

文章编号:1000-582X(2008)01-0093-04

基因活化聚乳酸表面工程的初步研究

陈欣,胡燕,蔡开勇,王远亮

(重庆大学生物工程学院,重庆 400030)

摘要:运用层层自装(layer-by-layer self-assembly)技术,在聚乳酸表面形成半乳糖苷化的壳聚糖(galactosylated chitosan, GC)/DNA 多层膜结构,构建基因活化的生物材料。用接触角测试仪及紫外吸收光谱仪监控多层膜的组装过程及 DNA 的释放行为,倒置荧光显微镜观察 HepG2 细胞在 GC/DNA 多层膜修饰的聚乳酸表面的细胞形态及生长状态。结果表明:GC/DNA 的交替吸收在聚乳酸表面形成了多层膜结构,DNA 在 PBS 缓冲液(pH=7.4, 37℃)中的释放可持续 42 h 以上。黏附在多层膜修饰的聚乳酸表面的 HepG2 呈现纺锤样的细胞形态。另外,半乳糖是肝细胞表面无唾液酸糖蛋白的受体,从多层膜上释放出来的 GC/DNA 颗粒可被肝细胞特异识别并结合。

关键词:基因活化生物材料;层层自组装技术;半乳糖苷化壳聚糖;靶向基因治疗

中图分类号:R318

文献标志码:A

Preliminary Studies on the Gene-activated Poly (D, L-lactic Acid) (PDLLA) Surface

Chen Xin, Hu Yan, Cai Kai-yong, Wang Yuan-liang

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, P. R. China)

Abstract: In order to construct gene-activated biomaterial, the layer-by-layer self-assembly (LBL) technique was employed to build up GC/DNA multilayered films on the poly (D, L-lactic acid) (PDLLA) film. The assembly process and DNA release behaviors were monitored by contact angle measurement and a UV-visible spectrometer, respectively. The morphology of HepG2 cultured on the LBL-modified PDLLA surface was observed according to fluorescence microscopy. These results indicated that the alternative adsorption of GC and DNA led to a multilayered structure on the PDLLA film and DNA release in the PBS buffer (pH=7.4) at 37℃ lasting over 42 hours. HepG2 cultured on the LBL-modified PDLLA film displayed spindle-shaped feature morphology. lactose is the ligand of an asialoglycoprotein receptor (ASPR) on the hepatocyte membrane. The GC/DNA complex released from the multilayered film can be specially recognized and binds to the hepatocyte.

Key words: gene-activated biomaterial; layer-by-layer technique; galactosylated chitosan; targeted gene therapy

随着生物技术的蓬勃发展和重大突破,生物材料已成为各国科学家竞相进行研究和开发的热点。其中生物材料表面的修饰又是热点中的热点。因为生物材料植入生物体后,首先与机体接触发挥作用

的就是材料表面。理想的生物材料表面应是随着应用的不同而产生相应的变化,就像智能表面一样能随着局部生物环境的变化而变化^[1]。另外,基因释放面临转染效率低、靶向性差等诸多问题,使得基因

收稿日期:2007-10-27

基金项目:国家自然科学基金(50603032)和重庆市自然科学基金(2006BB4001)

作者简介:陈欣(1973-),男,硕士,主要从事生物材料方向研究。蔡开勇(联系人),男,重庆大学教授,(tel):023-65102507;(E-mail) Kaiyong_cai@cqu.edu.cn。

治疗无法深入展开。因此,基于生物材料的发展及基因工程的需求,细胞/基因活化生物材料应运而生,为基因的可控、靶向性释放提供了新的思路。基因活化的生物材料^[2],是组织工程发展的要求和必然趋势。它赋予生物材料从分子水平刺激细胞产生特异反应的能力,促进细胞的黏附、生长、分化,达到组织修复及再生的目的。将基因释放和生物材料研究的有机结合,构建具有原位基因释放性能的生物材料表面工程在组织工程和修复植入体研究领域具有广泛的应用前景。要实现真正意义上的基因活化的生物材料,这就对生物材料表面工程提出了更高的要求。

层层自组装(Layer-by-layer)技术是基于静电相吸而产生的自我组装技术。将底物连续而又交替的沉浸在带相反电荷的两种溶液中,利用静电相吸的作用,使两种物质有序而紧凑的连接在一起,重复数次得到多层膜结构^[3]。许多大分子包括多糖^[4]、酶^[5]、DNA^[6]等都可以作为层状结构组装的成分,并且在组装的过程中不会失去其活性^[7]。广泛用于药物释放^[8]、生物传感器^[9]、生物材料的表面修饰^[10]等方面。它是一种简单而有效的构建具有独特机械性能及可控厚度及成分的聚电解质多层膜的方法^[11],为构建基因活化及功能化生物材料表面提供了新的思路。

基于基因释放所存在的问题和缺点,利用层层自组装技术,将质粒 DNA 与半乳糖苷化的壳聚糖(galactosylated chitosan, GC)在生物材料 PDLLA 表面构建层状结构,实现对生物材料的基因活化,如图 1a 所示。半乳糖苷化的壳聚糖具有生物相容性、降解性,它与质粒 DNA 形成的多层膜在生理条件下发生降解,质粒 DNA 或 GC/DNA 颗粒在 PDLLA 表面释放,被其附近的细胞原位吸收;半乳糖是肝细胞表面唾液糖蛋白的受体,当 GC/DNA 颗粒从多层膜上释放出来后,特异的与细胞表面唾液糖蛋白结合,实现基因传递的靶向性。同时,由于多层膜持续降解的特点,GC/DNA 颗粒持续产生,维持了质粒 DNA 的浓度,使得 DNA 可在一定的时间内能够持续表达,达到基因治疗的目的(如图 1b 所示)。因此,基于 LBL 技术的特点,可以在各种类型的生物材料(如,组织工程支架、医疗器械装置等)表面组建层状结构,实现材料表面基因活化。将基因活化的材料植入到组织损伤部位,实现基因的原位释放、靶向治疗,促进组织的修复与再生。引入功能性的外源基因,使细胞原位合成生长因子或功能性蛋白质,从而实现调控细胞的黏附、增值、分化等能力。

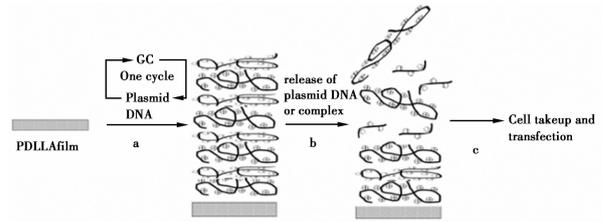


图 1 基因活化生物材料表面工程示意图

1 材料与方法

1.1 材料

碱性裂解法大量提取质粒 pSV- β -galactosidase control vector (promega) 壳聚糖、DNA (2 000bp)、乳糖醛酸、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)、MTT、四甲基乙二胺(TEMED)、聚乙烯亚胺(PEI)、N-hydroxysuccinimide (NHS) 购于 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 GC/DNA 多层膜的制备

聚乳酸溶于氯仿中,浓度为 0.1 g/mL。在直径为 15 mm、厚度约为 1 mm 的圆形玻璃片上铺上聚乳酸膜,自然干燥。配置 GC (GC 的制备参照 I-K. Park 等的报道^[12])、DNA、PEI 溶液。将 GC、PEI 分别溶于含有 150 mmol/L NaCl 溶液中,浓度均为 5 mg/mL。DNA 溶于 PBS (PH = 7.4) 中,浓度为 1 mg/mL。将含有聚乳酸膜的圆形玻璃片放置于 PEI 溶液中 20 min,在聚乳酸膜表面沉积 PEI 分子作为引发层以便于 DNA 及 GC 的后续沉淀。用含有 150 mmol/L NaCl 溶液清洗玻璃片。将玻璃片放于 DNA 溶液中,持续 10 min,用 NaCl 溶液清洗出去松散结合的 DNA 分子。玻璃片暴露于 GC 溶液中 10 min,沉积 GC 分子,再用 NaCl 溶液清洗。这样交替的将玻璃片放置于 DNA/GC 溶液中数次,得到想要的 GC/DNA 多层膜结构。

1.2.2 细胞毒性检测

用 1640 培养基配置不同浓度 (1, 10, 20, 50, 100, 200 μ g/mL) 的 GC 溶液,0.22 μ m 的微孔过滤膜进行过滤。HepG2 细胞接种到 96 孔板中,细胞密度为 10^4 cells/well, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的条件下培养。24 h 后,每孔加入 20 μ L MTT (5mg/mL) 溶液,继续培养 4 h。将含有 MTT 的培养液弃除,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min。在酶标仪中检测 490 nm 的吸收值。

1.2.3 接触角的检测

经过每个循环的沉淀,润洗,干燥后,PDLLA 膜的表面置于接触角测试仪(翰光高科技有限责任公司,台湾)上进行接触角的测定。水滴在材料表面的形状由相机摄像,并通过该仪器配置的软件进行处理。初始测试液滴的体积为 5 μ L,静置 15 s 后进行测定。每层 3 个样本,每个样本上选取 3 个不同的点进行检测,取其平均值。

1.2.4 DNA 的释放

PDLLA/PEI/ (DNA/GC)5/DNA 膜作为降解样本。GC/DNA 多层膜暴露于 PBS 缓冲液 (pH = 7.4, 37 °C) 中。在适当的时间间隔内取出 PBS 缓冲液,在紫外可见分光光度计 (BECKMAN DU640) 中检测 260 nm 下的吸光值。制作释放曲线。

1.2.5 细胞的形态学观察

按照上述步骤制备 PDLLA/PEI/ (DNA/GC) 5/DNA 膜,所有的溶液均用 0.22 μm 的微孔过滤膜进行过滤。HepG2 细胞悬液加入到含有 PDLLA/PEI/ (DNA/GC) 5/DNA 多层膜的 24 孔板中,细胞密度为 3×10^4 cell/well,加入 1 mL 的 1640 培养液 (含有 10% FBS),在 37 °C、5% CO₂ 的条件下进行培养。培养 24 h、48 h 后,弃除培养液,用 4% 的甲醛固定 15 min,再用 Hoechst 33258 DNA 染液 (10 μg/mL) 对细胞进行细胞核的染色。细胞置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

2 结果与讨论

2.1 细胞活性检测

琥珀酸脱氢酶是三羧酸循环中的重要酶,存在于线粒体内膜上,是反应线粒体功能的敏感指标。线粒体又是细胞的供能场所,其功能的丧失意味着细胞生命的结束。因此,可根据琥珀酸脱氢酶的活性推知细胞的活性。MTT 法即用 MTT 来显示细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶活性,在酶存在的部位,酶作用于底物进行脱氢,脱下的氢与 MTT 作用,将氧化型的 MTT 还原成有色的 formosan。因此,formosan 的量反映了细胞的活性水平。图 2 显示了 HepG2 细胞在不同 PEI、GC 浓度的培养液中培养 24 h 后 formosan 的吸收值。当 PEI 的浓度为 10 μg/mL 时,吸光值快速下降,表明细胞几乎全部死亡。与 PEI 相比,GC 具有良好的细胞相容性。在 GC 浓度高达 200 μg/mL 时,细胞的活性仍然很好。并且随着 GC 浓度的增加,细胞的活性增加。这些结果表明 GC 是一种具有良好生物相容性、安全的基因转运载体,不会影响细胞的生存能力。

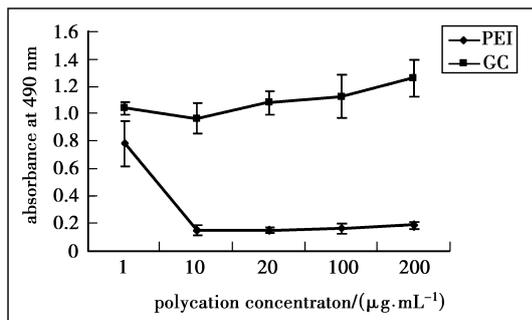


图2 MTT 检测。GC 较 PEI 具有良好的细胞相容性。

2.2 接触角测定

用接触角测试仪监控 GC/DNA 在 PDLLA 表面形成多层膜结构的层层自组装。接触角的大小由物

质自身的性质及其在 PDLLA 上成膜的状态决定。如图 3 所示,在第三层以前,接触角呈现下降的趋势。从第四层开始,接触角在 35° 和 25° 之间产生波动性的跳跃,接触角的大小取决于最外层沉淀的物质。这种接触角交替性的变化也在其它的文献中有所报道^[13]。表明全覆盖的、单层的 GC 或 DNA 膜已经在 PDLLA 表面形成。

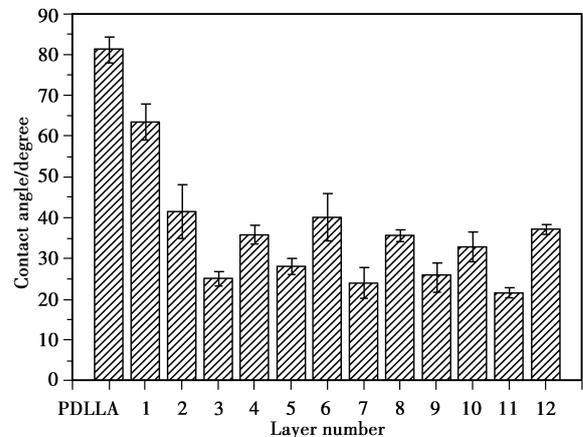


图3 接触角的检测,奇数代表 GC 层 (除第 1 层 PEI 外),偶数代表 DNA 层。从第四层开始,接触角的轮流变化,揭示了层状结构的存在。

2.3 DNA 的释放

选择 PDLLA/PEI/ (DNA/GC) 5/DNA 作为降解样本,考察 DNA 的释放行为。图 4 表示在不同的时间内 DNA 的累积释放状况。如图所示,DNA 从多层膜上的释放可分为三个阶段。在最初的 8 小时内,约有 40% 的 DNA 被释放,这是由多层膜最外层的 DNA 层以及周边 DNA 的释放所引起的。在壳聚糖/DNA 多层膜的降解释放中也有类似的现象^[13]。从 8 h 到 42 h,DNA 的释放持续上升。42 h 后,DNA 的释放保持恒定,表明 PDLLA 上的 DNA/GC 多层膜完全降解,DNA 完全释放。因此,我们可以通过控制多层膜的层数来控制 DNA 的释放速度。这在基因治疗中有着重要的应用前景。

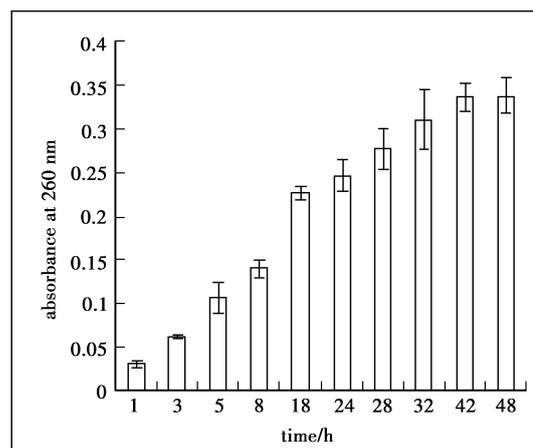


图4 DNA 的累积释放,到 42 h 后,药物释放趋于完毕。

2.4 细胞形态

生物材料表面的性质对细胞的功能和结构有重要的影响^[1]。有报道显示底物的机械性能可以调节细胞增殖、分化、迁移等许多生物学功能^[14],甚至细胞黏附底物的硬度可以调节非病毒性的基因转运^[15]。因此,GC/DNA 多层膜修饰的 PDLA 表面性质及大分子对细胞的生长将产生重要影响。图 5 显示了生长在 GC/DNA 多层膜修饰的 PDLA 表面及 PDLA 表面的 HepG2 细胞的形态及生长状况。黏附在对照组 PDLA 膜上的细胞呈现卵圆形样的细胞特征(图 5a,b),而生长在多层膜修饰的 PDLA 上的部分细胞表现出纺锤样的细胞形态(图 5c,d),细胞的肌动微丝发生了重排,形态改变。另外,随着时间的延长,生长在多层膜修饰的 PDLA 膜上的细胞数量增加(图 5d),并且在相同的培养时间(48 h)内多层膜上的细胞密度比对照组大。以上结果表明,GC/DNA 多层膜能够促进细胞与底物、细胞与细胞之间的相互作用,有利于细胞的生长。

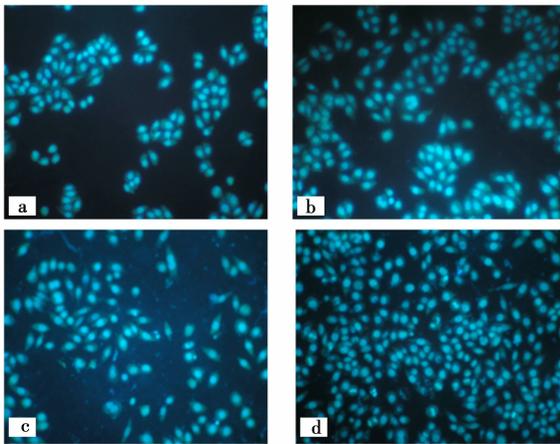


图 5 生长在不同膜上的 HepG2 的细胞形态
(a) PDLA 膜, 24 h; (b) PDLA 膜, 48 h; (c) GC/DNA 多层膜修饰的 PDLA, 24 h; (d) GC/DNA 多层膜修饰的 PDLA, 48 h。

3 结论

通过层层自组装技术在聚乳酸表面构建 GC/DNA 层状结构,这种有序的组装过程有利于 DNA 或质粒 DNA 在生理环境下沉积在生物材料表面,活化生物材料。接触角测试监控 GC/DNA 多层膜的组装过程,结果表明从第四层开始全覆盖的单层的膜开始形成。DNA 释放的特征显示 DNA 从多层膜中的释放可以持续 42 h 以上,因此,可以通过调控多层膜的层数来控制 DNA 释放的时间,这对于提高细胞的转染率或延长转染的时间将发挥重要作用。GC/DNA 多层膜修饰的 PDLA 系统有利于细胞的生长,而且经过半乳糖接枝的壳聚糖能够通过受体介导的细胞吸收提高转染率,这对于肝类疾病的靶向原位治疗有着巨大的潜力。

参考文献:

- [1] SWEDEN G. Surface modification of biomaterials from an academic research perspective [J]. *European Cells and Materials*, 2005, 10(Sup. 1): 2-6.
- [2] HENCH L L, JULIA M. The third-generation biomedical material[J]. *Science*, 2002, 295:1014-1017.
- [3] DECHER G. Fuzzy nanoassemblies; toward layered polymeric multicomposites[J]. *Science*, 1997,277:1232-1237.
- [4] CAI K Y, RECHTENBACH A, HAO J Y, et al. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects [J]. *Biomaterials*,2005(26): 5960-5971.
- [5] CONSTANTINE C A, MELLO S V, DUPONT A, et al. Layer-by-layer self-assembled chitosan/poly (thiophene-3-acetic acid)and organ phosphorus hydrolase multilayers[J]. *J Am Chem Soc* 1, 2003(125): 1805 1809.
- [6] LU Z S, LI C M, ZHOU Q, et al. Covalently linked DNA/protein multilayered film for controlled DNA release [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 314 (1) 80-88.
- [7] YOO P J, NAM K T, QI J F, et al. Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces [J]. *Nat. Mater*,2006(5): 234-240.
- [8] WOOD K C, CHUANG H F, BATTEN R D, et al. Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multi-agent drug delivery from layer-by-layer thin films [J]. *PNAS*, 2006,103:10207-10212.
- [9] WANG G, ZHOU J H, Li J. H. et al. Layer-by-layer self-assembly aluminum Keggin ions/Prussian blue nanoparticles ultrathin films towards multifunctional sensing applications [J]. *Biosens Bioelectron*,2007,22:2921-2925.
- [10] YU D G, JOU C H, LIN W C et al. Surface modification of poly (tetramethylene adipate-co-terephthalate) membrane via layer-by-layer assembly of chitosan and dextran sulfate polyelectrolyte multiplayer [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,2007,54(2):222-229.
- [11] JIANG C Y, TSUKRUK V V. Freestanding nanostructures via layer-by-layer assembly [J]. *Adv. Mater.* 2006(18): 829-840.
- [12] PARK I K, YANG J, JEONG H J. Galactosylated chitosan as a synthetic extracellular matrix for hepatocytes attachment [J]. *Biomaterials*, 2003(24): 2331-2337.
- [13] CAI K Y, HU Y, WANG Y L. Build up of multilayered thin films with chitosan/DNA pairs on poly (D, L-lactic acid) films: physical chemistry and sustained release behavior[J]. *Journal of Biomedical Materials Researches*. (in press).
- [14] KONG H J, POLTE T R, ALSBERG E, et al. FRET measurements of cell-traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness[J]. *PNAS*, 2005(102):4300-4305.
- [15] KONG H J, LIU J, RIDDLE K, et al. Non-viral gene delivery regulated by stiffness of cell adhesion substrates [J]. *Nat. Med.* 2005(4): 460-464.

(编辑 吕建斌)