新型聚乙烯亚胺衍生物在 COS-7 细胞中转染和毒性的研究 *

何倩倩 杜子秀△ 何 沐 臧 怡 胡振华 王 菲 金 拓

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的：研究以乙二醛为连接剂的聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine,PEI)衍生物 Polyimine-PEI 对非洲绿猴肾癌细胞 COS-7 的转染活性和细胞毒性的影响。**方法：**以荧光素酶质粒为报告基因，研究高分子与 DNA 的复合物在 COS-7 细胞的转染活性，用 MTT 方法研究高分子对 COS-7 细胞的毒性。**结果：**COS-7 细胞实验显示，Polyimine-PEI 具有很低细胞毒性，其毒性显著低于 PEI25kDa，同时也具有高效输送质粒的能力。**结论：**Polyimine-PEI 是一种新型的高效，低毒在基因治疗领域有相当前景的非病毒载体。

关键词：PEI 衍生物; COS-7 细胞; 转染; 细胞毒性

中图分类号：R918 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2011)12-2204-03

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

HE Qian-qian, DU Zi-xiu△, HE Mu, ZANG Yi, HE Zhen-hua, WANG Fei, JIN Tuo

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

ABSTRACT Objective: To investigate the transfection efficiency and cell cytotoxicity of Polyethyleneimine (PEI) derivative linking with glyoxal. Methods: Luciferase plasmid was used as the reporter gene to investigate transfection efficiency in COS-7 cells. Cytotoxicity was detected by MTT method. Results: COS-7 cells transfection and cytotoxicity results suggested that the gene carrier (Polyimine-PEI) was less cytotoxicity than that of PEI25kDa, and expressed equal transfection efficiency with PEI25kDa and Lipofectamine 2000. Conclusion: Polyimine-PEI could be a highly efficient and less toxic gene carrier which was promising in gene therapy.

Key word: Polyethyleneimine; COS-7 cells; Transfection; Cytotoxicity

Chinese Library Classification: R918 Document code:A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2204-03

前言

基因治疗目前主要针对那些对人类健康威胁严重的疾病，包括遗传病，恶性肿瘤，心血管疾病，感染性疾病(艾滋病，类风湿等)[1,2]。目前，有效输送载体成为基因治疗发展的瓶颈。各种基因输送载体中，聚阳离子非病毒载体具有基因担载量大，无免疫原性，化学结构可控，性质稳定和可大量制备等优点受到研究者的重视。但是聚阳离子载体需要克服转染活性低，细胞毒性大的问题[3-6]。本研究构建了一种新型聚乙烯亚胺衍生物，命名为 Polyimine-PEI。进一步检测了 Polyimine-PEI 在 COS-7 细胞中的转染活性和细胞毒性，结果显示，它具有高转染效率和低细胞毒性的特点。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

聚乙烯亚胺，MW=800 Da (Sigma 公司)，乙二醛(Sigma 公司)，胎牛血清(德国 PAA 公司)，DMEM 培养基(德国 PAA 公司)，MicroBCA 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)，Lipofectamine2000 (美国 Invitrogen 公司)，COS-7 细胞(中科院上海生命科学院细胞资源中心)。

1.2 实验方法

1.2.1 Polyimine-PEI 在 COS-7 细胞中的转染活性的研究 48 孔细胞培养板中，加入 500ul 浓度为 5.0-10× 10^4/mL 的细胞悬液，培养过夜。转染时，每孔 500ng 荧光素酶质粒，高分子按照设置质量比稀释成所需的比例，阳性对照采用 PEI25kDa 和 Lipofectamine2000。高分子溶液加入质粒的溶液中快速混匀，孵育 30min。取出 48 孔板，移除有血清的培养基，PBS 溶液洗两遍，每孔加入 250μl 无血清培养基，孵育好复合物按顺序加入细胞中。4 小时后，除去无血清培养基，每孔加 500μl 完全培养基，培养 48 小时，检测转染活性结果。此外为了消除细胞生长状况不同对结果的影响，MicroBCA 法测定蛋白总量。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 Polyimine-PEI 在 COS-7 细胞中的毒性研究 实验前 24

* 基金项目：国家自然科学基金(200801198)

作者简介：何倩倩(1984)，女，硕士研究生，主要研究方向：非病毒载体的基因输送

电话:+86(21)3420-4842,Email:heqq@hotmail.com

△通讯作者：杜子秀，电话：+86(21)3420-5072,Email:zixiudu@sjtu.edu.cn

(收稿日期：2011-01-07 接受日期：2011-01-30)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小时将 5.0-10× 10^4/mlCOS-7 细胞加入到 96 孔板，每孔 100μl。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 PEI25kDa 和 Lipofectamine2000 稀释为与待测样品组一致的浓度梯度。培养 4h,移除含有高分子的培养基，加入 100μl 无酚红培养基，同时加入 25μlMTT 溶液（5mg/ml）。继续培养 6h,观察会形成紫色甲瓒结晶，然后每孔加 DMSO,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 Polyimine-PEI 在 COS-7 细胞中的转染活性

体外细胞转染实验用于考察 Polyimine-PEI 对质粒输送情况，由结果可知，随着 Polyimine-PEI 对 DNA 质量比增加，转染效率也随之增加，在质量比 50 时可以达到比阳性对照 PEI25kDa 和 Lipofectamine2000 更好的转染效率。而且在 Polyimine-PEI 的高转染效率可以维持到质量比为 100 时，这也证明 Polyimine-PEI 低细胞毒性的特点。

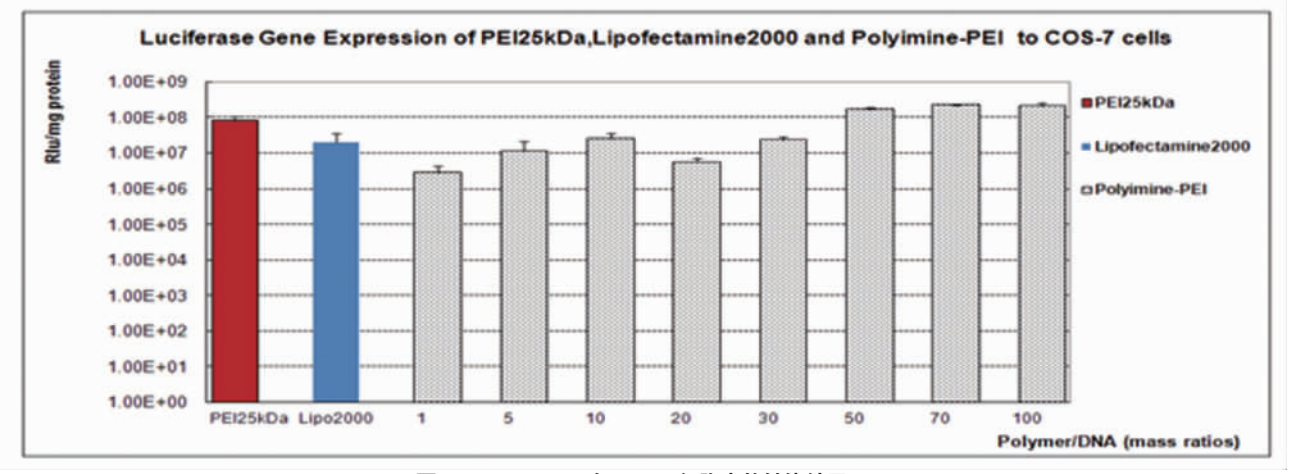

图 1 Polyimine-PEI 在 COS-7 细胞中的转染结果

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

2.2 Polyimine-PEI 在 COS-7 细胞中的细胞毒性

体外 MTT 毒性实验用于考察 Polyimine-PEI 对 COS-7 细胞毒性情况,由结果可知，在高分子浓度范围为 1-200μg/ml 范围内，Polyimine-PEI 的毒性始终低于 PEI25kDa，达到和市售的转染试剂 Lipofectamine2000 低毒性。在浓度为 1-100 的范围内 Polyimine-PEI 的细胞存活率在 80%以上。浓度高于 100μg/ml 后，Polyimine-PEI 的细胞存活率有所下降，但是毒性仍显著低于 PEI25kDa。

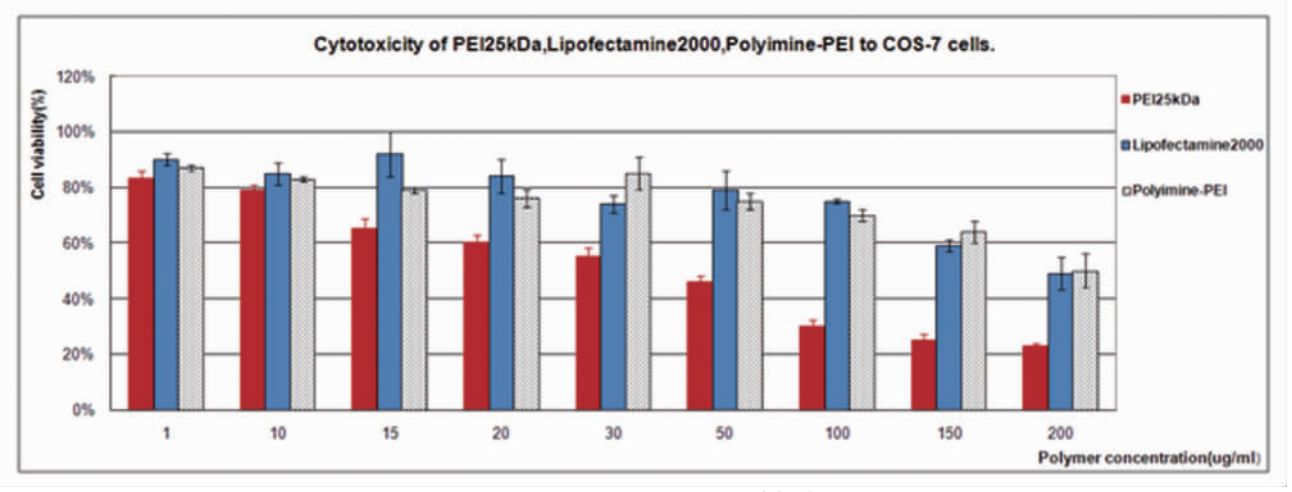

图 2 Polyimine-PEI 在 COS-7 细胞毒性结果

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

3 讨论

基因治疗的关键是有效进行基因转染的载体。目前研究的基因载体分为病毒载体和非病毒载体，病毒载体虽然具有高转染效率，但是其安全隐患一直存在。而在各种非病毒载体中，聚阳离子非病毒载体与脂质体相比具有基因担载密度大、担载量大、制备简单、便于化学修饰等优点，但是同时也面临着毒性大和转染效率低两大挑战，如何降低聚阳离子的毒性一直是研究的热点。聚乙烯亚胺 PEI 是应用最广泛的聚阳离子载体，转染活性随分子量变化而变化，PEI25kDa 转染效率最高，细胞毒性也较大。所以我们用可降解的基团连接无毒小分子 PEI800 合成高效，低毒的载体(Polyimine-PEI)[7-10]。实验结果显示，Poly-

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

imine-PEI 的转染活性能够达到甚至高于阳性对照 PEI25kDa 和市售转染试剂 Lipofectamine2000。细胞毒性实验结果证实在质量比为 1-200 的范围内，Polyimine-PEI 细胞毒性显著低于 PEI25kDa，甚至细胞存活率高于市售的转染试剂 Lipofectamine2000。Polyimine-PEI 的毒性可能与连接剂的选择，形成的可降解碳氮双键有关（碳氮双键能够在酸性环境下降解产生小分子 PEI 从而降低细胞毒性）。

本研究给出了一种新型具有亚胺结构的聚乙烯亚胺衍生物，其中亚胺结构使得复合物在内吞小泡遇到酸性环境快速降解从而降低了细胞毒性。进一步的研究可以进行 Polyimine-PEI 的结构优化（PEG 化降低表面正电荷[11]），也可以通过表面修饰兼顾体内循环和细胞靶向而提高体内细胞的摄取[12,13]。此外我们载体也可以做为 siRNA 或 miRNA 的输送 [14-16]，同时也希望本研究能够为基因载体的构建提供新的思路和方法。

致谢

本研究受到国家自然科学青年基金项目（20080119 8）资助。

参考文献（References）

[1] Anderson WF. Prospects of Human Gene Therapy [J]. Science, 1984, 226(4673) 401-409

[2] Chuah MK. Cutting through the obstacles and resurrecting the promise of gene therapy[J]. IDrugs, 2005.8(10): 818-821

[3] Kaneda.Y. Gene therapy: current status and promise [J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2001,117(4): 299-306

[4] Meyer F, Finer M. Gene therapy: progress and challenges[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001, 47(8): 1277-1294

[5] Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, et al. Progress in developing cationic vector for non-viral systemic gene therapy against cancer[J]. Biomaterials, 2008, 29: 3477-3496

[6] Luten J, van Nostruin CF, De Smedt SC, et al. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmids DNA delivery [J]. J Controlled release,2008, 126: 97-110

[7] Thomas M, Ge Q, Lu JJ, et al., Cross-linked small poly (ethylene-imines): while still nontoxic, deliver DNA efficiently to mammalian cells in vitro and in vivo[J]. Pharm. Res, 2005,22:373-380

[8] Kim YH, Park JH, Lee M, et al. Polyethylenimine with acid-labile linkage as a biodegradable gene carrier [J]. J Controlled release,2005, 103: 209-219

[9] Kircheis R, Wightman L, Wagner E, et al. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines [J]. Advanced Drug Delivery Reviews,2001, 53: 341-358

[10] Wolff JA, Rozema DB. Breaking the bonds: non-viral vectors become chemically dynamic[J], Mol. Therapy, 2008,16:8-15

[11] Katayose S, Kataoka K. Water-soluble polycation complex associates of DNA and Poly (ethylene glycol)-poly (L-lysine) block copolymer [J]. Bioconjug Chem, 1997, 8(5):702-707

[12] Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospect: non-viral gene therapy by systemic delivery [J]. Gene Ther, 2006, 13(18): 1313-1319

[13] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticles-based gene delivery[J]. Gene Ther, 2006,13(4):283-287

[14] Fire AZ. Gene silencing by double -stranded RNA (Nobel Lecture) [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2007,46:6966-6984

[15] Lewis DL, Wolff JA. Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection[J]. Advance Drug Delivery Reviews,2007,59 : 115-123

[16] Jere D, Kim JE, Arote R, et al. Akt1 silencing efficiencies in lung cancer cells by sh/si/ssiRNA transfection using a reductable polyspermine carrier[J]. J Controlled release,2008, 126: 97-110

（上接第 2346 页）

[7] 王昕. ELISA 法检测 HBsAg 的影响因素分析[J]. 临床输血与检验，2001，3(2) :43-44
Wang Xin. HBsAg was detected by ELISA analysis of influencing factors [J]. Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2001,3 (2) :43-44

[8] 李天君，张印则. 影响 ELISA 检测结果的因素[J]. 中国输血杂志，2000，13(4) :250-251
Li Tianjun, plates are. Factors that affect the ELISA test results [J]. Transfusion Medicine, 2000,13 (4) :250-251

[9] 郭慧芳，张文红，温冬青，等. 基于可重复利用免疫磁珠的抗体检测方法的建立[J].免疫学杂志,2006(05):276-277.
Guo Huifang, Zhang Hong, Wen Dongqing, et al. Immunomagnetic bead-based reusable antibody detection of [J]. Journal of Immunology, 2006 (05) :276-277

[10] 吕岳峰. 对 HBV 标志物的现场测试与常规室间质量评价的结果比较[J].国际检验医学杂志,2006(02):108-109
Lv Yuefeng. Of HBV markers and conventional field test chamber compared the results of quality assessment [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2006 (02) :108-109

[11] 朱远雁,余俊平,刘涛. 加样时差对献血者 HBsAg ELISA 结果的影响[J].中国输血杂志,2002(04):321-322
Zhuyuan Yan, Yu Junping, Liu Tao. Plus HBsAg ELISA-like time difference on the results of blood donors [J]. Transfusion, 2002 (04) : 321-322

[12] 范恩勇,孙海英.标本的保存温度和时间对血清抗 -HIV ELISA 检测结果的影响[J].中国输血杂志,2004(01):347-348
Fan Enyong, Sun Haiying. Specimen storage temperature and time on the serum anti-HIV ELISA test results of [J]. Transfusion, 2004 (01) : 347-348

[13] 邵彬. 血清学诊断肝纤维化新指标 -TIMP-1 试剂盒的研制、优化及临床应用 [D].第四军医大学,2006(02):297-298
Shao Bin. Serological diagnosis of liver fibrosis, a new index-TIMP-1 kit for the development, optimization and clinical application of [D]. Fourth Military Medical University, 2006 (02) :297-298

[14] 邓永福.ELISA 实验影响因素探讨[J].四川省卫生管理干部学院学报,2004(03):159-160
Deng Yongfu. ELISA test of factors [J]. Sichuan Institute of Health Management, 2004 (03) :159-160

[15] 杨勇毅,王军,罗蓉.全自动酶免分析系统工作流程的优化[J].中国输血杂志,2007(02):326-327
Yang Yongyi, Wang Jun, LUO Rong. Automatic enzyme immunoassay optimization workflow analysis system [J]. Transfusion, 2007 (02) :326-327

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net