

壳聚糖-肠三叶因子纳米粒制备与体外转染的实验研究

孙 勇*,王良喜,孙曙光,毛学飞,邓向东,潘晓峰,张 方,陈宝君,勒 娟

(徐州医学院附属淮海医院,中国人民解放军第九七医院烧伤科,江苏 徐州 221004)

[摘要] 目的:构建 hITF 基因传递系统,检测其细胞转染效果。方法:首先构建肠三叶因子(intestinal trefoil factor,ITF)的真核表达载体,再利用复凝法制备壳聚糖纳米粒,用透射电镜观察纳米粒的形态及大小,并利用 HEK293 细胞检验纳米粒的转染能力,最后利用 RT-PCR 和 Western blot 检测目的基因的转录及表达情况。结果:成功构建出 hITF 真核表达载体,利用复凝法制备了不同 N/P 比的壳聚糖纳米粒,透射电镜观察到粒度 $< 1\ 000\ \text{nm}$,粒径呈窄分布;荧光显微镜及流式细胞仪检测显示,壳聚糖纳米粒对 HEK293 细胞的转染率约为 80%,和脂质体的转染率基本一致;RT-PCR 和 Western blot 检测说明 hITF 被成功转录并分泌表达。结论:成功构建了 hITF 理想的基因传递系统,为壳聚糖介导 hITF 基因治疗的应用打下基础。

[关键词] 人肠三叶因子;壳聚糖;基因治疗;转染

[中图分类号] Q789

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1034-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140807

Experiment of preparation of chitosan-ITF nanoparticles and transfection *in vitro*

Sun Yong*, Wang Liangxi, Sun Shuguang, Mao Xuefei, Deng Xiangdong, Pan Xiaofeng, Zhang Fang, Chen Baojun, Le Juan

(Department of Burn Surgery, Huaihai Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College, the NO.97 Hospital of PLA, Xuzhou 221004, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a hITF gene delivery system, and assess its gene transfection efficiency. **Methods:** ITF eukaryotic expression vector was constructed. Chitosan nanoparticles were prepared by a complex coacervation method, and its size and morphology were assessed using transmission electron microscope (TEM). Gene transfer capability of nanoparticles was assessed in HEK293 cells. The transcription and expression of hITF were determined by RT-PCR and Western blot. **Results:** hITF eukaryotic expression vector was successfully constructed. The chitosan nanoparticles were prepared by complex coacervation method with different N/P ratio. Nanoparticle size less than 1 000 nm and narrow distribution of nanoparticle diameter were observed by TEM. The transfection efficiency assessed by fluorescence microscopy and flow cytometry was about 80%, similar to the transfection efficiency of Lipofectamine. RT-PCR and Western blot assay demonstrated that hITF was transfected and expressed successfully. **Conclusion:** An optimal hITF gene delivery system was successfully constructed. This research laid foundations for further application of hITF gene therapy.

[Key words] human intestinal trefoil factor; chitosan; gene therapy; transfection

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1034-1039]

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是由肠杯状细胞特异分泌的小分子多肽,它的 59 个氨基酸

序列中有一段特殊的核心结构域,其间的 6 个半胱氨酸按特定(1-5, 2-4 和 3-6)的顺序,依次以二硫键两两相接,形成 3 个环状结构,整个肽链由此发生弯曲和折叠,形如“三叶草”,故而得名^[1]。ITF 中有一些特定的位点能同黏蛋白的糖链相连,使之形成稳定的凝胶复合物,稳定胃肠黏液层。此外,ITF 还能通过抑制细胞间黏附分子的表达,加快细胞移行,促进受损黏膜修复。因此,ITF 可减轻多种致伤因子造成

[基金项目] 国家自然科学基金(81100252),南京军区医学科研课题重点项目(09Z007),中国人民解放军第九七医院院管课题(YN2012027)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: sunyong_97@sina.com

的消化道损害,在胃肠黏膜的自我保护机制中占据重要地位。作为一个具有广泛应用前景的药物前体,却因为复杂的制备过程、较低的产量限制了它的应用。基因治疗是近年来出现的崭新的治疗手段,是将人正常基因或有治疗作用的基因通过一定方式导入人体靶细胞以纠正基因的缺陷或者发挥治疗作用,从而达到治疗疾病目的的生物医学技术^[2]。若通过基因治疗的途径将 ITF 基因导入体内,可以使 ITF 在体内大量表达,有望简化繁琐的操作程序、降低昂贵的生产成本。本研究首先构建 ITF 的真核表达载体,再利用壳聚糖作为基因传递载体,通过复凝法制备纳米粒,并利用 HEK293 细胞检验纳米粒的转染能力,最后利用 RT-PCR 和 Western blot 检测目的基因的转录及表达情况,为壳聚糖介导 hITF 基因治疗的应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pEGFP-N1、*E.coli* DH5 α 由本实验室保存;T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I、KOD-Plus 酶,TRIzol,RT 试剂盒 (TaKaRa 公司,日本);小鼠抗人 ITF 抗体、羊抗小鼠 HRP 标记的二抗 (Abcom 公司,美国);其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 hITF 真核表达载体的构建

hITF 的信号肽+成熟肽 cDNA 编码区的大小为 222 bp,编码 73 个氨基酸。根据在 GenBank 检索得到的 hITF mRNA 序列(NM003226),使用 Primer 5.0 软件设计以下引物:引物 1:5'-GAGACTCGAGATGCTGGGGCTGGTCTG-3',引物 2:5'-TTTAGAA-TTCGGAAGGTGCATTCTGCTTC-3'。上游和下游引物分别引入 *Xho* I、*Eco*R I 酶切位点(下划线),为了阅读框正确,引物 2 添加碱基 G(加粗)。PCR 产物经 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切后与同样双酶切的 pEGFP-N1 相连。

1.2.2 壳聚糖-质粒纳米粒的制备^[3]

称取纯化的壳聚糖 55 mg,溶解于 1%醋酸溶液 80 ml 中,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 5.5,以去离子水补充到 100 ml 即为 0.055%壳聚糖储存溶液,工作溶液按比例稀释。取 100 μ l 不同浓度的壳聚糖工作溶液和 100 μ l 固定浓度的质粒基因(pEGFP-N1-hITF)溶液,分别置 55 $^{\circ}$ C 水浴 20 min。然后将两者混合,迅速在涡旋震荡混合器上混合 30 s,室温静置 30 min,即得基因壳聚糖纳米粒溶液。

1.2.3 纳米粒的形态观察

取少量新鲜制备的壳聚糖纳米粒溶液,轻轻滴于铺有碳膜的铜网上,静置 5 min 后用滤纸吸干多余的液滴,于透射电子显微镜下观察纳米粒形态。

1.2.4 壳聚糖纳米粒转染 HEK293 细胞

HEK293 细胞采用含 10%FCS 的 DMEM 培养液,青霉素、链霉素各 100 U/ml,37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养,细胞隔天换液 1 次,每 2~3 d 进行传代,传代比例为 1:3,选取形态好的细胞用于实验研究。转染前 1 d,24 孔板每孔中加入 1×10^5 个细胞和 500 μ l 无抗生素的培养基,待细胞达到 70%融合后,制备 N/P 比为 3 的纳米粒,制备 0.5 h 后立即用于转染;每孔按照 2.5 μ g 质粒的量加入纳米粒,以 DMEM 补足至 500 μ l;37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养过夜(16 h),更换全培养基;继续培养 48~72 h,以利于外源蛋白的表达。同时以脂质体 2000 和裸质粒分别作为阳性和阴性对照。

1.2.5 DAPI 染色

转染 2 d 后,去除培养基,PBS 洗 1 次;用 4%的多聚甲醛在室温固定 30 min;用 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min;用含 0.3%Triton X-100 的 PBS 在室温穿孔 20 min;用 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min;加入 DAPI 染色液室温作用 10 min;用 PBS 在室温漂洗 3 次,每次 10 min;避光保存,等待观察荧光显微镜。

1.2.6 荧光显微镜观察

荧光显微镜下观察 GFP,激发光波长 450~500 nm,检测光波长 500~540 nm(绿色荧光);并以 360 nm 激发波长,460 nm 发射波长观察细胞(蓝色)。

1.2.7 流式细胞仪检测转染效率

0.25%胰酶消化细胞,计数并调整细胞数至 1×10^5 个;室温下 1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤 1 次;加入 500 μ l PBS 重悬细胞,立即上机检测,FL1 通道(530/30 nm)检测 GFP 荧光,门内计数 10^4 个细胞,测定转染效率。

1.2.8 RT-PCR 检测

目的基因 hITF 引物同前,预计扩增 240 bp。hITF 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,61 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环;循环完成后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。内参 β -actin 引物,上游:5'-TCGACAACGGCTCCGGCATG-3',下游:5'-GCCAGGTCCAGACGCAGGAT-3',预计扩增 514 bp。 β -actin 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环;循环完成后 72 $^{\circ}$ C 继续

延伸 10 min。

1.2.9 Western blot 检测

细胞培养(无血清培养基)72 h后,取培养液 900 μ l 于离心管中,加入 1/9 体积的 100%TCA,颠倒 10 次混匀,置于冰浴中大于 0.5 h,15 000 g 离心 10~20 min,小心倒掉上清,加入 200 μ l 冰冷的丙酮,洗去管底和管壁残余的 TCA,15 000 g 离心 10~20 min,倒掉上清,重复丙酮清洗 1 次。倒置离心管,37 $^{\circ}$ C 烘箱 10~20 min,待管底无明显液体残留,加入 100 μ l 1 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 溶解沉淀、变性蛋白。电泳结束后,取下凝胶,放入电转移缓冲液中浸泡 20 min,同时浸泡 6 张滤纸,PVDF 膜,安装“三明治”结构,从负极到正极:三层滤纸-凝胶-PVDF 膜-三层滤纸,恒流 1.5 mA/cm 2 ,电转移 1.5 h。然后将 PVDF 膜浸泡于含 5%脱脂奶粉的 1 \times TBS 缓冲液中,室温封闭 1 h,加入来源于小鼠的 hITF 单克隆抗体(一抗,1:1 000),4 $^{\circ}$ C 过夜,以 1 \times TBST 洗膜 4 次(10 min/次),加入辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(二抗,1:5 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,以 1 \times TBST 洗膜 4 次,加入 A、B 混合液,化学发光法显色。

2 结果

2.1 hITF 真核表达载体的构建

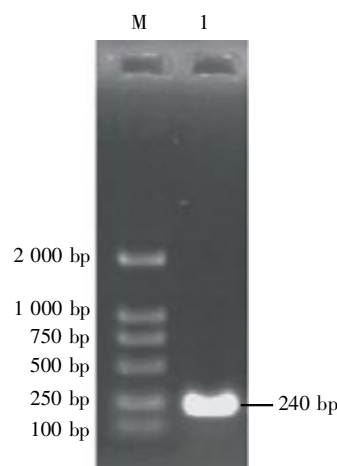
提取肠黏膜上皮细胞总 RNA,以 hITF 的信号肽+成熟肽 cDNA 为模板设计引物,PCR 扩增出与预计长度一致的 240 bp 片段(基因序列+酶切位点+保护碱基)(图 1)。将 PCR 扩增产物与表达载体 pEGFP-N1 双酶切,连接过夜并转化 *E.coli* DH5 α 感受态。随机挑选 1 个菌落提取质粒,经 *Xho* I、*Eco* R I 双酶切后,切出 232 bp 大小的片段(比 RT-PCR 产物减少了 8 个保护碱基),证实为阳性克隆(图 2)。阳性克隆送上海 Invitrogen 生物技术有限公司测序,结果证实所扩增的 hITF 基因序列完全正确(包含信号肽与成熟肽),与 GenBank 数据库所收录的基因序列完全一致(NM003226),并准确地插入到表达载体的相应位点。

2.2 纳米粒的透射电镜观察

纳米粒的形态接近球形,在混悬液中分布均匀,直径集中在 500~1 000 nm,平均约 700 nm,呈窄分布(图 3)。

2.3 荧光显微镜观察

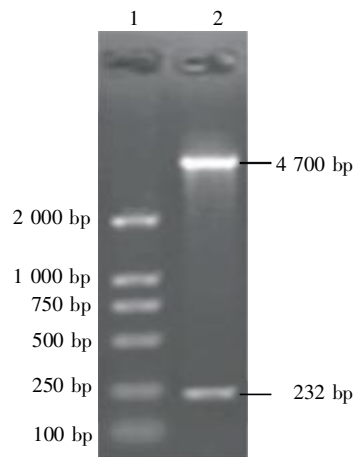
如图 4 所示,HEK293 细胞经壳聚糖纳米粒转染后可见绿色荧光蛋白表达,其转染率约 80%(任一视野,表达 GFP 的细胞占细胞核的比例),与脂质



1:DL2000 Marker;2:RT-PCR 产物。

图 1 RT-PCR 产物电泳图

Figure 1 Electropherogram of RT-PCR product



1:DL2000 Marker;2:*Eco* R I、*Xho* I 酶切鉴定。

图 2 重组质粒酶切鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid with enzyme digestion

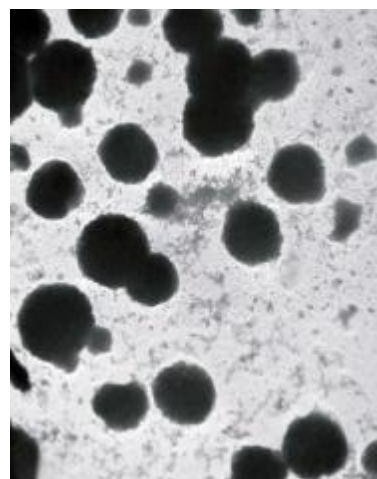


图 3 壳聚糖纳米粒的透射电镜照片($\times 40\ 000$)

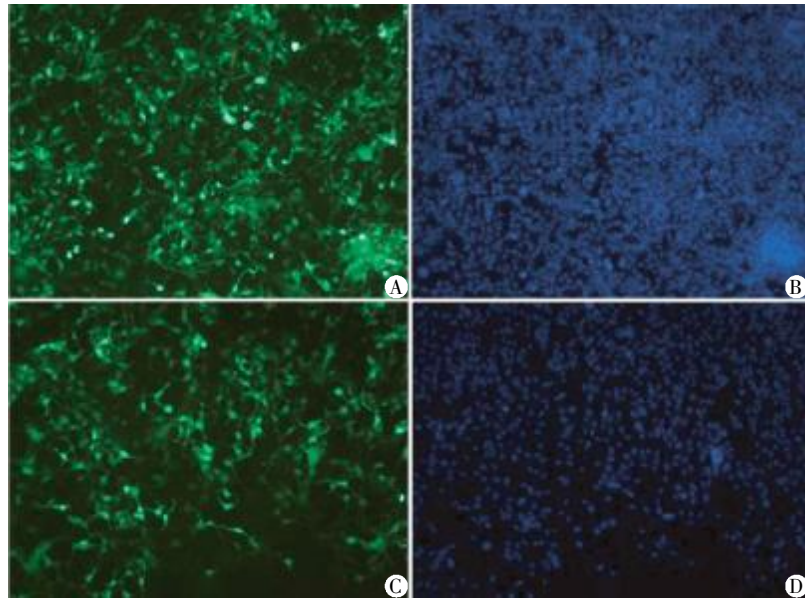
Figure 3 TEM image of chitosan/DNA nanoparticles($\times 40\ 000$)

体的转染效率相似,而裸质粒未发现 GFP 表达(资料未显示)。

2.4 流式细胞仪检测转染效率

细胞转染 3 d 后行流式细胞仪检测转染效率,

裸质粒组、脂质体组、壳聚糖纳米粒组转染效率分别为 $(0.23 \pm 0.04)\%$ 、 $(81.44 \pm 5.44)\%$ 、 $(83.61 \pm 5.31)\%$,脂质体组和壳聚糖纳米粒组之间转染效率没有差异,但均显著高于裸质粒组(图 5)。



A、B:脂质体转染 HEK293 细胞;C、D:纳米粒转染 HEK293 细胞(绿色代表绿色荧光蛋白,蓝色代表细胞核)。

图 4 脂质体、纳米粒转染 HEK293 细胞($\times 100$)

Figure 4 Transfection of HEK293 cells with lipofectamine and nanoparticles ($\times 100$)

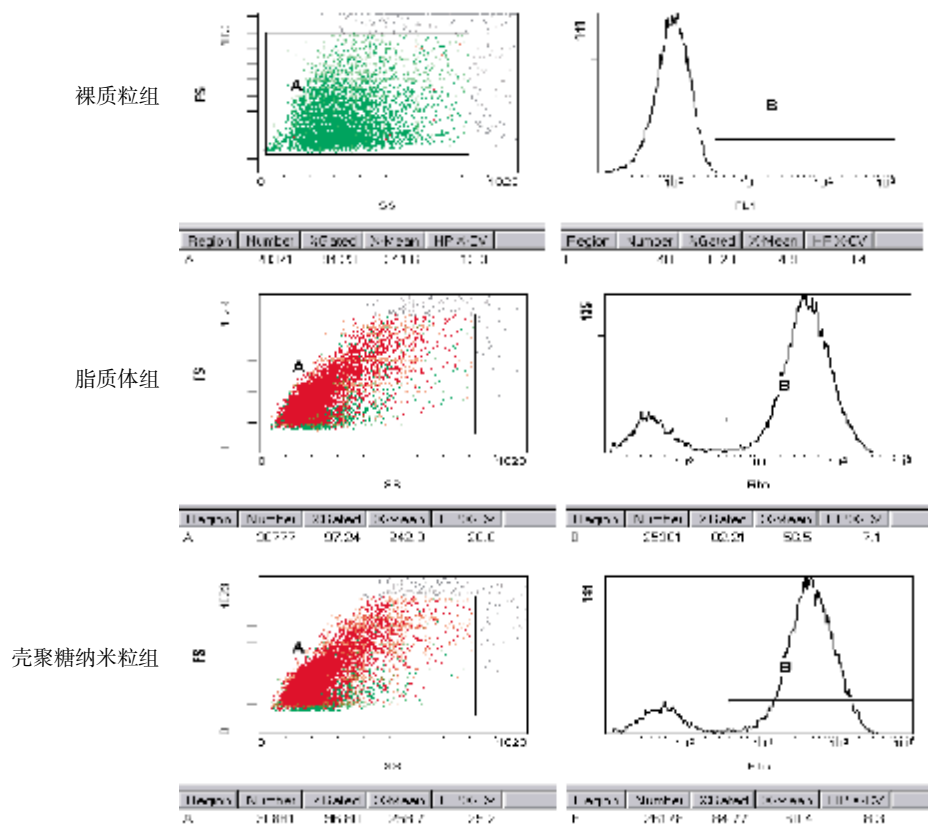
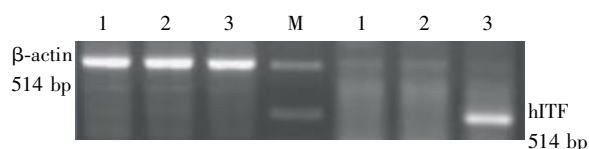


图 5 流式细胞仪检测

Figure 5 Determination of transfection efficiency by flow cytometry

2.5 RT-PCR

RT-PCR 显示, 纳米粒转染的 HEK293 细胞成功扩出目的条带, 而裸质粒转染细胞及空细胞均未扩出条带, 说明纳米粒转染的 HEK293 细胞转录出 hITF 基因(图 6)。



1: HEK293 细胞; 2: 裸质粒; 3: 壳聚糖纳米粒; M: DL2000 Marker。

图 6 RT-PCR 产物电泳图

Figure 6 Electropherogram of RT-PCR product

2.6 Western blot

Western blot 结果显示, 纳米粒转染后上清出现 1 条显色带, 而未转染组则没出现显色带, 说明表达产物能与抗 hITF 的单克隆相结合, 具有抗原性(图 7)。



1: 纳米粒转染 HEK293 细胞; 2: HEK293 细胞。

图 7 hITF 的 Western-blot 鉴定

Figure 7 Western blot analysis of hITF

3 讨论

ITF 是一种具有潜在药用价值的小分子多肽, 其主要药理作用为减轻各种致伤因素导致的胃肠黏膜损伤、促进受损黏膜修复。人 ITF 基因的 cDNA 全长为 222 bp (GenBank Accession No. NM003226), 共编码 73 个氨基酸, 前面 14 个为信号肽, 后面 59 个为成熟氨基酸^[4-5]。人小肠杯状细胞内合成 ITF 前体, 然后由信号肽引导分泌出细胞, 分布于肠道, 同时 ITF 信号肽脱落转化为成熟 ITF。本研究为得到分泌表达的 ITF, 构建了含有 ITF 信号肽及成熟肽的表达载体。表达载体选用含有绿色荧光蛋白报告基因的 pEGFP-N1 真核表达载体, 该载体可表达含有 GFP 的融合蛋白, GFP 发出的绿色荧光有利于检测目的蛋白^[6], 而且大量研究证明, 融合蛋白 GFP 并不影响目的蛋白的功能。

ITF 具有强大的胃肠黏膜保护作用^[7], 但由于产量低下限制了它的应用。基因治疗是新近发展起来的一项新技术, 是指把遗传物质引入到患者的细胞中, 以达到治疗疾病的目的, 是伴随着基因

工程技术和分子生物学的发展而逐渐形成的一种新型“分子治疗”手段^[8]。壳聚糖[聚(1,4)-2-氨基-2-去氧-β-D-葡萄糖胺]是一种极具潜力的天然阳离子多聚糖, 提取自海洋甲壳类生物, 是甲壳素脱乙酰化的产物^[9]。作为纯天然的高分子材料, 壳聚糖对细胞和机体无毒无害; 而且壳聚糖表面带有正电荷, 能将带有负电荷的 DNA 包裹在其内部, 防止体内 DNA 酶、胃肠道酸碱内容物、细菌对 DNA 的降解^[10-11]。另外, 壳聚糖包裹基因 DNA 后形成的微粒为纳米级, 易于穿透细胞膜, 具有较高的转染效率, 是一种有效的非病毒性基因载体。鉴于壳聚糖在基因载体方面独特的优越性, 因此选择壳聚糖作为本研究的基因传递载体^[12]。

本研究选择分子量 150 000、脱乙酰度 81% 的壳聚糖作为基因传递载体, 采用复凝法利用壳聚糖包裹重组质粒制备纳米粒。在 pH 值为 5.5 的条件下, 壳聚糖分子带正电荷, 质粒分子带负电荷, 通过硫酸钠盐析作用, 壳聚糖分子与质粒分子复合压缩、包裹缠绕, 并从溶液中析出生成纳米粒^[13]。透射电镜观察, 纳米粒的形态接近球形, 在混悬液中分布均匀, 粒度集 < 1 000 nm, 粒径呈窄分布。

转染效率的高低是评价基因传递载体优劣的主要指标。为检验壳聚糖纳米粒的转染效率, 本研究将其转染 HEK293 细胞, 同时以商品化的转染载体脂质体 2000 作为阳性对照。荧光显微镜及流式细胞仪检测证明, 壳聚糖纳米粒的转染效率和脂质体基本一致, 且远远高于裸质粒转染。然而从价格比较, 壳聚糖远远低于脂质体的价格, 具有极大的经济效益。RT-PCR 和 Western blot 检测从转录和翻译的水平证实, 壳聚糖纳米粒转染后可以成功表达 hITF, 并顺利分泌至细胞培养液中, 以符合其细胞外发挥生理作用的特点。

血清浓度是影响壳聚糖纳米粒转染效率的重要因素之一。本研究利用壳聚糖进行基因转染的时候使用的是无血清培养基, 然而有文献报道, 含有血清的培养基更加利于细胞转染。如研究表明在 20% 血清存在的情况下, A549 细胞中壳聚糖纳米粒的转染效率要比无血清者高 2~3 倍, 但血清高达 50% 后, 则会损伤被转染细胞, 使其活力下降, 导致细胞摄取效率和转染效率下降^[14]。壳聚糖-DNA 复合物对血清抑制的抵抗作用使其较脂质体更适合用于外源性基因的体内尤其是静脉途径的投递^[15]。

总之, 本研究利用复凝法制备了壳聚糖纳米粒, 透射电镜观察到粒度 < 1 000 nm, 粒径呈窄分布; 荧

光显微镜及流式细胞仪检测显示,壳聚糖纳米粒对 HEK293 细胞的转染率约为 80%, 和脂质体的转染率基本一致;RT-PCR 和 Western blot 检测说明, hITF 被成功转录并分泌表达。本研究结果为壳聚糖介导 hITF 基因治疗的应用打下基础。

[参考文献]

- [1] 孙勇,彭曦,张勇,等. hITF 毕赤酵母表达载体的构建及分泌表达[J]. 第三军医大学学报,2006,28(6): 527-530
- [2] Thanou M,Verhoef JC,Junginger HE. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2001,50(Suppl 1):S91-101
- [3] Sun Y,Zhang S,Peng X,et al. Preparation,characterization and transfection efficacy of chitosan nanoparticles containing the intestinal trefoil factor gene [J]. *Mol Biol Rep*,2012,39(2):945-952
- [4] Qasim W,Gaspar HB,Thrasher AJ. Progress and prospects:gene therapy for inherited immunodeficiencies [J]. *Gene Ther*,2009,16(11):1285-1291
- [5] 孙勇,孙曙光,吴炜,等. 人解痉多肽原核表达载体的构建及诱导表达[J].南京医科大学学报:自然科学版,2008,28(12):1537-1540
- [6] Blaese RM,Culver KW,Miller AD,et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID:initial trial results after 4 years[J]. *Science*,1995,270(5235):475-480
- [7] Shi J,Zheng D. An update on gene therapy in China [J]. *Curr Opin Mol Ther*,2009,11(5):547-553
- [8] Ferreira DM,Saga YY,Aluicio-Sarduy E,et al. Chitosan nanoparticles for melanoma cancer treatment by Photodynamic Therapy and electrochemotherapy using aminolevulinic acid derivatives [J]. *Curr Med Chem*,2013,20(14):1904-1911
- [9] Huang M,Fong CW,Khor E,et al. Transfection efficiency of chitosan vectors:effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation [J]. *J Control Release*,2005,106(3):391-406
- [10] Cao L,Yang F,Liu G,et al. The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*,2011,32(16):3910-3920
- [11] Duysen EG,Parikh K,Aleti V,et al. Adenovirus-mediated human paraoxonase1 gene transfer to provide protection against the toxicity of the organophosphorus pesticide toxicant diazoxon [J]. *Gene Ther*,2011,18(3):250-257
- [12] Seregin SS,Aldhamen YA,Appledorn DM,et al. Use of DAF-displaying Adenovirus vectors reduces induction of transgene and vector specific adaptive immune responses in mice [J]. *Hum Gene Ther*,2011,22(9):1083-1094
- [13] Mathis JM,Bhatia S,Khandelwal A,et al. Genetic incorporation of human metallothionein into the adenovirus protein IX for non-invasive SPECT imaging [J]. *PLoS One*,2011,6(2):e16792
- [14] Huang M,Khor E,Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles:effects of molecular weight and degree of deacetylation [J]. *Pharm Res*,2004,21(2):344-353
- [15] Hartigan-O'Connor D,Barjot C,Crawford R,et al. Efficient rescue of gutted adenovirus genomes allows rapid production of concentrated stocks without negative selection [J]. *Hum Gene Ther*,2002,13(4):519-531

[收稿日期] 2014-01-16