

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520061152674

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

功能多肽修饰的明胶-硅氧烷纳米粒子在细胞内转运途径及其作为基因载体的研究

Cellular traffic and *in vitro* transfection of functional peptides decorated gelatin-siloxane nanoparticles as non-viral vectors

王祖勇

指导教师姓名: 任磊 教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	II
第一章 绪论 .....	1
1.1 引言 .....	1
1.2 病毒载体介导基因转染的机制 .....	1
1.3 非病毒载体介导基因转染的机制 .....	2
1.4 增强非病毒载体基因转染效率的措施 .....	7
1.5 本课题的研究背景和研究内容 .....	8
参考文献 .....	9
第二章 明胶-硅氧烷及 Tat 修饰的明胶-硅氧烷纳米粒子跨膜机制的研究 .....	16
2.1 引言 .....	16
2.2 实验试剂和仪器 .....	16
2.3 实验方法 .....	18
2.4 结果与讨论 .....	26
2.5 本章小结 .....	48
参考文献 .....	49
第三章 明胶-硅氧烷及多肽修饰的明胶-硅氧烷纳米粒子在细胞内转运途径的研究 .....	51
3.1 引言 .....	51
3.2 实验试剂和仪器 .....	52
3.3 实验方法 .....	53
3.4 结果与讨论 .....	59
3.5 本章小结 .....	79
参考文献 .....	80
第四章 Tat 修饰的明胶-硅氧烷纳米粒子作为基因载体的体外研究 .....	83
4.1 引言 .....	83

4.2 实验试剂和仪器	84
4.3 实验方法	85
4.4 结果与讨论	93
4.5 本章小结	106
参考文献	106
全文结论及展望	109
硕士期间发表论文情况	111
致 谢	112

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

Abstract in Chinese .....	I
Abstract in English .....	II
Chapter 1 Reviews .....	1
1.1 Instruction .....	1
1.2 Transfection mechanisms of viral vectors.....	1
1.3 Transfection mechanisms of non-viral vectors.....	2
1.4 Principles for enhancing transfection efficiency <i>in vitro</i> .....	7
1.5 The Proposal and Contents of This Thesis .....	8
Reference .....	9
Chapter 2 Studies on the cellular uptake of gelatin-siloxane and Tat-peptides decorated gelatin-siloxane nanoparticles .....	16
2.1 Introduction.....	16
2.2 Materials .....	16
2.3 Experiment Methods .....	18
2.4 Results and Discussions .....	26
2.5 Conclusions.....	48
References.....	49
Chapter 3 Studies on the intracellular traffic of gelatin-siloxane based nanoparticles .....	51
3.1 Introduction.....	51
3.2 Materials .....	52
3.3 Experiment Methods .....	53
3.4 Results and Discussions .....	59
3.5 Conclusions.....	79
References.....	80
Chapter 4 <i>In vitro</i> transfection studies of Tat-peptides decorated nanoparticles as	

<b>gene vectors .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Introduction.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Materials .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3 Experiment Methods .....</b>	<b>85</b>
<b>4.4 Results and Discussions .....</b>	<b>93</b>
<b>4.5 Conclusions.....</b>	<b>106</b>
<b>References.....</b>	<b>106</b>
<b>Conclusions and Future Works .....</b>	<b>109</b>
<b>Publications .....</b>	<b>111</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>112</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要

## 摘要

基因治疗能够从基因组水平治愈人类疾病。非病毒载体相对病毒载体具有较好的生物相容性，但其基因递送和转染效率都较低。本课题组合成的明胶-硅氧烷纳米粒子是一种新颖的有机-无机纳米杂化材料，具有较好的 DNA 包封和释放性能。但是有关基于明胶-硅氧烷的纳米粒子作为非病毒基因载体的潜能还缺乏深入系统的研究。本文针对基因治疗中的主要屏障，就基于明胶-硅氧烷的纳米粒子作为理想非病毒载体的可行性，开展了一系列的研究，主要包括：

(1) 通过 MTT 实验对明胶-硅氧烷纳米粒子 (GS NPs) 和 Tat 修饰的明胶-硅氧烷纳米粒子 (TG NPs) 的细胞生物相容性进行了评价；通过激光共聚焦显微镜和流式细胞仪证实 GS NPs 和 TG NPs 均能有效进入 Hela 细胞；同时，结合胞吞途径特异抑制剂和示踪物确定了 GS NPs 和 TG NPs 跨膜进入细胞的机制。

(2) 通过激光共聚焦显微镜和透射电子显微镜对明胶-硅氧烷纳米粒子 (GS NPs) 进入细胞后的转运途径进行了探讨。同时，结合细胞器荧光标记技术，对氯喹、Tat、Kala 多肽促进 GS NPs 逃逸溶酶体的性能进行了研究，结果表明氯喹、Tat、Kala 多肽均能促进 GS NPs 逃逸溶酶体，但氯喹长时间 (> 24 h) 与细胞作用具有明显的细胞毒性，Kala 多肽促溶酶体逃逸的性能不稳定；此外，研究发现 Tat 修饰的 GS NPs 能够进入细胞核，pALDH Leader 多肽修饰的 GS NPs 能够靶向到线粒体。

(3) 通过流式细胞仪，结合 DNA 荧光标记技术，比较了 TG NPs 和脂质体载运 DNA 进入细胞的性能，并探讨出 DNA 浓度、血清对 TG NPs 载运质粒 DNA 进入细胞的影响；通过双荧光标记 DNA 和 TG NPs 研究出 DNA 在细胞内环境中的释放和分布情况；通过 $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因，系统研究了 TG/DNA、Tat/GS、DNA 浓度、转染时间和血清对 TG NPs 介导基因转染的影响，优化并得出最佳转染条件。

**关键词：**明胶-硅氧烷纳米粒子；Tat；穿膜机制；胞内途径；体外转染



## Abstract

Gene therapy is a promising method for healing human disease at the level of genome. Comparing to viral gene vectors, non-viral gene vectors, benefiting much from their good biocompatibility, have lower efficiency of the gene delivery and transfection. Gelatin-siloxane nanoparticles are novel organic-inorganic hybrid biomaterials with good abilities of DNA encapsulation and release. However, the potentials of nanoparticles based on gelatin-siloxane as novel gene vectors have not been systematically studied. Targeting the main barriers of gene delivery in cells, this thesis has operated a series of studies on the potentials of gelatin-siloxane-based nanoparticles as novel gene vectors. The main studies are as follows:

(1) Cytocompatibility of gelatin-siloxane nanoparticles (GS NPs) and Tat-decorated gelatin-siloxane nanoparticles (TG NPs) were analyzed by MTT assay. The entrances of GS NPs and TG NPs into HeLa cells were investigated by both confocal laser scanning microscope (CLSM) and fluorescence activated cell sorter (FACS). Cell membrane-penetrating mechanisms of GS NPs and TG NPs were investigated by inhibited and co-localized experiments.

(2) The fate of GS NPs after internalization into cells was investigated by CLSM and transmission electron microscope (TEM). By labeling lysosomes, the enhanced effects of chloroquine, Tat-peptides and Kala-peptides on the escape of GS NPs from lysosomes were discussed. However, chloroquine presents significant cytotoxicity when incubated with cells for long-period time (> 24 h) and Kala-peptides presents an unstable effect on the escape of GS NPs. Moreover, the targeting abilities of Tat-peptides to nuclei and pALDH leader-peptides to mitochondria were investigated by labeling nuclei and mitochondria with fluorescence probes.

(3) By labeling plasmid DNA, TG NPs were confirmed to transport plasmid DNA into HeLa cells more effectively than liposomes analysed by FACS. By labeling both TG NPs and DNA, the release and distribution of plasmid DNA in intracellular

environment were investigated using CLSM. Using  $\beta$ -galactosidase as report gene, the transfection abilities mediated by TG NPs were investigated. The effects of influence factors, such as Tat/GS ratio, TG/DNA ratio, DNA concentration and serum, on the transfection were systematically analysed to obtain the optimal conditions for TG NPs mediated transfection.

**Key words:** Gelatin-siloxane nanoparticles, Tat-peptides, membrane-penetrating mechanism, intracellular traffic, *in vitro* transfection

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 绪论

### 1.1 引言

基因治疗 (gene therapy) 是将有治疗作用的基因导入靶细胞, 以纠正基因缺陷, 达到治疗疾病目的一种方法[1]。基因递送是基因治疗中的关键技术, 基因递送载体包括病毒载体和非病毒载体[2]。基因载体将治疗基因导入靶细胞需要克服以下细胞屏障: 细胞膜、溶酶体、细胞核膜或线粒体膜[3, 4]。此外, 基因载体还必须保护治疗基因免受细胞内核酸酶降解[4]。

本章拟就当前病毒载体和非病毒载体穿越细胞屏障, 载运治疗基因转染靶细胞的机制进行探讨, 就增强非病毒载体基因转染效率的方法进行总结, 并在此基础上提出本文的研究内容和创新之处。

### 1.2 病毒载体介导基因转染的机制

病毒载体 (viral vectors) 是指利用真核病毒的基因组序列元件构建的真核基因转移工具, 是目前基因治疗中主要载体, 并已应用与临床实验[5]。病毒载体包括反转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体及单纯疱疹病毒载体等。

病毒载体可以高效转染靶细胞, 表达治疗基因[5], 这主要因为病毒载体可以有效包封和保护 DNA 进入靶细胞、有效逃逸溶酶体扣留, 并通过微管运输将 DNA 递送至细胞核[6-8]。已有研究表明腺病毒载体通过其外壳上纤维蛋白与细胞膜糖蛋白腺病毒受体 CAR 结合, 并通过外壳上 5 个 RGD 序列与细胞膜表面整合素蛋白亚基 ( $\alpha v\beta 3$  和  $\alpha v\beta 5$ ) 结合, 从而增强腺病毒载体与细胞的粘附作用[9, 10]。腺病毒载体内化由 RGD 序列诱导, 并通过胞饮作用经由内吞小泡途径进入细胞[10]。在进入细胞早期阶段, 纤维蛋白脱离外壳, 并大约有 80% 粘附的病毒载体可在 10 分钟内进入细胞[11, 12]。随着内吞小泡逐渐酸化, 腺病毒载体

外壳构象发生改变,成为疏水性质,从而介导载体逃逸溶酶体进入细胞质,整个过程只需 5 – 15 分钟[8, 11, 12]。同时,研究发现腺病毒载体外壳蛋白上带有核定位信号,能够介导腺病毒进入细胞核[13]。腺病毒 DNA 自从溶酶体中释放到进入细胞核大约只需 40 分钟,进入细胞核的病毒 DNA 可达到 40 %,相比之下非病毒载体脂质体介导的 DNA 进入细胞核不到千分之一[14]。Cotten 等人用腺病毒载体转染 Hela 细胞,转染率达到 100 %[15]。

与腺病毒类似,流感病毒通过细胞膜表面唾液酸与细胞结合,并在红细胞凝集素蛋白(HA)帮助下逃逸溶酶体[16-18]。红细胞凝集素在酸性条件发生构象改变,暴露出其具有两亲融合性的 N 末端(HA-2),并通过 HA-2 介导逃逸溶酶体[19]。Wagner 和 Pedroso 等人研究表明 HA-2 多肽可以增强转染效率,但 HA-2 多肽的转染增强作用只对分裂频率高的细胞有效[20]。

不同于流感病毒,腺病毒载体对于分裂期和非分裂期的细胞转染都非常有效,研究表明这主要得益于腺病毒载体表面的核定位信号(NLS)[13]。由于细胞核孔只能允许 70 kDa 分子量的大分子或直径小于 10 nm 的纳米粒子通过,普通病毒载体不能进入细胞核,只能在细胞分裂、核膜解体时进入到细胞核区域[21]。腺病毒载体能够通过核定位信号介导,经由核孔进入非分裂期细胞核。

人免疫缺陷病毒(HIV-1)转录调控蛋白(Tat)也被发现具有进入细胞核的功能,能够促进 HIV 在细胞核内扩增[22]。随后研究发现 Tat 蛋白具有很强生物活性,能够直接穿透细胞膜、细胞核膜,增强 HIV 感染宿主细胞[23]。进一步研究表明 HIV 这种高感染性能主要得益于 Tat 蛋白中一小段核心肽序列(48-56, GRKKRRQRRR)[23, 24]。

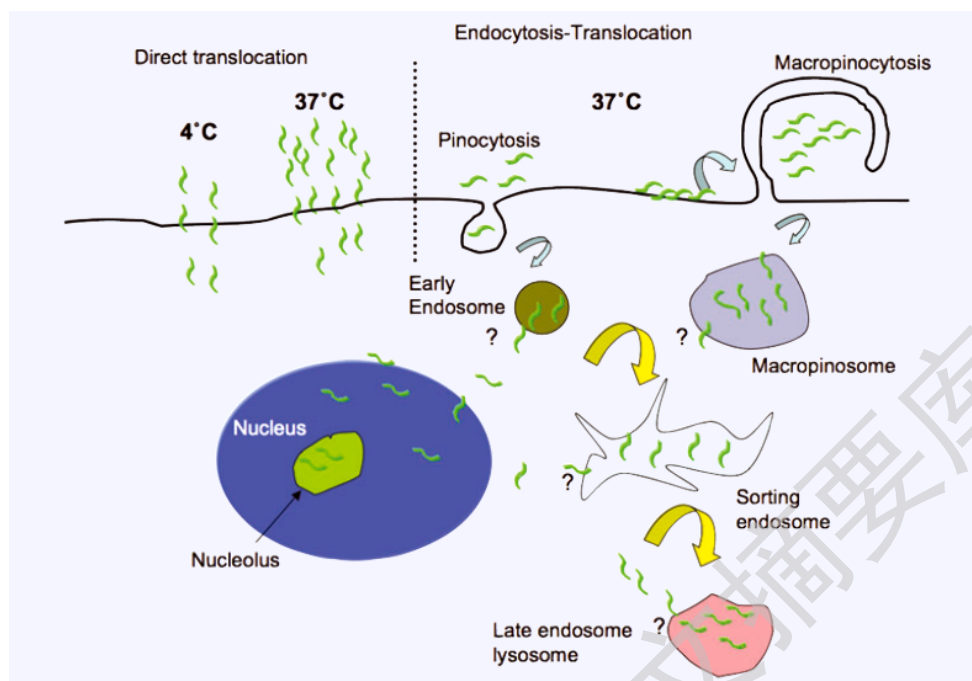
## 1.3 非病毒载体介导基因转染的机制

### 1.3.1 非病毒载体跨膜进入细胞的机制

胞吞途径被认为是物质进入细胞的一种有效途径,非病毒载体如能通过胞吞途径进入细胞,将有利于提高非病毒载体递送基因进入细胞的效率。胞吞作用主

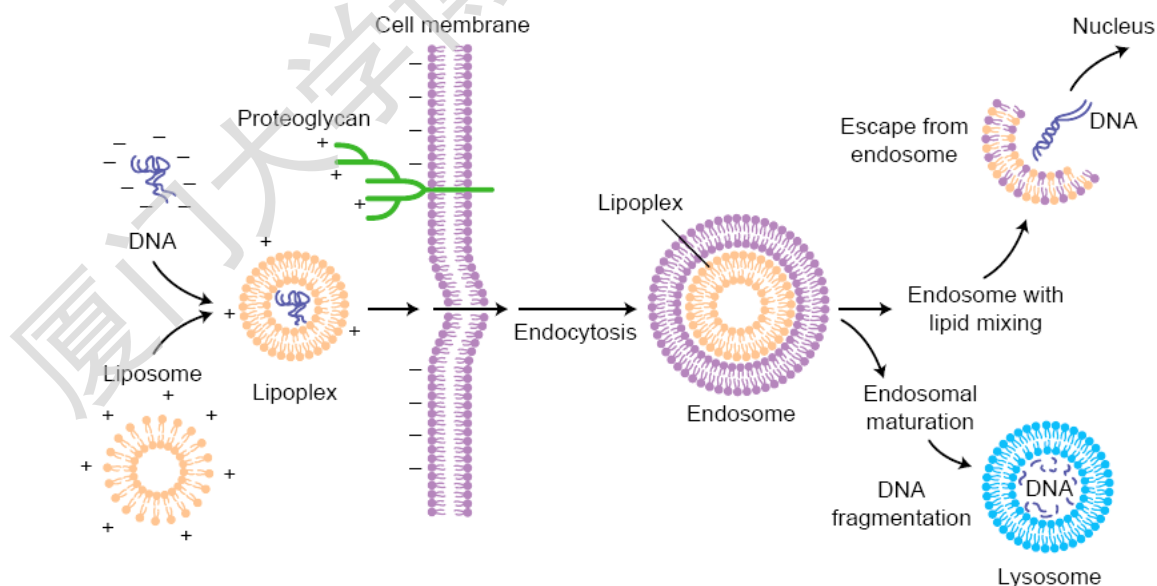
要包括以下三种途径[25, 26]: (1) 吞噬作用: 细胞内吞较大颗粒或超级复合大分子的过程称为吞噬作用, 被吞噬的物质通常为细菌、病毒、裂解的组织细胞片段以及尘粒等。(2) 胞饮作用: 细胞内化大分子溶质和/或液体的过程称为胞饮作用。一般将胞饮泡直径大于 100 nm 的胞饮叫做大胞饮, 而将胞饮泡直径小于 100 nm (常常小于 80 nm) 的胞饮叫做微胞饮。(3) 受体介导的内化: 配体通过受体结合到细胞膜表面, 然后由该处的细胞膜凹陷, 并形成独立完整的小泡, 将配体带入细胞内, 这一过程称为受体介导的内化或内吞。

尽管非病毒载体表现出优越的基因治疗潜能, 但其跨膜进入细胞的途径仍然是个谜。Tat 是一种阳离子型多肽, 具有较高的 DNA 亲和力, 有人直接用它介导质粒 DNA 进入细胞[23, 27]。起初研究发现, Tat 可以在 4 °C 条件下跨膜进入细胞, 而且一般胞吞抑制药物 (如: 秋水仙素, 紫杉醇, 诺可达唑等微管特异性药物和细胞松弛素 D 等微丝特异性药物) 也不能抑制其转导入细胞[23, 28-32]。ATP 去除剂 (如: 叠氮化钠和鱼藤酮) 也不能抑制其转导[32]。以上研究说明 Tat 的跨膜进入细胞不依赖能量, 与典型的胞吞作用不同 (图 1.1)。近几年来, 直接转导的机制受到质疑。更多的研究认为 Tat 通过胞吞作用进入细胞, 但不同研究小组对 Tat 通过那种胞吞途径进入细胞观点不一 (图 1.1): Richard 等人的研究表明 Tat 主要通过网格蛋白介导的受体包吞途径进入细胞, 并发现 Tat 与转铁蛋白 (clathrin 介导的受体胞吞途径示踪物) 共定位[32]。Fittipaldi 和 Ferrari 等人研究则表明 Tat 通过小泡途径跨膜进入细胞[33, 34]。目前, 较多研究认为 Tat 是通过脂筏介导的巨胞饮途径进入细胞。但是, Tat 修饰的载体跨膜进入细胞的途径受到载体性质的影响[35]。Jehangir 等人将具有溶酶体逃逸功能的 HA-2 连接到 Tat, 并通过与霍乱毒素 (巨胞饮途径示踪物)、转铁蛋白 (网格蛋白介导受体胞吞示踪物) 共培养, 激光共聚焦显微镜观察显示 Tat-HA-2 只与霍乱毒素共定位分布, 表明 Tat-HA-2 融合蛋白是通过脂筏介导的巨胞饮方式途径进入细胞而非受体或 caveolae 介导的胞吞途径[36]。



**Figure 1.1** Proposed model for the cellular entry of cationic cell penetrating peptides HIV-Tat peptides.[37]

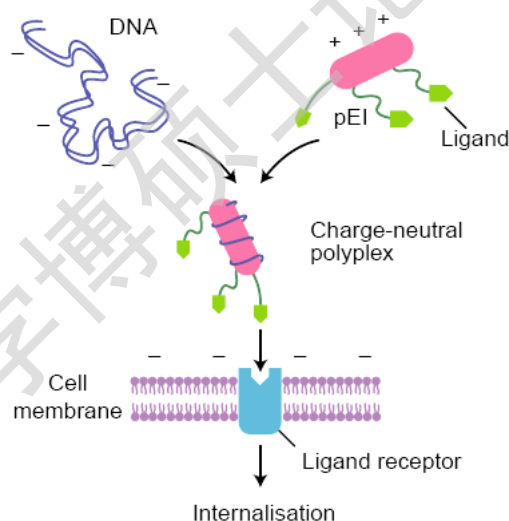
图 1.1 HIV-Tat 跨膜进入细胞的几种可能途径[37]。



**Figure 1.2** Lipoplex-mediated transfection and endocytosis[42].

图 1.2 脂质体通过胞吞途径介导转染[42]。

脂质体跨膜进入细胞的机制至今同样没有定论。早期的研究认为脂质体通过膜融合方式介导外源基因进入细胞：脂质体在与 DNA 或细胞膜作用时变得不稳定，从而与细胞膜发生融合，并释放其载运的 DNA 进入细胞质中[21, 38]。但随后越来越多的研究认为脂质体通过以胞吞作用为主的方式跨膜进入细胞。胞吞抑制剂能够显著降低脂质体介导的基因转染效率；氯喹等溶酶体释放试剂能够增强脂质体介导转染；而最直接的证据是 TEM 观察到由脂质体介导的金标记 DNA 出现在胞内体中[39-41]。所有这些证据都表明脂质体通过胞吞途径跨膜进入细胞。而目前普遍接受的观点是：脂质体通过以胞吞为主的途径进入细胞，但这其中涉及到膜融合的作用（图 1.2）[21]。



**Figure 1.3** Receptor-mediated internalization of ligand-labelled polyplexes[42].

**图 1.3** 配基修饰的多聚物经受体介导的胞吞途径跨膜进入细胞[42]。

聚合物载体同样通过胞吞途径进入细胞，但不涉及膜融合过程[21]。目前较多研究认为 PLL 和 PEI 通过网格蛋白受体介导的胞吞途径进入细胞(图 1.3)[21]。但 Rejman 等继续发现 PEI 还通过非网格蛋白介导的胞吞途径进入细胞，这主要涉及小泡途径，因为 PEI 进入细胞能够被菲律宾菌素和 genestein 抑制[43]。

Goncalves 等于 2004 年研究表明 His-pLK 部分通过网格蛋白介导的胞吞途径进入细胞。同时他们发现阿米洛利（巨胞饮途径抑制剂）可以抑制 His-pLK 进入细胞，而佛波醇酯（巨胞饮途径促进剂）可以促进 His-pLK 进入细胞，说明 His-pLK 同时通过巨胞饮途径跨膜进入细胞[44]。

### 1.3.2 非病毒载体逃逸溶酶体的机制

溶酶体是起消化作用的细胞器，内含含有 60 多种酸性水解酶。非病毒载体通过胞吞途径进入细胞，进入到溶酶体[25]。

目前关于非病毒载体逃逸溶酶体的机制主要包括：（1）脂质体膜融合：二油酰脂酰乙醇胺（DOPE）具有 pH 敏感性，在溶酶体酸性环境中分子构形发生变化，由 L $\alpha$  相转变为六角相。含有 DOPE 的脂质体能够通过 DOPE 构形的变化与溶酶体膜融合，迅速释放 DNA 到细胞质[41, 45, 46]。（2）质子海绵效应：PEI 与脂质体类似，具有内在逃逸溶酶体的能力，但逃逸机制不同。PEI 含有大量伯胺，pKa 接近中性。在低 pH 条件下，伯胺具有很强的质子化能力，能够缓冲溶酶体内部 H<sup>+</sup>，并通过质子泵引起 H<sup>+</sup> 内流和 Cl<sup>-</sup> 内流，最终导致溶酶体溶胀[47, 48]。富含赖氨酸的多肽也被发现具有逃逸溶酶体的能力，其主要借助于赖氨酸带有较强的正电荷，能够增强溶酶体内电正性，引起 Cl<sup>-</sup> 内流，从而引起溶酶体涨裂[47, 48]。（3）蛋白构象变化：一些病毒蛋白序列如 HA-2 则在溶酶体内构象发生变化，疏水一端与溶酶体单层膜作用，介导自身逃逸溶酶体[19, 20]。而 Kala 多肽在溶酶体内酸性条件下构象会由无规则的卷曲变为  $\alpha$  螺旋，对溶酶体膜呈现较强的膜融合能力，进而突破溶酶体[49-51]。

### 1.3.3 非病毒载体进入细胞核的机制

细胞核是细胞的控制中心，在细胞的代谢、生长、分化中起着重要作用，是遗传物质的主要存在部位。核膜是和基因治疗中的重要屏障。核孔只有允许大约 70 kDa 分子量的大分子或直径小于 10 nm 的纳米粒子通过[21]。普通 DNA 即使包封在基因载体表面也不能通过核孔。目前较为认可的两种机制支持基因载体进



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库