主体分子型非病毒基因载体的基础应用

刘 涛 陈 龙 侯 森 薛永来 冯喜增*

(南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071. * 联系人, E-mail: xzfeng@nankai.edu.cn)

摘要 设计并制备了一种新的具有分子探针功能的主体分子型非病毒载体-邻菲啰啉- β -环糊精衍生物主体分子(DZY-1), 应用凝胶电泳法研究探讨了 DZY-1 与 DNA 相互作用及客体分子对该主体分子诱导 DNA 凝聚的影响; 并进一步研究探讨了单一主体分子、主/客体分子配合物诱导 DNA 分子凝聚和聚合所形成的超分子聚合物抗限制性内切酶(*Hind* III)酶解的特性. 应用扫描电子显微镜(SEM)观测到该主体分子、主/客体分子配合物与 DNA 分子相互作用形成超分子聚合物的微观结构形态. 阐述了其作为非病毒基因载体可能的传递机制, 为设计、制备新的非病毒基因载体提供了一种新途径.

关键词 邻菲啰啉- β -环糊精衍生物 λ -非病毒基因载体 凝胶电泳 扫描电子显微镜

基因治疗是一种将外源基因导入目的细胞并有效表达, 从而达到治疗目的的方法, 优良的基因传递系统要能包裹和保护核酸物质, 避免内涵体降解, 并能专一靶向肿瘤部位, 因此开发高效、安全的基因传递系统是癌症基因治疗中最具挑战性的课题之一. 载体问题一直是基因治疗研究领域的核心技术之一, 基因载体主要分为病毒载体和非病毒载体两类: (1) 病毒载体有逆转录病毒、腺病毒、疱疹病毒、慢病毒等^[1,2], 其优点是病原性低、转染率高, 但作为一种改造的病毒, 其价格昂贵, 容易引发机体强烈的免疫反应并可能致癌, 其安全性低等缺点在临床应用还较困难; (2) 非病毒载体如阳离子聚合物^[3,4]、阳离子多肽^[5,6]和阳离子脂质体^[7,8]等, 具有价格低、操作简单、安全、有效、无免疫原性等优点^[9~11], 已渐成为病毒类基因载体最有希望的替代者.

β -环糊精(β -CD)是环状低聚葡萄糖, 呈筒状结构, 其一定尺寸的疏水性内腔可与很多分子通过弱的相互作用形成主-客体超分子配合物. 目前, 设计和合成各种具有功能性基团的新型环糊精衍生物作为超分子主体分子, 探讨主-客体分子的相互识别作用、构筑纳米尺度的分子组装体, 以及功能基团的特性等一直是化学、生物学和药学等领域关注的热点^[12,13].

本文利用新合成的邻菲啰啉- β -环糊精衍生物(DZY-1)作为具有探针功能的主体分子, 研究探讨其作为主体分子型基因载体与 DNA 的相互作用, 阐述其作为非病毒基因载体的传递机制.

1 实验

1.1 试剂和仪器

β -环糊精购自上海试剂厂; λ -DNA, 限制性内切酶 *Hind* III 均购自 TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co Ltd; 1-金刚烷胺(1-adamantanamine hydrochloride, AM)购自 ACROS Organics; pH 8.0 的 TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA; TBE 电泳缓冲液: 89 mmol/L Tris-硼酸, 2 mmol/L EDTA. BIO-RAD 琼脂糖凝胶电泳系统: Sub-Cell GT, POWER/PAC3000; 日本日立公司 X-650-扫描电子显微镜. 实验用水均为去离子的三蒸水; 其他所用试剂均为分析纯.

1.2 邻菲啰啉- β -环糊精衍生物(DZY-1)的合成

(1) 2-(4'-羟基苯)咪唑[5,6-f]1,10-邻菲啰啉(简称 HOP)的合成: 邻菲啰啉用浓硝酸氧化生成 1,10-邻菲啰啉-5,6-酮, 然后 1,10-邻菲啰啉-5,6-酮与对羟基苯甲醛在醋酸铵和冰醋酸的溶液中回流反应 1 h 生成 HOP; (2) 单-(6-对甲苯磺酰基)- β -环糊精(简称 6-OTs- β -CD)的合成: β -环糊精在氢氧化钠溶液中与对甲苯磺酰氯的乙腈溶液反应生成 6-OTs- β -CD; (3) HOP 与 6-OTs- β -CD 在 DMF(20 mL)溶液中, 于 80 °C 下反应 24 h 生成产物 DZY-1, 其相应的合成流程图 1 所示.

1.3 主体分子型基因载体(DZY-1)与 λ -DNA 相互作用的实验方法

(1) 用 TE 缓冲液分别配制浓度为 0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 λ -DNA 溶液和 3 mg/mL 的 DZY-1 储备液; (2) 按一定

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972005-1364>

图1 主体分子型非病毒基因载体的制备流程图及其结构

比例分别移取上述 λ -DNA, DZY-1 溶液, 并用 TE 缓冲液定用体系, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30 min; (3) 吸取一定量的上述样品液与电泳缓冲液混匀后, 上样于 0.5% 琼脂糖凝胶样孔内, 在 80 V 电压下电泳 100 min, 经紫外检测、记录实验结果。

1.4 主-客体分子 1:1 配合物基因载体(DZY-1/AM)与 λ -DNA 相互作用的实验方法

(1) 用 TE 缓冲液分别配制浓度为 0.06 μ g/ μ L 的 λ -DNA 溶液, 0.338 mg/mL 金刚烷胺溶液和 3 mg/mL 的 DZY-1 储备液; (2) 主-客体分子 1:1 配合反应体系: 将 0.338 mg/mL 金刚烷胺溶液与 3 mg/mL DZY-1 溶液, 按其摩尔比 1:1 混均并于室温下反应 1 h 后备用; (3) 按一定比例分别移取上述 DZY-1/金刚烷胺 1:1 配合液, λ -DNA 溶液, 并用 TE 缓冲液定用体系, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30 min; (4) 按 1.3 节(3)操作进行。

1.5 超分子凝聚体的抗酶解实验方法

(1) 按上述实验方法制备 λ -DNA/DZY-1, λ -DNA/(DZY-1/AM)相互作用而形成的两种超分子凝聚体体系溶液; (2) 分取上述复合物溶液各 20 μ L, 加入 2 μ L Hind (15 U/ μ L), 4 μ L 的 10 $\times$ M buffer, 14 μ L 三重蒸馏水使反应体系的总体积为 40 μ L, 并于 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶解反应 1 h; (3) 按 1.3 节(3)操作进行。

1.6 扫描电子显微镜检测法

(1) 依上述方法制备 λ -DNA/DZY-1 体系, λ -DNA/(DZY-1/AM)体系形成的超分子凝聚体溶液; (2) 分取上述两种不同体系的溶液 10 μ L, 滴加到经新解理的 2 cm 2 云母片表面上, 用氮气保护, 吹干; (3) 分别对

上述样品镀金膜后, 用扫描电子显微镜观测并记录实验结果。

2 结果与讨论

2.1 主体分子型、主-客体分子复合型基因载体与 λ -DNA 的相互作用

首先研究探讨了 λ -DNA/DZY-1 体系, λ -DNA/(DZY-1/AM)体系, 以及 λ -DNA/AM 体系的相互作用, 其相应体系的凝胶电泳结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出: (1) 在 λ -DNA/DZY-1 相互作用的体系中(2-4 泳道), 当 DZY-1 含量增加到一定浓度时, 由于其分子间的相互作用而诱导 DNA 分子凝聚增加, 并聚合形成较大分子量的 DZY-1/ λ -DNA 聚合物, 从而导致其电泳速率减慢(4 泳道); (2) 在 λ -DNA/(DZY-1/AM)相互作用的体系中(6~10 泳道), 其相应的电泳结果也表明: 在相对较低的(DZY-1/AM)浓度下, 即可诱导 λ -DNA 凝聚、聚合形成 DNA/(DZY-1/AM)超分子凝聚体, 而在较高的(DZY-1/AM)浓度下, 形成的较大凝聚体在此实验条件下仍有部分聚合体滞留于上样孔中(8~10 泳道), 反映出客体分子(AM)的加入可促进 DZY-1 与 λ -DNA 的相互作用; (3) 在 AM/ λ -DNA 的相互作用体系中(12~16 泳道), 其相应的电泳条带基本在同一水平线上。

由上述电泳结果表明: λ -DNA /DZY-1 体系, λ -DNA/(DZY-1/AM)体系的超分子凝聚体的形成主要是由于 DZY-1 与 λ -DNA 相互作用而形成; 而客体分子的介入将有利于 DZY-1 与 λ -DNA 的相互作用; 但单纯的客体分子对 λ -DNA 无诱导凝聚作用。初步证

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
[DNA](ng/ μ L)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0
[DZY-1](μ g/ μ L)	0	0.3	2.7		0	0.3	7.5	10.5	13.5		0	0	0	0	0	0	
[AM](μ g/ μ L)	0	0	0		0	0.03	0.09	0.12	0.15		0	0.03	0.9	0.12	0.15

图 2 λ -DNA/DZY-1 相互作用的凝胶电泳图

图 3 DZY-1 与 DNA 相互作用的模拟计算模型

实 DZY-1 具有主体分子型非病毒基因载体的功能,即可以与 DNA 相互作用诱导形成凝聚-聚合物,又可携带客体分子与 DNA 相互作用诱导形成了超分子识别凝聚-聚合物。

为了进一步阐明 DZY-1 诱导 DNA 凝聚的机理,应用 Argus Lab 计算软件对其相互作用的结合模式进行了初步的模拟计算,结果如图 3 所示。图 3(a)为 DZY-1 与 DNA 相互作用的球棒模型;图 3(b)为 DZY-1 球棒模型与 DNA 球状累积模型的相互作用模型。

由初步的模拟计算结果推测:在 λ -DNA/ DZY-1 体系中凝聚体的形成机制主要是由于 DZY-1 中的 2-(4'-羟基苯)咪唑[5,6-f]1,10-邻菲啉的探针分子,通过相嵌的作用模式与 DNA 双螺旋结构相互作用,诱导 λ -DNA 凝聚,进而聚合为 DZY-1/ λ -DNA 聚合体;而在 λ -DNA/(DZY-1/AM)体系中,由于 DZY-1 与 AM

分子识别结合的摩尔比为 1:1,当客体分子进入到该主体分子的疏水空腔中,使得 DZY-1 分子结构中的探针分子更加外露,增加了探针分子与 DNA 的相嵌作用,促进了 DNA 的凝聚、聚合的形成效率。因此我们认为 DZY-1 是一种具有分子探针功能的主体分子型非病毒基因载体,相关的分子动力学作用机制的研究正在进行中。

2.2 主体分子型、主-客体分子复合型基因载体与 λ -DNA 相互作用形成超分子凝聚体的抗 *Hind* 酶解特性

为了进一步探讨 DZY-1 作为主体分子型非病毒基因载体与 λ -DNA 形成凝聚-聚合物的稳定性,我们利用已知的 *Hind* 限制性内切酶对 λ -DNA 具有酶切作用的特性,在体外条件下研究探讨了 λ -DNA/ DZY-1 体系所形成的凝聚-聚合物的抗酶解特性,其实验结果如图 4 所示。

Lane	1	2	3	4	5	6	7
[DNA] (ng/ μ L)	3	3	3		3	3	3
[DZY-1] (μ g/ μ L)	0	0.3	0.9		0	0.3	0.9
[DNaseI] (30U)	-	-	-		+	+	+

图4 DZY-1/ λ -DNA 超分子凝聚体酶解变化的电泳图

从图4的电泳结果可以看出:在 λ -DNA/DZY-1体系中(1~3泳道),随着DZY-1浓度的增加,其相应DNA条带的电泳速率逐渐减慢、滞后,其原因是由于DZY-1的相嵌结合作用,首先诱导DNA分子凝聚增加,进而聚合形成较大分子量的 λ -DNA/DZY-1聚合物。(2)在相应的酶解实验中(5~7泳道),当不含DZY-1时可以清晰地看到被Hind酶切后的不同分子量大小的4条DNA条带(5泳道),随着DZY-1浓度的增加酶切条带减少、变浅,甚至消失,表明在此体系中随着DZY-1浓度的增加,其诱导 λ -DNA的凝聚、聚合程度也相应地增加,所形成的聚合物阻止了Hind内切酶对 λ -DNA的酶解作用。结果表明:一方面DZY-1分子中的分子探针可诱导 λ -DNA凝聚、聚合,另一方面其作为基因载体可以保护结合的外源DNA或基因在基因转导过程中免受相应酶的消化,进而可提高基因转染的效率。

我们进一步研究探讨了主-客体分子复合型基因载体与 λ -DNA相互作用形成超分子凝聚体的抗Hind酶解特性,其电泳实验的结果如图5所示。

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
[DNA] (ng/ μ L)	3	3	3	3	3	3	3	3
[DZY-1] (μ g/ μ L)	0	0.3	0.9	1.35	0	0.3	0.9	
[AM] (μ g/ μ L)	-	-	-	-	-	0.03	0.1	
[DNaseI] (30U)	+	+	+	+	+	+	+	+

图5 客体分子/DZY-1/ λ -DNA 超分子凝聚体酶解变化影响的电泳图

从图5中可以看出:在 λ -DNA/DZY-1体系中,当其浓度比为1:450时尚有一定的酶解作用(5泳道);而在 λ -DNA/(DZY-1-AM)体系中,当其质量浓度比大于1:100时已经无酶解作用。实验结果进一步表明:DZY-1作为含有探针分子的主体分子型非病毒载体,其分子探针可与外源DNA相互作用并诱导DNA凝聚、聚合;主体分子的 β -环糊精桶状结构空腔又可携带客体分子(药物分子或活性物质)与DNA形成超分子凝聚体复合物,而客体分子可增加DZY-1与DNA的相互作用,促进其诱导DNA凝聚、聚合,并增强其形成的超分子复合物的抗Hind内切酶对 λ -DNA的酶切作用;在一定浓度下形成的超分子凝聚体复合物对相应的酶具有抗酶解的特性,对其在基因转导过程中免受相关酶的消化,从而提高了基因转染的效率。

2.3 主体分子型、主-客体分子复合型基因载体与 λ -DNA相互作用结构形态的SEM观测

我们进一步应用SEM对主体分子型、主-客体分子复合型基因载体与 λ -DNA相互作用的结构形态进行了观测,在 λ -DNA/DZY-1体系和 λ -DNA/DZY-1(AM)体系中,其相应的质量浓度比均为1:300,反应时间均为30 min时,其相互作用所形成聚合体的表观结构形态的SEM结果如图6所示。

从SEM结果可以看出,在 λ -DNA/DZY-1体系中,DZY-1与 λ -DNA相互作用可形成球状及环状凝聚体,其凝聚体的直径在200~400 nm间(图6(a));而在 λ -DNA/(DZY-1/AM)体系中,可观测到由于含有客体分子金刚烷胺, λ -DNA/(DZY-1/AM)体系相互作用也可形成球状及环状凝聚体,但其直径均大于600 nm(图6(b))。我们认为,基因载体在与DNA的相互作用过程中,由于载体浓度的不同以及相应的反应时间的不同,其所形成的凝聚体形态、大小均有所不同;这对于研究在生理条件下,DNA紧密包装的机制、基因转导,以及基因治疗等均具有非常重要的意义。有关主体分子型、主-客体分子复合型基因载体与DNA相互作用诱导其结构形态变化的SEM及原子力显微镜(AFM)的研究,以及相应的基因转导、细胞内表达的进一步研究均正在进行中。

3 结论

本文报道了一种具有分子探针功能的主体分子型非病毒基因载体(DZY-1)的设计和制备方法;应用

图 6 DZY-1 与 λ -DNA 相互作用的 SEM 结果(a) λ -DNA/DZY-1 体系的 SEM 结果; (b) λ -DNA/(DZY-1/AM)体系的 SEM 结果

凝胶电泳法研究探讨了 DZY-1 与 DNA 的相互作用, 实验结果表明, 其探针分子可与外源 DNA 相互作用并诱导 DNA 凝聚、聚合, 而主体分子中 β -环糊精的桶状结构空腔又可携带客体分子(药物分子或活性物质)并与 DNA 形成超分子凝聚体复合物, 且客体分子可促进超分子凝聚体复合物的形成; 在一定浓度下形成的超分子凝聚物对相应的限制性内切酶又具有一定的抗酶解特性, 进一步表明该主体分子型非病毒基因载体在基因转导过程中, 即可与 DNA 相互作用诱导凝聚, 又可使聚合的 DNA 免受相应酶的酶切消化, 因此提高基因转染的效率. 为设计、制备新的非病毒基因载体提供了一种新的方法与途径.

致谢 作者衷心感谢 Lee Im Shik 教授在分子动力学模拟计算方面的大力协助. 本工作为国家自然科学基金重大项目(批准号: 90403140), 南开大学留学回国人员启动经费(批准号: A01544)、教育部留学回国人员启动经费(批准号: B04970), 以及天津市科技发展基金(批准号: TJ12317970)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Bonadio J, Goldstein S A, Levy R J. Gene therapy for tissue repair and regeneration. *Advanced Drug Delivery Review*, 1998, 33(1): 53~69[DOI]
- 2 Winn S R, Hu Y H, Sfeir C, et al. Gene therapy approaches for modulating bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Review*, 2000, 42: 121~138[DOI]
- 3 Parker A L, Oupicky D, Dash P R, et al. Methodologies for monitoring nanoparticle formation by self-assembly of DNA with poly

(L-lysine). *Anal Biochem*, 2002, 302 (1): 75~80[DOI]

- 4 Vijayanathan V, Thomas T, Thomas T J. DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene delivery. *Biochemistry*, 2002, 41(48): 14085~14094[DOI]
- 5 McKenzie D L, Kwok K Y, Rice K G. A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 9970~9977[DOI]
- 6 Scherer F, Anton M, Schillinger U, et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 2002, 9(2): 102~109[DOI]
- 7 Brunner S, Sauer T, Carotta S, et al. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*, 2000, 7(5): 401~407[DOI]
- 8 Sakurai F, Inoue R, Nishino Y, et al. Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical, characteristics, cellular uptake, and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression. *J Controlled Release*, 2000, 66(3): 255~269[DOI]
- 9 Wagner E. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Advanced Drug Delivery Review*, 1999, 38(3): 279~289[DOI]
- 10 黄世文, 卓仁禧. 高分子基因传递载体研究进展. *科学通报*, 2003, 48(5): 405~409[摘要]
- 11 王幽香, 沈家骢. 超分子组装构建非病毒基因载体传递体系的研究进展. *科学通报*, 2004, 49(9): 819~824[摘要]
- 12 Lee J W, Selvapalam S N, Kim H J, et al. Cucurbituril homologues and derivatives: New opportunities in supramolecular chemistry. *Acc Chem Res*, 2003, 36: 621~630[DOI]
- 13 Engeldinger E, Armspach D, Matt D. Capped cyclodextrins. *Chem Rev*, 2003, 103 (11): 4147~4173[DOI]

(2005-08-30 收稿, 2005-10-31 接受)