

疏水修饰聚阳离子高分子 SP-Chol 在 COS-7 细胞中转染和毒性的研究 *

李 晖 刘一浓 王 菲 魏蓓蓓 周 毅 杜子秀 吴 飞[△]

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的 研究以精胺为单体,以乙二醇二氯甲酸酯作为连接剂,以胆固醇氯甲酸酯作为疏水基团连接剂合成的疏水修饰聚阳离子高分子 SP-Chol 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 SP-Chol 与 DNA 的复合物在 COS-7 细胞的转染活性,用 MTT 方法研究 SP-Chol 对 COS-7 细胞的毒性。结果 COS-7 细胞实验显示,SP-Chol 具有低于 PEI 25kDa 的细胞毒性,同时也具有高效输送 DNA 的能力。结论 SP-Chol 是一种新型的高效、低毒,在基因治疗领域有潜在应用价值的非病毒基因输送载体。

关键词 疏水修饰;精胺;聚阳离子高分子;转染;毒性

中图分类号 Q813,Q813,R918 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 07-1205-03

Study on Transfection and Cytotoxicity of Hydrophobically Modified Cationic Polymer SP-Chol in COS-7 Cells*

LI Hui, LIU Yi-nong, WANG Fei, WEI Bei-bei, ZHOU Yi, DU Zi-xiu, WU Fei[△]

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

ABSTRACT Objective: To investigate the transfection efficiency and cell cytotoxicity of hydrophobically modified cationic polymer SP-Chol which is synthesized by using spermine as monomer, ethylenebis (chloroformate) as coupling agent and cholesterol chloroformate as hydrophobic coupling agent. **Methods:** Luciferase plasmid was used as the reporter gene to investigate transfection efficiency on COS-7 cells. Cytotoxicity was detected by MTT method. **Results:** COS-7 cells transfection and cytotoxicity results suggested that SP-Chol was less cytotoxic than PEI 25kDa, and had a high transfection efficiency. **Conclusion:** SP-Chol is a highly efficient and less toxic non-viral gene delivery vector which has potential application in gene therapy.

Key words: Hydrophobically modified; Spermine; Cationic Polymer; Transfection; Cytotoxicity

Chinese Library Classification: Q813, Q813, R918 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2011) 07-1205-03

前言

近年来,随着分子生物学、遗传学和生物技术的不断进步以及人类基因组计划^[1]的完成,许多引起疾病的基因被逐步鉴定。如能将疾病细胞中的某些错误基因进行修正或替换,或者插入能够治疗疾病的基因,对于某些现有医疗手段难治的疾病,可能起到治疗的效果^[2]。由于基因治疗具有理论上的巨大治疗潜力,在过去的数十年中,人们对基因治疗的机理和临床应用进行了广泛和深入的研究^[3]。对于基因治疗而言,有一个步骤至关重要,即将基因安全、高效和可控地输送进靶细胞中^[4]。本课题组前期合成了以精胺^[5]为单体,以乙二醇二氯甲酸酯作为连接剂,以胆固醇氯甲酸酯作为疏水基团连接剂的疏水修饰聚阳离子高分子 SP-Chol。本文研究了 SP-Chol 在 COS-7 细胞中的转染活性和细胞毒性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

SP-Chol (本实验室合成),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),Sirius 化学发光检测仪 (德国 Berthold detection system 公司),酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司),Lipofectamine 2000 (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 SP-Chol 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 $10-15 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液,培养过夜。转染时,每孔需加入 500ng 荧光素酶质粒,SP-Chol 用超纯水配成 2mg/ml 的储备液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤,再按照与 DNA 质量比稀释成所需的浓度 (0,1,2,3,5,7,10,15,20,30,50,70,100),阳性对照采用 PEI 25kDa (与 DNA 质量比为 2 和 5) 和 Lipofectamine 2000 (与 DNA 质量比为 1),将高分子加入到 DNA 中,吹打若干次,室温下静置 30min。静置时,拿出细胞板,除去有血清培养基,用

* 基金项目 国家 "重大新药创制" 科技专项 (2009ZX09310-007 针对生物技术药物的相关给药技术平台)

作者简介 李晖 (1986),男,硕士研究生,主要研究方向 生物大分子给药。

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

[△]通讯作者 吴飞,电话: +86(21)3420-5072, Email: feiwu@sjtu.edu.cn

(收稿日期 2011-01-17 接受日期 2011-02-12)

200 μ L PBS 洗一遍,将复合好的复合物按顺序依次加入到细胞中,每个样品做 3 个复孔。4h 后,吸去无血清培养基,加入有血清培养基 500 μ L,培养 48h 后,检测转染结果。为了消除细胞生长状况不同对结果的影响,转染结果检测之后,再用 MicroBCA 法测定每孔细胞裂解液蛋白总量。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 SP-Chol 在 COS-7 细胞中的毒性研究 实验前将 15-30*10⁴/ml COS-7 细胞加入到 96 孔板,每孔 100 μ L,培养过夜。SP-Chol 用超纯水配成 2mg/ml 的储备液,用 0.22 μ m 无菌滤膜过滤,再用 DMEM 培养基稀释成如下的浓度梯度: 100 μ g/ml, 40 μ g/ml, 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 4 μ g/ml, 终体积为 100 μ L,阳性对照组 PEI 25kDa 也稀释为与待测样品组一致的浓度梯度。然后在细胞板中加入 SP-Chol 溶液和阳性对照 PEI 25kDa,阴性对照组中加入 100 μ L 的 DMEM 培养基,每个样品做 5 个复孔。24 小时之后,除去培养液和高分子溶液,每孔

加入 100 μ L 的无酚红无血清 DMEM 培养基,再加入 25 μ L 的 MTT 溶液,置于细胞培养箱中培养 6 小时,吸去培养基和 MTT 溶液,最后加入 150 μ L DMSO,摇床上室温摇晃 10min,酶标仪于 490nm 测吸光度。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 SP-Chol 在 COS-7 细胞中的转染活性

体外细胞转染实验用于考察 SP-Chol 对荧光素酶质粒的输送能力。实验结果见图 1,结果显示 SP-Chol 可以有效地转染 COS-7 细胞,且高分子与 DNA 的质量比为 20 时,达到最高转染效率。SP-Chol 对 COS-7 的转染效率虽然不及商业化的转染试剂 PEI 25kDa 和 Lipofectamine 2000,但和 PEI 25kDa 的转染效率已比较接近,并且比裸 DNA 的转染效率要高出 2 个数量级以上。

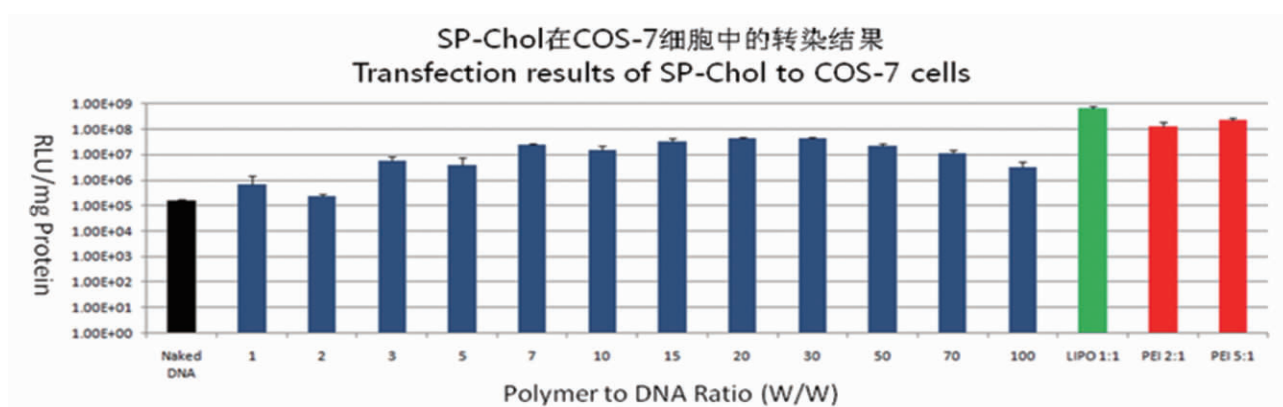


图 1 SP-Chol 在 COS-7 细胞中的转染结果

Fig. 1 Transfection results of SP-Chol to COS-7 cells

2.2 SP-Chol 在 COS-7 细胞中的细胞毒性

MTT 毒性实验用于考察 SP-Chol 对 COS-7 细胞毒性情况。实验结果见图 2, 结果显示 SP-Chol 在各个浓度对 COS-7

细胞的毒性都明显小于 PEI,并且在低浓度 (4 μ g/ml) 时已经无法检测到毒性,而 PEI 在此浓度时仍然有较大毒性 (细胞存活率只有 60%)。

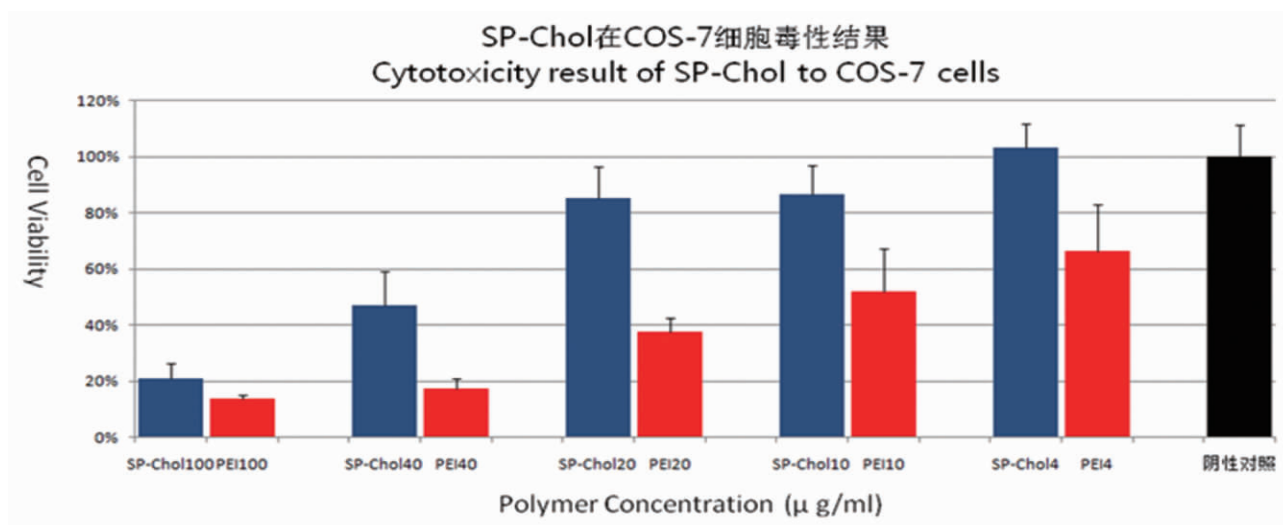


图 2 SP-Chol 在 COS-7 细胞毒性结果

Fig. 2 Cytotoxicity result of SP-Chol to COS-7 cells

3 讨论

安全、高效、质量可控的基因输送载体的缺位仍然是基因治疗广泛应用于临床的最大障碍^[6]。本文分别利用荧光素酶质粒转染实验和 MTT 实验研究了本实验室合成的疏水修饰聚阳离子高分子 SP-Chol 在 COS-7 细胞中的转染活性和细胞毒性。实验结果显示,SP-Chol 能够有效输送报告基因,并且具有较低的毒性。这些优点可能与其结构中的连接基团和疏水修饰基团有关。一方面,其连接基团具有可降解性,可是帮助高分子进行低毒化代谢;另一方面,DNA 的碱基具有一定疏水性,细胞膜也具有一定疏水性,所以将阳离子高分子进行疏水修饰,可能增加其与 DNA 和细胞膜的相互作用,从而提高基因输送效率,降低毒性和增强所形成的复合物的稳定性。我们希望本研究能够对以后非病毒基因载体的构建提供新思路。

此外,本研究也有许多可以进一步改进和深入的方面,如:研究此高分子的降解特性,特别是在酸性 pH 下的降解特性;研究将此高分子与 DNA 形成的复合物包裹进脂质体^[7]的方法;研究将靶向基团与此高分子连接,从而实现靶向基因输送的方法^[8-11];研究将能够屏蔽电荷的分子,如 PEG 与此高分子连接的方法^[12-13];以及研究此高分子对于 siRNA 的输送能力^[14-16]等等。

致谢 本研究受到 " 重大新药创制 " 科技专项 (2009ZX09310-007 : 针对生物技术药物的相关给药技术平台) 资助。

参考文献 (References)

- [1] Collins, F.S. and V.A. McKusick, Implications of the Human Genome Project for medical science[J]. JAMA, 2001, 285(5): 540-4
- [2] Dalglish, A.G., Why: gene therapy[J]? Gene Ther, 1997, 4(7): 629-30
- [3] Mulligan, R.C., The basic science of gene therapy [J]. Science, 1993, 260(5110): 926-32
- [4] Verma, I.M. and N. Somia, Gene therapy -- promises, problems and prospects[J]. Nature, 1997, 389(6648): 239-42
- [5] Tabor, C.W. and H. Tabor, 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine[J]. Annu Rev Biochem, 1976, 45: 285-306
- [6] Phillips, A.J., The challenge of gene therapy and DNA delivery [J]. J

- Pharm Pharmacol, 2001, 53(9): 1169-74
- [7] Szoka, F., Jr. and D. Papahadjopoulos, Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes) [J]. Annu Rev Biophys Bioeng, 1980,9: 467-508
 - [8] Wu, G.Y. and C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263 (29): 14621-14624
 - [9] Nishikawa, M., et al., Targeted Delivery of Plasmid DNA to Hepatocytes In Vivo: Optimization of the Pharmacokinetics of Plasmid DNA/Galactosylated Poly (l-Lysine) Complexes by Controlling their Physicochemical Properties [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1998, 287(1): 408-415
 - [10] Sobolev, A.S., et al., Receptor-mediated Transfection of Murine and Ovine Mammary Glands in Vivo[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(14): 7928-7933
 - [11] Fominaya, J. and W. Wels, Target Cell-specific DNA Transfer Mediated by a Chimeric Multidomain Protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(18): 10560-10568
 - [12] Katayose, S. and K. Kataoka, Water-Soluble Polyion Complex Associates of DNA and Poly (ethylene glycol)-Poly (l-lysine) Block Copolymer[J]. Bioconjugate Chemistry, 1997, 8(5): 702-707
 - [13] Osada, K., R.J. Christie, and K. Kataoka, Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery[J]. Journal of The Royal Society Interface, 2009, 6(Suppl 3): S325-S339
 - [14] Whitehead, K.A., R. Langer, and D.G. Anderson, Knocking down barriers: advances in siRNA delivery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(2): 129-138
 - [15] Spagnou, S., A.D. Miller, and M. Keller, Lipidic Carriers of siRNA: Differences in the Formulation, Cellular Uptake, and Delivery with Plasmid DNA[J]. Biochemistry, 2004, 43(42): 13348-13356
 - [16] Gary, D.J., N. Puri, and Y.-Y. Won, Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2007, 121(1-2): 64-73