

京尼平交联低聚乙烯亚胺智能基因载体的制备与表征*

董璇^{1,2} 田华雨¹ 陈杰¹ 夏加亮^{1,2} 陈学思^{1**} 危岩^{3**}

(¹中科院长春应用化学研究所 先进生态环境材料重点实验室 长春 130022)

(²中国科学院研究生院 北京 100039) (³清华大学理学院化学系 北京 100084)

摘 要 使用京尼平与分子量为 1800 的超支化低聚乙烯亚胺在 70% 的乙醇溶液中反应,合成了具有荧光的交联型聚合物.利用核磁、凝胶渗透色谱、粒度仪、zeta 电位仪和凝胶阻滞电泳对聚合物载体及其与 DNA 复合物颗粒进行了表征.研究表明,聚合物载体与 DNA 复合物颗粒粒径为 120 ~ 150 nm, zeta 电位为 +20 ~ 25 mV, 聚合物/DNA 在质量比为 0.25 时能够将 DNA 完全阻滞.通过 MTT 细胞毒性测试和体外荧光素酶质粒转染实验得出,载体在测试范围内显示了非常低的细胞毒性,最佳转染效率明显高于 PEI25k,同时载体可用于荧光标记.

关键词 京尼平, 低聚乙烯亚胺, 基因载体, 转染, 荧光

基因技术的发展使得基因缺陷导致的疾病或者癌症等的根治成为可能^[1-3].病毒类载体被广泛的应用于基因治疗中,但是病毒类载体存在着很大的免疫安全隐患,极大地限制了其发展.聚阳离子载体便宜易得,且不存在病毒类载体的安全隐患,日益成为基因载体领域的研究热点^[3].其中,聚乙烯亚胺(PEI)由于其独特的“质子海绵效应”,能够实现载体与 DNA 形成的复合物从内涵体中逃逸,引起科学学者的广泛关注^[4].作为金标准的 PEI25k ($M_n = 2.5 \times 10^4$ Da)虽然具有较高的转染效率,但细胞毒性大限制了其应用^[5-10].通过使用各种不同的交联剂将低分子量 PEI 进行选择性的交联得到的交联型 PEI 不仅保持了低分子量 PEI 的低毒性同时还获得了与 PEI25k 相似的转染效率^[11-15].

京尼平(Genipin)由于其极低的细胞毒性和基因毒性和优良的生物相容性,是一种新型、天然、天然的交联剂.因此,其在药物控释、骨组织修复以及组织工程支架等生物医用领域得到了广泛的应用^[16, 17].然而,在基因传递领域,有关京尼平的应用只有较少的报道^[18].利用京尼平交联低聚乙烯亚胺的合成及应用尚鲜见报道.因此,本文通过京尼平交联分子量为 1800 的超支化低聚乙烯亚胺,得到了一种新型具有荧光的阳离子聚合物,研究

了其作为非病毒基因载体应用的各项性能.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

超支化聚乙烯亚胺(PEI25k)(Sigma, $M_w = 2.5 \times 10^4$);支化低聚乙烯亚胺(OEI1800)(Alfa, $M_w = 1800$);京尼平(Genipin)(上海天放公司);透析袋(MWCO 3500,上海绿鸟公司);小牛胸腺 DNA(Promega 公司);4',6-二脒基-2-苯吡啶(DAPI, Sigma-Aldrich);噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司);BCA(二喹啉甲酸)法蛋白浓度检测试剂盒(Pierce 公司);酶标仪(ELISA microplate reader, Bio-rad 公司);乙醇溶剂为化学纯直接使用.

1.2 实验过程

1.2.1 京尼平交联低聚乙烯亚胺(GP)的合成

将 2.96 g OEI1800 (1.64 mmol)置于圆底烧瓶中,用 15 mL 70% 的乙醇溶解;另将 0.37 g (1.64 mmol)京尼平(Genipin)溶于 1.5 mL 70% 的乙醇中,将京尼平溶液加入到 OEI1800 的反应瓶中混合均匀,升温至 37℃ 搅拌反应 3 天.反应完毕后,在截留分子量为 3500 的透析袋中透析 3 天,用 G4 砂芯漏斗过滤溶液,将滤液冷冻干燥,得到蓝黑色目标产物京尼平交联低聚乙烯亚胺聚合物(GP),收率为 50%.

* 庆祝沈家骢院士 80 华诞专稿; 2011-04-18 收稿, 2011-06-08 修稿; 国家自然科学基金(基金号 50873102, 50733003, 21074129, 50903009 和 A3 项目 20921140264)、吉林省科技发展计划(项目号 20090128, 20096018)和科技部国际合作项目(项目号 2009AA03Z308)资助; ** 通讯联系人, E-mail: xschen@ciac.jl.cn; weiyen@tsinghua.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11121

1.2.2 测试方法

核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 用 Bruker AV400 NMR 核磁共振仪测试,以 D_2O 为溶剂. 凝胶渗透色谱 (GPC) 由 Waters 515 泵、1 根 $7.8 \times 300 \text{ mm}$ 线形柱、1 个 Wyatt 十八角激光光散射器和 1 个 OPTILAB DSP 折光指数检测仪组成. 流动相为 0.3 mol/L 醋酸钠 ($\text{pH} = 4.4$), 使用前用 $0.02 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,流速为 $0.5 \text{ mL/min}^{[19]}$.

1.2.3 凝胶阻滞电泳实验

配制 0.1 mg/mL 的质粒 DNA (pDNA, pEGFP-N1) 水溶液,加入等体积一定浓度的聚合物溶液,混合,涡旋,孵育 10 min 后,用 1% 的琼脂糖电泳分析.

1.2.4 复合物的粒径与表面电位表征

配制 0.05 mg/mL 的小牛胸腺 DNA 水溶液,复合物根据不同的阳离子聚合物/DNA 比例混合制备,涡旋后孵育 30 min ,粒径大小与表面电荷采用纳米粒度电位仪 (zeta plus, Brookhaven 公司, 美国) 进行测定.

1.2.5 细胞毒性测试

采用 MTT 方法进行表征.

HEK293 细胞按照 $1 \times 10^4 \text{ cell/孔}$ 的密度接种于 96 孔板中,置于 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 的孵箱,于含有 10% 新生牛血清 (FBS)、 $100 \mu\text{g/mL}$ 链霉素和 100 Unit/mL 青霉素的 DMEM 培养液中培养 24 h . 然后在每孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 不同浓度阳离子聚合物的磷酸盐缓冲液 (PBS),继续培养 24 h 后,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT (5 mg/mL) 的 PBS 溶液,继续培养 4 h ,小心弃去培养液,每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 二甲基亚砷 (DMSO),振荡 10 min ,用酶标仪测试每孔在 492 nm 波长下的吸收值. 细胞存活率 (%) = $(A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100\%$. A_{sample} 为与聚合物溶液作用的细胞样品孔的吸收, A_{control} 为未与聚合物溶液作用的细胞样品孔的吸收,每组实验重复 3 次.

1.2.6 细胞荧光素酶转染实验

转染前 24 h , HEK293 细胞按照 $1 \times 10^4 \text{ cell/}$

孔的密度接种于 96 孔板中,加入 DMEM 培养液在 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 的孵箱中培养 24 h 后使细胞汇合度达到 $80\% \sim 90\%$. 转染前,更新培养液,配制不同质量比的阳离子聚合物/DNA 复合物,室温下结合 30 min ,加入 96 孔板中. 继续培养 48 h ,小心弃去培养液,用 PBS 清洗 2 次,然后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 细胞裂解液. 使用荧光素酶分析系统 (Promega 公司) 测定荧光素酶活性的相对光单位 (relative light unit, RLU). 采用 BCA 法测定裂解液中的蛋白含量,转染效率采用荧光素酶活性的每毫克蛋白质的 RLU 表示.

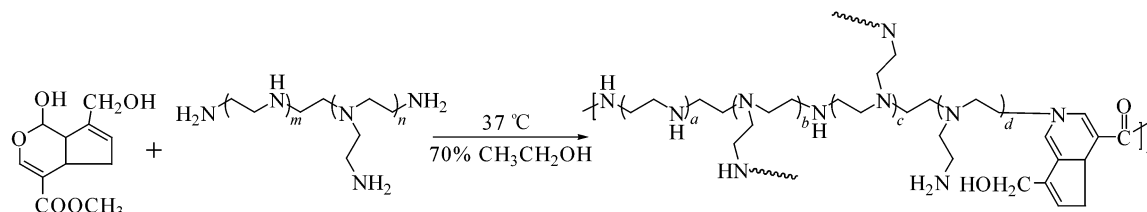
1.2.7 激光共聚焦实验

HEK293 细胞按照 $1 \times 10^5 \text{ cell/孔}$ 的密度接种于 6 孔板中的 11 mm 盖玻片上,在细胞汇合度达到 $70\% \sim 80\%$ 时进行转染,选荧光素酶质粒 DNA (pGL3 plasmid) 为报告基因,阳离子载体/DNA 复合物的质量比为 $20:1$. 在转染后 5 h 取出培养板,用 3.7% 多聚甲醛固定 10 min ,弃去上清液,用 PBS 洗 3 次. 每孔加入 $1 \mu\text{L}$ DAPI 溶液 ($1 \mu\text{g/mL}$) 标记细胞核 10 min ,使用激光共聚焦显微镜 (Leica, TCS SP2) 观察照相.

2 结果与讨论

2.1 载体合成及表征

聚合物 GP 的合成过程如示意图 1 所示. 京尼平和 OEI1800 都在 70% 乙醇中溶解很好,即使使用一个过大的反应浓度也不会出现一个黏稠的反应体系^[20,21],从而能够较精确地控制反应浓度,使交联产物的可重复性大大增强. 实验发现,通过控制乙醇的浓度可有效控制交联度,在 99% 乙醇中反应得到的交联聚合物在水中不溶解,而在 70% 乙醇中反应得到的聚合物在水中溶解性很好,可能是由于在高浓度的乙醇中反应得到交联产物中憎水性的京尼平含量增加降低了交联生成的聚阳离子在水中的溶解性. 另外,得到交联聚合物 GP 中含有大量的共轭结构,表现出了荧光



Scheme 1 Synthesis route of genipin crosslinked PEI (GP) copolymer

性,通过激光共聚焦显微镜观察也证实了这一点.

聚合物的结构通过 $^1\text{H-NMR}$ 的方法进行了表征.如图1所示,OEI1800结构的特征峰在 δ 2.4~3.5处;而在 δ 4.21(a)、7.73(b)、5.87(c)、5.71(d)出现的特征峰分别归属于京尼平的亚甲基峰以及杂环上质子峰,由此证明了京尼平交联 OEI1800 反应的发生.

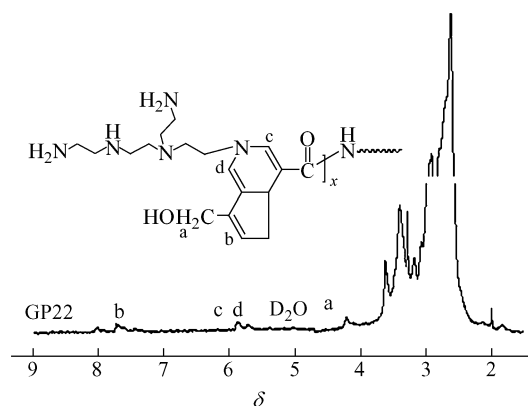


Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of GP22 in D_2O

通过 GPC-光散射方法测定产物绝对分子量及其分布的结果见表1.随着反应物(Genipin/OEI1800)投料摩尔比的减小,聚合物分子量变小;相对于 OEI1800 聚合物的分子量都显著增大,也证实了京尼平交联 OEI1800 反应发生.

Table 1 Preparation of GP copolymers

Sample	Feed molar ratio of Genipin/ OEI1800	M_w	PDI
GP21	2:1	75700	1.13
GP22	2:2	51100	1.09
GP23	2:3	40200	1.18

2.2 GP/DNA 复合物的粒径与表面电位

载体/DNA 复合物颗粒的粒径大小及表面电荷情况直接影响基因传递过程的稳定性以及细胞内吞效率^[20, 21].通过图2(a)表面电位结果并结合图2(b)粒径测试结果,可以得出,通过 Genipin 交联 OEI1800 反应得到较大分子量的 GP21、GP22 以及 GP23 都能够有效的包裹保护 DNA,形成 120~150 nm 复合物颗粒.表面电位随着载体/DNA 质量比增加,复合物颗粒的表面电荷由负变正并逐渐增大,最终稳定在 +20~25 mV. PEI25k 具有很强的 DNA 结合力,能够与 DNA 复合并压缩形成 120 nm 左右的表面带正电的颗粒.虽然 OEI1800 分子结构与 PEI25k 相同,但由于分子量偏低结合力弱,其与 DNA 复合并形成较大的颗粒

(280 nm 左右),表面电荷很小(+14 mV 左右).这一结果也体现了交联型阳离子的结合力较单纯的交联单元(OEI1800)提高了很多.

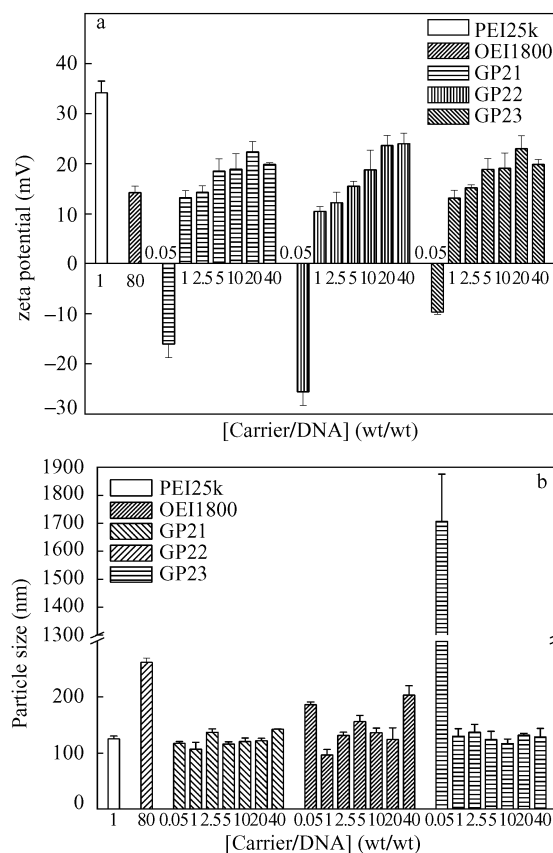


Fig. 2 (a) zeta potentials and (b) particle sizes of complexes of DNA and different carriers at various mass ratios

2.3 凝胶阻滞电泳

通过凝胶阻滞电泳实验进一步考察载体材料 GP 与 DNA 的结合能力.如图3所示,3种聚阳离子材料 GP21、GP22 和 GP23 都能够非常有效地完成对质粒 DNA 的电泳阻滞. PEI25k、GP21、GP22 和 GP23 的临界阻滞载体/DNA 质量比分别为 0.15、0.25、0.25 和 0.2, 聚阳离子材料 GP21、GP22 和 GP23 临界阻滞载体/DNA 质量比都比 PEI25k 稍高一点,可能是由于交联反应过程中伯胺参与反应,从而伯胺基团数量的减少导致电荷密度的降低,与 DNA 的结合能力减弱.

2.4 MTT 细胞毒性表征

图4为在不同聚合物浓度下的细胞存活率曲线.所有的 GP 共聚物(GP21、GP22 和 GP23)都表现出比 PEI25k 更低的细胞毒性,这与报道的此类载体性质一致^[22, 23].在浓度 < 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,所有 GP 共聚物都表现出较低的细胞毒性,细胞存活率

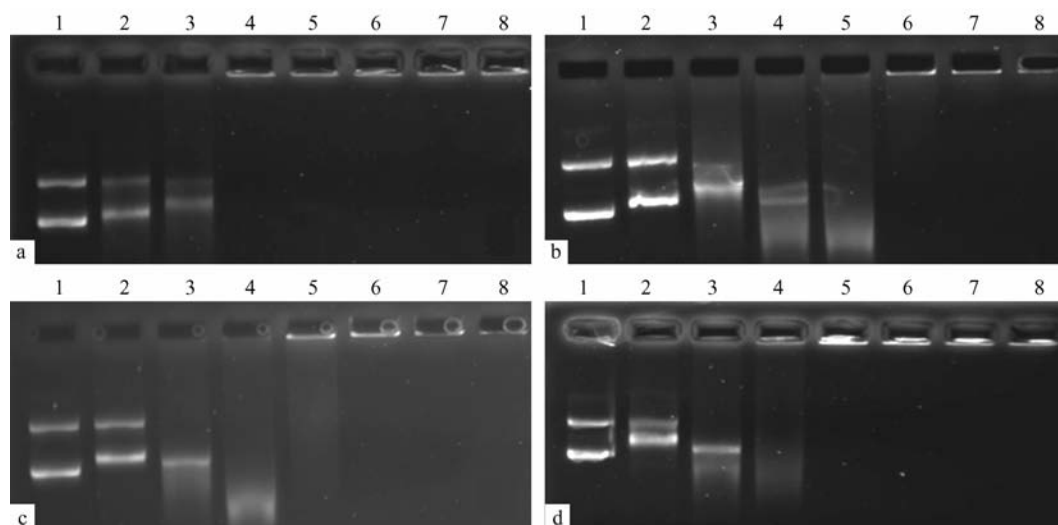


Fig. 3 Gel retardation assay of complexes at various mass ratios (a) PEI25k/pDNA, (b) GP21/pDNA, (c) GP22/pDNA, (d) GP23/pDNA; mass ratio of complex/DNA, 1 ~ 8; 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4

均大于 70%, 与 OEI1800 相当. 随着 GP 聚合物浓度的增加, 细胞毒性也随之相应增加, 这是因为交联的 GP 共聚物比 OEI 具有更高的阳离子密度.

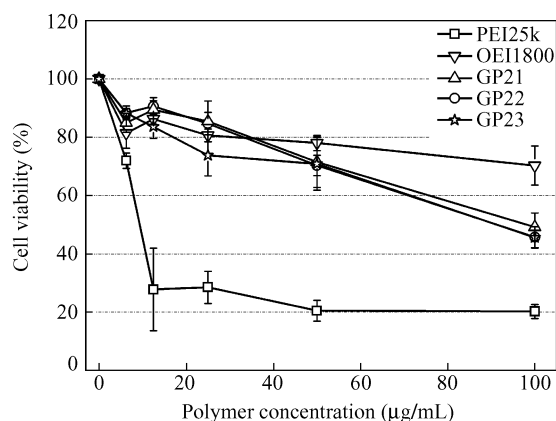


Fig. 4 The percentages of viable cells at various polymer concentrations for PEI25k, OEI1800, GP21, GP22, GP23

2.5 细胞荧光素酶转染

选用 pGL3 plasmid 作为报告基因进行细胞转染实验评价材料的性能. 用 HEK293 细胞系分别对 PEI25k、OEI1800 和载体 GP 进行转染性能比较. 如图 5 所示, 交联型基因载体 GP 与单纯 OEI1800 相比, 具有更高的转染效率. GP 聚合物的转染效率随着分子量的降低而升高. GP22 和 GP23 的最佳转染效率都高于 PEI25k, 其中, GP23/DNA 在其最佳转染质量比为 20:1 时的转染效率明显高于 PEI25k/DNA 最佳转染质量比为 1:1 的转染效率; GP21 的转染效率则略低于 PEI25k.

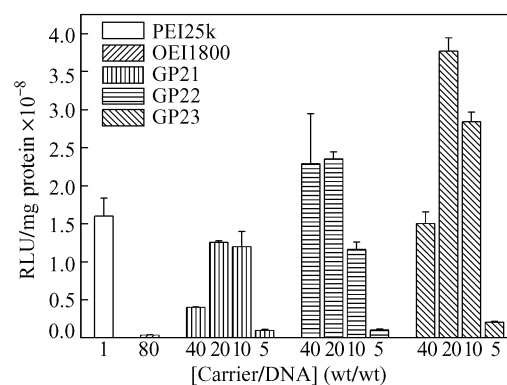


Fig. 5 Transfection efficiency of carrier/pDNA at various mass ratios in HEK293 cells

2.6 GP/DNA 复合物颗粒的细胞内吞

在前期定性以及定量实验中, GP 材料可以有效地介导 DNA 进入细胞转染, 获得了比较高的转染效率. 为了进一步证实 GP 共聚物介导 DNA 细胞传递的能力, 以 GP22 为代表, 利用激光共聚焦显微镜对其与 DNA 复合物颗粒进行了观察拍照. 图 6 即是 GP22/DNA 复合物颗粒在 HEK293 细胞转染 5 h 后分布情况结果. 图 6(b) 中箭头所示的白色(红色)区域为 GP22 自身发出的红色荧光, 图 6(a) 中箭头所示白色区域为 DAPI 染色(蓝色)的细胞核. 我们能清楚地看到明显的白色(红色)区域说明载体 GP22 可以发出红色荧光(图 6(b)). 通过图 6(c) 清楚地看到白色(红色)区域分布在细胞核(蓝色区域)的周围证实了聚阳离子载体 GP 能够携带 DNA 进行有效地胞内传递. 通过这些照片足以说明 GP 可以作为自发荧光载

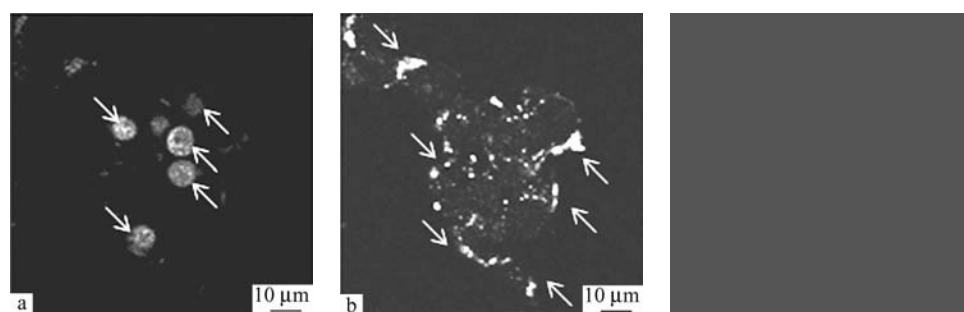


Fig. 6 Cellular distribution of GP22/pGL3 complexes in HEK293 cells at 5h post-transfection; cells were fixed with PFA and stained with DAPI to visualize the cell nuclei

体材料有效地介导质粒 DNA 进入细胞内并进行基因传递。

3 结论

通过京尼平交联低聚乙烯亚胺得到了一种新型具有红色荧光的交联型阳离子聚合物 GP。通过不同的京尼平/OEI 投料比,可以获得不同分子量

的 GP 共聚物。所获得 GP 共聚物都能够有效地结合 DNA,并进行基因传递,表现出与 PEI25k 相当的转染效率,却具有更低的细胞毒性。此外,其自身的红色荧光性能,使得其在基因传递过程中,易于进行荧光显微镜观察。因此,此类共聚物可作为自身荧光标记载体在基因传递领域将有良好的应用前景。

REFERENCES

- 1 Merdan T, Kopecek J, Kissel T. *Adv Drug Delivery Rev*, 2002, 54(5): 715 ~ 758
- 2 Olefsky J M. *Nature*, 2000, 408(6811): 420 ~ 421
- 3 Mintzer M A, Simanek E E. *Chem Rev*, 2009, 109(2): 259 ~ 302
- 4 Boussif O, Lezoualch F, Zanta M A, Mergny M D, Scherman D, Demeneix B, Behr J P. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, (92): 7297 ~ 7301
- 5 Tian H Y, Xiong W, Wei J Z, Wang Y, Chen X S, Jing X B, Zhu Q Y. *Biomaterials*, 2007, (28): 2899 ~ 2907
- 6 Chen J, Tian H Y, Guo Z P, Xia J L, Kano A, Maruyama A, Jing X B, Chen X S. *Macromol Biosci*, 2009, (9): 1247 ~ 1253
- 7 Tian H Y, Chen X S, Lin H, Deng C, Zhang P B, Wei Y. *Chem Eur J*, 2006, (12): 4305 ~ 4312
- 8 Xia J L, Chen L, Chen J, Tian H Y, Li F F, Zhu X J, Li G, Chen X S. *Macromol Biosci*, 2011, (11): 211 ~ 218
- 9 Tian H Y, Deng C, Lin H, Sun J R, Deng M X, Chen X S. *Biomaterials*, 2005, (26): 4209 ~ 4217
- 10 Pei Yuanyuan(裴媛媛), Wang Weiwei(王伟伟), Liu Xianguo(刘先国), Shuai Xintao(帅心涛). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (1): 79 ~ 86
- 11 Jere D, Xu C X, Arote R, Yun C H, Cho M H, Cho C S. *Biomaterials*, 2008, (29): 2535 ~ 2547
- 12 Ahn C H, Chae S Y, Bae Y H, Kim S W. *J Controlled Release*, 2002, (80): 273 ~ 282
- 13 Chen Lei(陈磊), Tian Huayu(田华雨), Chen Xuesi(陈学思), Park Taegwan(朴泰宽), Maruyama Atsushi(丸山厚), Jing Xiabin(景遐斌). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (6): 499 ~ 505
- 14 Fu Huili(付慧莉), Cheng Sixue(程巳雪), Zhuo Renxi(卓仁禧). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (2): 97 ~ 103
- 15 Dong X, Tian H Y, Chen L, Chen J, Chen X S. *J Controlled Release*, 2011, (152): 135 ~ 142
- 16 Chiono V, Pulieri E, Vozzi G, Ciardelli G, Ahluwalia A, Giusti P. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, (19): 889 ~ 898
- 17 Muzzarelli R A A. *Carbohydr Polym*, 2009, (77): 1 ~ 9
- 18 Choi D H, Park C H, Kim I H, Chun H J, Park K, Han D K. *J Controlled Release*, 2010, (147): 193 ~ 201
- 19 Jiang X L, van der Horst A, van Steenberg M J, Akeroyd N, van Nostrum C F, Schoenmakers P J, Hennink W E. *Pharm Res*, 2006, (23): 595 ~ 603
- 20 Forrest M L, Koerber J T, Pack D W. *Bioconjugate Chem*, 2003, (14): 934 ~ 940
- 21 Christensen L V, Chang C W, Kim W J, Kim S W. *Bioconjugate Chem*, 2006, (17): 1233 ~ 1240
- 22 Guo Zhaopei(郭兆培), Tian Huayu(田华雨), Xia Jialiang(夏加亮), Chen Jie(陈杰), Lin Lin(林琳), Chen Xuesi(陈学思). *Science China Chemistry(中国科学:化学)*, 2010, 53(12): 2490 ~ 2496
- 23 Yuan Renxu(苑仁旭), Zuo Yufang(左瑜芳), Xiao Zhongpeng(肖中鹏), Huang Wenlin(黄文林), Shuai Xintao(帅心涛). *Acta*

Polymerica Sinica(高分子学报),2009,(2):104~110

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF GENIPIN CROSS-LINKED OLIGOETHYLENIMINE FOR GENE DELIVERY

DONG Xuan^{1,2}, TIAN Huayu¹, CHEN Jie¹, XIA Jialiang^{1,2}, CHEN Xuesi¹, WEI Yen³

(¹ Key Laboratory of Advanced Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039) (³ Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract A novel fluorescent cationic polymer, genipin cross-linked branched oligoethylenimine (1800 Da, OEI1800), GP, was successfully synthesized in 70% ethanol solution and evaluated as a non-viral gene carrier. The copolymers were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) and gel permeation chromatography (GPC). The complexes of copolymers/DNA based on GP were measured by dynamic light scattering and Zeta potential instrument. The results showed that the synthesized copolymers could efficiently condense DNA into nanosized particles (120 ~ 150 nm) with positive surface charges (+20 ~ 25 mV). The DNA-binding ability of the copolymers was further examined by gel retardation assay. When the mass ratio of polymer and DNA was 0.25, the plasmids were fully retarded in 1% agarose gel by gel retardation electrophoresis. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity and transfection efficiency of the GP copolymers were respectively tested by the MTT and luciferase assay, using OEI1800 and PEI25k as the control in the HEK293 cells lines. The cell toxicity and gene transfection evaluations showed that the copolymers exhibited lower cytotoxicity and higher gene transfection efficiency than PEI25k in the HEK293 cell lines. Finally, the carriers could be used as the fluorescent labeling materials. Therefore, the copolymers may have potential biomedical application as non-viral gene carriers.

Keywords Genipin, Oligoethylenimine, Transfection, Gene carrier, Fluorescence