

# 叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺纳米载体转染螺旋神经节细胞

陈观贵, 徐亚丽(广州医科大学附属第二医院耳鼻喉科, 广东省广州市 510260)

## 文章亮点:

- 1 叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺作为新型非病毒载体已成功应用于多种细胞的转染及基因治疗研究中,但目前为止未发现其应用于转染耳蜗内细胞的研究报告。
- 2 实验首次以叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺转染耳蜗螺旋神经节细胞,发现其转染体外螺旋神经节细胞的转染效率及细胞毒性均优于传统的阳离子脂质体。

## 关键词:

生物材料; 纳米材料; 聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺; 阳离子脂质体; 基因转染; 螺旋神经节细胞; 绿色荧光蛋白; 广东省自然科学基金

## 主题词:

聚乙烯醇类; 聚乙烯亚胺; 脂质体; 螺旋神经节

## 基金资助:

广东省自然科学基金(博士启动)项目(S2011040003553)

## 缩略语:

叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺: polyethylenimine-polyethylene glycol, PEI-PEG

## 摘要

**背景:** 新型阳离子纳米材料叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺易于合成和改性,稳定性好,结构及性能容易调控,已被作为基因治疗转染载体应用于多种疾病的研究。

**目的:** 观察叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺转染体外培养小鼠内耳螺旋神经节细胞的可行性及特点。

**方法:** 分别以叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(实验组)、阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000(对照组)作为载体,制备携带增强型绿色荧光蛋白的转染载体系统。将昆明小鼠螺旋神经节细胞分别培养于含实验组和对照组转染载体系统的 DMEM/F-12 培养基中,培养 24 h 后,MTT 法观察载体系统的细胞毒性,倒置荧光显微镜观察细胞形态及绿色荧光蛋白表达强度,流式细胞仪检测细胞转染率。

**结果与结论:** 两种载体分别转染后,螺旋神经节细胞形态均未发生明显改变,但两组载体对螺旋神经节细胞均有一定的毒性,实验组载体毒性较小且转染效率较高( $P < 0.05$ )。结果说明叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺基因转染体外螺旋神经节细胞的转染效率及细胞毒性均优于传统的阳离子脂质体。

陈观贵, 徐亚丽. 叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺纳米载体转染螺旋神经节细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(21):3345-3349.

## Polyethylenimine-polyethylene glycol as a gene transfer vector for spiral ganglion cells *in vitro*

Chen Guan-gui, Xu Ya-li (Department of Otorhinolaryngology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** A new kind of polyethylenimine-polyethylene glycol (PEI-PEG) is apt to synthesis and modification, and has good stability, easily regulated structure and properties, which has been applied to a variety of diseases as gene transfer vectors.

**OBJECTIVE:** To study the feasibility and the characteristics of nanoparticles PEI-PEG as gene transfer vector for spiral ganglion cells of the inner ear of mice.

**METHODS:** Using PEI-PEG (experimental group) and lipofectamine™ 2000 (control group) as gene transfer vectors, with enhanced green fluorescent protein (EGFP) as tracing protein, spiral ganglion cells were transfected *in vitro*, the transfection rate and mean fluorescence strength were detected by fluorescence microscopy and flow cytometry. Toxicity effects of each vector on spiral ganglion cells were determined by spectroscopic measurement of MTT method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After transfection with two vectors, spiral ganglion cells had no changes in morphology. The transfection rate of PEI-PEG was statistically higher than that of liposome ( $P < 0.05$ ). Also, the toxicity effects of PEI-PEG to spiral ganglion cells was lightly than that of liposome ( $P < 0.05$ ). As a new gene transfer vector, PEI-PEG has a higher transfection rate and lower toxicity effects to spiral ganglion cells compared to liposome, and can serve as gene transferring system into cochlear nervous system.

陈观贵, 男, 1975年生, 广东省湛江市人, 博士, 副教授, 主要从事耳科学研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.21.012  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)21-03345-05

稿件接受: 2014-04-09

Chen Guan-gui, M.D.,  
Associate professor,  
Department of  
Otorhinolaryngology, the Second  
Affiliated Hospital of  
Guangzhou Medical University,  
Guangzhou 510260,  
Guangdong Province, China

Accepted: 2014-04-09

**Subject headings:** polyethylene glycols; polyethyleneimine; liposomes; spiral ganglion  
**Funding:** the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. S2011040003553

Chen GG, Xu YL. Polyethylenimine-polyethylene glycol as a gene transfer vector for spiral ganglion cells in vitro. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(21):3345-3349.

## 0 引言 Introduction

目前应用于基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体两大类,而非病毒载体可分为聚阳离子高分子和阳离子脂质体两类<sup>[1-2]</sup>,前者包括聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、壳聚糖等带正电荷的高分子材料,后者则是由中性脂质和带正电的脂质组成的脂质体。1995年Boussif等<sup>[3]</sup>首先报道了聚乙烯亚胺可作为非病毒载体。转染效率是基于聚乙烯亚胺有较强的结合和压缩DNA能力,能使DNA逃脱内体的吞噬,免受核酸酶降解<sup>[4]</sup>。但聚乙烯亚胺作为基因递释载体还存在一定缺陷,首先是细胞毒性问题,在转染细胞时须谨慎调节聚乙烯亚胺与DNA的比例<sup>[4]</sup>;其次,聚乙烯亚胺-DNA复合物的溶解性较差,采用常规方法无法制备稳定的聚乙烯亚胺-DNA给药系统。研究表明,对聚乙烯亚胺进行聚乙二醇修饰,可提高聚乙烯亚胺-DNA的溶解性;屏蔽复合物表面的正电荷,在不显著降低转染效率的前提下提高聚乙烯亚胺-DNA复合物的物理稳定性,降低细胞毒性;利用聚乙二醇在复合物纳米粒子表面形成中性的水溶性壳层,避免粒子在血液中聚集,减少粒子在传输过程中被网状内皮系统及巨噬细胞清除,延长体内循环时间,获得更好的基因传输效率<sup>[5-7]</sup>;无免疫原性,不会引起机体免疫反应;通过控制粒径尺寸和表面性质可控制载体的生理行为;可根据需要灵活设计分子结构;遗传物质的释放可由聚合物基质降解速率决定等。

叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(polyethylenimine-polyethylene glycol, PEI-PEG)作为新型非病毒载体,已被成功应用于多种细胞的转染及基因治疗研究中<sup>[5-9]</sup>。张璇等<sup>[5]</sup>应用PEI-PEG共聚物为基因载体,介导血管内皮生长因子165基因转染脐静脉内皮细胞,发现转染率与接枝聚乙二醇的量及N/P有关,当PEI-PEG在N/P=30时转染率达到最大值;转染后血管内皮生长因子蛋白表达及mRNA水平均有显著提高,且可有效刺激内皮细胞增殖。抑制ROCK基因是一种针对阿尔茨海默病的基因治疗方法,Liu等<sup>[6]</sup>合成PEI-PEG/ROCK-II-siRNA复合体,转染C17.2神经干细胞,发现其可有效抑制ROCK-II mRNAs的表达,揭示了PEI-PEG载体应用于中枢神经系统疾病的研究前景。PEI-PEG在肿瘤治疗方面也有着良好的应用价值,Liu等<sup>[7]</sup>发现经过枝化修饰的PEI-PEG载体可同时搭载治疗DNA和化疗药(阿霉素)转染肿瘤血管内皮细胞,增强肿瘤的治疗作用。段亚君等<sup>[10]</sup>利用肿瘤细胞表面抗原G250的单克隆抗体和PEI-PEG,获得肿瘤靶向基因载体G250mAb-聚乙烯亚胺-聚乙二醇,该载体对HeLa细胞的基因转染效率达到70%,远高于对非肿瘤细胞NIH3T3 30%的转染效率,通过该基因载体将Nucleostemin (NS)基因的特异性短发夹RNA高效率地转入靶细胞HeLa,

发现RNA干扰下调了细胞中NS的表达,显著抑制了HeLa细胞的增殖能力,引起HeLa细胞凋亡,表明该载体材料可靶向性、高效率转染HeLa细胞。以上研究均证明了是PEI-PEG是一种极有发展前景的非病毒载体。

螺旋神经节细胞是听觉通路的第一级神经元,大部分的感音性聋是由各种因素导致的耳蜗毛细胞死亡及螺旋神经节细胞凋亡所致<sup>[11]</sup>,因此螺旋神经节细胞的保护与修复对恢复听力起着重要的作用<sup>[12]</sup>。研究证明向内耳中导入相关治疗基因,比如神经生长因子基因,能有效减轻螺旋神经节细胞的凋亡,促进神经节细胞轴突的再生<sup>[13-14]</sup>。国内孙虹研究团队首先报道了纳米载体应用于内耳基因治疗,其使用羟基磷灰石纳米载体介导NT3基因转染体外培养的螺旋神经节细胞,而且介导耳蜗活体转染,证明可减轻耳蜗螺旋神经节细胞的兴奋性毒性损伤<sup>[13]</sup>。2011年10月至2012年12月,作者在体外观察了PEI-PEG对螺旋神经节细胞的转染效率、细胞毒性等,并与Lipofectamine 2000进行对比,以评价PEI-PEG应用于内耳基因治疗的前景。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 对比观察实验。

**时间及地点:** 于2011年10月至2012年12月在广州医科大学附属第二医院神经病学实验室(BSL-2)完成。

**材料:** Lipofectamine™ 2000、DMEM培养(美国Invitrogen公司); DMEM/F-12培养基(美国sigma公司); PEI-PEG4.6、pEGFP-N3质粒(实验室保存); 倒置荧光显微镜(日本nikon公司); 鼠抗神经丝蛋白抗体NF-200、阿糖胞苷(美国sigma-Aldrich公司); 质粒提取试剂盒(美国QIAGEN公司); 紫外分光计(上海佑科 UV752); 化学发光酶标仪(美国Bio-Tek Elix800)。

**实验方法:**

**螺旋神经节细胞的制备及培养鉴定<sup>[3]</sup>:** 出生后1-3 d的昆明小鼠(购自广东省动物实验中心),用体积分数75%乙醇浸泡消毒30-60 s,快速断头,取出耳蜗置于4 °C Hank's液中,显微镜下解剖耳蜗,暴露迷路,去除螺旋韧带、基底膜及血管纹,仅保留含有螺旋神经节的蜗轴螺旋管,依次用含0.125%胶原酶和含0.125%胰酶的Hank's液37 °C消化20-30 min。加入含体积分数10%胎牛血清DMEM/F-12终止消化,用吸管轻轻吹打2 min,500×g离心10 min,吸出上清,加入含100 U/mL青霉素的DMEM/F-12接种液,将细胞浓度调至10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup>后,接种于多聚赖氨酸处理的6孔板,37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育约2 h后,加入终浓度为5 μmol/L阿糖胞苷抑制非神经细胞生长。每日更换培养液。

培养24–48 h, 用鼠抗神经丝蛋白抗体NF-200(1 : 3 000)为一抗, 进行免疫组化鉴定, 经DAB显色后观察。阳性反应细胞呈棕黄色, 螺旋神经节细胞胞核及胞浆均着色, 细胞表达阳性的即可判断培养的是螺旋神经节细胞。

**质粒DNA(pDNA)的制备:** pEGFP-N3质粒用大肠杆菌(广州医科大学附属第二医院神经病学实验室保存)扩增, 质粒提取试剂盒提取纯化。制备的质粒通过紫外分光计检测含量( $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$ ), 然后在1.0%琼脂糖凝胶中100 V电压40 min。根据 $A_{260}$ 和 $A_{280}$ 的比值来估计制备样品的DNA纯度, 如果 $A_{260}/A_{280}=1.8-2$ , 并且电泳后没有杂质条带的, 表示DNA纯度较高, 符合实验要求。将合格的质粒保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

**pDNA/Lipofectamine2000复合物的制备:** 预实验中, 明确了转染螺旋神经节细胞时pDNA与脂质体的最佳比例为4 : 10(本文未列出数据)。先将2  $\mu\text{g}$  pDNA加入到100  $\mu\text{L}$ 无血清DMEM培养基中, 然后将5  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000加入100  $\mu\text{L}$ 无血清DMEM培养基中, 分别室温静置10 min后两者混合, 再室温作用20 min。

**pDNA/PEI-PEG4.6复合物的制备:** N/P比为聚合物中的氨基基团与DNA中的磷酸基团的摩尔比, 预实验中N/P=15时转染效率最好(本文未列出数据)。在Eppendorf管中, 将1  $\mu\text{g}$  pDNA稀释在50  $\mu\text{L}$  DMEM/F-12培养基中, 振荡均匀, 分别按N/P=15把相应量的聚乙烯亚胺-聚乙二醇加入到另外一管装有50  $\mu\text{L}$  DMEM/F-12培养基的Eppendorf管中, 然后把两溶液在室温下振荡5 min得到复合物。

**细胞毒性实验(MTT法):** 96孔板中每孔接种6 000个细胞, 每孔体积200  $\mu\text{L}$ , 培养24 h后每孔加入150  $\mu\text{L}$ 不含血清含有150 ng pDNA/Lipofectamine 2000复合物或pDNA/PEI-PEG4.6复合物的DMEM/F12培养液进行转染, 继续培养24 h后, 每孔加入5 g/L MTT溶液20  $\mu\text{L}$ , 继续培养4 h, 吸弃孔内培养上清液, 加入150  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砜, 振荡10 min后, 通过化学发光酶标仪测定在570 nm处的吸光值(A值), 计算细胞存活率。同时设置空白孔(DMEM/F12培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔(细胞、DMEM/F12培养液、MTT、二甲基亚砜), 每组设定3复孔。通过细胞的存活率来推定聚合物载体内在的细胞毒性, 其值越大则细胞毒性约小, 相对增殖百分率(%)=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值) $\times 100\%$ 。

#### 转染效果检测:

转染过程: 细胞以每孔 $1\times 10^8\text{ L}^{-1}$ 的浓度接种在24孔板上培养48 h, 待细胞丰度约70%, 先用无血清的DMEM/F-12培养基清洗, 再加DMEM/F-12无血清培养基, 将50  $\mu\text{L}$  pDNA/Lipofectamine 2000复合物或pDNA/PEI-PEG4.6复合物加入每孔中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中转染6 h, 加入含体积分数12%胎牛血清的DMEM/F-12培养基, 继续培育24 h。

倒置荧光显微镜观测: 转染24 h后通过倒置荧光显微

镜观测细胞的形态变化, 观测表达质粒子在细胞中的瞬时表达。阳性细胞发出明亮的绿色荧光, 而阴性细胞则无。

流式细胞仪观测: 转染24 h后弃去上层培养液, 细胞用500  $\mu\text{L}$  Hank's溶液悬浮, 然后应用流式细胞仪Aria<sup>TM</sup>系统计数阳性表达细胞的百分比(即转染效率), 每种细胞重复3次取平均值。

**主要观察指标:** PEI-PEG转染体外培养小鼠内耳螺旋神经节细胞的可行性及特点。

**统计学分析:** 应用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理, 计数资料以百分比表示, 两两比较卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 螺旋神经节细胞的制备及培养鉴定结果** 细胞种板48 h后大部分细胞贴壁生长, 螺旋神经节细胞胞体为椭圆形, 大部分细胞可见突起细长的双极细胞及少量三极神经原细胞(图1A)。神经丝蛋白抗体免疫组化结果显示, 螺旋神经节细胞胞质及突起显色为棕黄色, 核大而圆, 淡紫色, 呈现阳性反应(图1B)。

**2.2 转染后细胞形态** 两种载体分别转染后, 继续培养见培养液中细胞裂解碎片稍增多, 细胞数量稍略有减少, 但细胞形态未发生明显改变, 细胞突起无明显变少(图2)。

**2.3 细胞毒性实验** 实验所用的两种载体均对螺旋神经节细胞有一定的细胞毒性。PEI-PEG4.6复合物组螺旋神经节细胞存活率为85%, 比Lipofectamine 2000(73%)的细胞存活率要高( $P < 0.05$ )。

**2.4 细胞转染效果** 转染后在荧光显微镜下用波长488 nm的紫外线激发, 可观察到散在的绿色荧光螺旋神经节细胞, 胞体和轴突均有绿色荧光(图3), 两组细胞的荧光表达部位及强度未见明显差别。但从流式细胞仪检测转染效率来看, 发现PEI-PEG4.6组(16.5%)与Lipofectamine 2000(11.2%)组转染效率差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论 Discussion

感音性耳聋是耳蜗内的毛细胞及与其相联系的螺旋神经节细胞病变导致, 因为哺乳动物的毛细胞及螺旋神经节细胞的再生能力非常低甚至不能再生, 直接或间接的损伤均可导致永久性听力下降。所以感音性耳聋的药物治疗效果极其有限, 目前治疗神经性聋的方法只限于电子助听装置和人工耳蜗植入, 但人工耳蜗植入仅限于有一定数量听神经元存留的患者。研究证明, 螺旋神经节数量保持在10%以上才能保证人工耳蜗植入的效果<sup>[3]</sup>。因此, 受损的螺旋神经节细胞保护与修复对恢复听力起着至关重要的作用。螺旋神经节的发生及功能数量的维持离不开神经营养因子。由于神经营养因子等活性多肽相对分子质量大、半衰期短, 因此直接在内耳治疗上面临难题, 全身用药很难使药物在内耳保持有效治疗浓度, 而通过圆窗注射等途径的

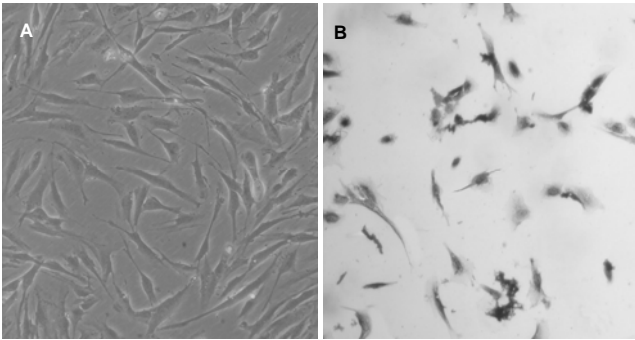


图1 小鼠内耳螺旋神经节细胞的培养与鉴定( $\times 100$ )

Figure 1 Culture and identification of spiral ganglion cells from the inner ear of mice ( $\times 100$ )

图注: 图中 A 为细胞种板 48 h 后, 荧光倒置显微镜观察胞体为椭圆形, 大部分细胞可见突起细长的双极细胞及少量三极神经原细胞; B 为神经丝蛋白免疫组化检测, 显示培养细胞的胞质及突起显色为棕黄色, 呈现阳性反应。

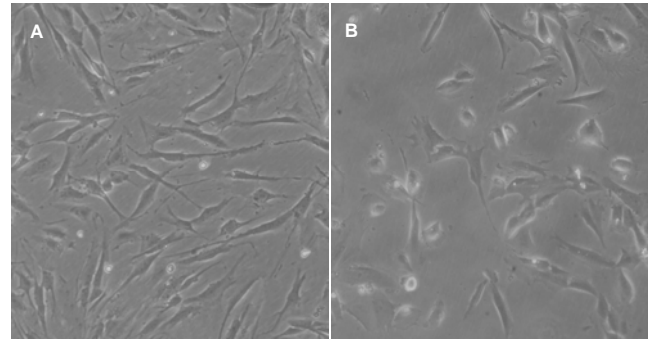


图2 叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺与 Lipofectamine 2000 分别介导转染小鼠内耳螺旋神经节细胞 24 h( $\times 100$ )

Figure 2 Spiral ganglion cells transfected with polyethylenimine-polyethylene glycol and lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 after 24 hours ( $\times 100$ )

图注: 图中 A 为叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺转染 24 h 的细胞, B 为 Lipofectamine 2000 转染 24 h 的细胞。两组细胞形态未发生明显改变。

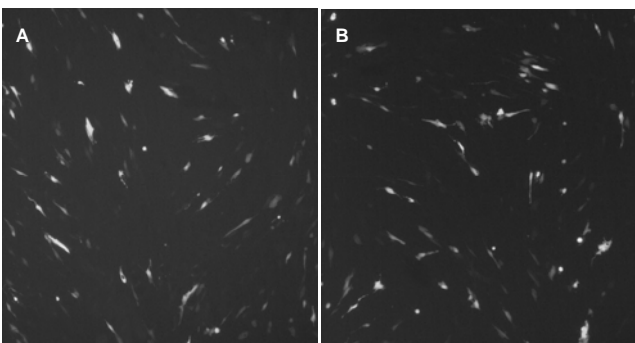


图3 叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺与 Lipofectamine 2000 分别介导转染小鼠内耳螺旋神经节细胞后绿色荧光蛋白的表达(倒置荧光显微镜,  $\times 10$ )

Figure 3 Green fluorescent protein expression in spiral ganglion cells after transfection by polyethylenimine-polyethylene glycol and Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (inverted fluorescence microscope,  $\times 10$ )

图注: 图中 A 为叶酸聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺介导转染后, 细胞胞体和轴突均有绿色荧光; B 为 Lipofectamine 2000 介导转染, 细胞胞体和轴突均有绿色荧光。

局部用药方法, 往往需多次反复用药而限制其应用。内耳基因治疗, 即通过病毒或非病毒载体向内耳细胞转染入相关治疗基因, 是一种极具发展前景的治疗手段。基因转染是基因治疗的关键技术, 也是一直以来制约基因治疗成功开展的重要问题, 而基因载体又是基因转染技术的关键因素。目前应用于基因治疗研究的基因转移载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。常用的病毒载体虽经遗传工程改造, 去除了病原性而保留了基因转染效能, 但制备困难、目的基因插入长度受限, 还存在潜在的免疫反应和生物安全等问题。非病毒载体大多制作简单, 免疫原性低, 不与宿主基因整合, 可重复应用, 使用安全性能显著优于病毒载体, 具有非常好的应用前景, 目前最常用的两种非病毒载体是以 Lipofectine 2000 为代表的阳离子脂质体和纳米颗粒。

阳离子脂质体是磷脂和其他亲水亲组物质分散于水中, 由一层或多层同心的脂质双分子膜包封而成的超微粒

状载体制剂。脂质体具有亲水性和疏水性双重特性, 决定了脂质体可以较好地包裹亲水性物质和亲脂性物质, 因此脂质体是目前运用较广泛的基因载体之一。尽管有了不少改良, 但脂质体普遍存在制备重复性和储存稳定性较差的缺点, 而且溶酶可以使进入细胞的脂质体降解, 并且脂质体细胞毒性相对较高, 可能会干扰细胞的代谢, 这些特点限制了脂质体的应用<sup>[15-16]</sup>。纳米颗粒是一种粒径在 1-100 nm 之间的超微粒子, 具有表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应等<sup>[17]</sup>。以纳米颗粒为基因转移载体的基本原理是将 DNA、RNA、肽核苷酸、dsRNA 和寡核苷酸等基因治疗分子包裹在纳米颗粒之中或吸附在其表面, 经细胞摄取后, 纳米颗粒进入细胞内, 释放基因治疗分子, 发挥其基因治疗效能<sup>[9]</sup>。阳离子聚合物作为一种新型纳米载体树枝状聚合物, 稳定性更好, 结构及性能也更容易调控, 是目前生物材料领域的研究热点, 也应用于内耳基因治疗研究中<sup>[18-19]</sup>。孙虹研究团队使用羟基磷灰石纳米载体介导 NT3 基因能成功转染离体培养螺旋神经节细胞, 但未分析转染效率及细胞毒性, 其向实验性兴奋性耳蜗损害豚鼠的耳蜗外淋巴腔灌注羟基磷灰石-Pegfpc2-NT3, 可见活体耳蜗神经元内有明显的 NT3 蛋白表达<sup>[13]</sup>。需要注意的是羟基磷灰石纳米载体是一种无机化学复合物纳米载体, 在耳蜗内如何降解及转归仍有待进一步研究。而本实验中使用的 PEG-PEI 纳米载体可在体内自然降解, 具备较低的细胞毒性, 在体内循环时间长, 无免疫原性, 不会引起机体免疫反应, 并且可根据细胞表面受体设计具备靶向性的分子结构。因此, PEI-PEG 作为新型非病毒载体已成功应用于多种细胞的转染及基因治疗研究中, 发现能转染包括神经干细胞、血管内皮细胞、肝癌细胞、宫颈癌细胞等多种体细胞<sup>[5-9]</sup>, 但目前为止未发现 PEI-PEG 应用于转染耳蜗内细胞(包括螺旋神经节细胞和毛细胞等)的研究报告。本研究尝试观察 PEI-PEG 对螺旋神经节细胞的转染效率、细胞毒性等, 以评价 PEI-PEG 应用于内耳基因治疗的前景。

转染效率及细胞存活率是权衡载体性能的主要指标之一,也是决定基因治疗可行性的指标之一。病毒载体介导转染螺旋神经节细胞的转染率一般为70%以上<sup>[20]</sup>,而非病毒载体转染效率远远低于病毒载体,这是制约非病毒载体应用于内耳基因治疗的主要因素<sup>[19]</sup>。国内学者报道应用阳离子脂质体作为载体,用NT-3基因转染耳蜗螺旋神经节细胞,发现对抑制耳蜗螺旋神经节细胞的退行性变有一定作用,证明了非病毒载体在耳蜗基因治疗中是可行的<sup>[21]</sup>。但阳离子脂质体转染效率较低,报道约为10%<sup>[22]</sup>,与本文作者研究的数据(11.2%)相当。该文研究中,PEI-PEG染效率(16.5%)比阳离子脂质体转染效率(11.2%)略高,差异有显著性意义。两种载体均对螺旋神经节细胞有一定的细胞毒性,螺旋神经节细胞存活率为85%,比Lipofectamine 2000的细胞存活率(73%)要高( $P < 0.05$ )。并且,以后可以通过优化材料化学修饰及优化实验条件,进一步提高转染效率及降低细胞死亡率<sup>[23-24]</sup>。

由此说明,Lipofectine和PEI-PEG都可以作为螺旋神经节细胞基因传输的载体,而PEI-PEG作为新的传输载体,各方面的性能都优于传统的阳离子脂质体,具有良好的研究价值,可作为基因载体用于耳蜗基因治疗研究。将来的研究中,还可以根据靶细胞表面受体的不同,在PEI-PEG添加特异性靶向分子,可以极大提高转染效率及降低细胞毒性<sup>[8, 25]</sup>。

**作者贡献:** 陈观贵负责整体实验的设计及实验实施,徐亚丽负责免疫荧光显微镜观察及流式细胞仪记录。陈观贵成文及审核,陈观贵对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 未涉及伦理冲突的内容。

**学术术语:** 聚乙烯亚胺分为线性 and 分枝状两种,线性聚乙烯亚胺包含的全是仲胺,而分枝状聚乙烯亚胺中有伯胺、仲胺和叔胺基。任何分子量的线性聚乙烯亚胺在常温下是固体,而分枝状聚乙烯亚胺是液体。

**作者声明:** 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Chen Y, Yang L, Huang S, et al. Delivery system for DNazymes using arginine-modified hydroxyapatite nanoparticles for therapeutic application in a nasopharyngeal carcinoma model. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3107-3118.
- [2] Sun NF, Liu ZA, Huang WB, et al. The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(3):352-357.
- [3] Boussif O, Lezoualc'h 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 U S A*. 1995;92(16):7297-7301.
- [4] Choosakoonkriang S, Lobo BA, Koe GS, et al. Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *J Pharm Sci*. 2003;92(8):1710-1722.
- [5] 张璇, 潘仕荣, 冯敏, 等. PEG-PEI共聚物介导VEGF165基因转染及对内皮细胞生长的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(10):1065-1071.
- [6] Liu Y, Liu Z, Wang Y, et al. Investigation of the performance of PEG-PEI/ROCK-II-siRNA complexes for Alzheimer's disease in vitro. *Brain Res*. 2013;1490:43-51.
- [7] 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. *Biomaterials*. 2013;34(10):2547-2564.
- [8] Liang B, He ML, Xiao ZP, et al. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367(4):874-880.
- [9] Merkel OM, Beyerle A, Librizzi D, et al. Nonviral siRNA delivery to the lung: investigation of PEG-PEI polyplexes and their in vivo performance. *Mol Pharm*. 2009;6(4):1246-1260.
- [10] 段亚君, 杨翠红, 张振方, 等. 非病毒基因载体介导短发夹RNA转染抑制肿瘤细胞生长[J]. *科学通报*, 2009, 54(9):1193-1197.
- [11] Fu Y, Ding D, Wei L, et al. Ouabain-induced apoptosis in cochlear hair cells and spiral ganglion neurons in vitro. *Biomed Res Int*. 2013;2013: 628064.
- [12] Yumusakhuyulu AC, Yazici M, Sari M, et al. Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012; 76(3):404-408.
- [13] 蒋明, 张永全, 贺广湘, 等. 羟基磷灰石纳米颗粒介导NT-3基因对豚鼠兴奋毒性损伤耳蜗的保护作用[J]. *中南大学学报:医学版*, 2007, 32(4):563-567.
- [14] 陈观贵, 谢鼎华, 刘谦虚, 等. 脑源性神经营养因子基因修饰的骨髓间充质干细胞在药物致聋豚鼠内耳的表达及保护作用[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 45(11):924-929.
- [15] Levine RM, Pearce TR, Adil M, et al. Preparation and characterization of liposome-encapsulated plasmid DNA for gene delivery. *Langmuir*. 2013;29(29):9208-9215.
- [16] Samadikhah HR, Majidi A, Nikkha M, et al. Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2275-2283.
- [17] Elangovan S, Jain S, Tsai PC, et al. Nano-sized calcium phosphate particles for periodontal gene therapy. *J Periodontol*. 2013;84(1):117-125.
- [18] Zhang W, Zhang Y, Lobler M, et al. Nuclear entry of hyperbranched polylysine nanoparticles into cochlear cells. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:535-546.
- [19] Pyykko I, Zou J, Zhang W, et al. Nanoparticle-based delivery for the treatment of inner ear disorders. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;19(5):388-396.
- [20] Husseman J, Raphael Y. Gene therapy in the inner ear using adenovirus vectors. *Adv Otorhinolaryngol*. 2009;66:37-51.
- [21] 蒋明, 张永全, 贺广湘, 等. 阳离子脂质体介导小鼠原代螺旋神经节细胞NT-3基因转染的实验研究[J]. *中国耳鼻咽喉喉底外科杂志*, 2006, 12(1):10-13.
- [22] 陈请国, 褚汉启, 王显红, 等. 新生大鼠螺旋神经节细胞体外生长特点及脂质体介导的转染效率[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2010, 18(5):462-465.
- [23] 周艳芳, 陈晓爱, 叶美红, 等. 正交设计优化聚乙烯亚胺介导肝癌细胞基因转染效率的研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2011, 28(1):104-109.
- [24] 陈磊, 田华雨, 陈学思, 等. 交联型聚乙烯亚胺智能基因载体的制备及PEG化影响[J]. *高分子学报*, 2009, 53(6):499-505.
- [25] Liu W, Kinnefors A, Bostrom M, et al. Expression of TrkB and BDNF in human cochlea-an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*. 2011;345(2):213-321.