

新型非病毒三元复合 DNA 载体的研究 *

宋存先^{1)**} 张琳华¹⁾ 张超¹⁾ LEVY RJ²⁾

¹⁾ 中国医学科学院 生物医学工程研究所, 天津市生物材料重点实验室, 天津 300192;
中国协和医科大学

²⁾ Childrens Hospital of Philadelphia, PA 19104, USA)

摘要 基因治疗是未来临床医学最具潜力的治疗方式, 目前阻碍临床基因治疗发展的主要因素是缺乏安全和高效的基因载体, 因此研究理想的非病毒转基因载体具有重要的意义. 构建了由质粒 DNA(D)- 抗 DNA 抗体(A)- 阳离子脂质体(C)组成的三元复合纳米基因载体(DAC), 研究表明, 三组分在磷酸缓冲液中可通过分子组装形成复合纳米胶束, DAC 在细胞培养中表现出显著高效的基因表达, DAC 在血管平滑肌细胞中的基因转染效率比不含抗 DNA 抗体的二元组合(DC)高 4 倍, 比不含阳离子脂质体的二元组合(DA)约高 11 倍. 激光共聚焦荧光显微观察证明, DAC 细胞摄取量和 DNA 进入细胞核的量均明显高于对照组, 而 DC 二元组合(不含抗 DNA 抗体)的 DNA 很少进入细胞核, 细胞在 DAC 存在下生长正常. 未发现细胞毒性. 研究结果提示, DAC 的作用机理主要是三元复合胶束中 DNA 的装载量比二元载体大得多, 抗 DNA 抗体与阳离子脂质体的协同作用明显有利于 DNA 被细胞摄取和胞吞, 从而提高了基因的转染和表达.

关键词 抗 DNA 抗体, 质粒 DNA, 阳离子脂质体, 三元复合纳米基因载体

学科分类号 Q782

基因载体一直是人们研究的焦点, 病毒载体^[1,2]是高效基因载体, 但存在着难以克服的弊端, 尤其是宾夕法尼亚大学出现首例因为腺病毒载体的免疫反应致死病例后^[3], 腺病毒载体的应用受到置疑. 非病毒载体中的质粒载体是安全性最佳的基因载体^[4~6], 而且具有制备容易, 储存方便、不受插入基因大小限制等优点, 但转染效率低严重限制其应用于基因治疗. 为了提高质粒 DNA 的转染效率, 人们试验过多种载体, 阳离子脂质体是最为成功的一种, 可显著提高质粒 DNA 的转染效率, 但根据现在研究的关于阳离子脂质体促进质粒 DNA 转染的机制^[7], 其对质粒 DNA 的保护及转运作用仅限于细胞外及细胞浆, 在基因进入细胞核前, 阳离子脂质体同质粒 DNA 解离, 也就是说, 质粒 DNA 进入细胞核是随机过程, 有研究认为大约只有千分之一的胞浆内质粒 DNA 能够进入细胞核并进行转录和翻译, 表达目的蛋白. 所以, 质粒 DNA 进入细胞核是转染最关键的限速步骤. 如何有效利用阳离子脂质体和质粒 DNA 的优点, 并增加质粒 DNA 进入细胞核以提高转染效率一直是研究热点. 为此, 我们设计并制备了一种包含质粒 DNA- 抗 DNA 抗

体 - 阳离子脂质体的三元复合纳米基因载体 (DAC), 在细胞水平验证了其能有效地促进质粒 DNA 进入细胞核, 提高质粒 DNA 的转染效率, 并初步研究了其作用机理.

1 材料

Lipofectin 购于 Sigma 公司. 鼠抗牛 DNA 单克隆抗体(IgM)购于美国 US Biological 公司. 纯化多克隆非特异性抗体 IgM 购自美国 Rockland 公司. 鼠动脉平滑肌细胞株(A10)由美国 Tissue Type Collection 提供. pEGFP-C1 质粒 DNA 由北京协和医院谷丽博士友情赠送, 使用德国 QIAGEN 公司无内毒素试剂盒提取和纯化. 标记试剂盒 Label IT™ labeling Kits 购于 Mirus-Pan Vera 公司. 含 4,6- 二脒基 -2- 苯基吡啶(DAPI)的 Vectashield® 荧光封固剂购自美国弗吉尼亚州伯林格姆 Vector Laboratories. 其他试剂均为市售分析纯.

*国家自然科学基金资助项目(50473059, 50673100), 天津市应用基础重点资助项目(043803011).

** 通讯联系人. Tel: 022-87892052, E-mail: scxian@eyou.com

收稿日期: 2006-12-27, 接受日期: 2007-01-31

2 方 法

2.1 DAC 三元复合纳米胶束的制备

10 μg pEGFP-C1 用 PBS 稀释至 25 μl , 10 μg 鼠抗牛 DNA 抗体用 PBS 稀释至 20 μl , 将二者混合后, 轻轻混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 加入 5 μl lipofectin (用 DMEM 或 PBS 稀释至 25 μl), 室温放置 35 min, 即制得质粒 DNA- 抗 DNA 抗体 - 阳离子脂质体(DAC)三元复合纳米胶束. 用同样的方法制备质粒 DNA- 阳离子脂质体(DC)组、质粒 DNA- 抗 DNA 抗体(DA)组、DNA- 非特异性抗体 - 阳离子脂质体(DIgMC)组作为对照组, 其中 DC 组指使用 pEGFP-C1 和 lipofectin, 而不加抗 DNA 抗体, DA 组指使用 pEGFP-C1 和抗 DNA 抗体, 而不加 lipofectin, DIgMC 组指使用非特异性抗体代替 DAC 中的抗 DNA 抗体.

2.2 DAC 三元复合纳米胶束的表征

2.2.1 DAC 三元复合纳米胶束粒径及 Zeta 电位的测定. 采用 Brookhaven 90 plus 粒子仪和 Zetaplus δ 电位分析仪对 DAC 三元复合纳米胶束及其对照组进行粒径及 Zeta 电位测定. 将无菌、无尘制备的 DAC、DC、DA、DIgMC 加入检测瓶, 上机测试.

2.2.2 DAC 三元复合纳米胶束中质粒 DNA 含量的测定.

使用相同剂量的质粒 DNA(pEGFP-C1, 10 μg) 分别制备 DAC 和 DC 粒子, 用 0.2 μm 滤膜过滤除去未结合的质粒 DNA 后, 重悬粒子, 用酚 / 氯仿抽提出纳米胶束中的质粒 DNA, 乙醇沉淀, 用紫外分光光度计测定 A_{260} 值, 计算质粒 DNA 含量.

质粒 DNA 含量 = $\text{pDNA}_1 / \text{pDNA}_0 \times 100\%$

其中, pDNA_1 指抽提复合纳米胶束得到的质粒 DNA 的量, pDNA_0 为制备时加入质粒 DNA 的量.

2.2.3 DAC 三元复合纳米胶束形态学观察. 按照 label IT 试剂盒说明书, 使用罗丹明标记质粒 DNA, 在倒置荧光显微镜下直接观察 DAC 三元复合纳米胶束及其对照组 DC、DA、DIgMC 的粒子形态. 设计双重标记体系, 同时用罗丹明标记的质粒 DNA 和 BODIPY 荧光素标记的 lipofectin 制备 DAC 三元复合纳米胶束, 使用装备有 Bio Rad 激光共聚焦扫描系统 1024ES 的 NIKON Exlipse E6000 倒置荧光显微镜(Nikon, Tokyo, 日本)观察双重荧光标记的 DAC 三元复合纳米胶束的形态. 激光激发波长为 488/568 nm, 使用 52DF35 滤镜观

察绿色荧光, 使用 605DF32 滤镜观察红色荧光.

2.3 DAC 三元复合纳米胶束的细胞摄取实验

单独使用罗丹明标记的质粒 DNA 制备 DAC 三元复合纳米胶束进行细胞摄取实验. 将 65 μl DAC 三元复合纳米胶束用 935 μl DMEM 稀释后, 加入预先准备好的 A10 细胞, 常规条件培养 24 h. 在指定时间点, 用激光共聚焦荧光显微镜 NIKON Exlipse E6000 观察 DAC 三元复合纳米胶束的 A10 细胞摄取情况. 同时使用罗丹明标记的质粒 DNA 和 BODIPY 荧光素标记的 lipofectin 制备 DAC 三元复合纳米胶束, 按照上述方法观察双重标记的 DAC 三元复合纳米胶束的 A10 细胞摄取情况. 以不加抗体的 DC 组作为对照.

2.4 DAC 三元复合纳米胶束的细胞转染实验

用 A10 细胞进行 DAC 三元复合纳米胶束的体外细胞转染实验. 转染前, 将 A10 细胞置于六孔细胞培养板中, 细胞用含 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 青霉素 / 链霉素(P/S)的 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h. 在转染前 1 h, 先用 PBS 然后用不含 FBS 和 P/S 的 DMEM 培养液冲洗细胞, 然后用该 DMEM 培养液培养 1 h. 将 DAC 三元复合纳米胶束转入每个标记孔中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2.5 h, 随后加入 3 μl 预温的 FBS 并继续培养过夜. 24 h 后, 细胞培养液用含 2% FBS 和 1% P/S 的 DMEM 培养液替代. 继续培养 24~48 h 后, 吸除培养液, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 使用含 4,6- 二脒基 -2- 苯基吡啶(DAPI)的荧光封固剂封片后, 用倒置荧光显微镜观察转染情况. 直接计数 GFP 阳性细胞及 DAPI 荧光染色的细胞核总数, 计算细胞转染率. 所有的细胞培养实验结果均以 5 个平行实验的平均值和标准差表示. 同时使用 DC、DA 和 DIgMC 作为对照.

2.5 统计学分析

实验数据分析采用成组 t 检验方法, $P < 0.05$ 表示存在统计学差异.

3 结 果

3.1 DAC 三元复合纳米胶束的表征

DAC 可以在水溶液中自组装形成稳定的球形粒子, 其粒径为 (360 ± 3.1) nm, Zeta 电位测定为 (-15 ± 4.5) mV, 而 DC 粒径为 (192 ± 2.6) nm, Zeta 电位测定为 (-8.9 ± 5.5) mV, 其余对照组结果见表 1. 在生理条件下(37 $^{\circ}\text{C}$, PBS 溶液, pH 7.4), DAC 粒子至少在一周内保持稳定, 粒径和 Zeta 电位未有明显变化. 质粒 DNA 含量测定结果显示, DAC 三

元复合纳米胶束中的质粒 DNA 含量为 $(28.5 \pm 1.3)\%$ ，而 DC 组中质粒 DNA 含量为 $(13.6 \pm 0.9)\%$ ，

DAC 组中的质粒 DNA 含量远高于 DC 组，2 组比较有显著统计学差异 ($P < 0.01$) (表 1)。

Table 1 Particle size, Zeta potential and DNA entrapment of various micelle formulations ($\bar{x} \pm s$)

Formulation	Particle size/nm	Zeta potential/nm	DNA entrapment efficiency/%
DAC	360.0 ± 3.1	-15.27 ± 4.45	28.5 ± 1.3
DA	Unstable	-17.46 ± 1.42	—
DC	191.7 ± 2.6	-8.89 ± 5.53	13.6 ± 0.9
DIgMC	172.9 ± 2.0	-14.29 ± 6.48	—

用罗丹明标记质粒 DNA，在倒置荧光显微镜下，罗丹明标记 DNA 的各组粒子的形态为大小较均匀

的球形粒子，DAC 组粒子比对照组稍大(图 1)。进一步采用双重标记体系，即用罗丹明 B 标记质粒

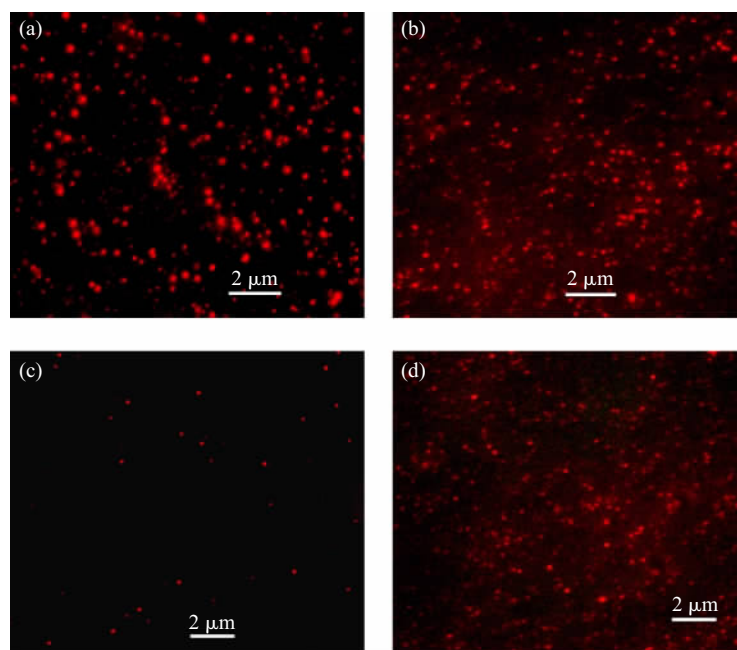


Fig. 1 Fluorescent micrograph of Rhodamine-labeled plasmid DNA

(a) Plasmid DNA-anti DNA antibody-cationic lipid micelles. (b) Plasmid DNA-cationic lipid micelles. (c) Plasmid DNA-anti DNA antibody micelles. (d) Plasmid DNA-non specific anti DNA antibody-cationic lipid micelles

DNA和用荧光素标记阳离子脂质体，用激光共聚焦荧光显微镜观察发现，DAC 三元复合纳米胶束的形态为不规则粒子，大部分粒子显示有黄色荧光，并主要分布在内层，表明复合胶束中质粒 DNA (红色荧光) 和阳离子脂质体 (绿色荧光) 形成的复合物分布在内层(图 2)。

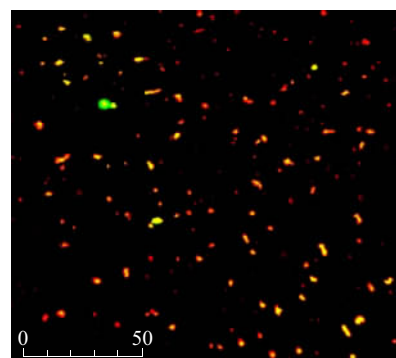


Fig. 2 Confocal fluorescent micrograph of DAC consisted of Rhodamine-labeled DNA (red) and BODIPY-labeled cationic lipid (green)

3.2 DAC 三元复合纳米胶束的细胞摄取实验结果

用罗丹明标记的质粒 DNA 的三元复合纳米胶束与 A10 细胞共同培养，在激光共聚焦荧光显微镜下观察了不同时间点粒子摄取的现象(图 3). 发现，大约在 8 h，A10 细胞浆中出现红色荧光；24 h 达到高峰，并积聚在细胞核周围；在 48 h，细胞核中出现红色荧光. 而不加抗体的对照组细胞核中红色荧光量远少于 DAC 组. 用双重荧光标记三

元复合纳米胶束与 A10 细胞共同培养，激光共聚焦荧光显微镜观察进入细胞核的过程，发现 2 种荧光同时出现在转染细胞中，细胞核中出现黄色荧光(红色荧光同绿色荧光重叠所致)，而不含抗 DNA 抗体的对照组细胞浆中的荧光远少于 DAC 组，细胞核中几乎没有出现荧光，说明 DAC 以完整的三元复合物形式进入细胞及细胞核中，同时抗 DNA 抗体可以促进质粒 DNA 进入细胞核(图 4).

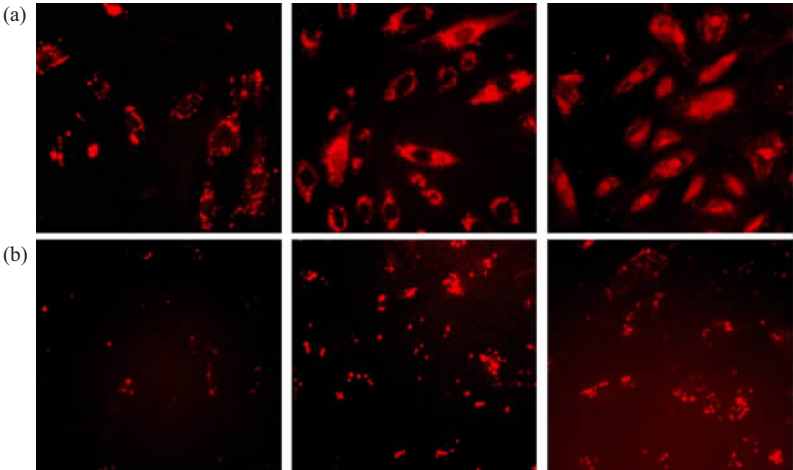


Fig. 3 A10 cell uptake of Rhodamine-labeled plasmid DNA at different time point
(a) Plasmid DNA-anti DNA antibody-cationic lipid micelles. (b) Plasmid DNA-cationic lipid micelles. The result showed that DAC uptake was extensive after only 8 h, with a very prominent cytoplasm-oriented presence at 24 h. Apparent nuclear entry of DAC was observed with 48 h cultures. The control experiment revealed qualitatively less amounts of cellular uptake and nuclear entry.

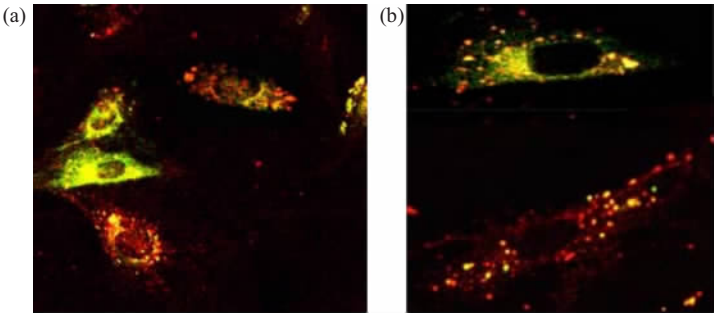


Fig. 4 Confocal microscopy studies of A10 cell uptake and nuclear entry of DAC and DC consisted of Rhodamine-labeled DNA (red) and BODIPY-labeled cationic lipid (green)
(a) Plasmid DNA-anti DNA antibody-cationic lipid micelles. (b) Plasmid DNA-cationic lipid micelles. The result showed that DAC entered cells as an intact antibody-DNA-lipid complex, even in the nuclei of the A10 cells. By comparison, the DC group without anti DNA antibody demonstrated little cationic lipid entry in association with fluorescent DNA, and neither fluorescent DNA nor fluorescent lipid were observed in the nuclei. Furthermore, the result indicated that anti-DNA antibody could enhance plasmid DNA entry into nuclear.

3.3 DAC 三元复合纳米胶束的细胞转染实验结果

用倒置荧光显微镜观察了 DAC 三元复合纳米胶束及其对照组在 A10 细胞中的转染，DAC 组转染 GFP 阳性细胞明显多于其他对照组. 细胞转染率

计算结果显示，DAC 组转染率为(41.8±2.5) %，DC 组转染率次之，为(10.8±2.1)%，DIgMC 组为(10.2±1.9)%，DA 组为(3.7±1.3)%，后 3 组同 DAC 组比较，有显著统计学差异($P < 0.01$) (图 5).

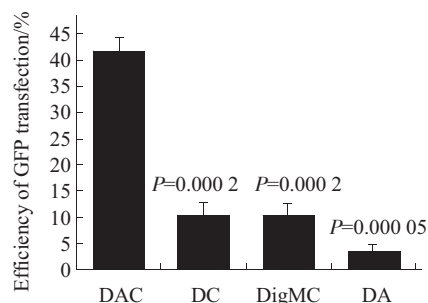


Fig. 5 Efficiency of GFP transfection

The result demonstrated that A10 cells transfection using GFP-DAC was significantly efficient than other control formulations.

4 讨 论

基因治疗中最重要的一个环节是选择适当的基因载体,用于基因治疗的载体主要有病毒和非病毒2大类.虽然基因治疗的临床实验研究多采用病毒载体,但是不同的病毒载体由于各自存在许多不足,如潜在致癌性、自身免疫原性以及目的基因容量小、靶向特异性差等,限制了它的应用.质粒DNA作为一种新的非病毒转基因载体,优点是安全可靠、稳定、对外源基因的容纳量不限、不会引起免疫系统反应及易于生产等,缺点是基因表达的时间短、转染效率较低等.

本文构建了一种新型高效的非病毒基因载体——质粒DNA/抗DNA抗体/阳离子脂质体三元复合纳米基因载体(DAC),能提高质粒DNA的转染效率,并且能促进质粒DNA进入细胞核.研究表明质粒DNA、抗DNA抗体、阳离子脂质体可以在适当条件下自组装形成相对稳定的复合纳米胶束,其粒径大约为360 nm左右,在生理条件下稳定至少一周,并且与不加抗DNA抗体对照组相比具有较高的基因装载容量(28.5% vs 13.6%).在细胞转染实验中,DAC三元复合纳米基因载体组转染效率大约为不加抗DNA抗体的DC对照组的4倍(41.8% vs 10.2%),为不加阳离子脂质体的DA对照组的11倍(41.8% vs 3.7%).用激光共聚焦荧光显微镜观察了双重荧光标记的DAC被细胞摄取和胞吞的过程,结果显示,进入细胞核的是完整的DAC复合物,而不单是质粒DNA(黄色荧光为红色荧光和绿色荧光叠加所致),不加抗DNA抗体的DC对照组几乎没有进入细胞核,这提示抗DNA抗体可能有促进复合物进入细胞核的作用,同时抗DNA抗体与阳离子脂质体的协同作用可以提高质粒DNA的转染效率.

我们推测DAC三元复合基因纳米载体能提高基因转染效率的机制在于:抗DNA抗体能够通过免疫偶联作用使DAC复合物携带更多的质粒DNA;阳离子脂质体能够介导DAC复合物易于穿过细胞膜;复合物通过内吞或内噬作用进入细胞后,在细胞内紧密的复合物可以保护质粒DNA免受核酸酶的降解;抗DNA抗体的核定位特征能促进质粒DNA进入细胞核,从而与阳离子脂质体协同作用增加了质粒DNA的转染和表达.Zack等^[8]和Yanase等^[9]报道,抗DNA抗体和DNA结合后可能引发抗体通过直接内化或者通过不明机制和细胞膜抗原决定簇相互作用促进DNA进入细胞核,现在认为可能抗DNA抗体存在核定位序列.本文主要目的是通过细胞试验验证该方案的可行性和有效性,在选择抗DNA抗体时只考虑其具有识别单链DNA和双链DNA的功能,对其来源种属没有特定要求.将来的动物实验和人体应用研究,从免疫学角度应该对抗体种属和功能2方面进行筛选.

在实验中,我们使用的是纯化的抗体,使用量很少,而且其中大部分抗体与DNA和阳离子脂质体形成复合载体,游离抗体的量应该很少,理论上抗DNA抗体引发副反应的几率很小.实验观察DAC组转染细胞未发现明显毒副作用.

综上所述,DAC三元复合纳米基因载体是一种高效安全的非病毒基因载体,为基因治疗的成功实施提供了研究基础.同时由于抗DNA抗体具有普适性,可以识别双链或单链DNA,而与其序列特异性无关,就可以同时使用不同治疗目的质粒DNA构建成DAC三元复合纳米基因载体,通过有效的基因递送体系将治疗基因递送到病灶局部进行“基因鸡尾酒”疗法.

参 考 文 献

- 1 Luo Z M, Sata T, Nguyen T, *et al.* Adenovirus-mediated delivery of fas ligand inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in immunologically primed animals. *Circulation*, 1999, **99** (14): 1776~1779
- 2 Palasis M Z, Luo J J, Barry J J, *et al.* Analysis of adenoviral transport mechanisms in the vessel wall and optimization of gene transfer using local delivery catheters. *Hum Gene Ther*, 2000, **11** (2): 237~246
- 3 Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 1999, **286** (5448): 2244~2245
- 4 Walter D H, Cejna M, Diaz-Sandoval L, *et al.* Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation*, 2004, **110** (1): 36~45

- 5 Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther*, 2001, **12**(8): 861~870
- 6 Numaguchi Y K, Okumura M, Harada M, *et al.* Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atheromatous arteries. *Cardiovasc Res*, 2004, **61**(1): 177~185
- 7 Templeton N S. Cationic liposomes as *in vivo* delivery vehicles. *Curr Med Chem*, 2003, **10**(14):1279~1287
- 8 Zack D J, Stempniak M, Wong A L, *et al.* Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. *J Immunol*, 1996, **157** (5): 2082~2088
- 9 Yanase K, Smith R M, Puccetti A, *et al.* Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin I. *J Clin Invest*, 1997, **100** (1): 25~31

Study on a Novel Non-virus Triplex Gene Vectors Composed of Plasmid DNA*

SONG Cun-Xian^{1)**}, ZHANG Lin-Hua¹⁾, ZHANG Chao¹⁾, LEVY RJ²⁾

⁽¹⁾ The Tianjin Key Laboratory of Biomaterial Research, The Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China;

⁽²⁾ Children's Hospital of Philadelphia, PA 19104, USA)

Abstract In order to study the feasibility and transfection mechanisms of a novel gene vector system composed of plasmid DNA-anti DNA antibody-cationic lipid (DAC) for non-virus site-specific gene therapy, stable DAC triplex nano-micelles were formed in PBS system through self-assembling of plasmid DNA, anti DNA antibody and cationic lipid. The mechanisms of cell uptake and entry with DAC were observed by fluorescent confocal microscopy. Transfection efficiency of DAC was estimated by using A10 cell *in vitro* with GFP-DNA (green fluorescent) triplex micelles. Cell culture studies revealed that DAC triplex micelles markedly increased the level of gene transferred to A10 cells, with more than 4-fold increase in transfection compared to DC group without anti DNA antibody and 11-fold increase compared to DA group without cationic lipid. Fluorescent DNA studies demonstrated greater cell uptake *in vitro* with DAC compared to the control formulations. Confocal microscopy studies confirmed nuclear entry in A10 cells with DAC, while formulations without anti-DNA antibody demonstrated no nuclear entry. It can be concluded that plasmid DNA-anti DNA antibody-cationic lipid (DAC) triplex micelle was a novel non-viral gene vector with high transfection efficiency and no cytotoxicity. It was hypothesized that DAC triplex micelles could enhance DNA delivery through mechanisms involving: increased levels of DNA incorporation into micelles due to antibody binding, enhanced plasmid DNA entry into nuclear due to the nuclear entry properties of anti-DNA antibody, and increased transfection efficiency via co-operation of anti-DNA antibody and cationic lipid. Gene delivery using DAC triplex micelles should be suitable for a wide array of single or multiple therapeutic gene strategies and for further successful gene therapy.

Key words anti-DNA antibody, plasmid DNA, cationic lipid, DAC triplex nano gene vector

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (50473059, 50673100) and Tianjin Committee of Sciences and Technology Key Program (043803011).

**Corresponding author . Tel: 86-22-87892052, E-mail: scxian@eyou.com

Received: December 12, 2006 Accepted: January 31, 2007