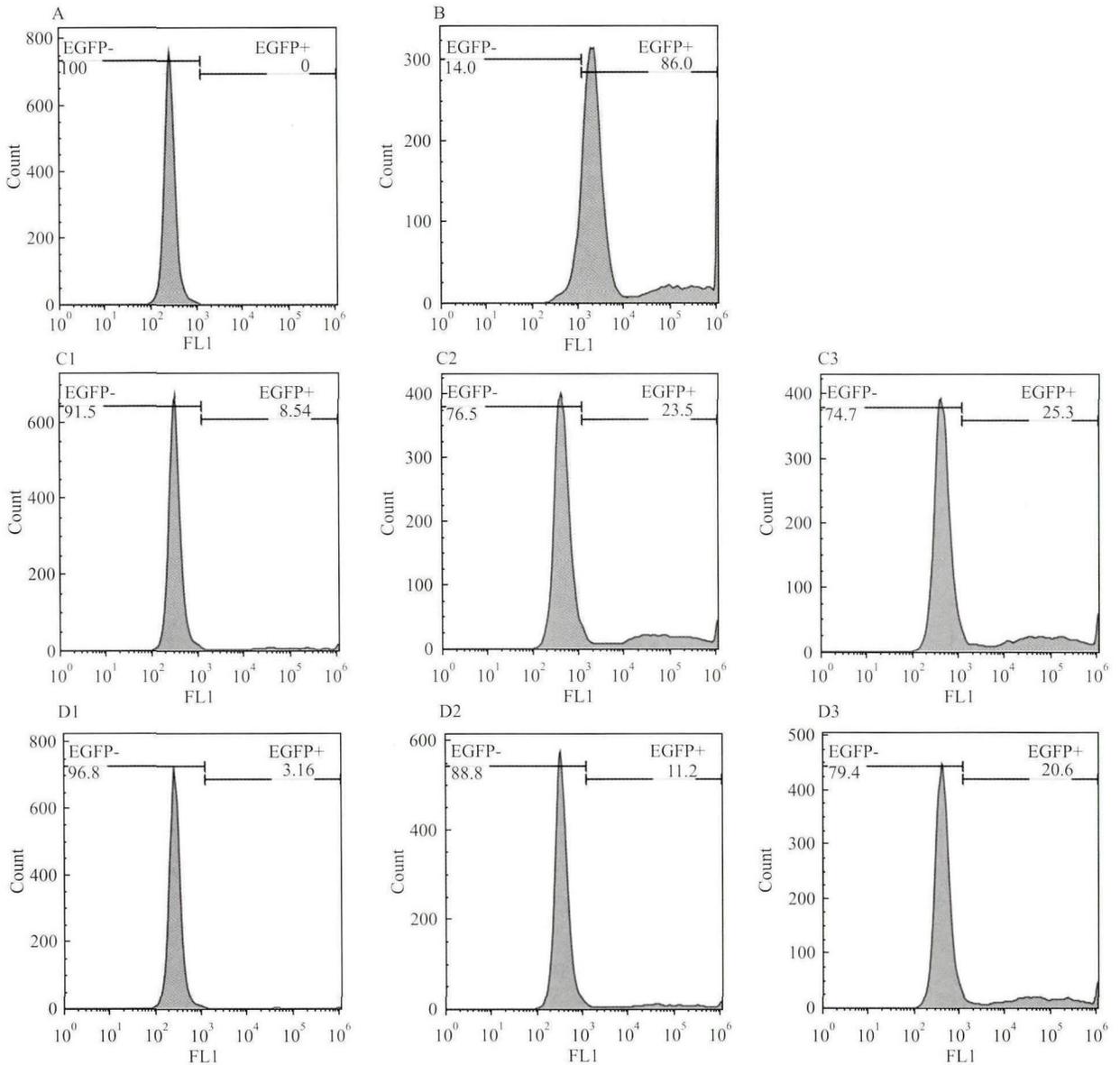


图5 流式细胞仪结果

1: 1 d; 2: 3 d; 3: 5 d; A: 阴性对照; B: promaga/pBMP4-EGFP; C: TACS-pBMP4-EGFP; D: TACS/HBC-pBMP4-EGFP

2.5 Western blot 随着转染时间的增加核壳结构表达的 BMP4 量在递增,见图 6。

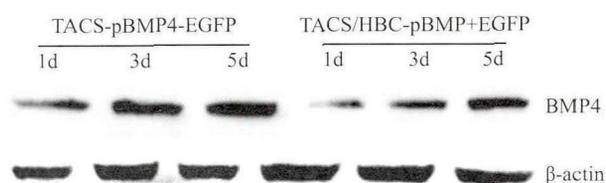


图 6 TACS-pBMP4-EGFP 和 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 在转染 1、3、5 d 时 Western blot 检测 BMP4 表达结果

2.6 细胞毒性试验 3 组细胞 RGR 分别为(87.97 ± 0.31)%、(91.69 ± 0.32)%、(79.94 ± 0.28)%，见图 7。1 和 2 组细胞存活率高于阳性对照组 ($P < 0.05$)。说明与 promega 相比, TACS 和 HBC 的毒性更低。

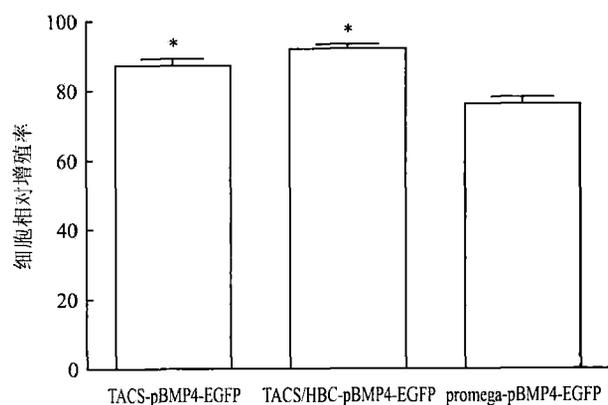


图 7 TACS-pBMP4-EGFP、TACS/HBC-pBMP4-EGFP、HD 转染试剂对 293T 细胞增值率的影响与 promega/pBMP4-EGFP 比较: * $P < 0.05$

2.7 X 线片检查 术后 4 周时实验组骨缺损处密度增加,可见片状阴影;对照组无明显改变。术后 8 周时实验组骨缺损可见骨痂形成,呈骨性愈合,皮质骨连续性较好;对照组无明显改变,见图 8。证明了 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 是一个治愈骨缺损可行的方法。

3 讨论

此外最重要的部分就是质粒的释放,现在最常用的刺激响应释放质粒可以达到很好的转染效果。但是他们往往没有缓释的能力,这在治疗类似于骨缺损之类的疾病上有着一定的劣势。

首先,纳米粒子的粒径的大小对于转染的效果

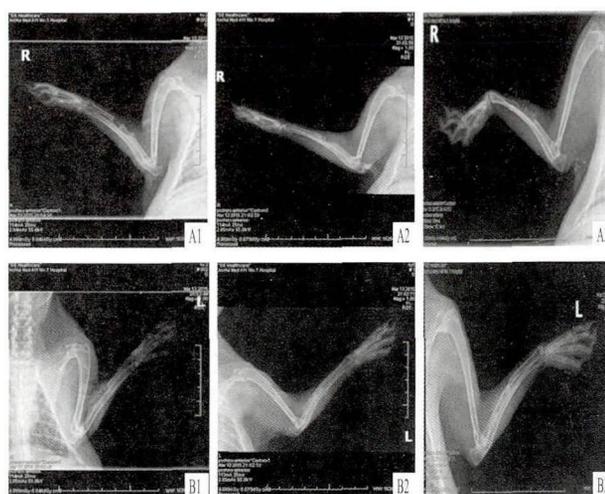


图 8 术后 0 周、4 周、8 周 X 线片

A: 对照组; B: 实验组; 1: 0 周; 2: 4 周; 3: 8 周

有着至关重要的影响,即聚合物是否可以将质粒压缩到一个合适的大小。如果所形成的纳米粒子的粒径过于大的话,那么它不容易被细胞所内吞到内部。通常情况下纳米粒子的直径在小于 200 nm 的时候可以很好的被细胞所内吞。其次,纳米粒子在被细胞内吞之后通常会进入到内涵体之中,为了达到转染的目的需要从内涵体逃逸出来,核壳结构因为具有较多的胺基,所以有质子海绵泵的效果可以使得纳米粒子成功的从内涵体逃逸出来。因此核壳结构具有较高的转染效率。

骨缺损治疗是一个缓慢的过程,一次性将质粒全部释放并不能保证持续的治疗效果。本研究采用的核壳结构有良好的缓释功能,为治疗骨缺损以及类似的病症提供了一个良好的平台。免绕骨缺损修复模型中,携带有 TACS/HBC-pBMP4-EGFP 的实验组骨缺损 4 周、8 周时骨密度明显增高,出现骨性愈合。对照组未见明显差异。因此,推测利用巯基烷基化壳聚糖和羟丁基壳聚糖作为 BMP4 质粒的载体用于治疗骨缺损是一个可行的方法。

参考文献

- [1] Anderson W F. Human gene therapy[J]. Nature,1998,392(4): 25-31.
- [2] Verma I M, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects[J]. Nature,1997,389(9):239-42.
- [3] Behr J P. Synthetic gene transfer vectors II: Back to the Future [J]. Accounts Chem Res,2012,45(7):980-4.
- [4] Li F, Liu W G, De Yao K. Preparation of oxidized glucose-

- crosslinked N-alkylated chitosan membrane and in vitro studies of pH-sensitive drug delivery behaviour[J]. Biomaterials, 2002, 23(2):343-7.
- [5] 赵慧清, 卢华定, 王 昆, 等. 透明质酸修饰壳聚糖/pDNA 纳米微球的制备及体外转染软骨细胞[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(7):1029-32.
- [6] Wang Y, Lin F X, Zhao Y, et al. The sustained-release behavior and *in vitro* and *in vivo* transfection of pEGFP-loaded core-shell-structured chitosan-based composite particles[J]. Int Nanomedicine, 2014, 9(1), 4965-78.

Gene delivery based on sustained releasing core-shell structure for therapy against bone defect

Bao Dandan¹, Lin Fuxing², Wang Mozhen², et al

(¹Dept of Plastic, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Division of Chemistry and Materials, University of Science and Technology of China, Hefei 230031)

Abstract Objective To explore the effects of core-shell structure in releasing plasmid and repairing of bone defect. **Methods** Thiolated N-alkylated chitosan and hydroxylbutyl chitosan were taken to interact with eGFP-BMP plasmid to form TACS/HBC-pBMP4-EGFP. Then dynamic light scattering, Transmission Electron Microscope, agarose gel electrophoresis, *in vitro* transfection, western blot and *in vivo* experiment to test whether they could delivery plasmid into cell and their ability of sustained release. **Results** With addition of thiolated N-alkylated chitosan, the diameter of formed nanoparticle became smaller. When the N/P ratio was 8, the diameter of nanoparticle was less than 200 nm. After forming a shell out of nanoparticle by addition of hydroxylbutyl chitosan, the diameter became a little larger and the zeta potential came to more neutral. We took advantage of some plasmid which contains both the base pair sequence of eGFP and BMP plasmid. The expression of eGFP was tested by flow cytometry and the expression of BMP was examined by Western blot. X-ray showed that more woven bone-like tissue were visible and trabecular-like structure was formed in the experiment group. **Conclusion** TACS/HBC-pBMP4-EGFP owns the ability of sustained release and may be used to repair bone defect.

Key words chitosan; bone morphogenetic protein4; transfection; sustained release; bone defect; repair

(上接第 357 页)

0.05). In the Morris water maze, the model group average escape latency period is higher than that in control group ($P < 0.05$). Compared with the Sham group, the expression of p-MAP2 in model group was obviously lighter in 1 d after CUMS ($P < 0.05$), but continuous high expression from 7 d ($P < 0.05$), reached its highest point in 14 d ($P < 0.05$), and the high expression in 28 d is still very obvious ($P < 0.05$). Compared to control group, the neuronal body was smaller, and the number of neurons was decreased. **Conclusion** The expression level of pMAP-2 protein in the depression model of hippocampus of rats decreases firstly and then increases, which is probably related to the change in the hippocampal volume abnormal of depression.

Key words depression; hippocampus; microtubule-associated protein; rats