

尾静脉注射方法考察 Stearic-PEI/SPIO 纳米基因载体的基因转染性能及磁共振可视化效果研究

谢丽斯 高琳 王志勇* 隆晓菁 郑海荣*

(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

摘 要 实验应用硬脂酸-聚乙烯亚胺包裹超顺磁氧化铁 (Superparamagnetic Iron Oxide, SPIO) 装载目的基因构建可视化纳米复合物, 进行 BABL/c 雌性小鼠体内磁共振成像实验、组织学检测, 探讨其是否能够有效地介导体内基因表达以及产生磁共振成像 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 效果。MRI 实验结果显示, 对小鼠尾静脉注射复合物 0.5 小时后进行磁共振扫描, 与注射生理盐水的对照组相比实验组 T2 加权信号明显降低, 信号强度仅为对照组的 35%; 48 小时后, 实验组 T2 加权信号强度略有回升, 但与对照组信号强度相比仍存在显著差异。组织学结果显示可视化基因纳米复合物能够穿过血管内皮细胞进入肝脏组织, 并释放 DNA 在细胞内成功表达, 但基因表达效果较差。综合 MRI 成像及组织检查实验结果可知, 该纳米颗粒具有优良的 MRI 成像性能, 但通过尾静脉注射方法基因转染效率较低。

关键词 聚乙烯亚胺; 超顺磁氧化铁; 磁共振成像; 基因治疗

The Effects of Tail Vein Injection on Gene Delivery and MR Imaging of Stearic-PEI/SPIO Nanovectors

XIE Li-si GAO Lin WANG Zhi-yong* LONG Xiao-jing ZHENG Hai-rong*

(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract A visible nanoparticle was constructed via recombination of stearic acid modified polyethyleneimine (stearic-PEI) and superparamagnetic iron oxide (SPIO) to combine with DNA. Then through tail vein injection, the stearic-PEI/SPIO/DNA nanoparticles were efficiently delivered to BABL/c female mice that were visualized by MRI (Magnetic Resonance Imaging) and confirmed by histology. The MRI results showed that the experimental group's T2 signal intensities significantly decrease at 0.5 h after injection, just 35% of that in the control group. Although the experimental group's T2 signal intensities slightly recovered at 48 h after injection, there were still obvious differences between the control group and experimental group. The histological staining showed that the visible gene deliver nanocomplexes could pass through vascular endothelial cell into liver tissues and release DNA into cells, but with low gene expression effect. From the foregoing results, the nanoparticles have excellent magnetic resonance imaging performance, but low gene transfection efficiency via tail vein injection.

Keywords polyethyleneimine; superparamagnetic iron oxide; magnetic resonance imaging; gene therapy

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2010CB732604), 广东省低成本健康创新技术项目。

作者简介: 谢丽斯, 研究助理, 研究方向为分子影像学; 高琳, 硕士, 研究助理, 研究方向为分子影像学; 隆晓菁, 博士, 助理研究员, 研究方向为磁共振图像处理。*通讯作者: 王志勇, 助理研究员, 研究方向为分子影像学, E-mail: zy.wang@siat.ac.cn; 郑海荣, 博士, 研究员, 研究方向为生物医学超声和医学成像, E-mail: hr.zheng@siat.ac.cn。

1 引言

安全高效的基因转染体系以及对基因载体的无创性示踪评估方法是目前基因治疗研究中的两个重要课题。聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)是现阶段较成功的阳离子非病毒性基因传递载体之一^[1], 其中, 分子量为 25000 g/mol 的支链 PEI 已被认为是转染试剂中的金标准, 并广泛应用于体内及体外转染实验。但由于高分子量 PEI 具有较高的细胞毒性, 其在临床上的应用潜能受到制约。而低分子量的 PEI, 如 PEI 600 g/mol, 虽细胞毒性较低, 但其较低的正电荷密度会造成转染性能不佳。因此, 近期已报道的 PEI 实验主要集中于两个方面的研究: 高分子量 PEI 的低毒化处理以及对低分子量 PEI 的功能化修饰以提高其转染性能。其中, 由于低分子量 PEI 的体内代谢相对较容易, 且只需通过简单的二硫键修饰或疏水自组装就能构建高电荷密度生物可降解大分子或纳米结构而备受关注。

针对基因载体的可视化示踪, 近年来已有很多相应的报道, 其中磁共振成像(MRI)具有较高的空间分辨率、较好的软硬组织成像、无创性观测以及生理功能性信息获取等优点, 在医疗诊断特别是分子影像研究方面发挥着重要作用。随着纳米技术和 MR 分子影像的发展与结合, 以超顺磁性氧化铁(SPIO)纳米晶体构建的 MR 纳米探针得到了极大的关注。由于 SPIO 的基本化学成分四氧化三铁(Fe_3O_4)能够在细胞内得到有效降解, 使其拥有良好的生物相容性和磁化效果, 已经应用于临床 MR 成像^[2]。因此设计研发基因转染与磁学性能兼备的多功能磁共振分子探针能够对基因传输进行有效的评估。

本文尝试将 PEI600 经硬脂酸修饰后包封疏水性 SPIO 纳米粒子构建硬脂酸-PEI600/SPIO 纳米复合材料, 然后通过静电吸附 DNA 实现基因负载和尾静脉注射完成基因回输。本文主要就硬脂酸-PEI600/SPIO 纳米复合材料经由尾静脉注射方法是否能够有效完成基因的有效递送进行相关探讨。

2 材料与方 法

2.1 硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 复合物的制备

依照已有文献报道^[3-5]进行硬脂酸-PEI600 大分子合成, 并制备 SPIO 纳米晶体。硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 复合物的制备按照以下步骤: 将硬脂酸-PEI600/

SPIO 水溶性纳米复合物与 DNA(含 LacZ 报告基因)溶液相混合, 用移液器轻柔上下吹吸混合, 于室温放置 15~30 min, 此处所制备硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 复合物的 N/P 比为 20(N/P 为 PEI 中的氨基基团/DNA 中的磷酸基团的比例)。

2.2 MR 成像

6 只 BABL/c 小鼠随机分成 A、B 二组, 每组 3 只。小鼠经 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 分别从尾静脉注射硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 生理盐水稀释液(实验组)、生理盐水(对照组), 其中每只小鼠注射的 DNA 含量为 5 μg , 应用临床西门子 3T MR 扫描仪进行成像检测。采用小鼠线圈, 取小鼠俯卧位, 先进行 TSE 序列平扫, 然后分别于尾静脉注射 30 分钟、48 小时后再次扫描。扫描序列及参数: TSE 序列, TR=3000 ms, TE=48 ms, FOV=25 \times 25.5 mm, 层厚 1 mm, FA180 $^\circ$, 对小鼠行横断面和冠状面进行成像。在 T2 加权成像图片上测量平扫前后 2 组实验动物各时间点肝脏的平均信号强度(Signal Intensity, SI)。最后应用 eFilm1.5.3 版本软件, 选取肝脏组织局部信号相对均匀、无明显伪影的 4 个区域, 读取信号值并计算平均值。

2.3 组织学检查

MR 扫描之后取实验组和对照组肝脏组织, 通过 TOC 包埋冷冻后进行连续切片, 切片厚度 10 mm。然后用 2.5% 戊二醛固定 10 分钟, PBS 水洗 5 分钟后进行 X-Gal 染色, 同样的切片预处理方法进行普鲁士蓝染色、核固红染色。

2.4 统计学方法

使用 SPSS17.0 统计学软件包进行相关数据分析, 其中, 取两组独立样本均数进行 *t* 检验、协方差分析; 双尾检验比较硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 纳米复合物组和对照组肝脏 SI 值的差异, 当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 MR 成像结果

图 1、图 2 显示, 与注射生理盐水的对照组相比, 实验组注射硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 纳米复合物 0.5 小时后的 T2 加权成像信号值显著降低, 降低 64.7%。48 小时后, 硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 实验组信号强度略有恢复, 但仍保持信号相对较低值。经统计学分析表明, 实验组与对照组在 T2 加权成像信

号值变化差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

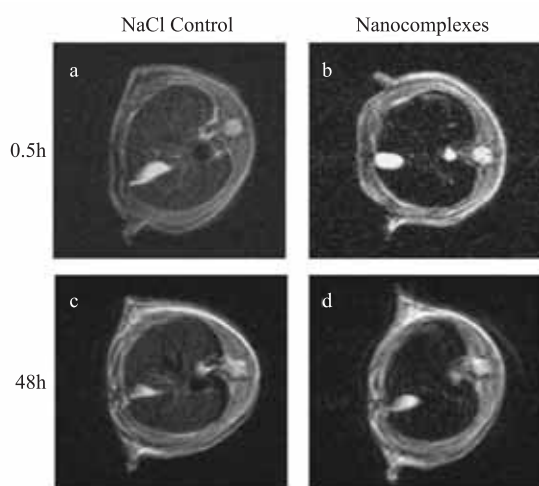


图1 生理盐水组与纳米复合物组肝脏 T2 加权成像 (图a、b 分别为小鼠尾静脉注射生理盐水和纳米复合物 0.5 小时后肝脏 MR 成像, 图 c、d 分别为小鼠尾静脉注射生理盐水和纳米复合物 48 小时后肝脏 MR 成像)

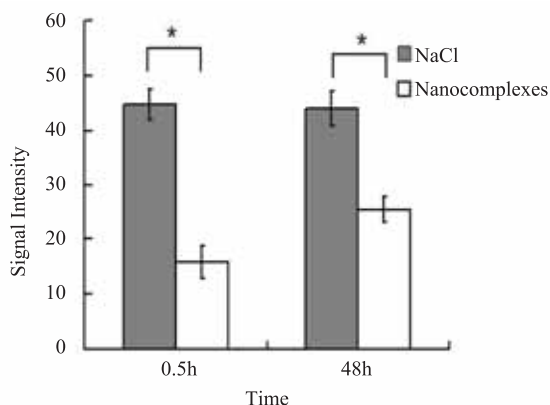


图2 生理盐水组与纳米复合物组 T2 加权信号值比较

3.2 组织学检查

显微镜观察普鲁士蓝染色结果显示: 注射生理盐水的对照组未见任何的蓝染颗粒(见图 3a), 而注射硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 纳米复合物实验组的正常肝脏组织和血管内皮细胞均出现蓝染颗粒(见图 3b)。实验过程中表达 LacZ 基因的细胞经 X-Gal 染色后将会呈现蓝染颗粒。本研究的 X-Gal 实验结果显示, 生理盐水组未见蓝色斑点, 而实验组出现蓝染的阳性细胞(见图 3c、d)。

4 讨论

PEI 阳离子大分子已被广泛作为非病毒型基因载体。基于 Fe_3O_4 组分构建的 SPIO 纳米粒子也已进入临床应用。SPIO 纳米粒子优良的生物可降解性及较高

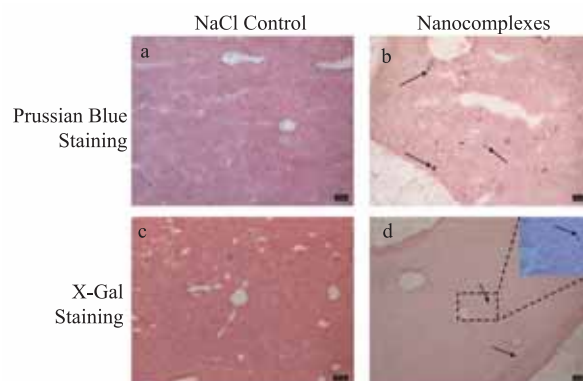


图3 肝脏组织切片普鲁士蓝染色及 X-Gal 染色 (图a、b 分别为生理盐水组和纳米复合物组普鲁士蓝染色, 蓝色颗粒为蓝染铁颗粒; 图c、d 分别为生理盐水组和纳米复合物组 X-Gal 染色, 蓝色颗粒为 β -半乳糖苷酶蛋白)

的弛豫效能也使它在磁共振分子影像中备受关注。

本研究利用两亲性硬脂酸-PEI600 大分子与疏水 SPIO 纳米晶体通过自组装作用构建纳米复合基因载体, 应用聚阳离子水溶液中呈现的正电性有效负载基因质粒。该纳米复合材料通过尾静脉注入小鼠体内, 经临床 3T MR 扫描结果显示, 小鼠肝脏 T2 加权成像信号强度显著降低, 48 h 后, 肝脏信号强度虽有所回升, 但仍较注射生理盐水对照组信号强度低。

文献报道^[6]的经由聚己内酯-聚乙二醇嵌段共聚物包裹 SPIO 构建的纳米粒子在尾静脉注射 48 h 后 MRI 信号值回升到正常值。但本研究中实验组的 MRI 信号值仍然维持在较低位, 造成这一原因可能是由于硬脂酸-PEI600/SPIO 纳米复合物能够有效地进入肝脏细胞从而延长了代谢时间。从组织学检查结果可以看到, 48 h 后组织切片显示硬脂酸-PEI600/SPIO/DNA 复合物已经进入肝脏组织细胞中, 这与 MRI 成像结果一致; 此外, 这也证明 LacZ 基因在组织细胞中有一定量的表达, 但尾静脉注射法表达量较先前报道的胆囊注射法表达量低^[7]。造成这一现象的原因可能是由于正电性纳米粒子在血液中会接触或附着大量蛋白、细胞等负电性物质, 造成基因与载体的脱离或形成遮蔽, 影响了基因表达效率, 而此推测尚需后续实验进行佐证。PEI 作为基因载体时, 分子量越大, 其电荷量也越大, 细胞毒性也越强^[8-10]。而文献报道^[11-13]中将胆固醇、聚氧乙烯硬脂酸酯^[14]等脂溶性的物质接枝到 PEI 上均能与 DNA 复合物形成单分散性很好的纳米粒子。

本研究通过硬脂酸修饰低分子量 PEI, 利用其脂质特性的亲油基团或许能够增强复合物与细胞膜的结合能力, 促进被细胞吸收的机率, 从而可以提高转染

效率, 此结论同样需要进一步证明。综上所述, 采用硬脂酸-PEI600 复合 SPIO、DNA 形成 N/P 为 20 的复合物, 在肝脏组织中具有很好的磁共振成像效果。该纳米颗粒兼具基因转染与磁学性能, 可作为潜在的 MRI 可见基因载体, 并有望在基因治疗中得到进一步的应用。

参 考 文 献

- [1] Merdan T, Kopecek J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(5): 715-758.
- [2] Margolis D J, Hoffman J M, Herfkens R J, et al. Molecular imaging techniques in body imaging [J]. *Radiology*, 2007, 245(2): 333-356.
- [3] Antonietti L, Aymonier C, Schlöterbeck U, et al. Core-shell-structured highly branched poly(ethylenimine amide)s: synthesis and structure [J]. *Macromolecules*, 2005, 38 (14): 5914-5920.
- [4] Sun S H, Zeng H, Robinson D B, et al. Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$) nanoparticles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126 (1): 273-279.
- [5] Sun S H, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(28): 8204-8205.
- [6] Lu J, Ma S, Sun J, et al. Manganese ferrite nanoparticle micellar nanocomposites as MRI contrast agent for liver imaging [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(15): 2919-2928.
- [7] Gao L, Long X, Wang Z, et al. Efficacy of MRI visible iron oxide nanoparticles in delivering minicircle DNA into liver via intrabiliary infusion [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3688-3696.
- [8] Aoyama Y, Kanamori T, Nakai T, et al. Artificial viruses and their application to gene delivery. size-controlled gene coating with glycocluster nanoparticles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(12): 3455-3457.
- [9] Sugiyama M, Matsuura M, Takeuchi Y, et al. Possible mechanism of polycation liposome (PCL)-mediated gene transfer [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1660(1-2): 24-30.
- [10] Nimesh S, Goyal A, Pawar V, et al. Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells [J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 110(2): 457-468.
- [11] Wang D A, Narang A S, Kotb M, et al. Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water soluble lipopolymers for gene delivery [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 1197-1207.
- [12] Furgeson D Y, Chan W S, Yockman J W, et al. Modified linear polyethylenimine-cholesterol conjugates for DNA complexation [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2003, 14(4): 840-847.
- [13] Han S O, Mahato R I, Kim S W. Water-soluble lipopolymer for gene delivery [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2001, 12(3): 337-345.
- [14] Gao S, Yin D F, Ding X Y, et al. The preparation and application of nonionic surfactant modified polyethyleneimine: China, 200710171722.3 [P]. 2007-12-04.