

[文章编号] 1674-8115(2011)06-0733-06

· 论著 ·

## 新型非病毒纳米基因载体 PEI- $\beta$ -CyD 对软骨细胞和骨髓间充质干细胞转染有效性评估

童海骏<sup>1</sup>, 黄金刚<sup>1</sup>, 汤谷平<sup>2</sup>, 戴魁戎<sup>1,3</sup>, 张晓玲<sup>1,3</sup>

(1. 上海交通大学医学院/中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所骨科细胞与分子生物学实验室, 上海 200025; 2. 浙江大学化学生物和药物研究所, 杭州 310028; 3. 上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科 上海市骨科内植物重点实验室, 上海 200011)

**[摘要]** 目的 评估新型非病毒纳米基因载体聚乙烯亚胺-β-环糊精(PEI- $\beta$ -CyD)对软骨细胞系C5.18和骨髓间充质干细胞系C3H10T1/2转染的有效性。方法 体外培养软骨细胞系C5.18和骨髓间充质干细胞系C3H10T1/2, MTT法观察并比较PEI- $\beta$ -CyD和相对分子质量为25 000的聚乙烯亚胺(PEI25KDa)对C5.18细胞和C3H10T1/2细胞的细胞毒性。在不同的N/P(载体有效氮含量/外源基因有效磷含量)复合条件下, 利用PEI- $\beta$ -CyD和PEI25KDa分别转染C5.18细胞和C3H10T1/2细胞, 倒置荧光显微镜结合流式细胞仪分析转染效率。结果 PEI- $\beta$ -CyD对C5.18细胞和C3H10T1/2细胞的细胞毒性均小于PEI25KDa。PEI- $\beta$ -CyD与PEI25KDa对C5.18细胞的转染效率比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) ; PEI- $\beta$ -CyD对C3H10T1/2细胞的转染效率显著高于PEI25KDa( $P < 0.05$ )。结论 PEI- $\beta$ -CyD对于软骨细胞系C5.18及骨髓间充质干细胞系C3H10T1/2是一种低毒有效的非病毒纳米基因载体, 在软骨组织工程和细胞治疗研究及应用领域具有良好的开发前景。

**[关键词]** 非病毒纳米基因载体; PEI- $\beta$ -CyD; 细胞毒性; 转染效率

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.06.012

[中图分类号] Q813;R68

[文献标志码] A

## Evaluation of transfection efficiency of novel non-viral nano gene vector PEI- $\beta$ -CyD on chondrocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells

TONG Hai-jun<sup>1</sup>, HUANG Jin-gang<sup>1</sup>, TANG Gu-ping<sup>2</sup>, DAI Ke-rong<sup>1,3</sup>, ZHANG Xiao-ling<sup>1,3</sup>

(1. Laboratory of Orthopaedical Cellular and Molecular Biology, Institute of Health Sciences, Shanghai Jiaotong University School of Medicine & Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Institute of Chemical Biology and Pharmaceutical Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implant, Department of Orthopaedics, the Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the transfection efficiency of novel non-viral nano gene vector polyethyleneimine- $\beta$ -cyclodextrin (PEI- $\beta$ -CyD) on chondrocyte cell line C5.18 and bone marrow-derived mesenchymal stem cell line C3H10T1/2. **Methods** Chondrocyte cell line C5.18 and bone marrow-derived mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 were cultured *in vitro*, and the cytotoxicity of PEI- $\beta$ -CyD and PEI25KDa (polyethyleneimine of 25 000 in molecular weight) on C5.18 cells and C3H10T1/2 cells was observed and compared by MTT method. C5.18 cells and C3H10T1/2 cells were transfected with PEI- $\beta$ -CyD and PEI25KDa respectively under different ratios of effective nitrogen content in vectors to effective phosphorus content in exogenous gene (N/P), and the transfection efficiency was analysed by inverted fluorescent microscopy and flow cytometry. **Results** The cytotoxicity of PEI- $\beta$ -CyD was significantly lower than that of PEI25KDa to both C5.18 cells and C3H10T1/2 cells. For C5.18 cells, there was no significant difference in transfection efficiency between PEI- $\beta$ -CyD and PEI25KDa ( $P > 0.05$ ), and for C3H10T1/2 cells, transfection efficiency of PEI- $\beta$ -CyD was

[基金项目] 国家科技部国际合作项目(2011DFA30790); 国家自然科学基金国际合作项目(30811120440); 国家自然科学基金(30871435); 上海市科委国际合作项目(09540703600); 上海教委重点学科建设基金(J50206)(Foundation of the Ministry of Science and Technology of China, S2011CR0323; National Natural Science Foundation of China, 30811120440, 30871435; Foundation of Shanghai Science and Technology Committee, 09540703600; Foundation of Shanghai Education Committee, J50206)。

[作者简介] 童海骏(1985—), 男, 硕士; 电子信箱: korean.moon@yahoo.com.cn。

[通信作者] 张晓玲, 电子信箱: xlzhang@sibs.ac.cn。

significantly higher than that of PEI25KDa ( $P < 0.05$ )。Conclusion PEI- $\beta$ -CyD is an ideal non-viral nano gene vector with low cytotoxicity and favorable transfection efficiency for chondrocyte cell line C5.18 and bone marrow-derived mesenchymal stem cell line C3H10T1/2, which is promising in the research and application of cartilage tissue engineering and cell therapy。

[Key words] non-viral nano gene vector; PEI- $\beta$ -CyD; cytotoxicity; transfection efficiency

长期以来,关节软骨的修复问题是骨科学与运动医学领域面临的巨大挑战,关节镜下的清理术和微骨折术、开放性自体软骨移植和异体软骨移植是目前仅有的治疗方法。前者仅能处理较小的缺损,且只能生成韧性较差的纤维软骨,无法满足关节功能需要;后者存在供体来源有限、移植排斥、传播疾病和远期效果不确定等问题。因此,现有治疗方法均无法有效满足临床治疗的要求。随着组织工程技术与细胞培养技术的不断发展,对于软骨缺损的治疗逐渐转向组织工程和细胞治疗技术,其如能与有效的基因运输技术相结合,在治疗过程中特异性地增加促进软骨分化与增殖基因的表达,将大幅度提高治疗效果。

寻找低毒而有效的基因输送体系一直是组织工程和细胞治疗技术应用于临床的瓶颈。纳米技术凭借其在溶解性、细胞毒性和粒径控制等方面的优势,为基因输送领域的研究提供了新方法。近年来,许多研究<sup>[1]</sup>尝试运用纳米技术对非病毒基因载体进行改造。聚乙烯亚胺- $\beta$ -环糊精(polyethyleneimine- $\beta$ -cyclodextrin, PEI- $\beta$ -CyD)是一种新型非病毒纳米基因载体,是由小相对分子质量聚乙烯亚胺(相对分子质量600)与 $\beta$ -环糊精通过羧基酰胺键相互结合而成的一种纳米尺寸的聚合物。PEI- $\beta$ -CyD与质粒DNA形成的复合物有较为理想的纳米结构,粒径约200 nm,原子力显微镜观察该复合物的粒子有着近似圆形的形态。此外,PEI- $\beta$ -CyD有较佳的生物可降解性,降解产物为低细胞毒性的小相对分子质量聚乙烯亚胺和 $\beta$ -环糊精<sup>[2]</sup>。

在软骨组织工程和细胞治疗中应用最广泛的种子细胞为骨髓间充质干细胞和软骨细胞。本研究选择软骨细胞系C5.18和骨髓间充质干细胞系C3H10T1/2作为靶细胞,研究新型非病毒纳米基因载体PEI- $\beta$ -CyD对这两类细胞的细胞毒性和转染效率,并且优化转染条件,为PEI- $\beta$ -CyD在软骨组织工程和细胞治疗的体内外研究与应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

C5.18细胞系(ATCC);C3H10T1/2细胞系(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);胰蛋白酶、DMEM/High Glucose、 $\alpha$ -MEM、胎牛血清和双抗(Hyclone);MTT(Sigma);质粒pEGFP-N1和细胞计数仪(Invitrogen);流式细胞仪(BD);倒置荧光显微镜(Nikon)。非病毒纳米基因载体PEI- $\beta$ -CyD,相对分子质量25 000的聚乙烯亚胺(PEI25KDa)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PEI- $\beta$ -CyD合成**  $\beta$ -环糊精(0.42 g, 0.37 mmol)和羧基(0.80 g, 5.2 mmol)溶解于6 mL二甲基甲酰胺,室温下混合物搅拌1 h(此过程需在氮气保护的环境下进行)。利用冷的乙醚将环糊精-羧基沉淀析出并过滤,过滤产物溶解于5 mL二甲基亚砜,4℃保存。相对分子质量为600的PEI(1.5 g)溶解于3 mL二甲基亚砜,将制备好的5 mL环糊精-羧基和0.3 mL三乙胺逐滴加入PEI溶液,持续搅拌1.5 h。继续反应5 h,将反应产物PEI- $\beta$ -CyD通过透析的方法溶解入水中。透析2 d后,将产物冻干,2 d后获得冻干的PEI- $\beta$ -CyD。

**1.2.2 细胞系培养** C5.18细胞的培养基为 $\alpha$ -MEM+10%胎牛血清+1%双抗,长满后1/3传代,2 d后长满并传代。C3H10T1/2细胞的培养基为DMEM/High Glucose+10%胎牛血清+1%双抗,长满后1/3传代,3 d后长满并传代。

**1.2.3 载体细胞毒性测定** 利用胰酶消化细胞后,培养基重悬细胞。利用细胞计数仪进行计数,并将细胞密度调整至 $1 \times 10^5$ 个/mL,向96孔板的每个孔中加入200  $\mu$ L细胞。在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,培养基替换为无血清培养基,同时分别加入PEI- $\beta$ -CyD和PEI25KDa,每孔加入5  $\mu$ L,共设10个浓度梯度。作用4 h后,弃去培养基,每孔加入200  $\mu$ L(0.5 mg/mL)的MTT,作用4 h后倒置显微镜观察到细胞内有紫色结晶。弃去上清,每孔加入

200 μL DMSO, 放入摇床, 37 °C、100 r/min 孵育20 min 溶解紫色结晶。紫色结晶溶解后, 放入酶标仪进行吸光度测量, 测试波长 570 nm, 参考波长630 nm。测试波长与参考波长的吸光度差值即为最终的吸光度值, 样品(加入非病毒纳米基因载体)与对照(未加非病毒纳米基因载体)的吸光度比值即为细胞活力百分比。绘制细胞存活率曲线, 观察 PEI-β-CyD 和 PEI25KDa 对细胞的半抑制浓度(抑制率达到 50% 时 PEI-β-CyD 和 PEI25KDa 的浓度)。

**1.2.4 细胞转染** C5.18 细胞的种板密度为  $2 \times 10^5$  个/孔, 每孔 1 mL。C3H10T1/2 细胞接种于 12 孔板, 种板密度为  $1 \times 10^5$  个/孔, 每孔 1 mL。24 h 后, 显微镜下观察细胞密度, 细胞密度达 80%~90% 时进行转染。转染时, 首先弃去培养基, 然后用 PBS 清洗细胞 1 次, 再加入准备好的转染液。转染液配制时, 根据不同的 N/P 比(载体有效氮含量/外源基因有效磷含量), 向 40 μL、0.05 mg/mL 的带有绿色荧光蛋白基因的质粒 (enhanced green fluorescent protein plasmid, pEGFP) 中加入不同浓度的等体积 PEI-β-CyD 或 PEI25KDa, 震荡混匀 0.5 min, 静置 30 min。再加入 1 mL 无血清培养基对复合物进行重悬, 静置 5 min, 转染液制备完成。转染 4 h 后, 弃去培养基, 加入 1 mL 完全培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 培养箱内培养 48 h 后收样。

**1.2.5 转染效率的定量分析** 细胞转染结束后, 倒置荧光显微镜观察并摄片。摄片后, 利用胰酶消化细胞并收集于流式管中, 离心弃去上清后, 加入 500 μL PBS 将细胞重悬。流式细胞仪对重悬的细胞进行统计分析, 定量计算发出绿色荧光的细胞占总细胞的百分比, 细胞的统计总数为 10 000。

### 1.3 统计学方法

采用 Excel 2007 软件计算并统计细胞存活率和转

染效率, Sigma Plot 10 软件绘制曲线图和柱状图。组间比较采用 t 检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 载体细胞毒性测定

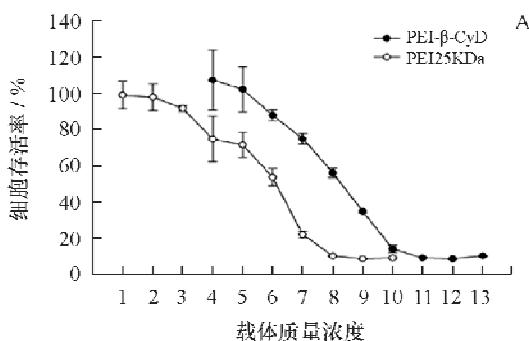
MTT 检测显示, 加入 PEI-β-CyD 的 C5.18 细胞和 C3H10T1/2 细胞存活率分别高于加入 PEI25KDa 的 C5.18 细胞和 C3H10T1/2 细胞存活率(图 1), PEI-β-CyD 对 C5.18 细胞和 C3H10T1/2 细胞的细胞毒性均低于 PEI25KDa; PEI-β-CyD 对 C3H10T1/2 细胞的半抑制浓度高于其对 C5.18 细胞的半抑制浓度, 而 PEI25KDa 对 C5.18 细胞的半抑制浓度高于其对 C3H10T1/2 细胞的半抑制浓度。

### 2.2 载体转染细胞最适 N/P 测定

**2.2.1 载体转染 C5.18 细胞最适 N/P 测定** PEI-β-CyD 的 N/P 达 240 时, 复合物对 C5.18 细胞产生细胞毒性, 细胞形态发生改变, 细胞间隙增大, 细胞出现脱壁现象(图 2A); N/P 为 120 时, 复合物对 C5.18 细胞的转染效率最高(图 2B、C)。PEI25KDa 的 N/P 达 40 时, 复合物对 C5.18 细胞产生细胞毒性, 细胞形态发生改变, 细胞间隙增大, 细胞出现脱壁现象(图 2D); N/P 为 10 时, 复合物对 C5.18 细胞的转染效率最高(图 2E、F)。

### 2.2.2 载体转染 C3H10T1/2 细胞最适 N/P 测定

PEI-β-CyD 的 N/P 达 240 时, 复合物对 C3H10T1/2 细胞产生非常明显的细胞毒性, 大部分细胞呈皱缩状态, 出现较多的细胞碎片和漂浮的死细胞(图 3A); N/P 为 120 时, 复合物对 C3H10T1/2 细胞的转染效率最高(图 3B、C)。PEI25KDa 的 N/P 达 40 时, 复合物对 C3H10T1/2 细胞产生非常明显的细胞毒性(图 3D); N/P 为 20 时, 复合物对 C3H10T1/2 细胞的转染效率最高(图 3E、F)。



A. C5.18 细胞; B. C3H10T1/2 细胞; 1. 0.000 976 562 5 μg/μL; 2. 0.001 953 125 μg/μL; 3. 0.003 906 25 μg/μL; 4. 0.007 812 5 μg/μL; 5. 0.015 625 μg/μL; 6. 0.03 125 μg/μL; 7. 0.062 5 μg/μL; 8. 0.125 μg/μL; 9. 0.25 μg/μL; 10. 0.5 μg/μL; 11. 1.0 μg/μL; 12. 2.0 μg/μL; 13. 4.0 μg/μL。

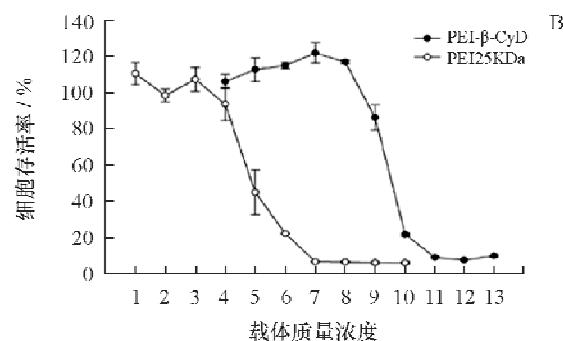


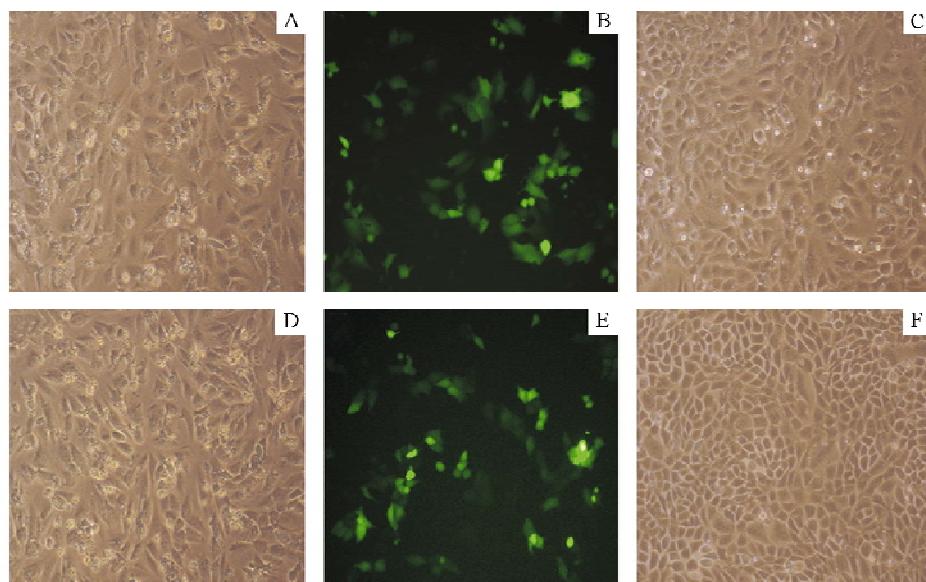
图 1 PEI-β-CyD 和 PEI25KDa 的细胞毒性测定

Fig 1 Cytotoxicity of PEI-β-CyD and PEI25KDa

### 2.3 载体转染效率定量分析

**2.3.1 载体转染 C5.18 细胞效率分析** 对于 C5.18 细胞, PEI- $\beta$ -CyD 在 N/P 为 120 时转染效率最高(约 27%), PEI25KDa 在 N/P 为 10 时转染效率最高(约 30%), 两者比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。当 N/P 为 25~120, PEI- $\beta$ -CyD 的转染效率随 N/P 的升高而升高;当 N/P 为 4~10, PEI25KDa 的转染效率随 N/P 的升高而升高(图 4)。

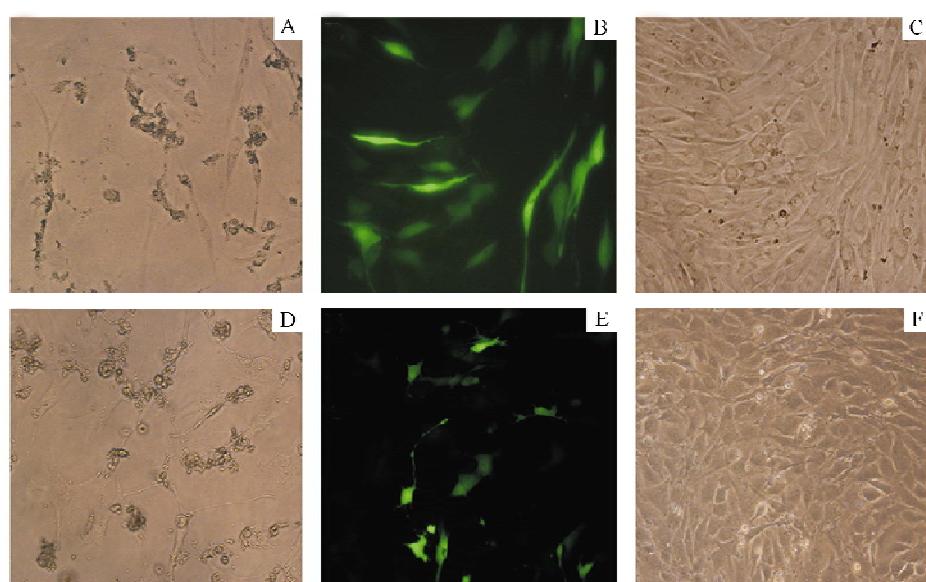
**2.3.2 载体转染 C3H10T1/2 细胞效率分析** 对于 C3H10T1/2 细胞, PEI- $\beta$ -CyD 在 N/P 为 120 时转染效率最高(约 20%), PEI25KDa 在 N/P 为 20 时转染效率最高(约 10%), PEI- $\beta$ -CyD 对 C3H10T1/2 细胞的最佳转染效率显著高于 PEI25KDa( $P < 0.05$ )。当 N/P 为 25~120, PEI- $\beta$ -CyD 的转染效率随 N/P 的升高而升高;当 N/P 为 4~20, PEI25KDa 的转染效率随 N/P 的升高而升高(图 5)。



A. PEI- $\beta$ -CyD (N/P = 240); B. PEI- $\beta$ -CyD (N/P = 120); C. PEI- $\beta$ -CyD (N/P = 120); D. PEI25KDa (N/P = 40); E. PEI25KDa (N/P = 10); F. PEI25KDa (N/P = 10)。

图 2 PEI- $\beta$ -CyD 和 PEI25KDa 对 C5.18 细胞转染效果观察  $\times 200$

Fig 2 Transfection effect of PEI- $\beta$ -CyD and PEI25KDa on C5.18 cells  $\times 200$



A. PEI- $\beta$ -CyD (N/P = 240); B. PEI- $\beta$ -CyD (N/P = 120); C. PEI- $\beta$ -CyD (N/P = 120); D. PEI25KDa (N/P = 40); E. PEI25KDa (N/P = 20); F. PEI25KDa (N/P = 20)。

图 3 PEI- $\beta$ -CyD 和 PEI25KDa 对 C3H10T1/2 细胞转染效果观察  $\times 200$

Fig 3 Transfection effect of PEI- $\beta$ -CyD and PEI25KDa on C3H10T1/2 cells  $\times 200$

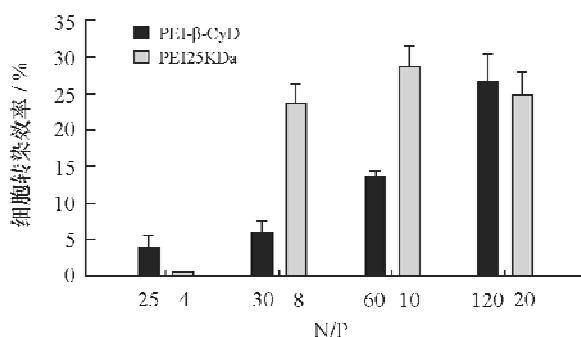


图 4 PEI- $\beta$ -CyD 和 PEI25KDa 对 C5.18 细胞的转染效率与 N/P 的关系

Fig 4 Relationship between N/P and transfection efficiency of PEI- $\beta$ -CyD and PEI25KDa on C5.18 cells

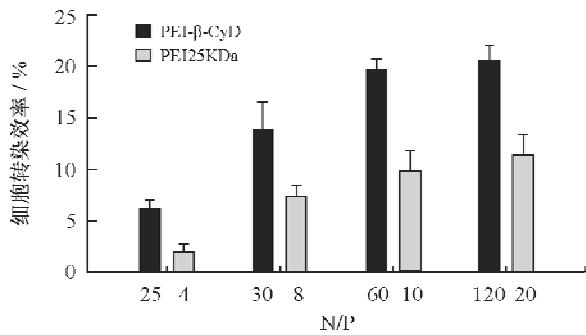


图 5 PEI- $\beta$ -CyD 和 PEI25KDa 对 C3H10T1/2 细胞的转染效率与 N/P 的关系

Fig 5 Relationship between N/P and transfection efficiency of PEI- $\beta$ -CyD and PEI25KDa on C3H10T1/2 cells

### 3 讨 论

非病毒纳米基因载体的研发是近年来国际研究的热点领域,也是使基因(分子)治疗应用于临床的关键突破点。第1例基因治疗<sup>[3]</sup>至今已有20多年的历史,然而时至今日仍然缺乏安全有效的临床治疗基因载体。目前,常用的基因载体主要分为病毒基因载体和非病毒基因载体<sup>[4-6]</sup>,病毒基因载体的安全性问题制约了其临床使用,因此,开发新型有效的非病毒基因输送体系迫在眉睫。目前主流的非病毒基因载体又可分为阳离子脂质体和阳离子聚合物。在阳离子聚合物中,相对分子质量为25 000的PEI25KDa由于在一些常见细胞系中有较高的转染效率而被公认为是该类非病毒基因载体的典型代表<sup>[7, 8]</sup>,但其依然存在着较强的细胞毒性等缺点。有研究<sup>[9]</sup>显示,聚乙烯亚胺的转染效率和细胞毒性与其相对分子质量有着极为密切的关系,高相对分子质量聚乙烯亚胺虽具有较好的转染效率,但同时也产生了较大的细胞毒性;相反,低相对分子质量聚乙烯亚胺具有较低的细胞毒性,但转染效率却较低。

近年来,很多研究致力于PEI25KDa的化学改造,希望在不影响其转染效率的同时尽量降低其细胞毒性<sup>[10]</sup>。目前常见的研究思路有两个,其中之一就是将小相对分子质量的聚乙烯亚胺通过细胞内可降解的化学键进行连接,这样由于其在转染过程中能够与质粒之间形成较为紧密而稳定的复合物,使得复合物内的质粒不易被核酸酶降解,而转染之后又能够降解为低细胞毒性的小相对分子质量聚乙烯亚胺,从而在保证了转染效率的同时,尽可能地降低细胞毒性<sup>[11]</sup>;另一研究思路就是在小相对分子质量聚乙烯亚胺的基础上接枝一些有利于细胞转染的化学基团,从而提高其转染效率。本研究即将 $\beta$ -环糊精接枝到小相对分子质量聚乙烯亚胺构筑新型非病毒纳米载体PEI- $\beta$ -CyD。 $\beta$ -环糊精是一类由 $\alpha$ -1,4-糖苷键将6~12个D-吡喃葡萄糖单元首尾相连组成的环状低聚糖,目前研究较多并且有重要意义的是含有6、7、8个吡喃葡萄糖单元分子的环糊精,分别称为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -环糊精,本研究所接枝的环糊精即为 $\beta$ -环糊精。已有研究<sup>[12, 13]</sup>显示, $\beta$ -环糊精可以通过与细胞膜上的胆固醇发生作用,从而提高其内吞能力。

骨髓间充质干细胞和软骨细胞在软骨组织工程和细胞治疗领域具有十分重要的地位,是临床治疗的重要种子细胞和靶细胞。我们的研究发现,PEI- $\beta$ -CyD对于软骨细胞系C5.18和骨髓间充质干细胞系C3H10T1/2的细胞毒性显著小于PEI25KDa,这主要是由于PEI- $\beta$ -CyD在细胞内的降解产物为小相对分子质量的聚乙烯亚胺和 $\beta$ -环糊精,两者的细胞毒性均较小<sup>[2]</sup>。此外,非病毒基因载体对于细胞的细胞毒性也随着N/P的升高而升高,当N/P超过达到最高转染效率的N/P时,其转染效率往往会由于细胞毒性过于明显而降低,这主要是由于随着N/P的升高,在转染液中游离状态的非病毒基因载体也会增加,这部分非病毒基因载体达到一定浓度时,其对细胞产生的细胞毒性会急剧增大<sup>[14]</sup>。

分析PEI- $\beta$ -CyD和PEI25KDa对C5.18细胞的转染效率与N/P之间的关系,我们发现在一定范围内随着N/P的上升,其转染效率也同步上升,这主要是由于在低N/P的条件下,所形成的复合物并不十分稳定且粒径往往较大(通常>500 nm);而当N/P上升到一定阶段后(PEI- $\beta$ -CyD的N/P>240,PEI25KDa的N/P>10),非病毒基因载体对C5.18细胞产生的毒性会越来越明显,从而降低了转染效率,这主要是当N/P上升时在转染液中游离状态的非

病毒基因载体浓度提高所造成的结果。在 C3H10T1/2 细胞中也存在着相同的现象, 在低 N/P 的条件下, 非病毒基因载体的转染效率均很低; 而当 PEI- $\beta$ -CyD 的 N/P > 240、PEI25KDa 的 N/P > 20 时, 由于转染液中游离状态的非病毒基因载体浓度的提高, 不同程度地影响了其对 C3H10T1/2 细胞的转染效率。鉴于不同的非病毒基因载体相对分子质量、结构和所带电荷数的差异, 对于相同细胞的最佳转染效率的 N/P 往往不尽相同。

进一步比较 PEI- $\beta$ -CyD 与 PEI25KDa 对于 C5.18 细胞与 C3H10T1/2 细胞的最佳体外转染效率的差异并分析其中可能的原因, 我们认为可能与以下方面有关: ①C5.18 细胞的增殖能力较 C3H10T1/2 细胞要强很多, 故非病毒载体借细胞增殖而进入 C5.18 细胞核的机会高于 C3H10T1/2, 这就导致了两种非病毒纳米基因载体对于 C5.18 细胞的转染效率均要高于 C3H10T1/2 细胞; ② $\beta$ -环糊精可以通过与细胞膜上的胆固醇发生作用, 从而提高其内吞能力, 因而接枝了  $\beta$ -环糊精, PEI- $\beta$ -CyD 对于 C3H10T1/2 细胞的转染效率明显高于 PEI25KDa。虽然 PEI25KDa 具有较强的质子海绵效应, 但由于 C3H10T1/2 细胞中的溶酶体的活性并非很强, PEI- $\beta$ -CyD 对 C3H10T1/2 细胞的转染效率在溶酶体逃逸环节并没有受到很大影响。对于 C5.18 细胞而言, 由于其增殖能力和相应的代谢水平均明显高于 C3H10T1/2 细胞, 故其细胞内溶酶体的活性可能较高, PEI25KDa 由于具有较强的质子海绵效应, 可以较好地从溶酶体中逃逸, 在一定程度上弥补了复合物内吞的不足, 从而使得其在 C5.18 细胞内的转染效率相似于 PEI- $\beta$ -CyD。一种非病毒基因载体对于某一种细胞的转染过程, 是一个复杂且繁琐的过程, 从非病毒基因载体基因复合物进入细胞膜、通过溶酶体逃逸再到进入细胞核得以最终表达, 任何一个步骤均有可能成为其限速步骤<sup>[15]</sup>。对于相关机制的探讨和研究将有助于根据所需转染的靶细胞的特性来改进载体, 大大加速非病毒纳米基因输送体系的研发进程。

综上所述, 本研究将  $\beta$ -环糊精接枝到小相对分子质量聚乙烯亚胺,  $\beta$ -环糊精可以通过与细胞膜上的胆固醇发生作用, 从而提高其内吞能力, 且此新型纳米非病毒载体与质粒 DNA 的复合物具有较为适合转染的粒径大小, 对于骨髓间充质干细胞系 C3H10T1/2 的转染效率明显高于经典非病毒基因载体 PEI25KDa, 对于软骨细胞系 C5.18 也有着与 PEI25KDa 相似的高转染活性。同时, 因 PEI- $\beta$ -CyD

有良好的生物可降解性, 其降解产物为细胞毒性较小的小相对分子质量的聚乙烯亚胺和  $\beta$ -环糊精<sup>[2]</sup>, 因而有望成为较为理想的非病毒基因载体用于软骨组织工程和细胞治疗, 具有良好的研发前景。

### [参考文献]

- [1] Akagi D, Oba M, Koyama H, et al. Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation [J]. Gene Ther, 2007, 14(13): 1029–1038.
- [2] Tang GP, Guo HY, Alexis F, et al. Low molecular weight polyethylenimines linked by beta-cyclodextrin for gene transfer into the nervous system [J]. J Gene Med, 2006, 8(6): 736–744.
- [3] No authors listed. The ADA human gene therapy clinical protocol [J]. Hum Gene Ther, 1990, 1(3): 327–362.
- [4] 王怡婷, 沃恩康. 基因治疗的病毒载体系统 [J]. 浙江省医学科学院学报, 2009, 2: 43–46.
- [5] De Laporte L, Cruz Rea J, Shea LD. Design of modular non-viral gene therapy vectors [J]. Biomaterials, 2006, 27(7): 947–954.
- [6] 汤谷平, 陆晓. 非病毒基因载体的研究进展 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2009, 38(1): 1–6.
- [7] Demeneix B, Behr J, Boussif O, et al. Gene transfer with liposomes and polyethylenimines [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 30(1–3): 85–95.
- [8] Neu M, Fischer D, Kissel T, et al. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives [J]. J Gene Med, 2005, 7(8): 992–1009.
- [9] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylene imine) as a gene delivery vehicle [J]. J Biomed Mater Res, 1999, 45(3): 268–275.
- [10] Deng R, Yue Y, Jin F, et al. Revisit the complexation of PEI and DNA—how to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure [J]. J Control Release, 2009, 140(1): 40–46.
- [11] Breunig M, Lungwitz U, Liebl R, et al. Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(36): 14454–14459.
- [12] Matilainen L, Toropainen T, Virolainen H, et al. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells [J]. J Control Release, 2008, 126(1): 10–16.
- [13] Li J, Loh XJ. Cyclodextrin-based supramolecular architectures: syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(9): 1000–1017.
- [14] Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, et al. A two-stage poly(ethylene imine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy [J]. Mol Ther, 2005, 11(6): 990–995.
- [15] Tong H, Qin S, Fernandes JC, et al. Progress and prospects of chitosan and its derivatives as non-viral gene vectors in gene therapy [J]. Curr Gene Ther, 2009, 9(6): 495–502.