

PEG-PEI 共聚物介导 VEGF165 基因转染 及对内皮细胞生长的影响*

张璇¹⁾ 潘仕荣^{1)**} 冯敏²⁾ 李子俊³⁾ 张未¹⁾ 罗昕²⁾

(¹⁾ 中山大学附属第一医院, 广州 510080; (²⁾ 中山大学药学院, 广州 510080; (³⁾ 广东省人民医院, 广州 510080)

摘要 为了考察 PEG-PEI 共聚物作为基因载体介导 VEGF165 基因的能力, 合成不同接枝量的 PEG-PEI 共聚物, 考察共聚物的细胞毒性, 同时采用 PCR 技术获得上下游含有 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切位点的目的基因 VEGF165, 与 pEGFP-C1 构建重组质粒 pEGFP-VEGF165, 将 PEG-PEI 作为基因载体, 与 pEGFP-VEGF165 通过自组装成 DNA 复合物, 使其转染脐静脉内皮细胞(HUVEc), 测定发光细胞百分数获得转染率, 利用 ELISA、RT-PCR 检测 VEGF 的表达, 用 MTT 法考察 VEGF165 转染 HUVEc 后对内皮细胞生长的影响. 结果显示, 形成 PEG-PEI 共聚物后可显著降低 PEI 的细胞毒性. 作为基因载体介导 pEGFP-VEGF165 转染 HUVEc 后, 在荧光显微镜下可见强绿色荧光蛋白表达, 转染率与接枝 PEG 的量及 N/P 有关, PEG-PEI(5-25-1)在 N/P=30 时转染率达到最大值, 比 PEI 显著提高. 转染后血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达及 mRNA 水平均有显著提高, 且可有效地刺激内皮细胞增殖. 研究表明, PEG-PEI 共聚物可做为基因载体, 有效地介导 pEGFP-VEGF165 基因的传递.

关键词 PEG-PEI 共聚物, 血管内皮生长因子, 脐静脉内皮细胞, 基因转染

学科分类号 R34, Q782

聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)是目前应用较有效的聚阳离子型基因载体, 它富含氨基可以与 DNA 链上负电性的磷酸根通过静电作用缔合成复合物, 在此过程中, DNA 会被高度压缩成 50~200 nm 大小的纳米球^[1], 大大增强了对细胞膜的穿透作用, 因此转染率较高. 但由于 PEI 强的渗透作用, 又表现出一定的细胞毒性^[2]. 用水溶性大分子聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰 PEI 形成 PEG-PEI 共聚物, 与 DNA 在水溶液中能自组装成核壳型纳米胶束, 其外壳为亲水性 PEG, 可克服 PEI/DNA 复合物的溶解性差、细胞毒性大和传递过程中沉积等不足, 且大大减少血液循环中血浆蛋白的调理作用和网状内皮系统 (RES) 的吞噬, 延长基因在血液循环中的半衰期.

经冠状动脉腔内成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后 3~6 个月内会有 25%~50% 患者发生再狭窄 (restenosis, RS), 严重影响术后远期疗效. 大量研究发现, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖、迁移和分泌细胞外基质所致的血管内膜增生

是 RS 的重要病理基础, 而血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 损伤是血管内膜增生的始动和关键环节, 已被动物实验结果所证实^[3~6]. 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是血管内皮细胞特异丝裂原^[7,8], 可特异地作用于血管内皮细胞, 强烈地促进其分裂、增殖和形成新血管进而抑制内膜的增生, 防止再狭窄发生^[9]. Hedman 等^[10]报道以腺病毒介导 VEGF 基因导入血管内膜, 防止再狭窄. 顾松等^[11]报道采用脂质体介导 VEGF165 基因转染内皮细胞, 探讨其对内皮细胞增殖的影响. 本研究以合成的 PEG-PEI 共聚物, 携带重组质粒 pEGFP-VEGF165 基因转染人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEc), 探讨 PEG-PEI 共聚物体外介导基因的能力, VEGF165 的表达及其对内皮细胞生长的影响.

* 国家自然科学基金资助项目 (30570500).

** 通讯联系人.

Tel: 020-87755766-8163, E-mail: gzpsr@163.com

收稿日期: 2007-02-06, 接受日期: 2007-04-03

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂. 聚乙烯亚胺(PEI, M_r 为25 000, Aldrich-Sigma公司产品, 支链型, 无水); 二甲基亚砜(DMSO), 四甲基偶氮唑盐(MTT)均购自Aldrich-Sigma公司; 聚乙二醇单甲醚(mPEG, M_r 为2 000和5 000, Fluka公司); 异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI, 广州市汇采涂料化学品有限公司, 进口分装); 二月桂酸二丁基锡(DBTL, 广东丽宝涂料助剂公司); 质粒大抽提试剂及纯化柱(QIAGEN公司); 一步法RT-PCR试剂盒(上海东洋纺生物科技有限公司); VEGF ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司).

1.1.2 质粒. 真核表达质粒编码增强型绿色荧光蛋白 pEGFP-C1(华西医科大学微生物实验室提供), 在DH5 α 菌株中大量扩增; PUC19-VEGF165(由广东省人民医院消化内科提供).

1.1.3 仪器. 核磁共振仪(NMR, Bruker AM400型); 透射电子显微镜(JEM-2010HR, 日本); PCR仪(PE2 000, 美国); 倒置相差荧光显微镜(Olympus, 日本); 核酸蛋白分析仪(800UV/vis spectrophotometer, 美国); POWER PAC300 恒温恒电流电泳仪(Bio-Rad公司); 台式高速离心机(eppendorf 5 804R, 德国).

1.2 方法

1.2.1 PEG-PEI共聚物的制备. 将mPEG与过量的异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI), 分别溶于氯仿, 混合, 加入0.6%~0.7%的催化剂DBTL, 75℃左右回流反应8 h, 所得产物在石油醚中沉淀, 沉淀用氯仿溶解, 再用石油醚沉淀, 此操作重复多次直至将过量的异佛尔酮去除干净, 真空干燥, 得白色蜡状至粉末状的异氰酸酯单端基聚乙二醇(mPEG-NCO). 将PEG-NCO与PEI分别溶于氯仿, 置60℃反应16 h, 将亮黄色溶液浓缩至约50 ml左右, 再用大量乙醚沉淀, 过滤, 真空干燥, 称重得PEG-PEI共聚物. 共聚物的组成及分子质量由 $^1\text{H-NMR}$ 结果计算.

1.2.2 pEGFP-VEGF165真核表达质粒的构建. 以PUC19-VEGF165为模板, 根据引物设计原则设计一对引物, 上下游分别引入Hind III和BamH I酶切位点. 上游: 5' CGGAAGCTTCGATGAACCTTC-TGCTGTC 3'; 下游: 5' GCGGATCCTCACCGCC-TCGGCTTGT 3'. 反应条件为: 94℃预变性5 min; 94℃30 s, 55℃30 s, 72℃30 s, 循环30次; 最后

72℃延伸7 min. 将回收的PCR产物及pEGFP-C1均以Hind III和BamH I进行双酶切. 回收酶切产物, 用T4连接酶连接. 重组质粒命名为pEGFP-VEGF165, 经酶切及测序验证其正确性.

1.2.3 HUVEc的培养. 无菌条件下取引产胎儿的脐静脉, 用胶原酶消化分离HUVEc, 加入含100 ml/L胎牛血清和含抗生素的DMEM细胞培养液, 在37℃、50 ml/L CO₂培养箱中培养传代得到第3代时, 通过光学显微镜和VIII因子相关抗原检测鉴定.

1.2.4 细胞毒性测定(MTT法). PEI、PEG-PEI共聚物在100 ml/L胎牛血清的DMEM培养基中配成不同浓度梯度, 分别为5、10、15、20 mg/L. 将HUVEc细胞接种到96孔板上, 密度为5 000个细胞/孔, 细胞培养24 h. 吸去每孔中的旧培养液, 加入不同浓度的含PEI及PEG-PEI共聚物的培养液, 每孔0.2 ml, 每个浓度4个复孔, 37℃ 5% CO₂培养箱中培养72 h后, 每孔加入5 g/L MTT 20 μl , 继续培养4 h, 吸尽培养液, 每孔加入DMSO溶液150 μl , 在Bio-Tek Elx800型酶标仪490 nm/630 nm波长处读取吸光度值(A), 计算细胞相对增殖百分率 $RGR(\%) = \frac{\text{实验组 } A_{490/630}}{\text{阴性对照组 } A_{490/630}} \times 100\%$.

1.2.5 PEG-PEI/pEGFP-VEGF165复合物的制备及其形态观察. N/P 比为聚合物中的氨基基团与DNA中磷酸基团的摩尔比, 根据 N/P 比, 将聚合物的PBS溶液, 与质粒DNA的PBS溶液混合, 涡旋, 室温静置30 min, 获得聚合物/DNA复合物. 取适量滴加在铜网上, 用醋酸铀进行负染, 干燥后置透射电镜下观察复合物胶束的形态.

1.2.6 细胞转染试验. 将原代培养至第3代的HUVEc以15 000个/孔接种到12孔板上培养24 h, 细胞汇合度 $\geq 80\%$, 转染前吸去细胞培养液, 加入不含血清的DMEM培养液1 ml, 再每孔加入100~200 μl 的PEG-PEI/DNA复合物, 细胞培养箱中培养4 h后, 吸去转染复合物, 加入含血清100 ml/L的DMEM培养液继续培养40~48 h, 转染后用PBS冲洗, 再用0.25%胰酶/EDTA消化液将细胞消化, 用PBS重悬细胞, 转染率通过在流式细胞仪上测定每100 000个细胞中发荧光的细胞百分数获得.

1.2.7 ELISA检测细胞培养上清中VEGF蛋白表达. 取转染后72 h的细胞培养上清, 采用夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒, 检测VEGF蛋白表达. 应用酶标仪检测450 nm的吸光度值(A). 每个样品均设3个平行孔, A 值取其平均值, 并将未转染组设空白对照.

1.2.8 RT-PCR检测pEGFP-VEGF165转染后内皮细胞中VEGF mRNA的表达. 用Trizol 提取总RNA, 按反转录试剂盒中的操作说明, 进行反转录合成cDNA, 加入PCR试剂及上下游引物行PCR扩增.以肌动蛋白 β -actin作为内参照, 扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 80 V, 30 min电泳分析鉴定.

1.2.9 MTT法测定VEGF165基因转染后内皮细胞的增殖. 在96孔板上每孔接种5 000个细胞, 37℃、50 ml/L CO₂培养24 h. 实验组分别加入PEI/pEGFP-VEGF165、PEG-PEI/pEGFP-VEGF165复合物, 孵育4 h后加入含血清100 ml/L的DMEM培养液. 转染2天后, 每天各组4个培养孔加入5 g/L MTT 20 μ l, 继续培养4 h, 弃上清液, 加入DMSO液150 μ l. 震动摇晃, 待紫色沉淀充分溶解后, 立即用酶标仪测定各孔吸光度值, 结果与未转染组对照.

2 结 果

2.1 共聚物的合成及表征

合成路线如图1所示.

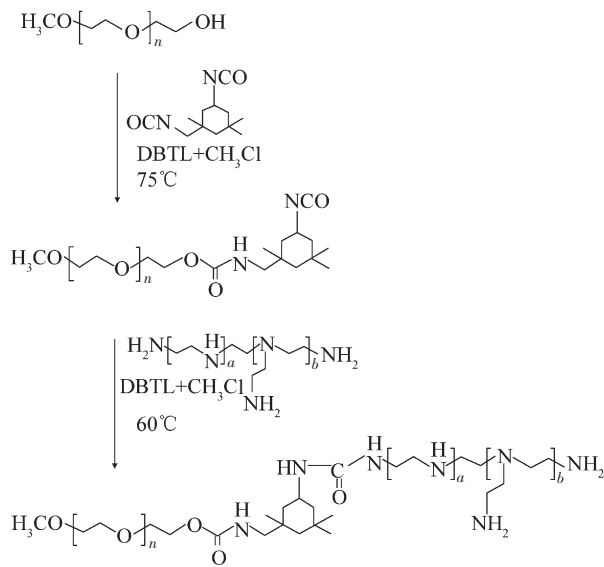


Fig. 1 Synthetic scheme of PEG-PEI copolymer

¹H-NMR的结果见图2, 图2a δ 2.5~3.0的吸收峰应归属PEI上的—CH₂CH₂NH—的化学位移,

图2b δ 3.6的吸收峰应归属为PEG上的—CH₂CH₂O—的化学位移, 图2c同图2b相比, 主要在低场出现了一系列峰为环己烷上的亚甲基及与之相连的甲基上质子的化学位移, 图2d同图2a和图2c相比, 既有PEG上质子的特征吸收峰, 又有PEI上质子的特征吸收峰, 可确定为PEG与PEI的共聚物.

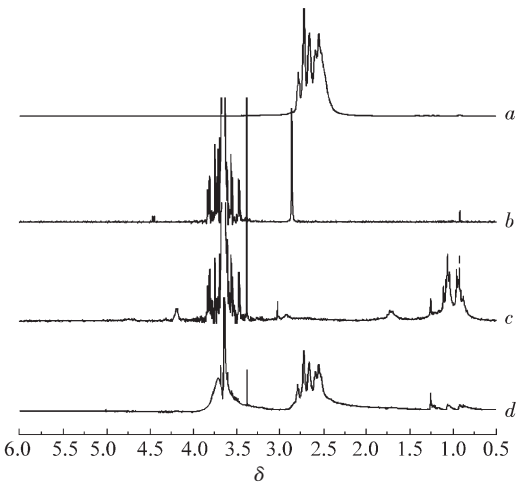


Fig. 2 ¹H-NMR spectrum of PEI 25 ku and copolymers
a: PEI 25 ku; b: mPEG 5 ku; c: mPEG 5 ku -NCO; d: PEG-PEI(5-25-2).

同时可根据共聚物中乙烯亚胺单元(δ 2.5~3.0)和乙二醇单元 δ 3.6中相关氢的积分面积之比计算出共聚物中2组分的重量比及分子质量, 见表1.

2.2 pEGFP-VEGF165真核表达质粒的鉴定

质粒PUC19-VEGF165用Hind III 和BamH I 双酶切后电泳, 得到约576 bp和2.68 kb的2个片段. 原核载体PUC19有Hind III 和BamH I 2个酶切位点, 但与pEGFP-C1方向相反, 故采用PCR在上下游引入方向一致的Hind III 和BamH I 酶切位点. 将重组真核表达质粒pEGFP-VEGF165用相同的酶切后, 得到约576 bp和4.7 kb 的2个片段. 以上的酶切结果均与相应载体及目的片段的大小相一致. 初步说明重组表达载体的构建正确(图3). 重组质粒的测序结果证实, 目的片段的序列与从GenBank中检索的VEGF165基因序列完全一致, 说明目的基因序列已正确插入pEGFP-C1载体中.

Table 1 Composition and molecular mass of PEG-PEI copolymers

Name	Reaction				Production		
	PEG (ku)	PEI (ku)	PEG/PEI (mol)	W/W (g/g)	PEG/PEI (mol)	PEI%	M (ku)
PEI		25	—	—	—	100	25
PEG-PEI(5-25-1)	5	25	0.56	1/9	0.66	88.32	28.3
PEG-PEI(5-25-2)	5	25	1.67	1/3	1.8	73.53	34
PEG-PEI(5-25-3)	5	25	5	1/1	7.2	41.06	61

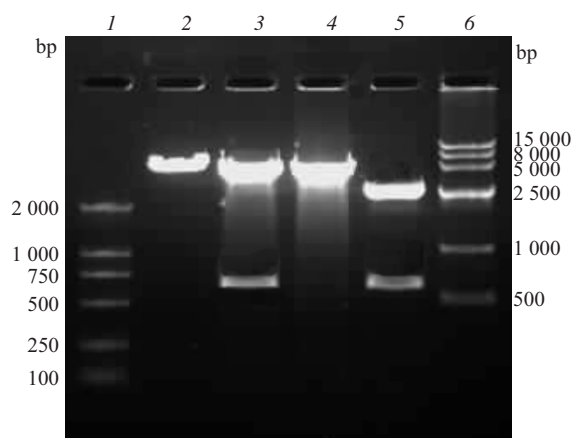


Fig. 3 Restriction enzyme digestion analysis of pEGFP-VEGF165

1: DNA marker; 2: pEGFP-VEGF165/*Hind* III; 3: pEGFP-VEGF165/*Hind* III + *Bam*H I; 4: pEGFP-C1/*Hind* III; 5: PUC19-VEGF165/*Hind* III + *Bam*H I; 6: DNA marker.

2.3 细胞毒性试验

RGR%为相对增殖百分率, 通过细胞的存活率来推定聚合物载体内在的细胞毒性, 其值越大则毒性越小. 从图4显示结果可以看出, 均聚物PEI的细胞毒性随着浓度的增高显著增加, 形成PEG-PEI共聚物后可明显降低PEI的细胞毒性, 接枝PEG的量越多, 细胞毒性降低越显著. 低接枝量的共聚物PEG-PEI(5-25-1), 在10 mg/L时可明显降低细胞毒性, 高浓度20 mg/L对细胞毒性未见明显影响, 而高接枝量的共聚物PEG-PEI(5-25-3)在高浓度20 mg/L时也可明显降低细胞毒性.

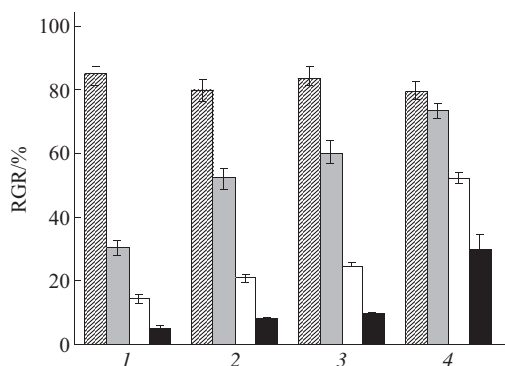


Fig. 4 Cytotoxicity of polymers at various concentrations

■: 5 mg/L; □: 10 mg/L; ▨: 15 mg/L; ▩: 20 mg/L. $n=4$. 1: PEI 25 ku; 2: PEG-PEI(5-25-1); 3: PEG-PEI(5-25-2); 4: PEG-PEI(5-25-3).

2.4 PEG-PEI/pEGFP-VEGF165复合物的形态观察

PEI/DNA 复合物的大小和形态通过负染透射

电镜检测. 图5可见明显的核壳结构胶束, 外壳是亲水性的PEG层, 易于被亲水染料染色, 故颜色较深, 内层为PEI/DNA缔合成的复合物. 粒子大小均在100 nm以内.

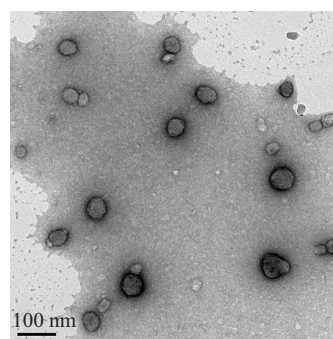


Fig. 5 Transmission electron microscope photograph of PEG-PEI (5-25-2) at $N/P=20$

2.5 细胞转染试验

转染40~48 h后于倒置荧光相差显微镜下观察 HUVEc, 可见在黑色背景下散在发有绿色荧光的细胞(图6), 表明已经成功地将质粒转入HUVEc, 并可根据在流式细胞仪上测定每100 000个细胞中发荧光的细胞百分数获得转染率数据. 由表2及图7可见PEG-PEI(5-25-1)在 N/P 为20、30时的转染率均较PEI有较大幅度提高, 在 $N/P=30$ 时达到最大值. PEG-PEI(5-25-2)在 N/P 为30、40时的转染率较PEI也有一定提高. 而PEG-PEI(5-25-3)转染率较PEI均有较大幅度下降. 说明PEI接枝少量的PEG可使转染率提高, 接枝较多量PEG反而会使转染率下降.

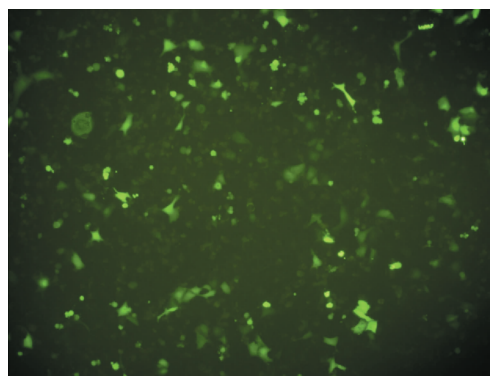


Fig. 6 Photograph of transfection efficiency of PEG-PEI (5-25-1) /DNA complexes at $N/P=20$

The green fluorescent protein (EGFP) expression was observed under fluorescent microscope at 100x magnification.

Table 2 Transfection efficiency of PEI and copolymers/DNA complexes ($\bar{x} \pm s$)

Polymers	N/P ratio			
	N/P = 10	N/P = 20	N/P = 30	N/P = 40
PEI 25 ku	21.2 ± 5.4	28.7 ± 2.1	23.1 ± 2.2	4.2 ± 0.9
PEG-PEI(5-25-1)	16.7 ± 4.9	32.8 ± 2.0	35.7 ± 6.7	5.6 ± 4.9
PEG-PEI(5-25-2)	10.6 ± 2.0	22.9 ± 6.3	27.0 ± 3.0	5.9 ± 4.8
PEG-PEI(5-25-3)	4.1 ± 2.3	15.0 ± 6.2	16.7 ± 1.4	4.0 ± 4.8

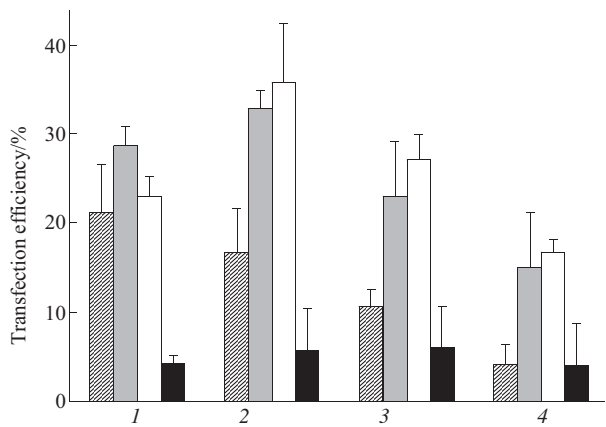


Fig. 7 Transfection efficiency of PEI and copolymers/DNA complexes ($n=3$)
▨: N/P = 10; ▤: N/P = 20; □: N/P = 30; ■: N/P = 40. 1: PEI 25 ku; 2: PEG-PEI(5-25-1); 3: PEG-PEI (5-25-2); 4: PEG-PEI (5-25-3).

2.6 ELISA检测结果

PEG-PEI/DNA复合物在N/P = 30时转染细胞，72 h收取上清，用ELISA方法检测VEGF165蛋白表达，结果见表3. 与对照组相比，PEI 25 K/pEGFP-VEGF165和PEG-PEI(5-25-1) / pEGFP-VEGF165转染后细胞上清中VEGF165表达明显升高，且PEG-PEI (5-25-1) 比PEI 25 ku的表达更高，结果与EGFP表达相一致.

Table 3 Amount of secreted VEGF by ELISA after transfection (N/P = 30)

	Amount of VEGF/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
PEI 25 ku/pEGFP-VEGF165	10.8 ± 2.6
PEG-PEI(5-25-1)/pEGFP-VEGF165	12.6 ± 2.8
Control	3.9 ± 1.4

2.7 RT-PCR检测结果

RT-PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳，以β-actin为内参照，可见2条带分别位于576 bp及

154 bp附近，对应产物分别为VEGF165和β-actin. 结果发现pEGFP-VEGF165转染HUVEc后，VEGF mRNA的表达水平明显上升，与正常培养的内皮细胞相比差异显著 (图8).

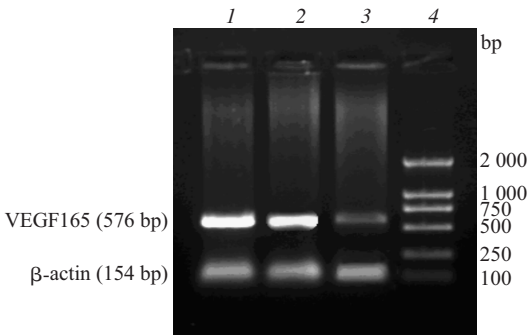


Fig. 8 RT-PCR products from HUVEc which had been transfected by pEGFP-VEGF165
1: PEG-PEI (5-25-1)/pEGFP-VEGF165; 2: PEI 25 ku/pEGFP-VEGF165; 3: Non-transfection; 4: DNA marker.

2.8 VEGF基因转染后内皮细胞的增殖试验

分别以PEG-PEI (5-25-1) 和PEI 25 ku为载体介导pEGFP-VEGF165转染HUVEc后，内皮细胞增殖

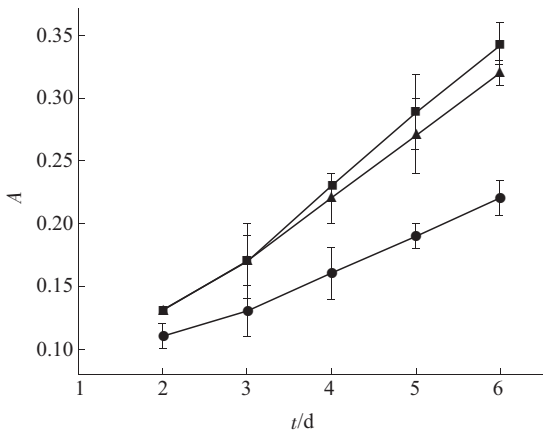


Fig. 9 The effect of transfection on HUVEc proliferation (MTT)
 $n=4$. ●—●: Control; ▲—▲: PEI 25 ku; ■—■: PEG-PEI (5-25-1).

明显加快,而未转染组的细胞增殖缓慢(图9),以PEG-PEI (5-25-1)为载体比PEI 25 ku转染后可更有效地促进内皮细胞增殖。

3 讨 论

基因转染是利用基因载体携带目的基因运送到细胞内。目前,最常用的非病毒转基因载体是阳离子脂质体和阳离子聚合物,作为2种不同的非病毒载体,它们在克服细胞屏障方面跟病毒有相似的特征,容易透过细胞膜,转染率高。已有研究证明,脂质体与PEI 25 ku的转染率无显著性差异^[12],阳离子脂质体在体外转染基因效率很高,然而在体内,它迅速被血清清除,在肺组织内累积,诱发强烈的炎症反应,因此在很大程度上限制了其应用^[13]。由于阳离子脂质体的局限性,聚阳离子基因载体日益受到重视。

PEI是目前研究较为广泛的聚阳离子基因载体,可与PEG形成共聚物,再在水溶液中与DNA自组装成核壳结构的纳米胶束,尺寸与病毒型基因载体相当^[14]。PEI-PEG/DNA胶束可大大减少血液循环中血浆蛋白的调理作用和网状内皮系统(RES)的吞噬,延长基因在血循环中的半衰期。复合物内吞进入细胞后,能保护DNA避免核酸酶的降解和从吞噬泡逃逸进入细胞核,通过基因表达,产生治疗作用的蛋白质^[1]。近年PEG-PEI/DNA传递系统的研究引起了学者们的重视。但对PEG-PEI共聚物研究仅限于携带报告基因,探讨转染率的影响因素,未见有对治疗基因的研究报道。

VEGF是最强的血管生成刺激因子之一,由血管平滑肌细胞产生,通过旁分泌途径特异性作用于存在VEGF受体的血管内皮细胞,具有强烈的促进内皮细胞分裂增殖作用和趋化作用,进而形成新生血管^[15],所以广泛用于基因治疗血管生成及防治血管再狭窄的研究中。要将VEGF165基因导入细胞使之有效表达,关键是基因传递系统。使用非病毒载体系统PEG-PEI介导VEGF基因防治血管再狭窄是一个崭新的方向。

PEG-PEI共聚物的组成对转染率影响显著,接枝少量的PEG可使转染率提高,接枝较多量PEG反而会使转染率下降。PEI毒性较大,经无毒、抗免疫原性的水溶性大分子PEG修饰PEI后,与DNA自组装成核壳结构胶束,其芯核由PEI与DNA通过静电作用缔合而成,PEG构成保护性的水溶性外壳,从而使PEI的毒性降低。对细胞转染有利,但若PEG

接枝量过多会产生屏蔽效应,阻止DNA复合物与细胞膜的接触^[16],故控制好两者比例是PEG-PEI共聚物成功介导基因传递的关键。 N/P 也会显著影响转染率,Godbey等^[17]报道,随着 N/P 增加,转染率增加,但细胞毒性也相应增加, N/P 增加到一定值时转染率下降。在本试验中共聚物PEG-PEI (5-25-1)在 $N/P=30$ 时转染率达到最大值。

本试验成功构建了易于检测的带有绿色荧光蛋白报告基因的pEGFP-VEGF165真核表达质粒,EGFP基因是在GFP的基础上经碱基修饰和人源化改造而来的,不仅无种属特异性,而且发光强度和细胞毒作用均获改善,从而广泛作为报告基因用于多种基因转移系统^[18]。用合成的PEG-PEI共聚物与pEGFP-VEGF165形成复合物,转染HUVec细胞,与PEI/pEGFP-VEGF165复合物对比,PEG-PEI (5-25-1)的转染率在 $N/P=30$ 时观察到最高,有35.72%的HUVec发绿色荧光,比PEI明显提高,ELISA检测证明VEGF在细胞上清中有效表达,RT-PCR证明了VEGF165 mRNA水平上的有效表达。VEGF165转染内皮细胞后可有效地刺激内皮细胞增殖,因此可通过将VEGF165导入血管局部,使损伤的内皮细胞迅速修复并发挥其功能,间接阻止平滑肌细胞的增殖,从而实现抑制血管再狭窄的目标。

参 考 文 献

- 1 Kakizawa Y, Kataoka K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv Drug delivery Reviews*, 2002, **54** (2): 203~222
- 2 Godbey W T, Mikos A G. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J Controlled Release*, 2001, **72** (1~3): 115~125
- 3 曲乐丰,景在平,曹贵松,等.反义寡核苷酸防治血管吻合口内膜增生性再狭窄的机制探讨. *上海医学*, 2002, **25** (11): 690~692
Qu L F, Jing Z P, Cao G S, *et al.* *Shanghai Medical Journal*, 2002, **25** (11): 690~692
- 4 Blindt R, Zeiffer U, Krott N, *et al.* Upregulation of the cytoskeletal - associated protein Moesin in the neointima of coronary arteries after balloon angioplasty: a new marker of smooth muscle cell migration?. *Cardiovasc Res*, 2002, **54** (3): 630~639
- 5 Li C, Cantor W J, Nili N, *et al.* Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Am Coll Cardiol*, 2002, **39** (9): 1852~1858
- 6 Mayr M, Siow R, Chung Y L, *et al.* A proteomic and metabolomic analysis: role of pkcdelta in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Pathol*, 2004, **13** (3): 35~41
- 7 Gospodarowicz D, Abraham J A, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (19): 7311~7315

- 8 Ferrara N, Henzel W J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **161** (2): 851~858
- 9 Van Belle E, Tio F O, Conffinhal T, *et al.* Stent endothelialization, time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition. *Circulation*, 1997, **95** (2): 438~448
- 10 Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, *et al.* Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation*, 2003, **107** (21): 2677~2283
- 11 顾松, 刘长建, 孙雪梅, 等. 脂质体介导的VEGF165基因转染对内皮细胞生长的作用. *现代免疫学*, 2004, **24** (3): 213~216
Gu S, Liu C J, Sun X M, *et al.* *Modern Immunology*, 2004, **24** (3): 213~216
- 12 杨耀武, 张莹, 王健伟, 等. 用聚乙烯亚胺反向转染siRNA表达盒进行RNA干扰的研究. *生物技术通讯*, 2006, **17** (2): 133~137
Yang Y W, Zhang Y, Wang J W, *et al.* *Letters in Biotechnology*, 2006, **17** (2): 133~137
- 13 白晓峰, 田卫东, 陈希哲, 等. 人血管内皮细胞生长因子165基因转染大鼠骨髓基质细胞的实验研究. *四川大学学报 (医学版)*, 2005, **36** (4): 468~470
Bai X F, Tian W D, Chen X Z, *et al.* *Journal of Sichuan University (Medical Sciences Edition)*, 2005, **36** (4): 468~470
- 14 Ogris M, Walker G, Blessing T, *et al.* Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine /DNA complexes. *Journal of Controlled Release*, 2003, **91** (1~2): 173~181
- 15 Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*, 1999, **77** (7): 527~543
- 16 Sung S J, Min S H, Cho K Y, *et al.* Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine. *Biol Pharm Bull*, 2003, **26** (4): 492~500
- 17 Godbey W T, Wu K K, Mikos A G. Poly(ethylenimine) mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials*, 2001, **22** (5): 471~480
- 18 Zhang G, Gurtu V, Kain S R, *et al.* An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **227** (3): 707~711

Transfection of Vascular Endothelial Growth Factor Gene VEGF165 Mediated With PEG-PEI Copolymers and Its Effect on The Growth of Endothelial Cells*

ZHANG Xuan¹⁾, PAN Shi-Rong^{1)**}, FENG Min²⁾, LI Zi-Jun³⁾, ZHANG Wei¹⁾, LUO Xin²⁾

¹⁾First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

²⁾School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

³⁾Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstract In order to investigate the ability of PEG-PEI copolymers as gene carriers for delivery of VEGF165. A series of PEG-PEI copolymers with different PEG grafting was prepared and the cytotoxicity was evaluated. Simultaneously, the VEGF165 gene segment with *Hind* III and *Bam*H I site was obtained by PCR, which was cloned into pEGFP-C1. PEG-PEI/ pEGFP-VEGF165 complexes were formed by self-assembly and transfected HUVEc. Transfection efficiency was evaluated by measuring the percentage of cells expressing green fluorescence protein. The VEGF expression was detected by ELISA, RT-PCR, and the effect of transfection on growth of endothelial cell was evaluated by MTT. The results suggested that the formation of PEG-PEI copolymers could help to reduce the cytotoxicity of PEI. After transfection, the strong expression of green fluorescence protein was observed by fluorescence microscopy. The transfection efficiency was influenced by the number of PEG side chains and *N/P* ratio. Of all copolymers tested, the transfection efficiency of PEG-PEI(5-25-1) at *N/P* = 30 reached a maximum, which was much higher than that of PEI. The expression of VEGF protein and mRNA increased significantly, and HUVEc proliferation was accelerated after transfection. These results indicate PEG-PEI copolymers can be used as effective gene carriers for delivery of pEGFP-VEGF165 gene.

Key words PEG-PEI copolymer, vascular endothelial growth factor (VEGF), umbilical vein endothelial cells, gene transfection

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30570500).

**Corresponding author. Tel: 86-20-87755766-8163, E-mail: gzpsr@163.com

Received: February 6, 2007 Accepted: April 3, 2007