

# 应用 PAMAM dendrimers 作为 DNA 运送载体的体外研究\*

郭晨莹 王 恒\*\* 蒯亚晖 蔡启良

(中国医学科学院基础医学研究所 病原生物学系分子寄生虫学实验室, 北京 100005)  
中国协和医科大学基础医学院

**摘要** Starburst™ PAMAM dendrimers 分子是一类新型的高分枝、辐射状对称的树状高分子, 在生理条件下其表面具有高密度的正电荷, 可以通过静电相互作用与核酸形成复合物后, 介导遗传物质进入细胞. 研究了 G3, G3.5, G5, G7, G7.5, G9 各代 dendrimers 分子与 DNA 结合后介导其转染细胞的能力, 并初步评价这种复合物转染对细胞活力的影响. 实验证实, 全代的 PAMAM dendrimers 皆可与 DNA 结合, 并可在体外培养的细胞中介导高效的 DNA 转染. PAMAM dendrimer/DNA 复合物很稳定, 在较大的 pH 值变化范围内 (pH 2~10) 不解离. PAMAM dendrimers 可保护与之复合的 DNA 分子免受限制性内切酶的降解. 在一定的电荷比范围内, 高代数的 dendrimers 分子与 DNA 形成的复合物对培养细胞的转染效率高于低代数 dendrimer 分子, 复合物所介导的转染效率在不同的细胞系之间也有差异. 在有效作用浓度范围内 ( $\leq 1.3 \times 10^{-1}$  g/L), PAMAM dendrimers/DNA 复合物对被转染细胞无毒性. 但是, 未与 DNA 复合的 dendrimers 分子在较低浓度时则表现出毒性, 表明 Starburst™ PAMAM dendrimers 分子可作为新型的低毒非病毒 DNA 载体, 用于介导 DNA 对体外培养细胞的转染. 这些前期观察, 为将纳米级高分子聚合物 dendrimers 分子作为基因转运载体应用于体内提供了初步的实验依据.

**关键词** DNA 转运, Starburst™ PAMAM dendrimers, 转染, 非病毒载体

**学科分类号** Q6

基因治疗和 DNA 疫苗是目前公认的高效而经济的疾病防治途径<sup>[1-4]</sup>, 但是, 如何提高 DNA 分子在培养细胞及活体中的转染效率和稳定表达, 仍然是需要解决的问题. 实验证明, 基因疫苗的免疫原性在很大程度上受疫苗载体和注射途径的影响<sup>[5]</sup>. 近 30 年来, 研究者们除采用过不同的免疫途径, 还尝试了多种 DNA 导入方法, 除直接进行裸 DNA 注射, 还通过不同载体介导 DNA 转运, 如: 阳离子脂复合物<sup>[6, 7]</sup>、聚合多肽<sup>[8]</sup>、阳离子多聚物<sup>[9, 10]</sup>、表面活性剂<sup>[11, 12]</sup>、脂质体<sup>[13]</sup>及树状高分子<sup>[14]</sup>等. 这些材料在其自身无免疫原性、无潜在的感染危险等方面显然优于病毒类载体, 但是它们的转染效率通常不如腺病毒类重组载体, 在有血清蛋白存在的情况下尤为明显<sup>[15]</sup>, 因此限制了这些载体的实际使用<sup>[16]</sup>. 另一方面, 已进入细胞内的外源性 DNA 分子可被细胞内核酸酶等降解, 其存留和表达的时间也很短, 常常难以满足治疗和预防的需要<sup>[17]</sup>. 此外, 有效的基因治疗还要求载体材料能够顺利通过机体内的一系列生物屏障, 如器官、组织和靶细胞<sup>[18, 19]</sup>, 这一过程也会受到载体的物化性质、生物、化学修饰程度及载体/DNA 复合物的导入途径等诸多因素的影响<sup>[20-23]</sup>.

纳米材料的结构大小接近生物大分子, 同时其性质能够被精确控制, 因此在生物技术领域中具有日益广泛的应用前景. Starburst™ PAMAM dendrimers 是一类分子直径在 1~13 nm 之间的新型高分子聚合物, 呈辐射状对称的刚性球体结构, 由于其高度分枝而被命名为星射状树形高分子<sup>[20]</sup>. 该分子由三部分组成: 中心核、内层重复的亚单位和外层的氨基端. 在 Starburst™ PAMAM dendrimers 分子的合成过程中<sup>[24, 25]</sup>, 每增加一次分枝, dendrimers 的分子就增长一“代”, 外层氨基基团数目则增长一倍<sup>[20]</sup>. 目前已被合成的 Starburst™ PAMAM dendrimers 分子有 0~10 代 (计为 G0~G10). 这些分子的特定结构和表面大量的氨基基团有利于它们与抗体<sup>[26]</sup>、核酸<sup>[27-29]</sup>和荧光基团<sup>[18]</sup>通过静电作用形成稳定的复合物, 因此被广泛地应用于不同的生物学和医学领域.

现有的研究表明, Starburst™ PAMAM dendrimers 分子能介导寡核苷酸、质粒 DNA 等核

\* 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA215021).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-65296960/6440, E-mail: hengwang@pumc.edu.cn

收稿日期: 2004-03-13, 接受日期: 2004-05-28

酸物质进入培养的真核细胞内, 并获得目的基因的表达<sup>[30]</sup>. 一些研究认为, 这种纳米载体与 DNA 形成的复合物对细胞的毒性很低, 因此有可能作为 DNA 转载体在体内外应用. 但是, 到目前为止, 对于 Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 复合物的生物学特性、dendrimers 分子单独存在或与 DNA 复合存在的形式对被转染细胞的毒性、复合物在细胞内转运和基因表达的分子行为等问题的了解都还不够. 本实验选择 G3、G5、G7 和 G9 四种全代和 G3.5、G7.5 两种半代 dendrimers 分子, 研究其介导 DNA 转染真核细胞的能力、细胞毒性、最优化的转染条件等因素, 初步评价 PAMAM dendrimers 作为 DNA 载体在基因治疗和 DNA 疫苗领域中应用的可能性.

## 1 材料与方法

### 1.1 Dendrimers

G3, G3.5, G5, G7, G7.5, G9 PAMAM dendrimers 购于美国 Sigma 公司.

### 1.2 细胞和培养基

COS-7 细胞和 SH-SY5Y 细胞购于北京细胞培养中心 (和加利福尼亚大学合作, 旧金山), 采用标准 RPMI 1640 培养基, 10% 胎牛血清 (Hyclone 公司, USA), 1% 青链霉素双抗, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 细胞孵育箱培养.

### 1.3 Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 复合物的制备

pRL-TK 报告基因 (Promega 公司) 载体 (4.05 kb) 包含一个 cDNA (Rluc 公司), 编码 Renillaluciferase 和单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子, 提供从低到中等水平的共转染哺乳动物细胞中 Renillaluciferase 的表达.

质粒 pEGFP-N1 (Clontech 公司) 和 pRL-TK 在 *E. coli* DH5 $\alpha$  中增殖, 然后用 QIAGEN 质粒 DNA 纯化系统分离质粒 DNA. DNA/dendrimers 复合物通过将这两种成分在无血清培养基 50 ~ 100  $\mu$ l 体系中混合, 室温下至少孵育 5 min, 每次使用前新鲜配制, 在 3 h 内使用. DNA 和 dendrimers 分子的电荷比建立在每种成分电荷计算的基础上 (Kukowska-Latallo 等, 1996), 也就是计算出核酸中每个碱基所含的磷酸基团数和每个 dendrimer 分子的氨基端基团数. 如: 已知 1  $\mu$ g DNA 中含有  $1.71 \times 10^{15}$  个碱基, 这就意味着 1  $\mu$ g DNA 中约有  $1.71 \times 10^{15}$  个负电荷, 而 1  $\mu$ g G7 dendrimer 中大约

有  $2.56 \times 10^{15}$  单位的正电荷. 因此, 为了得到 1:1 的电荷比, 1  $\mu$ g DNA 应与 0.65  $\mu$ g 的 G7 dendrimer 混合<sup>[23]</sup>. 质粒 DNA 和 Gi ( $i = 3, 3.5, 5, 7, 7.5, 9$ ) dendrimer 的复合物简称为 Gi/plasmid 复合物.

### 1.4 Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 复合物中 DNA 对限制性内切酶的抗性分析

对 G3/pRL-TK 复合物和空白质粒用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III (TAKARA) 进行消化. 消化液在下面的标准条件下进行操作. 在 37℃ 孵育 3 h 后, 反应通过煮沸停止, 然后加入 SDS 至终浓度为 0.4 mol/L 以溶解复合物. 其他 G3/pRL-TK 复合物先加 SDS 溶解, 然后用 BamH I 和 Hind III 消化. 将各组消化物在 0.8% ~ 1% 的琼脂糖凝胶中电泳.

### 1.5 pH 值对 dendrimers/pRL-TK 复合物的影响

不同代数的 dendrimer 与 pRL-TK DNA 在 Tris-HCl 缓冲液中形成复合物, 分别调 pH 值为 2.0、5.0、7.0、10.0, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析.

### 1.6 Starburst™ PAMAM dendrimers/pEGFP-N1 复合物转染 COS-7 细胞

2  $\mu$ g 质粒 pEGFP-N1 与 G3, G5, G7, G9 dendrimers 以 1:20 的电荷比, 与 G9 dendrimers 以 1:1 到 1:100 的电荷比在室温下形成复合物, 六孔板中每孔加入以上量的复合物与细胞混合. 一些复合物中加 DEAE-葡聚糖至终浓度为 0.05 g/L 到 0.4 g/L, 在室温下至少孵育 5 min. 转染之前 18 ~ 24 h, 在六孔板每孔种上  $2 \times 10^5$  个细胞, 之后用无血清培养基清洗. 包含 2  $\mu$ g DNA 的复合物溶解在 100  $\mu$ l 无血清培养基中, 再加到每孔 1  $\mu$ l 含细胞的无血清培养基中, 37℃ 孵育 3 h. 然后用标准生长培养基替代无血清培养基, 孵育 48 h 后, 收集细胞. 阳离子 Lipofectamine (GIBCO) 用作转染效率的空白对照, 根据 vendor 程序进行转染. 我们优化了 Lipofectamine 的转染条件, 发现 Lipofectamine 的最佳转染量为 4  $\mu$ l, 最佳孵育时间为 3 h.

### 1.7 基因表达的检测

转染后 48 h, 表达 GFP 的细胞通过流式细胞检测仪 (BD) 进行检测和定量, 用激光共聚焦显微镜 (Olympus) 在 488 nm 的激发光下检测阳性细胞.

### 1.8 MTT 检测

根据标准 MTT 检测方法 (薛庆善, 2002 年), 96 孔板每孔在转染前 8 ~ 24 h 种  $2 \times 10^4$  个细胞,

再用无血清培养基清洗. 25  $\mu$ l 含 0.2  $\mu$ g DNA 的不同复合物加到含 200  $\mu$ l 无血清培养基的孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h. 然后用标准生长培养基替代转染培养基, 继续培养 24 h 后收集细胞进行 MTT 分析. 没有转染的细胞用作空白. 每个检测点上 3 个平行孔进行检测. 检测分组如下: a. G9/DNA 复合物, 1:100 到 1:1 电荷比; b. 质粒 DNA, G3 dendrimer, G3/DNA 复合物, G5/DNA 复合物, G7/DNA 复合物, G9/DNA 复合物 (电荷比均为 20:1); c. Lipofectamine/DNA: 每孔中 DNA 分别与 0.2  $\mu$ l 和 0.4  $\mu$ l Lipofectamine 复合; d. G9/DNA 复合物 (电荷比均为 20:1) 每孔加入终浓度为 0.01  $\mu$ mol/L 到 0.4  $\mu$ mol/L 的 DEAE-葡聚糖.

### 1.9 统计分析

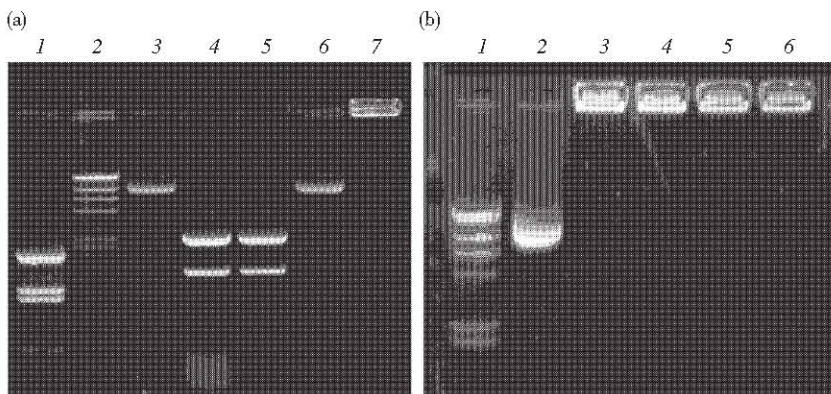
因为大量数据不是正常分布的 (Lilliefors 改写下的 Kolmogorov-Smirnov 检验,  $P < 0.05$ ), 所以可用非参数 Mann-Whitney U 检验方法检测, 在

Windows 下用 SPSS10.0 检验不同组间的差异.

## 2 结 果

### 2.1 dendrimers/DNA 复合物的抗酶切反应

当 dendrimers: DNA 的电荷比在 1:1 时, 各种全代 PAMAM dendrimers 分子都能阻止 dendrimers/DNA 复合物中 DNA 的电泳迁移. 由于阴离子去污剂 SDS 可以解离 dendrimers/DNA 复合物, 使复合物中的 DNA 分子释放出来, 证明 dendrimers 与 DNA 之间是通过静电相互作用发生复合的 (图 1a). 同时, 如图 1a 所示, 存在于复合物中的 DNA 分子不受限制性内切酶的降解. 与 G3 代 dendrimer 以 1:1 比例复合的 DNA 未被限制性内切酶消化 (第 7 行), 而裸 DNA 则被限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 消化成两个片段 (第 4 行和第 5 行).



**Fig. 1 Sensitivity of the Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA complex to enzyme digestion and pH variation**

(a) 1: pBR322/*Bst*N I marker; 2:  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker; 3: pRL-TK plasmid control; 4: Dissociated complexes with 0.4 mol/L SDS and then digested with *Bam*H I and *Hind* III; 5: pRL-TK plasmid control digested with *Bam*H I and *Hind* III; 6: Digested complexes with *Bam*H I and *Hind* III, then dissociated with 0.4 mol/L SDS; 7: Digested complexes with *Bam*H I and *Hind* III. (b) 1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker; 2: pRL-TK plasmid control; 3~6: dendrimers/DNA complexes in pH 10, 7, 5, 2, respectively.

### 2.2 Dendrimers/DNA 复合物的酸碱稳定性

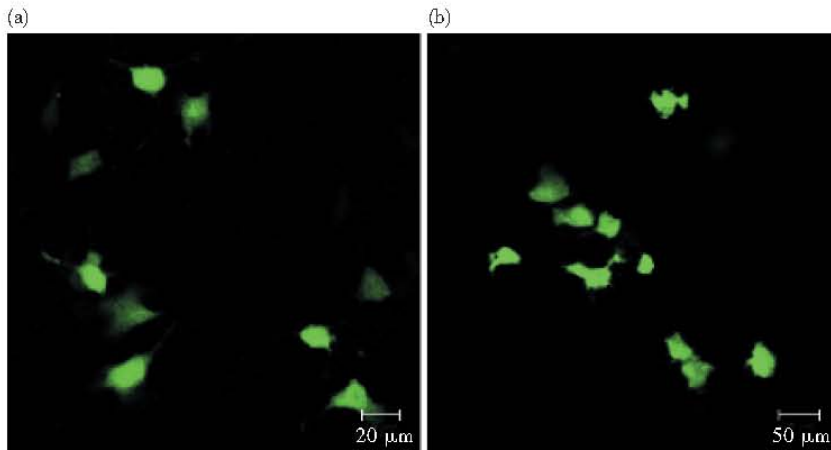
将 dendrimers/DNA 复合物溶于 pH 值从 2 到 10 的 Tris-HCl 中, 经琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 pH 值从 2 到 10 变化的范围内, dendrimers/DNA 复合物没有出现被解离的现象 (图 1b).

### 2.3 Dendrimers/DNA 复合物的转染效率

所有全代 dendrimers 都有介导 DNA 转入细胞的能力. 转染效率与 dendrimers 分子的大小 (代数) 和细胞类型密切相关. 不同细胞系接受外源基因能力的差异也影响到转染效率. 在相同的条件

下, dendrimers/DNA 复合物对 COS-7 细胞的转染效率高于对 SH-SY5Y 细胞的转染效率 (图 2a 和 2b). PAMAM dendrimers 分子的直径从 G3 代到 G9 代呈指数增长, 不同代的分子与 DNA 形成复合物后, 在细胞内的转染效率也显示出从 1.2% 到 17.75% 的递增趋势 (图 3). 由于 G9/DNA 复合物的转染效率是最高的, 我们用它进行了不同电荷比对转染效率的影响实验. 实验发现, 随着 DNA/G9 的电荷比从 1:1 增加到 1:100, 转染效率也相应增加 (数据未公布).

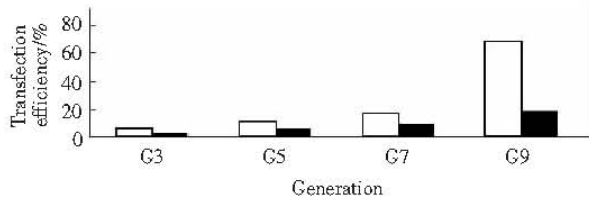




**Fig. 2** Transfection of G9/pEGFP-N1 complex at 10:1 charge ratio with the DEAE- dextran (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) into COS-7 and SH-Sy5y cells

(a) Cos-7 cells; (b) SH-Sy5y cells.

DEAE-葡聚糖是一种转染增强剂. 我们尝试了向转染液中加入不同浓度的 DEAE-葡聚糖, 发现当 DEAE-葡聚糖的终浓度从 0.05  $\mu\text{mol/L}$  增加到 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时, G3, G5, G7, G9 各代 dendrimers 分子与 DNA 分子复合物对真核细胞的转染率分别从 20% 逐渐上升到 70% (图 3), 是无 DEAE-葡

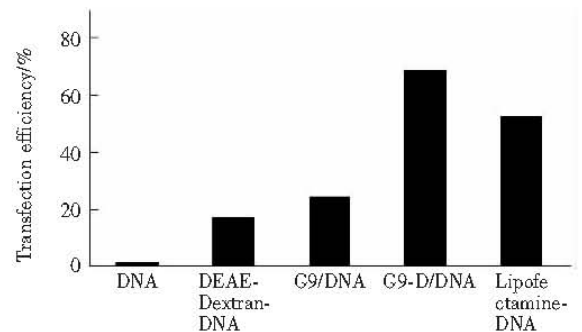


**Fig. 3** The transfection efficiency of G3 ~ G9 Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA complexes (20:1 charge ratio) with or without the presence of 0.1  $\mu\text{mol/L}$  DEAE-dextran

□: G3-D G5-D G7-D G9-D; ■: G3 G5 G7 G9.

聚糖存在时转染效率的 2~4 倍, 是裸 DNA 转染效率的 100 倍左右, 与优化后的商业化阳离子转染试剂 Lipofectamine 的转染效率相同, 甚至更高. 尽管提高 DEAE-葡聚糖的作用浓度有助于提高 dendrimer/DNA 的转染效率, 但是继续提高 DEAE-葡聚糖的浓度时, 细胞毒性也相应增加. 由于 DEAE-葡聚糖本身也是一种细胞转染试剂, 因此我们进一步比较了单独使用 DEAE-葡聚糖或 G9/DNA 复合物, 与 DEAE-葡聚糖加上 G9/DNA 复合物在

同样浓度下介导 DNA 的转染效率, 发现单独使用 G9 dendrimer 或 DEAE-葡聚糖介导 DNA 转染细胞的转染效率为 17.75% 和 16.67%, 远远小于同时使用 G9/DNA/DEAE-葡聚糖系统的转染效率 (68.73%) (图 4). 这个结果排除了 DEAE-葡聚糖本身提高转染效率的可能性.



**Fig. 4** The comparison of transfection efficiency with different transfection methods

## 2.4 被转染细胞的存活力改变

应用标准 MTT 分析方法, 我们检测了上述不同试剂组处理的细胞光吸收, 再对数据进行统计分析. 我们的结果显示 (图 5): Lipofectamine 在 0.4  $\mu\text{l}$  剂量时已显示出细胞毒性 ( $P=0.05$ ), 而 Lipofectamine 最优化的转染细胞剂量是 0.6  $\mu\text{l}$ . 加入各种浓度 DEAE-葡聚糖组对所转染的细胞均有毒性 ( $P \leq 0.05$ ). 用单独的 G3 代 dendrimer 分子

处理时, G3 代 dendrimer 分子在  $2.6 \times 10^{-2}$  g/L 浓度下表现出一定的细胞毒性. 相对于空白组, 各组 dendrimers/DNA 复合物均未显示对被转染细胞有毒性, 即使在高达  $1.3 \times 10^{-1}$  g/L 的有效作用浓度时也未显示明显毒性 (图 5).

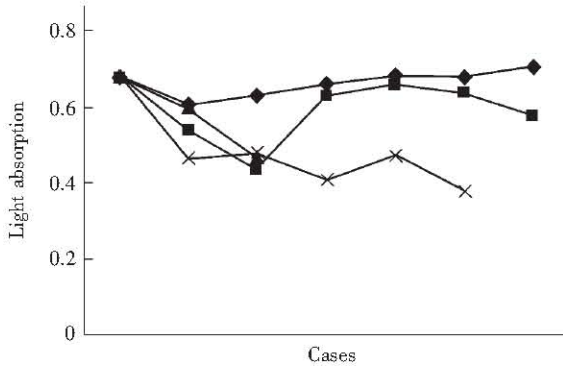


Fig. 5 Cell activities measured by MTT assay after the transfection

◆—◆: G9 charge ratios. From left to right on the X axes, each point represents the cells transfected with: None, plasmid DNA, G9/pEGFP-N1 complex (1:1 charge ratio), G9/pEGFP-N1 complex (1:10 charge ratio), G9/pEGFP-N1 complex (1:20 charge ratio), G9/pEGFP-N1 complex (1:50 charge ratio), G9/pEGFP-N1 complex (1:100 charge ratio); ■—■: Generations. From left to right on the X axes, each point represents the cells transfected with: None, plasmid DNA, G3 dendrimer, G3/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio), G5/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio), G7/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio), G9/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio); ▲—▲: Lipofectamine. From left to right on the X axes, each point represents the cells transfected with: None, 0.2 ml Lipofectamine, 0.4 ml Lipofectamine; ×—×: G9/DNA complex in the presence of DEAE-dextran with a series of concentration degradations. From left to right on the X axes, each point represents the cells transfected with: None, G9/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio) + 0.01 mmol/L DEAE-dextran, G9/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio) + 0.05 mmol/L DEAE-dextran, G9/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio) + 0.1 mmol/L DEAE-dextran, G9/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio) + 0.2 mmol/L DEAE-dextran, G9/pEGFP-N1 complex (20:1 charge ratio) + 0.4 mmol/L DEAE-dextran.

### 3 讨 论

全代 dendrimers 分子, 如: G3, G5, G7 和 G9, 能在大多数生理条件下和 DNA 形成稳定的复合物. 全代 dendrimers 分子表面带正电荷的氨基基团与 DNA 分子主链上带负电荷的磷酸基团发生静电相互作用, 形成复合物<sup>[28]</sup>. 而半代 dendrimers 分子因其末端为不带电荷的酯基而不能与 DNA 分子相互作用. pH 值变化及核酸酶都不能解离或降解全代 dendrimers/DNA 复合物, 因此可以推测,

这些复合物在活体内或细胞内也不被各种酶类解离或降解, 因而能够维持外源性 DNA 的长期表达. Dendrimer 介导 DNA 转染细胞的能力与聚合物的大小、形状以及聚合物表面氨基的数目相关. 本实验显示, Starburst™ PAMAM dendrimers 分子越大, 介导 DNA 转入所培养细胞的能力越高. Tang 和 Szoka<sup>[31]</sup>的研究表明, 完整的或经过处理发生局部断裂的 dendrimers 与 DNA 形成的复合物在电镜下呈圆环状的拓扑结构, 单个环状的拓扑结构在溶液中的直径约为 90 ~ 130 nm, 分子质量在  $10^1 \sim 10^2$  ku 数量级范围内<sup>[27]</sup>, 而通常大小为 7 kb 左右质粒的超螺旋结构, 在电镜下直径可达 150 ~ 300 nm 左右<sup>[7]</sup>. 这表明在溶液中阳离子化的 dendrimers 分子与带负电荷的 DNA 相互作用, 中和了 DNA 所带的负电荷, 使 DNA 的结构发生了压缩, 是一个熵增的过程. 同样的现象也发生在其他阳离子脂或阳离子多聚物与 DNA 的相互作用中, 尤其当阳离子大分子所携带的电荷数多于 DNA 时压缩效果更明显<sup>[7]</sup>. 这种结构上的压缩导致了两个有利结果: a. 相对小的体积有利于复合物的跨膜运送. 尤其当复合物带净正电荷时, 复合物与质膜上的糖蛋白、唾液酸、磷脂等相互作用, 启动细胞内吞作用, 将复合物主动摄入细胞内; b. 复合物中 dendrimers 分子在空间位置上“阻止”核酸酶、限制性内切酶向 DNA 分子的“靠近”, 对 DNA 起保护作用. 这一特点有利于外源基因在宿主细胞中的长期表达, 从而满足基因治疗和 DNA 疫苗的长期性保护的需要.

关于 dendrimers 分子介导 DNA 转染细胞及 DNA 在胞内的运送、表达过程, 目前大多数人认为复合物能与细胞膜表面带负电荷的大分子相互作用, 因此复合物表面应为净正电荷. 这种相互作用启动了复合物内移至细胞质的被动运输或内吞作用. 当我们将 DNA/G9 的电荷比从 1:1 增加到 1:100 时, 发现转染效率也相应增加 (结果未公布), 证明电荷比的增加有利于复合物从胞外向胞内的转移. 有研究证明, 进入细胞的复合物首先出现在胞内体中, 随后与溶酶体发生融合. 由于表面氨基的质子化, 分支状的阳离子聚合物有很高的缓冲能力. 这个特点使得 dendrimers 呈弱碱性, 阻止了内体-溶酶体的酸化降解作用. 关于 DNA 从溶酶体释放出来时是完全游离的, 还是仍与 dendrimers 分子复合着, 存在不同的看法, 一些人认为 DNA 仍是以复合态被释放入胞质, 另外一些

人认为 DNA 与 dendrimers 分离开了。我们的实验结果支持前一看法。尽管未能有效分离溶酶体,但是经电泳分析表明, pH 值在 5 左右时, DNA 并未从复合物中解离出来,而在这个 pH 值条件下,溶酶体中的酶活性最强。Godbey 等<sup>[32]</sup>的实验也支持这一观点,他们在研究 PEI/DNA 复合物转染细胞后的胞内过程中,证明 DNA 不必完全从复合物中解离出来才能表达。尽管人们对复合物进入胞核的机制还不清楚,考虑到许多核蛋白的核定位信号是富含正电荷的 6 个氨基酸组成,如:赖氨酸,精氨酸,脯氨酸等,我们认为带有正电荷的复合物可能更有利于其与核孔复合物相互作用<sup>[33]</sup>,介导 DNA 进入细胞核。

Kukowska-Latallo 等<sup>[23]</sup>首先发现 DEAE-葡聚糖的存在可能有效增强 Starburst™ PAMAM dendrimers 介导的转染效率,其机理尚不清楚。我们发现加入 DEAE-葡聚糖后, G3, G5, G7, G9 各代 dendrimers 分子与 DNA 分子的复合物对真核细胞转染率均有不同程度的提高,幅度为 2~14 倍。随着转染液中 DEAE-葡聚糖含量的增加(从终浓度 0.01 mol/L 到 0.05 mol/L),转染效率的增加幅度也逐渐提高,达到一定浓度后转染效率的增加趋势渐趋平缓,细胞毒性随之增加。

由于 DEAE-葡聚糖本身也是一种转染试剂,我们将仅由 DEAE-葡聚糖与 DNA 形成复合物转染细胞的效率,与 dendrimers/DNA 复合物转染细胞的效率,以及有一定浓度 DEAE-葡聚糖存在时 dendrimers/DNA 复合物转染细胞的效率做了比较。发现三者同时使用的转染效率明显高于其他两组。由于 DEAE-葡聚糖是在 DNA 与 dendrimers 分子完全复合后加入到溶液中,因此其增强作用不是直接介导 DNA 分子的转染。由于 DEAE-葡聚糖分子本身在细胞培养液中带一定的正电荷,它的存在可阻止转染液中的 Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 复合物聚集成簇。成簇后可导致复合物直径增加到 500 nm 以上<sup>[32]</sup>,造成对细胞的转染效率大大降低<sup>[34]</sup>。DEAE-葡聚糖的作用提示我们,选用其他低毒性的阳离子多聚物可能有助于进一步提高 Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 复合物在体内的转染效率。

Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 复合物对不同细胞的转染能力不同,对不同细胞表现出毒性的浓度也不同,这可能与不同细胞的敏感性有关。与目前效果较好的细胞转染试剂 Lipofectamine 相

比, Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 复合物具有与之相当的转染效率。但在有效作用浓度下, Starburst™ PAMAM dendrimers 基本没有细胞毒性,而 Lipofectamine 则有明显的细胞毒性<sup>[23]</sup>。通过 MTT 分析方法,我们没有证实 dendrimers/DNA 复合物的细胞毒性。但是,当在浓度超过  $2.6 \times 10^2$  g/L 的 Starburst™ PAMAM dendrimers/DNA 转染液中孵育 COS-7 细胞 3 h 后,我们观察到一些细胞形态的改变:胞体紧缩、透明度下降、胞内颗粒数上升。当我们在上述浓度稀释 2 倍的条件孵育 SH-Sy5y 细胞,发现仅用肉眼就能观察到细胞形态的变化。其原因可能是外源基因表达产物的团块影响了培养细胞的自然生活状态,或者是阳离子复合物和细胞膜之间的相互作用导致了细胞形态的变化。MTT 检测仅能反映细胞线粒体脱氢酶的状态,不能反映细胞活力的所有方面。要了解上述形态学变化是否可逆和是否伴随其他细胞代谢过程的改变,仍需要对 Starburst™ PAMAM dendrimers /DNA 复合物的细胞毒性做更进一步的研究。

有报道认为,纳米材料可以作为免疫佐剂发挥作用,纳米佐剂是巨噬细胞和树突细胞首选的吞噬目标,几乎所有的生化药品,特别是 DNA 药物的研究开发和多肽疫苗的分子佐剂都可以引入纳米技术<sup>[35]</sup>。通过以上的研究,我们初步验证了 Starburst™ PAMAM dendrimers 分子作为 DNA 载体在细胞内应用的效果,这些工作为进一步探讨它们在基因治疗和 DNA 疫苗领域的应用提供了必要的实验基础,也提示我们,对纳米材料的生物学特性仍需进行更深入和全面的研究,在此基础上才能客观评价其应用前景,避免其负面影响。

致谢 感谢于建教授、郭朝霞副教授和李会良博士对本实验的建议和指导。感谢丁俊军同学的文字编译工作。

## 参 考 文 献

- 1 Bronte V. Genetic vaccination for the active immunotherapy of cancer. *Curr Gene Ther*, 2001, 1 (1): 53~100
- 2 Lundstrom K. Alphavirus vectors for gene therapy applications. *Curr Gene Ther*, 2001, 1 (1): 19~29
- 3 Robinson H L. New hope for an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (4): 239~250
- 4 Yamamoto S, Yamamoto T, Nojima Y, *et al.* Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. *Jpn J Infect Dis*, 2002, 55 (2): 37~44
- 5 Minichiello V. New vaccine technology-what do you need to know? *J Am Acad Nurse Pract*, 2002, 14 (2): 73~81

- 6 Gao X, Huang L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 1996, **35**: 1027 ~ 1036
- 7 Dunlap D D, Maggi A, Soria M R, *et al.* Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 3095 ~ 3101
- 8 Rajur S B, Roth C M, Morgan J R, *et al.* Covalent protein-oligonucleotide conjugates for efficient delivery of antisense molecules. *Bioconjug Chem*, 1997, **8**: 935 ~ 940
- 9 Brazeau G A, Attia S, Poxon S, *et al.* *In vitro* myotoxicity of selected cationic macromolecules used in non-viral gene delivery. *Pharm Res*, 1998, **15** (5): 680 ~ 684
- 10 Fischer D, Bieber T, Li Y, *et al.* A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*, 1999, **16**: 1272 ~ 1278
- 11 Hughes J A, Aronsohn A I, Avrutskaya A V, *et al.* Evaluation of adjuvants that enhance the effectiveness of antisense oligodeoxynucleotides. *Pharm Res*, 1996, **13** (3): 404 ~ 410
- 12 Kukowska-Latallo J F, Chen C, Eichman J, *et al.* Enhancement of dendrimer-mediated transfection using synthetic lung surfactant exosurf neonatal *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **264** (1): 253 ~ 261
- 13 Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 1995, **2** (10): 710 ~ 722
- 14 Shah D S, Sakthivel T, Toth I, *et al.* DNA transfection and transfected cell viability using amphipathic asymmetric dendrimers. *Int J Pharmaceutics*, 2000, **208** (1 ~ 2): 41 ~ 48
- 15 Lewis J G, Lin K Y, Kothavale A, *et al.* A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (8): 3176 ~ 3181
- 16 Brody S L, Crystal R G. Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, **716**: 90 ~ 103
- 17 Qin L, Pahud D R, Ding Y, *et al.* Efficient transfer of genes into murine cardiac grafts by Starburst polyamidoamine dendrimers. *Hum Gene Ther*, 1998, **9** (4): 553 ~ 560
- 18 Yoo H, Juliano R L. Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (21): 4225 ~ 4231
- 19 El-Sayed M, Kiani M F, Naimark M D, *et al.* Extravasation of poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers across microvascular network endothelium. *Pharm Res*, 2001, **18** (1): 23 ~ 28
- 20 Tomalia D A, Baker H, Dewald J, *et al.* A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer J*, 1985, **17** (1): 117 ~ 132
- 21 Ferkol T W, Kaetzel C A, Davis P B. Gene transfer into respiratory epithelial cells by targeting the polymeric immunoglobulin receptor. *J Clin Invest*, 1993, **92** (5): 2394 ~ 2400
- 22 Kowalczyk D W, Ertl H C. Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55** (5): 751 ~ 770
- 23 Kukowska-Latallo J F, Bielinska A U, Johnson J, *et al.* Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (10): 4897 ~ 4902
- 24 Hawker C J, Fréchet J M J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture—a new convergent approach to dendritic molecules. *J Am Chem Soc*, 1990, **112** (21): 7638 ~ 7647
- 25 Wooley K L. Polymers with controlled molecular architecture-control of surface functionality in the synthesis of dendritic hyperbranched macromolecules using the convergent approach. *J Am Chem Soc*, 1991, **113** (11): 4252 ~ 4261
- 26 Singh P, Moll F, Lin S H, *et al.* Starburst™ dendrimers: enhanced performance and flexibility for immunoassays. *Clin Chem*, 1994, **40** (9): 1845 ~ 1849
- 27 Delong R, Stephenson K, Loftus T, *et al.* Characterization of complexes of oligonucleotides with polyamidoamine starburst dendrimers and effects on intracellular delivery. *J Pharm Sci*, 1997, **86** (6): 762 ~ 764
- 28 Bielinska A U, Kukowska-Latallo J F, Baker J R, *et al.* The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1353** (2): 180 ~ 190
- 29 Helin V, Gottikh M, Mishal Z, *et al.* Uptake and intracellular distribution of oligonucleotides vectorized by a PAMAM dendrimer. *Nucleosides Nucleotides*, 1999, **18** (6 ~ 7): 1721 ~ 1722
- 30 Eichman J D, Bielinska A U, Kukowska-Latallo J F, *et al.* The use of PAMAM dendrimers for the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharmaceutical Sci & Technol Today*, 2000, **3** (7): 232 ~ 245
- 31 Tang M X, Szoka F C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther*, 1997, **4** (8): 823 ~ 832
- 32 Godbey W T, Wu K K, Mikos A G. Tracking the intracellular path of poly (ethyleneimine) /DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **96** (9): 5177 ~ 5181
- 33 汪仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学. 北京: 北京师范大学出版社, 1998. 304  
Wang K R, Xue S B, Liu H T. *Cell Biology*. Beijing: Beijing Normal University Press, 1998. 304
- 34 Bielinska A U, Chen C, Johnson J, *et al.* DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: Implications for transfection. *Bioconjug Chem*, 1999, **10** (5): 843 ~ 850
- 35 Lv F L, He F H. The thought of nano material as polypeptide adjuvant. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (6): 832 ~ 835



## Application of Starburst™ PAMAM Dendrimers as DNA Carriers *In vitro* \*

GUO Chen-Ying, WANG Heng \*\*, LIN Ya-Hui, CAI Qi-Liang

(Department of Molecular Parasitology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

**Abstract** Starburst™ PAMAM dendrimers are novel polymers with a molecular architecture characterized by regular, dendritic branching with radial symmetry. Having high density of positive charges on their surfaces in physiological condition because of the protonization of amino groups on the surfaces, and complexing with genetic materials on the basis of electrostatic interactions, those Starburst™ PAMAM dendrimers deliver genes into alive cells. In order to characterize the potential effects of Starburst™ PAMAM dendrimers as a carrier for DNA transfection, six different types generations of Starburst™ PAMAM dendrimers were investigated for their capabilities in binding DNA, and the effects on both DNA transfection and maintenance of cell viability was evaluated *in vitro*. The experiments demonstrated that it was the full generations but not the half generations of Starburst™ PAMAM dendrimer could transfect eukaryotic cells efficiently. The dendrimer/DNA complexes were very steady, no dissociation of the complexes was detectable in a large scope of pH (2 ~ 10). The complexation of Starburst™ PAMAM dendrimer and DNA prevent the reaction that endonuclease dissociates the DNA. In a certain range of dendrimers to DNA charge ratios, the Starburst™ PAMAM dendrimer with higher generations showed much better transfection efficiency than those with lower generations. The transfection efficiency was also variable in different cell lines. Starburst™ PAMAM dendrimers complexing with DNA have no or very low cytotoxicity at the concentrations effective for DNA transfection ( $\leq 1.3 \times 10^{-1}$  g/L). However, the cytotoxicity of Starburst™ PAMAM dendrimers without binding DNA could be detected at a lower concentration. The results demonstrated that Starburst™ PAMAM dendrimers, as a novel type of low toxicity, non-viral DNA delivery vehicle, had promising potential to mediate DNA transfection *in vitro*. It provide primary experimental basis for the application of the nanometer material-Starburst™ PAMAM dendrimers *in vivo* as DNA delivery carrier.

**Key words** DNA delivery, Starburst™ PAMAM dendrimers, transfection, nonviral vectors

\* This work was supported by a grant from State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA215021).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-65296960/6440, E-mail: hengwang@pumc.edu.cn

Received: March 13, 2004 Accepted: May 28, 2004