



聚乙烯亚胺纳米载体的设计及其在 DNA 体内外递送中的性能评估

孙佳怡^{1,2}, 鲁晓锋², 舒建洪¹, 吴方丽¹, 金伟波^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院, 浙江绍兴 312366)

摘要: 聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)纳米载体广泛应用于核酸药物的递送,但高细胞毒性限制了其在临床上的应用。采用二油酰基磷脂酰乙醇胺(Dioleoyl phosphatidylethanolamine, DOPE)和胆固醇修饰分子量为 1.2 kDa 与 25.0 kDa 的 PEI,并将修饰后的 PEI 与 DNA 按照不同的氮磷比混合,制备 PEI/DNA 纳米颗粒;评估纳米颗粒的理化性质、细胞毒性与转染效率,筛选高效低毒的 PEI 纳米载体。结果显示:DOPE 和胆固醇修饰显著降低了 PEI/DNA 纳米颗粒的细胞毒性。当氮磷比为 3 和 5 时,修饰后的纳米颗粒的平均粒径约为 200 nm,Zeta 电位在 5 mV 至 10 mV 之间,分散度在 0.1 至 0.2 之间;当氮磷比为 5 时,修饰后的 25.0 kDa 纳米颗粒展现出最高的 DNA 体内外递送效率和低细胞毒性。该结果表明辅助脂质修饰显著影响了纳米颗粒的细胞毒性,PEI 分子量和氮磷比显著影响了纳米颗粒的理化性质和转染效率。筛选出修饰后的 25.0 kDa PEI 在氮磷比为 5 时与 DNA 混合制备的纳米颗粒兼具高效的基因递送效率和良好的生物相容性,为 PEI 纳米载体在 DNA 疫苗递送领域的应用提供了数据支撑。

关键词: 聚乙烯亚胺;二油酰基磷脂酰乙醇胺;胆固醇;PEI/DNA 纳米颗粒;DNA 递送

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2025)09-0656-08

引文格式: 孙佳怡,鲁晓锋,舒建洪,等. 聚乙烯亚胺纳米载体的设计及其在 DNA 体内外递送中的性能评估[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2025,53(5):656-663.

Reference Format: SUN Jiayi, LU Xiaofeng, SHU Jianhong, et al. Design of polyethyleneimine nanocarriers and evaluation of their performance in DNA delivery *in vivo* and *ex vivo*[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2025, 53(5):656-663.

Design of polyethyleneimine nanocarriers and evaluation of their performance in DNA delivery *in vivo* and *ex vivo*

SUN Jiayi^{1,2}, LU Xiaofeng², SHU Jianhong¹, WU Fangli¹, JIN Weibo^{1,2}

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Sci-Tech University Shaoxing Academy of Biomedicine, Shaoxing 312366, China)

Abstract: Polyethyleneimine (PEI) nanocarriers are widely used for nucleic acid drug delivery, but high cytotoxicity limits their clinical applications. Dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) and cholesterol were used to modify PEI with molecular weights of 1.2 kDa and 25.0 kDa, and PEI/DNA nanoparticles were prepared by mixing modified PEI with DNA at different nitrogen-to-phosphorus ratios. The physicochemical properties, cytotoxicity and transfection efficiency of the nanoparticles were evaluated, and efficient and low-toxicity PEI nanocarriers were screened. The results showed that DOPE and cholesterol modifications significantly reduced the cytotoxicity of PEI/DNA nanoparticles. When the nitrogen-phosphorus ratios were 3 and 5, the modified nanoparticles had an average particle size of about 200 nm, a zeta potential between 5 mV and 10 mV, and a dispersion between 0.1 and 0.2. When the

收稿日期: 2025-03-03 网络出版日期: 2025-06-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172496)

作者简介: 孙佳怡(1999—),女,江苏苏州人,硕士研究生,主要从事纳米载体递送方面的研究。

通信作者: 金伟波, E-mail: jwb@zstu.edu.cn

nitrogen-phosphorus ratio was 5, the modified 25.0 kDa nanoparticles exhibited the highest DNA *in vivo* and *ex vivo* delivery efficiency and low cytotoxicity. This result indicated that auxiliary lipid modification significantly affected the cytotoxicity of the nanoparticles, and the PEI molecular weight and nitrogen-phosphorus ratio significantly affected the physicochemical properties and transfection efficiency of the nanoparticles. The nanoparticles prepared by screening the modified 25.0 kDa PEI mixed with DNA at a nitrogen-phosphorus ratio of 5 exhibited both high gene delivery efficiency and good biocompatibility, which provided data support for the application of PEI nanocarriers in the field of DNA vaccine delivery.

Key words: polyethyleneimine; dioleoyl phosphatidylethanolamine; cholesterol; PEI/DNA nanoparticles; DNA delivery

0 引言

核酸药物在疾病治疗中应用潜力巨大,但核酸分子的不稳定性及其在内化过程中存在的递送屏障等问题,限制了其在临床上的应用^[1-2]。聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)在 1995 年首次报道后被研究者广泛用作基因递送载体,该载体具有高效的基因转染、良好的基因压缩和内体逃逸能力以及可修饰性强等优点,在核酸药物递送领域展现出巨大的应用潜力^[3]。PEI 富含氨基基团,可通过静电作用与核酸紧密结合,将其压缩形成稳定的纳米颗粒。这一结构可在一定程度上避免核酸降解,并提高细胞摄取效率,实现有效的细胞内递送^[4]。同时,PEI 具备“质子海绵效应”,能在内体内吸收质子,诱导内体渗透压上升和破裂,从而促进核酸从内体释放至细胞质,实现基因表达^[5-7]。然而,PEI 存在较高的细胞毒性问题,其高密度氨基易与细胞膜发生强烈相互作用,尤其是高分子量 PEI(25.0 kDa)更易造成细胞膜损伤并诱发细胞死亡^[8]。此外,PEI 还易与血液中带负电的血清蛋白发生非特异性结合,形成血栓并破坏血浆膜结构,引发系统性毒性和免疫反应^[9]。

PEI 可以通过化学修饰来改善其性能、降低细胞毒性^[10-12]。将二油酰基磷脂酰乙醇胺(Dioleoyl phosphatidylethanolamine, DOPE)与低分子量 PEI 进行化学偶联,可提高 siRNA 的细胞内递送效率和基因沉默效果,同时维持较低的细胞毒性水平^[13-14]。此外,在 PEI 分子上接枝靶向配体(如叶酸、抗体、寡核苷酸等),可实现核酸药物向特定细胞的靶向递送^[15]。引入生物学可降解材料也是常用策略。例如,将壳聚糖^[16-17]、淀粉^[18]、葡聚糖^[19]等与 PEI 偶联,可显著改善 PEI 的生物降解性和生物相容性。Nicolle 等^[20]将解聚壳聚糖与 PEI 偶联后,用于 DNA 的递送,修饰后的载体表现出良好的生物相容性,并提高了基因表达效率、降低了 PEI 的细胞毒

性。Noga 等^[21]发现将羟乙基淀粉与低分子量 PEI 偶联后,显著降低了 PEI 的细胞毒性和溶血率。

化学修饰在一定程度上可以改善 PEI 的性能,但也会产生一些负面效果,如聚乙二醇(PEG)修饰可有效降低 PEI 的细胞毒性,但可能干扰其质子海绵效应,从而削弱内体逃逸能力^[22]。同样,壳聚糖或淀粉修饰虽能改善 PEI 的细胞毒性,可能影响 PEI 与核酸的结合稳定性,递送效率下降^[16-18]。寻找能在降低细胞毒性的同时维持或提升递送效率的修饰策略,对 PEI 在临床核酸药物递送中的应用具有重要意义,在脂质纳米颗粒中加入胆固醇(Cholesterol, Chol)和 DOPE 能改变纳米颗粒的静电作用、脂质自组装、堆积参数、粒径及表面电荷等性能^[23-24]。这种调控显著提升了脂质纳米颗粒的递送效率^[25]。

本文采用 DOPE 和 Chol 修饰分子量分别为 1.2 kDa 和 25.0 kDa 的 PEI 分子,修饰后的 PEI 与 DNA 按照不同氮磷比混合制备 PEI/DNA 纳米颗粒。通过动态光散射仪检测 PEI 分子量和氮磷比对纳米颗粒的理化性质的影响;利用 CCK-8 方法分析 PEI 分子量、脂质修饰和氮磷比对纳米颗粒转染人胚肾细胞(HEK 293T)细胞活力的影响;通过细胞转染和小动物活体成像系统分别评价 PEI 分子量和氮磷比对纳米颗粒体内外递送效率。研究旨在筛选出兼具低毒性与高转染效率的 PEI 纳米载体,为其在 DNA 疫苗等核酸药物递送中的应用提供实验依据和理论支持。

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 仪器

动态光散射仪(英国 Malvern Panalytical 公司)、IVIS 小动物活体成像系统(美国 Caliper Life Sciences 公司)、微流控双通道注射泵(南京晞迈纳米科技有限公司)、微流控芯片(江苏澎赞生物科技

有限公司)、二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司)、倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)、pH 计(江苏梅特勒-托利多科技)、倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)、小动物活体成像系统(美国 Caliper 公司)、酶标仪(浙江天能科技有限公司)和细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.1.2 试剂

分子量分别为 1.2 kDa 和 25.0 kDa 的聚乙烯亚胺和柠檬酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),DOPE(美国 MedChemExpress 生物科技公司),胆固醇(浙江赛诺佩生物医药有限公司),DMEM 培养基、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、青霉素、链霉素和胰酶(浙江浩克世纪生物科技股份有限公司),D-荧光素钠盐(上海翌圣生物科技股份有限公司),三溴乙醇(南京爱贝生物科技有限公司),50 kDa 超滤管(德国 Merk 公司)和 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒、Lipo8000™ 商业转染试剂和去内毒素质粒 pCMV-N-EGFP/pSV40Luc(上海碧云天生物科技股份有限公司)。

1.1.3 动物和细胞系

6 周龄雌性 BALB/c 小鼠(杭州杭斯生物科技股份有限公司)和 HEK 293T 细胞(浙江浩克世纪生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 PEI/DNA 纳米颗粒的制备

将分子量分别为 1.2 kDa 和 25.0 kDa 的 PEI 分别与 DOPE、Chol、无水乙醇按体积比 8.0:1.6:5.4:85.0 混合,制备经 DOPE、Chol 脂质修饰的 PEI 纳米颗粒,分别命名为 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol} 和 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol} 纳米载体;并制备未经 DOPE、Chol 脂质修饰的 PEI 纳米颗粒作为对照。将 PEI^{DOPE+Chol} 纳米载体和未经修饰的 PEI 纳米颗粒负载溶解于含 10 μg pCMV-N-EGFP 和 pSV40Luc 去内毒素质粒的 50 mmol/L 柠檬酸钠溶液中(pH 值 4.5),按体积比 1:1 通过微流控技术制备形成不同氮磷比(1、3、5、7、9)的纳米颗粒。

纳米颗粒用 PBS 缓冲液(pH 值 7.4)定容至 10 mL 后,转入 50 kDa 超滤管,在 4 °C 下以 12000 r/min 离心 15 min;重复离心操作,直到管内上层溶液体积浓缩至 1 mL。浓缩液根据 PEI 分子量、脂质修饰策略和所负载质粒类型分别命名为 1.2 kDa PEI/EGFP、25.0 kDa PEI/EGFP、1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP、25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP、1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 和 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 纳米

颗粒。上述超滤后的纳米颗粒统称为 PEI/DNA 纳米颗粒,全部制品均于 4 °C 保存,现配现用。

1.2.2 PEI/DNA 纳米颗粒理化性质测定

通过动态光散射仪检测分析 PEI 分子量,氮磷比对 PEI/DNA 纳米颗粒粒径大小和 Zeta 电位及分散度的影响。取 1 mL 超滤后的 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP、25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒溶液,置于 Y 形微量比色皿中,温度、散射角和工作电压分别设置为 25 °C、90°和 100 mV。

1.2.3 PEI/DNA 纳米颗粒对 HEK 293T 细胞活力的检测

采用 CCK-8 方法评价 PEI 分子量、脂质修饰策略和氮磷比对 PEI/DNA 纳米颗粒转染 HEK 293T 细胞活力的影响。将 HEK 293T 细胞接种到 96 孔板中,细胞密度为 8×10^3 个/孔,取超滤后不同氮磷比的 1.2 kDa PEI/EGFP、25.0 kDa PEI/EGFP、1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP、25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒溶液,分别转染 HEK 293T 细胞,每组 3 个复孔。

取 HEK 293T 细胞,弃去旧培养基,将各组纳米颗粒和阴性对照分别与完全 DMEM 培养基(含质量分数 10% FBS、质量分数 1% 青霉素和质量分数 1% 链霉素)按照 1:1 比例混匀;取 100 μL 分别加入设定孔中,将 96 孔板放回细胞培养箱,培养 24 h 后,吸去培养基,加入质量分数为 0.1 mg/mL 的 100 μL CCK-8 溶液;在细胞培养箱中孵育 1 h 后,取出 96 孔板,观察 96 孔板中溶液变色情况,使用酶标仪检测每个孔在 450 nm 波长下的吸光度值(OD)。细胞活力(Cell viability)计算公式如式(1)所示:

$$CV/\% = \frac{\Delta OD_1}{\Delta OD_2} \times 100 \quad (1)$$

其中:CV 为细胞活力, ΔOD_1 为实验组与不含细胞的 CCK-8 溶液组在 450 nm 处的吸光度差值; ΔOD_2 为对照组与不含细胞的 CCK-8 溶液组在 450 nm 处的吸光度差值。

1.2.4 PEI/DNA 纳米颗粒对 HEK 293T 细胞的转染效率检测

将 HEK 293T 细胞接种于 12 孔板,细胞密度为 2.5×10^5 个/孔,将超滤后不同氮磷比的 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP、25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒溶液,分别与完全 DMEM 培养基(含质量分数 10% FBS、质量分数 1% 青霉素和质量分数 1% 链霉素)按照 1:1 比例混匀,取 100 μL 分别

加入设定孔中,以加入等量 PBS 溶液的 HEK 293T 细胞为空白对照,商业转染试剂 Lipo8000™ 转染的 HEK 293T 细胞为阳性对照,每组 3 个复孔;转染 24 h 和 48 h 后,通过倒置荧光显微镜观察 EGFP 的表达情况。

1.2.5 PEI/DNA 纳米颗粒对小鼠的转染效率

通过小动物活体成像系统定量检测氮磷比为 5 时制备的 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc、25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 纳米颗粒在小鼠体内的转染效率。各取 50 μ L 纳米颗粒溶液大腿肌肉注射 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,以注射等量体积 PBS 溶液的 BALB/c 小鼠为空白对照组,每组 3 个重复;注射 72 h 后,使用三溴乙醇麻醉小鼠,并腹腔内注射质量分数为 15 mg/mL 的 200 μ L D-荧光素钠盐,处理 15 min,利用小动物活体成像系统检测小鼠体内 Luc 的表达情况,划定统一 ROI 进行荧光信号定量。

1.2.6 统计学分析

实验数据的分析和图表制作采用 GraphPad Prism9 软件进行。所有数据均使用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)的形式来表示 3 个重复的平均值,单因素多样本分析采用双因素方差分析(two-way ANOVA)来比较单组数据之间的差异,当 P 值小于 0.05 时,不同组之间存在统计学显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 PEI/DNA 纳米颗粒理化性质分析

2.1.1 PEI/DNA 纳米颗粒的粒径分析

为了解 PEI 分子量和氮磷比对 PEI 纳米颗粒理化性质的影响,以不同氮磷比将修饰后的 PEI 与 pCMV-N-EGFP 质粒混合纳米颗粒,并通过动态光散射仪检测纳米颗粒的粒径大小,结果如图 1 所示。图 1 表明:当氮磷比为 1 时,经 DOPE 和 Chol 修饰分子量为 25.0 kDa 的 PEI 与 pCMV-N-EGFP 质粒形成的纳米颗粒(25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒)的粒径最大,为 810 nm,大于 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒(粒径约 610 nm);当氮磷比为 3、5、7 和 9 时,纳米颗粒的粒径随氮磷比值的增加而增大,在氮磷比相同的条件下,2 种分子量不同的 PEI 与 pCMV-N-EGFP 质粒混合制备的纳米颗粒粒径大小相等;在氮磷比为 3 时,两种纳米颗粒的粒径最小,约 190 nm,氮磷比为 5 时的粒径增加至 200 nm,氮磷比为 7 时的粒径约为 300 nm 以及氮磷比为 9 时的粒径约 400 nm。综上所述,纳米颗粒粒径控制在约 200 nm 更有利于细胞摄取与

胞内分布的均匀性,能够减少胞吞效率差异或局部聚集现象,提高基因递送效率与转染稳定^[26]。

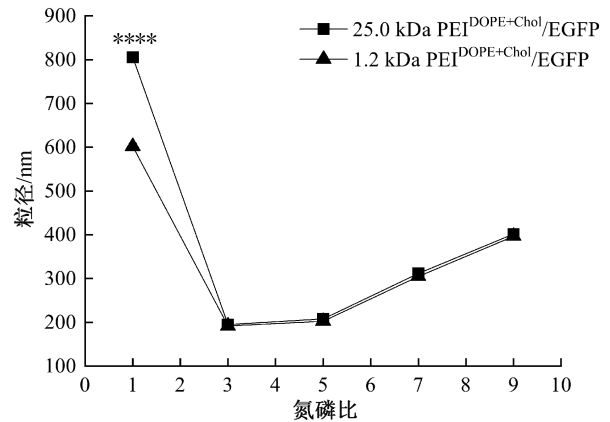


图 1 不同分子量 PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒在不同氮磷比下的粒径分布曲线

注: **** $P < 0.0001$ 。

2.1.2 PEI/DNA 纳米颗粒的表面 Zeta 电位分析

为了进一步了解制备的 PEI 纳米颗粒的表面电位,利用动态光散射仪检测其 Zeta 电位。结果如图 2 所示,随着氮磷比的增加,2 种纳米颗粒的 Zeta 电位逐渐升高,Zeta 电位由负值转为正值,表明更多阳离子的引入中和了 DNA 分子的负电荷,纳米颗粒表面逐渐呈正电性;在相同氮磷比条件下,25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒的 Zeta 电位高于 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒。这说明高分子量的 PEI 具有更稳定的复合结构与更强的细胞摄取潜力,其原因在于高分子量的 PEI 具有更高的阳离子密度和更强的 DNA 压缩能力,使其能够更有效地包裹 DNA 并形成带更多正电荷的复合物,在较高氮磷比条件下能更有效地与 DNA 结合并形成带正电的稳定纳米颗粒。

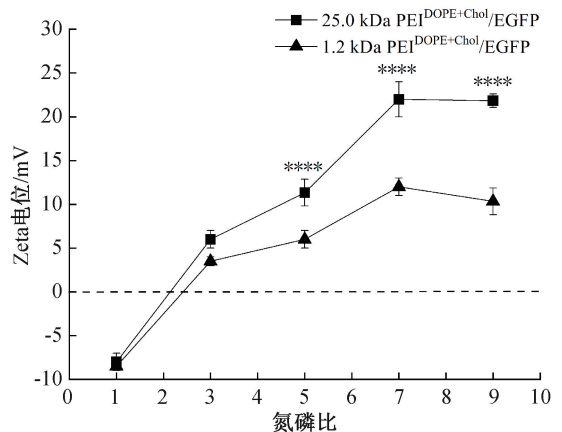


图 2 不同分子量 PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒在不同氮磷比下的 Zeta 电位分布曲线

注: **** $P < 0.0001$ 。

2.1.3 PEI/DNA 纳米颗粒的分散度分析

PEI 纳米颗粒的分散度如图 3 所示,2 种 PEI 形成的纳米颗粒在不同氮磷比下的分散度变化趋势基本一致,呈“U”字形变化。在氮磷比为 1、7 及 9 时,纳米颗粒分散度较高,表明此时纳米颗粒系统不均一,特别是在氮磷比为 1 时,25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 的分散度值接近 0.85,表明存在部分 DNA 未被完全包裹或颗粒聚集现象。此外,在氮磷比为 1 和 7 时,25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 的分散度显著高于 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP ($P < 0.0001$),这可能与 25.0 kDa PEI 具有更强的电荷密度相关。在氮磷比为 3 和 5 时,2 种纳米颗粒分散度较低。此时颗粒结构稳定,粒径均一,是形成稳定纳米颗粒的最佳条件区间。综上,氮磷比为 3 和 5 是构建粒径均一、稳定结构的 PEI/DNA 纳米颗粒的最优区间。同时,25 kDa PEI 制备的纳米颗粒具有更强的电荷密度,表现出较强的 DNA 压缩能力。

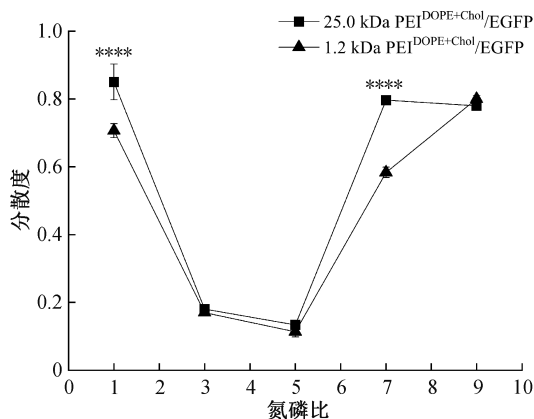
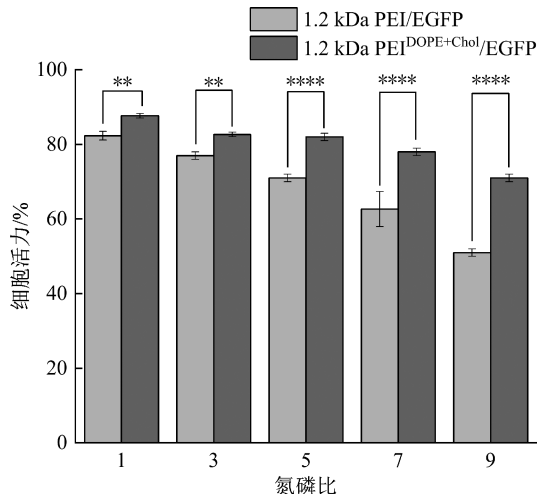


图 3 不同分子量 PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒在不同氮磷比下的分散度分布曲线

注:**** $P < 0.0001$ 。



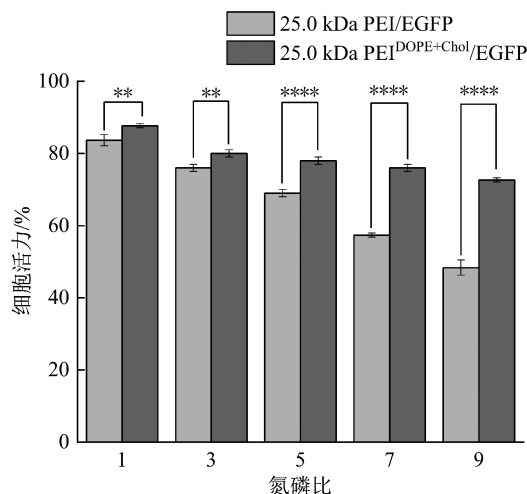
(a) 1.2 kDa PEI 纳米颗粒

2.2 PEI/DNA 纳米颗粒对 HEK 293T 细胞活力的影响

为了分析 PEI 分子量、脂质修饰和氮磷比对纳米颗粒转染 HEK 293T 细胞活力的影响。将上述制备的所有纳米颗粒分别转染 HEK 293T 细胞,以未修饰的 PEI 纳米颗粒为对照,利用 CCK-8 试剂盒对细胞活力进行测定。结果如图 4 所示,随着氮磷比的增加,2 种纳米颗粒的细胞活力均呈缓慢下降趋势,表明更多阳离子的引入造成了对细胞的损伤。在不同氮磷比下,两种不同分子量的纳米颗粒对细胞的活力影响未见明显变化。此外,与未经修饰的纳米颗粒相比,1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 和 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒处理细胞后的存活率明显增高,表明 DOPE 和 Chol 修饰可显著降低了 PEI/DNA 纳米颗粒的细胞毒性,提升细胞活力。PEI 细胞毒性的下降可能是 Chol 修饰改善了纳米颗粒的血液稳定性,从而抑制其在循环中的早期解离,阻碍 PEI 与细胞膜的直接接触,降低了 PEI 对细胞膜的损伤风险,进而降低了 PEI 的细胞毒性^[27-30];DOPE 的不饱和脂肪酸结构增强了纳米颗粒与细胞膜的融合能力,促进了内体逃逸并提高了内化效率,在一定程度上降低 PEI 的细胞毒性^[31]。

2.3 PEI/DNA 纳米颗粒对 HEK 293T 细胞的转染效率分析

为了分析 PEI 分子量和氮磷比对纳米颗粒转染效率的影响,通过荧光显微镜观察纳米颗粒在 HEK 293T 细胞中递送 pCMV-N-EGFP 质粒的表达情况。结果如图 5 所示,当氮磷比为 3 和 5 时,转染后 24 h 和 48 h 的细胞中可见明显的绿色荧光信号。



(b) 25.0 kDa PEI 纳米颗粒

图 4 不同分子量 PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒转染后 HEK 293T 细胞活力变化直方图

注:** $P < 0.01$;**** $P < 0.0001$ 。

在氮磷比为 5 时, 纳米颗粒转染细胞中的绿色荧光信号最强, 优于氮磷比为 3 时的纳米颗粒, 说明较高氮磷比有利于质粒表达。转染 48 h 后, 在 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 转染细胞中的绿色荧光信号明显比 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 转染细胞中的强, 表明高分子量 PEI 具有更强的转染效率。氮磷比为 1、7 和 9 制备的纳米颗粒处理细胞中均无任何荧光信号, 说明了这些纳米颗粒不能有效递送外

源 DNA 进入细胞, 这可能与这些纳米颗粒具有较大的粒径和分散度有关。综上, 当氮磷比为 5 时制备的 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒的递送效率最佳; 氮磷比为 3 的 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒次之; 以氮磷比为 3 和 5 制备的 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 也能有效递送外源 DNA 进入细胞, 在 48 h 的转染效率远远低于 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒。

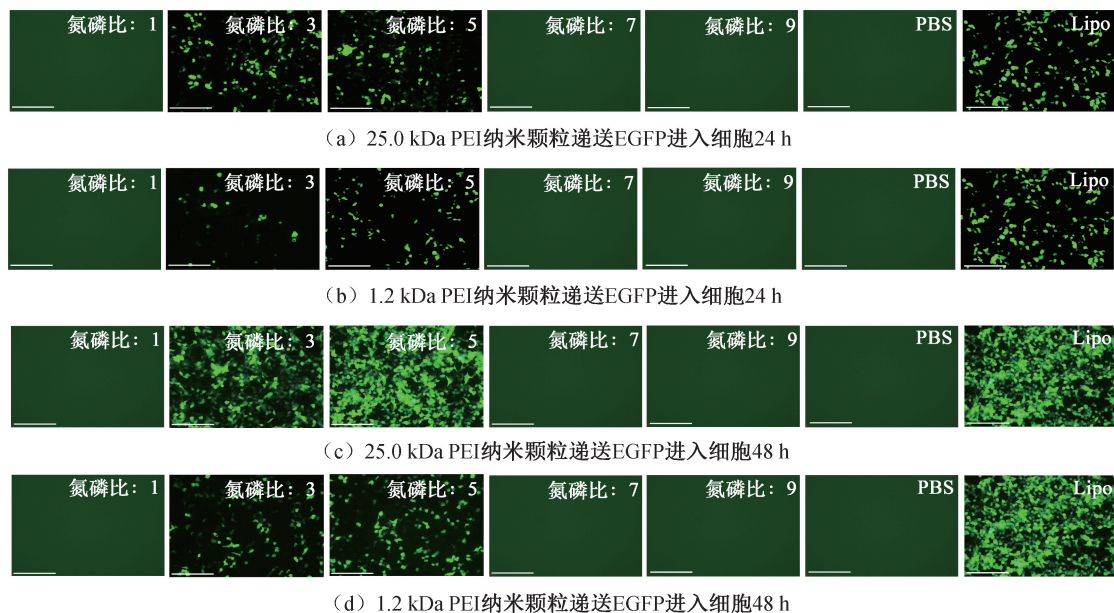


图 5 不同分子量 PEI^{DOPE+Chol}/EGFP 纳米颗粒递送 EGFP 在 HEK 293T 细胞中荧光表型图

注: PBS 表示磷酸缓冲液, 作为阴性对照; Lipo 表示 Lipo8000TM, 作为阳性对照; 白线标尺为 100 μm 。

2.4 PEI/DNA 纳米颗粒体内转染分析

为了在活体动物水平分析 PEI 分子量对纳米颗粒体内递送 DNA 的影响, 以氮磷比为 5 分别制备 1.2 kDa 和 25.0 kDa PEI 纳米颗粒, 并肌肉注射于小鼠体内。小鼠处理 72 h, 利用小动物活体成像系统观察 pSV40Luc 质粒的表达情况, 结果如图 6 所示。从图 6 可以看出: 与 PBS 对照组相比, 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 和 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 纳米颗粒均能成功将 pSV40Luc 质粒递送到小鼠体内并得到表达, 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 注射小鼠体内的平均荧光信号强高于 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 处理组; 在 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 纳米颗粒处理组中, 小鼠体内的平均荧光强度为 $0.2595 \times 10^5 \text{ p}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr})$, 比 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 处理组的平均荧光强度为 $0.2095 \times 10^5 \text{ p}/(\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sr})$ 提升约 20%, 高分子量 PEI 比低分子量 PEI 具备更强的 DNA 递送效率, 其原因可能是高分子量 PEI 具有较强的 DNA 压缩能力和更高的表面电荷, 增强了其与细胞膜的相互作用, 提升了体内递送效果^[32-33]。

3 结 论

本文采用 DOPE 和 Chol 修饰分子量分别为 1.2 kDa 和 25.0 kDa 的 PEI 为基础, 将修饰后的 PEI 与 DNA 按照不同的氮磷比进行混合, 制备 PEI/DNA 纳米颗粒。通过评估纳米颗粒的理化性质、转染效率和细胞毒性, 筛选得到了高效低毒的 PEI 纳米载体。主要结果如下:

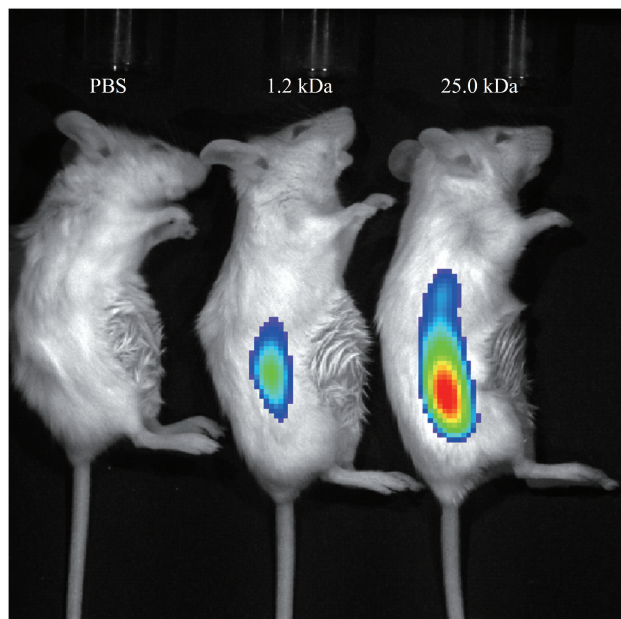
a) DOPE 和 Chol 修饰能显著降低 PEI 的细胞毒性, 显著提升 PEI/DNA 纳米颗粒在 HEK 293T 细胞中的细胞活力。

b) 当氮磷比为 3 和 5 时制备的 PEI/DNA 纳米颗粒具有理想的粒径 (190~200 nm)、适中的 Zeta 电位 (5~10 mV) 和较低的分散度 (0.1~0.2), 有利于细胞摄取和基因递送。

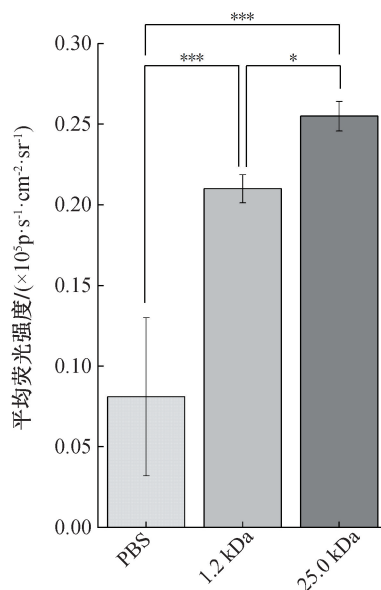
c) 当氮磷比为 5 时, 25.0 kDa PEI/DNA 纳米颗粒展现出最优的 DNA 递送效率。25.0 kDa PEI/DNA 纳米颗粒体外转染产生的绿色荧光信号明显强于 1.2 kDa PEI/DNA 纳米颗粒。在活体实

验中,25.0 kDa PEI/DNA 纳米颗粒在活体中转染产生的平均荧光强度比 1.2 kDa PEI/DNA 纳米颗

粒处理组提升约 20%。



(a) 活体成像图



(b) Luc在体内的表达柱状图

图6 不同分子量 PEI^{DOPE+Chol}/Luc 纳米颗粒递送 Luc 在小鼠活体中的表达

注: PBS 表示磷酸缓冲液,作为阴性对照;1.2kDa 表示 1.2 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 纳米颗粒, 25.0 kDa 表示 25.0 kDa PEI^{DOPE+Chol}/Luc 纳米颗粒; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

本文的研究结果表明,在氮磷比为 5 时,经 DOPE 和 Chol 修饰的 25.0 kDa PEI/DNA 纳米颗粒不仅显著降低了细胞毒性,同时实现了高效稳定的 DNA 递送,为利用 PEI 纳米载体进行 DNA 疫苗开发和应用研究奠定基础。但未来还需 PEI 纳米载体在 DNA 疫苗递送研究中的稳定性和免疫原性,进一步优化其在 DNA 疫苗递送中的实际应用效果。

参考文献:

- [1] Casper J, Schenk S H, Parhizkar E, et al. Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications [J]. *Journal of Controlled Release*, 2023, 362: 667-691.
- [2] Tan X, Jia F, Wang P, et al. Nucleic acid-based drug delivery strategies[J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 323: 240-252.
- [3] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [4] Pei D, Buyanova M. Overcoming endosomal entrapment in drug delivery[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2019, 30(2): 273-283.
- [5] Bai J H, Yu Q T, Wang Y W, et al. Polyethyleneimine-mediated assembly of DNA nanotubes for KRAS siRNA delivery in lung adenocarcinoma therapy [J]. *Journal of Materials*

Chemistry B, 2024, 12(26): 6442-6451.

- [6] Ahmadi Z, Jha D, Kumar B, et al. Bifunctionally engineered polyethylenimines as efficient DNA carriers and antibacterials against resistant pathogens [J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2018, 33(3): 363-379.
- [7] Clark S R, Lee K Y, Lee H, et al. Determining the effects of PEI adsorption on the permeability of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine/bis (monoacylglycerol) phosphate membranes under osmotic stress[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 65: 317-326.
- [8] Beyerle A, Irmeler M, Beckers J, et al. Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2010, 7 (3): 727-737.
- [9] Lee Y, Miyata K, Oba M, et al. Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: A technique for efficient and safe gene delivery [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 120(28): 5241-5244.
- [10] Wu P, Luo X, Wu H, et al. Combined hydrophobization of polyethylenimine with cholesterol and perfluorobutyrate improves siRNA delivery[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2020, 31(3): 698-707.
- [11] Parhiz H, Hashemi M, Hatefi A, et al. Arginine-rich hydrophobic polyethylenimine: Potent agent with simple components for nucleic acid delivery[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 60: 18-27.
- [12] Ma K, Hu M, Qi Y, et al. Structure-transfection activity relationships with glucocorticoid-polyethyl-amine conjugate

- nuclear gene delivery systems[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(22): 3780-3789.
- [13] Navarro G, Sawant R R, Biswas S, et al. P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells[J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(1): 65-78.
- [14] Navarro G, Sawant R R, Essex S, et al. Phospholipid-polyethylenimine conjugate-based micelle-like nanoparticles for siRNA delivery[J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2011, 1(1): 25-33.
- [15] Zhao Z, Ukidve A, Kim J, et al. Targeting strategies for tissue-specific drug delivery[J]. *Cell*, 2020, 181(1): 151-167.
- [16] Lee Y H, Park H I, Choi J S. Novel glycol chitosan-based polymeric gene carrier synthesized by a Michael addition reaction with low molecular weight polyethylenimine [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 137: 669-677.
- [17] Yue J, Wu J, Liu D, et al. BMP2 gene delivery to bone mesenchymal stem cell by chitosan-g-PEI nonviral vector[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2015, 10(1): 203.
- [18] Yamada H, Loretz B, Lehr C M. Design of starch-*graft*-PEI polymers: An effective and biodegradable gene delivery platform[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(5): 1753-1761.
- [19] Ochrimenko S, Vollrath A, Tauhardt L, et al. Dextran-graft-linear poly(ethylene imine)s for gene delivery: Importance of the linking strategy[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 113: 597-606.
- [20] Nicolle L, Casper J, Willmann M, et al. Development of covalent chitosan-polyethylenimine derivatives as gene delivery vehicle: Synthesis, characterization, and evaluation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 3828.
- [21] Noga M, Edinger D, Wagner E, et al. Characterization and compatibility of hydroxyethyl starch-polyethylenimine copolymers for DNA delivery[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2014, 25(9): 855-871.
- [22] Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. The polyethyleneglycol dilemma: Advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 36(6): 892-899.
- [23] Zuhorn I S, Oberle V, Visser W H, et al. Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 83(4): 2096-2108.
- [24] Dabkowska A P, Barlow D J, Hughes A V, et al. The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers[J]. *Journal of The Royal Society Interface*, 2012, 9(68): 548-561.
- [25] Jerzykiewicz J, Czogalla A. Polyethyleneimine-based lipopolyplexes as carriers in anticancer gene therapies[J]. *Materials*, 2022, 15(1): 179.
- [26] Afrouz M, Ahmadi-Nouraldinvand F, Amani A, et al. Preparation and characterization of magnetic PEG-PEI-PLA-PEI-PEG/Fe₃O₄-PCL/DNA micelles for gene delivery into MCF-7 cells [J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023, 79: 104016.
- [27] Eusébio D, Paul M, Biswas S, et al. Mannosylated polyethylenimine-cholesterol-based nanoparticles for targeted delivery of minicircle DNA vaccine against COVID-19 to antigen-presenting cells [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 654: 123959.
- [28] 胡立中, 李靖, 郁川, 等. 聚乙烯亚胺纳米基因递送系统的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(7): 853-858.
- [29] 邢浩宇, 孙洁芳, 董慧胜. 基因递送中阳离子脂质体结构对转染效率及细胞毒性的影响研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2024, 38(3): 220-231.
- [30] Bajaj A, Kondaiah P, Bhattacharya S. Synthesis and gene transfection efficacies of PEI-cholesterol-based lipopolymers [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2008, 19(8): 1640-1651.
- [31] Essex S, Navarro G, Sabhachandani P, et al. Phospholipid-modified PEI-based nanocarriers for in vivo siRNA therapeutics against multidrug-resistant tumors[J]. *Gene Therapy*, 2015, 22(3): 257-266.
- [32] Zare F, Kazemi M, Khalvati B, et al. Small library of prednisolone and budesonide conjugated low and high molecular weight polyethylenimine for delivery of plasmid DNA [J]. *BioNanoScience*, 2024, 15(1): 112.
- [33] Gao Y, Huang J Y, O'Keeffe Ahern J, et al. Highly branched poly(β -amino esters) for non-viral gene delivery: High transfection efficiency and low toxicity achieved by increasing molecular weight [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(11): 3640-3647.

团队介绍

金伟波教授团队专注于核酸药物的开发和递送研究,主要研究方向包括核酸药物的分子设计以及递送系统的开发和优化等。团队包括教授 1 名,副教授 1 名,讲师 1 名,硕士研究生 10 余名。金伟波,博士,教授,浙江理工大学“521 青年拔尖人才”,嘉兴市科技创新创业领军人才,浙江省生物化学与分子生物学学会理事。吴方丽,副教授,2008 年 6 月获西北农林科技大学微生物专业博士学位,2023 年 10 月—2024 年 10 月任英国伍斯特大学科学与环境学院访问学者。团队承担国家自然科学基金 4 项、浙江省自然科学基金项目 4 项、企业合作项目 5 项;发表 SCI 论文 30 余篇,获授权发明专利 13 项。团队建立了 RNA 药物的生物信息学设计分析平台和应用技术平台,近期在 RNA 纳米载体领域取得了突破性进展,开发了多种新型 RNA 纳米递送载体,并成功应用于动物疫苗、动物抗病毒以及植物病害防治领域,相关研究水平处于国际前列。

(责任编辑:张会巍)