

细胞外基质仿生型基因活化支架的构建与表征

沈海俊*, 吴志娟, 王东霞, 霍东方, 柏钰, 杨智涵, 姚春芳

(江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 本文拟构建一种模拟细胞外基质结构与功能的基因活化支架 (ECM-m-GAM), 并对其结构、机械强度和释放性能进行表征。首先制备细胞穿膜肽 TAT 修饰的脂质体基因载体 TAT-LPD, 然后将 TAT-LPD 与 RGD 修饰的透明质酸混合, 加入交联剂 MMPs 敏感肽 (HS-MMP-SH), 使透明质酸凝胶化, 在凝胶化过程中实现对 TAT-LPD 的负载, 从而将细胞黏附因子 RGD、MMPs 敏感底物和高效的基因转染载体 TAT-LPD 有机地整合到一个结构中, 完成 ECM-m-GAM 的构建。利用 PicoGreen 试剂盒考察 ECM-m-GAM 在不同释放介质中 DNA 的释放行为。研究表明: TAT-LPD 在透射电镜下呈球形, 平均粒径为 (263.0 ± 4.30) nm, 可被成功地包埋在 ECM-m-GAM 中; ECM-m-GAM 具有典型的凝胶结构, 机械强度随着透明质酸用量的增加而增强, 透明质酸用量为 4% 时其弹性模量约为 1 600 Pa, 适合支架植入和组织修复; DNA 从 ECM-m-GAM 中的释放呈现明显的 MMPs 敏感性, 并且释放的 DNA 仍以纳米粒的形式存在, 能够转染大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 并表达绿色荧光, 为后续的细胞转染和组织修复研究奠定了基础。

关键词: 凝胶; 透明质酸; 细胞外基质; 基因转染; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 11-1748-08

Preparation and characterization of a gene-activated matrix mimicking extracellular matrix

SHEN Hai-jun*, WU Zhi-juan, WANG Dong-xia, HUO Dong-fang, BAI Yu, YANG Zhi-han, YAO Chun-fang

(School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: This study aims to establish a novel gene-activated matrix that mimics the structure and function of extracellular matrix (ECM-m-GAM). The structure, mechanical property and release profile were also characterized. Firstly, the liposome/DNA lipoplex (LPD) was modified with cell penetrating peptide TAT. The obtained TAT-LPD was then mixed with RGD grafting hyaluronic acid solution. After addition of the matrix metalloproteinase (MMPs) sensitive crosslinker (HS-MMP-SH), hyaluronic acid was crosslinked and TAT-LPD was encapsulated in the subsequently formed hydrogel. As a result, the cell adhesion factor RGD, MMPs sensitive substrate and the efficient gene transfer vector TAT-LPD were all integrated in the hyaluronic acid hydrogel, which was named as ECM-m-GAM. The release profile of DNA from ECM-m-GAM in different release medium was evaluated with PicoGreen kits. The results suggested that the mean diameter of the spherical TAT-LPD was (263.0 ± 4.30) nm. TAT-LPD was successfully encapsulated in ECM-m-GAM, which had the typical porous network structure of hydrogels. The mechanical strength of GAM was enhanced with the

收稿日期: 2017-07-20; 修回日期: 2017-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81402870); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20140579); 中国博士后科学基金面上资助项目 (2015M571696); 江苏省博士后科研资助项目 (1401145C); 江苏大学高级专业人才培养启动基金项目 (14JDG046).

*通讯作者 Tel: 86-511-85038483, E-mail: shj_2003@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0715

increasing of hyaluronic acid content. When the content was 4%, the elastic modulus of GAM reached 1 600 Pa. The highly elastic GAM may be suitable for implantation and tissue regeneration. The DNA release showed significant MMPs sensitive property. Especially, the released DNA still existed in form of nanoparticles. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were successfully transfected with GAM and the green fluorescent protein was expressed. The results have laid a solid foundation for future study of the cell transfection and tissue regeneration.

Key words: hydrogel; hyaluronic acid; extracellular matrix; gene transfer; matrix metalloproteinase

随着医学技术的迅猛发展, 利用组织工程技术进行缺损组织和器官的修复与再生已成为一种极具潜力的治疗手段, 生长因子是组织工程中应用的重要的细胞营养物质, 具有诱导和刺激细胞增殖、维持细胞存活等多方面的生物功能。然而, 生长因子多为蛋白类药物, 其半衰期比较短, 在体内容易失去生物活性, 只能在短期内产生效果, 此外, 生长因子的价格昂贵, 治疗成本高。

近年来, 基因治疗技术的发展及其在组织工程领域的应用为这些问题的解决提供了新的策略。将编码有生长因子并具有转染能力的 DNA 融合于生物可降解材料中构建含 DNA 的生物支架, 即基因活化支架 (gene-activated matrix, GAM)^[1]。将 GAM 直接植入到组织缺损区, 可在植入部位释放 DNA 并转染附近的细胞。一旦转染成功, 细胞将成为生物反应器, 持续表达并分泌基因所编码的生长因子, 达到对细胞分化和组织再生调控的目的^[2,3]。GAM 在结构上包含 DNA 复合物和支架材料两部分, 这两部分的功能决定了 GAM 的功能。目前, 关于 GAM 的研究热点主要集中于仿生支架的设计及如何实现高效的 DNA 转染这两个方面。

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是体内细胞生长的微环境, 是由纤维蛋白和多糖组成的复杂的网架结构, 它通过黏附因子与细胞表面受体结合, 促使细胞在基质上附着, 细胞则通过自身释放的酶降解基质, 为自身的迁移和增殖创造空间, ECM 对维持细胞的生理活动具有重要的作用。支架作为承载细胞附着、生长和增殖的微环境, 应最大程度地模拟 ECM 的功能。凝胶是组织工程中常用的支架形式, 其交联网络的多孔结构利于细胞的迁移及活性物质的传递, 可以很好地模拟 ECM 的网架结构。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 属于细胞内的蛋白水解酶家族。在组织修复过程中, 细胞能够分泌 MMPs, 它几乎能降解 ECM 中的各种蛋白成分, 从而为细胞的迁移与增殖提供空间。RGD 肽是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp) 的

短肽, 存在于多种生物细胞外基质中, 能特异性识别细胞表面的整合素并与其结合, 是细胞在 ECM 中附着和迁移的识别部位。受此启发, Lutolf 等^[4]用 MMPs 敏感肽交联聚乙二醇 (PEG) 制备 PEG 凝胶, 再将 RGD 连接到凝胶上构建细胞支架。该凝胶支架兼具细胞黏附因子 RGD 及 MMPs 敏感性。依靠 RGD 介导及 MMPs 的酶解作用, 人纤维母细胞能够吸附并侵入凝胶内部, 体内研究表明负载骨形成蛋白 BMP-2 的凝胶支架具有良好的骨修复作用。Kim 等^[5]将 RGD 修饰的透明质酸用 MMPs 敏感肽交联制备凝胶支架, 更好地仿生了 ECM 的功能, 因为透明质酸是 ECM 中的主要成分, 它存在于迁移细胞的周围, 能够抑制细胞间的黏附, 促进细胞迁移。Lei 等^[6]考察了小鼠间充质干细胞在上述凝胶支架中的生长情况, 结果表明 MMPs 敏感性及 RGD 的存在有利于细胞在支架中的迁移、生长和增殖。

细胞穿膜肽 TAT (transcriptional activator protein) 具有高效的入胞能力, 能够迅速破坏内吞体膜, 逃逸溶酶体。TAT 已经成功携带多种生物活性物质及载体, 包括蛋白质、DNA、多肽、纳米粒和脂质体等进行细胞内传输, 是一种新型而高效的药物递送工具^[7,8]。利用 TAT 修饰非病毒载体可以实现高效的基因转染。Torchilin 等^[9]用 TAT 修饰负载 DNA 的脂质体, 构建 TAT-liposome-DNA 复合物, 其对鼠 NIH/3T3 成纤维母细胞和 H9C2 心肌细胞的转染效率显著高于未经 TAT 修饰的 DNA 脂质体。

本文率先提出构建一种新型的“细胞外基质仿生型基因活化支架” (ECM-mimicking-GAM, ECM-m-GAM): 用 TAT 修饰脂质体作为高效的基因转染载体, 将其与 RGD 修饰的透明质酸混合, 加入交联剂 MMPs 敏感肽 (HS-MMP-SH) 使透明质酸凝胶化, 得到脂质体/凝胶复合系统。从而将具有高效转染能力的 TAT 脂质体、细胞黏附因子 RGD 和对细胞分泌酶 MMPs 敏感的交联链整合到同一个结构 (透明质酸凝胶) 中, 完成 ECM-m-GAM 的构建。本文将优化并报道该支架的制备方法, 表征其表面形态和机械

性能, 评价其对 DNA 复合物的负载及 MMPs 敏感性释放行为, 为细胞转染及组织修复研究奠定基础。

材料与方法

主要仪器 纳米粒径电位分析仪 (Zetasizer Nano ZS90, 英国 Malvern Instrument 公司); 透射电镜 (Tecnai 12, 荷兰 Philips 公司); 核磁共振光谱仪 (AVANCE II, 瑞士 Bruker 公司); 扫描电子显微镜 (S-4800, 日本 Hitachi 公司); 旋转流变仪 (RS600, 美国 Thervno 公司); 荧光显微镜 (DMLB2, 德国 LEICA 公司); 多功能微孔板检测仪 (Synergy HT, 美国 BioTek 公司)。

材料与试剂 胆固醇 (上海艾韦特医药科技有限公司); (2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺 (DOTAP, 德国 Lipoid 公司); 鱼精蛋白 (PRO)、胶原酶 (Sigma 公司); 绿色荧光蛋白质粒 (pEGFP-N1, 南京钟鼎生物技术有限公司); 透明质酸 (HA, 华熙福瑞达生物医药有限公司); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC)、己二酸二酰肼 (ADH)、三乙醇胺 (TEA) (上海阿拉丁试剂公司); *N*-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺 (NHS-AC, 上海 TCI 试剂公司); TAT 肽 (CYGRKKR RQRRR)、RGD 肽 (GCGYGRGDS PG)、MMPs 敏感性多肽 HS-MMP-SH (GCRDGPQGIWGQDRCG) (南京金斯瑞生物科技有限公司); 肝素、Triton (上海生工生物工程股份有限公司); 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[maleimide(polyethylene glycol)-2000], (DSPE-PEG-MAL, Avanti Polar Lipids, Inc.); DSPE-PEG-TAT (本实验室合成); TE 缓冲液、PicoGreen dsDNA 定量试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司); 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs, 本实验室分离提取); 胎牛血清、LG-DMEM 培养基、青霉素-链霉素双抗和胰蛋白酶 (Gibco 公司)。

TAT-LPD 的制备与表征 TAT-LPD 的制备分成 4 步: 首先, 制备空白阳离子脂质体。按照 DOTAP : 胆固醇=1 : 1 的比例将两者溶解在氯仿中, 薄膜分散法制备脂质体, 适量 HEPES ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 水合, 使最终的脂质浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 超声 3~5 min, 采用 Extruder 使脂质体过 $0.4 \mu\text{m}$ 的膜 11 次, 再过 $0.1 \mu\text{m}$ 的膜 11 次, 制备粒径小而分布均匀的阳离子脂质体, 4°C 保存, 备用。第二步, 制备 PRO/DNA 复合物。精确称取一定量鱼精蛋白 (PRO), 溶于 HEPES ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 中, 配成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PRO 溶液。将 PRO 和 DNA (质粒 pEGFP-N1) 按照不同比例 (w/w) 涡旋混合, 室温静置 20 min, 得

PRO/DNA 纳米复合物, PRO 和 DNA 的孵育比例用琼脂糖凝胶电泳进行优化。第三步, 将空白阳离子脂质体与 PRO/DNA 复合物涡旋混合 (最终采用的比例是 DOTAP : PRO : DNA=12 μmol : 0.6 μg : 1 μg), 室温静置 30 min, 即得脂质-聚阳离子-DNA 复合物 (liposome-polycation-DNA complex, LPD)。最后, 将 LPD 与不同用量的 DSPE-PEG-TAT 涡旋混合 (DSPE-PEG-TAT 的用量为 LPD 脂质总量的 5%、10% 和 20%), $50\sim 60^\circ\text{C}$ 孵育 10 min, 冷至室温, 制备不同含量 DSPE-PEG-TAT 修饰的 LPD (即 TAT-LPD)。

LPD 及不同比例 DSPE-PEG-TAT 修饰的 LPD 的粒径与电位由纳米粒径电位分析仪测量; 10% DSPE-PEG-TAT 修饰的 LPD 经醋酸双氧铀负染 15 s, 透射电镜观察。

透明质酸-丙烯酸酯 (HA-AC) 的合成 称取 0.5 g 透明质酸 (HA, M_w 42 kDa) 溶于 50 mL 去离子水, 加入 EDC 1 g 和 ADH 9 g, 溶解完全后将体系的 pH 值调为 4.8, 室温反应 12 h, 去离子水透析 1 周 (MWCO 8000~14000), 冻干, 得 HA-ADH。将 HA-ADH 溶于 50 mL HEPES 缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2) 中, 加入 0.4 g NHS-AC, 反应 12 h, 去离子水透析 1 周 (MWCO 8000~14000), 冻干, 即得 HA-AC, 核磁共振进行表征。

ECM-m-GAM 的制备 精密称取一定量的 RGD 溶于 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEA 缓冲液 (pH 8.0) 中, 配成质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 RGD 溶液, -20°C 保存。称取 HA-AC 20 mg, 溶于 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEA 缓冲液 (pH 8.0) 300 μL 中, 加入上述 RGD 溶液 5 μL , 混匀, 反应 30 min。按上述 TAT-LPD 的制备方法制备含 15 μg DNA 的 TAT-LPD。称取 HS-MMP-SH 7 mg, 溶于 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TEA 缓冲液 (pH 8.0) 30 μL 中。将 TAT-LPD 和 HS-MMP-SH 溶液均加入 HA-RGD 的反应体系中, 补充适量 TEA 缓冲液使体系的最终体积为 500 μL , 混匀, 37°C 反应 30 min 成凝胶, 即得 ECM-m-GAM, 其中 HA-AC 用量为 4%, RGD 终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DNA 浓度为 3%。制备示意图见图 1。

ECM-m-GAM 的表征 取适量真空冷冻干燥后 GAM, 置于载物台上, 喷金, 扫描电子显微镜观察形貌; 按照 ECM-m-GAM 的制备方法, 同法制备 HA-AC 用量为 3% 的 GAM, 旋转流变仪测定两者的弹性模量 (G') 与黏性模量 (G''), 测量参数为应变力 0.03、频率范围 $0.01\sim 1.5 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 。为了观察 TAT-LPD 在 GAM 中的分布, 用特异性的核酸染料 Gel-Red 对 GAM 中的质粒 DNA 进行染色, 然后用荧光

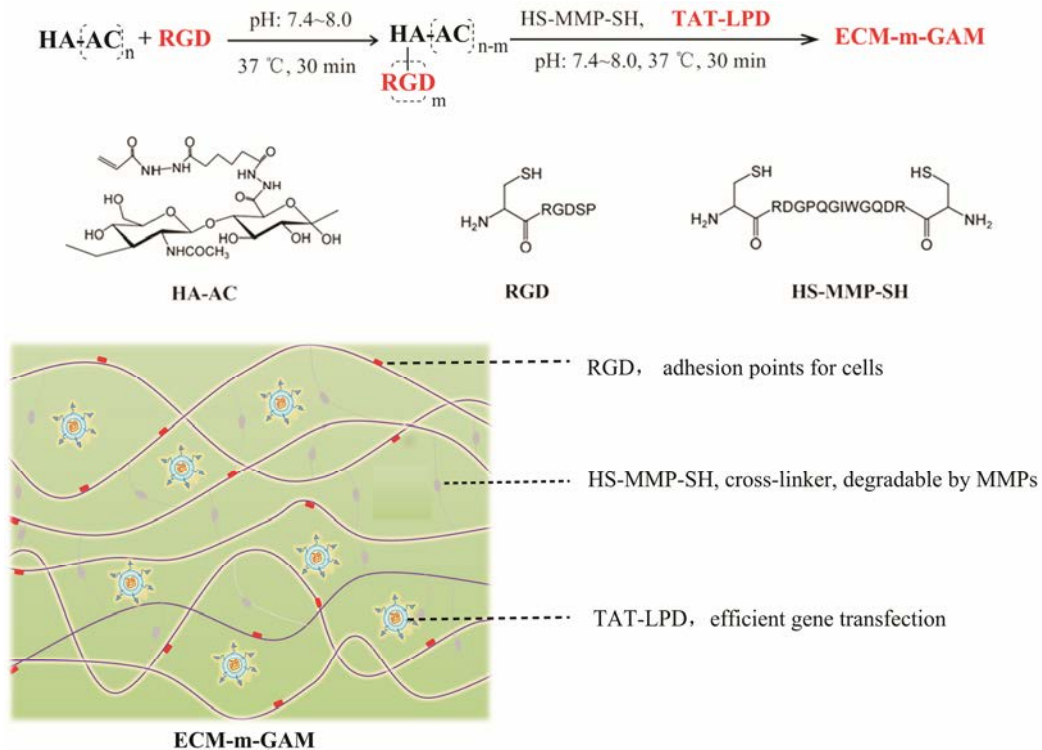


Figure 1 Schematic illustration of ECM-m-GAM formation. Hyaluronic acid-acrylate (HA-AC) was first modified with RGD peptides using Michael type addition. The residual acrylate groups were then crosslinked using MMP degradable peptides (HS-MMP-SH) in the presence of TAT-LPD nanoparticles. As a result, the cell adhesion factor RGD, MMPs sensitive substrate and efficient gene transfer vector TAT-LPD were all integrated in the hyaluronic acid hydrogel, which was named as ECM-m-GAM. RGD: Arg-Gly-Asp; MMP: Matrix metalloproteinase; TAT: Transcriptional activator protein; TAT-LPD: TAT functioned liposome-polycation-DNA complex

显微镜观察。

ECM-m-GAM 的 MMPs 敏感性释放 为了评价 ECM-m-GAM 的 MMPs 敏感性, 配制两种释放介质: PBS 缓冲液 (pH 7.4) 和 PBS 缓冲液 (pH 7.4, 含 $0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胶原酶)。将 GAM 分别浸泡在 1 mL 上述两种不同的释放介质中, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡箱中, 于不同时间点取出释放液 $800 \text{ } \mu\text{L}$, 并补充新鲜释放介质。

将各时间点取出的释放液 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 分别置于 2 mL EP 管中, 每管加入 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 预先配制的含有肝素 ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 1% Triton 的 TE 缓冲液, 涡旋混匀, 放置 15 min, 使 DNA 与磷脂及 PRO 充分分离, 然后用 PicoGreen dsDNA 定量试剂盒检测各个时间点 DNA 的释放情况, 绘制释放曲线。

为了观察释放液中 DNA 是否仍以纳米复合物的形式存在, 用 Gel-Red 负染 GAM 中的 DNA, 然后将负染后的 GAM 浸泡在 1 mL PBS 缓冲液 (pH 7.4, 含 $0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胶原酶) 中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡 12 h, 取适量释放液滴于载玻片上, 用荧光显微镜观察。

ECM-m-GAM 体外转染能力的评价 取生长旺盛的第 3 代 BMSCs, 弃去培养基, 胰蛋白酶消化, 轻

轻吹打细胞至完全脱落并分散后, 离心弃去上清液, 加适量培养液吹散所得细胞。按照 1×10^5 个细胞/孔接种于 24 孔板, 加不含抗生素的完全培养基 (10% 胎牛血清 + LG-DMEM 培养液), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳环境下培养。次日, 待贴壁后, 换不含抗生素的完全培养基, 于每孔加入已制备的 ECM-m-GAM (含 pEGFP-N1 质粒), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳环境下继续培养 3 天, 弃去培养基并去除支架, 于荧光显微镜下观察^[10]。

结果

1 TAT-LPD 的制备与表征

鱼精蛋白 (PRO) 是一种正电性的天然高分子材料, 具有很好的生物相容性, 可作为良好的基因载体, 脂质-鱼精蛋白-DNA 复合物 (LPD) 已有多篇文献报道^[11, 12]。本课题组将 PRO 与质粒 DNA 按一定比例混合, 形成一个呈负电性的 PRO/DNA 复合物 (polyplex), 然后再依靠静电作用使其与 DOTAP 阳离子脂质体结合, 从而完成对 DNA 的包裹与压缩, 最后将 DSPE-PEG-TAT 插入到脂质层中, 完成 TAT-LPD 的构建。

首先, 利用琼脂糖凝胶电泳研究不同比例的 PRO 与质粒 DNA 复合后的电泳情况, 结果见图 2, 由图可见, 随着 PRO 与 DNA 比例的增加, DNA 的条带越来越不明显, 当达到 1:1 时 DNA 完全滞留在加样槽中, 说明游离 DNA 被完全压缩在 PRO 中, 这时 polyplex 呈现正电性。然而, 为了下一步 polyplex 能够与阳离子脂质体顺利结合, 需要 polyplex 既结合较多的 DNA, 又带一定的负电。根据电泳结果, 优选出合适的制备比例为 PRO : DNA = 0.6 : 1, 此时能看到较浅的条带, 说明 DNA 被部分包裹, polyplex 仍带负电, zeta 电位测定结果为 (-19.2 ± 2.8) , 见图 3, 其显著的负电性为阳离子脂质的结合提供了基础。

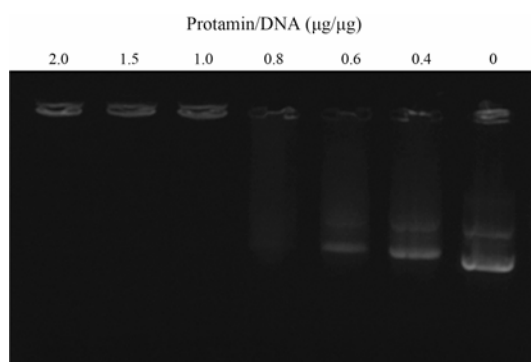


Figure 2 Gel electrophoresis of polyplex prepared with different protamin/DNA ratios

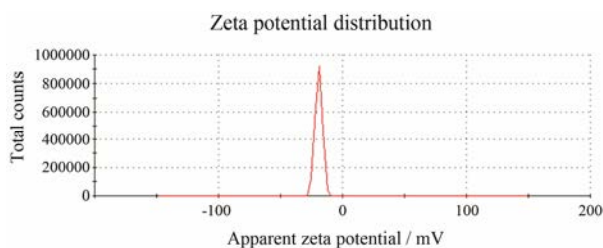


Figure 3 Zeta-potential of polyplex prepared with PRO : DNA = 0.6 : 1

然后, 将 DOTAP 阳离子脂质体与 polyplex 按一定比例混合孵育 (DOTAP : PRO : DNA = 12 μmol : 0.6 μg : 1 μg), 静电作用能够使两者顺利地结合在一起形成复合物 LPD。由表 1 可知, LPD 的电位为 (31.2 ± 7.93) mV、粒径为 (203.8 ± 1.53) nm, 相比于 polyplex, 电位发生反转, 粒径明显减小, 表明正电性的 DOTAP 脂质顺利吸附在 polyplex 表面, 并最终完成了对 DNA 的包裹与压缩, 形成稳定的 DNA 脂质纳米复合物 LPD。

最后, 采用后期孵育 (post-insertation) 的方法将 DSPE-PEG-TAT 插入到 LPD 的脂质层, 完成 TAT-LPD 的制备。这个方法的具体过程是 DSPE-PEG-TAT

Table 1 Zeta-potential and size of polyplex and LPD nanoparticles with different percentage of DSPE-PEG-TAT (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol-TAT)

Nanoparticle	Zeta-potential/mV	Size/nm
Polyplex	-19.2 ± 2.86	323.0 ± 11.8
LPD (0% DSPE-PEG-TAT)	31.2 ± 7.93	203.8 ± 1.53
TAT-LPD (5% DSPE-PEG-TAT)	24.8 ± 3.96	240.9 ± 69.5
TAT-LPD (10% DSPE-PEG-TAT)	8.46 ± 3.90	263.0 ± 4.30
TAT-LPD (20% DSPE-PEG-TAT)	-1.65 ± 3.25	261.7 ± 8.01

分散于水中形成胶束, 将 DSPE-PEG-TAT 胶束和已经制备好的 LPD 粒子在一定温度 (50°C) 下孵育一定时间 (10~40 min), 组成胶束的 DSPE-PEG-TAT 分子将自动转移到 LPD 脂质双层中, 因此也被称作胶束转移法^[13]。胶束转移法已被 Kanda 等^[14-16]用于将脂质分子插入到脂质体中, 过程简单易于操作。

DSPE-PEG-TAT 不同用量制备的 TAT-LPD 的粒径及电位情况, 结果见表 1。从表中可以发现, 随着 DSPE-PEG-TAT 用量的增加, 其电性越来越低, 这是由于 PEG₂₀₀₀ 在纳米粒表面的屏蔽作用^[17]; 此外, 随着用量的增加, LPD 的粒径也稍微增大, 这是由于 LPD 表面的 PEG 在水中伸展, 具有一定的空间位阻而引起的。上述电位与粒径的变化均表明 DSPE-PEG-TAT 成功地插入到 LPD 中, 形成了 PEG 化的 LPD, 即 TAT 修饰的 LPD (TAT-LPD)。DSPE-PEG-TAT 用量为 10% 时, 制备的 TAT-LPD 用透射电镜进行表征, 结果见图 4, 可见制备的 TAT-LPD 具有较好的分散性, 粒径在 200 nm 左右, 与粒径测定结果一致。

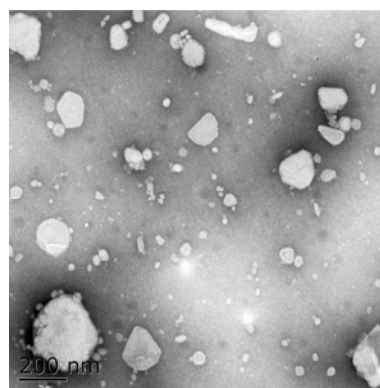


Figure 4 TEM image of TAT-LPD nanoparticles (10% DSPE-PEG-TAT)

2 透明质酸-丙烯酸酯的合成

以透明质酸为骨架, 通过两步法合成了 HA-AC, 并用核磁共振进行表征 (图 5)。由图可知, 相比于 HA, HA-AC 在 δ 6.2 有明显的多重峰, 这应归属于丙烯酸酯基团中的顺式 (cis) 和反式 (trans) 氢,

^1H NMR 结果表明丙烯酸酯已成功连接在透明质酸骨架上。通过 δ 6.2 峰积分与 δ 1.88 峰积分的比值可以得出, 丙烯酸酯接枝率约为 16%^[18]。

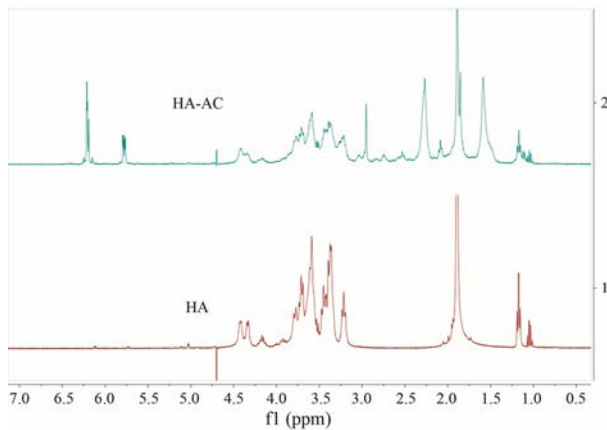


Figure 5 ^1H NMR spectrum of HA-AC and HA in D_2O

3 ECM-m-GAM 的制备与表征

利用丙烯酸酯 (-AC) 能够与巯基 (-SH) 发生迈克尔加成反应, 先将 RGD 上的巯基与 HA 骨架上的 -AC 基团反应, 使 RGD 连接在 HA 骨架上, 得到 HA-RGD, 再向其中加入 TAT-LPD 和 HS-MMP-SH, 混匀, 并在 37°C 孵育 30 min, 利用 HS-MMP-SH 两端的巯基与 HA 骨架上剩余的 -AC 基团反应, 使 HA 产生交联和凝胶化, 在凝胶化的过程中实现对 TAT-LPD 的负载, 从而完成脂质体/凝胶复合型基因活化支架的构建。如图 6A 所示, ECM-m-GAM 呈透明的半固体状 (inset), SEM 电镜下可见明显的多孔网状交联结构, 表现出典型的凝胶结构特征。

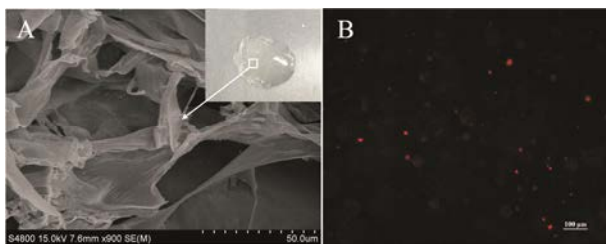


Figure 6 SEM image of ECM-m-GAM. The inset shows macroscopic GAM (A). TAT-LPD were stained with Gel-Red post-hydrogel formation and imaged with a fluorescence microscope (B)

凝胶支架对 DNA 的负载通过荧光显微镜进行表征, 将 ECM-m-GAM 用特异性的核酸染料 Gel-Red 负染后进行观察, 结果见图 6B。由图可见, 凝胶中存在大量呈颗粒状分布的被染成红色的 DNA, 这与文献报道的非常一致^[19], 表明 DNA 是以纳米粒形式

(TAT-LPD) 存在的, ECM-m-GAM 成功实现了对 TAT-LPD 的负载。

ECM-m-GAM 的机械性能利用旋转流变仪进行测定, 结果见图 7。由图可以看出, 不管 HA-AC 的用量是 3% 还是 4%, 支架的弹性模量 (G') 始终高于黏性模量 (G''), 表明 HA-AC 用量为 3% 或 4% 时均形成了凝胶。此外, 3% HA-AC 制备的 GAM 的弹性模量约为 600 Pa, 而 4% HA-AC 制备的 GAM 的弹性模量约为 1600 Pa, 说明 4% HA-AC 制备的 GAM 具有更高的机械强度, 更适用于支架植入和组织修复, 这与文献报道一致^[19]。由此可见, 可以调整 HA-AC 的用量来控制 ECM-m-GAM 的机械性能以满足组织修复时对支架机械强度的要求。本研究中, 选用 4% HA-AC 来制备支架。

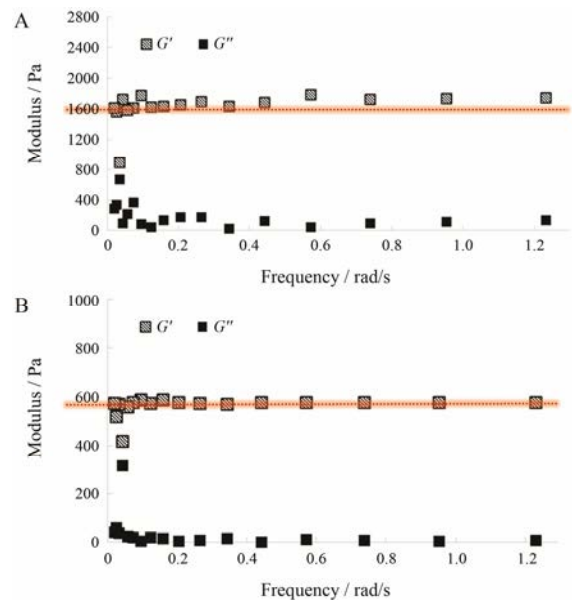


Figure 7 The elastic (G') and viscous (G'') modulus of ECM-m-GAM. GAM prepared with 4% HA-AC (A); GAM prepared with 3% HA-AC (B)

4 ECM-m-GAM 的 MMPs 敏感性释放

首先, 为了评价 ECM-m-GAM 的 MMPs 敏感性, 配制了两种释放介质: PBS 缓冲液 (pH 7.4)、PBS 缓冲液 (pH 7.4, 含 $0.5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶原酶), DNA 的释放曲线见图 8。由图 8A 可见, PBS 缓冲液体系中 DNA 的释放呈现明显的缓释行为, 这是由于凝胶的包载作用; 相反, PBS 缓冲液 (含 $0.5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶原酶) 中 DNA 的释放快于 PBS 缓冲液, 表明 ECM-m-GAM 具有明显的 MMPs 敏感性, 这是由于 ECM-m-GAM 是通过 MMPs 敏感性多肽 HS-MMP-SH 将 HA 交联在一起, 而 HS-MMP-SH 能够被胶原酶快速断裂, 从而

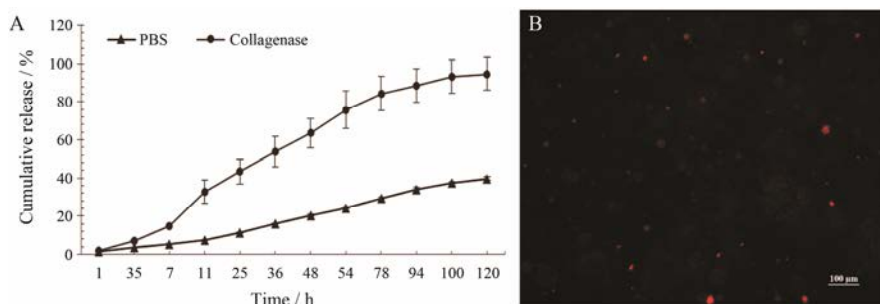


Figure 8 DNA release from ECM-m-GAM incubated in PBS (pH 7.4) and PBS (pH 7.4, $0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ collagenase) release solutions (A). The released DNA from Gel-Red stained GAM was imaged with a fluorescence microscope (B)

使 ECM-m-GAM 逐步降解, 最终使 DNA 快速释放出来。为了证明释放的 DNA 仍以纳米复合物的形式存在, 作者又将 Gel-Red 负染后的 GAM 浸泡在 1 mL PBS 缓冲液 (pH 7.4, 含 $0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胶原酶) 中释放 12 h, 释放液用荧光显微镜观察。由图 8B 可见, 释放液与 ECM-m-GAM 的观察结果类似, 仍然存在大量呈颗粒状分布的被染成红色的 DNA, 表明释放的 DNA 仍以纳米粒的形式存在, 这将为以后的细胞转染研究奠定基础。

5 ECM-m-GAM 体外转染能力的评价

为了进一步证明释放的 DNA 纳米粒具有转染能力, 考察了负载 pEGFP-N1 质粒的 ECM-m-GAM 对 BMSCs 的转染效果。结果显示, 转染 3 天去除支架后, 显微镜下观察可见细胞呈单层贴壁生长, 形态呈典型多角形, 细胞生长状态良好 (图 9A)。荧光显微镜下观察到部分细胞呈现绿色 (图 9B), 说明有绿色荧光蛋白 EGFP 的表达, 表明从 ECM-m-GAM 中释放的 DNA 粒子能够对周围细胞进行转染, 使细胞表达 DNA 所编码的蛋白, 证明 ECM-m-GAM 具备作为转染支架的可行性。

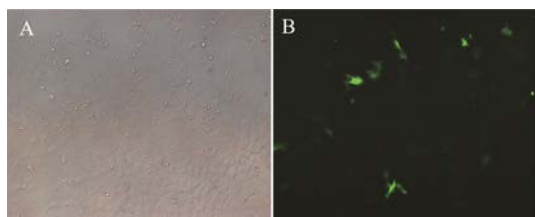


Figure 9 Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) (A) and the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BMSCs (B) after co-cultured with ECM-m-GAM for 3 days ($\times 100$)

讨论

GAM 技术是综合了组织工程学技术和基因治疗理论的新兴技术, 在组织工程的应用方面具有独特的优势: ① 质粒 DNA 制备技术成熟、稳定性好、价

格明显低于纯化的重组生长因子, 且少量即可转染相当数量的细胞, 降低了成本; ② 被转染成功的细胞能在一定时期内持续表达并分泌 DNA 所编码的生长因子, 有利于克服生长因子半衰期短, 价格昂贵的缺陷; ③ 目前组织工程常用的基因治疗是预先在体外将种子细胞进行基因转染, 然后再将转染后的细胞植入组织缺损区域。这种方法需要进行种子细胞的分离、培养和转染等步骤, 耗时耗力, 增加成本, GAM 可直接移植到缺损区域, 通过对缺损区域细胞的原位转染, 实现生长因子的表达。

本文首先构建 TAT 修饰的脂质体基因载体 (TAT-LPD) 并进行表征, 然后用 RGD 修饰透明质酸, 并与 TAT-LPD 混合均匀, 在交联剂 HS-MMP-SH 的作用下使透明质酸凝胶化, 得到内部包载 TAT-LPD 的 MMPs 敏感肽交联的 RGD-透明质酸凝胶, 完成了 ECM-m-GAM 的构建。扫描电镜证实 ECM-m-GAM 具有典型的凝胶结构, 旋转流变仪测定弹性模量和储能模量, 表明 ECM-m-GAM 具有良好的机械性能, 可以作为组织工程的支架。最后, 建立体外释放模型, 考察 ECM-m-GAM 在不同释放介质中的释放行为, 证明其具有 MMPs 敏感性, 此外, 结果表明释放液中 DNA 仍以纳米复合物的形式存在, 提示释放后的 DNA 粒子仍然具备 LPD 的转染能力。为了验证这一推论, 考察了负载 pEGFP-N1 质粒的 ECM-m-GAM 对 BMSCs 的转染效果, 结果显示 GAM 能够转染 BMSCs 细胞并使其表达绿色荧光蛋白, 从而直接证明了释放后 DNA 纳米粒的转染能力, 为 ECM-m-GAM 的细胞转染和组织修复研究提供了依据。需要提出的是, 本研究尚处于起始阶段, 本文更侧重于包载 TAT-LPD 的 ECM-m-GAM 的设计、构建与表征, 而 TAT 的引入对转染效率的影响及 RGD 的引入对细胞增殖的影响等将是作者下一步研究的主要内容。

ECM-m-GAM 能够将以下功能有机地整合到一起: RGD 作为细胞黏附的识别位点, 促进细胞在支架

中的附着, 这是细胞在支架中增殖与分化的前提; 细胞在迁移和增殖的过程中分泌 MMPs, 使凝胶降解, 一方面为细胞自身的迁移和增殖创造空间, 避免凝胶的网状结构成为细胞迁移和增殖的物理屏障; 另一方面释放出 TAT-LPD。由于细胞穿膜肽 TAT 高效的入胞及溶酶体逃逸能力, 释放出的 TAT-LPD 将对周围细胞进行高效地原位转染, 从而表达并分泌生长因子, 促进组织修复与再生。这些功能环环相扣、相互促进, 为解决目前基因活化支架仿生性能不足、基因难以控释和转染效率低等问题提供切实可行的方法。

References

- [1] Evans CH. Gene delivery to bone [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64: 1331–1340.
- [2] Tierney EG, Duffy GP, Cryan SA, et al. Non-viral gene-activated matrices: next generation constructs for bone repair [J]. *Organogenesis*, 2013, 9: 22–28.
- [3] Tierney EG, Duffy GP, Hibbitts AJ, et al. The development of non-viral gene-activated matrices for bone regeneration using polyethyleneimine (PEI) and collagen-based scaffolds [J]. *J Control Release*, 2012, 158: 304–311.
- [4] Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 5413–5418.
- [5] Kim J, Park Y, Tae G, et al. Synthesis and characterization of matrix metalloproteinase sensitive-low molecular weight hyaluronic acid based hydrogels [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19: 3311–3318.
- [6] Lei YG, Gojgini S, Lam J, et al. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 39–47.
- [7] Torchilin VP. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 548–558.
- [8] Fan B, Jin MJ, Huang W, et al. The development of cell-penetrating peptides in drug delivery system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 264–271.
- [9] Torchilin VP, Levchenko TS, Rammohan R, et al. Cell transfection *in vitro* and *in vivo* with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 1972–1977.
- [10] Bao TW. Fabrication and Evaluation of PAMAM Dendrimers Complexed rhBMP-2 Gene Activated Matrix for Bone Regeneration (PAMAM 树状分子复合 rhBMP-2 基因活性基质的构建及其骨再生研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [11] Ma K, Wang DD, Lin Y, et al. Synergetic targeted delivery of sleeping-beauty transposon system to mesenchymal stem cells using LPD nanoparticles modified with a phage-displayed targeting peptide [J]. *Adv Funct Mater*, 2013, 23: 1172–1181.
- [12] Li SD, Huang L. Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2006, 3: 579–588.
- [13] Bai J. The study of Cationic Lipid Based Gene Delivery System Lipid-mu Peptide-DNA (阳离子脂质基因载体 Lipid-mu peptide-DNA 的研究) [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2012.
- [14] Kanda S, Inoue K, Nojima S, et al. Incorporation of a ganglioside and spin-labeled ganglioside analogue into cell and liposomal membranes [J]. *J Biochem*, 1982, 91: 2095–2098.
- [15] Uster PS, Allen TM, Daniel BE, et al. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged *in vivo* circulation time [J]. *FEBS Lett*, 1996, 386: 243–246.
- [16] Chen Y, Sen J, Bathula SR, et al. Novel cationic lipid that delivers siRNA and enhances therapeutic effect in lung cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6: 696–705.
- [17] Zhang L, Wang Y, Gao HL, et al. The construction of cell-penetrating peptide R8 and pH sensitive cleavable polyethylene glycols co-modified liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 760–766.
- [18] Tokatlian T, Cam C, Segura T. Non-viral DNA delivery from porous hyaluronic acid hydrogels in mice [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 825–835.
- [19] Gojgini S, Tokatlian T, Segura T. Utilizing cell-matrix interactions to modulate gene transfer to stem cells inside hyaluronic acid hydrogels [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8: 1582–1591.