

PEI 在动物皮肤组织基因转化中的应用研究

Study on the Application of PEI for Gene Transfer in Mouse Skin Tissue

刘永军^{1, 2*}, 张爱宁¹, 薛小平²

LIU Yong-Jun^{1, 2*}, ZHANG Ai-Ning¹ and XUE Xiao-Ping²

1 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055

2 西北工业大学生命科学院, 西安 710072

1 College of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055, China

2 Faculty of Life Sciences, Northwest Polytechnical University, Xi'an 710072, China

摘 要 用低分子量的聚乙亚胺(PEI)开发一种新的非病毒基因转染系统,为基因在皮肤组织中的有效转染提供一种可靠、廉价的方法。将带有绿色荧光蛋白报告基因(*gfp*)的真核表达质粒与阳离子聚合物聚乙亚胺结合,用肝癌细胞株 CM7721 试验,研究其转染效率及可能引起的细胞毒性,进一步转染小鼠皮肤组织,研究转染基因的表达位置及持续表达时间。结果发现,低分子量 PEI 介导的细胞转染效率最高可达 55% 转染效率与 PEI 结构无关($P > 0.05$),但是随着 PEI 分子量的增加,其转染活性略有下降。同时,随着分子量的增加,PEI 对细胞的毒性也相应加大;小鼠皮肤转染实验显示,转染 24h 后,*gfp* 即可在皮肤组织的毛囊、汗腺、皮脂腺等处高效表达,表达可持续 7~9d,进一步对皮肤用氮酮、维甲酸处理后,*gfp* 可在皮肤组织的颗粒层细胞中高效表达。PEI 是一种高效、有用的非病毒基因转染载体,能够在体外培养的动物细胞及动物皮肤组织中进行基因转移,这对皮肤疾病的基因治疗具有潜在的应用价值。

关键词 聚乙亚胺(PEI), 绿色荧光蛋白(GFP), 皮肤组织, 转染活性

中图分类号 R394 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)01-0166-05

Abstract A reliable, low-cost, and highly efficient nonviral gene delivery system using lower molecular weight polyethylenimine (LMW-PEI) is provided. LMW-PEI was linked to an expressing plasmid with green fluorescence protein gene (*gfp*), the transfection activity mediated by PEIs were examined in the CM7721 cell line and the skin tissue of mouse, respectively. The cytotoxicity of PEIs, the localization and continuance time of *gfp* expressed in the skin tissue of mouse were also studied. Results showed that the transfection rate of *gfp* mediated by LMW-PEI in the CM7721 cell line was about 55%. However, with the increasing PEI molecular weight, the cytotoxicity of PEI increased, but its transfection activity decreased. The tissue transfection results showed that LMW-PEI induced a significant expression of the *gfp* in the cells of hair vesicle and sweat gland of mouse skin tissues following transfection of 24 h, and the expression of *gfp* lasted 7~9 d. When the tissue of mouse was treated with retinoic acid and nitrogenous ketone, respectively, *gfp* was transferred to the granule layer of mouse skin tissue. The LMW-PEI described here is a new, highly efficient vector; it would be a useful nonviral vector for gene delivery technology.

Key words polyethylenimine, green fluorescence protein, skin tissue, transfection activity

Received: August 3, 2006; Accepted: September 6, 2006.

This work was supported by the grants from the Postdoctoral Foundation of Northwest Polytechnical University (No. P0478048) and the Basis Research Foundation of Xi'an University of Architecture & Technology (No. JC0507).

* Corresponding author: Tel: +86-29-8220-1024, Fax: +86-29-8220-1024, E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

西北工业大学博士后基金(No. P0478048)和西安建筑科技大学基础研究中心基金(No. JC0507)研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

聚乙亚胺(PEI)是一种线状或分支状的多聚阳离子聚合物,是一种新的非病毒基因转染系统^[1]。分子量在25~800kD的PEI已经成功应用于体内或体外的基因转移。但是,高分子量的PEI对细胞的潜在毒性也相对较大,这就大大地影响了其在生物医学领域的应用范围。所以,开发一种更为有效、毒性更低的基因转染试剂就成为当务之急。目前的研究显示,低分子量的PEI同样有效地进行基因转移,已成功应用于呼吸道上皮细胞、人类软骨样HCS-2/8细胞等的基因转化^[2,3]。本文用低分子量的PEI进行研究,用肝癌细胞系CM7721以及小鼠皮肤组织进行实验,结果显示,低分子量聚阳离子脂质体能够将绿色荧光蛋白基因(*gfp*)成功转入小鼠皮肤组织并有效表达,这对进一步开发皮肤疾病的基因治疗药物具有重要的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

CM7721肝癌细胞株,本实验室保存;昆明小白鼠(25~30g),购自第四军医大学实验动物中心;聚乙亚胺(PEI)购自Sigma公司,带有*gfp*的真核表达质粒,本实验室保存;绿色荧光蛋白(GFP)抗体,购自Sigma公司;SABC免疫组化试剂盒,购自华美生物工程公司;1640培养基,GIBCO产品;胎牛血清,购自原平公司。其余化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PEI/DNA复合物的形成:在pH值6.0条件下,将分子量为600D、1800D、12000D、25000D的直链(支链)PEI与质粒DNA分别按1:1的质量比在5%的葡萄糖水溶液中混合(PEI和DNA质粒的浓度均为1mg/mL),同时加入四氢叶酸(终浓度为20 μ mol/L)和15%的聚乙二醇(PEG)。反应温度为37 $^{\circ}$ C,反应时间为30min。结合所形成的PEI/DNA复合体分别转染入肝癌细胞株CM7721和昆明小白鼠皮肤组织。

1.2.2 细胞培养:CM7721细胞株接种于含有100mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下,连续培养。待细胞长到培养面积的85%的时候,进行转染。

1.2.3 肝癌CM7721细胞转染及检测:取处于对数生长期的CM7721细胞 1×10^6 个,用PBS洗2次,重悬于0.8mL无血清培养液中。分别取40 μ L的PEI/DNA复合物加入到0.8mL重悬的细胞中,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养8h之后,每隔24h取样观察,连续

培养10d。观察时,将细胞固定,在荧光显微镜下观察并对阳性细胞记数,设阴性对照,细胞有绿色荧光信号为阳性。

1.2.4 细胞毒性检测:分别在CM7721细胞转染后24h、48h、72h、96h、120h时,取细胞置普通光学显微镜下观察细胞形态的变化,并经台盼蓝染色,以不加转染试剂的CM7721细胞作为对照,计算细胞死亡率。

1.2.5 小鼠皮肤细胞转染及检测:将小鼠皮肤用15%硫化钠脱毛处理,12h后进行皮肤转染试验。转染时将50 μ L的PEI/DNA复合物均匀涂抹在处理过的小鼠皮肤表面,然后对小鼠进行正常饲养。每隔24h取小鼠皮肤,做冰冻切片并用荧光显微镜直接观察GFP表达情况,同时做石蜡切片,通过免疫组织化学的方法检测GFP在皮肤组织中的表达情况并用普通光学显微镜对绿色荧光蛋白表达部位相应的组织结构和细胞结构进行确定。

1.2.6 免疫组织化学分析(IHC):将小鼠皮肤组织标本经过10%甲醛固定,石蜡包埋后5 μ m切片。组织切片在覆盖有多聚赖氨酸的载玻片上于37 $^{\circ}$ C下烤片12~24h。免疫组织化学实验采用SABC试剂盒。1抗为GFP抗体,染色步骤按SABC试剂盒说明书进行。细胞浆着色,阳性信号呈棕黄色颗粒。

2 结果

2.1 *gfp*在CM7721细胞中的表达

用分子量为600D的PEI/DNA复合物转染CM7721细胞,每隔24h取样观察,检测细胞阳性率。结果发现,转染24h后就有GFP表达,细胞转染效率可达50%以上,表达可持续5~7d。图1为CM7721细胞转染48h后的观察结果。

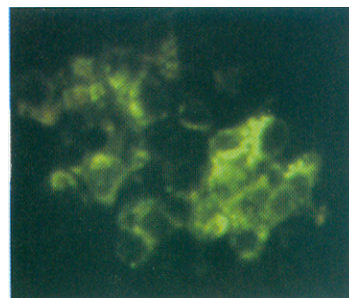


图1 *gfp*在CM7721细胞中的表达

Fig.1 Expression of *gfp* in CM7721 cell($\times 2000$)

2.2 PEI结构及其分子量与细胞转染效率的关系
用不同分子量(600D~25000D)的直链和支链PEI与DNA在pH为6.0的条件下形成的复合物转

染肝癌 CM7721 细胞,48 h 后检测阳性率。结果发现,转染效率与 PEI 结构无关 ($P > 0.05$)。分子量为 600D 的直链/支链 PEI 在 pH 值为 6.0 时,细胞转染效率最高为 $(55.3 \pm 4.3)\%$ 。随着分子量的增大,转染效率略有下降。PEI 分子量为 25000D 时,转染效率为 $(40 \pm 3.2)\%$,与分子量为 600D 时有显著差异 ($P < 0.05$),见图 2。

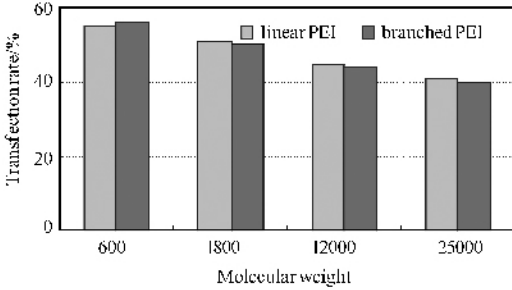


图 2 PEI 结构及其分子量与细胞转染活性的关系
Fig.2 Relationship among PEI structure, MW and its transfection activity

2.3 PEI 浓度对细胞转染效率的影响

在 PEI 与 DNA 结合的时候,分别将 PEI (MW 600D) 的浓度调整为 0mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL、1.5mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL, DNA 浓度为 1.0 mg/mL,其他条件不变。转染肝癌 CM7721 细胞后发现,PEI 和 DNA 的浓度均为 1.0mg/mL 的时候,转染效率最高,与 PEI 浓度为 0.5mg/mL 时的转染效率有显著性差异 ($P < 0.05$)。当 PEI 的浓度升高时,转染效率没有发生变化 ($P > 0.05$) (图 3)。

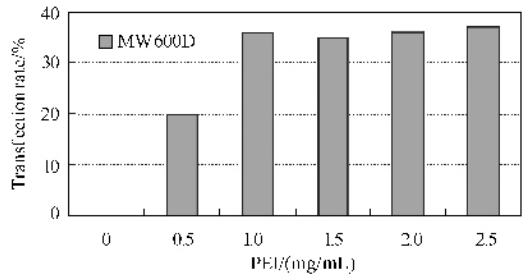


图 3 PEI 的浓度与细胞转染活性的关系
Fig.3 Relationship between PEI concentration and its transfection activity

死亡率,以此确定 PEI 对细胞的毒性。结果分子量为 600D 的直链/支链 PEI 都没有引起细胞毒性或使细胞形态改变或死亡,但是随着分子量的增大,PEI 对细胞的毒性也相应加大 (图 4)。

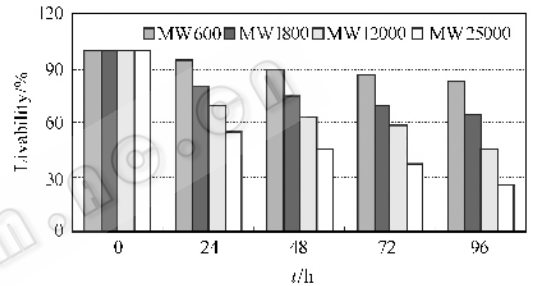


图 4 PEI 对细胞的毒性试验
Fig.4 Cytotoxicity of PEI on CM7721 cell line

2.4 PEI 对细胞的毒性试验

用不同分子量的直链、支链 PEI/DNA 复合物 40μL 转染 CM7721 细胞 (PEI 与质粒 DNA 的质量比为 1:1),分别在 24h、48h、72h、96h、120h 的时候用台盼蓝对细胞染色,然后在光学显微镜下观察细胞的

2.5 小鼠皮肤组织转染试验

用不同分子量、不同结构的 PEI/DNA 复合物转染经脱毛处理的小鼠皮肤细胞,结果发现 (图 5),转染 24h 后,就可以观察到 GFP 在小鼠皮肤组织中有所表达,但是表达只是局限在皮肤毛囊细胞、汗腺及皮脂腺细胞中,而在皮肤组织的其它地方未观察到有 GFP 的表达,表达可持续 7d,PEI 的结构以及分子量的大小对转染效率的影响不大。

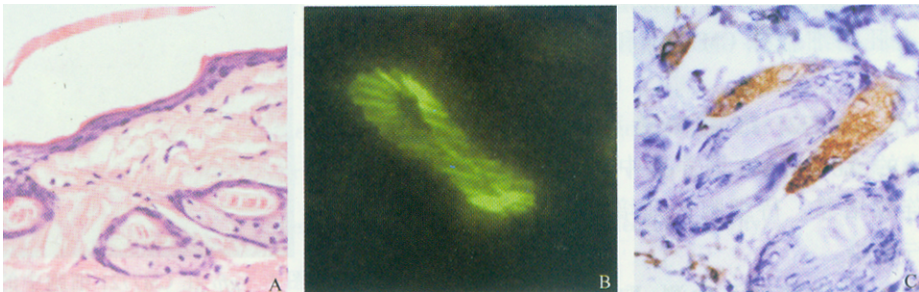


图 5 *gfp* 在皮肤毛囊细胞中的表达

Fig. 5 Expression of *gfp* in the cell of hair vesicle

A: HE staining of skin tissues, which showed cells of hair vesicle; B: Green fluorescence signal is the positive expression of GFP in the cells of hair vesicle; C: Immunohistochemistry showed the positive expression of GFP in the cells of hair vesicle.

2.6 氮酮、维甲酸对 *gfp* 在小鼠皮肤组织中转染的影响

将小鼠皮肤用 15% 硫化钠脱毛处理, 处理 12h 后, 再将经脱毛处理后的皮肤用 2% 的氮酮和 0.03% 的维甲酸涂抹处理, 2h 后用 PEI/DNA 复合物进行皮肤转染试验, 转染 24 h 后取样分析。结果发现, GFP 不仅在小鼠皮肤毛囊细胞、汗腺及皮脂腺细胞中有所表达, 而且在皮肤组织的颗粒层也观察到有 GFP 的高效表达。这说明小鼠皮肤经过氮酮和维甲酸的处理后, 皮肤的角质层去掉同时增加了皮肤的通透性, 这就使得质粒 DNA 能够到达皮肤的颗粒层细胞并表达。如图 6 所示。

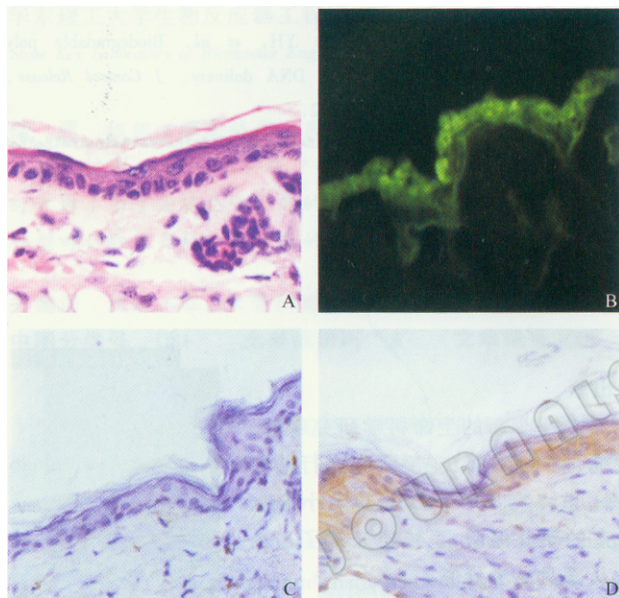


图 6 *gfp* 在皮肤颗粒层细胞中的表达

Fig. 6 Expression of *gfp* in the cells of granule layer

A: HE staining of skin tissues, which showed cells of granule layer; B: green fluorescence signal is the positive expression of GFP in the cells of granule layer; C: immunohistochemistry negative control; D: immunohistochemistry, which showed the positive expression of GFP in the cells of granule layer.

3 讨论

目前, 基因转移的方法分为生物学方法、物理方法和化学方法。腺病毒载体是目前基因治疗最为常用的病毒载体之一。脂质体作为一种可供选择的基因载体, 具有无毒、无免疫原性、可生物降解的特点, 可保护质粒 DNA 被核酸酶降解^[4], 能将目的基因 DNA 特异传递到靶细胞中。聚乙亚胺(PEI)是一类阳离子多聚体, 其结构特点为每隔 3 个原子即出现氨基氮, 这就构成了多聚网状结构, 从而与 DNA 结合, 在适当条件下均能将 DNA 浓缩为相似的超环结

构, 通过细胞的内吞途径(endocytosis pathway)进行基因的转移^[5], 目前被认为是基因治疗最为有效的非病毒载体之一^[6]。目前在美国实施的基因治疗方案中阳离子脂质体介导的基因传递系统占 12 项。关于 PEI 介导的基因转染的研究, 近年来在国外有很多报道^[7-9]。

本文分别用 4 个不同分子量的聚乙亚胺进行研究, 用肝癌细胞系 CM7721 做靶细胞, 通过检测 GFP, 研究其转染活性。结果显示, 聚阳离子脂质体显示出非同一般的转染效率。进一步研究 PEI 的结构以及分子量与转染效率的关系, 结果发现分子量为 1800D、12000D 的 PEI 转染效果与分子量为 600D 的 PEI 一样, 但是分子量为 25000D 时, 转染效率远远降低。这可能是因为小分子 PEI 与 DNA 形成的复合物不易聚集成较大的结构^[10], PEI 分子量大, 形成的复合物结构相应的也大, 这样不容易进入细胞, 从而使转染效率下降。但是, 转染效率的高低与 PEI 的结构没有多大的关系。这与 Jeong JH 等^[11, 12]报道的结果有所区别。关于 PEI 的分子量与细胞毒性的关系, 研究发现, 随着分子量的增大细胞毒性也相应增大, 这与 Bieber T 等^[13-15]的研究结果一致。

用 PEI/DNA 复合物对小鼠皮肤组织进行转染, 通过 GFP 的表达位置以及表达持续时间等的研究结果显示, *gfp* 在皮肤组织的毛囊、汗腺、皮脂腺等处高效表达, 表达可持续 7d。进一步将小鼠皮肤用氮酮、维甲酸等处理后, 发现 *gfp* 能够进入皮肤颗粒层细胞并表达, 有关这方面的研究结果在国内外还未见报道。此项研究结果对于进一步研究开发银屑病等与人体自身性免疫相关的皮肤疾病的基因治疗药物具有重要的意义。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Yamazaki Y, Nango M, Matsuura M, et al. Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethylenimine. *Gene Ther*, 2000, 7(13): 1148-1155.
- [2] Gautam A, Densmore CL, Golunski E, et al. Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol Ther*, 2001, 3(4): 551-556.
- [3] Ohashi S, Kubo T, Ikeda T, et al. Cationic polymer-mediated genetic transduction into cultured human chondrosarcoma-derived HCS-2/8 cells. *J Orthop Sci*, 2001, 6(1): 75-81.
- [4] Boussif O, Zanta MA, Behr TP. Optimized galentics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000 fold. *Gene Ther*, 1996, 3(12): 1074-1080.
- [5] Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(16): 7297

- [6] Remy-Kristensen A , Clamme JP , Vuilleumier C , *et al.* Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* , 2001 , **1514**(1) : 21 – 32.
- [7] Coll JL , Chollet P , Brambilla E , *et al.* *In vivo* delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine. *Hum Gene Ther* , 1999 , **10**(10) : 1659 – 1666.
- [8] Florea BI , Meaney C , Junginger HE , *et al.* Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS Pharm Sci* , 2002 , **4**(3) : E12.
- [9] Kursa M , Walker GF , Roessler V , *et al.* Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem* , 2003 , **14**(1) : 222 – 231.
- [10] Kircheis R , Kichler A , Wallner G , *et al.* Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* , 1997 , **4**(5) : 409 – 418.
- [11] Jeong JH , Song SH , Lim DW , *et al.* DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). *J Control Release* , 2001 , **73**(2 – 3) : 391 – 399.
- [12] Wightman L , Kircheis R , Rossler V , *et al.* Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery *in vitro* and *in vivo* . *J Gene Med* , 2001 , **3**(4) : 362 – 372.
- [13] Bieber T , Elsasser HP. Preparation of a low molecular weight polyethylenimine for efficient cell transfection. *Biotechniques* , 2001 , **30**(1) : 74 – 77 , 80 – 81 .
- [14] 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. *Pharm Res* , 1999 , **16**(8) : 1273 – 1279.
- [15] Ahn CH , Chae SY , Bae YH , *et al.* Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release* , 2002 , **80**(1 – 3) : 273 – 282.