

交联聚乙烯亚胺衍生物的构建及其转染 COS-7 细胞的研究 *

王玉强¹ 臧 怡² 蔡文玮¹ 陈 谊¹ 金 拓² 苏 靖^{2△} 盛 净^{1△}

(1 上海交通大学医学院附属第九人民医院老年科 上海 200011 2 上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的: 优化构建交联聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI) 衍生物 PEI-Bu, 研究其对非洲绿猴肾成纤维细胞系 (COS-7) 的转染活性和细胞毒性。方法: 以 PEI 800Da 为骨架, 1,4- 丁二醇二氯甲酸酯为连接剂制备聚合物 PEI-Bu, 琼脂糖凝胶电泳考察其复合质粒 DNA 的能力, MTT 法检测 PEI-Bu 对 COS-7 的毒性, 以荧光素酶质粒作为报告基因, 测定 PEI-Bu/DNA 复合物在 COS-7 细胞的转染活性。结果: 凝胶电泳表明 PEI-Bu/DNA 在质量比大于 1 时即具有复合 DNA 的能力, PEI-Bu 的细胞毒性随浓度增大而增大, 在同一浓度下 PEI-Bu 的细胞毒性小于 PEI 25kDa, ($P < 0.05$), PEI-Bu/DNA 在质量比为 5 时达到最高转染活性, 高于 PEI 25 kDa ($P < 0.01$), 并与 Lipofectamine 2000 相当 ($P > 0.05$)。结论: PEI-Bu 在 COS-7 细胞中是一种低细胞毒性、高转染活性的非病毒基因载体(与商业化的 PEI 25kDa 比较), 其在基因治疗领域中具有潜在的应用前景。

关键词 聚乙烯亚胺 非病毒基因载体 转染效率 细胞毒性

中图分类号 Q813, R915 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)10-1805-03

Construction of Cross-linked Polyethylenimine Derivative and Its Transfection in COS-7 Cells*

WANG Yu-qiang¹, ZANG Yi², CAI Wen-wei¹, CHEN Yi¹, JIN Tuo², SU Jing^{2△}, SHENG Jing^{1△}

(1 Department of Geriatrics, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2 Shanghai Jiao Tong University School of Pharmacy, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT **Objective:** To synthesize cross-linked Polyethylenimine derivative with modified procedure and investigate its cytotoxicity and transfection efficiency on COS-7 cells. **Methods:** PEI-Bu was synthesized by using PEI 800Da as a backbone and 1, 4-Dibutanediol Chloroformate was used as a linker. The pDNA condensation ability of the polymer was evaluated by agarose gel electrophoresis. MTT assay was employed to measure the cytotoxicity of the polymer. Luciferase plasmid was used as the reporter gene to investigate transfection efficiency in COS-7 cells. **Results:** Gel retardation assay showed complete condensation of pDNA at w/w ratios exceeded 1. Cytotoxicity of PEI-Bu increased with the increasing of the concentrations. PEI-Bu showed lower cytotoxicity than PEI 25kDa at the same concentration. Transfection result indicated that the polymer performed the highest transfection efficiency at w/w 5, which was higher than that in commercially available PEI 25kDa ($P < 0.01$) and comparable with Lipofectamine 2000 ($P > 0.05$). **Conclusion:** The polymer PEI-Bu displayed much lower cytotoxicity and significantly enhanced transfection efficiency than PEI 25kDa in COS-7 cells, Therefore, it would be a promising candidate for safe and efficient gene delivery in gene therapy.

Key words: Polyethylenimine; Non-viral gene carrier; Transfection efficiency; Cytotoxicity

Chinese Library Classification: Q813, R915 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1805-03

前言

基因治疗在先天性和获得性疾病的治疗中具有广阔的应用前景, 安全有效的基因载体仍然是基因治疗的重要前提^[1,2]。随着基因治疗的发展, 非病毒载体越来越受到重视^[3,4]。与病毒载体相比, 非病毒载体具有无免疫原性、易于制备、成本低、基因携载量大等优点^[5]。在非病毒载体中, 聚乙烯亚胺 (PEI) 是设计最为成功的基因载体。PEI 在生理环境下就能质子化而带正电荷, 从而能够包裹带负电的 DNA, 同时 PEI 特有的“质子海绵”效应可使 PEI/pDNA 复合物从内体液中逃逸出来, 避免

DNA 被降解, 这使其在体内外实验中均显示出较高的转染效率^[6,7]。我们课题组 Songlin Xu^[8]以前的研究证实以 1, 4- 丁二醇二氯甲酸酯为连接剂的聚乙烯亚胺聚阳离子非病毒基因载体 PEIC, 在 COS-7 细胞中具有很高的转染效率, 并且在 PEI-Bu/pDNA 质量比为 40 时达到最高转染效率。本研究优化了合成方法, 对产物用截留分子量为 3500Da 的透析袋透析以除去未反应的反应物, 进一步纯化得到 PEI-Bu。PEI-Bu 在 COS-7 细胞中仍然具有很高的转染效率和较低的细胞毒性 (与 PEI 25kDa 相比), 并且在 PEI-Bu/pDNA 质量比为 5 时即达到最高转染效率, 低的质量比可产生更低的毒性, 更有利于基因输送。

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (81001416), 上海市科委基金项目 (10JC1408902)

作者简介 王玉强 (1985), 男, 硕士研究生, 主要研究方向 基因靶向输送, Tel: 13482052680,

E-mail: wangyuqiangabc@163.com

△通讯作者 盛净, 教授, E-mail: shengjing60@163.com, 苏靖, 助理研究员, E-mail: jingsu@sjtu.edu.cn

(收稿日期 2012-01-12 接受日期 2012-02-10)

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PEI 800Da、PEI 25kDa、1,4- 丁二醇二氯甲酸酯、MTT(Sigma 公司)、胎牛血清、EMEM 培养基、胰酶(德国 PAA 公司)、透析袋(MWCO=3500)、MicroBCA 蛋白浓度试剂盒(美国 Thermo 公司)、荧光素酶试剂盒、质粒 DNA (pGL3-control, 美国 Promega 公司)、Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司)、凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)、酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)、Sirius 化学发光检测仪(德国 Berthold detection system 公司)、COS-7(非洲绿猴肾成纤维细胞,中科院上海生命科学院细胞资源中心)。

1.2 方法

1.2.1 PEI-Bu 合成 冰浴下将 1,4- 丁二醇二氯甲酸酯的重蒸氯仿溶液(10 mg/ml, 21.5 ml)滴加入 PEI 800Da 的重蒸氯仿溶液(300 mg/ml, 3 ml)中,在氮气氛围中搅拌反应约 24 小时。然后用旋转蒸发器把大部分溶剂蒸出得粗产物,将粗产物加水溶解后用截留分子量为 3500Da 的透析袋透析约 48 小时,最后于冻干机冻干后保存在 -20℃ 冰箱备用。

1.2.2 PEI-Bu/pDNA 复合物的制备 取适量的 PEI-Bu 和 DNA 分别溶解在超纯水中配制成适当浓度,将 PEI-Bu 溶液加入到等体积的 DNA 溶液中并混合均匀,室温孵育 30min,制成不同质量比的复合物。

1.2.3 复合物琼脂糖凝胶电泳 配置不同质量比(0.1,0.5,1,2,3,5,7,10,15)的 PEI-Bu/pDNA 复合物,电泳条件为:1%琼脂糖(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)做电泳凝胶,1× TAE(Tris- 醋酸)缓冲液,电压 80v,电泳时间 45 分钟。最后于凝胶成像系统中观察凝胶的 DNA 条带。

1.2.4 细胞系培养 COS-7 细胞的培养基为 DMEM+10%胎牛血清,在 37℃,5% CO₂ 的培养箱中生长,当细胞融合率达到 90%左右时用胰酶传代。

1.2.5 细胞毒性分析 将 8.5×10^4 /ml COS-7 细胞加入到 96 孔板,每孔 100 μl,培养 24 小时。将聚合物和阳性对照组 PEI25kDa 用无酚红的 DMEM 培养基稀释成不同的浓度梯度,5,10,20,50,100 μg/ml,终体积为 100 μL。检测时,先移除含有血清的培养基,用 PBS 洗一遍出去残留的血清,然后加入配好的聚合物和 PEI 25kDa 溶液。阴性对照组加入不含聚合物的培养基,每个样品做 5 个复孔。继续培养 4 小时后移除含有聚合物的培养基,每孔加入 100 μL 无酚红 DMEM 和 25 μL MTT 溶液(5 mg/ml)。继续培养 6 小时,吸去培养基和 MTT 溶液,每孔加入 150 μL DMSO,37℃ 摇床上摇晃 10min 以充分溶解甲瓖,最后用酶标仪测定在 570nm 处的吸光度(OD 值),以样品组和对照组 OD 值的比值来表示细胞的存活率。

1.2.6 转染活性分析 将 9.2×10^4 /ml COS-7 细胞加入到 48 孔板中,每孔 500 μL,培养 24 小时。转染时每孔加入的荧光素酶质粒 DNA 为 500 ng,在 PBS 中配制 PEI-Bu/DNA 复合物,质量比为(2,3,5,7,10,20,30),阳性对照组用 PEI 25kDa 和 Lipofectamine2000。将复合物在室温下孵育 30min,在此期间,取出 48 孔板,吸去含有血清的培养基,用 PBS 洗一遍以除去残留的血清,然后每孔加入 250 μL DMEM 和孵育好的复合物,每个样品

做 3 个复孔。培养 4 小时后,除去培养基,每孔加入 500 μL 完全培养基,继续培养 48 小时后检测转染活性。此外,为了消除细胞生长状况不同对结果的影响,用 MicroBCA 法测定细胞蛋白总量,最后转染活性用单位质量蛋白的发光强度(RLU/mg protein)来表示。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两独立样本比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 复合物琼脂糖凝胶电泳

凝胶阻滞分析表明(图 1),PEI-Bu/pDNA 复合物在 w/w 大于 1 时可阻止 DNA 在琼脂糖凝胶中的迁移,PEI-Bu 可完全包裹 DNA。

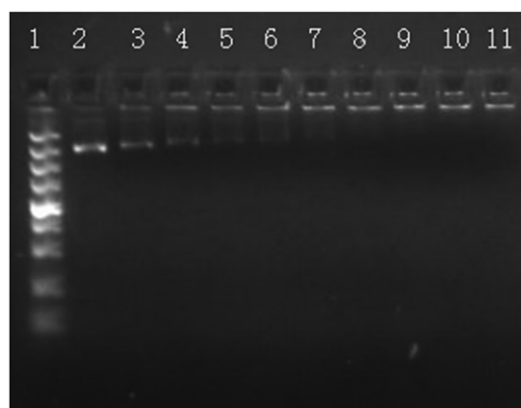


图 1 不同质量比 PEI-Bu/pDNA 复合物琼脂糖凝胶电泳:1 marker,2:裸 DNA,3-11: PEI-Bu/pDNA 质量比分别为 0.1,0.5,1,2,3,5,7,10,15

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PEI-Bu/ pDNA complexes at various w/w ratios:1 marker 2 naked DNA 3-11 PEI-Bu/pDNA at w/w ratios of 0.1,0.5,1,2,3,5,7,10,15

2.2 细胞毒性分析

采用 MTT 法测定不同浓度聚合物对 COS-7 细胞的毒性情况,以未经聚合物处理的细胞作为对照(100%),计算细胞的相对存活率。图 2 表明在 5-50 μg/mL 浓度范围内,PEI-Bu 和 PEI-25 kDa 的胞毒性随浓度增大而增大,表现出浓度依赖性特点,如在浓度为 5 μg/mL 时,PEI-Bu 和 PEI 25kDa 的存活率分别是 $97.32 \pm 2.24\%$ 和 $77.66 \pm 6.96\%$,而在浓度为 50 μg/mL 时存活率降低为 $51.93 \pm 6.15\%$ 和 $42.19 \pm 3.49\%$ 。但是 PEI-Bu 的毒性始终比 PEI 25kDa 小,体现出 PEI-Bu 安全性更好。

2.3 转染活性分析

细胞转染实验用于考察 PEI-Bu 对荧光素酶质粒的输送能力。由图 3 可知,随着 PEI-Bu/DNA 质量比的增加,转染效率呈现先升高后下降的趋势,在质量比为 5 时转染效率达到最高,为阳性对照 PEI 25kDa 的 2.6 倍 ($P < 0.05$),并且与 Lipofectamine2000 的转染效率接近 ($P > 0.05$)。裸 DNA 的转染效率要比其他组低 3-5 个数量级。

3 讨论

PEI-Bu 分子链中的游离氨基质子化后带正电,可与带负

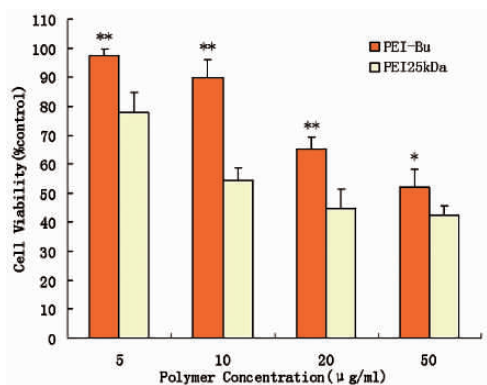


图2 PEI-Bu 对 COS-7 细胞的细胞毒性 (*P<0.05,**P<0.01 vs PEI 25kDa)

Fig.2 Cytotoxicity of PEI-Bu to COS-7 cells (*P<0.05,**P<0.01 vs PEI 25kDa)

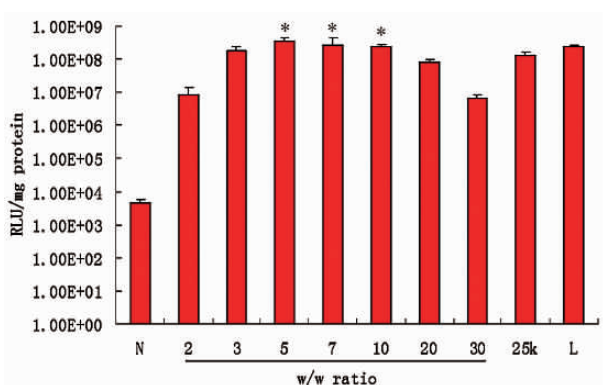


图3 PEI-Bu 在 COS-7 细胞中的转染效率(*P<0.05 vs 25k) 25k:PEI 25kDa, L:Lipofectamine2000

Fig.3 Transfection efficiency of PEI-Bu in COS-7 cells(*P<0.05 vs 25k) 25k:PEI 25kDa, L:Lipofectamine2000

电的质粒 DNA 发生电性结合而形成稳定的 PEI-Bu/DNA 复合物。使用凝胶阻滞电泳可以评价共聚物与基因的结合能力^[9]。随着 PEI-Bu/DNA 质量比的增加,复合物中的 PEI-Bu 的正电荷会增加,其对 DNA 的结合能力也随之增大,当达到一定质量比后就能实现与 DNA 完全结合,此时表现为 DNA 在琼脂糖凝胶中不再迁移。

阳离子聚合物细胞毒性的产生是由于聚合物在静电作用下聚集在细胞膜上对细胞膜产生损害而引起^[10,11]。分子量是影响 PEI 的细胞毒性的一个重要因素,高分子量 PEI 的细胞毒性高于低分子量 PEI^[12,13]。最近,Bieber 等^[14]用凝胶过滤色谱法(GFC)将高分子量的 PEI 分成不同分子量的片段,他们发现细胞毒性和分子量成正相关。我们课题组曾用凝胶渗透色谱法(GPC)测定过 PEI-Bu 的分子量为 Mw4289Da, Mn3278,远低于 PEI 25kDa,因此可以推测本研究中分子量小是 PEI-Bu 毒性比 PEI 25kDa 低的一个重要的原因。

在转染实验中,PEI-Bu/pDNA 的转染效率随质量比增加呈现先升高后下降的趋势,出现这种现象可能是因为,在低的质量比时形成的复合物不稳定从而表现较低的转染效率,而在较高的质量比时 PEI-Bu 与 DNA 结合太过紧密,不利于 DNA 从复合物中释放出来。PEI-Bu/pDNA 在质量比为 5-10 范围内均

表现出比 PEI 25kDa 更高的转染活性(P<0.05),说明通过交联小分子量 PEI 能够提高转染活性。与以前报道的 PEIC 相比,经纯化后 PEI-Bu 在 COS-7 细胞中依然具有很高转染活性的同时,将达到最高转染活性的聚合物/pDNA 质量比由 40 降低到 5,这样在用相同量的 pDNA 时低质量比会用更少的聚合物,其产生的细胞毒性也就越小从而更有利于基因输送。

进一步的研究可以对 PEI-Bu 进行表面修饰,如 PEG 化以降低表面正电荷、减小细胞毒性和增加体内循环时间,还可以连接靶向基团实现靶向基因输送^[15,16]。

4 结论

PEI-Bu 具有复合质粒 DNA 的能力,和商业化的 PEI 25kDa 相比,在 COS-7 细胞中具有更低的细胞毒性和更高的转染活性,且优化后的 PEI-Bu 比 PEIC 能在更低的 PEI-Bu/DNA 质量比达到最高转染活性,因此在基因治疗领域中具有潜在的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems[J]. Adv. Drug Deliv. Rev, 2006, 58:467-486
- [2] Srinivas R, Samanta S, Chaudhuri A. Cationic amphiphiles: promising carriers of genetic materials in gene therapy[J]. Chem. Soc. Rev, 2009, 38: 3326-3338
- [3] Shimizu K, Ito A, Arinobe M, et al. Effective cell seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering [J]. J Biosci Bioeng, 2007, 103 (5) : 472-478
- [4] Tang T, Zheng JW, Chen B, et al. Effects of targeting magnetic drug nanoparticles on human cholangiocarcinoma xenografts in nude mice [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 6 (3): 303-307
- [5] Thomas M, Klivanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(1): 27-34
- [6] Demeneix B, Behr J, Boussif O, et al. Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines [J]. Adv. Drug Deliv. Rev, 1998, 30: 85-95
- [7] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1995, 92: 7297-7301
- [8] Xu S, Chen M, Yao Y, et al. Novel poly(ethylene imine) bis-carbamate conjugate as an efficient and nontoxic gene delivery system [J]. J Control Release, 2008, 130: 64-68
- [9] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, et al. Poly (ethylene glycol) -conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible high efficiency DNA delivery [J]. Macromolecules, 2002, 35: 3456-3462
- [10] Fischer D, Bieber T, Li Y, et al. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity [J]. Pharm Res, 1999, 16: 1273-1279
- [11] Ryser HJ. A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size[J]. Nature, 1967, 215: 934-936

(下转第 1804 页)

- 军医大学学报, 2007,28(9):773-775
- Yu Xin-ping, Song Qing-he, Hou Li-chao, et al. Preparation of human Lrp polyclonal antibody [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2007,28 (9): 773-775
- [7] Mourlevat S, Galizzi JP, Guigal SN, et al. Molecular characterization of the AMPA-receptor potentiator S70340 in rat primary cortical culture: Whole-genome expression profiling [J]. Neurosci Res, 2011, 70(4):349-360
- [8] 司艺玲, 邓子辉, 杨涛, 等. 瘦素对体外培养的大鼠脑星形胶质细胞缺血缺氧耐受性的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2009,8(5):479-483
- Si Yi-ling, Deng Zi-hui, Yang Tao, et al. Leptin enhances the tolerance of rat brain astrocytes to ischemia and hypoxia in vitro[J]. Chin J Neuromed, 2009, 8(5):479-483
- [9] 贾济, 朱萧玲, 左志义, 等. CBR2 激活与小胶质细胞的活化和损伤的关系[J]. 现代生物医学进展, 2011,11(4):601-604
- Jia ji, Zhu Xiao-ling, Zuo Zhi-yi, et al. The relationship between CBR2 Activation and Injury Induced by Inflammation[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(4): 601-604
- [10] 赵咏梅, 吕风月, 徐群渊. 脑源性神经营养因子在脑室注射脂多糖大鼠黑质多巴胺能神经元变性中的作用 [J]. 首都医科大学学报, 2009,30(5):648-652
- Zhao Yong-mei, Lv Feng-yue, Xu Qun-yuan. Effect of BDNF on Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra of a Model of Intra-ventricular Injection of Lipopolysaccharide in the Rat [J]. J Capital Med Univ, 2009,30(5):648-652
- [11] Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, et al. TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA[J]. PLoS One, 2009, 4(5): 56-74
- [12] Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, et al. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk[J]. J Dent Res, 2011, 90(4): 417-27
- [13] 毕媛, 骆文静, 侯立朝, 等. 全长 hlrp 分子在多种细胞系中的表达及其分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(5): 420-422
- Bi Yuan, Luo Wen-jing, Hou Li-chao, et al. Analysis of full length molecule of human lipopolysaccharide responded gene and its expression in four cell lines [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2007, 23 (5): 420-422
- [14] 宋庆贺, 于欣平, 陈苏民, 等. 人 Lrp 蛋白在细胞中的定位及 LPS 对其表达的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(7): 542-546
- Song Qing-he, Yu Xin-ping, Chen Su-min, et al. Intracellular Location of Human Lrp and Effects of LPS on Lrp Expression in Human Cell Lines [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 22(7): 542-546
- [15] 宋庆贺, 陈苏民, 陈南春, 等. 全长人 lrp 基因及其截短和定点突变体真核表达载体的构建[J]. 科学技术与工程, 2006,14(6):2016-2018
- Song Qing-he, Chen Su-min, Chen Nan-chun, et al. Construction of eukaryotic expression vectors of lrp gene with its truncation and site-directed mutagenesis [J]. Science Technology and Engineering, 2006, 14(6): 2016-2018
- [16] Nerlov C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. Trends Cell Biol, 2007, 17(7): 318-324
- [17] Asada R, Kanemoto S, Kondo S, et al. The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology[J]. J Biochem, 2011,149(5):507-518
- [18] Peterson CW, Ayer DE. An extended Myc network contributes to glucose homeostasis in cancer and diabetes [J]. Front Biosci, 2011, 1 (17): 2206-2223
- [19] Junichi T, Yasuhiro Y, Yoshihiko K, et al. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation [J]. Cytokine, 2011, 54: 6-19
- [20] Pulak RM, Matthew TD, Douglas MS, et al. Role of basic leucine zipper proteins in transcriptional regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 302: 1-11

(上接第 1807 页)

- [12] Grayson AC, Doody AM, Putnam D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine mediated siRNA delivery in vitro[J]. Pharm. Res, 2006, 23: 1868-1876
- [13] Peng Q, Zhong Z, Zhuo R. Disulfide cross-linked polyethylenimines (PEI) prepared via thiolation of low molecular weight PEI as highly efficient gene vectors[J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19: 499-506
- [14] Bieber T, Elsassner HP. Preparation of a low molecular weight polyethylenimine for efficient cell transfection [J]. Biotechniques, 2001, 30: 74-81
- [15] Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospect: non-viral gene therapy by systemic delivery [J]. Gene Ther, 2006, 13(18): 1313-1319
- [16] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticles-based gene delivery[J]. Gene Ther, 2006, 13(4): 283-287