

新型聚乙烯亚胺衍生物在 Hep G2 细胞中转染和毒性的研究 *

王 菲 吕 楠 张奇昕 苏 靖[△]

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的:研究以对苯二甲醛(Terephthalaldehyde)为连接剂的聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)衍生物 PEI-Tp 对肝癌细胞 Hep G2 的转染活性和细胞毒性的影响。方法:以荧光素酶质粒作为报告基因,研究高分子和 DNA 的复合物在 Hep G2 细胞中的转染活性,用 MTT 的方法研究高分子对 Hep G2 细胞的毒性。结果:Hep G2 细胞转染结果显示构建的聚乙烯亚胺衍生物 PEI-Tp 具有高效输送质粒的能力,细胞毒性结果显示 PEI-Tp 随着浓度的增加,其毒性显著低于 PEI25 kDa。结论:Hep G2 细胞实验数据显示 PEI-Tp 是一种高效、低毒,在基因治疗领域有相当前景的非病毒载体。

关键词 聚乙烯亚胺衍生物 Hep G2 细胞 转染 细胞毒性

中图分类号 R971 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)22-4205-03

Transfection and Cytotoxicity Studies of Novel Polyethyleneimine Derivative in Hep G2 cells*

WANG Fei, LV Nan, ZHANG Qi-xin, SU Jing[△]

(School of Pharmacy Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the transfection efficiency and cell cytotoxicity of Polyethyleneimine (PEI) derivative linking with Terephthalaldehyde. **Methods:** Luciferase plasmid was used as the reporter gene to investigate transfection efficiency in Hep G2 cells. Cytotoxicity was detected by MTT method. **Results:** Hep G2 cells transfection and cytotoxicity results suggested that the gene carrier (PEI-Tp) expressed equal transfection efficiency with PEI 25kDa and Lipofectamine 2000, and had less cytotoxicity than that of PEI 25kDa. **Conclusion:** PEI-Tp could be a highly efficient and less toxic gene carrier which was promising in gene therapy.

Key words: Polyethyleneimine; Hep G2 cells; Transfection; Cytotoxicity

Chinese Library Classification(CLC): R971 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)22-4205-03

前言

基因治疗是指将可以产生特异性蛋白的基因插入病人细胞来纠正遗传缺损或治疗后天性疾病,包括癌症、艾滋病、糖尿病等,是近二十年来兴起的新型治疗方法,有很好的发展前景^[1]。在基因治疗过程中,最主要的瓶颈之一就是基因物质的安全、有效输送。基因输送的载体中,聚阳离子非病毒载体和病毒及脂质体载体相比具有无传染性、基因担载密度和担载量大、化学结构可控制、性质稳定和可大量制备等优点而引起广泛重视,但是聚阳离子载体本身仍存在着转染活性低、细胞毒性大的问题^[2-4]。本研究以对苯二甲醛连接低分子量的聚乙烯亚胺(PEI),构建了一种新型聚乙烯亚胺衍生物,将其命名为 PEI-Tp。进一步检测 PEI-Tp 在 Hep G2 细胞中的转染活性和细胞毒性,实验结果显示,PEI-Tp 具有很高的转染效率和较低的细胞毒性。希望我们的研究能为该载体应用于基因治疗提供初步的研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

胎牛血清(德国 PAA 公司),DMEM 培养基(德国 PAA 公司),Micro BCA 蛋白浓度试剂盒(美国 Thermo 公司),荧光素酶试剂盒(美国 Promega 公司),酶标仪(美国 Thermo 公司),TC2323-2E CO₂ 培养箱 (Sheldon manufacturing),48 孔和 96 孔板(美国 Corning 公司),DMSO (美国 Sigma-Aldrich 公司),Lipofectamine2000 (美国 Invitrogen 公司),Hep G2 细胞(中科院上海生命科学院细胞资源中心)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 PEI-Tp 在 HepG2 细胞中转染活性的研究 向 48 孔板中加入浓度为每毫升 $5 \sim 10 \times 10^4$ 个 HepG2 细胞的悬浮液,每孔 0.5mL,置于 37℃ 下 CO₂ 培养箱培养过夜。转染时,每孔加入荧光素酶质粒 DNA 为 500ng,高分子按照设计质量比稀释成所需的比例,阳性对照采用 PEI 25kDa 和 Lipofectamine2000。高分子溶液在转染前和 DNA 溶液在室温下孵育 20min。在此过程中,取出 48 孔板,移除还有血清的培养基,用 PBS 洗两遍,然后每孔加入 250 μ L 的无血清 DMEM 高糖培养基。待高分子和 DNA 的复合物加入后,在 37℃ 培养 4h,然后除去无血清 DMEM 培养基,再次给每孔加入 0.5mL 的含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基,细胞培养 48h 后,用发光计检测转染活性。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81001416)

作者简介:王菲(1987-)女,硕士研究生,主要研究方向:非病毒载体的基因输送

[△]通讯作者:苏靖,电话: +86(21) 3420-5072, E-mail: jingsu@sjtu.edu.cn

(收稿日期: 2012-01-27 接受日期: 2012-02-23)

此外为了消除细胞生长状况不同对结果的影响,采用 Micro BCA 法定测定蛋白总量。最后转染效率用单位质量蛋白的发光强度(RLU/mg Protein)表示。

1.2.2 PEI-Tp 在 HepG2 细胞中的毒性的研究 实验前 24 小时将浓度为每毫升 $5 \sim 10 \times 10^4$ 个 HepG2 细胞的细胞悬浮液加入到 96 孔板中,每孔 100 μL 。将高分子溶液用无酚红的 DMEM 培养基稀释成不同的浓度梯度并加入到 96 孔板中,阳性对照组 PEI 25kDa 稀释为与待测样品组相同的浓度梯度。测定时,移除含有血清的培养基,用 PBS 洗 2 遍,然后加入 100 μL 预先配好的高分子溶液,对照组加入不含高分子的培养基。继续培养 4h,移除含有高分子的培养基,加入 100 μL 无酚红培养基,同时加入 25 μL MTT 溶液(5mg/mL)。继续培养 6h,有紫色甲瓞形成,然后每孔加入 150 μL 的 DMSO,在 20min 内用酶标仪测定在 490nm 的 OD 值。以样品组和对照组 OD 值的比值来表示细胞的生存状况。

2 结果

2.1 PEI-Tp 在 HepG2 细胞中的转染活性

如图 1 中所示,随着 PEI-Tp 对 DNA 质量比的增加,转染效率也随之增加,在质量比在 50-100 的范围内,有比阳性对照 PEI 25kDa 更高的转染效率,在质量比在 30-100 的范围内,PEI-Tp 均有高于 Lipofectamine2000 的基因表达。

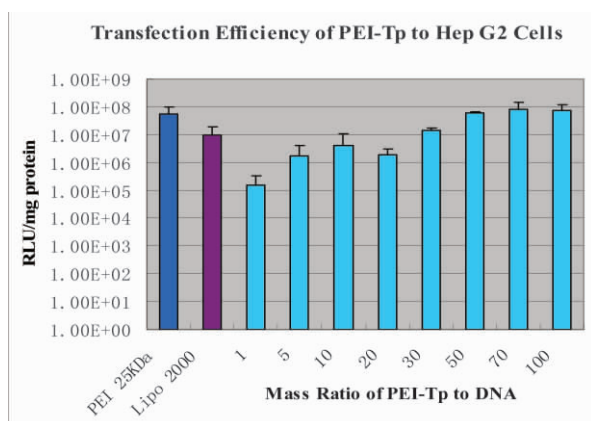


图 1 PEI-Tp 在 Hep G2 细胞中的转染结果

Fig.1 Transfection results of PEI-Tp to Hep G2 cells

2.2 PEI-Tp 在 HepG2 中的细胞毒性

如图 2 中所示,在低分子浓度为 1-100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,PEI-Tp 的毒性始终低于 PEI 25kDa。浓度从 1-50 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,PEI-Tp 的细胞存活率均在 85% 以上。浓度高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 后,PEI-Tp 的细胞存活率有所下降,但是其毒性仍显著低于 PEI 25kDa。

3 讨论

实现遗传物质(DNA / RNA)本身作为药物的基因治疗,高效低毒的输送载体的缺位是首要技术障碍。当前研究的基因载体主要分为病毒载体和非病毒载体。其中,病毒载体的转染效率高,但是却一直存在着安全隐患。而在各种非病毒载体中,聚阳离子与脂质体相比具有基因担载密度和担载量大、便于化学修饰、易于制备等优点,但是同时也面临着转染效率低和毒

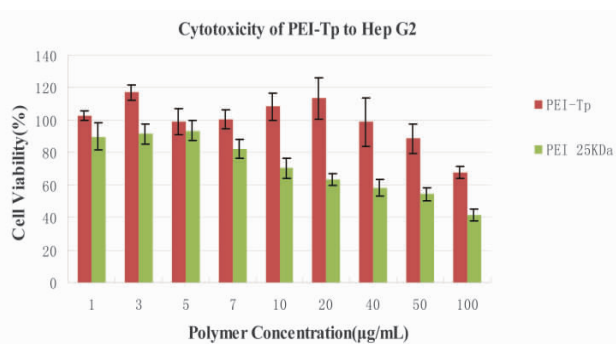


图 2 PEI-Tp 对 Hep G2 的细胞毒性结果

Fig.2 Cytotoxicity result of PEI-Tp to Hep G2 cells

性高两大难题。构建低毒性和高转染活性的聚阳离子成为近年来基因治疗药物输送领域研究的热点。聚乙烯亚胺(PEI)是迄今为止研究得最多的聚阳离子基因载体,常作为聚阳离子基因载体的参考标准^[5-8]。分子量低于 1.8 kDa 的 PEI 几乎没有转染效果,然而随着分子量的增高,聚乙烯亚胺复合物的转染效率提高,同时其细胞毒性也在增加^[9-11]。为了解决其转染效率和毒性之间的矛盾,我们用可降解的基团连接小分子 PEI 800 合成了高效、低毒的基因载体(PEI-Tp)。实验结果显示,PEI-Tp 的转染活性能够达到甚至高于阳性对照 PEI 25kDa 和市售转染试剂 Lipofectamine 2000。高的转染效率可能与 PEI-Tp 具有更强的 DNA 复合能力,以及更容易从溶酶体中逃逸有关^[12]。细胞毒性实验结果证实,在质量比为 1-100 的范围内,PEI-Tp 的细胞存活率较高,细胞毒性显著低于 PEI 25kDa。PEI-Tp 较低的毒性可能与连接剂的选择形成的碳氮双键结构有关,碳氮双键能够在酸性环境下降解产生低毒的小分子 PEI。

4 结论

本研究以对苯二甲醛连接低分子量的聚乙烯亚胺(PEI),构建了一种新型的聚乙烯亚胺衍生物 PEI-Tp。Hep G2 细胞的转染和毒性数据显示,PEI-Tp 可成为一种毒性低,转染效率高的非病毒基因输送载体。为避免 PEI 类聚阳离子与体内细胞表面负电荷结合产生聚集,我们下一步的研究将侧重于屏蔽 PEI-Tp 表面的正电荷(PEG 化降低表面正电荷^[13,14]),以及通过表面修饰来提高其体内转染效率及其组织器官的靶向性^[15-17]。此外 PEI-Tp 也可以用于 siRNA 或者 miRNA 的输送^[18-20],用于探索基因功能和传染性疾疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。

参考文献(References)

- [1] Chuah MK. Cutting through the obstacles and resurrecting the promise of gene therapy [J]. IDrugs, 2005, 8(10):818-821
- [2] Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery [J]. Chem. Rev, 2009, 109: 259-302
- [3] Kaneda Y. Gene therapy: current status and promise [J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2001, 117(4):299-306
- [4] Luten J, Van Nostruin CF, De Smedt SC, et al. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmids DNA delivery [J]. J Control release, 2008, 126:97-110
- [5] Xu S.L, Chen M.Y, Yao Y, et al. Novelpoly (ethyleneimine) biscarbamate conjugate as an efficient and nontoxic gene delivery system [J]. J

- Control Release, 2008, 130(1):64-68
- [6] T.F.Yang, W.Chin, J.Cherng, et al. Synthesis of novel biodegradable cationic polymer: N,N-diethyl ethylene diamine polyurethane as a gene carrier [J]. Biomacromolecules, 2004, 5(5):1926-1932
- [7] Y.H.Kim, J.H.Park, M.Lee. Polyethylenimine with acid-labile linkages as a biodegradable gene carrier [J]. J Control Release, 2005, 103(1): 209-219
- [8] Boussif, O. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(16): 7297-7301
- [9] Godbey W, Wu K, Mikos A. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethylenimine) as a gene delivery vehicle [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45(3):268-275
- [10] Ahn CH, Chae SY, BaeYH, et al. Biodegradable poly (ethylenimine) for plasmid DNA delivery [J]. J Control Release, 2002, 80 (1-3): 273-282
- [11] Kircheis R, Wightman L, Wagner E, et al. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 53:341-358
- [12] Akinc A, Thomas M, Klubanov A, et al. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis [J]. J Gene Med, 2005, 7(5):657-663
- [13] Chollet P, Favrot M, Hurbin A, et al. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes [J]. J Gene Med, 2002, 4(1):84-91
- [14] Katayose S, Kataoka K. Water-soluble polycation complex associates of DNA and Poly (ethyleneglycol)-poly (L-lysine) block copolymer [J]. Bioconjug Chem, 1997, 8(5):702-707
- [15] 徐松琳, 金拓. 新型聚乙烯亚胺衍生物体内转染活性的研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8 (12):2242-2243
Xu Song-lin, Jin Tuo. Transfection activity of a novel polyethylenimine derivative in vivo [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8 (12):2242-2243 (In Chinese)
- [16] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticles-based gene delivery [J]. Gene Ther, 2006, 13(4):283-287
- [17] Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospect: non-viral gene therapy by systemic delivery [J]. Gene Ther, 2006, 13(18):1313-1319
- [18] Fire AZ. Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture) [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46:6966-6984
- [19] JereD, KimJE, AroteR, et al. Akt1 silencing efficiencies in lung cancer cells by sh/siRNA transfection using a reductable Polyspermine carrier [J]. J Control Release, 2008, 126:97-110
- [20] 陈默颖, 何沐, 杜子秀, 等. 新型 PEI 衍生物对基因沉默作用的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9 (7):1260-1264
Chen Mo-ying, He Mu, Du Zi-xiu, et al. Effect of a novel PEI derivative on the Gene Silencing [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(7):1260-1264

• 重要信息 •

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。