

PEI-g-MPEG/白细胞介素-10 基因传递系统转染 背根神经节细胞的体外性能研究*

裴媛媛¹ 王伟伟^{1,2} 刘先国^{3**} 帅心涛^{1,2**}

(¹ 中山大学中山医学院生物医学工程中心 广州 510080) (² 中山大学化学与化学工程学院 广州 510275)

(³ 中山大学中山医学院疼痛研究中心 广州 510080)

摘要 探索非病毒基因载体聚乙二醇-聚乙烯亚胺共聚物(PEI-g-MPEG)介导白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)体外转染原代培养背根神经节细胞(dorsal root ganglion cells, DRGs)的效果. 采用本实验室设计合成的 PEI-g-MPEG,与同时携带增强型绿色荧光蛋白报告基因及 IL-10 基因的真核表达质粒 DNA(pDC316-EGFP/IL-10)形成复合物,以脂质体(lipofectamine)复合体系 Lipo/pDNA 为对照,通过溴乙锭(ethidium bromide, EB)排斥实验、凝胶阻滞电泳实验、粒径与电位的测定及扫描电镜等实验方法观察 PEI-g-MPEG/pDNA 的复合效果. 并且检测了复合物对 DRGs 的毒性、转染效果及 IL-10 的蛋白表达情况. 结果表明, PEI-g-MPEG 在 N/P(PEI-g-MPEG 所含的氮原子和质粒 DNA 中磷原子的摩尔比)为 5 时可完全复合 pDNA;随着 N/P 的增大, PEI-g-MPEG/pDNA 复合物的粒径逐渐减小,而表面电位逐渐增大;在 N/P 为 15 时报告基因转染效果和 IL-10 蛋白表达情况较好,复合物的形貌呈大小均一的球形. PEI-g-MPEG/IL-10 基因传递系统对于神经病理性疼痛的基因治疗具有潜在应用价值.

关键词 PEI-g-MPEG, DRGs, IL-10, 神经病理性疼痛

基因治疗在神经病理性疼痛(neuropathic pain)的研究中越来越受到广泛关注^[1]. 白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)是一种重要的抗炎细胞因子,对多种原因引起的神经病理性疼痛有着预防和治疗作用^[2,3]. 载体是进行疾病基因治疗的关键,通常分为病毒载体及非病毒载体两大类,目前所应用的病毒类基因载体如腺病毒、腺相关病毒或逆转录病毒等虽然在基因转染效率方面存在优势,但是都存在潜在的病原性、免疫原性等方面的安全问题,其临床应用价值一直受到很多的质疑. 大量的研究表明,生物医用高分子材料作为一类新型的非病毒基因载体有着广泛的应用前景,具有结构及性能易于调控以及使用安全性好等方面的巨大优势,近年来成为非常热门的研究领域,其中聚乙烯亚胺(PEI)由于具有独特的“质子海绵”效应,成为近年来研究最为广泛的正离子聚合物非病毒基因载体之一^[4],在众多细胞中比如 NIH 3T3, HeLa, HepG2, HUVEC, PC-12 和 hADSC 等都表现出较好的转染效果^[5~8];但是 PEI 载体的基因转染效率也受到许多因素诸如

PEI 本身的结构(例如线形、枝化等不同分子结构)、质粒大小、细胞种类及转染环境等的影响,此外,随着 PEI 分子量的增加,随之增大的正离子细胞毒性严重限制了它在体内的应用^[9]. 为此将正离子聚合物连接上非离子亲水性基团如聚乙二醇(PEG),聚[N-(2-羟丙基)异丁烯酰胺]等,一方面可降低 PEI 的正离子毒性,另一方面可减少“聚合物/基因复合物”纳米粒子在生理环境中与血浆蛋白等的相互作用,从而提高纳米粒子在血液中的稳定性并延长其血液循环时间^[9,10]. Tang 等^[11,12]在研究 PEG 修饰 PEI 载体的体内外中枢神经系统的基因传递情况时,发现 PEG-PEI/DNA 复合物经鞘内注射后,在脊髓组织中目的基因的表达比 PEI 均聚物明显增强. 进一步研究发现,适度的短链 PEG 修饰 PEI 能使复合物体积变小,抑制复合物聚集,显著提高 PEI/DNA 复合物的可溶性和转染效果.

本研究中主要涉及背根神经节细胞(dorsal root ganglion cells, DRGs),其结构简单,是神经系统研究中一个重要的细胞模型. 本文设计合成4:1

* 2009-02-16 收稿,2009-03-10 修稿;国家自然科学基金(基金号 50673103)、高等学校博士学科点专项科研基金(基金号 20060558083)和广东省基金(基金号 7003703 和 2005A30801002)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: liuxg@mail.sysu.edu.cn; shuaxt@mail.sysu.edu.cn

摩尔比的 MPEG 接枝的 PEI 共聚物基因载体, 观察 PEI-g-MPEG/IL-10 基因传递系统的理化性能及其对原代培养 DRGs 的体外转染效果, 探讨非病毒基因载体在原代培养神经系统细胞中应用的可行性, 为神经病理理性疼痛的基因治疗研究奠定一定的基础. 目前, 在大鼠原代培养神经系统细胞中, 由 PEI-g-MPEG 介导的 IL-10 基因传输情况尚鲜见报道.

1 实验部分

1.1 试剂

支化 PEI (25KD), 甲氧基聚乙二醇又称单甲醚聚乙二醇 (MPEG-OH, 2KD), *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), *N,N'*-二环己基碳二亚胺 (DCC) 及透析袋 (MWCO = 1 kDa 和 8 kDa) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 细胞培养试剂购自 Gibico 公司; 脂质体 Lipofectamine2000 (Lipo) 购自 Invitrogen 公司; 细胞计数 (Cell Counting Kit-8 (CCK-8)) 试剂盒购自日本同仁化学研究所; 真核表达质粒 pDC316-EGFP/IL-10 由本室 -80℃ 保存; SD 大鼠购自中山大学实验动物中心.

1.2 DRGs 的原代细胞培养

将 50 g 左右的 SD 大鼠麻醉后无菌条件下逐个摘除脊髓两旁呈串珠样的背根神经节^[13]; 在培养皿中用 D-PBS 清洗两次, 剪碎后加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化 20 min; 终止消化后以 200 目筛网过滤; 用 DMEM 培养基清洗 2 次, 1000 r/min 离心 10 min, 去上清; 加入含 10% 胎牛血清

(FBS) 和双抗的 DMEM 培养基重悬细胞, 制成单细胞悬液; 细胞计数后调整细胞浓度为 5×10^5 / mL, 接种于底部预铺有盖玻片的 24 孔培养板, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱.

1.3 PEI-g-MPEG 的合成

PEI-g-MPEG 的合成路线如图 1 所示, 由单甲醚聚乙二醇丁二酸酯 (MPEG-SA) 的合成, 活化单甲醚聚乙二醇丁二酸酯 (MPEG-NHS) 的合成和单甲醚聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺共聚物 (PEI-g-MPEG) 的合成 3 部分组成^[14].

把 5 g (2.5 mmol) MPEG ($M_n = 2$ kDa) 加入三口瓶中, 80℃ 真空干燥 5 h, 加入 20 mL 干燥三氯甲烷, 待其溶解后再加入 1.25 g (5 mmol) 丁二酸酐, 70℃ 搅拌回流反应 48 h, 减压除掉三氯甲烷, 溶解在 20 mL 蒸馏水中, 然后用透析袋 (MWCO = 1 kDa) 透析 48 h, 冷冻干燥得白色粉末状产物 MPEG-SA.

把 4.0 g (2.0 mmol) MPEG-SA 加入两口瓶中真空干燥 5 h, 溶解在 15 mL 干燥的二氯甲烷中, 加入 0.4 g (4.0 mmol) NHS 和 0.72 g (4.0 mmol) DCC, 室温搅拌反应 24 h, 随着反应进行, 体系逐渐变混浊, 过滤除去不溶物, 滤液沉淀在冷乙醚中, 过滤后用乙醚和异丙醇分别洗 1 次, 干燥得产物 PEG-NHS.

称取 1 g 支化聚乙烯亚胺 (hy-PEI $M_n = 25$ kDa) (0.04 mmol) 溶于 20 mL pH = 7.4 的 PBS 中, 然后加入 0.32 g (0.16 mmol) MPEG-NHS, 室温搅拌反应 24 h, 用透析袋 (MWCO = 8 kDa) 在蒸

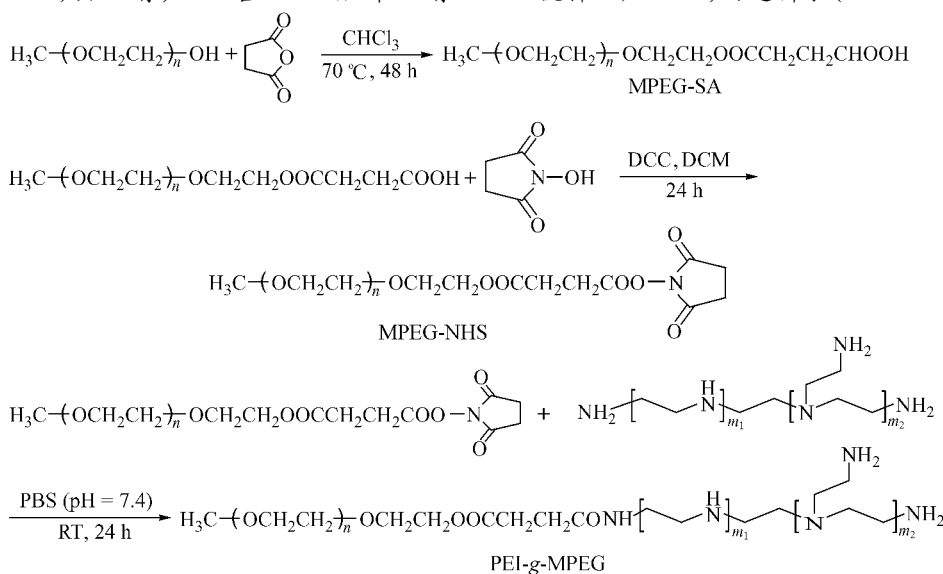


Fig. 1 Synthesis of PEI-g-MPEG

馏水中透析 48 h 后冷冻干燥,得到白色黏稠状产物 PEI-g-MPEG。

1.4 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物的制备

取质粒 pDNA 1 μg ,按不同 N/P (PEI-g-MPEG 的氨基与 pDNA 的磷酸基摩尔比)取相应量的 PEI-g-MPEG,加去离子水至实验所需体积,混匀后摇床振荡 30 min,静置 10 min,即得到不同比例的 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物溶液;相应量 Lipo/pDNA 的复合体系按照说明书进行(质粒 DNA 1 μg 时,脂质体 Lipo 2 μL)。

1.5 EB 排斥实验和凝胶阻滞电泳

在不同 N/P 的 PEI-g-MPEG/pDNA 复合体系里加入 0.01% EB 5 μL 充分混匀;转移至 96 孔酶标板,用荧光酶标仪(Infinite F200, TECAN)测定荧光强度,激发波长 518 nm,发射波长 605 nm。阳性对照孔不加纳米聚合物,阴性对照孔为空白介质。

取不同 N/P 的 PEI-g-MPEG/pDNA 和 Lipo/pDNA 的复合物溶液 10 μL ,在含 EB 的 1% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 40 min,紫外灯下观察电泳条带。

1.6 粒径和 zeta 电位的测定

取不同 N/P 的 PEI-g-MPEG/pDNA 和 Lipo/pDNA 的复合体系,用去离子水稀释至 1.5 mL,用激光衍射纳米粒度分析仪(90 Plus/BI-MAS)测量粒径、zeta 电位,所得数值为 3 次测量的平均值。

1.7 细胞毒性(CCK-8 实验)

在 96 孔培养板中接种 DRGs 细胞 8000 个/孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养;实验孔分别加入不同浓度的 PEI-g-MPEG 或不同 N/P 值的 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物溶液以及 Lipo/pDNA 的复合体系,对照孔不加干预物质,空白孔为不含细胞和干预物质的培养基;37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h,每孔加入 10 μL CCK-8 孵育 4 h,在不同时间点用荧光酶标仪检测 450 nm 吸光度,参比波长 620 nm。

1.8 基因转染实验

在 24 孔培养板中接种 DRGs 细胞 5.0×10^4 /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,当细胞密度达到 70% 时(每孔内细胞的生长占到孔底总面积的 70% 左右)吸除培养基,用 D-PBS 清洗两次,将不同 N/P(0、1、5、10、20、30)的 PEI-g-MPEG/pDNA 和 Lipo/pDNA 形成的转染体系分别加入到培养孔中,充分混合后孵育 4 h,去除转染体系,加培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱。在 48 h 时用倒置荧光显微镜

(Axiovision, Zeiss)观察报告基因增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达情况,同时收获细胞用 FACScan 流式细胞仪定量检测 EGFP 的转染效率。

1.9 ELISA 检测

按 R&D 试剂盒说明书进行 ELISA 检测。稀释冻干标准品至浓度依次为 1.0×10^3 , 5×10^2 , 2.5×10^2 , 1.25×10^2 , 0.625×10^2 , 0.3125×10^2 , 0 $\mu\text{g/mL}$;取出适量聚苯乙烯微量酶标板,每孔加生物素化抗体工作液 50 μL ,孵育 30 min,洗板 3 次,每次 3 min;除空白孔外,分别将样品和不同浓度的标准品 100 μL 加入相应孔中,用封胶纸封住反应孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,洗板 3 次;每孔加 100 μL 生物素化抗体工作液,封住板孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,洗板 3 次;每孔加 100 μL 酶结合物工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗板 3 次;37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min,终止反应后测光密度值 OD(optical density)。

1.10 扫描电镜(SEM)

把样品复合物溶液滴到干净盖玻片上,放进加有硅胶的干燥器中室温干燥 2 h,镀金 8 min,在热场发射环境扫描电镜(Quanta 400 FEG)上观测样品形貌。

1.11 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示,通过 SPSS11.5 统计软件进行数据处理,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 PEI-g-MPEG 的合成

文献报道^[5, 15],高分子量 PEI 具有较高的转染效率和较强的细胞毒性。Ahn 等^[16]发现 PEI 分子量从 1.8 kD 增至 25 kD 时,对 293T 细胞的转染效率增加 3 倍,但是毒性的增加使细胞存活率从 80% 降到 40%。在 PEI 表面进行接枝 PEG 修饰后可以降低毒性,增加水溶性,但接枝较多 PEG 会产生屏蔽效应,阻止纳米粒子复合物与细胞膜的接触,从而使转染效率下降,为此本实验室设计合成了 4:1 摩尔比的 MPEG 接枝 PEI 共聚物。如图 2 所示,通过 Mercury-Plus300 超导核磁共振波谱仪($^1\text{H-NMR}$)表征合成的 PEI-g-MPEG,显示出质子特征化学位移 $\delta = 3.4$ 和 3.63 分别对应于 MPEG 链上 CH_3O —和— OCH_2CH_2 —质子的

化学位移; $\delta = 2.4 \sim 2.8$ 对应于 PEI 链上 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{NH}-$ 亚甲基的化学位移. 由积分峰面积计算出 MPEG 与 PEI 的摩尔比为 4:1.

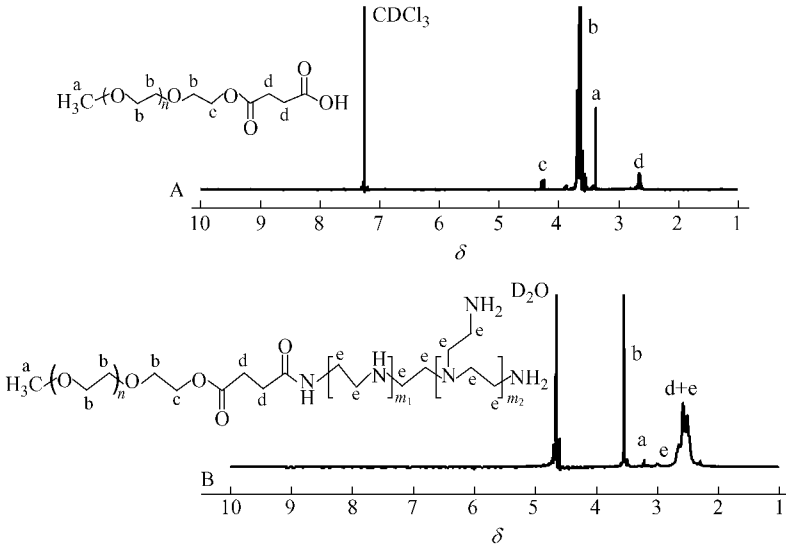


Fig. 2 ^1H -NMR spectra of carboxylic group-ended MPEG in CDCl_3 (A) and PEI-g-MPEG in D_2O (B)

2.2 EB 排斥实验和凝胶阻滞电泳

随着 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物 N/P 值的增大,转染细胞的荧光强度呈下降趋势(图3),N/P = 1 和 2 时,相对 EB 荧光强度分别为 $(84 \pm 1.22)\%$ 、 $(47 \pm 1.08)\%$,至 N/P = 5 到 30 时,相对荧光强度分别减至 $(13 \pm 0.83)\%$ 、 $(12 \pm 0.91)\%$,形成了与横坐标轴基本平行的趋势. EB 排斥实验的基本原理是,EB 荧光染料可嵌入 DNA 双链从而引起荧光强度的显著提高,而与载体完全复合的 DNA 不能接受 EB 的嵌入,因而不会干预 EB 的荧光强度值. EB 排斥实验表明加入聚合物 PEG-PEI 后,EB 的荧光强度急剧降低,随着 N/P 的增加,荧光强度的降低趋于缓慢,与凝胶阻滞实验结果相符合. 图 3 结果表明载体与质粒在 N/P 4 至 5 范围内发生完全复合.

在 DNA 凝胶电泳实验中使用 EB 为染料,可见 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物的条带亮度随着

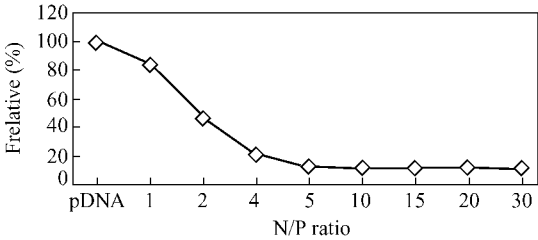


Fig. 3 Relationship between relative fluorescence intensity of ethidium bromide (EB) and N/P ratio determined in EB exclusion assay

N/P 的增大而逐渐减弱(图4),表明 DNA 因与载体复合而难以迁移入凝胶中并被 EB 染色,在 N/P = 5 时已经完全看不到游离的 pDNA 条带,与 Lipo/pDNA 复合体系的实验结果及前述 EB 排斥实验结果一致,说明此时 pDNA 所带负电荷已完全被 PEI-g-MPEG 中和,使 pDNA 完全阻滞在加样孔中.

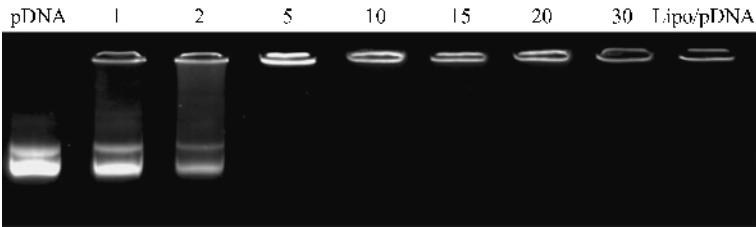


Fig. 4 Determination of pDNA condensation by PEI-g-MPEG in gel retardation assay

2.3 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物粒径和 zeta 电位的测定

PEI-g-MPEG/pDNA 复合物的粒径和 zeta 电位是衡量其进入细胞能力的重要指标. 经激光纳米粒度仪测定, 可知不同 N/P 的 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物粒径及 zeta 电位是不同的 (图 5); 随着 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物 N/P 值的不断增高, 载体凝聚 pDNA 的效果逐渐提高, 因而复合物的粒径逐渐减小, 而负电性 pDNA 被更好地复合的结果则是使粒子的 zeta 电位逐渐增大; N/P = 5 降至最小值 89 nm 左右, 随后增大并稳定在 130 nm 左右; 与其相比 Lipo/pDNA 复合体系的粒径

稍大为 138 nm 左右, 两者的 zeta 电位相当, 都大约为 30 mV 左右. 纳米粒子的粒径和表面电位不仅影响到复合物纳米粒子的溶液稳定性, 还显著影响粒子与细胞膜的粘附, 电位较高的复合物更容易与带负电的细胞膜结合, 而粒径较小的粒子更易被细胞内吞, 从而可以将外源基因更有效地导入细胞, 获得更高的基因转染效率. 然而, 若复合物纳米粒子的表面正电性过高, 粒子的阳离子毒性也较高, 因此, 非病毒基因载体研究中的一个重要任务就是在追求理想基因转染效率的前提下尽量降低基因复合物纳米粒子的正离子毒性, 即对粒子的表面正电性进行合理的调控^[17, 18].

2.4 细胞毒性

CCK-8 比色法是广泛应用于检测细胞毒性和增殖的一种实验方法. 以不同浓度的 PEI-g-MPEG 作用于 DRGs 细胞, 正常培养 7~10 天左右, 在聚合物浓度小于 10 μg/mL 以下时, 细胞生存率能达到 95.2%, 提示做基因转染实验时聚合物 PEI-

g-MPEG 的终浓度应 ≤ 10 μg/mL. 以不同 N/P 的 PEI-g-MPEG/pDNA 复合体系作用于 DRGs 细胞 48 h, 可见在 N/P ≤ 15 时, 复合物对细胞没有明显的毒性, 但在 N/P > 15 时, 细胞毒性逐渐增大 (图 6).

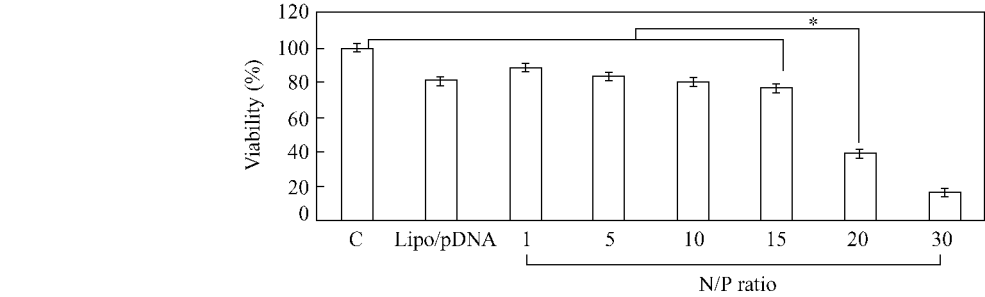


Fig. 5 Particle size and ζ -potential of PEI-g-MPEG/pDNA polyplexes determined by dynamic light scattering

2.5 基因转染

在 DRGs 细胞的体外转染实验中, 以 Lipo/pDNA 为对照, 把 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物溶液形成的转染体系作用于 DRGs 细胞 48 h, 倒置荧光显微镜下观察 DRGs 细胞表达的 EGFP 的荧光

强度, 并用流式细胞仪定量检测 EGFP 的转染效率. 白光下可见 DRGs 中主要有神经元和神经胶质细胞两类细胞, 但荧光下观察到 DRGs 细胞中 EGFP 的表达基本上都在神经胶质细胞中, 而且在不同 N/P 时 EGFP 的表达量是不同的 (图 7);

Fig. 6 *In vitro* cytotoxicity of PEI-g-MPEG/pDNA polyplexes in DRGs determined by CCK-8 assay
C represents control (*i. e.* cells incubated without adding polyplex); * $P < 0.05$

随着 N/P 的逐渐递增,转染效率相应逐渐增加,在 N/P = 15 时可见获得最高转染效率 24.14%,随后转染效率反而又有所降低;略高于 Lipo/pDNA 体系获得的转染效率 17.53%. 粒径测量实验结果显示此时纳米复合物的粒径为 130 nm 左

右,在 N/P = 5 时复合物的粒径更小而此时复合物的基因转染效率反而较低,一个可能的原因是过小粒径复合物粒子不易传输至细胞表面,以及胞内核酸释放减少等原因导致其转染效率低下^[5].

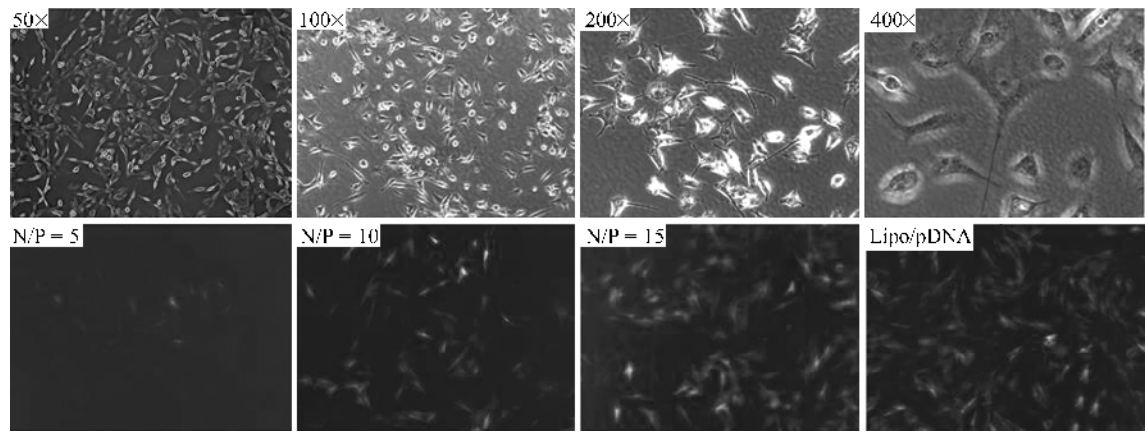


Fig. 7 Phase contrast microscopic images of cultured DRGs of different magnifications from 50 × to 400 × and fluorescence images of 100 × at 48 h after tansfected with PEI-g-MPEG/pDNA polyplexes at N/P ratios of 5, 10, 15, respectively and Lipo/pDNA

2.6 扫描电镜观察

如图 8 所示,N/P = 15 时,在溶液中所形成的 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物纳米粒子在扫描电镜下呈大小均匀的球形,分散性良好,边界清晰规则,有利于获得理想的基因转染效率. 平均粒径为 130 nm 左右,与动态光散射的检测结果相当.

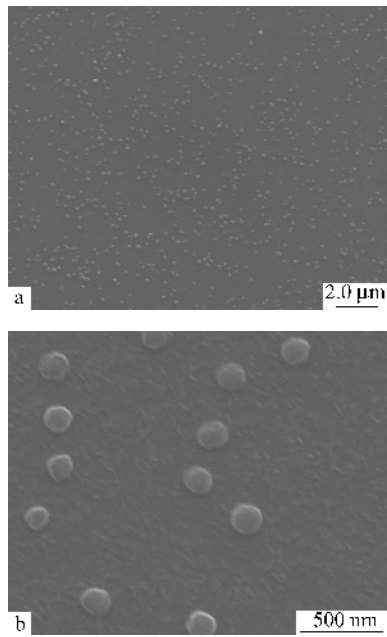


Fig. 8 Scanning electron microscopy (SEM) images of PEI-g-MPEG/pDNA polyplexes at N/P 15
(a) and (b) represent magnifications of 15000 × and 120000 ×, respectively

2.7 ELISA 检测 IL-10 蛋白表达

用 PEI-g-MPEG/pDNA 在 N/P 比为 0、1、5、10、15、20、30 时以及 Lipo/pDNA 转染 DRG 细胞,通过流式细胞仪定量检测得出 EGFP 的转染效率分别为 0.69%、0.98%、2.57%、14.19%、24.14%、21.25%、7.16% 和 17.53%. 在采用 Lipo/pDNA 为对照,以不同 N/P 值的 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物作用于 DRGs 细胞 48 h,分别收集细胞上清和胞浆,用 ELISA 试剂盒(R&D 公司)检测目的蛋白 IL-10 的表达情况(图 9). 实验结果表明在基因转染 48h 时,分泌型细胞因子 IL-10 基本存在于 DRGs 细胞培养上清中,在 N/P = 15 时 IL-10 的蛋白表达情况最好,并且和绿色荧光蛋白的表达情况相一致,说明本实验所构建的真核表达质粒中 EGFP 和 IL-10 基因能够同时被启动;在 N/P = 20 时由于 PEI-g-MPEG/pDNA 复合物对 DRGs 细胞的毒性明显增大,转染效率下降,IL-10 蛋白表达也开始呈现下降趋势,可能随着 N/P 的增加,PEI-g-MPEG 和 DNA 之间逐渐增强的缔合作用限制了 DNA 在细胞内的解离、释放与表达,而且其细胞毒性也增加,从而使转染效率逐渐下降,目的蛋白的表达水平也随之降低.

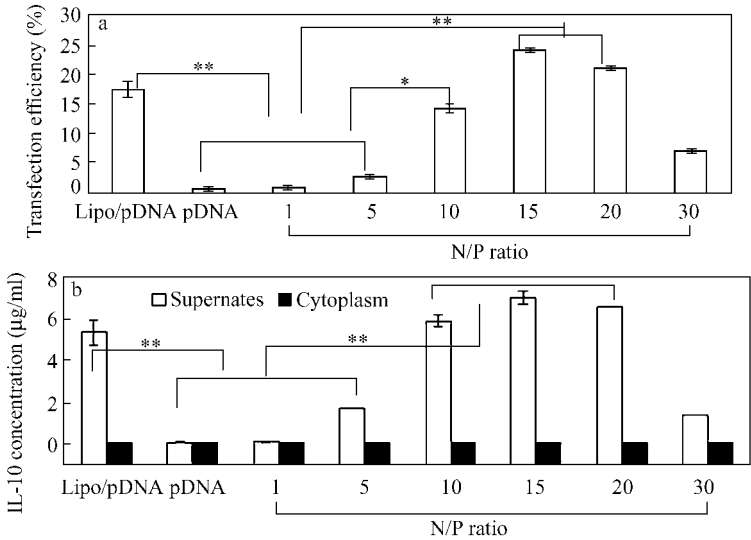


Fig. 9 IL-10 protein expression determined by ELISA (b) and EGFP transfection efficiency (a) in DRGs at 48 h after transfection with PEI-g-MPEG/pDNA polyplexes
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3 结论

在创伤、肿瘤及炎症等因素的作用下、初级感觉传入神经元和中枢神经元的兴奋性异常升高导致神经胶质细胞(主要是星型胶质细胞和小胶质细胞)分泌致炎细胞因子如 IL-1、IL-6、TNF- α 等,作用于背根神经节和脊髓背角神经元,引起外周和中枢敏化,导致神经病理性疼痛^[19, 20]. IL-10 是一种重要的抗炎细胞因子,对致炎细胞因子的合成、释放及其受体表达有广泛的抑制作用,对多种原因引起的神经病理性疼痛有预防和治疗作用.随着细胞和分子生物学技术的发展,基因治疗在神经病理性疼痛机制的研究中不断深入,非病毒载体易于组装、低毒性、低免疫源性和易实现靶向性等优点使得它在基因治疗的研究中日渐显示出优势.背根神经节细胞(DRGs)主要为神经系统

感觉神经元,结构简单,富含神经元、雪旺细胞、卫星样胶质细胞等,是神经系统研究中一个重要的细胞模型.本研究经采用无毒、抗免疫原性的水溶性大分子 MPEG 接枝修饰 PEI,与含 IL-10 基因及绿色荧光蛋白报告基因的质粒 DNA 复合,自组装形成壳-核结构的纳米粒子,增加了复合物的稳定性,降低了细胞毒性,其所形成的基因传递系统(PEI-g-MPEG/IL-10)经过一系列理化性能研究,使报告基因 EGFP 和目的基因 IL-10 得到了有效表达.初步证实了该基因传输体系对原代培养背根神经节细胞具有较好的基因转染效果,在神经病理性疼痛治疗学中具有潜在的应用价值.

致谢 感谢中山大学生命科学院翁少萍老师、吕玲老师对本研究的帮助

REFERENCES

- Goss J R, Goins W F, Glorioso J C. Expert Review of Neurotherapeutics, 2007, 7: 487 ~ 506
- Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L, O'Garra A. Annual Review of Immunology, 2001, 19: 683 ~ 765
- Milligan E D, Sloane E M, Langer S J, Hughes T S, Jekich B M, Frank M G, Mahoney J H, Levkoff L H, Maier S F, Cruz P E, Flotte T R, Johnson K W, Mahoney M M, Chavez R A, Leinwand L A, Watkins L R. Pain, 2006, 126: 294 ~ 308
- Godbey W T, Wu K K, Mikos A G. J Control Release, 1999, 60: 149 ~ 160
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 60: 247 ~ 266
- Zaric V, Weltin D, Erbacher P, Remy J S, Behr J P, Stephan D. Journal of Gene Medicine, 2004, 6: 176 ~ 184
- Lee J H, Ahn H H, Kim K S, Lee J Y, Kim M S, Lee B, Khang G, Lee H B. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2008, 2: 288 ~ 295
- Ahn H H, Lee J H, Kim K S, Lee J Y, Kim M S, Khang G, Lee H B. Biomaterials, 2008, 29: 2415 ~ 2422
- Hong J W, Park J H, Huh K M, Chung H, Kwon I C, Jeong S Y. J Control Release, 2004, 99: 167 ~ 176

- 10 Nimesh S, Goyal A, Pawar V, Jayaraman S, Kumar P, Chandra R, Singh Y, Gupta K C. *J Control Release*, 2006, 110:457 ~ 468
- 11 Tang G P, Zeng J M, Gao S J, Ma Y X, Shi L, Li Y, Too H P, Wang S. *Biomaterials*, 2003, 24:2351 ~ 2362
- 12 Shi L, Tang G P, Gao S J, Ma Y X, Liu B H, Li Y, Zeng J M, Ng Y K, Leong K W, Wang S. *Gene Therapy*, 2003, 10:1179 ~ 1188
- 13 Wong L F, Yip P K, Battaglia A, Grist J, Corcoran J, Maden M, Azzouz M, Kingsman S M, Kingsman A J, Mazarakis N D, McMahon S B. *Nature Neuroscience*, 2006, 9:243 ~ 250
- 14 Shuai X T, Merdan T, Unger F, Wittmar M, Kissel T. *Macromolecules*, 2003, 36:5751 ~ 5759
- 15 Lemkine G F, Demeneix B A. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2001, 3:178 ~ 182
- 16 Ahn C H, Chae S Y, Bae Y H, Kim S W. *Journal of Controlled Release*, 2002, 80:547 ~ 548
- 17 Nishiyama N, Kataoka K. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, 112:630 ~ 648
- 18 Durnev A D. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, 145:72 ~ 74
- 19 Milligan E D, Langer S J, Sloane E M, He L, Wieseler-Frank J, O'Connor K, Martin D, Forsayeth J R, Maier S F, Johnson K, Chavez R A, Leinwand L A, Watkins L R. *The European Journal of Neuroscience*, 2005, 21:2136 ~ 2148
- 20 Murray P J. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006, 6:379 ~ 386

IN VITRO EVALUATION OF INTERLEUKIN-10 GENE DELIVERY INTO DORSAL ROOT GANGLION CELLS MEDIATED BY PEI-g-MPEG

PEI Yuanyuan¹, WANG Weiwei^{1,2}, LIU Xianguo³, SHUAI Xintao^{1,2}

(¹ Biomedical Engineering Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080)

(² School of Chemistry & Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275)

(³ Pain Research Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080)

Abstract The use of non-viral carrier, polyethyleneimine-*g*-methoxypoly(ethylene glycol) (PEI-*g*-MPEG) for interleukin-10 (IL-10) gene delivery into rat dorsal root ganglion cells (DRGs) was examined *in vitro*. Electrophoresis, ethidium bromide exclusion, SEM, size and zeta (ζ) potential measurements were performed to characterize the nanocomplex, PEI-*g*-MPEG/pDNA. In addition, the cytotoxicity, transfection efficiency and IL-10 protein expression level in comparison with lipofectamine as a delivery agent were determined. Results showed that plasmid DNA was completely complexed by PEI-*g*-MPEG at a nitrogen-to-phosphor (N/P) ratio of 5. The PEI-*g*-MPEG/pDNA complexes were well-distributed and spherical with smooth surface. As the proportion of PEI-*g*-MPEG increased, *i. e.* when N/P ratio increased from 1 to 30, the size of the PEI-*g*-MPEG/DNA complexes decreased from 229 nm to 130 nm, while the surface charge increased from -19 mV to 32 mV, which led to the increased cytotoxicity. Flow cytometry revealed that the highest transfection efficiency (24%) using PEI-*g*-MPEG as a delivery agent was obtained at N/P charge ratio of 15, which was higher than that of lipofectamine (17%) at the same N/P value. After transfection, rat IL-10 expression in DRGs primary culture assessed using ELISA was observed to localize in the cytoplasm at 48 h in concordance with the result obtained for EGFP expression. These results indicated that PEI-*g*-MPEG could be a potential candidate for gene delivery during the therapy of neuropathic pain.

Keywords PEI-*g*-MPEG, DRGs, IL-10, Neuropathic pain