

## · 论著 ·

## 微小 RNA 传递载体聚乙二醇-b-聚赖氨酸的合成及细胞毒性研究

任海峰, 赵英魁, 杨峰, 俞媛, 马志强 (第二军医大学药学院, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 制备微小 RNA(miRNA) 传递载体聚乙二醇-b-聚赖氨酸(PEG-b-PLL) 并且选用模型细胞对其进行毒性考察。方法 通过核磁谱测定聚赖氨酸的聚合度,用 4% 琼脂糖凝胶电泳检测聚复合物对 miRNA 的包封,用动态光散射法测定制备所得聚复合物粒径、多分散性指数(PDI) Zeta 电位,用荧光标记的 FAM-hsa-miR-15a 进行包封率的测定,采用 CKK-8 试剂盒测定 K562 细胞(人慢性淋巴白血病细胞)活力考察 PEG-b-PLL 的细胞毒性。结果 用 PEG-b-PLL 制备的聚阳离子胶束/miRNA 复合物特性符合应用要求,并且细胞毒性显著低于聚乙烯亚胺(PEI),lipo2000。结论 离子聚合物载体 PEG-b-PLL 符合应用要求,同时毒性较低,有望成为基因转染的有效载体。

**[关键词]** 非病毒载体;聚赖氨酸;微小 RNA(miRNA);细胞毒性

**[中图分类号]** R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)05-0362-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.05.013

## Study on synthesis and cyto-toxicity of polyethylene glycol-b-polylysine as potential miRNA carrier

REN Haifeng, ZHAO Yingkui, YANG Feng, YU Yuan, MA Zhiqiang (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To synthesize miRNA carrier PEG-b-PLL and to testify the stability, encapsulation efficiency and cytotoxicity of its complexes. **Methods**  $^1\text{H}$  NMR was used to determine the degree of polymerization of PLL, 4% agarose gel electrophoresis was used to determine entrapment of the polymer to the miRNA; then dynamic light scattering(DLS) was used to measure the hydrodynamic parameter such as size, polydispersity index(PDI) and zeta potential of the polyplexes. The entrapment efficiency was determined by ultraviolet-visible spectrophotometer, and finally, the cyto-toxicity of PEG-b-PLL was evaluated by CKK-8 kit with K562 cell lines. **Results** The characteristics indicated polyplexes prepared by PEG-b-PLL and miRNA fulfill the demand of being the gene carrier of miRNA because of low cyto-toxicity, high encapsulation efficiency and stability. **Conclusion** The miRNA carrier PEG-b-PLL had good character and low cyto-toxicity. It showed considerable potential as an efficient miRNA carrier.

**[Key words]** non-viral vector; polyethylenimine; miRNA; cyto-toxicity

微小 RNA(microRNA, miRNA) 是由内源性发夹(hairpin)结构转录衍生而来的一种长度为 19~25 nt 的单链 RNA(single-stranded RNA, ssRNA), 广泛存在于真核生物细胞中, 是一种非编码 RNA, 它可以介导基因沉默<sup>[1]</sup>。近年来, 越来越多的证据显示 miRNA 在生理过程中起到很大的作用<sup>[2]</sup>, 它们的异常表达会导致很多疾病的发生<sup>[3,4]</sup>。因此, 近年来不少科学家试图利用 miRNA 的生理功能实现疾病治疗的目的<sup>[5,6]</sup>。但是, 裸 miRNA 通过注射等方式进入机体存在诸多问题, 包括: 在血清中稳定性差, 很快被细胞外的 RNA 酶降解; 在正常组织中会有非

特异性分布, 从而使它们在靶组织的水平降低, 发挥不了期望的药理活性<sup>[7]</sup>。因此, 将 miRNA 成功地导入体内, 有效地到达靶组织, 迫切需要寻找一种高效的载体来克服上述障碍。

目前常用的两种基因载体: 病毒载体和非病毒载体。病毒载体虽然有极高的转染效率, 但是其转基因表达时间短, 不能在宿主细胞中持续表达, 临床上也存在多种安全问题<sup>[7-10]</sup>, 因此病毒载体的应用前景备受质疑。为了解决病毒载体出现的问题, 大量的非病毒载体被开发出来用于基因传递, 例如壳聚糖、阳离子脂质体以及阳离子高分子嵌段聚合物等。在诸多非病毒载体中, 具有质子海绵效应的聚阳离子高分子材料日益受到重视, 有望成为解决基因传递问题的重要材料。该类材料可以增强复合物粒子在血液中的稳定性, 避开网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES) 的吞噬作用, 具有良好的

**[作者简介]** 任海峰, 第二军医大学药学本科 2010 级学员。E-mail: 13636581237@163.com.

**[通讯作者]** 马志强。Tel: (021) 81871220-1, E-mail: briskbreeze@126.com.

内涵体逃逸功能,同时兼具较低的细胞毒性,是一种理想的基因载体。

聚赖氨酸是近年来应用较广泛的一种阳离子载体,极具应用前景。在质粒 DNA 以及 siRNA (small interfering RNA) 的传递系统中多有报道<sup>[11-13]</sup>,但是尚未见该材料用于 miRNA 的基因传递系统中。hsa-miR-15a 是一种典型的 miRNA,在多种肿瘤中该基因缺失或者下调。本实验合成了 PEG 化的聚赖氨酸,并以 hsa-miR-15a 为模型基因探讨 PEG 化的聚赖氨酸包覆 miRNA 的性能,对其细胞毒性进行考察,实验结果表明 PEG-b-PLL 是一种有潜力的 miRNA 基因传递载体。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

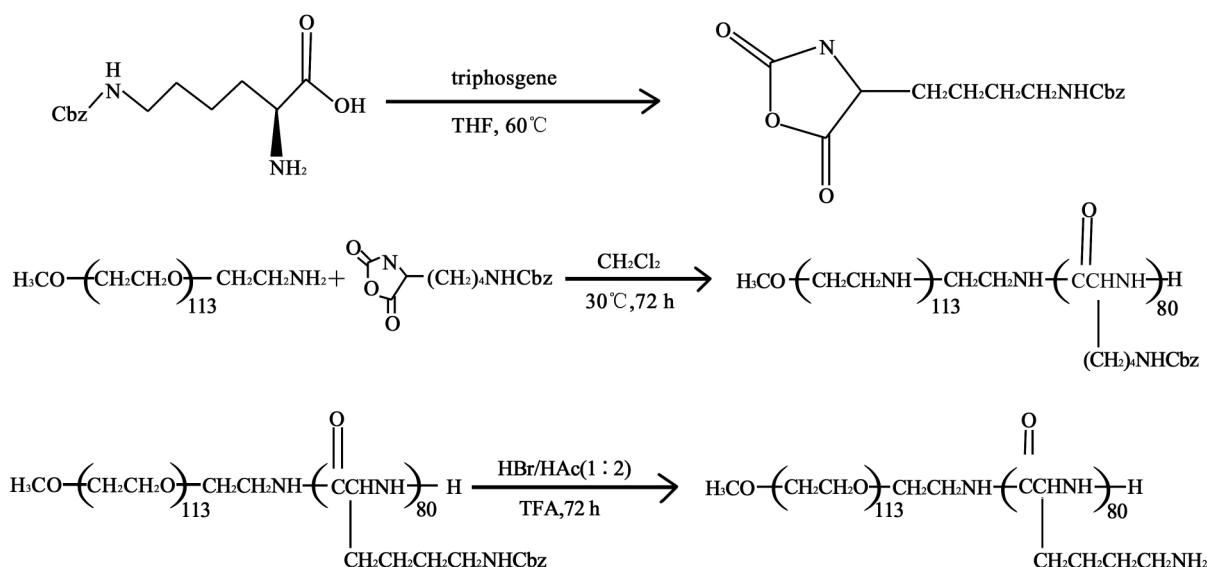


图1 PEG-b-PLL 合成示意图

称取 N-碳苄氧基赖氨酸 10 g,溶于回流过的四氢呋喃 50 ml,升温至 60℃,在磁力搅拌下加入三光气 7 g,待反应液变成澄清后充入氮气去除多余的光气和 HCl 气体,旋蒸浓缩反应液,用氯仿稀释,并缓慢加入过量正己烷沉淀产物,在冰箱中静置 12 h,过滤得粗产物,并用乙酸乙酯-正己烷(1:1)重结晶,静置 12 h,过滤,真空干燥得产物 L-碳苄氧基赖氨酸-N-羧酸酐。

精密称取 PEG-NH<sub>2</sub> 500 mg、L-碳苄氧基赖氨酸-N-羧酸酐 2.5 g,溶于 6.2 ml 的 DMF(二甲基甲酰胺)中,氮气保护,体系隔绝水,在 35℃ 条件下反应 72 h,用纯水透析,即得 PEG-b-PLL-Cbz。

取 PEG-b-PLL-Cbz 500 mg,加入 10 ml 混合溶剂 HBr-HAc(1:2),再加入 2 ml TFA(三氟乙酸),室温

1.1.1 试剂 甲氧基聚乙二醇胺(mPEG-NH<sub>2</sub>)和 N-碳苄氧基赖氨酸(Nepsilon-Cbz-L-Lysine)购于上海阿拉丁试剂有限公司;二亚乙基三胺( DET)购自百灵威科技有限公司;Goldview 核酸染料,购自北京赛百盛基因技术有限公司;CKK-8 试剂盒,购自同仁化学研究所;其余有机溶剂与反应介质购自国药集团。

1.1.2 仪器 核磁共振仪(美国 Bruker 公司);冷冻干燥机 V55C 型(美国 Virtis 公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Barnstead 公司);电泳仪 WH-300-LCD(上海伊瑞生物科技仪器有限公司);水平电泳槽 YR-158(上海伊瑞生物科技仪器有限公司);凝胶成像仪(上海复日科技有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 PEG-b-PLL 的合成

下反应 72 h,加入过量乙醚沉淀分层,取水相,加入碱调至弱酸,透析,加入过量乙醚,沉淀,加入水静置分层,除去乙醚层,加碱中和,透析,冻干,得终产品。

1.2.2 聚复合物的合成及表征 采用自组合法合成聚复合物。按照 N/P = 0, 5, 10, 20, 取 PEG-b-PLL 和 hsa-miR-15a 在 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 中,按照一定比例混合孵育,自组装得到载基因聚复合物(hsa-miR-15a-polyplex)。将 hsa-miR-15a-polyplex 稀释于 0.001 mol/L NaCl 溶液中,测定光散射粒径、PDI、Zeta 电位值。

同时,为了考察该胶束复合物的性质随时间变化的趋势,选定 N/P = 20 的情况对各组胶束复合物的粒径和 PDI 在 10% FBS(胎牛血清)的 PBS(磷酸盐缓冲液)溶液中考察,每半小时测定一次,直到最

稳定组的粒径和 PDI 发生凝聚后 1 h 停止记录。

用 4% 琼脂糖凝胶电泳检测聚复合物对 miRNA 的包封率。称取琼脂糖 4 g, 加入 87 ml 无菌蒸馏水, 微波炉中加热溶解, 加入 10 ml RNArun 溶液, 室温下将溶液冷却至 60 °C 左右, 再加入 3 ml 去离子甲醛, 混匀, 趁热灌胶, 上样前用 110 V 电压预电泳 5 min。

**1.2.3 聚复合物细胞毒性的研究** 培养的慢性淋巴白血病细胞(K562 细胞), 采用 CCK-8 试剂盒测定考察 PEG-b-PLL 的细胞毒性。实验步骤如下:

**1.2.3.1** 取出对数生长期的 K562 细胞, 吹匀, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃去培养基, 收集 K562 细胞, 重悬接种于 96 孔板, 每孔加细胞悬液 90  $\mu$ l, 浓度为  $1 \times 10^4$  cell/well。加入不同浓度的合成聚合物溶液, 混合均匀, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下连续培养 4 h。设计每个浓度 3 个复孔。同时设不加细胞的空白孔和不进行任何处理的阴性对照孔。

**1.2.3.2** 各因素组细胞孵育 2 d 后, 取出 96 孔板, 每孔加入 15  $\mu$ l 的 CCK-8 溶液, 将孔板置于孵箱中继续孵育 4 h。

**1.2.3.3** 用紫外酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。

**1.2.3.4** 计算每组 3 个复孔的平均吸光度值(OD 值) 按以下公式计算细胞生存率:

细胞生存率(%) = (样品 OD 值 - 空白 OD 值) / (阴性对照 OD 值 - 空白组 OD 值)  $\times$  100%

## 2 结果

**2.1 PEG-b-PLL 的合成** 设计聚赖氨酸的聚合度为 80, 合成的产品核磁谱如图 1, 以分子中 PEG 定标的情况下得出苯基的个数为 82.7 个, 即所得产品赖氨酸聚合度约为 83。PEG-b-PLL-Cbz 在脱掉苯基后即生成 PEG-b-PLL。

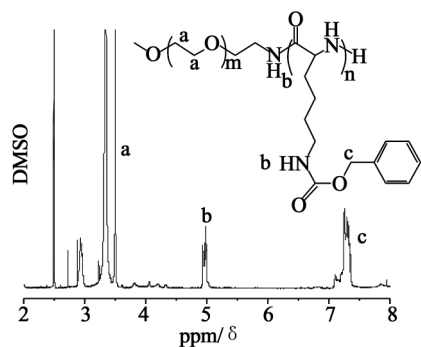


图 1 PEG-b-PLL-Cbz 核磁图谱

**2.2 聚复合物的合成及表征** 实验结果如表 1, 结果显示随着 N/P(氮磷比) 的增大, miRNA 由游离状态逐渐与高分子材料复合, 形成胶束复合物, 胶束复

合物的纳米粒比较松散, 粒径在 150 ~ 260 nm 之间。可能因为 miRNA 的链段很短(只有 21 个碱基对), 并且刚性很强的缘故, 因此在我们的实验里, 并未见到胶束的粒径与 N/P 有明显的线性关系。PDI(多分散性)可衡量胶束复合物粒径的分散程度, 通常认为在胶束复合物系统中, PDI < 0.3 方可满足进一步研究的要求。我们制备的胶束复合物的 PDI 均在 0.3 以下, 并且胶束复合物整体带正电荷(Zeta 电位都在 10 mV 以上), 满足后续实验通过与细胞膜的负电荷物质(主要为磷脂双分子层)相互作用, 内吞进入细胞的要求。

表 1 不同氮磷比下胶束复合物的动态光散射数据

| N/P | d( nm) | PDI   | Zeta( mV) |
|-----|--------|-------|-----------|
| 0   | 668.4  | 0.738 | -25.1     |
| 5   | 185.5  | 0.277 | 15.6      |
| 10  | 250.6  | 0.284 | 12.2      |
| 20  | 155.7  | 0.244 | 16.3      |

中性溶液中, 带有负电荷的 miRNA 可利用甲醛变性琼脂糖从负极向正极泳动, 利用 Goldview 核酸染料插入到 miRNA 后在紫外灯下呈现荧光条带。凝胶电泳阻滞分析法可以通过荧光的位置和强度直观地反映聚合物与 RNA 结合作用的强弱。当聚合物与 miRNA 结合牢固时, 紫外灯下无法观察到荧光; 如果结合得不牢固, 那么游离的 miRNA 就会与核酸染料结合显示出荧光。如图 2 所示, 当 N/P = 0 时, 裸的 miRNA 显示出非常强的荧光, 随着 N/P 的增大, 荧光逐渐减弱, 并且拖尾现象消失, 显示 miRNA 已经与 PEG-b-PLL 稳定结合形成胶束复合物, 滞留在加样孔中。

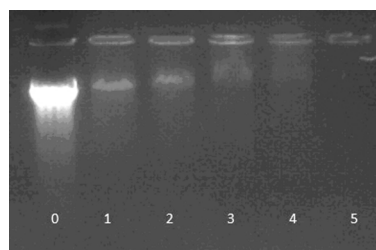


图 2 不同 N/P 条件下, 高分子嵌段共聚物对于 miRNA 的复合效率(图中 0 ~ 5 为复合物中的 N/P, 即氮磷比)

为了测定该胶束复合物在生理条件下的稳定性, 在 0.1 mol/L PBS 的溶液体系中制备 N/P = 10, 基因浓度在 5 nmol/L 的胶束复合物溶液, 每隔 2 h 测一次其粒径和 PDI 变化(图 3)。可以看出, 粒径和 PDI 的变化是比较一致的。随着时间的推移, 复

合物的粒径逐渐增大,由 160 nm 左右增至 1 000 nm 以上,伴随的是 PDI 的数值由 0.2 左右逐渐增大到 0.45 左右,表明随着时间的推移,胶束复合物的稳定性逐渐下降,胶束复合物在溶液电解质的作用下,在 20 h 后明显发生团聚现象。

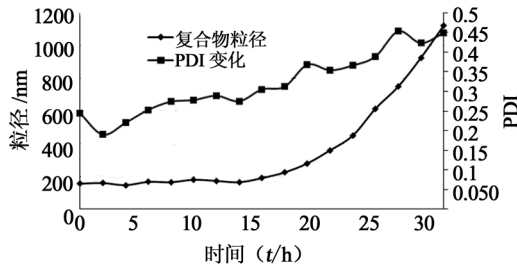


图 3 N/P = 10 时,胶束复合物的粒径和 PDI 随时间变化趋势

**2.3 聚复合物细胞毒性的研究** 实验所得结果如图 4,分别在 PEG-b-PLL 的浓度为 0.04、0.2、1 mg/ml 时测定其毒性。由实验结果我们可以看出,在相同浓度下,相对传统的转染试剂 PEI,胶束复合物的细胞存活率远高于 PEI 组;同已经商业化的 lipo2000 比较,只有高分子材料在 1 mg/ml 的高浓度时毒性高于 lipo2000,而在接近工作浓度的 0.04 mg/ml,高分子材料的表现略优于 lipo2000。表明该材料可作为基因载体做进一步的研究。

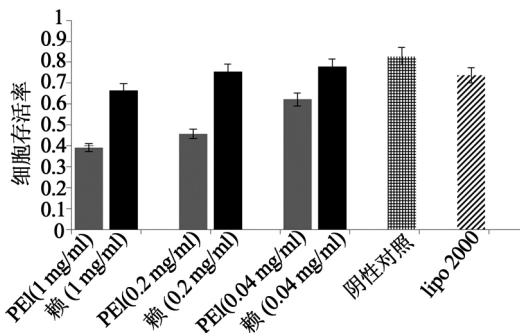


图 4 不同浓度下 PEG-b-PLL 的细胞毒性 (赖: PEG-b-PLL)

### 3 讨论

因为 miRNA 较质粒 DNA 和 siRNA 脆弱,因此在载体系统的设计中能保证其稳定性就显得十分重要。在本实验中成功制得 PEG-b-PLL,核磁谱显示聚赖氨酸聚合度 83,与实验设计的结构接近,说明本合成方案可行。利用动态光散射对不同 N/P 条件下胶束复合物的流体力学半径以及 Zeta 电位进

行研究,实验结果表明,随着 N/P 的增大,胶束复合物的流体力学半径变小,Zeta 电位变化不大,表明可能在此过程中,胶束复合物复合 miRNA 的能力逐渐增大。本实验还利用凝胶阻滞色谱测定了胶束复合物复合 miRNA 的能力,在 N/P ≥ 5 时,聚合物可以对 miRNA 进行有效包覆;动态光散射数据显示,在 N/P = 10 时,在 20 h 后胶束复合物开始发生聚沉现象,显示胶束复合物在类生理环境下具有一定的稳定性。最后对该高分子材料的细胞生物毒性进行了考察,结果显示聚赖氨酸-miRNA 聚复合物各项特性符合应用要求,相比其他载体毒性低,极具应用前景。该材料有望通过传递 miRNA 进入细胞内,在肿瘤治疗等领域发挥巨大作用。

### 【参考文献】

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-4* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] Hagiwara K, Ochiya T, Kosaka N. A paradigm shift for extracellular vesicles as small RNA carriers: from cellular waste elimination to therapeutic applications [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2014, 4: 31-37.
- [3] Sheherbata HR, Hatfield S, Ward EJ, et al. The MicroRNA pathway plays a regulatory role in stem cell division [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(2): 172-175.
- [4] Hatfield SD, Sheherbata HR, Fischer KA, et al. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway [J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 974-978.
- [5] Tan PH, Pao YY, Cheng JK, et al. MicroRNA-based therapy in pain medicine: current progress and future prospects [J]. *Acta Anaesthesiol Taiwanica*, 2013, 51: 171-176.
- [6] Hatakeyama H, Murata M, Sato Y, et al. The systemic administration of an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice [J]. *J Control Rel*, 2014, 173: 43-50.
- [7] Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector [J]. *Science*, 1999, 286: 2244-2245.
- [8] Hollon T. Researchers and regulators reflect on first gene therapy death [J]. *Am J Ophthalmol*, 2000, 129(5): 701.
- [9] Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(1): 3-13.
- [10] Cavazzana Calvo M, Hacein Bey S, Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease [J]. *Science*, 2000, 288: 669-672.
- [11] Sanjoh M, Miyata K, Christie RJ, et al. Dual environment-responsive polyplex carriers for enhanced intracellular delivery of plasmid DNA [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(11): 3641-3649.
- [12] Osada K, Shiotani T, Tockary TA, et al. Enhanced gene expression promoted by the quantized folding of pDNA within polyplex micelles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(1): 325-332.

(下转第 373 页)

总发生率。

1.5 统计学分析 采用  $\chi^2$  检验 , $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

表 1 两组第 4 周期化疗后神经毒性比较(  $n = 32$  )

| 组别  | 神经毒性级别 |   |    |     |    | 发生率( % )                  | $\chi^2$ |
|-----|--------|---|----|-----|----|---------------------------|----------|
|     | 0      | I | II | III | IV |                           |          |
| 对照组 | 18     | 8 | 6  | 0   | 0  | 43.8( 14/32)              | 4.654 5  |
| 预防组 | 26     | 3 | 3  | 0   | 0  | 18.8( 6/23) <sup>1)</sup> |          |

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  ,与对照组比较

## 3 讨论

紫杉醇是一种抗微管装配的抑制剂 ,自 1992 年在美国上市以来 ,越来越广泛地应用在乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、食管癌等的一线二线治疗中。其毒副作用包括过敏反应、骨髓抑制、神经毒性和心脏毒性等 ,是限制其临床进一步应用的重要原因。其神经毒性发生率较高 ,呈剂量依赖 ,多为周围神经病变 ,表现为麻木、感觉异常等。研究发现紫杉醇致神经毒性的机制与铂类药物类似: 其会导致感觉神经元线粒体功能损害 ,表现为线粒体呼吸功能减弱、ATP 产量减少等<sup>[4]</sup>。目前临床上尚无有效预防及治疗周围神经毒性的药物及治疗方案。

左卡尼汀是人体能量代谢必需物质 ,广泛存在于机体各组织中 ,心肌和骨骼肌含量较高 ,主要功能是调节能量代谢。足量游离左卡尼汀可使因缺氧缺血堆积的酯酰 CoA 进入线粒体从而使氧化磷酸化顺利进行 ,在新陈代谢中起重要的作用。有基础研究发现左卡尼汀可通过改善周围神经轴突线粒体功能保护周围神经免受神经毒性药物损害<sup>[5 6]</sup>。更有研究发现在紫杉醇及铂类药物诱导产生神经病变的大鼠模型中 ,同时预防性给予左卡尼汀可以保护线粒体功能而避免神经毒性发生<sup>[1-7]</sup>。

本研究尝试选用左卡尼汀来预防紫杉醇的周围神经毒性。临床观察发现: 在应用紫杉醇联合卡培他滨化疗的患者中加用左卡尼汀组的周围神经毒性发生率较低 ,差异有统计学意义。初步说明左卡尼汀对紫杉醇引起的周围神经毒性具有预防及治疗作用 ,其机制可能与其改善神经细胞能量代谢及保护线粒体功能有关。左卡尼汀也可尝试联合 B 族维

两组患者于第 4 个周期完成后进行评价 ,详见表 1。结果显示 ,预防组周围神经毒性总发生率低于对照组(  $P < 0.05$  ) ,两组间各级周围神经毒性发生率无显著性差异。

生素以及还原性谷胱甘肽等药进一步减少紫杉醇等化疗药物的神经毒性及各种不良反应 ,最大限度发挥化疗药物的抗肿瘤活性 ,改善患者生存质量。作为一个新型的周围神经保护剂 ,左卡尼汀值得临床应用及进一步研究。

## 【参考文献】

- [1] Ghirardi O ,Lo Giudice P ,Pisano C *et al.* Acetyl-L-carnitine prevents and reverts experimental chronic neurotoxicity induced by oxaliplatin ,without altering its antitumor properties [J]. *Anticancer Res* 2005 ,25( 4) :2681-2687.
- [2] Gunes D ,Kirrim G ,Kolatan E *et al.* Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity [J]. *Chemotherapy* 2011 ,57( 3) :186-194.
- [3] 孙 燕. 抗癌药物急性与亚急性毒性反应分度标准临床肿瘤手册[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社 2005: 145.
- [4] Xiao WH ,Zheng H ,Zheng FY *et al.* Mitochondrial abnormality in sensory ,but not motor ,axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy in the rat [J]. *Neuroscience* 2011 ,199: 461-469.
- [5] He MD ,Xu SC ,Lu YH *et al.* L-carnitine protects against nickel-induced neurotoxicity by maintaining mitochondrial function in neuro-2a cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011 ,253( 1) :38-44.
- [6] Nagesh BG ,Kumar A ,Singh RL. Chronic pretreatment with acetyl-L-carnitine and  $\pm$ DL- $\alpha$ -lipoic acid protects against acute glutamate-induced neurotoxicity in rat brain by altering mitochondrial function [J]. *Neurotox Res* 2011 ,19( 2) :319-329.
- [7] Zheng H ,Xiao WH ,Bennett GJ. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel-and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy [J]. *Exp Neurol* 2011 ,232( 2) :154-161.

[收稿日期] 2013-04-01 [修回日期] 2013-07-30  
[本文编辑] 陈 静

( 上接第 365 页)

- [13] Sanjoh M ,Hiki S ,Lee Y ,*et al.* pDNA/poly( L-lysine) polyplexes functionalized with a pH-sensitive charge-conversional poly( aspartamide) derivative for controlled gene delivery to human

umbilical vein endothelial cells [J]. *Macromol Rapid Commun.* 2010 ,31( 13) :1181-1186.

[收稿日期] 2014-02-21 [修回日期] 2014-06-28  
[本文编辑] 顾文华