

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.47.004 [http://www.crter.org]

卢华定, 戴驭虎, 连礼熠, 吕璐璐, 赵慧清. 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒的制备及介导体外转染关节软骨细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(47):8162-8168.

## 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒的制备及介导体外转染关节软骨细胞\*\*\*\*☆

卢华定, 戴驭虎, 连礼熠, 吕璐璐, 赵慧清(中山大学附属第三医院骨科, 广东省广州市 510630)

### 文章亮点:

实验创新性地将小分子质量聚乙烯亚胺共价连接于壳聚糖骨架上制作聚乙烯亚胺-壳聚糖复合载体, 再以复凝聚法制备聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒, 体外基因转染实验显示聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒对关节软骨细胞具有较高的转染效率, 达到与 Lipofectamine™ 2000 相近, 但其在活体内环境多种因素影响下效果如何, 尚需进一步研究以验证其有效性。

### 关键词:

生物材料; 组织工程软骨材料; 壳聚糖; 聚乙烯亚胺; 非病毒基因载体; 软骨细胞; 基因转染; DNA 纳米粒; 国家自然科学基金

### 主题词:

生物相容性材料; 壳聚糖; 聚乙烯亚胺; 软骨细胞

### 基金资助:

国家自然科学基金资助项目(82172040, 30600632)\*\*, 广东省科技计划基金资助项目(2012B031800451)\*, 广东省自然科学基金资助项目(S2011010004808)\*

卢华定☆, 男, 1971年生, 浙江省温岭市人, 汉族, 2005年中山大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事创伤骨科、关节外科研究。johnnielu@126.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344  
(2013)47-08162-07

修回日期:2013-10-22  
(201308153/GW - W)

### 摘要

**背景:** 壳聚糖对软骨细胞具有良好的生物相容性和可降解性, 但存在基因转染效率偏低的缺陷。

**目的:** 构建负载增强型绿色荧光蛋白基因的聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒, 检测其理化性能, 以及体外对关节软骨细胞的基因转染效率。

**方法:** 将聚乙烯亚胺共价连接于壳聚糖骨架上构建聚乙烯亚胺-壳聚糖复合物, 再将聚乙烯亚胺-壳聚糖与负载增强型绿色荧光蛋白基因的质粒 DNA 以复凝聚法制成纳米粒, 以扫描电镜检测纳米粒形态, Zeta 电位粒度分析仪测定其粒径、表面电位; 凝胶电泳阻滞实验观察聚乙烯亚胺-壳聚糖和质粒 DNA 的结合力。以聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒、裸质粒 DNA、脂质体 2000 及壳聚糖/DNA 纳米粒转染体外培养的兔关节软骨细胞, 流式细胞仪及荧光显微镜检测基因转染率; 激光共聚焦显微镜检测 DNA 的入核情况。

**结果与结论:** 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒多呈球形, 粒径为(154.6±18.6) nm, 表面 Zeta 电位为(24.68±6.82) mV, 可有效保护质粒 DNA 免受 DNase I 的降解。体外转染实验证明聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒能介导增强型绿色荧光蛋白基因转染关节软骨细胞并在细胞内表达绿色荧光蛋白, 转染率达(23.80±1.74)%, 转染率高于裸质粒 DNA 组及壳聚糖/DNA 纳米粒组( $P < 0.05$ ), 与脂质体 2000 组无显著差别( $P=0.522$ )。表明聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒能有效保护质粒 DNA 免受核酸酶降解, 对关节软骨细胞有良好的基因转染能力。

## Preparation of polyethylenimine-chitosan/DNA nanoparticles for transfecting articular chondrocytes *in vitro*

Lu Hua-ding, Dai Yu-hu, Lian Li-yi, Lü Lu-lu, Zhao Hui-qing (Department of Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-san University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Chitosan is well known as good biocompatibility and biodegradability; however, its extensive use in biomedical applications is restricted due to its poor transfection efficiency.

**OBJECTIVE:** To prepare the polyethylenimine-chitosan/DNA nanoparticles loading enhanced green fluorescent protein gene, and to detect their physicochemical properties and gene transfection efficiency towards chondrocytes *in vitro*.

**METHODS:** Low molecular weight polyethylenimine was covalently linked to chitosan backbone to construct chitosan-graft-polyethylenimine; then the chitosan-graft-polyethylenimine was mixed with DNA nanoparticles, which loaded enhanced green fluorescent protein gene, by a complex coacervation method. The nanoparticle morphology was observed under a scanning electron microscopy. The sizes and zeta-potentials of the nanoparticles were measured by a Marven-nano laser diffractometer. The binding capacity of plasmid DNA was evaluated by agarose gel electrophoresis analysis. The gene transfection experiments *in vitro* were performed towards rabbit's chondrocytes. The gene transfection efficiency was measured with flow cytometry and under fluorescence microscope. How marked DNA entered into the nucleus of chondrocytes mediated by the

Lu Hua-ding☆, M.D., Associate professor, Department of Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-san University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China  
johnnielu@126.com

Accepted: 2013-10-22

nanoparticles was detected by laser scanning confocal microscopy.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The prepared nanoparticles were mainly spherical, with an average size of (154.6±18.6) nm, and zeta-potential of (24.68±6.82) mV. The agarose gel electrophoresis analysis confirmed that the nanoparticles could effectively protect plasmid DNA from DNase I-induced degradation. Gene transfection *in vitro* proved that the nanoparticles were efficient in transfecting rabbit's chondrocytes and the expression of green fluorescent proteins was observed under fluorescent microscope, with a transfection efficiency of (23.80±1.74)% that was significantly higher than that of the naked plasmid DNA and chitosan/DNA nanoparticles ( $P < 0.05$ ). But no significant differences were observed between polyethyleneimine-chitosan/DNA nanoparticles and Lipofectamine™ 2000. These findings indicate that the polyethyleneimine-chitosan/DNA nanoparticles can effectively protect plasmid DNA from nuclease degradation, and exhibit the favorable transfection ability towards articular chondrocytes.

**Subject headings:** biocompatible materials; chitosan; polyethyleneimine; chondrocytes

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 82172040\*, 30600632\*; the Science and Technology Project of Guangdong Province, No. 2012B031800451\*; the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. S2011010004808\*

Lu HD, Dai YH, Lian LY, Lü LL, Zhao HQ. Preparation of polyethyleneimine-chitosan/DNA nanoparticles for transfecting articular chondrocytes in vitro. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(47):8162-8168.

## 0 引言 Introduction

选择合适的载体是基因治疗的关键问题。病毒类载体在临床应用上面临免疫原性、致癌性等严重的安全问题<sup>[1-2]</sup>。非病毒类基因载体如脂质体虽能增加体外基因转染率,但细胞毒性明显,不适于体内转染。壳聚糖作为一种天然碱性多糖,具有良好的生物相容性和生物可降解性,以及具有安全性较高、成本低廉、构建聚合物-质粒纳米粒的反应条件温和、操作简易、能保护DNA免被降解等优点,其主要缺陷是较低的基因转染效率<sup>[3-4]</sup>。

聚乙烯亚胺与壳聚糖一样为阳离子非病毒基因载体,都能与细胞表面的蛋白多糖结合,通过内吞作用进入细胞。聚乙烯亚胺的“质子海绵效应”使载体易于从细胞内涵体逃逸以提高转染效率,但聚乙烯亚胺存在与其分子量大小相关的细胞毒性。小分子质量的聚乙烯亚胺基本没有细胞毒性,但其转染率也低下<sup>[5]</sup>。实验通过将小分子质量聚乙烯亚胺共价连接于壳聚糖骨架上制作聚乙烯亚胺-壳聚糖复合载体,再制备聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒,通过理化特征检测及体外基因转染软骨细胞实验等,以期治疗骨关节炎等关节疾患提供有效低毒的非病毒基因载体。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 对比观察实验。

**时间及地点:** 实验于2011年10月至2013年6月在中山大学附属第三医院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 3周龄雄性新西兰大白兔2只,体质量分别为0.25, 0.28 kg,购于广东省医学实验动物中心,许可证号: 2011-0905。

聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒制备及体外转染关节软骨细胞实验的主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
壳聚糖(相对分子质量 50 000, 脱乙酰度 85%); 聚乙烯亚胺, 相对分子质量 1 800; 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC); 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI)及 DNase I	美国 Sigma-Aldrich 公司
高糖 DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
三磷酸五钠	上海江莱生物科技有限公司
含增强型绿色荧光蛋白基因的 pReceiver-M29	Invitrogen 公司
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
大肠杆菌 <i>Ecoli</i> /DH5α	Promega 公司
冷冻干燥机	OHRIST BETA1-15, 德国
扫描电镜	SEM, JSM-6360, Jap
激光粒度分析仪	Malvern Instruments, Worcestershire, UK

**实验方法:**

**质粒DNA的扩增:** 包含增强型绿色荧光蛋白基因的 pReceiver-M29载体购于Invitrogene公司。将重组质粒DNA经大肠杆菌*Ecoli*/DH5α在含氨苄青霉素的LB培养基中增殖,提纯。提纯的质粒DNA含量由紫外分光光度计(UV-2000, UNICO)在260 nm和280 nm波长测定,并经测序鉴定。

**聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒的制备:** 按照Tripathi等<sup>[3]</sup>所述方法,将100 mg壳多糖溶解在质量分数为1% HCl溶液中,搅拌过夜;再在60 °C下搅拌,加入0.25 mL环氧氯丙烷。60 °C下搅拌3 h,得到壳多糖氯醇盐酸盐,在旋转蒸发器上浓缩为白色粉末。以无水乙醇洗涤2次,以去除多余的环氧氯丙烷。将壳多糖氯醇盐酸盐和聚乙烯亚胺以1:4的质量比溶于100 mL水中,加热至60 °C。滴加2 mol/L NaOH溶液2 mL于上述

溶液中迅速搅拌, 待在60 °C下搅拌20 h后, 将所得溶液进行透析。再经冷冻干燥机冻干, 得到聚乙烯亚胺-壳聚糖复合物。将上述聚乙烯亚胺-壳聚糖溶于水中制成0.5 g/L的溶液, 搅拌过夜。按N与P比为4:1的比例, 分别在聚乙烯亚胺-壳聚糖溶液中加入适量的质粒DNA(表达绿色荧光蛋白)并搅拌2 min, 按照复凝聚法制备得聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒溶液。壳聚糖接枝聚乙烯亚胺构建聚乙烯亚胺-壳聚糖化学反应示意图, 见图1。

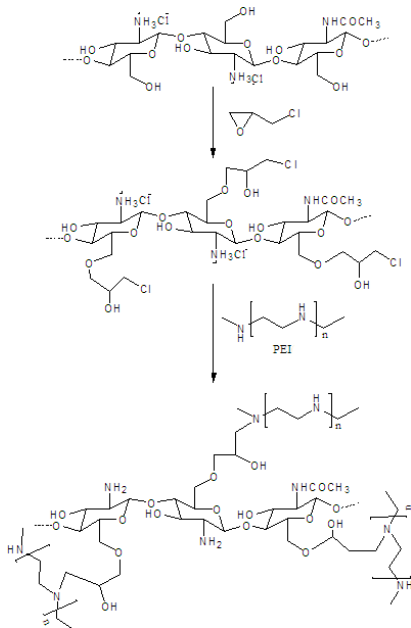


图1 壳聚糖接枝聚乙烯亚胺构建聚乙烯亚胺-壳聚糖化学反应示意图

Figure 1 Chemical reaction scheme of constructing chitosan-graft-polyethyleneimine

**聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒形貌及特征的检测:** 将聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒溶液冷冻干燥, 分散在样品台上, 喷铂金, 扫描电镜观察其形貌。通过激光粒度分析仪测量纳米粒的粒径、表面Zeta电位及分散度。

**琼脂糖凝胶阻滞电泳:** 取裸质粒DNA和聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒溶液, 进行1%琼脂糖凝胶电泳, 分析载体与DNA的结合能力。再将聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒和质粒DNA溶液(各含0.5 μg的DNA), 加入5 U的DNase I, 37 °C水浴20 min, 1%琼脂糖凝胶电泳分析结果。

**体外基因转染软骨细胞观察:** 取新西兰大白兔, 切取双侧膝股骨髁关节软骨, 体外分离培养软骨细胞。取第二三代软骨细胞, 按 $5 \times 10^5$ /孔加入24孔板。每孔预先加入1 mL含体积分数10%胎牛血清的DMEM液培养24 h。

转染时先吸除培养基, 将聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒(相当于每孔加入2.5 μg的质粒DNA)加入不含血清的DMEM培养液中, 以裸质粒DNA及按照复凝聚法制备的壳聚糖/DNA纳米粒为对照<sup>[6]</sup>。将细胞置于37 °C、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下孵育4 h, 吸除转染液, 加入含有体积分数10%胎牛血清的DMEM液继续培养。以Lipofectamine™ 2000为阳性对照, 转染时以DMEM液清洗2次, 按照操作说明加入Lipofectamine™ 2000至不含血清和双抗的DMEM液中, 每孔加入0.8 μg质粒DNA, 在37 °C、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下孵育4 h, 吸除转染液, 加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM液继续培养。将转染48 h的细胞以PBS冲洗, 以质量分数0.02%的EDTA和质量分数为0.25%的胰蛋白酶消化后, 1 000 r/min离心6 min, 离心半径为13.5 cm, PBS重悬, 以流式细胞仪检测软骨细胞基因转染率。其余转染的细胞在倒置相差显微镜和荧光显微镜下观察细胞生长情况, 以及细胞内绿色荧光蛋白表达情况。

**激光共聚焦显微镜检测聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒转染软骨细胞入胞、入核途径:** 将软骨细胞接种于激光共聚焦检测专用培养皿中(每个皿 $1 \times 10^5$ 个细胞), 以含体积分数为10%胎牛血清的培养基培养。24 h时后移除培养液, PBS洗2次, 把含有2 μg FITC标记的质粒DNA构建的聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒加入200 μL无血清DMEM液中, 混匀, 滴加到培养皿中。转染后1 h或2 h终止转染, 移除转染液, PBS洗2次, 加40 g/L多聚甲醛固定10 min, PBS洗2次, 加300 nmol/L DAPI培养10 min以染核, 再用PBS洗2次, 加入防淬灭剂GelTol mounting medium, 以激光共聚焦显微镜检测。

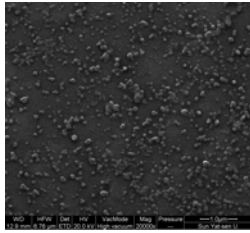
**主要观察指标:** 扫描电镜检测纳米粒形态, 马尔文激光粒度分析仪测定其粒径、表面电位; 凝胶电泳阻滞实验观察壳聚糖和质粒DNA的结合力; 以聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒转染体外培养的兔关节软骨细胞, 流式细胞仪及荧光显微镜检测基因转染率; 激光共聚焦显微镜检测聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒转染软骨细胞入胞、入核途径。

**统计学分析:** 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同载体之间的体外基因转染率均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*法检验。采用SPSS 13.0统计软件分析,  $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒的形态特征** 见图2所示, 扫描电镜下观察聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒呈球形, 粒径在100-300 nm之间。经激光粒度分析仪检测, 在pH=5.5时, 粒径为 $(154.6 \pm 18.6)$  nm, Zeta

电位为(24.68±6.82) mV, 分散度为0.284±0.078。

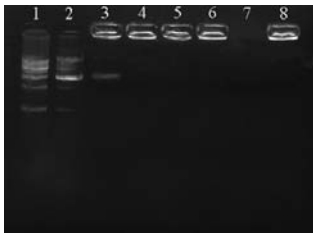


注: 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒呈球形, 粒径在 100-300 nm 之间。

图 2 扫描电镜观察聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒形貌 (×20 000)

Figure 2 Scanning electron micrograph of polyethyleneimine-chitosan/DNA nanoparticles (×20 000)

**2.2 凝胶电泳阻滞实验结果** 见图3所示, 裸质粒DNA跑出加样孔, 而聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒能阻滞DNA向阳极移动; 不同N/P比值的聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒稳定性不同, N/P比值升高, 使DNA与聚乙烯亚胺-壳聚糖通过静电作用结合更加紧密。加入DNase I后, 裸质粒DNA泳道内的条带完全消失, 而聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒泳道内的荧光亮度基本没变。



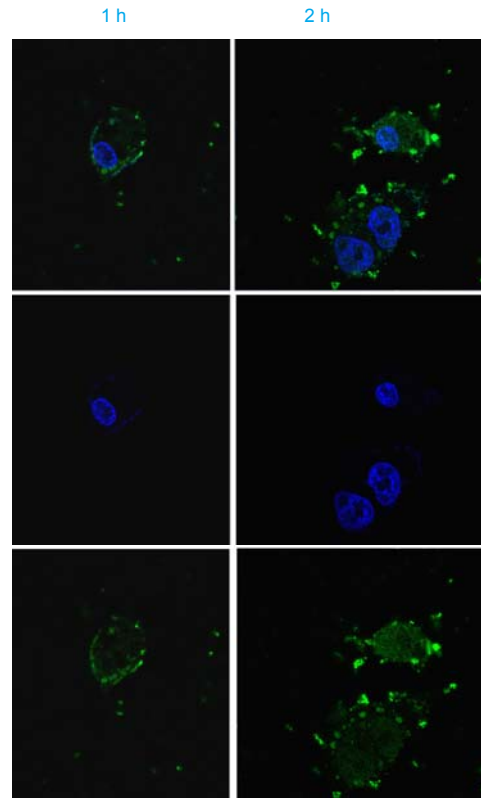
注: 1: DNA Marker; 2: 裸质粒 DNA; 3-6 分别为 N/P 为 1:2-4:1 的聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒; 7: 裸质粒 DNA 在 37 °C 加入 DNase I 消化 20 min; 8: 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒在 37 °C 加入 DNase I 消化 20 min。裸质粒 DNA 跑出加样孔, 而聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒能阻滞 DNA 向阳极移动; 不同 N/P 比值的聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒稳定性不同, N/P 比值升高, 使 DNA 与聚乙烯亚胺-壳聚糖通过静电作用结合更加紧密。加入 DNase I 后, 裸质粒 DNA 泳道内的条带完全消失, 而聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒泳道内的荧光亮度基本没变。

图 3 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒凝胶阻滞实验

Figure 3 Electrophoresis photo of polyethyleneimine-chitosan/DNA nanoparticles

**2.3 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒入胞、入核考察** 见图4所示, 图中绿色部分为FITC标记的DNA, 在 1 h

时, 激光共聚焦显微镜检测可见绿色部分已经入胞, 大部分在胞浆中, 围绕着蓝色DAPI标记的细胞核周围; 2 h后绿色部分与蓝色已开始重叠, 说明DNA已经进入核。

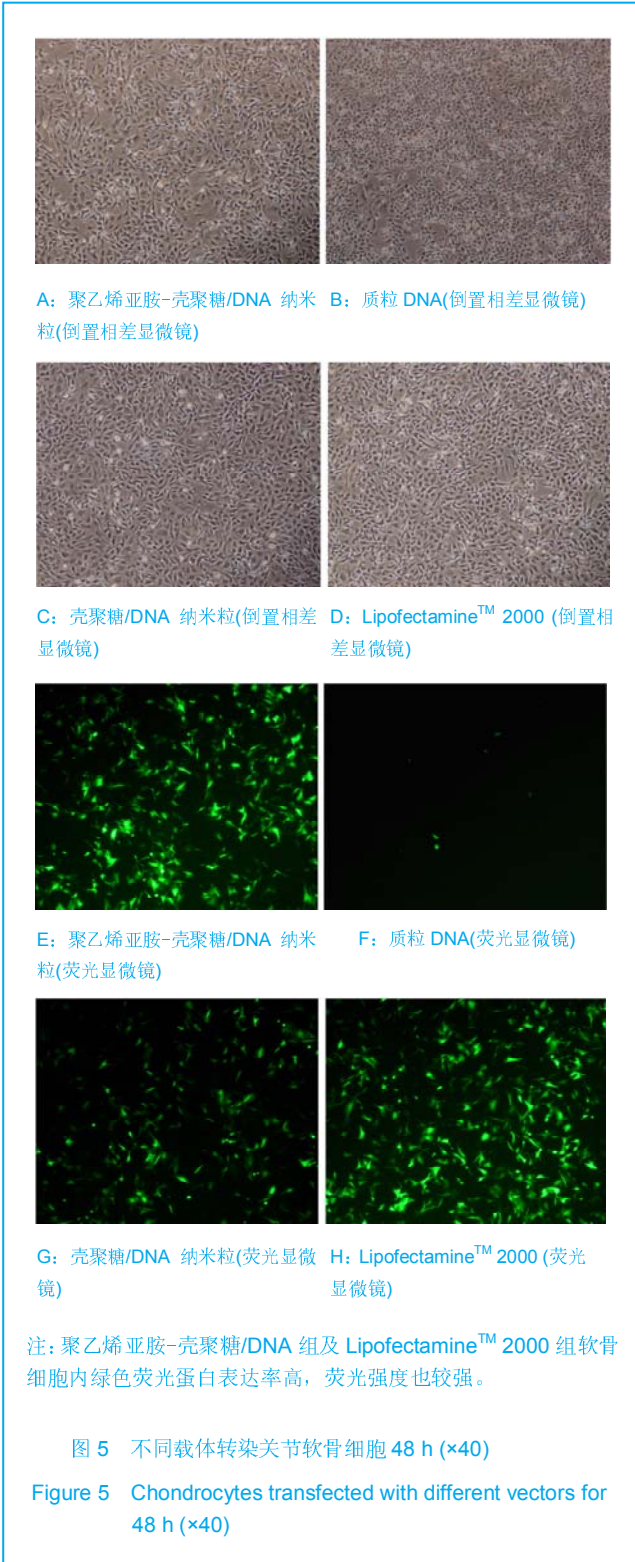


注: 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒中的 DNA 已做 FITC 标记。左排为转染后 1 h 检测, 右排为转染后 2 h 检测。以 DAPI 染色细胞核, 可见转染 2 h 时已有 FITC 标记的 DNA 进入细胞核内。

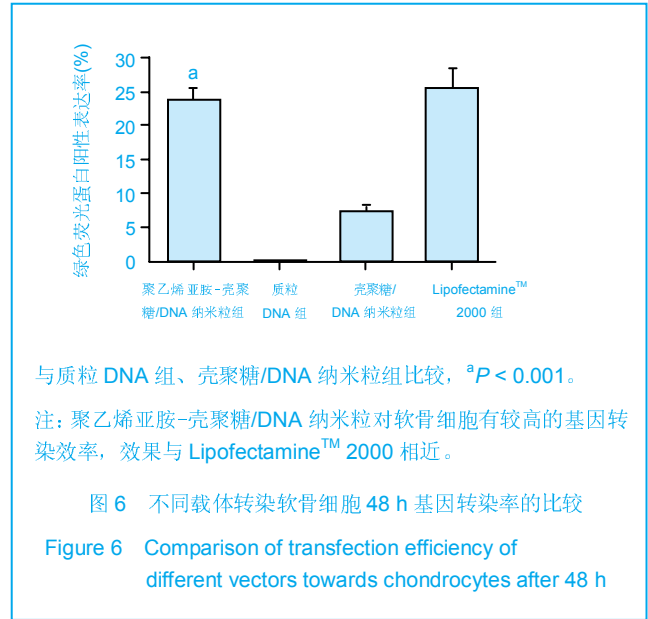
图 4 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒在软骨细胞胞内分布的激光共聚焦检测(×1 000)

Figure 4 Intracellular distribution of polyethyleneimine-chitosan/DNA nanoparticles in chondrocytes observed with a confocal fluorescence microscope (×1 000)

**2.4 体外基因转染实验结果** 软骨细胞转染后24 h, 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒组在荧光显微镜下有较少细胞表达绿色荧光蛋白, 壳聚糖/DNA纳米粒组只有少数细胞表达弱的绿色荧光, 至48 h细胞的转染率增高, 荧光强度也增强; 裸质粒DNA组只有极个别的细胞表达绿色荧光蛋白阳性, 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA 纳米粒组在48 h阳性细胞的比例明显增加, 荧光强度也增强, 见图5, Lipofectamine™ 2000转染软骨细胞24 h后, 荧光显微镜下已有表达绿色荧光蛋白的阳性细胞, 转染48 h后细胞的转染率更高。



见图6所示, 4组之间对软骨细胞的转染效率(绿色荧光蛋白表达阳性率)存在明显差别( $F=258.234, P=0$ ); 组间两两比较采用LSD-*t* 法检验, 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒与Lipofectamine™ 2000组均与裸质粒DNA组及壳聚糖/DNA纳米粒组存在明显差别( $P < 0.001$ ), 但聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒与Lipofectamine™ 2000之间差别不显著( $P=0.522$ )。



### 3 讨论 Discussion

骨关节炎的基因治疗高度靶向于其发病机制而不只是针对症状的缓解<sup>[7]</sup>, 而选择理想的非病毒基因载体是目前基因治疗的关键问题。由于病毒类载体在临床应用上面临免疫原性、致癌性等严重的安全问题, 非病毒类基因载体在近年来受到越来越多的关注<sup>[1-2,4,8-9]</sup>。壳聚糖对软骨细胞具有良好的生物相容性和可降解性<sup>[10]</sup>, 然而, 由于其转染效率较低而在医学领域的应用受到限制<sup>[4,11]</sup>, 这主要是因为: 壳聚糖本身在生理pH值条件下溶解度低<sup>[12]</sup>; 因缺乏缓冲胺而内涵体逃逸能力差<sup>[13]</sup>; 其与DNA非常强的结合力导致进入细胞质后DNA不易从复合物中解离<sup>[14]</sup>。针对壳聚糖的这些缺陷, 通过不同方法对壳聚糖进行改性以尽量提高其基因转染效率。Chang 等<sup>[15]</sup>将组氨酸基团共价连接到壳聚糖骨架中增加其缓冲能力, 使其易于从内涵体-溶酶体逃逸, 有效提高基因转染效率, 但发现其细胞摄取能力仍不如脂质体。其他如在壳聚糖分子上连接半乳糖<sup>[16]</sup>、聚乙二醇<sup>[17]</sup>、聚乙烯亚胺<sup>[3,5,18]</sup>、精氨酸等<sup>[19]</sup>, 以及进行三甲基化<sup>[20]</sup>、解聚合<sup>[21]</sup>、巯基化修饰等<sup>[22]</sup>, 这些经过改性的壳聚糖/DNA复合物均在不同程度上提高了其基因转染效率, 但转染效率仍不够理想。作者采用透明质酸对壳聚糖/DNA纳米粒进行修饰, 因透明质酸可与软骨细胞表面的CD44、Toll-like-receptor 4 (TLR4)等受体结合<sup>[23-24]</sup>, 实现受体介导下的靶向基因转染, 同时因透明质酸-CD44作用引发细胞内的信号传导, 以及透明质酸沉积于壳聚糖/DNA聚合物表面, 可活化基因转录, 结果表明, 透明质酸修饰的壳聚糖/DNA纳米粒对软骨细胞的基因转染效率有大幅提高<sup>[25]</sup>, 但对应用于临床仍欠理想。

Tripathi 等<sup>[3]</sup>研究发现, 与DNA的结合力为: 壳聚糖>聚乙烯亚胺(相对分子质量25 000)>聚乙烯亚胺-壳聚糖>聚乙烯亚胺(相对分子质量2 500)。说明聚乙烯亚胺-壳聚糖与DNA的结合力既不太强也不松散, 从而既不易被核酸酶所降解, 又有利于提高转染效率<sup>[3]</sup>。实验针对导致壳聚糖基因转染效率低下的主要缺陷, 以壳聚糖为骨架, 共价连接小分子质量聚乙烯亚胺构建新型复合载体, 利用复合载体中带有较多小分子质量聚乙烯亚胺的缓冲胺基, 其“质子海绵效应”使载体易于从细胞内涵体逃逸以提高转染效率, 从内涵体逃逸出来后, 部分聚乙烯亚胺可从聚乙烯亚胺-壳聚糖上解离下来, 而小分子质量的聚乙烯亚胺毒性低, 对软骨细胞不会造成太大的毒性。由于壳聚糖/DNA纳米粒具有基因缓释性能, 起着逐步释放DNA的功能<sup>[26-27]</sup>。因此, 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA的基因表达也能持续较长时间。从图5, 6可见, 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒对软骨细胞有较高的基因转染效率, 达到与Lipofectamine™ 2000相近( $P=0.522$ )。体外基因转染实验显示聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒可将绿色荧光蛋白基因递送到软骨细胞内, 成功转染并表达绿色荧光蛋白, 同时进一步证实制备过程中并未损害质粒DNA活性。

在制备聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒时, 其N/P比值对复合载体的稳定性及理化特性有重要影响。由图3可见, 在N/P比值为1:2时, 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒中的DNA仍有跑出泳道, 说明聚乙烯亚胺-壳聚糖尚不足完全结合并浓缩DNA, 此时的聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒不稳定, 在N/P比值达到2:1乃至4:1, 聚乙烯亚胺-壳聚糖与DNA通过静电作用结合更加紧密, 已无DNA跑出泳道; 在加入DNase I后, 裸质粒DNA泳道内的条带完全消失, 而聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒泳道内的荧光亮度基本没变, 说明纳米粒可保护DNA免受核酸酶降解。在N/P比值为4时通过扫描电镜观察其形态, 可见纳米粒大多呈圆球形, 粒径在100-300 nm之间; 进一步经激光粒度分析仪测得此时纳米粒粒径平均为(154.6±18.6) nm, Zeta电位为(24.68±6.82) mV, 说明其粒径和电位均有利于聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒经由细胞内吞作用入胞。

研究显示, 壳聚糖/DNA纳米粒容易进入细胞内, 但入核困难, 在观察6 h尚难见到DNA进入胞核<sup>[28]</sup>, 因此壳聚糖/DNA纳米粒转染软骨细胞表达绿色荧光蛋白较慢, 转染率也低下; 相反, 高相对分子质量(25 000)聚乙烯亚胺能快速从内涵体逃逸并入核<sup>[29]</sup>。但逃逸过快, 因“质子海绵效应”导致的溶胀作用使内涵体在短时间大量破裂对细胞的生理环境造成巨大损伤, 影响细胞的生存状态而对细胞产生大的毒性<sup>[5]</sup>。由图4可见, 聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA携带的DNA在1 h大部分入胞而聚集在细胞核周围, 2 h后开始已经有部分进入细胞核了, 说明复合

载体的“质子海绵效应”在内涵体-溶酶体逃逸能力及入核时间上起了关键的作用。因此, 壳聚糖接枝低分子量(1 800)聚乙烯亚胺能够在适当的时间逃逸内涵体并入核表达, 显示其作为非病毒基因载体相对于单纯壳聚糖或高相对分子质量(25 000)聚乙烯亚胺的优越性。

实验将小分子质量聚乙烯亚胺共价嫁接于壳聚糖骨架上构建聚乙烯亚胺-壳聚糖, 再采用复凝聚法制备聚乙烯亚胺-壳聚糖/DNA纳米粒, 在制备过程中不涉及超声及有机溶剂的使用, 对DNA的损害少<sup>[30]</sup>, 体外基因转染实验显示其对关节软骨细胞具有较高的转染效率, 达到与Lipofectamine™ 2000相近, 但其在活体内环境多种因素影响下效果如何, 尚需进一步研究以验证其有效性。另外, 其在体内应用的安全性、基因表达的调控及缓释性能也有待进一步研究。

**致谢:** 感谢中山大学附属第三医院中心实验室在实验中的大力协助及华南理工大学材料学院吴刚副教授在纳米粒构建中的帮助。

**作者贡献:** 第一作者进行实验设计, 实验实施为全部作者, 实验评估为第一、二作者, 资料收集为第三作者, 第一作者成文, 第一、二作者审校, 全部作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

**学术术语:** 基因转染-将具生物功能的核酸转移或运送到细胞内, 使核酸在细胞内维持其生物功能。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Rekha MR, Sharma CP. Polymers for gene delivery: current status and future perspectives. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2012;6(2):98-107.
- [2] Tiera MJ, Shi Q, Winnik FM, et al. Polycation-based gene therapy: current knowledge and new perspectives. *Curr Gene Ther.* 2011;11(4):288-306.
- [3] Tripathi SK, Goyal R, Kumar P, et al. Linear polyethylenimine-graft-chitosan copolymers as efficient DNA/siRNA delivery vectors in vitro and in vivo. *Nanomedicine.* 2012;8(3):337-345.
- [4] Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(1):12-27.
- [5] Gao JQ, Zhao QQ, Lv TF, et al. Gene-carried chitosan-linked-PEI induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant tumor-suppressive activity. *Int J Pharm.* 2010;387(1-2):286-294.

- [6] 卢华定,赵慧清,吕璐璐,等.壳聚糖-负载增强型绿色荧光蛋白基因的质粒DNA纳米微球体外转染软骨细胞的能力及影响因素[J].中华创伤骨科杂志,2011,13(11):64-69.
- [7] Steinert AF,Nöth U,Tuan RS.Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury*.2008;39 Suppl 1:S97-113.
- [8] Lehrman S.Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*. 1999;401(6753):517-518.
- [9] Liu Q,Muruve DA.Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors.*Gene Ther*.2003;10(11):935-940.
- [10] 张世浩,朱立新,靳安民,等.软骨细胞复合胶原/壳聚糖/ $\beta$ -磷酸三钙层状梯度修复体的体外培养[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(41):8033-8036.
- [11] Jayakumar R,Chennazhi KP,Muzzarelli RAA,et al.Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy.*Carbohydrate Polymers*.2010;79(1):1-8.
- [12] Aiba S.Studies on chitosan: 2. Solution stability and reactivity of partially N-acetylated chitosan derivatives in aqueous media. *Int J Biol Macromol*. 1989;11(4): 249-252.
- [13] Wong K,Sun G,Zhang X,et al.PEI-g-chitosan, a novel gene delivery system with transfection efficiency comparable to polyethylenimine in vitro and after liver administration in vivo. *Bioconjug Chem*.2006;17(1): 152-158.
- [14] Lavertu M,Méthot S,Tran-Khanh N,et al. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*.2006;27(27):4815-4824.
- [15] Chang KL,Higuchi Y,Kawakami S,et al. Efficient gene transfection by histidine-modified chitosan through enhancement of endosomal escape.*Bioconjug Chem*. 2010; 21(6):1087-1095.
- [16] Song B,Zhang W,Peng R,et al.Synthesis and cell activity of novel galactosylated chitosan as a gene carrier.*Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;70(2):181-186.
- [17] Xu Z,Wan X,Zhang W,et al.Synthesis of biodegradable polycationic methoxy poly (ethylene glycol)-polyethylenimine-chitosan and its potential as gene carrier. *Carbohydr Polym*.2009;78:46-53.
- [18] Jiang HL,Kim YK,Arote R,et al.Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier.*J Control Release*.2007; 117(2):273-280.
- [19] Gao Y,Xu Z,Chen S,et al. Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency.*Int J Pharm*.2008; 359(1-2):241-246.
- [20] Germershaus O,Mao S,Sitterberg J,et al.Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethyleneglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: establishment of structure-activity relationships in vitro.*J Control Release*.2008; 125(2):145-154.
- [21] Morris VB,Neethu S,Abraham TE,et al.Studies on the condensation of depolymerized chitosans with DNA for preparing chitosan-DNA nanoparticles for gene delivery applications.*J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.2009;89(2): 282-292.
- [22] 陈斌,马世坤,高娴.巯基化壳聚糖-质粒 DNA 纳米粒的制备及相关性质的研究[J].天津医科大学学报,2008,14(4):466-469.
- [23] Knudson W,Chow G,Knudson CB.CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan.*Matrix Biol*.2002;21(1):15-23.
- [24] Campo GM,Avenoso A,Campo S,et al.Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes.*Biochem Pharmacol*.2010;80(4):480-490.
- [25] Lu HD,Zhao HQ,Wang K,et al.Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis.*Int J Pharm*.2011; 420(2):358-365.
- [26] Sezer AD,Akbuğa J.Comparison on in vitro characterization of fucospheres and chitosan microspheres encapsulated plasmid DNA (pGM-CSF): formulation design and release characteristics.*AAPS Pharm Sci Tech*.2009;10(4):1193-1199.
- [27] 金才益,王斌,曾忠友,等.壳聚糖基因转移载体在关节软骨细胞中表达的定量分析[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(45): 9035-9038.
- [28] Hashimoto M,Morimoto M,Saimoto H,et al.Lactosylated chitosan for DNA delivery into hepatocytes: the effect of lactosylation on the physicochemical properties and intracellular trafficking of pDNA/chitosan complexes.*Bioconjug Chem*.2006;17(2):309-316.
- [29] Feng M,Lee D,Li P.Intracellular uptake and release of poly(ethyleneimine)-co-poly(methyl methacrylate) nanoparticle/pDNA complexes for gene delivery.*Int J Pharm*. 2006;311(1-2):209-214.
- [30] 卢华定,吕璐璐,赵慧清,等.转化生长因子 $\beta$ 1基因缓释的壳聚糖纳米粒制备及体外检测[J].中国组织工程研究,2012,16(12): 2120-2124.