

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.008

## 新型可降解 PEI 衍生物的特征及其在 Brl-3A 细胞中的毒性和转染研究 \*

张奇昕 原明璐 陈 顺 袁伟恩<sup>△</sup>

(上海交通大学药学院 上海 200240)

**摘要 目的:**对新型可降解高分子进行表征,研究其在 Brl-3A 细胞中的毒性和转染效率,以及连接剂比例对以上方面的影响。**方法:**通过化学方法合成不同比例 PEI-Tr 高分子,考察其包裹质粒 DNA 形成纳米颗粒的粒径和电位,以 CCK-8 方法考察 Brl-3A 细胞中的细胞毒性,以荧光素酶质粒为报告基因考察 Brl-3A 细胞中的转染效率。**结果:**PEI-Tr 材料能形成 200 nm 以下带 20 mV 左右正电荷的纳米颗粒,具有较好的细胞内吞能力和溶液稳定性,细胞毒性实验证明,随着浓度增加 PEI-Tr 材料显示了远低于 PEI-25kDa 的细胞毒性,细胞转染实验表明其拥有高效输送质粒的能力。**结论:**PEI-Tr 是一种高效低毒的可降解聚阳离子载体,在基因输送领域有很大的潜力;连接剂的比例在聚阳离子功能中起到重要作用。

**关键词:** 基因载体;PEI 衍生物;细胞毒性;转染效率;比例

**中图分类号:** R944.2; R742.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)31-6032-03

## Characterizations of Novel Degradable Polyethyleneimine Derivatives and Transfection and Cytotoxicity Studies on Brl-3A \*

ZHANG Qi-xin, YUAN Ming-lu, CHEN Shun, YUAN Wei-en<sup>△</sup>

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

**ABSTRACT Objective:** To characterize a novel biodegradable polymer, investigate its cell cytotoxicity and gene transfection efficiency, and the influence of linker's ratio. **Methods:** PEI-Tr series were synthesized, and the particle size and Zeta potential of polymer-DNA nanoparticles were estimated, then, cell cytotoxicity and transfection efficiency were tested. **Results:** PEI-Tr could form nanoparticles under 200 nm, and its Zeta potential was about 20 mV, which indicated that it had a good cell endocytosis capability and stability. The Brl-3A cytotoxicity and transfection results suggested that PEI-Tr had a high plasmid transfection ability within low cell toxicity. **Conclusion:** PEI-Tr is a promising, efficient and low-toxic gene carrier, and the linker ratio is an important factor in carrier design.

**Key words:** General carrier; PEI derivative; Cytotoxicity; Transfection; Ratio

**Chinese Library Classification(CLC):** R944.2; R742.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)31-6032-03

### 前言

基因治疗是指“将遗传物质作为治疗药物,通过对其进行一定的修饰,针对活细胞进行治疗。这种治疗主要是将治疗基因通过一定的方式输送的靶细胞,改变其基因表达,起到纠正基因缺陷的作用从而完成治疗”<sup>[1,2]</sup>。自 RNA 的干扰现象以来,基因与 RNA 治疗研究在国际范围内获得了生物学界、药学界的广泛关注与研究,其相关的技术也获得了长足的进步,并被成功应用于多种疾病的治疗之中<sup>[3,4]</sup>。

伴随着研究的进行,治疗基因及治疗 siRNA 诸如多靶和脱靶的问题得到了很好的解决,其自身的稳定性问题也得到了很大的改善<sup>[5,7]</sup>,因此,当前困扰基因药物大规模出现的主要瓶颈为研发高效安全的通用基因输送载体。病毒载体在免疫原性、基因担载量以及安全性方面有诸多的缺陷<sup>[8-10]</sup>。而非病毒载

体能够担载更多的治疗基因,免疫原性也比较小,更大的优点是能够人工合成有利于大规模工业化生产,它的缺点在于基因输送效率比较低,细胞毒性较大,其中以 PEI-25kDa 为代表的聚阳离子由于其成熟的内吞逃逸机制受到了广泛的关注<sup>[11,12]</sup>。

小分子量的 PEI-800Da 毒性小,但是没有转染活性<sup>[13]</sup>。我们通过采用不同比例的连接剂双(三氯甲基)碳酸酯将其连接成较高分子量的 PEI 衍生物 PEI-Tr 系列,进而考察其转染和细胞毒性。这种连接剂和 PEI-800Da 反应分别可形成脲键结构,理论上都可以通过体内降解使恢复到初始状态 PEI-800Da。我们检验了高分子 - 基因纳米颗粒的物化特征,考察了其对于 Brl-3A 细胞毒性和转染能力,并验证了连接剂比例不同对高分子性质的影响。

### 1 材料与方法

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373366)

作者简介:张奇昕(1989-),男,硕士研究生,研究方向:基因输送

△ 通讯作者:袁伟恩, E-mail: yuanweien@126.com

(收稿日期:2014-03-12 接受日期:2014-04-09)

## 1.1 仪器与试剂

PEI-800Da (sigma 公司), 双(三氯甲基)碳酸酯(sigma 公司), Brl-3A 细胞(中科院细胞所), PEI-25kDa (sigma 公司), 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), 酶标仪(美国 Thermo 公司), 荧光素酶试剂盒(美国 Promega 公司), 48 孔和 96 孔板(美国 Corning 公司), 粒径电位仪(美国 Brookhaven 公司), CCK-8(日本 Dojindo 公司)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 PEI-Tr 系列材料纳米颗粒的物化特征比较研究** 用精密天平称取一定量的高分子聚合物, 用超纯水配成 2 mg/mL 的溶液, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌滤膜过滤, 将 GFP 质粒的浓度稀释成 2 mg/mL, 在根据实验需要配置不同质量比的复合物溶液, 置于室温下静置孵育 30 分钟, 从而获得一系列不同质量比的高分子-DNA 复合物, 按照实验设计的质量比将稀释后的高分子溶液加入质粒溶液, 多次吹打使其混合均匀, 之后在室温下孵育 30 分钟后, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤去灰尘等后检测, 每个样品测定 3 次, 取平均值作图。

**1.2.2 PEI-Tr 系列材料在 Brl-3A 细胞中的细胞毒性比较研究** 首先进行细胞转板, 将 Brl-3A 细胞消化, 稀释成细胞密度为  $5-10 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液, 在 96 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 培养过夜。再将 2 mg/mL 的高分子的无酚红 DMEM 溶液分别稀释成不同的浓度梯度, 终体积为 100  $\mu\text{L}$ , 阳性对照组 PEI-25kDa 也稀释为与高分子组一致的浓度梯度。取出 96 孔板后, 移除有血清的培养基, 用 100  $\mu\text{L}$  的 PBS 洗一遍, 然后把之前配好的高分子 DMEM 溶液加到各个细胞孔中, 阴性对照组中加入 100  $\mu\text{L}$  无血清无酚红 DMEM。4 小时之后, 向每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 于培养箱中 2 小时后用酶标仪检测吸光度, 检测波长为 450 nm 和 600 nm, 通过样品组的在此波长的吸收值和空白对照组做比值, 从而得到细胞的成活率。

**1.2.3 PEI-Tr 系列材料在 Brl-3A 细胞中的转染活性比较研究** 首先向 48 孔板中每孔转入 0.5 mL 细胞密度在  $5-10 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液, 待培养过夜。48 孔板转染时, 每孔中质粒量固定为 500 ng, 每个浓度比需做 3 个复孔, 每个复孔的体积为 25  $\mu\text{L}$ , 浓度为 20 ng/ $\mu\text{L}$ , 将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。高分子溶液在转染前和 DNA 溶液在室温下复合, 并静置孵育 30 分钟。静置时, 拿出细胞板, 除去有血清培养基, 用 200  $\mu\text{L}$  PBS 洗一遍, 换入 250  $\mu\text{L}$  无血清培养基(质粒终浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。将复合好的复合物按顺序依次加入到细胞中。于细胞培养箱培养 4 小时后, 吸去无血清培养基, 每孔加入有血清培养基 500  $\mu\text{L}$ , 培养 48 小时后, 用荧光计数器检测转染结果。为了消除细胞生长状况的不同以及转板不均匀带来的误差, 本实验采用 Micro BCA 法测定裂解液中的蛋白总量。细胞实验转染效率用每毫克总蛋白中的荧光光强(RLU/mg protein)来评价。

## 2 结果

### 2.1 PEI-Tr 系列材料纳米颗粒的物化特征

复合物的粒径是影响复合物被细胞内吞的重要因素之一, 一般情况下, 内涵体能够内吞的纳米微粒直径需在 200 nm 以

下。从实验结果看 PEI-Tr-1.5 初始粒径较大, 但是在 3:1 及之后迅速降低, 最后降至 65 nm 左右。PEI-Tr-2 的粒径有一定波动, 最终维持在 80 nm。PEI-Tr-3 的粒径一直在 100 nm 左右浮动缓慢降低, 最后在 75 nm。三者最终都能形成粒径较小的纳米颗粒, 但彼此的趋势有明显不同。

Zeta 电位在维持高分子复合物在溶液中稳定存在这方面起着重要的作用, 在低质量比时, 由于 DNA 含量较高, 因此 Zeta 电位的正值较小甚至在 PEI-Tr-1.5 在 0.5:1 时甚至呈现负值, 然而随着高分子质量比的加大, Zeta 电位逐渐增大并稳定在一定的范围内, PEI-Tr-1.5 的电位稳定在 22 mV, PEI-Tr-2 和 PEI-Tr-3 的电位都稳定在 25 mV 左右。这显示出不同比例材料屏蔽表面负电荷能力的不同。

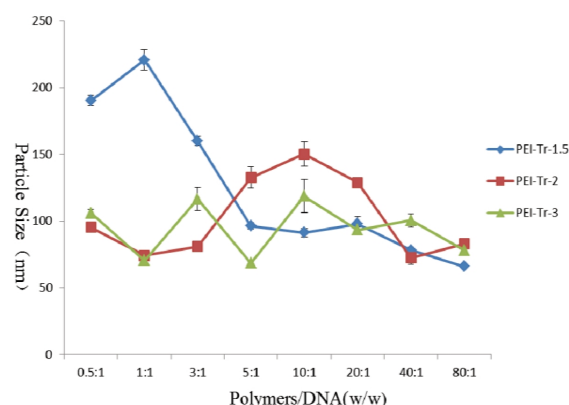


图 1 PEI-Tr 的粒径

Fig.1 Particle sizes of PEI-Tr series

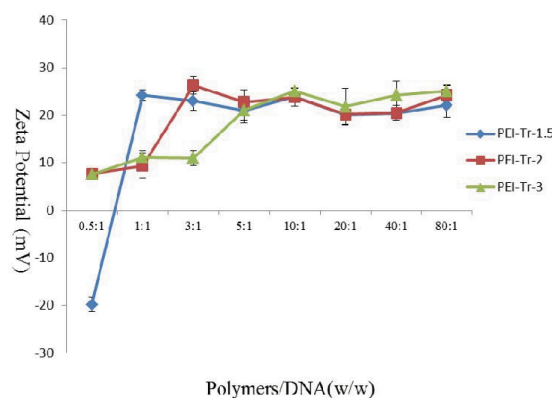


图 2 PEI-Tr 的 Zeta 电位

Fig.2 Zeta potentials of PEI-Tr series

### 2.2 PEI-Tr 系列材料纳米颗粒在 Brl-3A 细胞的细胞毒性

高分子对人体器官细胞毒性是影响能否在体内应用和应用程度的重要因素。4 种聚阳离子 PEI-Tr-1.5, PEI-Tr-2, PEI-Tr-3 和 PEI-25kDa 在 Brl-3A 细胞中的毒性如图所示, 实验结果三种合成的材料在所有浓度范围均显示出比 PEI-25kDa 更小的毒性。细胞存活率在 0.5-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内基本上都在 80 % 以上, 而 PEI-Tr-1.5 的细胞存活率明显优于另外两者。

### 2.3 PEI-Tr 系列材料纳米颗粒在 Brl-3A 细胞的转染活性

转染的结果如图所示, PEI-Tr 材料中, PEI-Tr-1.5 具有最高的转染活性, 在 20:1 和 30:1 的质量比转染活性达到最高, 50:1 时转染活性略有下降。

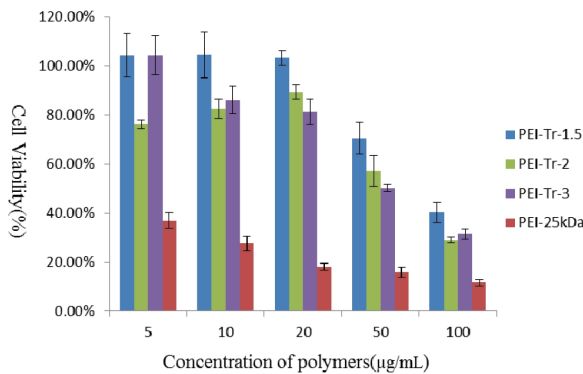


图3 PEI-Tr 在 Brl-3A 细胞中的毒性结果

Fig.3 Cytotoxicity results of PEI-Tr to Brl-3A cells

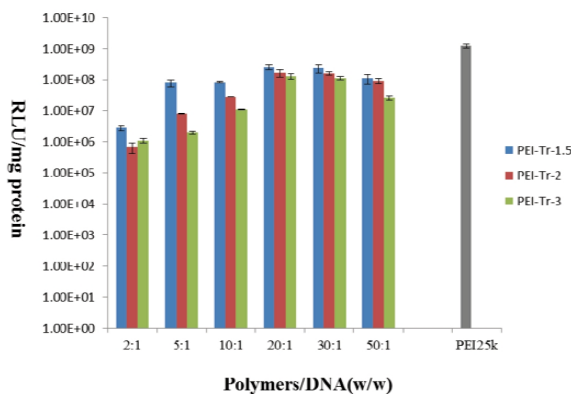


图4 PEI-Tr 在 Brl-3A 细胞中的转染结果

Fig.4 Transfection results of PEI-Tr to Brl-3A cells

### 3 讨论

目前,横亘在遗传物质(DNA/RNA)输送治疗研究大规模临床化最大的难题在于载体设计在高转染效率和低细胞毒性间难以两全<sup>[14,15]</sup>。现在使用较多的转染试剂 PEI-25kDa 就是典型的高效率高毒性试剂,结构中较高的氨基密度使其具有高基因输送效率,但无法自身降解及过高的正电荷的缺点又使其拥有过高的细胞毒性。与此相对,分子量低于 1.8 kDa 的低毒 PEI 又几乎没有转染活性<sup>[16,17]</sup>。为了解决这个矛盾,我们用脲键连接小分子 PEI-800Da 合成了 PEI-Tr 系列可降解聚阳离子高分子,根据我们的设想,这一高分子拥有较高的氨基密度以保证其拥有较好的遗传物质包裹及运输效率,而可降解的脲键保证其在体内可以代谢为低毒的小分子从而降低毒性,并考察了不同连接剂比例对聚阳离子性质的影响。

实验结果显示,PEI-Tr 系列材料能包裹 DNA 形成粒径在 200 nm 以内的纳米颗粒,适合细胞内吞<sup>[18,19]</sup>。该纳米颗粒在溶液中带有约 20 mV 的正电荷,能够维持自身的稳定性。在 Brl-3A 细胞中,该材料显示了较低的细胞毒性,在 5-20 µg/mL 浓度范围内的细胞存活率在 80 %以上,在 50 µg/mL 的高浓度下细胞存活率有一定下降,但仍然明显高于阳性对照组,这显示其可降解的特点可以明显降低毒性。从转染实验的结果来看,PEI-Tr 系列材料在质量比 20:1 和 30:1 能取得较好的转染效果,其较高的基因转染效率主要有利于高 DNA 复合能力和溶酶体逃逸能力强,但可能由于聚合物分子量相对较低,氨基密度较小,阳离子浓度不够<sup>[20]</sup>,所以相比阳性对照 PEI-25kDa

仍有明显的差距,相差近一个数量级。

实验结果显示,通过脲键连接小分子 PEI-800Da 形成的聚阳离子载体能够初步实现高转染效率和低细胞毒性的两全,具有很大的潜力。今后的研究还可以对其结构进行优化,增加氨基密度,提升其转染效率,对其进行表面修饰增强对组织器官的靶向性以及用于 siRNA 及 miRNA 的输送等。

此外,实验结果同时揭示了连接剂比例在聚阳离子载体的设计与合成中的重要影响,三种不同比例的 PEI-Tr 系列材料在粒径、电位、细胞毒性和转染效率上都显示出了明显的区别,其中以 PEI-Tr-1.5 的综合结果更为优秀,显示了更低的细胞毒性和更高的转染效果。这说明连接剂的用量和比例对聚阳离子载体的复合以及基因输送能力均有明显的影响,必须成为今后相关载体设计中的考虑因素之一。

### 参考文献(References)

- [1] Mulligan, R.C. The basic science of gene therapy. [J] Science, 1993, 260: 926-932
- [2] Cristiano RJ, Xu B, Nguyen D, et al. Viral and nonviral gene delivery vectors for cancer gene therapy [J]. Cancer Detect Prev, 1998, 225: 445-454
- [3] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. nature, 1998, 391(6669): 806-811
- [4] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. nature, 2001, 411(6836): 494-498
- [5] Baker M. RNA interference: Homing in on delivery [J]. Nature, 2010, 464(7292): 1225-1228
- [6] Whitehead K A, Langer R, Anderson D G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery [J]. Nature reviews Drug discovery, 2009, 8(2): 129-138
- [7] Carmen Alvarez-Lorenzo, Rafael Barreiro-Iglesias, Angel Concheiro, et al. Biophysical characterization of complexation of DNA with block copolymers of poly(2-dimethylaminoethyl) methacrylate, poly(ethylene oxide), and poly(propylene oxide) [J]. Langmuir, 2005, 21: 5142-5148
- [8] Bartel M A, Weinstein J R, Schaffer D V. Directed evolution of novel adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery [J]. Gene therapy, 2012, 19(6): 694-700
- [9] Tomanin R, Scarpa M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction [J]. Current gene therapy, 2004, 4(4): 357-372
- [10] Hester M E, Foust K D, Kaspar R W, et al. AAV as a gene transfer vector for the treatment of neurological disorders: novel treatment thoughts for ALS [J]. Current gene therapy, 2009, 9(5): 428-433
- [11] Putnam D. Polymers for gene delivery across length scales [J]. Nature materials, 2006, 5(6): 439-451
- [12] Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, et al. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer [J]. Biomaterials, 2008, 29(24): 3477-3496
- [13] Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors [J]. Gene therapy, 2002, 9(24): 1647-1652

(下转第 6106 页)

细胞外基质发生了改变,在肿瘤边缘激活其抗黏附作用促进肿瘤的浸润和转移。在乳腺癌的研究中发现癌巢边缘的 TNC 高表达预示高转移性,TNC 对有无转移和生存率的评估作用更优于肿瘤大小和分级<sup>[15]</sup>。肿瘤细胞质 TNC 阳性表达提示患者预后不良,在有浸润的肿瘤中 TNC 阳性表达是肿瘤局部复发的重要标志<sup>[16]</sup>。在我们的研究中同样发现癌巢边缘 TNC 的表达强度高于癌巢中心,提示在 NSCLC 组织内 TNC 的高表达可能参与肺癌细胞的转移。根据本文和以上研究资料,我们推测 TNC 的表达与 NSCLC 的发生和恶性转化演进有关,其高表达提示 NSCLC 的高转移性影响患者预后。

综上所述,NSCLC 组织 TNC 的高表达可能导致术后肿瘤的早期复发和转移,降低了患者远期生存时间。目前的基础研究提示,通过调节细胞因子、ECM、血管活性肽等多种因子下调 TNC 的表达,阻断肿瘤细胞的浸润和转移以达到肿瘤姑息或根治的目的,延长病人生存期。检测 TNC 在细胞、组织、体液中的蛋白含量变化,可望成为早期诊断肺癌预后的新指标。为初发和复发患者合理选择治疗方案帮助临床医生判断预后提供客观的依据。明确 TNC 蛋白在 NSCLC 中的表达是我们研究的第一步,对它的作用机制以及和其他蛋白的相互作用的研究还需要进一步探索。

#### 参考文献(References)

- [1] Maione P, Rossi A, Sacco PC, et al. Advances in chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer [J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(18): 2997-3007
- [2] 支修益,李辉,陈东红.早期非小细胞肺癌外科治疗进展[J].肿瘤研究与临床,2010,1(22): 2-6  
Zhi Xiu-yi, Li Hui, Chen Dong-hong. Surgical progress on early stage non-small cell lung cancer [J]. Cancer Research and Clinic, 2010, 1(22): 2-6
- [3] Kuriyama N, Duarte S, Hamada T, et al. Tenascin-C: a novel mediator of hepatic ischemia and reperfusion injury [J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2125-2136
- [4] Brunner A, Mayer IC, Tzankov A, et al. Prognostic significance of tenascin-C expression in superficial and invasive bladder cancer [J]. J Clin Pathol, 2004, 57(9): 927-931
- [5] 王昌惠.肺癌转移机制的研究进展[J].同济大学学报,2011,32(2): 1-4  
Wang Chang-hui. Recent advances in the mechanism of the metastasis of lung cancer [J]. Journal of Tongji University, 2011, 32(2): 1-4
- [6] Bennett JS, Berger BW, Billings PC, et al. The structure and function of platelet integrins. J Thromb Haemost, 2009, 7(1): 200-205
- [7] Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, et al. Advances in tenascin-C biology [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(19): 3175-3199
- [8] Peng Q, Zhuang S, Wang M, et al. Mechanical design of the third FnIII domain of tenascin-C [J]. J Mol Biol, 2009, 386(5): 1327-1342
- [9] Guttery DS, Shaw JA, Lloyd K, et al. Expression of tenascin-C and its isoforms in the breast [J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(4): 595-606
- [10] Sivasankaran B, Degen M, Ghaffari A, et al. Tenascin-C is a novel RBPJkappa-induced target gene for Notch signaling in gliomas [J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 458-465
- [11] Van Obberghen-Schilling E, Tucker RP, Saupe F, et al. Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth [J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(4-5): 511-525
- [12] Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, et al. Expression of phosphorylated Akt(pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy [J]. Gastric Cancer, 2007, 10(1): 45-51
- [13] 张奇兵,管旌旌,杨明,等. Tenascin-C 在乳腺导管原位癌的表达及其意义 [J]. 吉林医学, 2009, 30(5): 396-397  
Zhang Qi-bing, Guan Jing-jing, Yang Ming, et al. Expression of Tenascin-C in ductal carcinoma in situ of the breast and its clinical significance [J]. Jilin Medical Journal, 2009, 30(5): 396-397
- [14] 尹传昌,廖晓峰,陈雯,等. Tenascin-C 在人原发性肝细胞癌浸润、转移和血管生成中的作用 [J]. 华中科技大学学报, 2012, 41(3): 278-283  
Yin Chuan-chang, Liao Xiao-feng, Chen Wen, et al. Role of Tenascin-C in Invasion, Metastasis and Angiogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 2012, 41(3): 278-283
- [15] Jähkola T, Toivonen T, Von Smitten K, et al. Expression of tenascin in invasion border of early breast cancer correlates with higher risk of distant metastasis [J]. Int J Cancer, 1996, 69(6): 445-447
- [16] Pazzaglia L, Conti A, Chiechi A, et al. Differential gene expression in classic giant cell tumours of bone: Tenascin C as biological risk factor for local relapses and metastases [J]. Histopathology, 2010, 57(1): 59-72
- [17] Son S, Kim W J. Biodegradable nanoparticles modified by branched polyethylenimine for plasmid DNA delivery [J]. Biomaterials, 2010, 31(1): 133-143
- [18] Gao, K. & Huang, L. Nonviral methods for siRNA delivery [J]. Molecular pharmaceuticals, 6, 651-658 (2008)
- [19] Zhang J, Li X, Lou L, et al. Non-viral Gene Therapy [M]. Intracellular Delivery. Springer Netherlands, 2011: 599-699
- [20] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery [J]. Cell. Mol. Life Sci. 2009, 66: 2873-2896

(上接第 6034 页)

- [14] Nguyen J, Szoka F C. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? [J]. Accounts of Chemical Research, 2012, 45(7): 1153-1162
- [15] Ito T, Yoshihara C, Hamada K, et al. DNA/polyethylenimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice [J]. Biomaterials, 2010, 31(10): 2912-2918
- [16] Glover D J, Leyton D L, Moseley G W, et al. The efficiency of nuclear plasmid DNA delivery is a critical determinant of transgene expression at the single cell level [J]. The journal of gene medicine, 2010, 12(1): 77-85