

聚乙烯亚胺包裹小环 DNA 形成的纳米颗粒传输外源基因的性质表征

张超¹, 刘鹤¹, 高诗娟¹, 黄文林^{1,3}, 王宗焯²

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 解放军第 306 医院放疗中心, 北京 100101

3 中山大学附属肿瘤医院, 广州 510060

摘要: 聚乙烯亚胺 (PEI) 是一种具有良好生物安全性和生物相容性的非病毒载体, 能高效转染肿瘤细胞。小环 DNA 是一种去除质粒细菌骨架, 只含有目的基因表达框的环状 DNA 分子。与普通质粒相比, 小环 DNA 具有表达效率高、持续时间长的优势。使用 PEI 包裹携带报告基因 *gfp* 和抑癌基因 *pten* 小环 DNA 载体, 并利用各种技术手段分析了该传输系统的理化性质和生物学效应。凝胶阻滞实验、电镜实验及 MTT 实验分析结果表明利用 PEI 包裹小环 DNA 和质粒 DNA 体系性质无显著的差别, 并且 2 种复合物对细胞毒性亦无明显差别; 但是动态光散射实验结果显示由于 PEI 可以包裹更多数量的小环 DNA, 所以 PEI 包裹小环 DNA 形成的复合物粒径要略大于包裹质粒 DNA 形成的复合物粒径。荧光显微镜实验、real-time PCR 分析和 Western blotting 分析结果表明, PEI 包裹小环 DNA 形成的复合物对细胞的转染效率要远远高于 PEI 包裹质粒 DNA 所形成的复合物, 并且小环所携带的外源基因的表达效率要远远高于质粒 DNA 所携带的外源基因的表达效率。实验结果表明, PEI 包裹小环 DNA 形成的纳米颗粒在细胞转染过程中具有很高的表达效率, 这一研究结果为 PEI 包裹小环 DNA 的非病毒载体系统在传输外源基因过程中的应用提供理论基础和技术支持。

关键词: 聚乙烯亚胺, 小环 DNA, *gfp* 基因, *pten* 基因, 纳米颗粒, 基因传输

Polyethylenimine and minicircle DNA based gene transfer

Chao Zhang¹, He Liu¹, Shijuan Gao¹, Wenlin Huang^{1,3}, and Zongye Wang²

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Radiotherapy Center, the 306th Hospital of P.L.A, Beijing 100101, China

3 State Key Laboratory of Oncology in South China, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Abstract: Polyethylenimine (PEI) is one of the most characterized non-viral vectors. It can condense DNA in a good manner and achieve high transfection efficiency. Minicircle DNA (mc-DNA) is a novel kind of supercoiled DNA which is devoid of bacterial backbone. mc-DNA is superior to conventional DNA for its higher transfection efficiency and longer time-span. In this study, we combined PEI and mc-DNA in gene delivery system. We investigated the physicochemical and biochemical effects of this non-viral system and further explore its potential in tumor gene therapy. mc-DNA was obtained by recombination of parental

Received: March 9, 2010; **Accepted:** April 7, 2010

Supported by: Knowledge Innovation Program in Chinese Academy of Sciences (No. KSCX1-YW-R-10), National Natural Science Foundation of China (Nos. 30901751, 30973448), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB529904).

Corresponding author: Zongye Wang. Tel: +86-10-64872016; E-mail: wangzye@163.com

中国科学院知识创新工程基金项目 (No. KSCX1-YW-R-10), 国家自然科学基金 (Nos. 30901751, 30973448), 国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (No. 2010CB529904) 资助。

plasmid in the presence of L-arabinose, and complexed with PEI. The results of transmission electron microscopy and scanning electron microscopy showed that the particles were spherical and homogeneous. Through gel retardation assay and MTT assay, we found that there were no obvious differences in binding capability of PEI to mc-DNA and plasmid DNA, as well as in cytotoxicity. The results of dynamic light scattering showed that the size of PEI/mc-DNA was about 68 nm, a slight larger than that of PEI/plasmid DNA. Furthermore, the tumor cells transfected with mc-GFP showed higher GFP expression level than that of conventional plasmid. The same results were achieved in the cells treated with tumor-suppressor gene *pten*, assayed by RT-PCR and Western blot. It indicates that the system of PEI/minicircle DNA is promising in gene transfer.

Keywords: polyethylenimine, minicircle DNA, *gfp*, *pten*, nanoparticle, gene delivery

基因传输系统是当前研究的一个热点。目前用于基因传输的载体可分为病毒载体和非病毒载体 2 种。与病毒载体相比, 非病毒载体具有安全性高、容易制备和修饰、基因容量大的优势^[1-2]。其中, 聚阳离子化合物聚乙烯亚胺 (PEI) 是研究最多和最有效的非病毒载体之一。PEI 具有“质子海绵效应”, 因此能够很好地复合带负电荷的 DNA 分子, 并且能够将复合的 DNA 运送到细胞核内, 实现有效的基因转染^[3-5]。小环 DNA 是一种去除了细菌骨架, 而只含有目的基因表达框的新型环状 DNA, 它是由母环质粒 DNA 在 Φ C31 重组酶的诱导下重组产生的。研究表明, 与普通质粒相比, 小环 DNA 具有表达效率高、表达时间长的优势^[6-9]。除此之外, 小环 DNA 因为缺乏质粒 DNA 中的抗性基因, 因此更为安全^[10]。Park 等利用 PEI 包裹携带脂联素基因的小环 DNA 治疗 II 型肥胖糖尿病小鼠, 取得了比使用普通质粒系统更好的治疗效果^[11]。但是关于 PEI 包裹小环 DNA 这一传输体系的理化性质, 以及它在肿瘤细胞中的生物学效应等方面的研究尚未见报道。因此, 本研究用 PEI 包裹携带报告基因 *gfp* 和抑癌基因 *pten* 的小环 DNA, 并利用各种技术手段比较该体系相对质粒 DNA 体系的理化和生化性质的差别, 探讨 PEI 包裹小环 DNA 的非病毒载体系统在基因传输中应用的可行性, 并为探索该系统在肿瘤基因治疗中的应用提供前期的理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种和细胞

p2 Φ C31 质粒由美国斯坦福大学陈志英教授惠赠; pEGFPN1 质粒购自美国 Clontech 公司; pBS-T 载体和大肠杆菌 TOP10 购自中国 TIANGEN 生物科

技有限公司; pShuttle 和 pCDNA3.1-PTEN 由本实验室保存。人转化肾上皮细胞系 293T、人乳腺癌细胞系 MCF-7、人宫颈癌细胞系 HeLa 和人肝癌细胞系 HepG2 购自美国 ATCC。

1.2 主要试剂和材料

L-阿拉伯糖、树枝状聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI, MW 25 kDa)、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 等购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 限制性内切酶和连接酶购自日本 TaKaRa 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; DMEM 购自美国 Gibco 公司; 质粒提取试剂盒和 TRNzol Total RNA Reagent 购自中国 TIANGEN 生物科技有限公司; M-MLV 逆转录酶系统购自美国 Promega 公司; 抗 PTEN 鼠多克隆抗体、HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自中山金桥公司。

1.3 质粒构建

1.3.1 p2 Φ C31-EGFPN1 质粒的构建

用 *Bgl* II 和 *Bam*H I 双酶切 pEGFPN1 质粒, 将得到的载体片段进行自连, 转化大肠杆菌 TOP10, 挑取氨苄抗性克隆, 酶切鉴定, 获得 pEGFPN1-2。以 pEGFPN1-2 质粒为模板扩增得到 CMV-EGFP-polyA 的基因片段, 上游引物: 5'-GGACTAGTGTAATCAATTACGGGGTCATTAG-3', 下游引物: 5'-GGACTAGTCGCCTTAAGATACATTGATGAGT-3' (下划线代表 *Spe* I 酶切位点), 将得到的目的基因片段克隆到 p2 Φ C31 载体中, 转化大肠杆菌, 挑取氨苄抗性克隆, 酶切鉴定, 获得 p2 Φ C31-EGFPN1。

1.3.2 p2 Φ C31-PTEN 质粒的构建

以 pCDNA3.1-PTEN 质粒为模板扩增得到 *pten* 的基因片段, 上游引物: 5'-GCTCTAGAATGACAGCATCATCAAAGAG-3' (下划线部分为 *Xba* I 酶切位点), 下游引物: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCAGA

CTTTTGTAATTTGTGTAT-3' (下划线部分为 *Not* I 酶切位点), 将扩增的片段通过 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切后克隆到 pShuttle 载体中, 转化大肠杆菌 TOP10, 挑取氨苄抗性克隆, 酶切鉴定, 获得 pShuttle-PTEN。用 *Spe* I 和 *EcoR* I 双酶切 pShuttle-PTEN 得到 CMV-PTEN-BGH 的基因片段, 将该片段连入 pBS-T 载体, 转化大肠杆菌 TOP10, 挑取氨苄抗性克隆, 酶切鉴定, 获得 pBS-T-PTEN。用 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切 pBS-T-PTEN, 将得到的基因片段克隆到 p2ΦC31 载体中, 转化大肠杆菌, 挑取氨苄抗性克隆, 酶切鉴定, 获得 p2ΦC31-PTEN。

1.3.3 小环 DNA 的诱导和纯化

本实验中的方法步骤是根据 Chen 等所介绍的方法稍做改动^[7]。将质粒转化的 *E. coli* TOP10 接种到 Tris-borate 培养基中, 过夜摇菌, 当 OD_{600} 约为 2.50 时离心、收菌, 将菌团重悬于原液体积 1/4 的, 含 1.5% 的 L-阿拉伯糖的 LB (Amp^+) 培养基中, 在 32℃ 摇床上 250 r/min 继续振荡培养 2~4 h, 接下来向菌液中加入其 1/2 体积的, 含 1% 的 L-阿拉伯糖 LB (Amp^+) 培养基 (pH 8.0), 随之将温度调至 37℃, 继续振荡培养 2~4 h, 收集菌体并用质粒提取试剂盒提取小环 DNA。

1.4 复合物的理化性质表征

1.4.1 聚阳离子复合物的制备

首先, 将一定量的 PEI 溶于 150 mmol/L 的 NaCl 溶液中, 用 0.22 μm 的滤膜 (Millipore) 过滤除菌得到聚阳离子溶液; 将提取的 DNA 溶于超纯水中。然后, 将一定量的聚阳离子溶液滴加到 DNA 溶液中, 边滴加边振荡, 并将形成的复合物室温放置 15~30 min, 制成不同 N/P 比 (PEI 中的 N 原子数/DNA 中的 P 原子数) 的复合物 (DNA 浓度为 20 mg/L)。

1.4.2 凝胶阻滞实验

将制备好的复合物在 1% (w/v) 的琼脂糖胶上进行电泳, 电泳缓冲液为 Tris-acetate (TAE), 电压为 140 V, 电泳时间 30 min, 电泳结束后将胶放在溴化乙锭 (EB, 0.5 mg/L) 中染色 5 min, 用紫外灯 ($\lambda=312$ nm) 进行观察。

1.4.3 动态光散射法测量颗粒粒径

将制备的聚阳离子复合物以 3 000 r/min 离心

10 min 去除灰尘颗粒, 取上清用动态光散射仪 (DynaPro Tian, Wyatt Technology Inc) 进行测量。每个样品重复测量 3 次。

1.4.4 透射电子显微镜 (TEM) 观察纳米颗粒形态结构

制备 PEI/mc-DNA 复合物, 将制备的复合物滴加到 300 目的铜网上, 室温孵育 5 min, 将颗粒用醋酸铀染色 5 min, 用去离子水洗涤, 过夜晾干, 样品用透射电子显微镜 (JEM-1400, Tokyo, Japan) 进行观察。

1.4.5 扫描电子显微镜 (SEM) 观察纳米颗粒形态结构

用超滤膜收集颗粒, 室温下过夜晾干, 将样品用金包被, 然后用两面导电的胶带裱在一个 stub 上, 用扫描电子显微镜 (Quanta 200, FEI company, Holland) 进行观察。

1.5 MTT 实验

细胞以 10^4 /孔接种于 96 孔板 (边缘孔用无菌 PBS 填充), 在 5% CO_2 , 37℃ 条件下孵育 24 h, 之后换为 DMEM 无血清培养基, 并将不同 N/P 比的复合物加入每孔细胞中。5% CO_2 , 37℃ 孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 g/L), 继续培养 4 h, 吸去孔内培养液, 每孔加入 100 μL DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 应用酶联免疫检测仪在 OD_{570} 处测量各孔的吸光值, 计算细胞存活率。

1.6 细胞培养和转染

细胞在含 10% 胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 氨苄和 100 mg/L 氯霉素的 DMEM 培养基 (37℃, 5% CO_2) 中贴壁生长。转染前将细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板的孔中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 当细胞浓度达到 80%~90% 时, 将培养基换为 DMEM 无血清培养基并转染特定 N/P 比的复合物, 每孔转入质粒的量均为 0.3 μg, 在 37℃, 5% CO_2 培养箱中孵育 4~6 h, 之后用含 10% 血清的 DMEM 培养基换液, 继续培养 30 h, 进行后续的检测。转染细胞中 GFP 蛋白表达用倒置荧光显微镜 (Axiovert200, ZEISS, Germany) 检测。

1.7 半定量 RT-PCR

收集 5×10^6 的细胞, 用 TRNzol Total RNA Reagent 并依据其说明书提取总 RNA。取 $2 \mu\text{g}$ RNA, $1 \mu\text{g}$ Random Primer, DEPC 水补至 $10 \mu\text{L}$; 70°C 水浴变性 5 min; 冰上骤冷后加入 $2 \mu\text{L}$ dNTPs (10 nmol/L), $1 \mu\text{L}$ RNase inhibitor, $8 \mu\text{L}$ $5 \times$ Reaction Buffer, $1 \mu\text{L}$ M-MLV 逆转录酶, DEPC 水补至 $40 \mu\text{L}$, 37°C 水浴 1 h。然后进行 PCR, PCR 的反应条件为: 94°C 5 min, 1 个循环; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 终延伸 5 min。*pten* 的上游引物: 5'-GAACTGGTGTAATGATATGTGCATATT-3', 下游引物: 5'-ATTTTTTGTAAAGTAAGTAC TAGATAT-3'; β -actin 的上游引物 5'-CTACAATG AGCTGCGTGTGGC-3', 下游引物: 5'-CAGGTCCAG ACGCAGGATGGC-3'。

1.8 Western blotting 检测蛋白表达

收集处理和未处理的 293T 细胞, 用 IP 细胞裂解液提取总蛋白, 用 Bradford 法测量蛋白浓度, 各取 $40 \mu\text{g}$ 蛋白进行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后在冰上 300 mA 条件下转膜 1 h。5% 脱脂奶粉室

温封闭 2 h, 加入一定稀释比例的一抗 4°C 反应过夜, 用 TBST 洗涤 3 次, 再加连接有辣根过氧化物酶的二抗室温孵育 1 h, 然后用凝胶成像仪检测。

2 结果

2.1 重组母环质粒和小环 DNA 的酶切鉴定

小环 DNA 的诱导过程如图 1 所示。p2 Φ C31-EGFPN1 用 *Spe* I 单酶切得到约大于 10 kb 的片段, 与预期结果一致 (图 2A)。p2 Φ C31-PTEN 用插入位点 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切得到约 9.7 kb 的载体片段和约 2.3 kb 的 *pten* 基因片段, 与预期结果一致 (图 2C)。pShuttle-PTEN 用插入位点 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切得到约 4.0 kb 的载体片段和约 1.2 kb 的 *pten* 基因片段, 与预期一致 (图 2E)。小环 DNA 的电泳和酶切电泳结果显示 (图 2B, D), 诱导产生得到的 minicircle-GFP (mc-GFP) 和 minicircle-PTEN (mc-PTEN) 的电泳条带很亮, 相比较而言, 残余的母环和细菌骨架条带比较弱。信号强度分析显示 mc-GFP 和 mc-PTEN 的得率均占总 DNA 的 95% 以上, 说明实验中小环的诱导比较完全。

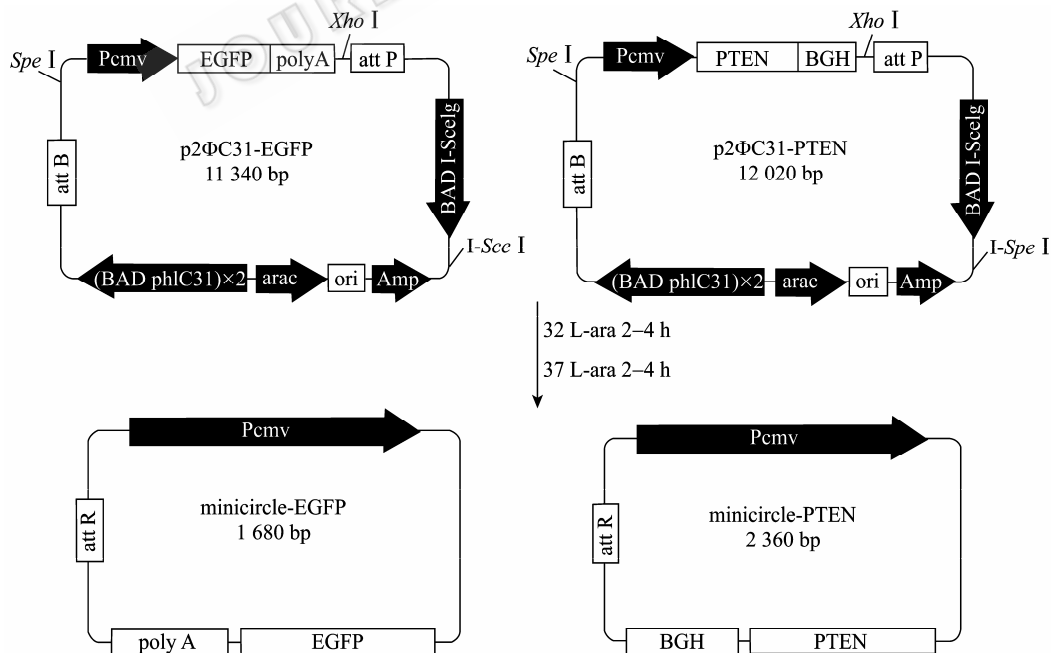


图 1 p2 Φ C31-EGFPN1 和 p2 Φ C31-PTEN 质粒诱导产生小环 DNA 的示意图

Fig. 1 Diagrams of p2 Φ C31-EGFPN1 or p2 Φ C31-PTEN and production of mc-GFP or mc-PTEN. Flow chart of Φ C31 integrase-mediated intramolecular recombination of p2 Φ C31-EGFPN1 and p2 Φ C31-PTEN. The resulting products are mc-GFP and mc-PTEN, respectively. BAD: araBAD promoter; araC: araC repressor; attB: bacterial attachment site; attP: phage attachment site; attR: right hybrid sequence; Amp: ampicillin resistance gene.

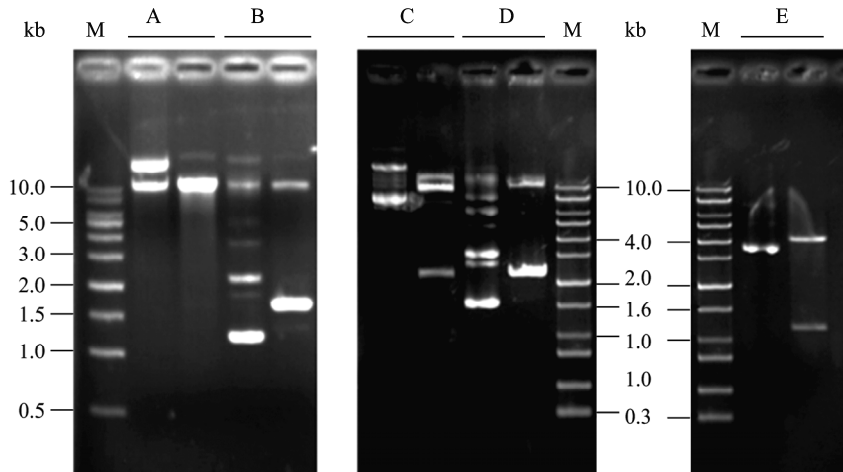


图2 p2ΦC31-EGFPN1、p2ΦC31-PTEN和pShuttle-PTEN质粒及小环mc-GFP和mc-PTEN的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of DNA with (+) or without (-) enzyme digestion. (A) p2ΦC31-EGFPN1 and (B) mc-GFP digested with or without *Xho* I. (C) p2ΦC31-PTEN and (D) mc-PTEN digested with or without *Spe* I and *Xho* I. (E) pShuttle-PTEN digested with or without *Xba* I and *Not* I. M: DNA marker.

2.2 DNA 迁移实验比较 PEI 复合 DNA 的能力

小环 DNA 因为去除了细菌骨架,所以比普通质粒 DNA 要小 (图 1)。由于之前的研究表明,聚阳离子在复合大小存在差异的质粒和 siRNA 的能力上存在明显区别^[12-13],所以在本实验中,凝胶阻滞实验被用来评价小环 DNA 与质粒 DNA 大小的差别是否影响 PEI 复合两者的能力。结果显示 (图 3),聚合物 PEI 在复合两种 DNA 的能力上没有明显区别。在 N/P 比为 4 或大于 4 时,未观测到有质粒 DNA 和小环 DNA 的条带,说明当 N/P 值为 4 时,PEI 能够完全复合这 2 种 DNA。

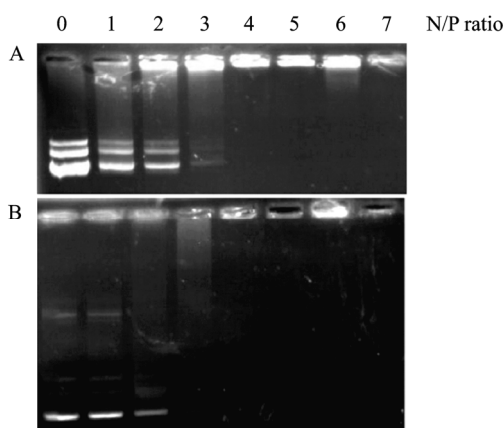


图3 凝胶阻滞实验比较 PEI 复合质粒 DNA 和小环 DNA 的能力

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of (A) pEGFPN1 and (B) mc-GFP complexed by PEI at different N/P ratios. Complete retardation of PEI/pEGFPN1 and PEI/mc-GFP were achieved at N/P ratio of 4.

2.3 动态光散射实验考察颗粒粒径

通过动态光散射法测量 PEI 复合质粒 DNA 和小环 DNA 后形成的纳米颗粒的粒径,结果显示复合物 PEI/pEGFPN1 的粒径为 (62.4 ± 0.8) nm,复合物 PEI/mc-GFP 的粒径为 (68.4 ± 1.8) nm。PEI 复合小环 DNA 形成的颗粒的粒径大于复合质粒 DNA 形成的颗粒粒径,结果与之前 Park 等的报道相符合^[11]。这可能是由于颗粒内小环 DNA 的拷贝数多于质粒 DNA 的拷贝数引起的。

2.4 电镜观察纳米颗粒形态结构

通过透射电镜 (TEM) 和扫描电镜 (SEM) 观察 PEI 复合小环 DNA 形成的纳米颗粒的形态结构,从图中可以看出复合物 PEI/mc-DNA 能够形成大小均一、形态规则的纳米颗粒 (图 4)。

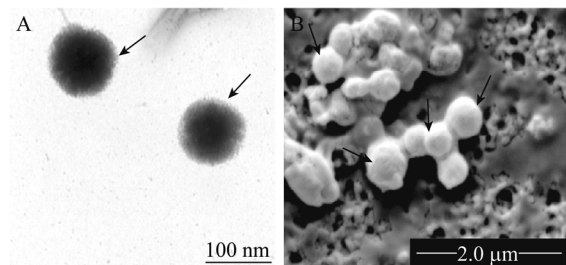


图4 透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察颗粒的形态
Fig. 4 Transmission electron microscopy and Scanning electron microscopy of PEI/mc-DNA polyplexes. The polyplexes were formed in 150 mmol/L NaCl solution with a DNA concentration of 20 mg/L and observed by (A) TEM and (B) SEM. The polyplexes were pointed by arrow.

2.5 MTT 法检测复合物对细胞的毒性

我们用 MTT 法考察小环 DNA 和质粒 DNA 形成复合物对细胞毒性的影响, 从图 5 中可以发现, 2 种复合物对细胞的毒性随着 N/P 比的增加而增加, PEI 复合小环 DNA 及复合质粒 DNA 形成的纳米颗粒对细胞毒性的影响没有明显的区别。

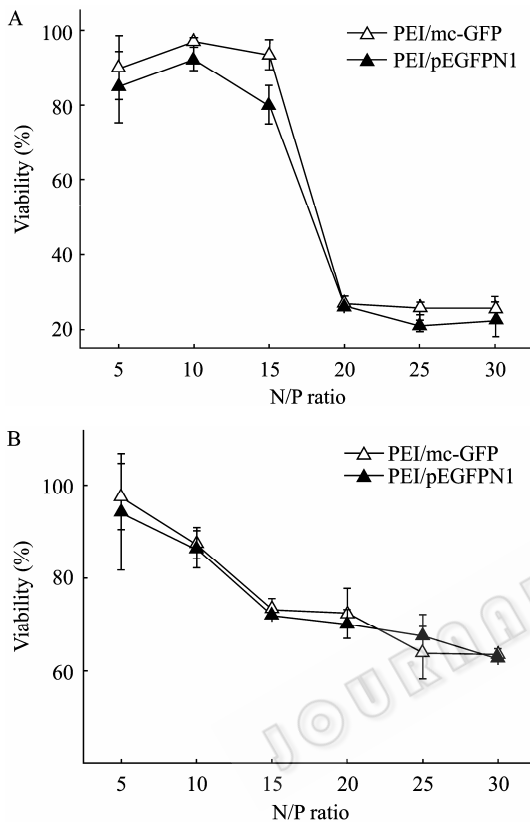


图 5 MTT 法检测复合物的细胞毒性

Fig. 5 Cytotoxicity evaluated with the MTT assay in HepG2 (A) and HeLa (B) cells. Results are presented as $\bar{x} \pm s$.

2.6 携带 *gfp* 基因的小环 DNA 和质粒 DNA 的表达量的比较

荧光显微镜观察 293T、MCF-7、HeLa 细胞中 GFP 的表达, 结果显示 (图 6) 2 种复合物在不同细胞中均有较高的转染效率, 并且复合物 PEI/mc-GFP 的转染效率在不同细胞中均高于复合物 PEI/pEGFPN1 的转染效率。表明转染小环 DNA 形成的复合物具有比普通质粒系统更高的表达效率。

2.7 RT-PCR 比较携带 *pten* 基因的小环 DNA 和质粒 DNA 的表达量

为进一步探索 PEI 复合小环 DNA 的载体系统应用到肿瘤基因治疗中的可行性, 从 RNA 水平和蛋白

水平比较携带抑癌基因 *pten* 的小环 DNA 和质粒 DNA 系统的表达量。

RT-PCR 的结果显示 (图 7), 转染了复合物 PEI/mc-PTEN 的 293T、MCF-7、HeLa 细胞中 PTEN 的表达量明显高于转染了复合物 PEI/p2ΦC31-PTEN 细胞中的水平, 表明比起普通质粒系统, 携带 *pten* 基因的小环 DNA 系统具有更高的 mRNA 转录水平。

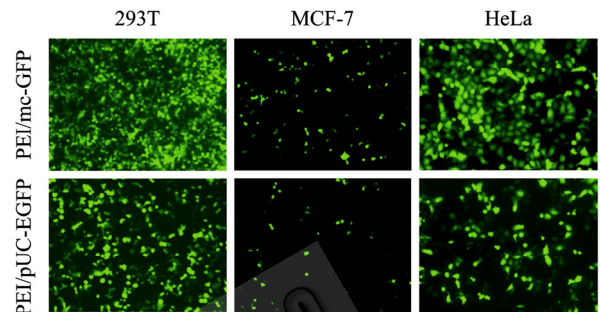


图 6 PEI 复合质粒 DNA 和小环 DNA 形成的纳米颗粒转染细胞后 GFP 表达量的比较 (100×)

Fig. 6 Gene transfection efficiency examined by GFP expression in varied cells at N/P ratio of 15 (100×).

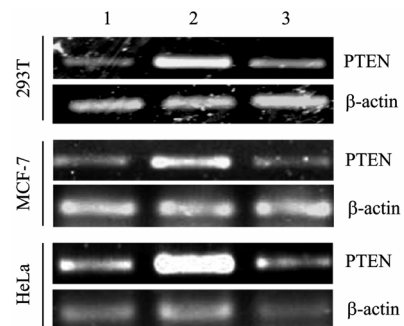


图 7 RT-PCR 比较小环 DNA 体系和普通质粒 DNA 体系转染的细胞中 mRNA 水平

Fig. 7 Analysis of PTEN expression by RT-PCR. Total RNA was extracted, reverse transcribed, and amplified. RT-PCR was carried. 1: pCDNA; 2: mc-PTEN; 3: p2ΦC31-PTEN.

2.8 Western blotting 比较携带 *pten* 基因的小环 DNA 和质粒 DNA 在细胞中的表达效率

Western blotting 实验结果表明 (图 8), mc-PTEN 转染的 293T 细胞中 PTEN 的表达量显著高于 p2ΦC31-PTEN 转染的细胞中 PTEN 的表达量, 进一步从蛋白表达水平说明小环 DNA 系统比普通质粒 DNA 系统具有更高的表达效率。而 mc-PTEN 转染的 MCF-7 细胞中这种差别不是很明显, 这可能是由于 MCF-7 的转染效率比较低造成的。

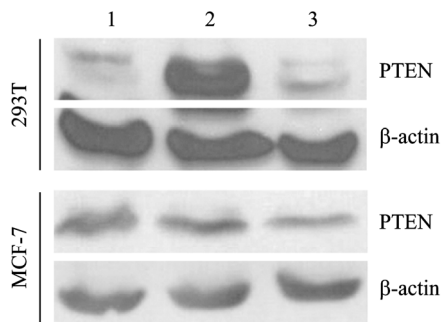


图8 Western blotting 比较小环 DNA 体系和质粒 DNA 体系转染的细胞中 PTEN 基因的蛋白表达效率

Fig. 8 Protein expression of PTEN in human 293T cells and MCF-7 cells by Western blotting assay. 1: pCDNA; 2: mc-PTEN; 3: p2ΦC31-PTEN.

3 讨论

在过去的报道中,小环 DNA 在细胞水平的转染主要是通过脂质体介导的,而用 PEI 运载小环 DNA 的研究仅有 Park 等组成的研究小组进行过相关报道^[11]。他们利用 PEI 运载携带脂联素基因的小环 DNA 治疗 II 型肥胖小鼠,动物实验结果显示使用小环 DNA 系统携带的脂联素基因的表达量显著高于使用普通质粒系统的表达量。除此之外,关于 PEI 包裹小环 DNA 这一传输体系的理化性质,以及它在肿瘤细胞中的生物学效应等方面的研究还没有相关报道。本研究用 PEI 包裹携带报告基因 *gfp* 和抑癌基因 *pten* 的小环 DNA,并利用各种技术手段比较该体系相对质粒 DNA 体系的理化和生化性质的差别,探讨 PEI 包裹小环 DNA 的非病毒载体系统在肿瘤细胞基因传输中的可行性。

研究表明 PEI 能够很好的复合小环 DNA,并且形成均一规则的纳米颗粒,颗粒的粒径大小为 (68.4 ± 1.8) nm。研究表明 100 nm 左右的纳米颗粒,通过血液循环后能够很好地富集到肿瘤部位,这主要是由于肿瘤血管存在着 200~400 nm 的空隙,小于这个尺寸的纳米颗粒能够通过并到达肿瘤组织,这种性质被称为 enhanced permeability and retention effect (EPR) 效应^[2,14]。因此,将 PEI 复合小环 DNA 的纳米颗粒应用于肿瘤基因治疗中,可能能够实现被靶向肿瘤组织,从而减少毒副作用。

通过对理化性质的研究发现,PEI 复合小环

DNA 和复合质粒 DNA 差别并不是很明显,但是比较两者转染肿瘤细胞后 GFP 的表达发现,相比较质粒 DNA 系统来说,小环 DNA 系统能够实现更为高效的表达。由于理化性质无明显差别,因此这种差别主要是由于小环 DNA 自身的优势引起的。研究表明,质粒 DNA 中的细菌骨架能够在空间上顺式抑制基因的转录,小环 DNA 由于去除了细菌骨架而去除了这种抑制作用,因此能够实现更为高效的表达^[15]。

为了进一步探讨 PEI 运载小环 DNA 的基因传输系统在肿瘤治疗中的潜在价值,本研究将抑癌基因 *pten* 引入到这一系统中,结果进一步表明小环 DNA 系统比普通质粒 DNA 系统具有更高的表达优势,因此能够发挥更强的抑癌效果。之前有研究应用小环 DNA 携带 IFN γ 治疗鼻咽癌的荷瘤小鼠,并且取得良好的效果,小环 DNA 在 IFN γ 的表达量和治疗效果方面都有明显的优势^[16]。本研究的结果为小环 DNA 在肿瘤基因治疗方面的可行性提供了理论基础和技术支持。

然而,PEI 复合小环 DNA 的载体系统和普通质粒系统类似^[17],能够导致较大的细胞毒性,因此以后的研究仍需要进一步对该系统进行修饰和改良,减少对细胞的毒性和机体的损伤。

综上所述,PEI 复合小环 DNA 能够形成均一规则的纳米颗粒,而且形成的复合物在肿瘤细胞转染中具有比普通质粒系统更高的表达优势。研究表明 PEI 复合小环 DNA 的载体系统在基因传输中具有比较显著的优势。

REFERENCES

- [1] Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther*, 2002, **9**(24): 1647-1652.
- [2] Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, **7**(9): 771-782.
- [3] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*, 1999, **60**(2/3): 149-160.
- [4] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly (ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(9): 5177-5181.

- [5] Sonawane ND, Szoka FC, Verkman AS. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 2003, **278**(45): 44826–44831.
- [6] Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, *et al.* Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Mol Ther*, 2003, **8**(3): 495–500.
- [7] Chen ZY, He CY, Kay MA. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 2005, **16**(1): 126–131.
- [8] Darquet AM, Cameron B, Wils P, *et al.* A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther*, 1997, **4**(12): 1341–1349.
- [9] Darquet AM, Rangara R, Kreiss P, *et al.* Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther*, 1999, **6**(2): 209–218.
- [10] Jia F, Wilson KD, Sun N, *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*, 2010, **7**(3): 197–199.
- [11] Park JH, Lee M, Kim SW. Non-viral adiponectin gene therapy into obese type 2 diabetic mice ameliorates insulin resistance. *J Control Release*, 2006, **114**(1): 118–125.
- [12] Shim MS, Kwon YJ. Controlled cytoplasmic and nuclear localization of plasmid DNA and siRNA by differentially tailored polyethylenimine. *J Control Release*, 2009, **133**(3): 206–213.
- [13] Stevenson M, Ramos-Perez V, Singh S, *et al.* Delivery of siRNA mediated by histidine-containing reducible polyplexes. *J Control Release*, 2008, **130**(1): 46–56.
- [14] Shchors K, Evan G. Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res*, 2007, **67**(15): 7059–7061.
- [15] Chen ZY, Riu E, He CY, *et al.* Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther*, 2008, **16**(3): 548–556.
- [16] Wu J, Xiao X, Zhao P, *et al.* Minicircle-IFN γ induces antiproliferative and antitumoral effects in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(15): 4702–4713.
- [17] Kunath K, von Harpe A, Fischer D, *et al.* Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release*, 2003, **89**(1): 113–125.