HA-His/PEI-His/DNA 纳米复合载体的制备及基因转染研究

田慧慧， 吴 婧， 伍亚玲， 徐 政， 陈荆晓， 陈敬华*

（江南大学 药学院，江苏 无锡 214122）

摘要： 为了克服 PEI 介导的基因转染毒性高、无肿瘤细胞选择性的缺点，采用组氨酸（His）分别对聚乙烯亚胺（PEI）和透明质酸（HA）进行修饰，得到 PEI-His（PH）和 HA-His（HH）。利用静电相互作用制得 HH、PH 与 DNA 的复合物 HH/PH/DNA（HPD）并用于基因转染。动态光散射测定 HPD 复合物的平均粒径为 109 nm，ζ-电位为-15 mV。HPD 复合物可有效包载 DNA 并保护其不被酶降解，表面的 HA 还可避免血清粘附。细胞实验结果表明，经 His 修饰可有效降低 PEI 的细胞毒性，HPD 复合物介导的基因转染对肿瘤细胞具有选择性，在肿瘤细胞中的转染效率为正常细胞中的 2 倍。

关键词： 纳米复合物；聚乙烯亚胺；透明质酸；基因转染；靶向性

中图分类号：R 944.9　**文章编号：**1673-1689（2019）06-0064-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.009

Preparation of HA-His/PEI-His/DNA Nano-Complexes for Gene Transfection

TIAN Huihui， *WU Jing*， *WU Yaling*， *XU Zheng*， *CHEN Jingxiao*， *CHEN Jinghua**

（School of Pharmaceutical Science，Jiangnan University，Wuxi 214122，Jiangsu Province，China）

Abstract： To decrease the toxicity and improve the tumor cell selectivity of PEI，polyethyleneimine（PEI）and hyaluronic acid（HA）were modified with histidine（His）to obtain PEI-His and HA-His in this study. The HH/PH/DNA （HPD）complexes，used for gene transfection，were prepared via electrostatic interaction. The average particle size of the complexes was 108.5 nm determined by dynamic light scattering，as well as the ζ-potential was -15.4 mV. HPD could efficiently encapsulate DNA and protect it from the enzymatic degradation. In addition，the HH coating further prevented the adhesion of serum on the surface of HPD. Cellular experiments showed that the cytotoxicity of PEI was reduced via the modification of His. The gene transfection efficiency induced by HPD in tumor cells increased by 2-fold as compared with that in normal cells，showing good selectivity.

Keywords： nano-complexes，polythylenimine，hyaluronic acid，gene transfection，targeting

收稿日期： 2016-11-15

基金项目： 国家自然科学基金项目（21574059，21306066）；安徽大学现代生物制造协同创新中心开放课题项目（BM2015008）。

* **通信作者：** 陈敬华（1971—），男，博士，教授，博士研究生导师，从事生物大分子和生物功能材料的研究。E-mail：jhchenwhut@126.com

引用本文： 田慧慧，吴婧，伍亚玲，等. HA-His/PEI-His/DNA 纳米复合载体的制备及基因转染研究 [J]. 食品与生物技术学报，2019，38（06）：64-71.

随着人类基因组计划的开展，基因与多种重大疾病之间的关系受到人们的关注。基因疗法作为一种将外源性基因导入靶细胞，用于治疗因基因缺陷或异常所引起疾病的方法，对治疗癌症、心血管疾病、遗传病等多种重大疾病具有较高的潜力[1-2]。大量研究表明，载体是影响基因治疗效果的关键因素之一。利用安全、稳定的载体不仅能有效保护目的基因不被体内的酶降解[3]，还有助于提高基因的传递和转染效率。

目前，临床研究中更倾向于使用以聚乙烯亚胺（polyethylenimine，PEI）为代表的非病毒载体。这主要是因为非病毒载体不仅易制造、易修饰、价格低廉，还能够避免病毒载体诱发的生物安全性方面的缺陷[4-5]。病毒载体可能在染色体上随机插入激活原癌基因，诱导强烈的免疫反应而造成其他病症[6]。PEI 这种阳离子高分子材料，可以有效压缩 DNA 并将其传递至细胞内，进而通过“质子海绵”效应释放目的基因进入细胞核，实现高效转染[7]。不过，PEI 高正电荷密度的性质也导致其容易破坏细胞膜结构，从而表现出较高的细胞毒性。PEI 还易与带负电荷的血浆蛋白结合，在血液循环过程中被机体清除[8]。此外，PEI 缺乏对肿瘤细胞的识别能力，在治疗过程中不具有选择性。为解决上述问题，研究人员尝试用可断裂的化学键交联低相对分子质量 PEI，或对其表面进行修饰，以降低其电荷密度，提高靶向性[9]。另一策略是利用电荷相互作用，将 PEI 与负电性材料结合，得到纳米聚电解质复合物作为载体[10-11]。有报道用带弱负电的透明质酸（hyaluronic acid，HA）与 PEI 制备聚电解质复合物，不仅能够避免与血浆蛋白吸附，还可以利用 HA 与肿瘤细胞表面过度表达的 CD44 受体之间的识别作用，提高对肿瘤细胞的靶向性[12]。除此之外，HA 作为一种天然多糖还具有生物相容性好、可生物降解的优点[13]。然而，聚电解质复合物依赖于聚阳离子和聚阴离子化合物之间的电荷相互作用[14]，这会造成聚阴离子与 DNA 之间竞争，导致 DNA 包裹不够紧密而泄漏，降低转染效率。因此，如何提高载体稳定性，防止 DNA 泄漏失活，是这类材料实现高效基因传递的关键。

组氨酸（Histidine，His）是一种广泛用于 pH 敏感性材料制备的氨基酸。由于 His 分子结构中含有咪唑基团（pKa ~6.0），其在生理 pH 7.4 条件下表现为疏水性，在 pH<6 时又吸收质子表现出亲水性[15]。利用 His 的这一特性，本研究中用 His 分别修饰 PEI 和 HA，制备 PEI-His（PH）和 HA-His（HH），之后通过正负电荷吸附，两步包载得到 HH/PH/DNA（HPD）复合物。PEI 经 His 修饰能降低表面电荷密度，从而降低其细胞毒性；同时保持对 DNA 的包裹能力。HA 经 His 修饰，可减少其与 DNA 间对电荷的竞争，利用 His 在生理 pH 下的疏水性，还能使复合物结构更加紧密。另外，利用 HA 对肿瘤细胞的识别作用，还可以提高材料传递基因时对肿瘤细胞的靶向性。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

HA（M_w：6.2×10^3），山东福瑞达生物化工有限公司产品；透明质酸酶（HAase）、脱氧核糖核酸酶 I（DNase I），上海生工生物工程股份有限公司产品；L-组氨酸（L-His）、1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳化二亚胺盐酸盐（EDC·HCl）、N-羟基丁二酰亚胺（NHS）、枝化 PEI（Mw：25 kDa）、噻唑蓝（MTT）、胰酶、上海阿拉丁试剂有限公司产品；RPMI 1640 细胞培养基、DMEM 细胞培养基、胎牛血清（FBS），美国 Gibco Invitrogen 公司产品；pEGFP-N1 pDNA，美国 Promega 公司产品。

1.2 仪器

FreeZone 2.5 L 型冷冻干燥机，美国 Labconco 公司产品；Avance III 型核磁共振波谱仪（400 MHz），德国 Bruker 公司产品；JEM-2100 型透射电子显微镜，日本 JEOL 公司产品；Zetasizer Nano ZS 型激光粒度仪，英国 Malvern 公司产品；Multiskan GO 型酶标仪，美国 Thermo 公司产品；DMIL/LED 型荧光显微镜，德国 Leica 公司产品；FACSCalibur 型流式细胞仪，美国 BD 公司产品。

1.3 细胞株

小鼠黑色素瘤细胞（B16）和非洲绿猴肾成纤维细胞（COS7），购自中国科学院上海生命科学研究院细胞保藏中心。

1.4 PH 和 HH 的制备

将 200 mg 和 400 mg 的 His 分别溶解于 50 mL 去离子水中，加入 0.93 g EDC·HCl 和 0.70 g NHS，调节溶液 pH 至 4~5，于室温搅拌 1 h，之后分别加入 8 mL 的 PEI 溶液（25 mg/mL），调节 pH 至 7.4，继续反应 24 h，反应结束后将溶液装入透析袋，对去

离子水透析除去未反应的 His 及杂质，冻干得 PH1 和 PH2,用 1H NMR 验证其结构。

将 100 mg 的 HA 溶于 50 mL 去离子水中,加入 72.8 mg EDC·HCl 和 43.7 mg NHS,反应 1 h 后,向溶液中加入 78.5 mg His。室温搅拌 24 h 后,将溶液装入透析袋，对去离子水透析除去未反应的 His 及杂质,冻干得 HH,用 1H NMR 验证其结构。

1.5 PD 和 HPD 复合物的制备

将 1 mL pDNA 溶液(100 μg/mL)加入到 1 mL 不同质量浓度的 PH1 和 PH2 溶液(20、50、100、200、500 μg/mL)中,涡旋振荡,室温静置 30 min,得到具有不同 PH/DNA 质量比(分别为 1:5,1:2,1:1,2:1,5:1)的复合物,分别标记为 PD1 和 PD2。

将 1 mL pDNA 溶液(100 μg/mL)滴加到 1 mL PH1 溶液(200 μg/mL)中,涡旋振荡,室温静置 30 min,之后将所得 PD 复合物溶液滴加到不同质量浓度的 2 mL HH 溶液(150、200、250、300、350 μg/mL)中,涡旋振荡,室温静置 30 min,得到具有不同 HH/PH1/DNA 质量比(分别为 3:2:1,4:2:1,5:2:1,6:2:1,7:2:1)的 HPD 复合物。

1.6 PD 和 HPD 的表征

取 18 μL 上述制备的 PD 和 HPD 复合物,加入 2 μL Loading Buffer(10×),通过琼脂糖凝胶电泳检测复合物对 DNA 的包载能力，用凝胶成像系统记录实验结果；取 1 mL 上述制备的 PD 和 HPD 复合物用粒径仪测定复合物的平均粒径及 ζ-电位,通过 TEM 观测 HPD 复合物的微观形貌。

1.7 复合物酶稳定性实验

参照 1.5 中方法制备 HPD 复合物,取 15 μL 溶液,在不同样品中分别加入 1 μL HAase(3 U/μL)和 1 μL DNase I(10 U/μL),另取 3 μL 裸 pDNA 溶液直接加入 1 μL DNase I(10 U/μL),样品于 37 ℃孵育 30 min,再于 65 ℃加热 20 min 终止反应,所有样品用超纯水补齐体积至 18 μL，加 2 μL Loading Buffer(10×),之后进行琼脂糖电泳实验,用凝胶成像系统记录实验结果。

1.8 细胞毒性实验

材料的细胞毒性用 B16 和 COS7 细胞进行测试。将细胞分别以 8 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,B16 细胞用含体积分数为 10% FBS 的 1640 培养基培养过夜,COS7 细胞用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养基培养过夜。之后小心移去培养基,加入 100 μL 含不同质量浓度(1、10、20、50、100、200、300、500 μg/mL)PEI、PH 和 HH 的培养基溶液,其中 PEI 溶液质量浓度与 PH1、PH2 溶液中对应的 PEI 质量浓度一致,继续在 37 ℃培养箱中培养 24 h。吸去培养基，每孔加入 100 μL MTT 溶液,37 ℃下继续培养 4 h 后吸除 MTT，每孔再加入 100 μL DMSO 混合均匀,用酶标仪测定其在 570 nm 下的光密度值(OD570),计算细胞存活率,如下式(1)。

$$细胞存活率/\%=(OD_{加药组} / OD_{空白组})\times 100 \quad (1)$$

以不加样品作为空白对照,每组 3 个平行样。

1.9 细胞转染实验

以 pEGFP-N1 pDNA 为报告基因进行转染实验。首先将细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种到 6 孔板中,吸出培养基后,加入 1 mL 含复合物的培养基溶液,其中 pDNA 的质量为 4 μg,于 37 ℃的培养箱中培养 4 h 后,吸出含药培养基,加入 1 mL 含体积分数为 10% FBS 的新鲜培养基，于 37 ℃的培养箱继续培养 20 h,用无菌 PBS 缓慢冲洗 3 次,用倒置荧光显微镜观察并拍照。细胞用胰酶消化,用 PBS 制成细胞悬液,用流式细胞仪对细胞转染情况进行定量检测,以空白细胞作为阴性对照,以 PEI/DNA(N/P=10)复合物为阳性对照,每组 3 个平行样。其中,PD 复合物的质量比分别为 1:2、1:1、2:1,HPD 复合物的质量比为 7:2:1。

2 结果与讨论

2.1 PH 以及 HH 的 ^{1}H NMR 谱图分析

PH 和 HH 分别用 ^{1}H NMR 表征其化学结构。见图 1(a),在 2.9~3.20(m,4H,$-CH_2CH_2-$)处为 PEI 分子中亚甲基的氢,7.25(s,1H,-N=CH-)为 His 咪唑环上的 H-2,8.02(s,1H,-N=CH-)为 His 咪唑环上的 H-1,表明 His 已成功连接到 PEI 分子。通过峰面积计算 His 在 PH1 中取代度为 3.2%，在 PH2 中取代度为 7.3%。见 1(b),1.98(s,3H,CH_3-CO-)处为 HA 上 N-乙酰甲基的氢,7.22(s,H,-N=CH-)为 His 咪唑环上的 H-b,8.49(s,1H,-N=CH-)为 His 咪唑环上的 H-a,表明 His 已成功连接至 HA 分子,通过峰面积比计算得到 His 在 HH 上的取代度为 6.2%。

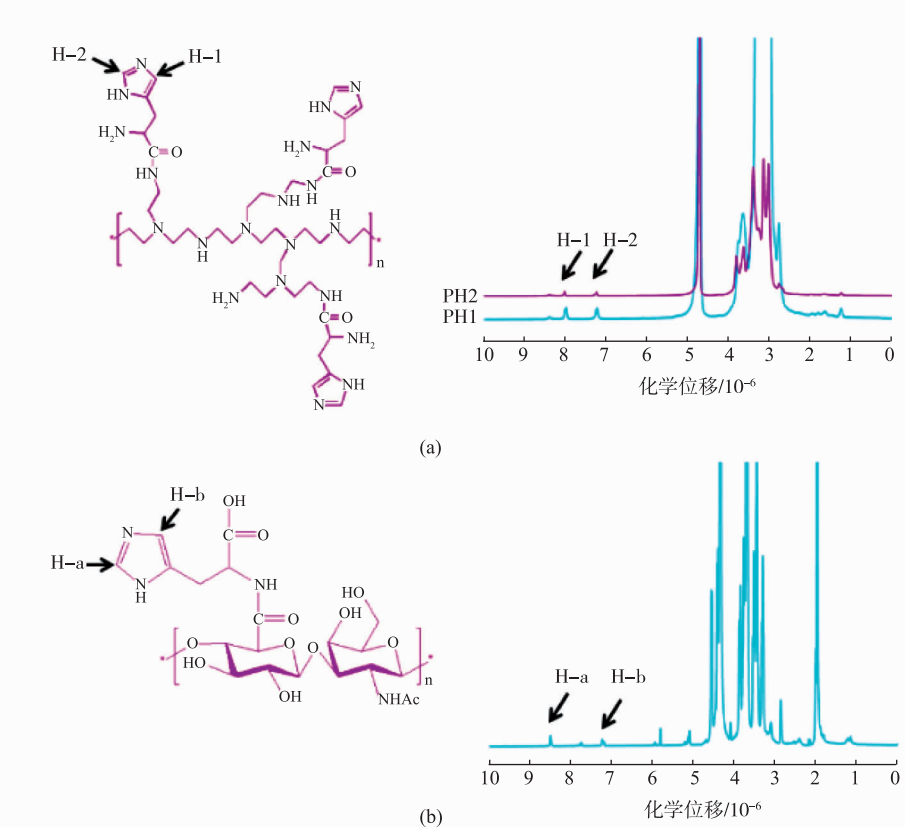
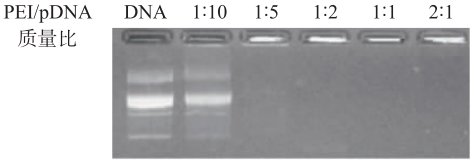


图 1　PH1、PH2 与 HH 的化学结构及核磁共振谱图

Fig. 1　Chemical structures and ^{1}H NMR spectra of PH1, PH2 and HH

2.2　PD 的琼脂糖凝胶电泳

材料对 DNA 的有效包载是实现转染的首要条件，因此先通过琼脂糖凝胶电泳测试 2 种 PH 对 DNA 的包载能力。从图 2 中可以看出，当 PEI/pDNA 的质量比为 1:5 时，PEI 即可完全包载 pDNA，而当 PD1 的质量比大于 1:5，PD2 的质量比大于 1:2 时，可在孔中观察到 pDNA 条带，说明此时载体可包载 pDNA 并形成复合物，pDNA 不会随电场在凝胶中移动。与 PEI 相比，PH 包裹 DNA 的能力有所减弱，这是因为经 His 修饰，PH1 和 PH2 与 PEI 相比，其表面的正电荷密度有所降低所致，但其对 DNA 的复合能力得以保持。由于 His 在 PH1 上的取代度(3.2%)低于在 PH2 上的取代度(7.3%)，因而 PH1 携带更多的正电荷，其对 DNA 的包载能力更强。



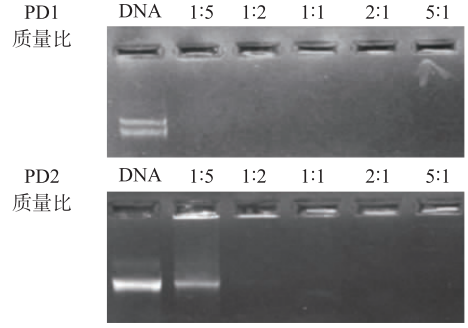


图 2　PEI/pDNA、PD1 与 PD2 复合物的琼脂糖凝胶电泳阻滞图

Fig. 2　Agarose gel electrophoresis of PEI/pDNA, PH1/pDNA and PH2/pDNA complexes

2.3　PD 的平均粒径和电位

PD 复合物的平均粒径和 ζ-电位如图 3 所示。2 种 PH 都可以有效压缩 pDNA 形成纳米尺度的复合物。随着质量比逐渐增加至 5:1，PD1 和 PD2 复合物的平均粒径分别减小至 103 nm 和 112 nm，而 ζ-电位则逐渐增加至 53 mV 和 40 mV。对于 2 种 PD 而

言,当质量比大于 1:2 时,载体表面携带正电荷,这表明 PH 已经完全包载 pDNA,该结果与琼脂糖凝胶电泳试验结果一致。同质量比条件下,由于 PH1 比 PH2 的正电荷密度更高,因此 PD1 的 ζ-电位更高,其在溶液中稳定性也更好。根据粒径和 ζ-电位的值,选用质量比为 1:2、1:1 和 2:1 进行 2 种复合物的转染试验,以找出其最佳转染条件。

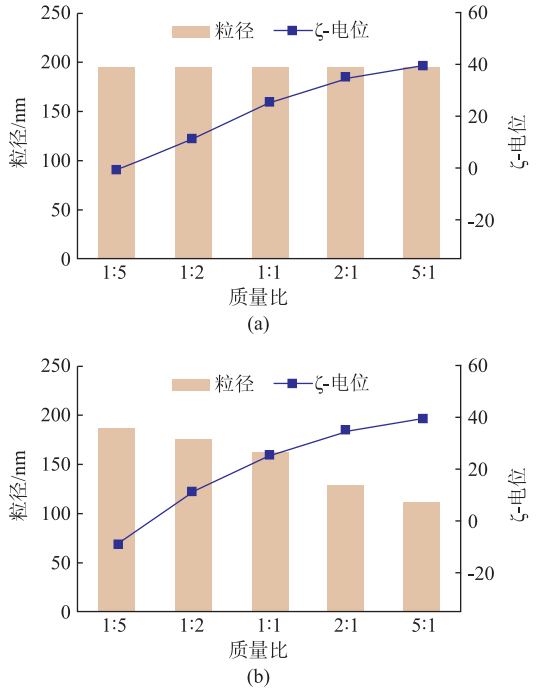


图 3 PD1、PD2 复合物的平均粒径及 ζ-电位

Fig. 3 Average size and ζ-potential of PD1 and PD2 complexes

2.4 PD 复合物转染性能评价

PD 复合物介导的转染效率通过流式细胞仪进行定量检测,结果如图 4 所示。可以看出,在 PD1 和 PD2 的质量比为 2:1 时,PH1 能够更为有效地介导 pDNA 实现转染,效率明显高于 PH2。由于复合物进入细胞介导 DNA 转染依赖于其粒子大小,以及粒子表面正电荷与细胞膜表面负电荷之间的相互作用。PD1 较 PD2 而言,其 ζ-电位更高,而其平均粒径更小,因而更利于其传递更多的 pDNA 进入细胞。当 2 种 PD 的质量比为 1:1 和 1:2 时,转染效率偏低,这可能是因为其表面电荷密度下降,且复合物粒径偏高导致其进入细胞的效率降低所致。因而选用 PH1/pDNA 的质量比为 2:1 进行下一步实验。

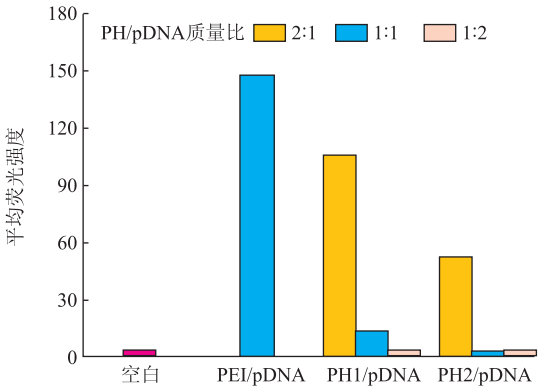


图 4 pDNA/PEI、PD1 和 PD2 复合物对 B16 细胞诱导的基因转染的流式分析图

Fig. 4 Flow cytometric analysis of pDNA/PEI, PH1/pDNA and PH2/pDNA induced gene transfection with B16 cells

2.5 HPD 的 DNA 包载能力

从 HPD 复合物平均粒径及 ζ-电位图(图 5)中可以看出,随着质量比的变化,复合物的粒径趋于稳定。质量比为 4:2:1 时,复合物表面 ζ-电位接近于 0 mV,复合物之间受到的表面电荷的排斥力减小,产生团聚,导致粒径增大。当质量比调节至 5:2:1 时,复合物的粒径减小至 183 nm,ζ-电位减小至-8 mV。当质量比变为 7:2:1 时,HPD 复合物粒径为 109 nm,这一尺寸适合复合物粒子进入细胞,而其 ζ-电位逐渐降低达到-15 mV,表明 PD1 已经完全被 HH 包裹。HPD 粒子表面呈负电荷,可以减少与血清蛋白吸附,增加材料在体内的循环时间。后续选用 HPD 质量比为 7:2:1 进一步测试。

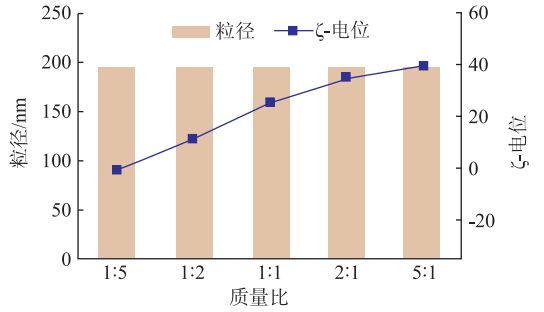


图 5 HPD 复合物的平均粒径及 ζ-电位

Fig. 5 Average size and ζ-potential of HH/PH1/pDNA complexes

HPD 复合物的琼脂糖凝胶电泳实验结果如图 6。结果显示,HPD 复合物在每个胶孔中均能观察到明亮的 DNA 条带,与裸 DNA 相比,复合物没有产

生与其同一位置的条带,说明 DNA 并未随 HH/PH/pDNA 质量比的变化而从复合物内部泄漏。这也说明 HH 的加入并未影响内部 PD 复合物的稳定性。这是因为本研究设计中引入的 His 分子在 pH 7.4 环境下表现出疏水性,这使得 HH 表现出两亲性,当其包裹于 PD 表面时,His 会因为疏水作用而进一步向内压缩 PD, 不仅能有效避免因电荷竞争而导致 DNA 泄漏,还能保持复合物的粒径大小不受影响。

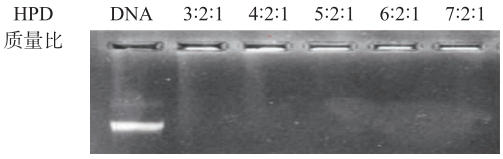
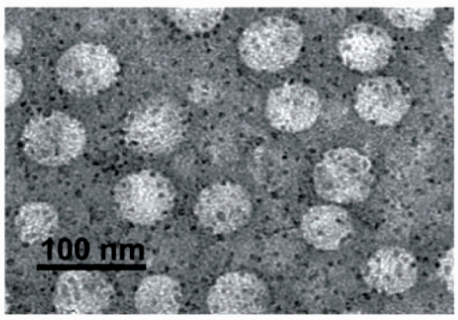


图 6 HPD 复合物的琼脂糖凝胶电泳阻滞实验谱图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of HPD complexes

2.6 HPD 的形貌和血清稳定性

采用透射电镜观测 HPD 复合物的形貌 (图 7(a))。从图中可以看出,复合物为规整球形,尺寸均一且分布均匀,其在干态下的平均粒径约为 60 nm。采用 DLS 测得复合物在水相中的平均粒径 (图 7(b))为 109 nm。这与 HPD 表面亲水性的 HH 在水介质中处于水合伸展状态有关。通过加入体积分数为 10% FBS 验证 HPD 在含血清溶液中的稳定性,结果如图 7(c)所示,100 nm 以下为血清中的固有粒子峰, 这说明 HPD 的粒径分布并未因加入 FBS 而发生变化。这是由于 HPD 复合物表面带负电,可拮抗同样带有负电的血清。因而 HPD 复合物具有良好的血清稳定性,不会与血清蛋白吸附团聚而被代谢清除。



(a)

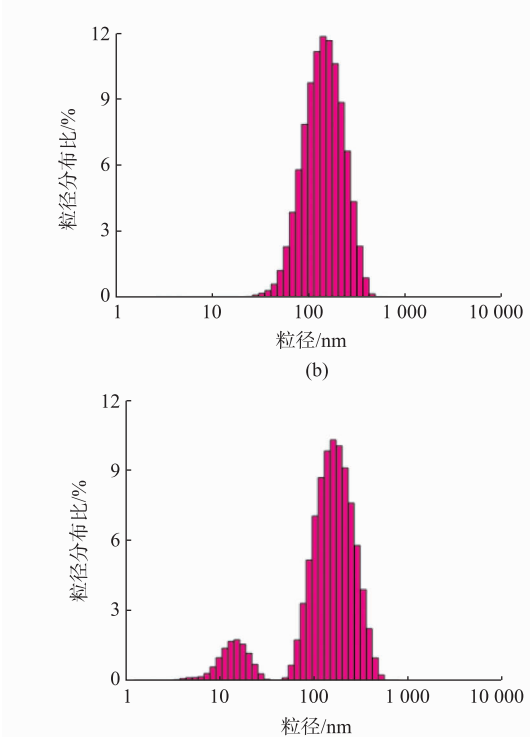


图 7 HPD 复合物的透射电镜图,溶液中有或无体积分数为 10%血清时 HPD 复合物粒径分布

Fig. 7 TEM image of HPD complexes;size distribution of HPD complexes with and without 10% serum

2.7 HPD 的酶稳定性

HPD 复合物在不同条件下对 pDNA 的保护能力通过琼脂糖凝胶电泳进行测试。如图 8 所示,与裸 DNA 相比,加入 DNA 酶后,质粒被降解产生多条条带。HPD 复合物经 DNase I 处理后,DNA 依然处于胶孔中,且未发现被降解的 DNA 条带,这说明 HPD 不仅能负载 DNA,还可有效保护 DNA 免于被 DNA 酶降解。而在与 HAase 作用后,DNA 亦保留于胶孔当中, 并未在泳道中出现条带, 这说明即使 HPD 复合物表面的 HA 被酶降解,PD 复合物仍然可保持稳定,并包载 DNA。综上,HPD 复合物的多层结构稳定,可有效包载并且保护 DNA。

2.8 细胞毒性

通过细胞存活率实验对材料的细胞相容性进行评价,结果如图 9 所示。在图 9(a)中,对于 B16 细胞,在质量浓度低于 20 μg/mL 时,PEI 与 PH1 的细胞毒性相差不大,而在质量浓度高于 50 μg/mL 时,PH1 组的细胞存活率则明显更高,即使质量浓度达到 500 μg/mL,PH1 组细胞存活率仍可达到 46%。而

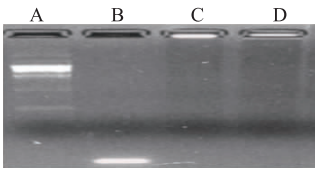


图 8 不同条件下的 HPD 复合物稳定性

Fig. 8 Agarose gel electrophoresis of HPD complexes treated with various enzymes

对于COS7 细胞,PEI 与 PH1 的细胞毒性在低质量浓度条件下即表现出明显差异, 在 200 μg/mL 时,PH1 组细胞存活率仍可达到 40%以上,而这一质量浓度已经远高于转染实验时所使用的材料质量浓度。PEI 的细胞毒性主要因为高正电荷密度会破坏细胞膜结构,致使细胞破裂而产生。当 PEI 经 His 修饰后,表面部分正电荷被屏蔽,从而降低了细胞毒性。图 9(b)中可以看出,HH 对B16 细胞及 COS7 细胞基本无毒。当 HA 质量浓度为500 μg/mL 时,B16 和 COS7 细胞的存活率依然可达到 96%和 103%。因此,PH 和 HH 都具有较好的细胞相容性。

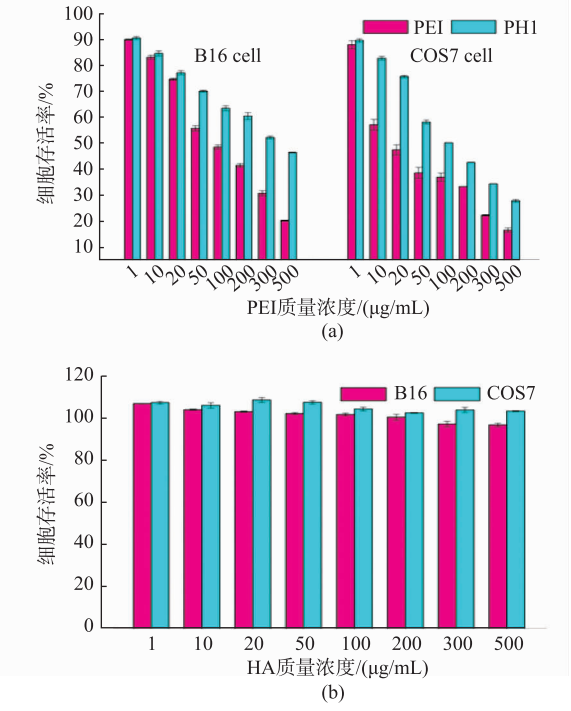


图 9 PEI、PH1 和 HH 对 B16 细胞、COS7 细胞的体外细胞毒性

Fig. 9 In vitro cytotoxicity of PEI and PH1;HH against B16 and COS7 cells

2.9 HPD 转染性能

以 pEGFP-N1 为报告基因测定 HPD 复合物的转染能力,转染后的荧光图以及流式细胞分析结果如图 10 所示。图 10(a)(I、III)中,PEI 在 B16 细胞以及 COS7 细胞中介导的转染效率基本相同。从图10(a)(II、IV)中可以看出,在 B16 肿瘤细胞中出现了明显的绿色荧光,这说明 HPD 复合物已经成功介导基因转染,表达出绿色荧光蛋白。与 COS7 正常细胞相比,B16 肿瘤细胞中表达产生的绿色荧光强度明显更高。此外,B16 细胞中 HPD 介导的细胞转染与 PEI/pDNA 介导的细胞转染相比稍弱,COS7 细胞中 HPD 介导的细胞转染与 PEI 介导的细胞转染则具有明显差距。该结果与图 10(b)流式细胞仪结果一致,PEI 在 2 种细胞中介导的基因转染产生的荧光强度基本相当, 而 HPD 介导的在 B16 细胞中表达的平均荧光强度明显高于 COS7 细胞的荧光强度,可达到 COS7 细胞中荧光强度的 2 倍。这是由于 B16 细胞表面过度表达的 CD44 受体可以与 HPD 复合物表面的 HH 特异性识别,能够增加了肿瘤细胞对 HPD 复合物的摄取,从而提高转染效率。因此,HPD 复合物对于肿瘤细胞的基因传递具有一定的选择性。

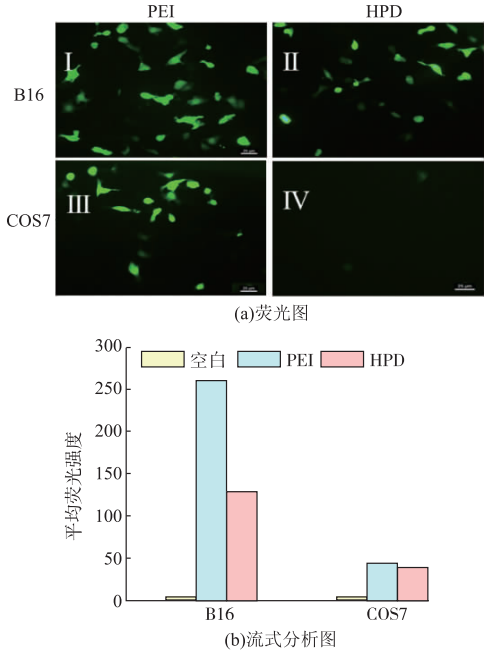


图 10 PEI 和 HPD 复合物对 B16 细胞、COS7 细胞转染的荧光图和流式分析图

Fig. 10 Fluorescent images and flow cytometric analysis of gene transfection in B16 and COS7 cells

3 结 语

通过 His 修饰获得了 2 种具有不同 His 取代度的 PH 以及一种 HH。其中,His 取代度为 3.2%的 PH1 能够更为有效地包载 DNA,形成尺度在 103 mm 的复合物,并介导高效的基因转染。之后通过二次复合,得到了 HPD 复合物,其在水溶液中尺寸均一,平均粒径为 109 nm,ζ-电位为-15 mV,并且能够有效拮抗血清黏附,在 DNase I 和 HAase 存在条件下保持稳定,保护所包载的 DNA 不被酶降解。利用表面的 HH 与 CD44 受体的作用,HPD 复合物可以对于肿瘤细胞介导高效的基因转染,对 B16 肿瘤细胞为 COS7 正常细胞中转染效率的 2 倍,体现出明显的选择性,并且材料经 His 修饰后,细胞毒性明显降低。综上所述,HPD 复合物在基因转染研究具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] ZHANG Y H,CHEN Y,ZHANG Y M,et al. Recycling gene carrier with high rfficiency and low toxicity mediated by L-cystine-bridged bis(β-cyclodextrin)s[J]. **Sci Rep**,2014,4:7471-7471.

[2] WAN N,JIA Y Y,HOU Y L,et al. Preparation physicochemical properties and transfection activities of tartaric acid-based cationic lipids as effective nonviral gene delivery vectors[J]. **Biol Pharm Bull**,2016,39(7):1112-1120.

[3] SHIM SUK MIN,XIA Y. A reactive oxygen species (ROS)-responsive polymer for safe,efficient,and targeted gene delivery in cancer cells[J]. **Angew Chem Int Ed**,2013,52(27):6926-6929.

[4] ORTIZ M C,JM Garcia Fernandez,BENITO J M,et al. Cyclodextrin-based gene delivery systems[J]. **Chem Soc Rev**,2011,40(3):1586-1608.

[5] HAN K,CHEN S,CHEN W H,et al. Synergistic gene and drug tumor therapy using a chimeric peptide[J]. **Biomaterials**,2013,34(19):3680-3689.

[6] WANG F,SHEN Y,ZHANG W J,et al. Efficient,dual-stimuli responsive cytosolic gene delivery using a RGD modified disulfide-linked polyethylenimine functionalized gold nanorod[J]. **J Control Release**,2014,196(28):37-51.

[7] ZHANG X,DUAN Y,WANG D,et al. Preparation of arginine modified PEI-conjugated chitosan copolymer for DNA delivery[J]. **Carbohydr Polym**,2015,122(20):53-59.

[8] DASH P R,READ M L,BARRETT L B,et al. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery[J]. **Gene Ther**,1999,6(4):643-650.

[9] LEE Y S,KIM S W. Bioreducible polymers for therapeutic gene delivery[J]. **J Control Release**,2014,190(28):424-439.

[10] YAO J,FAN Y,DU R,et al. Amphoteric hyaluronic acid derivative for targeting gene delivery[J]. **Biomaterials**,2010,31(35):9357-9365.

[11] LIAN S N,SUN J F,SUN K X,et al. Preparation and characterization of oligomeric hyaluronic acid-ketal as a tumour CD44 receptor and pH-sensitive targeting carrier[J]. **J China Pharm Univ**,2014,45(5):540-543.

[12] HONG Y Y,KIM H R,SARAVANAKUMAR G,et al. Bioreducible hyaluronic acid conjugates as siRNA carrier for tumor targeting[J]. **J Control Release**,2013,172(3):653-661.

[13] ZHANG Miao,LIU Wen,CHEN Jinxiao,et al. Preparation and properties of the redox-sensitive K5 polysaccharide micelles as drug carrier[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(1):34-39.

[14] MARTENS T F,REMAUT K,DESCHOUT H,et al. Coating nanocarriers with hyaluronic acid facilitates intravitreal drug delivery for retinal gene therapy[J]. **J Control Release**,2015,202(28):83-92.

[15] WANG Min,TIAN Huihui,CHEN Jinxiao,et al. Fabrication of double-decked carrier with negatively charged shielding for gene transfection[J]. **Chin J Pharm**,2015,46(10):1080-1086.