

碳酸钙微球合成、修饰及作为基因载体的研究

韩华锋^a, 杨卫^{a,b}, 陈菲菲^{a,b}, 李泽豪^{a,b}, 孔祥东^{a,b}

(浙江理工大学, a. 生命科学学院; b. 生物材料与海洋生物资源研究所, 杭州 310018)

摘要: 采用聚苯乙烯磺酸钠(PSS)作为调控剂,将其加入到氯化钙和碳酸钠溶液反应体系中成功制备出表面粗糙的碳酸钙微球(粒径平均约为 510 nm),采用场发射扫描电镜(FE-SEM)、红外光谱(FTIR)、X-射线衍射(XRD)和动态光散射(DLS)等对碳酸钙微球颗粒进行表征。MTT 实验显示碳酸钙微球毒性具有浓度依赖性,在终浓度 <1 mg/mL 时,细胞存活率都可达 60%以上,显示出很低的细胞毒性,具有良好的生物相容性。不同 pH 值条件下碳酸钙微球的降解实验结果显示碳酸钙微球在酸性 pH 下能够更快速地降解,说明碳酸钙微球能够响应酸性 pH 值,具有 pH 依赖性。将碳酸钙微球经 PEI 表面修饰后用于负载质粒 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳及体外转染实验结果证实碳酸钙微球能够有效负载质粒 DNA,并可在癌细胞内成功表达发出绿色荧光。这些研究结果显示将碳酸钙微球作为一种安全的非病毒基因载体用于基因治疗领域具有潜在的应用价值。

关键词: 碳酸钙微球; 表面修饰; 基因传递载体; 基因治疗

中图分类号: Q279

文献标志码: A

0 引言

基因治疗是治疗癌症的一大趋势,人们对其寄予高度期望。基因治疗的关键主要取决于基因传递载体^[1]。鉴于当前基因治疗载体还不够完善,疗效不尽人意,因此,研制安全、有效转染靶细胞的载体系统仍是基因治疗研究的热点^[2]。基因治疗载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大系统^[3-4]。由于病毒载体存在较大的安全隐患^[5-7],因此无机非病毒材料载体逐渐受到关注。

无机非病毒载体是新兴的基因转导系统。非病毒载体具有安全性高、无免疫原性以及制备方便、便于保存和检验等优势。目前,研究报道较多的无机材料载体主要有磷酸钙^[8-9],碳纳米管^[10],羟基磷灰石^[11],二氧化硅^[12]等。

在众多无机材料载体中,碳酸钙(CaCO_3)逐渐成为科学家们关注的焦点。一方面,碳酸钙制备来源丰富,制备简便且在过程中易于调控颗粒大小和

形貌,性能优良且价格低;另一方面,碳酸钙颗粒因其具有良好的生物相容性和生物可降解性等优越的生物学性能而显示出其作为一种无机非病毒载体的巨大潜力。Zhang 等^[13]将多孔球形结构的碳酸钙颗粒作用于 Hela 细胞评估其颗粒的生物安全性能,结果显示球形碳酸钙微粒具有良好的生物相容性,可作为一种相对安全的运输载体。碳酸钙具有较大孔隙率、大比表面积以及在相对温和环境下可迅速降解等特性,使其成为药物运输的理想载体^[14-15];加上碳酸钙的合成工艺稳定可控,近年碳酸钙颗粒作为新型非病毒载体备受关注。而聚乙烯亚胺(PEI)分子表面带正电荷,可与 DNA 紧密结合,可将 PEI 表面修饰无机纳米颗粒,如羟基磷灰石颗粒^[16]来提高其携带基因的能力。因此,可采用 PEI 作为修饰剂对无机材料进行表面修饰,用于材料作为一种基因载体的研究。

本文通过采用氯化钙和碳酸钠溶液共沉淀反应体系于实验室内简易制备小粒径的碳酸钙微球,经

收稿日期: 2013-02-14

基金项目: 国家自然科学基金(51272236,51172207,51002139);浙江省自然科学基金(Y207217);浙江理工大学 521 人才培养计划资助

作者简介: 韩华锋(1988-),女,安徽宿州人,硕士研究生,研究方向为生物材料方向。

通信作者: 孔祥东,电子邮箱: kongxiangdong@gmail.com

表面修饰后初步研究其用于一种传递基因载体的潜在应用价值。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

材料:聚苯乙烯磺酸钠(PSS, $M_w=7\ 000$), 聚乙烯亚胺(PEI), 无水乙醇, 氯化钙(CaCl_2)和碳酸钠(Na_2CO_3)均为市售分析纯。去离子水均由Milipore纯水仪制备。

仪器: Nicolet 5700 型傅立叶红外光谱仪(Thermo Electron), HITACHI U2800 紫外光度计(赛多利斯公司), 78 HW-3 型恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司), ZMQS 50F01 型 Milipore 纯水仪(Millipore 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 碳酸钙微球的合成

(a) 分别配置浓度均为 60 mM 的氯化钙溶液和碳酸钠溶液;

(b) 称取一定质量的 PSS, 将 PSS 分别加入氯化钙和碳酸钠溶液中使其终浓度均为 50 g/L, 形成两种混合溶液;

(c) 在 300 r/min 的搅拌转速下, 碳酸钠混合溶液逐滴加入到一定体积的氯化钙混合溶液中, 其中使钙离子与碳酸根离子的体积比为 5:1;

(d) 待滴加完后再持续搅拌 15 min, 将反应完成后的颗粒沉淀离心收集, 用无水乙醇和去离子水洗涤数次;

(e) 最后, 将清洗干净的碳酸钙颗粒沉淀样品置于干净的培养皿里, 在 60℃ 恒温干燥箱内干燥后收集纳米碳酸钙颗粒粉末, 密封保存以备后续 FE-SEM、XRD、FTIR 和 DLS 等测试。

制备出的碳酸钙微球颗粒记为 PCa, 以上反应流程见图 1。

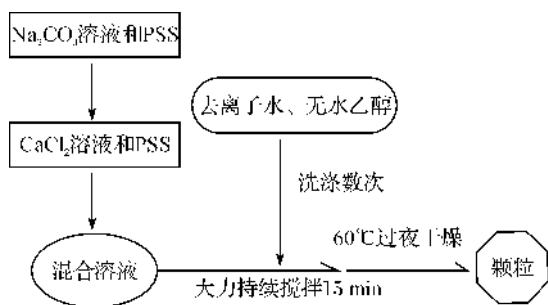


图1 PSS调控制备 PSS- CaCO_3 (PCa)微球的反应流程

1.2.2 碳酸钙微球的表面修饰

PEI 作为一种表面改性剂用于表面修饰已制备

的碳酸钙微球。具体修饰方法如下:(a)首先称取 PCa 粉末,用 Na_2CO_3 溶液活化,超声分散 15 min;然后再离心去除碳酸钠上清液,取灭菌的去离子水溶解沉淀,超声 15 min,最终将碳酸钙粉末配制成 1 mg/mL 的溶液,置于 4℃ 冰箱保存备用;(b)将 PCa 颗粒溶液与 1 mg/mL PEI 溶液混合震荡,然后在 37℃ 水浴下孵育,即完成碳酸钙微球 PCa 的表面修饰。

1.2.3 碳酸钙微球的表征方法

(a) 场发射扫描电镜(FE-SEM)

采用 FE-SEM 分析碳酸钙微球表面特征。将干燥后制得的碳酸钙微粒置于清洗干净的硅片上,硅片粘于导电胶上,然后采用日本日立公司 Hitachi 生产的 cold-field emission SEM S-4800 观察碳酸钙的微观形貌结构,电压为 3.0 kV。

(b) X-射线衍射(XRD)

采用 X-射线粉末衍射仪对碳酸钙微粒进行物相和结晶性能分析。将干燥后的碳酸钙粉末均匀地铺于载玻片表面,置于 X-射线粉末衍射仪的载物台上。仪器在管电压为 40 kV、管电流 35 mA 和扫描速度为 5°/min 的条件下,记录 $2\theta=20\sim70^\circ$ 的衍射强度曲线。

(c) 傅里叶红外光谱(FTIR)

将干燥的碳酸钙粉末与溴化钾混合,以质量比约为 1:100 的条件下充分均匀研磨,傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet 5700, Thermo Electron)对制备样品进行分析,其分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描范围为 4 000~400 cm^{-1} 。

(d) 粒径分析(DLS)

将干燥后的碳酸钙微粒分散在无水乙醇中,超声分散 20 min 后,采用 LB550 型动态光散射纳米粒度分析仪分析碳酸钙颗粒的粒径分布。

1.2.4 碳酸钙微球 PCa 不同 pH 值下降解实验

(a) 首先,配制不同 pH 的 PBS 溶液(pH=10, 7, 4);

(b) 将 PCa 粉末加入到等体积的 PBS 溶液(pH=10, 7, 4)中,超声分散;

(c) 室温下孵育放置 10 h 后,FE-SEM 观察碳酸钙微球的形貌变化。

1.3 载体-重组质粒基因复合

将碳酸钙微球 PCa 颗粒在无菌环境下密封保存,备用。首先按照上述方法对碳酸钙颗粒进行表面修饰。再将形成的 PCa-PEI 与质粒 pEGFP-C1 形成复合物,即完成载体与质粒 DNA 的复合。将

形成的复合物在 8 000 r/min、4℃ 条件下离心 5 min, 取沉淀进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 碳酸钙颗粒生物相容性

将处于生长对数期的 1×10^4 的正常细胞 QSG-7701 铺于 96 孔板中, 将细胞板置于 5% CO_2 、37℃ 的细胞培养箱中培养 24 h 后, 以不加颗粒处理的细胞作为对照, 各做 6 个复孔, 并设置调零组, 其中对照组和调零组分别加入等体积的无菌水处理。实验组分别加入已配制完成的浓度梯度为 0.1、0.5、1、2、3、4、5 mg/mL 和 6 mg/mL 的 PCa 颗粒悬液。将培养板置于 37℃、5% 的培养箱培养 24 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL , 继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 再加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 充分溶解。在酶标仪 OD 490 nm 处测量各孔的吸光值, 按照公式代入测得的 OD 490 nm 值:

$$\text{细胞生存率} = (\text{OD}_{\text{处理组}} - \text{OD}_{\text{调零孔}}) / (\text{OD}_{\text{对照孔}} - \text{OD}_{\text{调零孔}}) \times 100\%$$

计算细胞生存率。以浓度梯度为横轴, 细胞生存率为纵轴绘制细胞生长活力曲线。

1.5 PCa-PEI-pEGFP-C1 体外转染细胞的荧光观察

取处于对数生长期的 QSG-7701、Hep3B、Hela、h1299 和 293a 细胞, 以每孔 2×10^5 个细胞铺于 6 孔培养板中, 每孔 4 mL 培养基, 将已配制好的 PCa-PEI-pEGFP-C1 复合物颗粒悬液加入到六孔板里, 每

孔均匀加入 200 μL , 于 37℃、5% CO_2 培养箱中分别培养 24、48 h 和 72 h 后, 荧光倒置显微镜观察并拍照, 对照组分别设置加入等体积的无菌水和裸质粒 DNA。PEI 修饰碳酸钙的方法见 1.3 的处理方法。

2 结果与讨论

2.1 碳酸钙微球(PCa)的表征

图 2 是采用 PSS 调控合成的碳酸钙微球(PCa)的 FE-SEM、XRD、FTIR 和粒径 DLS 测试结果。

图 2(a)是 PCa 晶体的 FE-SEM 结果。从图中可以看出, 所合成的 PCa 颗粒呈球形形貌, 表面比较粗糙, 颗粒之间分散性良好。球形结构具有较大的比表面积, 可为增大比表面积的物理吸附量提供基础。

图 2(b)是 PCa 晶体粒径大小 DLS 的测量结果。由图可知微球颗粒的平均大小约为 510 nm, 且粒径分布相对较集中。

图 2(c)是 PCa 晶体的 XRD 结果。将该衍射图谱中的衍射峰值与碳酸钙的标准粉末衍射数据进行对比分析, 可知: 球霏石的尖锐衍射峰可被观测到, 说明 PCa 晶体主要为球霏石晶型; 碳酸钙粉末的衍射峰与其球霏石晶型一致, 以上衍射峰分别对应于 PCa 晶体的(004)、(110)和(112)等晶面的衍射特征峰, 只有一个杂峰出现; 且晶体衍射峰的强度比较强, 表明产品获得了很好的结晶度。

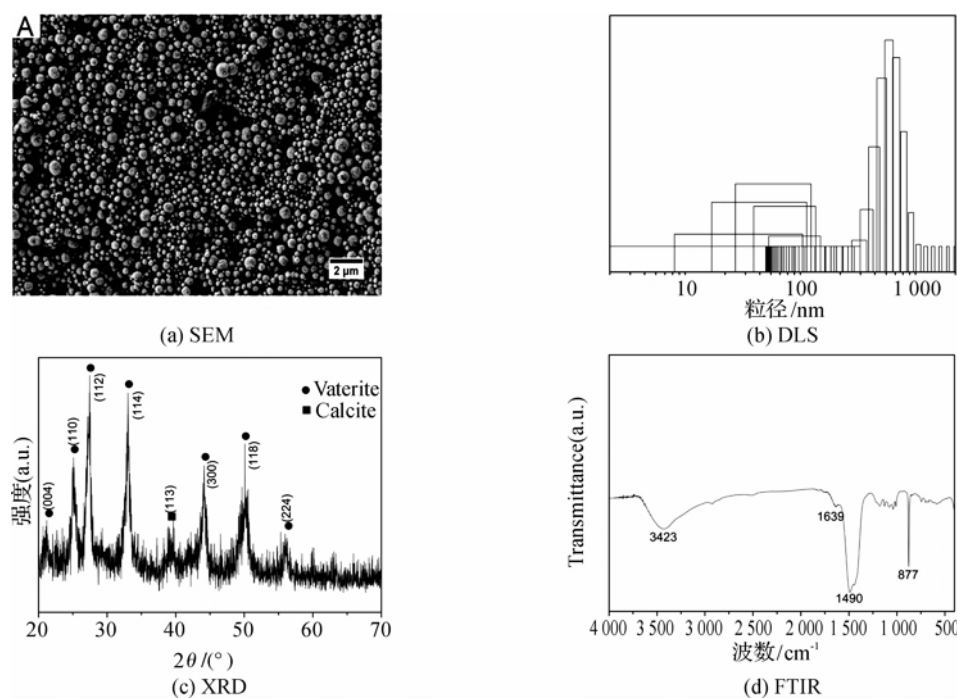


图 2 碳酸钙微球 PCa 的表征

图 2(d)是 PCa 晶体的 FTIR 结果。由图 2(d)可见 877 cm^{-1} 的吸收峰是球霏石的特征峰, 表示

PSS 的添加不会改变碳酸钙的晶型。由此可见, 碳酸钙微球的物相主要是球霏石。从 XRD 图中也可

以判断出晶型是球霏石。

2.2 PCa 微球的生物相容性

图3为PCa微球的生物相容性实验结果。图3显示出PCa微球在不同浓度条件下处理对正常细胞 QSG-7701 细胞存活率的影响。

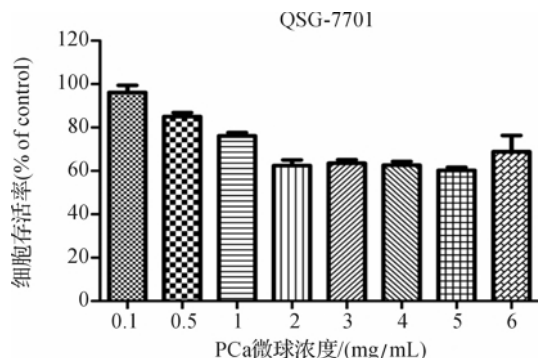


图3 PCa 微球的生物相容性结果

从图3中可看出,不同浓度的PCa微球处理肝正常细胞 QSG-7701 24 h后,MTT结果显示PCa微球毒性具有一定的浓度依赖性。随着PCa微球浓度的增加,细胞的存活率逐渐降低。PCa微球在培养基中的终浓度低于167 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率约达76%以上;而终浓度在1000 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率仍可达60%以上。以上实验说明碳酸钙微球PCa具有浓度依赖性,在一定浓度范围内具有良好生物相容性。该结果为将碳酸钙微球作为一种安全的基因传递载体提供依据。

2.3 PCa 微球不同 pH 值下的降解

众所周知,癌细胞内pH值呈酸性,而正常细胞内的环境则接近中性。为确定载体是否能够在癌组织内释放出目的基因,从而使基因有效地表达,设计试验在不同pH环境下PCa颗粒的降解情况。将已制备完成的PCa微球置于不同pH值的PBS溶液(pH=10,7和4)中浸泡10 h后观察微球的 FE-SEM 表征图。

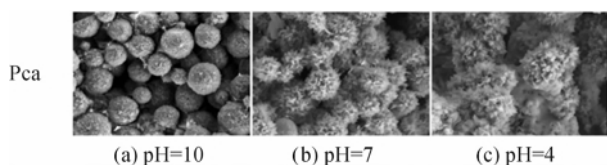


图4 不同pH值下PCa微球降解10 h的FE-SEM图

图4的FE-SEM结果显示,PCa微球在pH为10时,形貌基本维持不变,即不发生降解。随着pH值的降低,颗粒逐渐发生降解;而在pH为4时图4中已基本看不出PCa微球较完整的形貌。可见,随着pH的降低,PCa微球会发生一定程度的降解,说明PCa微球具有pH值依赖性这一特性。这就为碳

酸钙微球作为一种基因传递载体并能够在酸性环境中有效地释放携带基因这一理论基础提供依据。

2.4 PCa-PEI 与质粒 pEGFP-C1 的复合实验

为评估PCa微球能否作为基因传递载体,采用1.0%琼脂糖凝胶电泳实验检测碳酸钙微球对质粒 pEGFP-C1 的负载情况,图5是PCa微球负载pEGFP-C1电泳结果。从图5中可以看出,被PCa微球负载的DNA不能够在胶中的正确位置出现,反被堵在初始的胶孔处。该电泳实验证实PCa微球能够有效地负载质粒DNA,为其作为一种基因载体提供依据。



图5 PCa-PEI-pEGFP-C1 和裸 pEGFP-C1 的1%琼脂糖凝胶电泳

2.5 体外细胞转染实验

质粒 pEGFP-C1 可表达绿色荧光蛋白 GFP。图6为碳酸钙微球PCa经表面修饰后携带质粒 pEGFP-C1 转染正常细胞 QSG-7701、293a 及癌细胞 Hep3B、h1299 和 HeLa 5种细胞在不同时间梯度下的荧光结果。

从图6中可以看出,PCa-PEI-pEGFP-C1颗粒混悬液在肝正常细胞 QSG-7701 中的转染效率非常低,在293a中任何转染的效率都较高。这也就间接说明携带基因的PCa微球到达正常细胞的数量较少或在正常细胞内几乎不表达。而对于3种癌细胞的转染效率,随着时间梯度的增加,碳酸钙微球PCa混悬液对其转染效率都逐渐有所提高,且在72 h时仍可见到强度很大的荧光。结果可见PCa微球的转染具有时间依赖性。此外,图6中3种癌细胞荧光转染效果相比,HeLa癌细胞中荧光的表达量较高。

因此,碳酸钙微球具有作为一种基因传递载体使用的可能性,可将其携带抗癌基因,突显出其应用于癌症基因治疗领域的潜力。

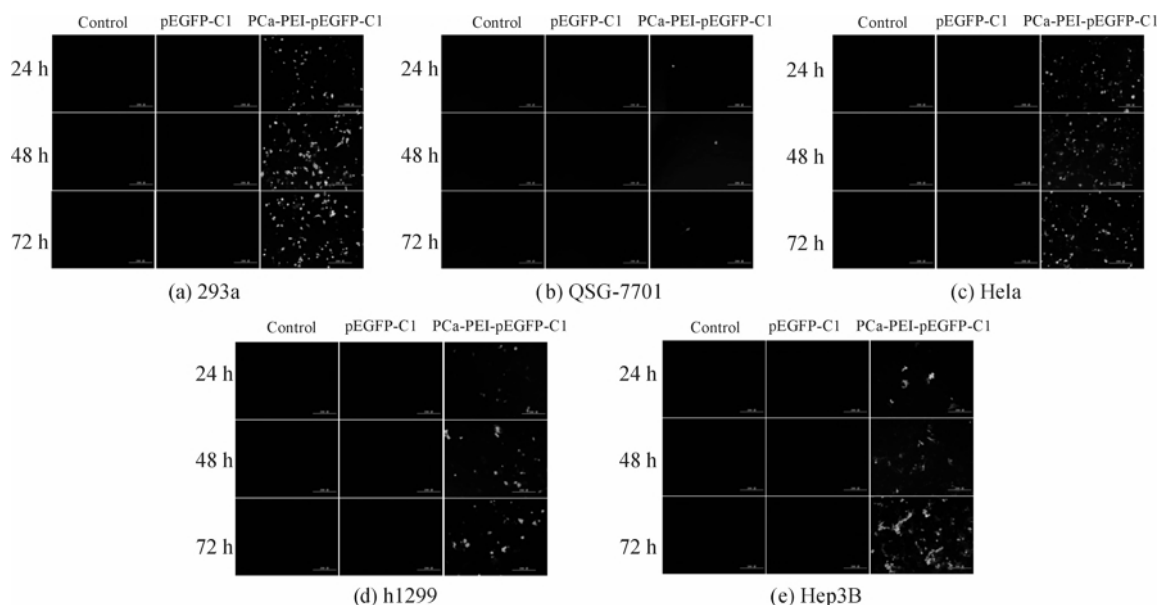


图 6 荧光显微镜检测 PCa-PEI-pEGFP-C1 转染的荧光

但同时可见,在所有癌细胞中的转染效率都不是太高,导致这种情况发生的可能原因是:颗粒与基因混悬液本身进入细胞的数量就较少或转染进入细胞的颗粒混悬液大部分都被溶酶体分解,因此导致荧光蛋白的表达量较低。因此,未来可致力于研究如何提高碳酸钙载体携带基因的转染效率这一问题。

此外,除转染以上细胞外,还对其他细胞进行了细胞转染,如 MCF-7, Bel-7404, U251, Huh-7 等细胞株,结果发现只有上皮来源的细胞株才有较明显的荧光发生。其余几乎不发生转染。因此推论经 PEI 表面修饰的碳酸钙微球对各种细胞可能具有转染选择性,但其转染机理还需进行深入研究。

3 结 论

利用 PSS 作为调控剂成功合成出球形的碳酸钙微粒,并采用 FE-SEM、XRD、FTR 和 DLS 对 PCa 微球进行了表征。制备出的碳酸钙微球平均粒径约为 510 nm,分散性良好,粒径分布较均一,表面粗糙度较大且合成工艺稳定。

通过研究在不同 pH 值条件下碳酸钙微球的降解情况,实验结果显示该 PCa 微球在酸性 pH 下能够更快速地降解,具有 pH 依赖特性。这为碳酸钙微球作为一种基因传递载体并能够在酸性环境中有效地释放携带基因这一理论基础提供依据。不同浓度 PCa 微球的生物相容性实验结果显示在一定浓度范围内该碳酸钙微球毒性较低,说明该微球具有良好的生物相容特性。而碳酸钙微球与质粒 DNA

的负载和体外细胞转染实验的结果也证实经表面修饰的 CaCO_3 微球(PCa)能够成功携带 pEGFP-C1 基因并将其传递至细胞内,这为将碳酸钙微球作为一种安全的基因治疗载体提供依据。

参考文献:

- [1] Atkinson H, Chalmers R. Delivering the goods: viral and non-viral gene therapy systems and the inherent limits on cargo DNA and internal sequences[J]. *Genetica*, 2010, 138(5): 485-498.
- [2] Bainbridge J W, Smith A J, Barker S S, et al. Effect of gene therapy on visual function in leber's congenital amaurosis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358(21): 2231-2239.
- [3] Al-Dosari M S, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress[J]. *The AAPS Journal*, 2009, 11(4): 671-681.
- [4] Phillips J E, Gersbach C A, García A J. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(2): 211-229.
- [5] Daya S, Berns K I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(4): 583-593.
- [6] Mohyeldin A, Chiocca E A. Gene and viral therapy for glioblastoma: a review of clinical trials and future directions[J]. *The Cancer Journal*, 2012, 18(1): 82-88.
- [7] Gao S, Chen J, Dong L, et al. Targeting delivery of oligonucleotide and plasmid DNA to hepatocyte via galactosylated chitosan vector[J]. *European Journal of Pharmacology and Biopharmaceutics*, 2005, 60(3): 327-

- 334.
- [8] Chowdhury E, Maruyama A, Kano A, et al. Ph-sensing nano-crystals of carbonate apatite: effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells[J]. *Gene*, 2006, 376(1): 87-94.
- [9] Wong S Y, Pelet J M, Putnam D. Polymer systems for gene delivery: past, present, and future[J]. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32(8): 799-837.
- [10] Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(6): 674-679.
- [11] Uskoković V, Uskoković D P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2011, 96(1): 152-191.
- [12] Li Z Z, Wen L X, Shao L, et al. Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control[J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 98(2): 245-254.
- [13] Zhang Y, Ma P, Wang Y, et al. Biocompatibility of porous spherical calcium carbonate microparticles on hela cells[J]. *World*, 2012, 2: 25-31.
- [14] Schmidt S, Volodkin D. Microparticulate biomolecules by mild CaCO_3 templating[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(9): 1210-1218.
- [15] Volodkin D V, Petrov A I, Prevot M, et al. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation[J]. *Langmuir*, 2004, 20(8): 3398-3406.
- [16] Wu X, Ding D, Jiang H, et al. Transfection using hydroxyapatite nanoparticles in the inner ear via an intact round window membrane in chinchilla[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, 14(1): 1-13.

Study on Synthesis and Modification of Calcium Carbonate Microparticles as Gene Carrier

HAN Hua-feng^a, YANG Wei^a, CHEN Fei-fei^a, LI Ze-hao^a, KONG Xiang-dong

(a. School of Life Sciences; b. Institute of Biomaterials and Marine Biological Resources, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This study uses sodium polystyrene sulfonate (PSS) as regulating agent, adds it to the reaction system of calcium chloride and sodium carbonate solution, successfully prepares calcium carbonate microparticles with rough surface (average particle size is about 510 nm) and uses field emission scanning electron microscope (FE-SEM), infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and dynamic light scattering (DLS) to characterize calcium carbonate microparticles. MTT experiment shows that the toxicity of calcium carbonate microparticles has concentration dependency. When final concentration <1 mg/mL, cell survival rate can be more than 60%. It shows a very low cytotoxicity and good biocompatibility. The result of degradation experiment of calcium carbonate microparticles under different conditions of pH value shows that calcium carbonate microparticles can degrade more rapidly under acid pH, indicating that calcium carbonate microparticles can respond to acid pH value and have pH dependency. Calcium carbonate microparticles are used to load plasmid DNA after PEI surface modification. The result of agarose gel electrophoresis and transfection in vitro proves that calcium carbonate microparticles can load plasmid DNA effectively and express and emit green fluorescence successfully in cancer cell. These research results show that the use of calcium carbonate microparticles in the field of gene therapy as a safe non-viral gene carrier has potential application value.

Key words: calcium carbonate microparticles; surface modification; gene delivery carrier; gene therapy

(责任编辑: 许惠儿)