

【基础研究】

后,游离的外源 DNA 即可进入细胞核^[6-7]进行转录和表达。相对分子质量为 25 000 的分枝状 PEI 最早被作为基因载体用于体外转染和基因治疗^[8]。虽然相对分子质量为 25 000 的分枝状 PEI 具有很高的转染效率,但 PEI 的高细胞毒性限制了其在临床治疗中的应用^[9-10]。同时有研究显示,在某些细胞株中 PEI 的转染效率远低于 40%,有学者推测这可能与 PEI 的细胞毒性有关^[10-11]。但是,PEI 作为基因转染载体对不同细胞株的转染效率和细胞毒性间的内在联系尚缺乏研究。本研究对 3 个低转染效率的细胞株和 1 个高转染效率的细胞株(293T)进行了研究,拟阐明 PEI 的转染效率与细胞毒性之间的关系,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人类胚胎肾细胞 293T、人上皮癌细胞 Hela 和大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 购自美国 ATCC 公司,小鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)细胞株取自本实验室。

1.2 主要试剂 相对分子质量 25 000 的分枝状 PEI 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,其工作液浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自生工生物工程(上海)股份有限公司;达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司;测定蛋白浓度的 Quick start Bradford 试剂购自美国 Bio-Rad 公司;荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.3 细胞培养 293T、Hela 和 PC12 细胞用高糖 DMEM(含 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖)培养, BMSC 细胞用低糖 DMEM(含 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖)培养^[12]。细胞培养时,所有的培养基均含体积分数 10% FBS、 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素,置于 37°C 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱,在饱和湿度条件下培养。

1.4 绿色荧光蛋白表达 将 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞按每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,悬浮转染,PEI/DNA 复合物包括 $200 \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), $2 \mu\text{g}$ 质粒(pEGFP)和 $4 \mu\text{g}$ PEI(转染之前 PEI/DNA 复合物在 PBS 中孵育 15 min),置于 37°C 、含体积分数 5% CO_2 培养箱培养 48 h。换培养基之后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白信号,阳性细胞发出明亮的绿色荧光,而阴性细胞则无,每孔选择 3 个视野照相。转染效率(%) = EGFP 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.5 荧光素酶活性检测 参照文献[13],被检测

细胞按每孔 1×10^5 接种于 24 孔板中,悬浮转染,PEI/DNA 复合物包括 $50 \mu\text{L}$ PBS、 $0.5 \mu\text{g}$ 质粒(Renilla)和 $1 \mu\text{g}$ PEI(每孔设 4 个复孔)。于 37°C 、体积分数 5% CO_2 的培养箱培养 48 h, PBS 冲洗 1 次,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 细胞裂解液。室温放置 10 min,用漩涡振荡器震动 10 ~ 15 s,取出所有含细胞碎片的裂解液,转移到微量离心管中, 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。按照荧光素酶检测试剂盒的操作说明,取 $10 \mu\text{L}$ 上清液置于 1.5 mL EP 管中,加入 $40 \mu\text{L}$ 荧光素酶分析底物,放入 GloMax[®] 20/20 光度计中,检测 10 s 内荧光素酶荧光素氧化反应产生的光强度,用相对光度单位(RLU)表示。按照 Quick start Bradford 的操作说明测定蛋白浓度。

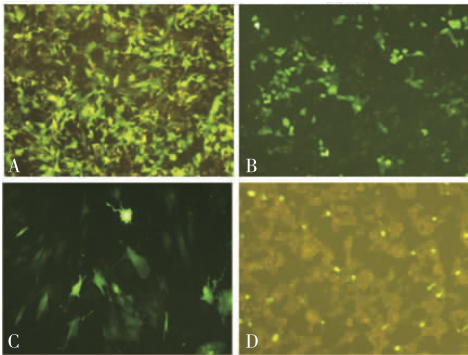
1.6 细胞毒性检测 采用 MTT 比色法分析 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞的毒性^[14]。将被检细胞接种于 96 孔板中,悬浮转染,PEI : DNA ($\mu\text{g} : \mu\text{g}$) = 2,置于 37°C 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱培养 3 d(每个浓度设 4 个复孔),同时设空白孔(不含细胞的完全培养基)和对照孔,PEI : DNA ($\mu\text{g} : \mu\text{g}$) = 0,然后每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无菌 MTT 工作溶液 $20 \mu\text{L}$ 。 37°C 孵育 4 h 后,翻板法弃去孔内所有液体,可见甲臞结晶形成于细胞内,每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砷,震荡 10 min,使甲臞结晶充分溶解。最后在酶联免疫检测仪上测定各孔在 570 nm 波长的吸光度值。细胞活力(%) = (试验组吸光度值 - 空白组吸光度值)/(对照组吸光度值 - 空白组吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间观察指标的比较采用单因素方差分析和最小显著差法,转染效率与细胞毒性的关系采用相关性分析;检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 EGFP 基因转染 荧光倒置显微镜下观察转染 pEGFP 48 h 后的 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞,发现所有被检测的细胞株均有不同程度的绿色荧光蛋白表达,但表达效率差别很大。其中转染效率最高的是 293T 细胞,转染效率最低的是 PC12 细胞(图 1)。运用细胞计数法得出 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞的转染效率分别为 $(92.1 \pm 4.5)\%$ 、 $(29.2 \pm 3.4)\%$ 、 $(21.5 \pm 2.1)\%$ 和 $(17.0 \pm 3.2)\%$ 。经两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),转染效率排序为:293T > Hela > BMSC > PC12。

2.2 荧光素酶报告基因转染 结果显示 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞的荧光素酶活性分别是 2.87×10^8 、 3.35×10^7 、 1.94×10^7 和 $1.08 \times 10^7 \text{ RLU} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 。



A:293T;B:Hela;C:BMSC;D:PC12。

图 1 不同细胞 EGFP 基因转染效率

Fig.1 Gene transfer efficiency with pEGFP DNA in different cell lines

2.3 细胞毒性分析 结果显示,经 PEI 处理后 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞活力分别为 $(33.9 \pm 2.1)\%$ 、 $(44.1 \pm 2.5)\%$ 、 $(54.9 \pm 6.7)\%$ 和 $(80.0 \pm 6.1)\%$ 。经两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 PEI 对 4 种细胞的毒性顺序为:293T > Hela > BMSC > PC12。相关性分析结果显示,转染效率与细胞毒性呈正相关($r = 0.865, P < 0.05$)。

3 讨论

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,从而达到治疗的目的。基因治疗为治疗先天性遗传疾病和严重后天获得性疾病提供了治疗措施和新方法^[3]。PEI 是目前用于基因传递最成功、最广泛的聚合物之一^[4-5]。它具有很高的转染效率,但同时易诱发较强的细胞毒性。

为了阐明 PEI 载体的基因转染效率和 PEI 诱发的细胞毒性的内在联系,本研究利用荧光显微镜分析法确定了 PEI 对 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞的转染效率,293T 细胞获得高达 92.1% 的 EGFP 阳性表达率。与之相比,Hela、BMSC 和 PC12 细胞的 EGFP 阳性率仅为 29.2%、21.5% 和 17.0%。同时,荧光素酶活性检测也支持该结果(293T > Hela > BMSC > PC12 细胞)。这些数据表明 PEI 在各种细胞系中的基因传递效率存在很大差异,也从侧面揭示了 293T 细胞的高基因转染效率或许可以解释为什么 293T 细胞系被广泛用作外源蛋白的表达宿主细胞。

同时,本研究比较了 PEI 对不同细胞株的毒性。MTT 分析法表明 PEI 对 293T、Hela、BMSC 和 PC12 细胞都有一定的细胞毒性,且细胞毒性具有剂量依赖性。Western 印迹法结果与 MTT 法相一致,即细胞毒性高低排序:293T > Hela > BMSC > PC12 细胞。特别是相同条件下[PEI : DNA ($\mu\text{g} : \mu\text{g}$) = 2],PEI

对 4 种细胞株的毒性顺序与 EGFP 和 pLuc 基因转染效率的顺序高度一致,该研究结果提示 PEI 对 4 种细胞的细胞毒性和转染效率正相关,即转染效率越高,PEI 的细胞毒性亦越高。这也正是 PEI 转染试剂发展的瓶颈。如何对 PEI 进行更合理的改造,在保持其高转染效率的同时,有效降低其细胞毒性,将是人们长期的研究目标。

参考文献:

[1] Islam M A, Park T E, Singh B, *et al.* Major degradable polycations as carriers for DNA and siRNA[J]. *J Control Release*, 2014, 193: 74-89.

[2] Zhao X, Cui H, Chen W, *et al.* Morphology, structure and function characterization of PEI modified magnetic nanoparticles gene delivery system[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98919.

[3] 任先越, 杨立群, 梁玄, 等. 阳离子聚合物在非病毒基因转染中的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(5): 568-577.

[4] Sou S N, Polizzi K M, Kontoravdi C. Evaluation of transfection methods for transient gene expression in Chinese hamster ovary cells[J]. *Adv Biosci Biotechnol*, 2013, 4: 1013-1019.

[5] Ehrhardt C, Schmolke M, Matzke A, *et al.* Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent[J]. *Signal Transduct*, 2006, 6: 179-184.

[6] Hsu C Y, Uludağ H. Cellular uptake pathways of lipid-modified cationic polymers in gene delivery to primary cells[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(31): 7834-7848.

[7] Rejman J, Conese M, Hoekstra D. Gene transfer by means of lipopolyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis[J]. *J Liposome Res*, 2006, 16(3): 237-247.

[8] Boussif O, Lezoualch F, Zanta M A, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92(16): 7297-7301.

[9] Lai W F, Jung H S. Cell transfection with a β -cyclodextrin-PEI-propane-1,2,3-triol nanopolymer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100258.

[10] Wang Y Q, Su J, Wu F, *et al.* Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity, and high efficiency for gene delivery[J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 693-704.

[11] Liu Y, You R, Liu G, *et al.* Antheraea pernyi silk fibroin-coated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery in HEK 293 and HCT 116 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 7049-7063.

[12] Yang H J, Xia Y Y, Wang L, *et al.* A novel role for neural cell adhesion molecule in modulating insulin signaling and adipocyte differentiation of mouse mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt15): 2552-2560.

[13] Yamano S, Dai J, Hanatani S, *et al.* Long-term efficient gene delivery using polyethylenimine with modified Tat peptide[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1705-1715.

[14] Ma D, Lin Q M, Zhang L M, *et al.* A star-shaped porphyrin-arginine functionalized poly(L-lysine) copolymer for photo-enhanced drug and gene co-delivery[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(14): 4357-4367.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)