

• 论 著 •

# PEI 与脂质体介导基因转染的比较研究

曹慧玲,滕凤猛,汪小蓉,顾万建,张春兵

(江苏省中医院/南京中医药大学附属医院检验科,江苏南京 210029)

**摘要:**目的 比较新型转染试剂阳离子聚合物聚乙烯亚胺(PEI)与脂质体 2000 介导的血管内皮细胞生长因子 VEGF165 基因转染人胚肾细胞 293T 的转染效率,为基因转染提供新的方法。方法 分别采用脂质体和不同 N/P 比值的 PEI 将合成的含有绿色荧光蛋白(GFP)和 VEGF165 的质粒转入 293T 细胞。转染 24 h 后,采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性;转染 48 h 后在荧光显微镜下观察比较两种转染方法的转染效率,并通过 ELISA 方法检测细胞上清液中 VEGF165 浓度,比较两种方法的转染效果。结果 当 N/P=9 时,PEI 转染的细胞活性与脂质体转染相近,对细胞的毒性较小;此时,PEI 转染效率与脂质体也相似,均可达到约 70%;同样,转染后细胞上清中 VEGF165 浓度较未转染组提高( $P<0.05$ ),但两种方法转染组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 PEI 作为一种新型的转染试剂,与脂质体相比,在一定比例范围内,具有转染效率高,对细胞毒性小且价格低廉的优势,有望成为基因转染的有效载体。

**关键词:**聚乙烯亚胺; 脂质体; 基因转染; 转染效率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)03-0328-03

## Comparison of gene transfection reagents between PEI and lipofectamine

Cao Huiling, Teng Fengmeng, Wang Xiaorong, Gu Wanjian, Zhang Chunbing

(Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine /Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

**Abstract: Objective** To compare the transfection efficiency of cationic polyethylenimine(PEI) with Lipofectamine 2000TM by using the plasmid DNA encoding vascular endothelial cell growth factor(VEGF165) gene in human embryonic kidney cell line 293T. **Methods** PEI of different N/P ratio and Lipofectamine 2000TM were used to deliver the vector containing VEGF165 to 293T cells, respectively. Green fluorescent protein(GFP) gene was inserted into the vector as a report gene. Evaluation of cytoactive was performed by CCK-8 assay 24 h after transfection. The cells were observed by fluorescent microscope and the presence of VEGF165 in cell supernatant was detected by ELISA 48 h after transfection. The transfection efficiency was calculated and compared. **Results** Similar cytoactive and best transfection efficiency could be obtained when N/P ratio was 9, the transfection efficiency was around 70%. Furthermore, the presence of VEGF165 increased significantly after transfection( $P<0.05$ ), but there was no significant difference between the two groups in which different transfection methods were adopted. **Conclusion** PEI as a novel oligofectamine reagent could mediate more efficient transfection compared with lipofectamine. It also has low cell-toxicity and low price and could be an ideal vector in gene delivery technology.

**Key words:** polyethylenimine; lipofectamine; gene transfection; transfection efficiency

基因转染需要一定的转染试剂将带有目的基因的载体运送至细胞内。目前,应用最广泛的转染试剂是阳离子脂质体和阳离子聚合物,它们容易通过细胞膜,在通过细胞屏障方面跟病毒有很相似的特征。阳离子脂质体在体外基因转染中有很高的效率,应用也最为广泛。然而在体内,它会被迅速清除,并在肺组织内累积,诱发强烈的抗炎反应,具有毒性,这使其应用受到限制。由于阳离子脂质体使用的局限性,阳离子聚合物转染试剂日益受到关注,聚乙烯亚胺(PEI)就是这样一类转染试剂<sup>[1]</sup>。PEI 中的 N 元素与质粒 DNA 中 P 元素的摩尔数的比值(N/P 比值)是影响 PEI 转染效率的重要因素。本研究旨在观察不同 N/P 比值 PEI 的转染效率及其对细胞活性的影响并与脂质体转染试剂进行比较,从而为扩大其应用提供实验依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 293T 细胞由南京医科大学惠赠。PEI 分支型,相对分子质量为  $25 \times 10^3$ ,为 Sigma 公司产品;脂质体 2000 为 Invitrogen 公司产品;VEGF165 质粒[携带绿色荧光蛋白(GFP)

基因],由本实验室构建,见图 1;CCK-8 试剂盒为日本同仁公司生产;高糖 DMEM 培养液为 Hyclone 公司生产;胎牛血清为 Hyclone 公司生产;胰蛋白酶为 Sigma 公司生产;VEGF165 ELISA 试剂盒为 R&D 公司生产;PBS 缓冲液购自南京天为公司。

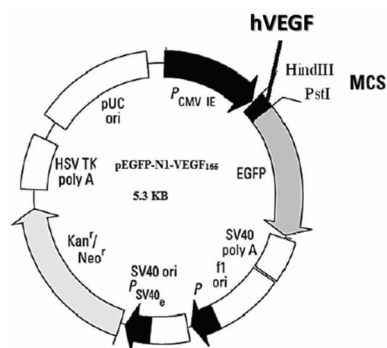


图 1 人 VEGF165 质粒构建图

1.2 方法

1.2.1 脂质体转染混合液配制 取无血清 DMEM 100  $\mu$ L, 加入质粒 DNA 8  $\mu$ g, 室温放置 5 min, 取 10  $\mu$ L 脂质体 2000 加入无血清 DMEM 100  $\mu$ L, 放置 5 min, 将二者混合后放置 20 min, 备用。

1.2.2 PEI 转染混合液配制 取无血清 DMEM 100  $\mu$ L, 加入质粒 DNA 8  $\mu$ g, 放置 5 min, 另根据不同 N/P 比值将 PEI 稀释至不同质量浓度, 加入无血清 DMEM 100  $\mu$ L 中, 放置 5 min, 将两者混合, 边加入边震荡, 混合后放置 20 min, 备用。

1.2.3 N/P 比值的优化 本实验所用 DNA 质量为 8  $\mu$ g, 根据公式:  $N/P = PEI(\mu g) / DNA(\mu g) \times 7.75$  进行计算, 所需 PEI 的质量见表 1。

表 1 不同 N/P 对应的 PEI 和 DNA 质量

N/P 比值	PEI 质量( $\mu$ g)	DNA 质量( $\mu$ g)
0	0.00	8.00
1	1.03	8.00
3	3.09	8.00
5	5.16	8.00
7	7.23	8.00
9	9.29	8.00
11	11.35	8.00

1.2.4 细胞培养 293T 细胞培养于 DMEM[含 10% 胎牛血清(FBS)中], 置于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下连续培养, 转染前 24 h 将细胞接种于 6 孔板中, 每孔  $5 \times 10^5$  个细胞且均匀分布, 用于转染。

1.2.5 293T 细胞转染 取 6 孔板细胞, PBS 缓冲液洗涤两次, 转染组细胞分别加入脂质体转染混合液和 PEI 转染混合液, 对照组加入等量无血清 DMEM, 边加边混匀, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 6 h。转染后去除转染混合液, 每孔加入完全培养基 2 mL 继续培养, 48 h 后检测转染效果。

1.2.6 细胞活性检测 采用 CCK-8 试剂盒进行检测。取转染 48 h 的细胞接种于 96 孔板, 培养过夜后, 每孔加入 CCK-8 检测试剂 10  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 酶标仪检测吸光度(A)值。

1.2.7 转染后绿色荧光观察 在荧光显微镜下观察转染 48 h 后带有绿色荧光的细胞比例, 有绿色荧光说明转染成功。

1.2.8 ELISA 检测培养上清 VEGF165 取转染 48 h 后细胞培养上清, 按照 VEGF165 ELISA 试剂盒说明书操作, 得到培养上清中 VEGF165 的浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞活性检测 PEI 转染组细胞活性随 N/P 比值的升高而降低, N/P=9 时接近脂质体转染组, 而所有转染组细胞较未转染组细胞活性均有所降低, 但除 N/P=11 时外, 其他 N/P 比值的 PEI 转染与脂质体转染的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 2。

2.2 细胞转染效率 荧光显微镜观察到未转染组未见绿色荧光蛋白表达(转染率为 0%), 脂质体转染组可见大部分细胞表达绿色荧光蛋白(转染率约为 70%), PEI 转染组也可见大量细胞表达 GFP(转染率约为 75%), 可见两种转染试剂均能达到较高的转染效率, 见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 细胞上清液 VEGF165 的浓度 转染 48 h 后, ELISA 法检测细胞上清液中 VEGF165 的浓度, 见表 3。VEGF165 的浓度随 N/P 比值的增高而增加, 当 N/P=9 时, PEI 转染结果与脂质体相似, 较未转染组有明显升高( $P < 0.01$ )。

表 2 各组的细胞活性检测结果 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	检测结果
PEI 转染组	—
N/P=0	3.28 $\pm$ 0.34
N/P=1	3.21 $\pm$ 0.32
N/P=3	3.15 $\pm$ 0.27
N/P=5	3.01 $\pm$ 0.28
N/P=7	2.93 $\pm$ 0.22
N/P=9	2.87 $\pm$ 0.25
N/P=11	2.24 $\pm$ 0.30*
脂质体转染组	2.89 $\pm$ 0.28
未转染组	3.29 $\pm$ 0.36

\*:  $P < 0.05$ , 与脂质体转染组比较; —: 无数据。

表 3 细胞上清液中 VEGF165 的检测 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	VEGF165 水平
PEI 转染组	—
N/P=0	5.8 $\pm$ 0.46
N/P=1	9.2 $\pm$ 0.11
N/P=3	23.7 $\pm$ 2.34
N/P=5	67.9 $\pm$ 5.53
N/P=7	147.1 $\pm$ 8.24
N/P=9	241.5 $\pm$ 14.76
N/P=11	235.0 $\pm$ 17.55
脂质体转染组	240.3 $\pm$ 16.65
未转染组	6.1 $\pm$ 0.54

—: 无数据。

3 讨 论

PEI 是人工合成的含有极高密度正电荷的有机大分子阳离子聚合物。PEI 与 DNA 通过正负电荷的相互吸引形成复合物<sup>[2]</sup>, 是较为有效的聚阳离子型基因载体, 转染效率高, 常辅助超声等物理方法携带外源基因进入目的细胞<sup>[3-4]</sup>。然而, 随着 PEI 用量的增大, 其细胞毒性也随之升高。同样, 应用最多的脂质体转染方法与 PEI 转染有着相似的特性。但脂质体往往价格较高, 相比较而言, PEI 价格较低, 在适当的比例下, 也可发挥较好的转染效果<sup>[5]</sup>。

胡伟等<sup>[6]</sup>比较了 PEI 与阳离子脂质体转染人舌鳞癌细胞的转染效率和细胞毒性, 研究发现在各自最佳转染条件下, PEI 转染效率更高, 细胞毒性小。为了进一步了解 PEI 作为新型转染试剂的优势, 本研究以 293T 作为转染细胞, 通过观察质粒载体上 GFP 和 VEGF165 的表达情况, 比较了脂质体、PEI 两种转染试剂的转染效率。细胞活性检测结果显示, 较未转染细胞的细胞活性而言, 经过转染的细胞活性均有所降低, 且随着 N/P 比值的增加 PEI 对细胞的毒性也逐渐加大。但是当 PEI 控制在一定范围内, 与未转染组相比, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。同时, 研究表明当 PEI 浓度为 N/P=9 时, 对细胞活性的影响与脂质体转染方法接近, 说明在一定比例范围内, PEI 毒性对细胞活性的影响不大。荧光显微镜观察细胞转染结果显示, 两种转染方法的转染效率均达到 70% (产生绿色

荧光的细胞即转染阳性细胞占总细胞的比例),与脂质体相比,一定 N/P 比值的 PEI 转染同样具有较好转染效果。携带 VEGF165 基因的质粒转入 293T 细胞,培养后转染细胞可表达 VEGF165 相应蛋白,并分泌入细胞上清中,使得细胞上清中 VEGF165 的含量增加,增加程度与荧光结果相一致。本研究显示,加入适当 N/P 比值的 PEI 后,两种方法转染后细胞上清液中的 VEGF165 水平与未转染组比较,均显著提高,再次验证了 PEI 与脂质体转染具有较高的转染效率,且转染效果相似。

目前,PEI 及其相关复合试剂广泛应用于医学的各个领域<sup>[7]</sup>,Liang 等<sup>[8]</sup>认为 PEI 与普流尼克通过表面交联可以达到更好的转染效果;Shao 等<sup>[9]</sup>学者则利用 PEI 包裹病毒样颗粒介导 isRNA 用于治疗乳腺癌研究;Liu 等<sup>[10]</sup>利用 PEI-PEG 将 DNA 及药物特异性导入肿瘤细胞;傅晓源等<sup>[11]</sup>制备了 PEI 载体基因纳米颗粒并研究其理化性质及体外活性。本文的研究也提示,在合适的比例下 PEI 可以替代脂质体,作为新型有效的转染试剂用于实验研究中。

PEI 作为新型转染试剂,其细胞毒性一定程度上制约了其的应用,因此,有更多的研究者提出对 PEI 的加入量加以控制(N/P 比值)或对其进行重新构建,以减少其对细胞活性的影响<sup>[12]</sup>。

综上所述,通过比较阳性聚合物 PEI 与脂质体 2000 两种转染试剂分别介导 VEGF165 质粒的转染效率,说明 PEI 在适当的 N/P 比值时,可以达到与脂质体同样或更好的转染效果,如将 PEI 加以改造,构建新的复合转染试剂,可有效降低 PEI 的生物毒性,使其应用更为广泛。由于 PEI 较脂质体而言具有转染效率高且经济实惠的优势,提示其可作为新型的转染试剂广泛应用于医疗领域。

参考文献

[1] Yan X, Zhang Y, Zhang H, et al. Amphiphilic polyethylenimine (PEI) as highly efficient non-viral gene carrier[J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12(12): 1975-1982.  
 [2] 刘涛,马栋,王蓉,等. 叶酸靶向 PEG-PEI-Alg-氧化铁磁性纳米基

(上接第 327 页)

载量可能是控制肝纤维化进展的重要因素<sup>[11]</sup>,但在使用抗病毒药物抑制 HBV 复制改善患者肝功能的同时,如何尽早发现肝纤维化并及时合理地选择抗纤维化治疗,将肝纤维化在早期逆转从而阻断肝硬化的形成,是保护肝脏功能,改善乙型肝炎患者的生活质量及预后的重要手段。因此,血清 HBV-DNA 与肝纤维化指标相关性分析提示慢性乙型肝炎患者在抗病毒治疗的同时也应加强抗纤维化的治疗,对早期肝纤维化患者显得尤为重要。

参考文献

[1] 曾小辉,沙卫红,李瑜元,等. 血清肝纤维化指标对慢性肝病的临床价值[J]. *中国临床实用医学*, 2010, 4(2): 87-88.  
 [2] 张泓. 乙型肝炎血清标志物模式及 HBV-DNA 与肝纤维化指标的关系[J]. *中国民康医学*, 2009, 21(16): 1916.  
 [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华内科杂志*, 2001, 40(1): 62-68.  
 [4] 陈洪涛,贺春民,赵翠林,等. 血清肝纤维化指标在慢性肝病中的应用研究[J]. *河南医学研究*, 2003, 12(1): 28-29.

因载体的构建及鉴定[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(19): 12-17.  
 [3] 陈智毅,谢明星,王新房,等. 超声辐照联合 PEI 增强体外基因转染的实验研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2009, 25(1): 1-4.  
 [4] Chen XA, Zhang LJ, He ZJ, et al. Plasmid-encapsulated polyethylene glycol-grafted polyethylenimine nanoparticles for gene delivery into rat mesenchymal stem cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6(6): 843-853.  
 [5] Opanasopit P, Paecharoenchai O, Rojanarata T, et al. Type and composition of surfactants mediating gene transfection of polyethylenimine-coated liposomes[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6(7): 975-983.  
 [6] 韩伟,胡勤刚,王志勇,等. 两种转染方法介导质粒转染人舌鳞癌细胞的实验研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2008, 24(4): 575-578.  
 [7] 彭健,刘桦,刘路,等. PEG-PEI/Fe3O4 纳米磁流体-TK 对裸鼠移植性肝癌细胞靶向杀伤作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(9): 1162-1166.  
 [8] Liang W, Gong H, Yin D, et al. High-molecular-weight polyethylenimine conjugated pluronic for gene transfer agents[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2011, 59(9): 1094-1101.  
 [9] Shao W, Paul A, Abbasi S, et al. A novel polyethylenimine-coated adeno-associated virus-like particle formulation for efficient siRNA delivery in breast Cancer therapy: preparation and in vitro analysis[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7(9): 1575-1586.  
 [10] Liu C, Liu F, Feng L, et al. The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(10): 2547-2564.  
 [11] 傅晓源,张浩伟,谢灏,等. 聚乙烯亚胺载体基因纳米颗粒的制备及其相关特性的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(24): 3570-3572.  
 [12] Huang X, Hartley AV, Yin Y, et al. AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications[J]. *J Virol Methods*, 2013, 193(2): 270-277.

(收稿日期:2014-12-08)

[5] 李文全,曹春晓,杨琦,等. 血清肝纤维化指标在慢性肝病中的临床分析[J]. *中国当代医药*, 2009, 16(14): 50-51.  
 [6] 杨绍基,任红. 病毒性肝炎的发病机制与病理解剖[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2007: 30-31.  
 [7] 蔡文品,赵春,吴惠洁,等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与肝纤维化指标的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(1): 72-73.  
 [8] 甘平,彭芳. 乙型肝炎治疗研究进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(5): 720-721.  
 [9] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 2010 年更新版[J]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2011, 5(1): 79-100.  
 [10] 慢性乙型肝炎联合治疗专家委员会. 慢性乙型肝炎联合治疗专家共识[J]. *中国肝脏病杂志:电子版*, 2012, 4(1): 39-46.  
 [11] 王远驰,黄金伟. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 病毒载量与血清肝纤维化指标变化[J]. *放射免疫学杂志*, 2009, 22(3): 222-224.

(收稿日期:2014-11-08)