

负载肝素及生物素化肝素修饰的纳米粒子的 基质介导基因传递系统*

张 桥¹ 汪 军² 赵 东² 程 巳 雪^{2**}

(¹ 武汉工程大学材料科学与工程学院 武汉 430074)

(² 武汉大学化学与分子科学学院生物医用高分子材料教育部重点实验室 武汉 430072)

摘 要 首先通过静电作用将带负电荷的肝素及生物素化肝素和带正电荷的 PAMAM/DNA 自组装, 分别制备了 PAMAM/DNA/heparin 和 PAMAM/DNA/heparin-biotin 复合物, 然后用快速降解胆酸功能化星型聚(DL-丙交酯)作为基质、并加入水溶性高分子 α, β -聚(*N*-2-羟乙基)-L-天冬酰胺(PHEA)作为添加剂制备了负载这些复合物的薄膜, 用于基质介导基因传递. 研究了这些薄膜在 HeLa 和 293T 细胞中介导基因转染的性能, 体外转染实验表明高分子薄膜能够有效地介导基因传递. 由于生物素的靶向作用, 在复合物中引入生物素化肝素可提高对 HeLa 细胞的转染效率. PHEA 的加入能保护 DNA 的活性从而显著提高转染效率. 在细胞转染过程中, 聚合物降解没有对基因转染产生不利影响.

关键词 基质介导基因传递, 肝素, 生物素, 自组装, 生物降解

基质介导基因传递 (substrate-mediated gene delivery) 也称固相转染 (solid-phase transfection), 是指将 DNA 或载体/DNA 复合物通过物理和化学的方法负载于高分子基质表面或包埋于高分子基质内部. 在分子基质支撑细胞生长的同时控制释放 DNA 或载体/DNA 复合物. 基质介导基因传递系统可以实现对靶组织的基因转染, 避免对非靶组织的毒性, 减少 DNA 在体内被降解的机率, 并且能长时间维持治疗部位 DNA 的浓度^[1, 2].

虽然裸 DNA 可以被直接负载在基质中用于介导基因传递, 但是由于裸 DNA 在体内容易被降解而且细胞对其摄取率低, 导致转染效率通常很低. 为提高基因转染效率, 通常用基因载体缩合 DNA, 形成载体/DNA 复合物, 然后复合物通过负载于基质表面或内部用于介导基因转染^[3]. 基因载体可以有效缩合 DNA, 保护其免受降解, 提高细胞摄取率, 以及促进其从内涵体或溶酶体逃逸^[4, 5]. 此外在复合物的表面引入靶向配体可以增强靶细胞对复合物的摄取率, 从而提高转染效率. 常用的细胞靶向配体主要有维生素、多糖、多肽、蛋白质、抗体等^[6]. 生物素 (维生素 H) 是一种细胞分裂必须的维生素, 对于快速增殖的肿瘤细

胞通常在其表面有过度表达的生物素受体. 因此, 生物素可以作为特定肿瘤细胞的靶向配体用于靶向药物传递系统^[7, 8]. 我们曾用生物素化肝素通过静电作用来修饰聚酰胺-胺 (PAMAM/DNA) 复合物以提高其在特定肿瘤细胞的转染^[9].

基质介导基因传递系统在制备过程中需要干燥, 而 DNA 在干燥时会失活, 因此基质介导的基因转染效率通常较低. 提高基质介导的基因转染效率的一个关键问题是保持 DNA 的活性. 有文献报道添加特定的添加剂, 如一些带羟基的糖类和带羧基的氨基酸, 能保持 DNA 的活性并有助于 DNA 复合物从基质中分离从而提高基因表达水平^[10-12].

本研究中, 我们用快速降解的胆酸功能化星型聚(DL-丙交酯)作为基质负载肝素及生物素化肝素修饰的纳米粒子, 并用可降解水溶性高分子 α, β -聚(*N*-2-羟乙基)-L-天冬酰胺(PHEA)来保护 DNA 复合物的活性. 结果表明, 在 PAMAM/DNA 复合物表面引入肝素和生物素化肝素可以提高转染效率, 由于生物素的靶向作用, 引入生物素化肝素可进一步提高对 HeLa 细胞的转染效率. PHEA 的加入能显著提高固相转染效率. 在细胞转染过程中, 聚合物降解没有对基因转染产生不利影响.

* 庆祝卓仁禧院士 80 华诞专稿; 2011-04-02 收稿, 2011-04-22 修稿; 国家自然科学基金 (基金号 21074099) 资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: chengsixue@whu.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂

聚酰胺-胺(PAMAM)(5代,末端含128个氨基)购自Aldrich,肝素钠和生物素化肝素钠盐购自Sigma,胆酸购自Acros.使用前用甲醇重结晶纯化. DL-丙交酯购自Aldrich,用乙酸乙酯重结晶. 辛酸亚锡 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ 购自Aldrich使用前减压蒸馏纯化后溶解在无水甲苯中. L-天冬氨酸和磷酸均为分析纯(购自上海国药),使用前未经处理. 乙醇胺使用前蒸馏纯化. *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)用 P_2O_5 和 CaH_2 干燥并蒸馏纯化. MTT购自Amresco. 二甲亚砜(DMSO)购自Sigma.

人胚胎肾细胞(293T)和人子宫颈癌细胞(HeLa)购自中国典型培养物保藏中心(武汉). 细胞用含10%胎牛血清、2 mg/mL NaHCO_3 和100 U/mL双抗的DMEM(Gibco)培养基在37℃、5% CO_2 培养箱中培养.

报告基因质粒pGL3-Luc和pEGFP-C1分别购自Promega和Invitrogen. 质粒在*Escherichia coli*中扩增并用E. Z. N. A. fastfilter endo-free plasmid maxi kit(Omega)提取纯化,在超纯水中于-20℃保存.

1.2 聚合物的合成

胆酸功能化星型聚(DL-丙交酯)(CA-(DLL)_n)和 α,β -聚(*N*-2-羟乙基)-L-天冬酰胺(PHEA)依据文献合成^[13,14].

1.3 PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin和PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的制备

将PAMAM溶于去离子水,0.22 μm 灭菌滤头过滤后保存于4℃.将50 μL 的PAMAM水溶液(0.272 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和50 μL 的质粒DNA水溶液(0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)混和均匀,37℃放置30 min,即得含PAMAM/DNA复合物的水溶液.

将2 μL 的肝素水溶液(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)或2 μL 的生物素化肝素水溶液(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)与含PAMAM/DNA复合物的水溶液(0.292 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,含1 μg 的DNA)混合均匀,37℃放置30 min后分别得到含PAMAM/DNA/heparin及PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的水溶液,复合物中heparin/DNA及heparin-biotin/DNA重量比为2.

1.4 用于基质介导基因传递的薄膜制备

制备了9种负载不同复合物的薄膜用于基质介导基因转染,制备细节如下.

表面负载PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin和PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的膜(film 1, film 2, film 3)制备方法如下. 首先用溶剂浇铸的方法在直径14 mm的玻片上滴加40 μL CA-(DLL)_n的氯仿溶液(10 mg/mL). 在溶剂挥发后,将玻片放入真空干燥箱真空干燥24 h. 薄膜用紫外灯照射1 h灭菌. 然后分别将含PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin或PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的水溶液(含1 μg DNA)滴加在CA-(DLL)_n薄膜表面,在超净台内自然干燥.

表面负载PHEA保护的PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin和PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的膜(film 4, film 5, film 6)制备方法如下. 配制2 mg/mL的PHEA水溶液,用0.22 μm 无菌滤头过滤除菌,然后分别将含PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin或PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的水溶液(含1 μg DNA)和100 μL 的PHEA(含0.2 mg PHEA)溶液混合. 再将混合物滴加在CA-(DLL)_n薄膜表面,在超净台内自然干燥.

包封PHEA保护的PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin和PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的膜(film 7, film 8, film 9)制备方法如下. 在无菌的条件下将40 μL CA-(DLL)_n氯仿溶液(10 mg/mL)分别浇铸在film 4, film 5和film 6上,溶剂挥发后,真空干燥.

所有制备的样品在干燥后,放入24孔培养板,保存在干燥器中备用.

1.5 膜的降解研究

聚合物膜在降解前和在37℃浸泡于细胞培养基96 h后的表面形貌由SEM(FEI Quanta 200)观测.

降解前后聚合物的分子量用尺寸排除色谱和多角激光散射分析(SEC-MALLS, Wyatt Technology)联用测定. 将CA-(DLL)_n膜放入细胞培养基内培养降解特定时间后. 用去离子水清洗3次,再放入真空干燥箱40℃干燥2天. 最后用THF溶解聚合物膜,并用SEC-MALLS测量分子量.

1.6 体外转染

将负载PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin和PAMAM/DNA/heparin-biotin复合物的膜的放入24孔培养板孔中. 然后每孔加入 5×10^4 /mL细

胞,在 37℃、5% CO₂ 完全培养基中培养 48 h. 然后除去培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4)轻轻地润洗细胞,再加入裂解液(Promega, 200 μL/孔)充分裂解. 离心后取 20 μL 细胞裂解上清液与荧光素酶底物(Promega, 100 μL)充分混合,用化学发光仪(Lumat LB 9507, Berthold)测定荧光素酶的活性. 细胞裂解液中的蛋白浓度用 BCA protein assay reagent kit(Pierce)试剂盒测定,OD 值用酶标仪(Bio-rad 550)测量,使用的滤光片为 570 nm. 测 3 个平行样,数据以平均值 ± 标准偏差(SD)表示. *P* 值根据统计学显著性检验方法得到,当 *P* < 0.05 时,差异有统计学意义.

增强绿色荧光蛋白的表达由配备有 CCD (Roper CoolSnap Color)的 Olympus IX 70 荧光倒置相差显微镜观察.

1.7 细胞存活率测定

转染后,去除培养基,每孔加入新鲜培养基(1 mL)和 MTT(60 μL, 5 mg/mL),37℃ 培养 4 h. 小心吸除上清,每孔加入 0.8 mL DMSO,轻轻振荡 5 min 后用酶标仪(Bio-rad 550)在 570 nm 处测量溶液的 OD 值. 以 24 孔培养板上培养的细胞的存活率作为对照. 测 3 个平行样,数据以平均值 ± 标准偏差(SD)表示.

1.8 DNA 控制释放测定

分别将制备的 film 1、film 3、film 4、film 6、film 7 和 film 9 浸泡在 1 mL 的 TE(pH 7.5)缓冲液中,在 37℃ 放置一定时间后,将 1 mL 的 TE 缓冲液移入离心管,轻轻涡旋后,取 100 μL 上清用于测量,原液补充 100 μL 新鲜 TE 缓冲液后继续浸泡. 向上清中加入肝素钠使其最终浓度为 10 mg/mL,室温剧烈涡旋 10 min,解离 PAMAM/DNA 复合物,解离出来的 DNA(pGL3-Luc)的浓度用 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit(Invitrogen)试剂盒测定. 测 3 个平行样,数据以平均值 ± 标准偏差(SD)表示.

2 结果与讨论

2.1 DNA 复合物的制备

为制备基质介导基因传递体系,首先需要制备载体/DNA 复合物纳米粒子,然后将这些纳米粒子负载到可降解基质中. 本研究中,为制备载体/DNA 复合物纳米粒子,首先用带正电荷的树形高分子 PAMAM 结合 DNA,形成 N/P 比为 20

的 PAMAM/DNA 复合物,其表面也带正电荷. 肝素(heparin)是一种电负性黏多糖,可通过静电作用与 PAMAM/DNA 结合,形成 PAMAM/DNA/heparin 三元复合物. 电负性的生物素化肝素(heparin-biotin)也可通过静电作用与 PAMAM/DNA 结合,形成 PAMAM/DNA/heparin-biotin 三元复合物. 我们以前的研究表明,当三元复合物中 heparin/DNA 及 heparin-biotin/DNA 重量比为 2 时,DNA 可以被有效地结合在复合物中,水溶液中复合物的粒径小于 150 nm. 与 PAMAM/DNA 复合物相比,由于加入了电负性组份,三元复合物的表面正电荷有所降低^[9].

2.2 用于基质介导基因传递的聚合物

用于基质介导基因传递的负载 PAMAM/DNA, PAMAM/DNA/heparin 和 PAMAM/DNA/heparin-biotin 复合物纳米粒子的可降解高分子为星型聚(DL-丙交酯)(CA-(DLL)_n). 其结构、性质详见我们以前发表的论文^[13]. 由于 CA-(DLL)_n 具有支化结构,而且本研究中所用的样品分子量不是很高($M_w = 5.4 \times 10^3$, $M_w/M_n = 1.37$),因此其降解速率比线型聚(DL-丙交酯)快,适于作为基质来控制释放含 DNA 的复合物^[12].

此外,为了在制备过程中保护 DNA 复合物的活性,我们还在体系中加入水溶性高分子 α, β -聚(*N*-2-羟乙基)-L-天冬酰胺(PHEA)($M_w = 4.2 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1.27$). 制备过程中,将 PAMAM/DNA, PAMAM/DNA/heparin 和 PAMAM/DNA/heparin-biotin 复合物纳米粒子加入到 PHEA 溶液中,然后负载到 CA-(DLL)_n 膜中.

2.3 基质介导基因传递薄膜的制备及表征

用于基质介导基因传递的薄膜共有 9 种,分别是表面负载 PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin 和 PAMAM/DNA/heparin-biotin 的膜(film 1、film 2、film 3),表面负载 PHEA 保护的 PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin 和 PAMAM/DNA/heparin-biotin 的膜(film 4、film 5、film 6),以及包封 PHEA 保护的 PAMAM/DNA、PAMAM/DNA/heparin 和 PAMAM/DNA/heparin-biotin 的膜(film 7、film 8、film 9). 它们的结构归纳在表 1 中.

聚合物膜在降解前和在浸泡于细胞培养基 96 h 后的表面形貌由扫描电镜观测(图 1). 样品 film 1、film 4 和 film 7 在降解前都很平整,在细胞培养液中浸泡 96 h 后,膜的表面出现了许多小孔

和隆起,表明高分子膜发生了降解. CA-(DLL)_n 在细胞培养液中降解不同时间的分子量由 SEC-MALLS 测得,在降解 48、96 和 144 h 后重均分子量分别为 5.3×10^3 ($M_w/M_n = 1.25$), 5.1×10^3

($M_w/M_n = 1.53$) 和 5.1×10^3 ($M_w/M_n = 1.40$). 与普通线型聚乳酸相比, CA-(DLL)_n 的降解速率快,利于及时释放出载体/DNA 复合物以介导基因转染.

Table 1 Structures of complexes loaded films for substrate-mediated gene delivery

Sample	Film structure
Film 1	Top: PAMAM/DNA complexes; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 2	Top: PAMAM/DNA/heparin complexes; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 3	Top: PAMAM/DNA/heparin-biotin complexes; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 4	Top: PAMAM/DNA complexes in PHEA; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 5	Top: PAMAM/DNA/heparin complexes in PHEA; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 6	Top: PAMAM/DNA/heparin-biotin complexes in PHEA; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 7	Top: CA-(DLL) _n ; Middle: PAMAM/DNA complexes in PHEA; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 8	Top: CA-(DLL) _n ; Middle: PAMAM/DNA/heparin complexes in PHEA; Bottom: CA-(DLL) _n
Film 9	Top: CA-(DLL) _n ; Middle: PAMAM/DNA/heparin-biotin complexes in PHEA; Bottom: CA-(DLL) _n

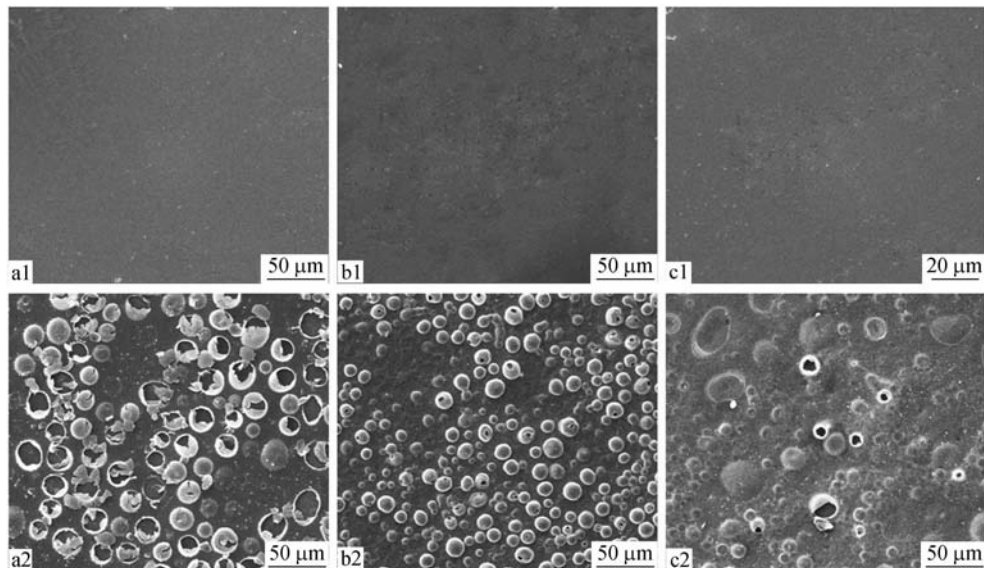


Fig. 1 Surface morphologies of different films before degradation and after degradation for 96 h: (a1, a2) film 1 before degradation/after degradation, (b1, b2) film 4 before degradation/after degradation, and (c1, c2) film 7 before degradation/after degradation

图 2 是 DNA 从不同膜中的释放曲线. 直接将复合物负载在表面的 film 1、film 3、film 4、film 6 释放 DNA 的速率明显快于将复合物包封在内部的 film 7 和 film 9. 对于 film 1、film 3、film 4 和 film 6 它们释放 DNA 的速率基本相当. 对于 film 7 和 film 9, 因为复合物被包封在聚合物膜中, 其释放受 CA-(DLL)_n 的降解控制, 释放较慢, 但由于 CA-(DLL)_n 降解速率较快, 因此在释放 144 h 后, 约有 40% 的 DNA 可被释放出来.

2.4 体外细胞转染研究

不同膜介导 pGL3-Luc 转染 HeLa 细胞的荧光素酶表达结果如图 3. 对于 film 1、film 2 和 film

3, 由于没有添加 PHEA 保护 DNA 活性, 因此基因表达水平较低. 因为在膜制备过程中 DNA 复合物被干燥, 而根据文献报道在此过程中质粒 DNA 的闭环结构可能被破坏, 导致其转染活性丧失^[10]. 图 3 显示, 加入 PHEA 后, film 4、film 5 和 film 6 的转染效率比 film 1、film 2 和 film 3 分别高出两个数量级. 根据我们以前的研究结果, 膜的制备过程对特定的 DNA 复合物的转染活性影响很大, 加入水溶性高分子 PHEA 可以有效保持 DNA 的活性, 从而获得较高的转染效率^[11, 12]. 将 PHEA 保护的 DNA 复合物包封在内部的膜 (film 7、film 8、film 9) 的表达效果则分别低于将 PHEA 保护的

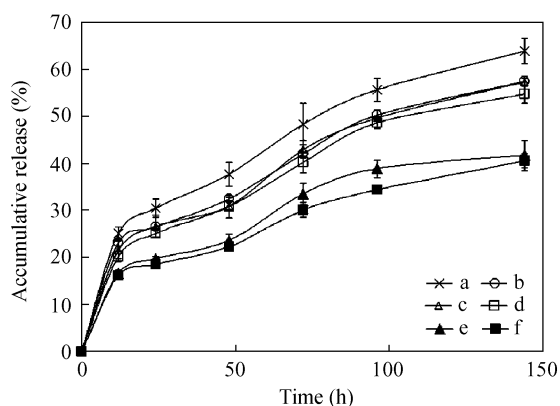


Fig. 2 Release profiles of DNA from different films: (a) film 1, (b) film 3, (c) film 4, (d) film 6, (e) film 7 and (f) film 9

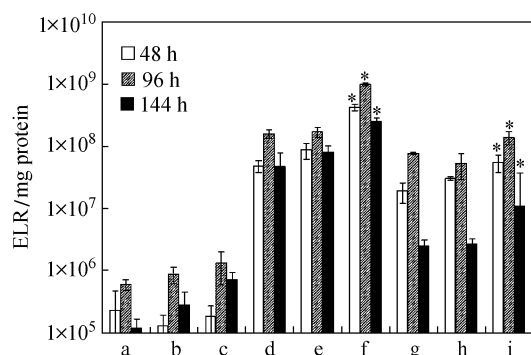


Fig. 3 Luciferase expression of film-mediated transfections in the HeLa cells: (a) film 1, (b) film 2, (c) film 3, (d) film 4, (e) film 5, (f) film 6, (g) film 7, (h) film 8 and (i) film 9

DNA 复合物负载在表面的膜 (film 4, film 5 和 film 6). 这是因为在 film 7、film 8、film 9 表面有一层 CA-(DLL)_n 膜, 虽然它降解速率较快但是仍然减缓了 DNA 复合物的释放速率. 另外, 根据我们以前的研究和文献报道, 膜上的 DNA 复合物也可以直接被贴壁在膜上的细胞吞噬^[15], 而最上层的 CA-(DLL)_n 膜也阻碍 DNA 复合物直接被细胞吞噬, 从而使基因表达水平较低.

此外, 如图 3 所示, 用相同结构的膜负载不同 DNA 复合物介导基因转染的结果表明在大多数情况下, 负载 PAMAM/DNA/heparin 复合物的 film 2 及 film 5 介导基因表达的水平分别略高于负载 PAMAM/DNA 复合物的 film 1 及 film 4. 根据我们以前溶液相转染的研究结果, 通过带正电的 PAMAM/DNA 和带负电的 heparin 间的静电引力自组装形成 PAMAM/DNA/heparin 复合物后, 由于复合物表面的肝素降低了粒子的表面电位, 改

善了细胞相容性, 增强了细胞对复合物的摄取率, 从而使 PAMAM/DNA/heparin 复合物的基因转染效率高于 PAMAM/DNA 复合物^[9]. 与溶液相转染相比, 基质介导基因传递中 PAMAM/DNA/heparin 复合物与 PAMAM/DNA 复合物的转染效率差别较小. 负载 PAMAM/DNA/heparin-biotin 复合物的 film 6 和 film 9 在 HeLa 细胞中介导基因表达水平分别显著高于 film 5 和 film 8 (**P* < 0.05). 我们以前的溶液相转染研究表明通过在复合物表面引入 heparin-biotin 可以显著提高 HeLa 细胞对 PAMAM/DNA/heparin-biotin 复合物的摄取率, 增强溶液相转染效率^[9]. 这是因为复合物表面的生物素可以与 HeLa 细胞表面的生物素受体作用, 通过特异性内吞提高摄取率, 从而显著增强基因表达水平.

HeLa 细胞在 96 h 时的荧光素酶的表达水平明显高于 48 h 时. 对于膜介导的基因传递系统, DNA 复合物通过解吸附作用或聚合物降解被缓慢释放, 随着时间的增加被释放的 DNA 复合物量增加, 因此基因表达水平提高, 但是转染时间大于 96 h 后, 细胞已经长满培养板, 由于细胞的接触抑制作用, 细胞分裂减慢, 导致 144 h 时转染效率下降.

用未经转染在培养板上培养的细胞作为对照, 在不同膜介导转染 96 h 后, HeLa 细胞的存活率用 MTT 法测定, 结果如图 4 所示. 本研究中的细胞毒性主要是由于所负载的 DNA 复合物表面带正电而引起的, 对于 film 7、film 8、film 9, 由于在 DNA 复合物被包封在膜内部, 虽然 CA-(DLL)_n 膜降解很快, 但是 DNA 复合物并没有完全与 HeLa 细胞接触, 所以 film 7、film 8 和 film 9

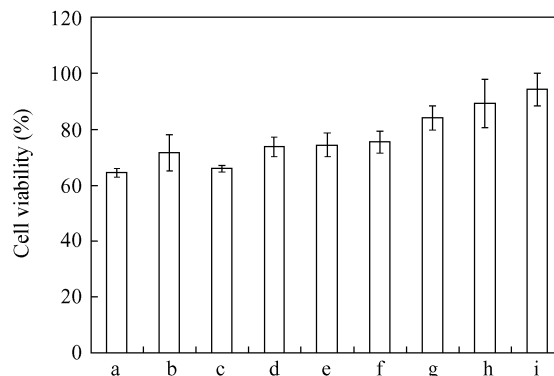


Fig. 4 Cell viability after film-mediated transfections: (a) film 1, (b) film 2, (c) film 3, (d) film 4, (e) film 5, (f) film 6, (g) film 7, (h) film 8 and (i) film 9

的细胞毒性较小,而 film 4、film 5 和 film 6 的细胞存活率略高于 film 1、film 2 和 film 3,这可能是因为 PHEA 的存在减小了 DNA 复合物对细胞的毒性。

为了进一步考察膜介导转染的效率,我们用另外一种报告基因质粒 pEGFP-C1 制备的相同结构的膜转染 HeLa 细胞,结果见图 5。转染 96 h

后,所有膜上的 HeLa 细胞都表达了增强型绿色荧光蛋白。由图 5 可以看出 film 4、film 5、film 6 介导转染表达的绿色荧光蛋白分别明显高于 film 1、film 2、film 3。其中 film 6 介导转染表达的绿色荧光最强。这些绿色荧光蛋白的表达结果与荧光素酶的表达结果是一致的。

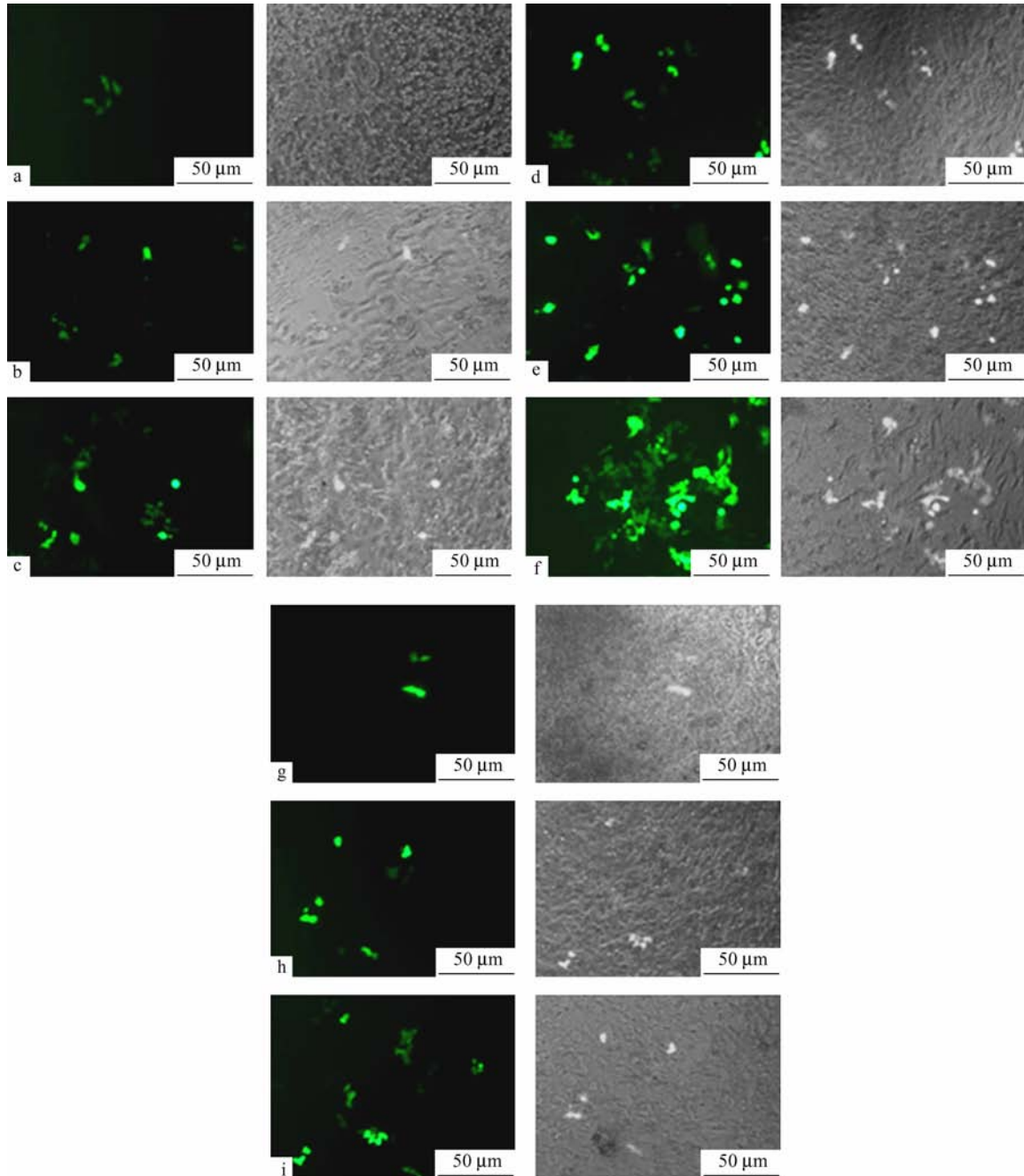


Fig. 5 Enhanced green fluorescent protein expression of film-mediated transfections in HeLa cells: (a) film 1, (b) film 2, (c) film 3, (d) film 4, (e) film 5, (f) film 6, (g) film 7, (h) film 8 and (i) film 9

除了 HeLa 细胞外,我们还研究了膜介导荧光素酶基因在 293T 细胞的转染,结果见图 6。从

图中可见,与 HeLa 细胞类似,加入了 PHEA 保护 DNA 复合物活性后, film 4、film 5、film 6 介导转染

表达的荧光素酶分别高于 film 1、film 2、film 3。由于将 DNA 复合物包封在膜的内部延缓了 DNA 复合物的释放,因此 film 7、film 8、film 9 表达的荧光素酶分别低于 film 4、film 5、film 6。分别比较 film 5 和 film 6 以及 film 8 和 film 9,其基因表达水平没有显著差异,这是因为 293T 细胞膜表面没有过

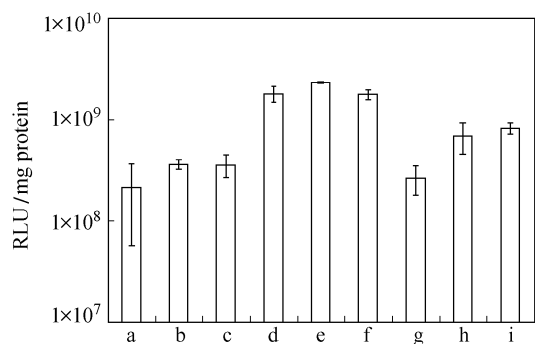


Fig. 6 Luciferase expression of film-mediated transfections in the 293T cells: (a) film 1, (b) film 2, (c) film 3, (d) film 4, (e) film 5, (f) film 6, (g) film 7, (h) film 8 and (i) film 9

度表达的生物素受体,因此 PAMAM/DNA/heparin-biotin 复合物表面的生物素并不能提高 293T 细胞对复合物的摄取率.

3 结论

利用肝素及生物素化肝素修饰 PAMAM/DNA,通过自组装分别制备了 PAMAM/DNA/heparin 和 PAMAM/DNA/heparin-biotin 复合物,并用快速降解的胆酸功能化的星型聚(DL-丙交酯)薄膜负载这些复合物用于介导基因转染.体外细胞转染表明由于生物素的靶向作用,负载 PAMAM/DNA/heparin-biotin 的膜介导基因在 HeLa 细胞中基因表达的水平有所提高,而在没有生物素受体过度表达的细胞中的表达水平与负载 PAMAM/DNA/heparin 的膜相当.添加水溶性高分子 PHEA 可保护 DNA 活性,提高膜介导基因转染的效率.所制备的这些用于基质介导基因传递的薄膜具有良好的生物相容性和较好的基因传递性能,在基因传递领域有广阔的应用前景.

REFERENCES

- Putnam D. *Nat Mater*, 2006, 5: 439 ~ 451
- Fu Huili (付慧莉), Cheng Sixue (程巳雪), Zhuo Renxi (卓仁禧). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2009, (2): 97 ~ 103
- Bonadio J. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 44: 185 ~ 194
- Chen Lei (陈磊), Tian Huayu (田华雨), Chen Xuesi (陈学思), Po Taikuang (朴泰宽), Wan Shanhou (丸山厚), Jing Xiabin (景遐斌). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2009, (6): 499 ~ 505
- Xu C H, Sui M H, Tang J B, Shen Y Q. *Chinese J Polym Sci*, 2011, 29(3): 274 ~ 287
- Chen S, Cheng S X, Zhuo R X. *Macromol Biosci*, 2011, 11: 576 ~ 589
- Yang W J, Cheng Y Y, Xu T W, Wang X Y, Wen L P. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 862 ~ 868
- Patil Y, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. *J Control Release*, 2009, 136: 21 ~ 29
- Zhang Q, Chen S, Zhuo R X, Zhang X Z, Cheng S X. *Bioconjugate Chem*, 2010, 21: 2086 ~ 2092
- Sano A, Maeda M, Nagahara S, Ochiya T, Honma K, Itoh H, Miyata T, Fujioka K. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 1651 ~ 1677
- Fu H L, Cheng S X, Zhang X Z, Zhuo R X. *J Control Release*, 2007, 124: 181 ~ 188
- Zhang Q, Cheng S X, Zhang X Z, Zhuo R X. *Macromol Biosci*, 2009, 9: 1262 ~ 1271
- Zou T, Cheng S X, Zhang X Z, Zhuo R X. *J Biomed Mater Res B*, 2007, 82B: 400 ~ 407
- Neri P, Antoni G, Benvenuti F, Coccola F, Gazzei G. *J Med Chem*, 1973, 16: 893 ~ 897
- Bielinska A U, Yen A, Wu H L, Zahos K M, Sun R, Weiner N D, Baker J R, Roessler B J. *Biomaterials*, 2000, 21: 877 ~ 887

STUDY ON SUBSTRATE-MEDIATED GENE DELIVERY SYSTEMS LOADED WITH HEPARIN AND HEPARIN-BIOTIN MODIFIED NANOPARTICLES

ZHANG Qiao¹, WANG Jun², ZHAO Dong², CHENG Sixue²

(¹ School of Material Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074)

(² Key Laboratory of Biomedical Polymers of Ministry of Education, Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract The negatively charged heparin and heparin-biotin were complexed with the positively charged PAMAM/DNA *via* electrostatic interactions to prepare PAMAM/DNA/heparin and PAMAM/DNA/heparin-biotin complexes, respectively. By using a fast degrading cholic acid functionalized star poly(DL-lactide) as a matrix and a water soluble polymer, α, β -poly(*N*-2-hydroxyethyl)-L-aspartamide (PHEA) as an additive, thin films loaded with PAMAM/DNA, PAMAM/DNA/heparin or PAMAM/DNA/heparin-biotin complexes were prepared. The *in vitro* substrate-mediated gene transfections were carried out in HeLa cells and 293T cells. The results indicated that the complexes loaded polymer films could effectively mediate sustained transfections. The PAMAM/DNA/heparin-biotin complexes loaded polymer films exhibited improved transfection efficiency because the existence of heparin-biotin on the complex surface resulted in an enhanced cellular uptake for HeLa cells due to the specific interaction between the biotin moiety and the biotin-specific receptors on HeLa cells. By adding the water soluble polymer PHEA, which could keep the bioactivity of DNA during the film fabrication, the gene expression levels could be significantly improved. During the cellular transfection, the degradation of the polymer films did not show any negative effects on the gene transfection.

Keywords Substrate-mediated gene delivery, Heparin, Biotin, Self-assembly, Biodegradation