新型 PEI 衍生物在 COS-7 细胞中的转染与毒性研究 *

臧 怡[1] 黄立群[1] 王玉强[2] 周 毅[1] 杜子秀[1△]

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

摘要 目的：寻找一种新型的转染效率高，毒性低的非病毒基因载体。**方法：**通过化学方法合成 Polyimine-MPEI，然后以不同质量比包裹绿色荧光蛋白质粒，检测在 COS-7 细胞中的转染效率和毒性。**结果：**在比例从 5 到 100 之间，转染效率均比较理想，能达到 1.00E+07 以上，Polyimine-MPEI 的毒性也很小，细胞的生长率均在 80%以上，明显高于 PEI25KDa 对照组。**结论：**Polyimine-MPEI 是一个很有研究前景的聚合物载体，具有高转染效率低毒性的特点，可以通过延长反应时间，增加分子量，增大转染能力。

关键词：基因载体；PEI 衍生物；转染效率；细胞毒性

中图分类号：Q75，Q813，R915 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)24-4611-03

Transfection and Cytotoxicity Studies of Novel Polyethyleneimine Derivative on COS-7*

ZANG Yi[1], HUANG Li-qun[1], WANG Yu-qiang[2], ZHOU Yi[1], DU Zi-xiu[1△]

(1 1 School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240

2 The Ninth People's Hospital Affiliated to the School of Medicine of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200011)

ABSTRACT Objective: To find a novel nonviral gene vector with a high transfection efficiency and low cytotoxicity. Methods: Polyimine-MPEI is synthesized, then packed with luciferase gene at different mass ratio. The transfection efficiency and cytotoxitity of this polyplex was detected. Results: From mass ratio 5 to 100, the transfection efficiency of the polyplex was above 1.00E+07 and it was relatively ideal. Its cytotoxicity was lower comparing with the PEI25KDa control group and the cell viability was all above the 80%. Conclusions: Polyimine-MPEI is a polycation vector with a bright research prospect, which has high transfection efficiency and low cytotoxicity. Prolonging the synthesis time and making its molecular weight higher can increase the transfection efficiency.

Key words: Gene vector; PEI derivative; Transfection efficiency; Cytotoxicity

Chinese Library Classification: Q75, Q813, R915 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)24-4611-03

前言

对于严重危害人类健康的疾病，包括如血友病、家庭型高胆固醇血症等遗传病，恶性肿瘤，心血管疾病，艾滋病和类风湿等感染性疾病，人们将希望寄托于基因治疗[1,2]。基因治疗是指将外源正常基因导入靶细胞，以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病，以达到治疗目的[3,4]。裸基因由于具有负电基团和体积较大等问题，不能有效的进入细胞内。此外，裸基因非常容易受到细胞内核酸酶的作用而降解。所以对于基因治疗来说，最大的障碍就是如何找到一个合适的载体[5-7]，将目的基因输送到细胞中，而避免被核酸酶降解。为了构建安全有效的基因载体，本研究以小分子量聚乙酰亚胺(PEI-800)作为基本构建单元，丙酮醛作为连接剂，合成聚阳离子基因载体，命名为 Polyimine-MPEI.研究其在 COS-7 细胞中的转染效率和毒性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PEI800 (Sigma 公司)，丙酮醛 (Sigma 公司)，COS-7 细胞(中科院细胞所)，PEI25KDa (Sigma 公司)，胎牛血清 (德国 PAA 公司)，荧光素酶试剂盒 (美国 Promega 公司)，MicroBCA 试剂盒 (美国 Thermo 公司)，DMEM 培养基(德国 PAA 公司)，CCK-8 (日本 Dojindo 公司)，ELX800 酶标仪 (Bio-Tech 公司)

1.2 实验方法

1.2.1 Polyimine-MPEI 在 COS-7 细胞中的转染效率研究 将 COS-7 细胞用胰酶消化，离心，在 50mL 离心管中加入含有10%胎牛血清的培养基 27mL，吸取离心细胞的上清液，加入 2mL 培养基吹打均匀，吸取 1mL培养基加入离心管中，取 10μL细胞混悬液于细胞计数器上，在显微镜下观察，保证细胞密度约为 1×10^5 个 /mL，取 48 孔板，每孔加入细胞液 500μL，培养过夜。聚合物与 DNA 质粒分别以质量比为 5、10、220、50、70、100，PEI25KDa 与 DNA 质粒质量比为 2 复合 30min。将 48 孔板从培养箱中取出，吸去培养基，每孔加入 200μL PBS 洗一下，然后吸去，再加入 250μL DMEM，每个比例做三个复孔，每孔加入 50μL。四小时后将 DMEM 换成有血清的培养基，培养 48 小时。48 小时后，出去培养基，用超纯水洗一遍，每孔加入 75μL 裂解液，20min 后划板，将裂解液离心。用荧光计数器测定发光

* 基金项目：国家自然科学基金项目(200801198)

作者简介：臧怡(1985-)，女，硕士研究生，主要研究方向：基因输送。Tel: 13761576493,E-mail:zangyi968@yahoo.com.cn

△通讯作者：杜子秀，电话：13671723206 E-mail:zixiudu@sjtu.edu.cn

(收稿日期：2012-02-04 接受日期：2012-02-28)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

值(RLU 为单位)，取 20μL上清液，快速加入荧光素酶底物 20μL 混匀,采集时间为 10s。并采用 MicroBCA 法测定蛋白总量,转染效率用每单位蛋白质量的发荧光强度表示。

1.2.2 Polyimine-MPEI 在 COS-7 细胞中的毒性研究 培养 COS-7 细胞,并且以密度约为 1.0×10^5 个 /mL 种在 96 孔板上,每孔加入 100μL细胞悬液,培养过夜。将聚合物和 DNA 质粒以 5、10、20、50、100,PEI25KDa 与 DNA 质粒以 2 的比例复合,高分子浓度为 2mg/mL，用无酚红的 DMEM 稀释。复合物孵育 30min。将 96 孔板从培养箱中取出，除去有血清的培养基,用 100μL的 PBS 洗一遍,每孔加入 100μL无酚红的 DMEM,每个比例做三个复孔,每孔加入 100μL复合物。4 小时后每孔加入 10μLCCK8 试剂。放入培养箱,3 小时后每隔 1 小时用酶标仪在 450nm 和 600nm 下检测。以样品组和正常生长组的 OD 比值来表示细胞生长状况。

2 结果

2.1 Polyimine-MPEI 在 COS-7 细胞中的转染效率研究

从实验结果看，比例在 5 到 100 之间均有很高的活性,根据文献，PEI25KDa 与质粒在质量比为 2 时转染活性最好,本实验中转染活性达到 1.00E+08,Polyimine-MPEI 在比例为 10 时转染活性最好,在 1.00E+07 以上。

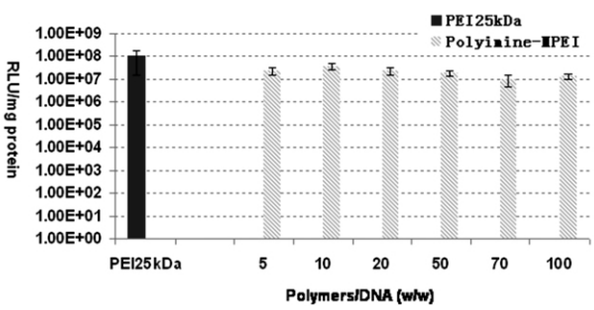

图 1 Polyimine-MPEI 在 COS-7 细胞中的转染结果

Fig.1 Transfection results of Polyimine-MPEI to COS-7 cells

2.2 Polyimine-MPEI 在 COS-7 细胞中的毒性研究

从毒性数据看,随着聚合物与质粒的比例的上升,细胞毒性有所增加,但是在 5 到 100 之间,细胞生长率均在 80%以上,要远远小于 PEI25KDa 的细胞毒性,其中比例为 10 时,细胞毒性最小,细胞生长率接近 90%。

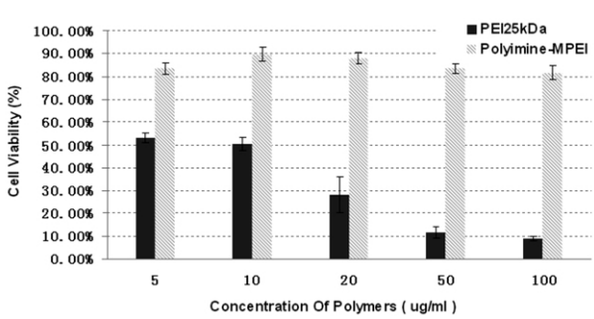

图 2 Polyimine-MPEI 在 COS-7 细胞毒性结果

Fig.2 Cytotoxicity result of Polyimine-MPEI to COS-7 cells

3 讨论

在过去的四十年中,科学家致力于找到合适的基因输送载体[9],安全有效的输送载体已经成为基因治疗的瓶颈,病毒载体具有高效性,但是其安全性一直是难以解决的问题,后来人们研究了大量的非病毒载体,有物理方法,机械方法,和化学合成的载体[10,11]。目前化学合成载体在低毒方面有着很大的优势,如何提高转染效率是一个亟待解决的问题[11-13]。

PEI25KDa 是一种最为常用的聚阳离子基因载体，其转染效率也一直较高,但是由于其毒性较大,应用一直受到限制,该实验以无毒小分子聚乙烯亚胺为基本单元,以丙酮醛为连接剂合成聚阳离子基因载体,这种基因载体能够稳定的包裹基因物质形成稳定的纳米颗粒,并且显著的降低了细胞毒性,从实验结果看，在比例为 10 时,Polyimine-MPEI 的转染活性最高,并且毒性最低,是一个比较理想的聚阳离子 / 质粒质量比例,但由于聚合物的分子量不够,氨基密度不够大,阳离子浓度不够[14,15],转染效率比对照 PEI25KDa 低了一个数量级。在后续实验中,可以尝试延长聚合物反应的时间,增加聚合物的分子量,从而提高其转染效率。但兼顾转染效率与毒性来看,该聚合物有着很好的应用前景,具有很高的研究意义,并且可以对其表面进行修饰和优化[16],来更大程度的降低细胞毒性,继续 siRNA 转染实验和动物实验,希望本研究为以后基因载体系统的构建提供了一定的新的思路与想法。

参 考 文 献(References)

[1] Tae GP, Ji HJ, Sung WK. Current status of polymeric gene delivery systems[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006,58:467-486

[2] Jiang Y, Su B, Meng XX, et al. Effect of siRNA-mediated silencing of Bmi-1 gene expression on HeLa cells [J]. Japanese Cancer Association, 2010,101:379-386

[3] Xu RZ, Lu ZR. Design, synthesis and evaluation of spermine-based pH-sensitive amphiphilic gene delivery systems:Multifunctional non-viral gene carriers[J]. Science China chemistry, 2011,54:359-368

[4] Thomas M. Klibanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery[J].Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62:27-34

[5] Eveline Edith Salcher and Ernst Wagner. Chemically Programmed Polymers for Targeted DNA and siRNA Transfection [J]. Top Curr Chem, 2010,296: 227-249

[6] Wiebke F, Marcelo C, Rainer H. Hyperbranched Polyamines for Transfection[J]. Top Curr Chem, 2010,296: 95-129

[7] Qi R, Gao Y, Tang Y, et al. George Liu.PEG-conjugated PAMAM Dendrimers Mediate Efficient Intramuscular Gene Expression[J]. The AAPS Journal, 2009,11:395-405

[8] Francisco CPM, Javier G, Inmaculada P, et al. Barriers to Non-Viral Vector-Mediated Gene Delivery in the Nervous System [J]. Pharm Res, 2011,28:1843-1858

[9] Peter H, Elizabeth S. Gene Delivery into Mammalian Cells:An Overview on Existing Approaches[J]. Employed In Vitro and In Vivo Top Curr Chem, 2010,296: 1-13

[10] Mohammed SAD, Xiang G. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress[J]. The AAPS Journal, 2009,11:671-681

[11] Inge SZ, Jan BFN, Engberts DH. Gene delivery by cationic lipid vec-

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tors: overcoming cellular barriers [J]. Eur Biophys J, 2007, 36: 349-362

[12] Gao X, Kim KS, Liu D. Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next[J]. The AAPS Journal, 2007,9:E92-E104

[13] Louise C. Nonviral Vectors [J].Methods in Molecular Biology, 2006,33:201-225

[14] Osama AAA, Noppadon A, Chararеh P, et al. N4,N9-Dioleoyl Spermine Is a Novel Nonviral Lipopolyamine Vector for Plasmid DNA Formulation[J]. Pharmaceutical Research, 2005,22:972-980

[15] Moustafa KS, Hassan MG. Blagbrough. Design and Synthesis of N4, N9-Disubstituted Spermines for Non-viral siRNA Delivery - Structure-Activity Relationship Studies of siFection Efficiency Versus Toxicity[J]. Pharmaceutical Research, 2009,26:286-295

[16] Hea CX, Tabatab Y, Gaoa JQ. Non-viral gene delivery carrier and its three-dimensional transfection systemInternational [J]. Journal of Pharmaceutics, 2010,386:232-242

[17] Anas EA. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy[J]. Journal of Controlled Release, 2004,94: 1-14

[18] Thomas M, KlibanovAM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003,62:27-34

[19] Schroeder A, Levins CG, Cortez C, et al. Anderson,Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery [J]. Journal of internal medicine, 2009, 267:9-21

[20] Chiu YL, Tariq M. RANA, siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis[J]. RNA Society, 2003, 9:1034-1048

·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》是国内第一部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 Gamhbir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。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net