

侧链含咪唑取代基聚(L-天冬酰胺)高效基因载体研究*

薛亚楠¹ 张 敏¹ 刘 磊¹ 李文鑫² 黄世文^{1**}

(¹ 武汉大学化学与分子科学学院 生物医用高分子材料教育部重点实验室 武汉 430072)

(² 武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘 要 通过氨基引发聚丁二酰亚胺(PSI)开环反应,制备了系列侧链含氨乙基和咪唑丙基的聚(L-天冬酰胺)共聚物(P1~P5)。该系列聚合物不仅具有极低的细胞毒性,而且随侧链中咪唑取代基含量的增加,聚合物在 pH 5~8 范围内缓冲能力显著提高。通过凝胶电泳、粒径和电位分析等研究了聚合物与质粒 DNA 的相互作用。结果表明,所有聚合物均可以在较低 N/P 比有效结合 DNA。在 N/P 比高于 5 时,形成粒径在 100 nm 以下、表面电荷为 +20 mV 左右的稳定复合物纳米粒子。聚合物介导荧光素酶基因(pGL-3)和增强型绿色荧光蛋白基因(pEGFP-C1)体外转染 293T 细胞和 COS-7 细胞的结果表明,侧链中引入咪唑取代基显著提高了聚合物的转染能力。通过优化侧链氨基/咪唑取代基比例,获得转染效率最高的聚合物 P4。P4 介导 pGL-3 和 pEGFP-C1 在细胞中的表达与聚乙烯亚胺(PEI)相当,甚至是 PEI 的 2~3 倍。

关键词 基因传递, 聚阳离子, 聚(L-天冬酰胺), 咪唑, 低毒

外源基因在体内不够稳定,易被机体血浆或组织细胞中各种补体(complement)以及各种酶破坏而发生降解。同时,功能基因的大尺寸和自身所带的负电荷抑制细胞摄取。通常需要载体有效缩合外源基因形成紧密纳米粒子用于基因输送,从而在基因传递的过程中保持其完整性^[1]。病毒载体的基因输送效率通常较高,但它在临床应用中有安全隐患。非病毒载体引起人们的广泛研究兴趣。聚阳离子作为非病毒基因载体具有很多优点,它不仅避免了病毒载体的安全隐患^[2],而且制备相对简单,分子结构易于调控,通过改变化学组成和引入多功能配体可以提高高分子载体的性能,有效克服基因传递过程中的细胞外、细胞内屏障,提高转染效率和实现靶向性输送^[3]。高分子基因载体已经成为近年来备受瞩目的研究热点。

聚阳离子中的氨基在生理 pH 下会发生质子化,带正电荷的铵离子可以与 DNA 分子中带负电荷的磷酸根离子通过静电相互作用发生电性中和。通过聚阳离子与 DNA 的静电组装,形成粒径为 50~500 nm、表面带有正电荷的稳定聚电解质复合物。DNA 分子由伸展结构压缩为体积相对较小的粒子,可以防止大尺寸粒子在短时间内沉淀

的发生^[2]。通常情况下,DNA 被聚合物的正电荷外壳包裹,不仅在体循环中保护 DNA 不受机体血浆或组织、细胞中各种补体以及酶的破坏,而且在进入靶细胞后,DNA 在细胞内转运的过程中保持 DNA 的完整性^[4]。同时,聚阳离子/DNA 复合物纳米粒子表面的正电荷与细胞表面的负电荷相互作用,有利于 DNA 被细胞摄取,提高转染效率^[5]。

高转染效率和良好的生物相容性是聚阳离子作为基因载体的基本要求,也是目前限制聚阳离子在基因治疗中应用的主要瓶颈。高分子量支化聚乙烯亚胺(*b*PEI, M_w 25 kDa)是目前合成聚阳离子中最有效的载体之一,在许多细胞中均表现高的转染能力,成为人们评价新型聚合物基因载体的重要参照标准。*b*PEI 的高电荷密度及其在生理 pH 范围内的高缓冲能力,是其具有高效转染能力的重要原因。然而,高分子量 *b*PEI 的不可降解性和高毒性限制了它在体内的应用^[6]。利用可降解交联剂交联低分子量 PEI,可以部分解决 PEI 的毒性和不可降解性问题^[7]。

基于已被广泛接受的质子泵假说^[8~10],在聚阳离子分子中引入在 pH 5~7 范围内具有高缓冲能力的取代基是目前设计高效聚阳离子基因载体

* 庆祝卓仁禧院士 80 华诞专稿; 2011-04-15 收稿, 2011-05-04 修稿; 国家自然科学基金(基金号 20874076, 21074101)、国家重大科学研究计划(项目号 2009CB930300)、教育部新世纪优秀人才支持计划(项目号 08-0410)和中国博士后科学基金(基金号 20100471143)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: sw Huang@whu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11114

的重要方法.聚(L-天冬酰胺)是一种具有良好生物相容性的水溶性聚氨基酸衍生物.通过聚丁二酰亚胺(PSI)的开环反应,可以在聚(L-天冬酰胺)的侧链上引入不同的侧链基团,如羟基、羧基、氨基等.由于其低毒性、无免疫原性及结构易修饰等优点,聚(L-天冬酰胺)已被广泛应用于大分子前药(prodrug)的合成、聚合物胶束的前体以及蛋白质与基因的输送等^[11~15].我们先前的工作证实,在聚(L-天冬酰胺)的侧链引入短链聚乙烯亚胺低聚体,得到的聚阳离子体外输送外源基因的效率和bPEI 25 kDa相当,细胞毒性低于bPEI 25 kDa,但是依然表现出明显的细胞毒性^[15].本文通过氨基引发PSI的开环反应,将氨基和咪唑丙基同时引入到聚(L-天冬酰胺)的侧链中,制备新型的聚阳离子基因载体.聚合物侧链中氨基的存在可以有效结合DNA,咪唑基团在弱酸性条件下的高缓冲性能有助于聚阳离子/DNA复合物从内涵体逃逸,从而获得高效的基因载体.细胞毒性测试发现,侧链含伯氨基和咪唑取代基的聚(L-天冬酰胺)对细胞表现极低的毒性.本文还评价了具有不同侧链组成的聚(L-天冬酰胺)衍生物的缓冲能力、细胞毒性、结合DNA的能力以及介导外源DNA在不同细胞系中的转染能力,研究聚合物组成与转染能力之间的相互关系.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1-(3-氨丙基)咪唑(API,99%)、支化聚乙烯亚胺(bPEI, M_w 25 kDa)和噻唑蓝(MTT)购自Sigma-Aldrich公司.聚丁二酰亚胺(PSI)由L-天冬氨酸在磷酸催化下热聚合制备^[16].N-叔丁氧羰基-1,2-乙二胺(N-Boc-EDA)由二碳酸二叔丁酯和乙二胺制备^[17].GelRed™染料(Biotium)、DMEM培养基干粉(Gibco BRL)、胎牛血清(Hyclone)、青霉素-链霉素(吉诺生物)、荧光素酶检测试剂盒(Promega)、二辛可宁酸(BCA)蛋白测定试剂盒(Pierce)直接使用.人类胚胎肾细胞(293T)和非洲绿猴肾细胞(COS-7)购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学).使用添加10%胎牛血清、4 mmol/L L-谷氨酰胺、100 μg/mL链霉素和100单位/mL青霉素的DMEM培养基在5% CO₂的培养箱中37℃培养.

FTIR由Perkin-Elmer-2红外光谱仪测定.¹H-

NMR由Mercury VX-300型核磁共振波谱仪在300 MHz下测定,D₂O为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标.聚合物的分子量和分散度由尺寸排除色谱和多角度激光光散射联用分析系统(SEC-MALLS)测定.其中尺寸排除色谱使用Waters-2690D HPLC装备Ultrasphere 120和250柱,流动相为NaAc-HAc缓冲溶液(0.3 mol/L, pH 4.6),流速为0.6 mL/min,柱温为25℃.检测器为Wyatt DAWN DSP多角度光散射检测仪和Waters 2410示差折光检测器.

1.2 质粒DNA的分离和纯化

编码荧光素酶的质粒pGL-3和编码增强型绿色荧光蛋白的质粒pEGFP-C1分别在大肠杆菌JM109和DH5α中转化.两种细菌分别在LB(Luria-Bertani)培养基中于37℃、250 r/min的培养箱中过夜扩增.使用QIAGEN EndoFree plasmid Giga试剂盒,按照厂家说明分离、纯化质粒.利用琼脂糖凝胶电泳表征质粒,利用260 nm和280 nm的紫外吸收确定质粒的纯度和浓度.然后将纯化后的质粒溶解在TE缓冲溶液中,于-20℃保存.

1.3 聚合物的合成

1.3.1 PAEA(P1)、PIPA(P5)的合成

α,β-聚(2-氨基-L-天冬酰胺)(PAEA, P1)与α,β-聚(2-咪唑丙基-L-天冬酰胺)(PIPA, P5)的合成方法如下:冰浴(0~5℃)下,将两份PSI(0.485 g, 5 mmol)的10 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液分别缓慢滴加至剧烈搅拌的Boc-EDA(4.0 g, 25 mmol)或API(3.12 g, 25 mmol)的5 mL DMF溶液中.反应混合物经低温反应2 h,室温反应24 h后,于无水乙醚中沉降纯化.所得固体加入到50 mL 2 mol/L盐酸中,室温搅拌4 h,然后在超纯水中透析3天(MWCO 3500, Pierce),透析液冷冻干燥后得白色粉末. P1: 0.942 g,产率72.9%. FTIR (KBr, cm⁻¹): 3446, 2948, 1642, 1561, 1446, 1122, 1089, 840, 622. ¹H-NMR (D₂O, δ): 2.5~2.9 (2H, d, CHC H₂CO); 3.1 (2H, m, CH₂CH₂NH₃⁺); 3.5 (2H, m, CH₂CH₂NH₃⁺); 4.7 (1H, m, CHCH₂CO). $M_w = 7.98 \times 10^3$, $M_w/M_n = 1.35$. P5: 0.700 g,产率72.4%. FTIR (KBr, cm⁻¹): 3445, 2952, 1645, 1549, 1442, 1109, 1086, 840, 624. ¹H-NMR (D₂O, δ): 1.9 (2H, m, CH₂CH₂CH₂NH₃⁺); 2.5~2.9 (2H, d, CHCH₂CO); 3.0 (2H, m,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+$); 4.0 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+$); 4.6 (1H, m, CHCH_2CO); 7.1 ~ 7.2 (2H, d, $\text{CH}=\text{CH}$); 7.9 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}$). $M_w = 3.90 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1.54$.

1.3.2 P2 ~ P4 的合成

侧链含氨乙基和咪唑丙基的聚(L-天冬酰胺)共聚物(P2 ~ P4)的合成分两步进行. 首先, 冰浴(0 ~ 5℃)下, 将 Boc-EDA 的 2 mL DMF 溶液, 缓慢滴加至 PSI 的 5 mL DMF 溶液中. 低温反应 2 h, 室温反应 24 h. 然后, 冰浴下, 将 API 的 5 mL DMF 溶液缓慢滴加至上述反应液中. 反应混合物经低温反应 2 h, 室温反应 24 h 后, 于无水乙醚中沉降纯化. 所得固体分别加入到 50 mL 2 mol/L 盐酸中, 室温搅拌 4 h, 然后在超纯水中透析 (MWCO 3500, Pierce), 透析液冷冻干燥后得白色粉末. 含不同接枝比例的聚合物的投料量、产率及分子量详见表 1, 核磁详见图 2. FTIR (KBr, cm^{-1}): P2, 3438, 2949, 1643, 1553, 1441, 1115, 1087, 841, 623. P3, 3440, 2955, 1645, 1549, 1442, 1113, 1085, 840, 622. P4, 3446, 2948, 1645, 1546, 1438, 1108, 1087, 840, 624.

1.4 细胞毒性的测定

以 bPEI (M_w 25 kDa) 为参照, 使用 MTT 法考察聚合物 P1 ~ P5 对 293T 和 COS-7 细胞的毒性. 将 293T 细胞以 7 000/孔、COS-7 细胞以 4 000 细胞/孔 (100 μL /孔) 的密度种到 96 孔板中, 并在 5% CO_2 培养箱中于 37℃ 培养 1 天. 将聚合物溶于完全 DMEM 培养基中, 过滤灭菌, 并用培养基稀释成不同浓度的聚合物溶液. 各取 100 μL 加入预先种有细胞的 96 孔板中 (对照组不加聚合物溶液, 加入 100 μL 培养基), 继续在 37℃ 下培养 24 h. 然后在每孔加入 20 μL MTT 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 (BPS, 5 mg/mL) (作为背景的孔中只加入 20 μL PBS 缓冲液). 于 37℃ 培养 4 h 后, 移去培养基, 各加入 150 μL DMSO 并在室温下轻柔振荡至细胞中甲瓚蓝紫色晶体完全溶解. 用酶标仪 (Bio-Rad 550) 测定 570 nm 各孔内溶液的吸光值. 根据与对照孔吸光值的比值计算细胞相对存活率 (relative cell viability), 公式如下: $\text{Relative cell viability} (\%) = 100 \times (A_{\text{test}} - A_0) / (A_{\text{control}} - A_0)$. 其中, A 是每孔在 570 nm 处的吸光值, A_0 是未加聚合物和 MTT 的孔的背景值, A_{control} 是未加聚合物的孔的对照值, A_{test} 是含不同浓度聚合物的孔的实验值. 以聚合物浓度为横坐标 (X 轴),

细胞相对存活率为纵坐标 (Y 轴) 绘制曲线图. 每个聚合物溶液浓度及对照组做 4 个平行样.

1.5 酸碱滴定

聚合物的缓冲能力通过酸碱滴定测试. 将一定量的聚合物溶解在 10 mL 0.15 mol/L 的氯化钠溶液中, 配制成总氨基浓度为 10 mmol/L 的溶液. 测试前用 2 mol/L 盐酸将 pH 调至 2.5. 向聚合物溶液中滴加 0.1 mol/L 的标准氢氧化钠溶液, 使用 pH 计 (PB-10, Sartorius) 测定 pH 值. 以 pH 值对加入的氢氧化钠量作图得滴定曲线. bPEI (M_w 25 kDa) 作为参照, 亦在相同条件下进行测定.

1.6 聚阳离子/DNA 复合物的制备与表征

1.6.1 复合物的制备

按照一定的总氨基与磷酸根之比 (N/P), 将 50 μL 含有一定量聚合物的氯化钠溶液 (0.15 mol/L) 快速加入到 50 μL 含有 1 μg DNA (pGL-3 或 pEGFP-C1) 的氯化钠溶液 (0.15 mol/L) 中, 震荡 5 s, 在室温下静置 30 min 后, 用于凝胶电泳、测定复合物的粒径及 zeta 电位或细胞转染等实验.

1.6.2 凝胶电泳

在含有 0.01% GelRed (V/V) 染料的 7 g/L 琼脂糖凝胶中, 加入由聚合物和 DNA 按不同比例混合形成的复合物进行电泳实验, N/P 比分别为 0:1、1:1、2:1、5:1、10:1 和 20:1. TAE (tris-acetate-EDTA, pH 8) 为工作液, 电泳条件为 80 V、60 min. 使用凝胶成像仪 (Vilber Lourmat), 通过紫外照射成像观察 DNA 在凝胶上的迁移.

1.6.3 复合物粒径及表面电荷的测定

复合物的粒径与表面电荷由动态光散射 (DLS) 测定. 使用纳米粒度和 zeta 电位分析仪 (zetasizer Nano ZS, Malvern), 在 25℃, 波长为 633 nm 的氦-氖激光光源下进行测定. 将含有 1 μg DNA 的不同 N/P 比的复合物溶液稀释到 1 mL 后, 用于粒径和 zeta 电位的测定.

1.7 聚合物介导外源 DNA 体外转染细胞

1.7.1 体外转染细胞的一般过程

将 293T 和 COS-7 细胞分别以 80000 细胞/孔和 40000 细胞/孔的密度接种至 24 孔细胞培养板中, 用完全 DMEM 培养基 (1 mL/孔) 在 5% CO_2 培养箱中 37℃ 培养 24 h. 转染前移去培养基, 用温热的 PBS 7.4 缓冲液洗涤后, 换用 0.9 mL 新鲜的无血清 DMEM 培养基. 将 100 μL 含有 1 μg DNA 的不同 N/P 比的复合物溶液加入换液后的

细胞中. 于 37℃ 培养 4 h 后, 将培养基换成 1 mL 新鲜的完全 DMEM 培养基, 继续培养 44 h. 细胞的转染实验均做 2 个平行样本, 每个转染实验最少进行两次.

1.7.2 荧光素酶的检测

对于使用 pGL-3 质粒 DNA 转染的细胞, 转染 48 h 后, 移去培养基, 用温热 PBS 7.4 缓冲液轻轻润洗细胞. 每孔加入 200 μL 裂解液 (Promega), 冻融两次以充分裂解细胞. 离心后, 取 20 μL 上清液与 100 μL 荧光素酶测试底物 (Promega) 充分混合, 使用 Lumat LB 9507 化学发光仪 (Berthold) 测定在细胞中表达的荧光素酶活性, 记录时间 10 s. 使用 BCA 蛋白测定试剂盒 (Pierce) 测定细胞的总蛋白含量. 用酶标仪 (Bio-Rad 550) 测定 570 nm 处溶液的吸光值. 细胞中表达的荧光素酶活性用 RLU/mg protein 表示.

1.7.3 绿色荧光蛋白表达

对于使用 pEGFP-C1 质粒 DNA 转染的细胞, 转染 48 h 后直接在荧光倒置显微镜 (Eclipse TE2000-E, Nikon) 下观察表达绿色荧光蛋白的细胞.

2 结果与讨论

2.1 聚合物的合成与结构表征

侧链含氨基和咪唑丙基的聚(L-天冬酰胺)衍生物的合成路线如图 1 所示. 通过氨基引发 PSI 开环反应制备聚(L-天冬酰胺)的接枝聚合物. PSI 首先与 Boc-EDA 按一定的比例反应, 然后与过量的 API 反应以保证 PSI 充分开环, 最后在稀盐酸的作用下脱 Boc 保护基, 得到侧链含氨基和咪唑丙基的聚(L-天冬酰胺)共聚物的盐酸盐. 控制 Boc-EDA 与 PSI 的投料比, 可以得到不同侧链比例的共聚物. 单保护乙二醇胺的使用可以有效避免交联反应的发生. PSI 与过量的 Boc-EDA 或 API 反应, 分别得到侧链为氨基的聚(L-天冬酰胺) (PAEA) 或侧链为咪唑丙基的聚(L-天冬酰胺) (PIPA).

聚合物的分子量采用尺寸排除色谱 (SEC) 和多角度激光光散射 (MALLS) 联用 (SEC-MALLS) 的方法测定. 测试结果 (表 1) 表明, 我们所得到的聚合物分子量均呈单峰分布, 具有较窄的分子量分布, 多分散指数 (PDI) 在 1.35 ~ 1.89 之间.

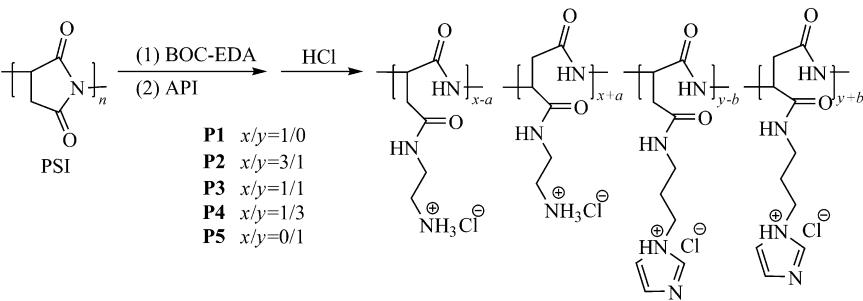


Fig. 1 Synthesis scheme of polymers

Table 1 Synthesis and properties of P1 ~ P5

Code	P1	P2	P3	P4	P5
PSI ^a	0.485 g, 5 mmol	0.485 g, 5 mmol	0.485 g, 5 mmol	0.485 g, 5 mmol	0.485 g, 5 mmol
Boc-EDA ^a	4.00 g, 25 mmol	0.60 g, 3.75 mmol	0.40 g, 2.50 mmol	0.20 g, 1.25 mmol	—
API ^a	—	1.25 g, 10 mmol	2.50 g, 20 mmol	3.75 g, 30 mmol	3.12 g, 25 mmol
Yield	0.942 g, 72.9%	0.756 g, 72.2%	0.930 g, 82.3%	0.906 g, 74.8%	0.700 g, 72.4%
Theoretical x/y ^b	1/0	3/1	1/1	1/3	0/1
Calculated x/y ^c	1/0	1.4/1	1/1.6	1/3.7	0/1
M _w (M _w /M _n) ^d	7.98 × 10 ³ (1.35)	2.60 × 10 ⁴ (1.61)	3.44 × 10 ⁴ (1.89)	3.26 × 10 ⁴ (1.68)	3.90 × 10 ⁴ (1.54)

^a Feed ratio of PSI, Boc-EDA and API; ^b Theoretical molar ratio of polymers grafted with EDA to IPA; ^c Calculated by ¹H-NMR; ^d Determined by SEC-MALLS using NaAc buffer (0.3 mol/L, pH 4.6) as the mobile phase

聚合物的结构经 FTIR 和 ¹H-NMR 表征. 在图 2 的 ¹H-NMR 中, 聚(L-天冬酰胺)链段中次甲基

和亚甲基的质子峰分别出现在 δ = 4.6 (peak c) 和 2.6 ~ 2.8 (peak h) 处. 聚合物主链的 2 种不同

结构(α -, β -)使得亚甲基的质子峰(peak h)呈双峰分布.侧链咪唑基团中3个次甲基的质子峰分别出现在 $\delta = 8.0$ (peak a)和 $7.0 \sim 7.3$ (peak b)处,咪唑丙基中3个亚甲基的质子峰分别出现在 $\delta = 4.0$ (peak d)、 3.1 (peak g)和 1.9 (peak i)处.而侧链氨乙基中两个亚甲基的质子峰则分别出现在 $\delta = 3.4$ (peak e)和 3.1 (peak f)处.其中 peak f 与 peak g 的质子峰相重合.根据 peak e 与 peak d 或 peak i 的积分面积比,计算聚合物中氨乙基与咪唑丙基的接枝比例 x/y ,结果列于表 1 中.

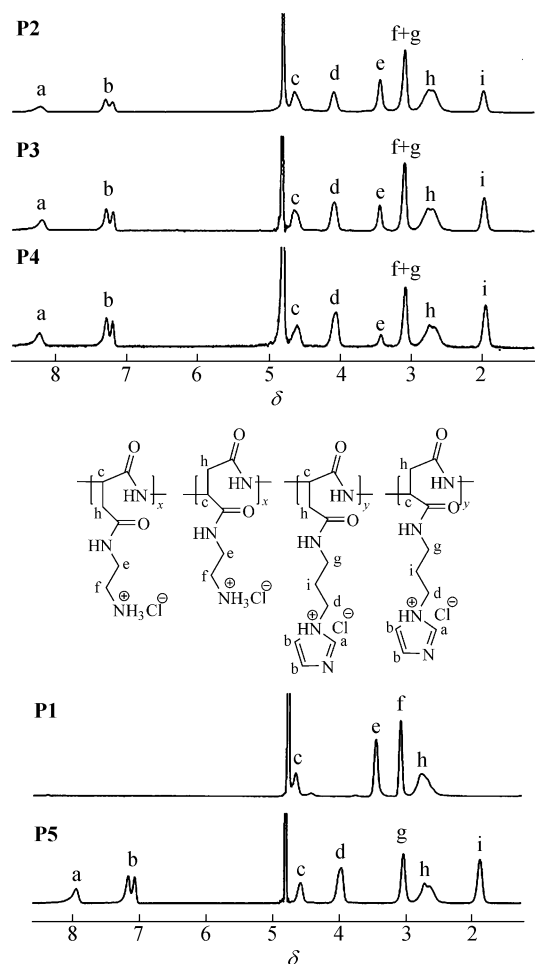


Fig. 2 ^1H -NMR spectra of polymers in D_2O

2.2 聚合物细胞毒性

细胞毒性是评价高分子基因载体安全性的重要参数,聚合物对 293T 细胞和 COS-7 细胞的体外细胞毒性用 MTT 法测定.从图 3 可以看出,聚合物在 293T 和 COS-7 细胞系中均表现低细胞毒性,且不同接枝比例的聚合物之间未表现出明显差异.与具有半抑制浓度(IC_{50})为 0.015 mg/mL 的聚阳离子参照 $b\text{PEI}$ (M_w 25 kDa) 相比,当聚合

物浓度达到 0.8 mg/mL 时,细胞的存活率仍保持在 90% 以上.

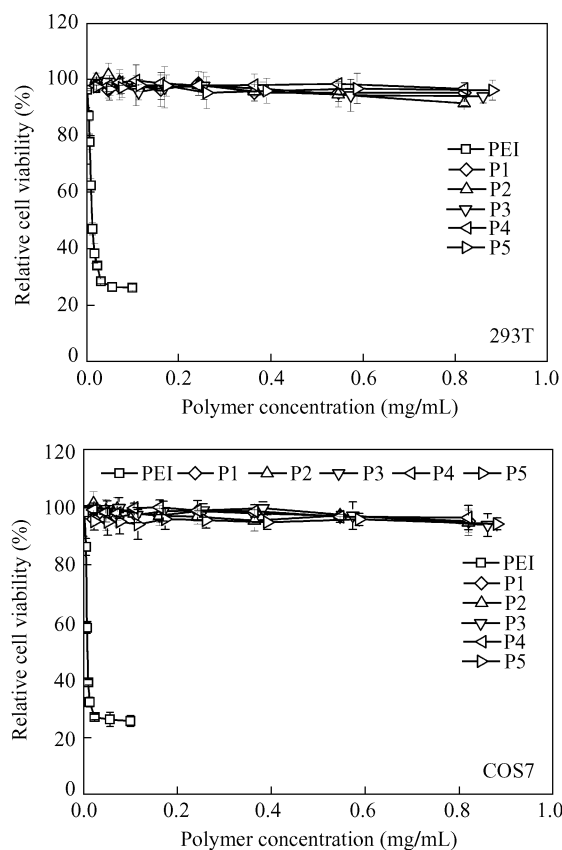


Fig. 3 *In vitro* cytotoxicity of polymers in 293T (left) and COS-7 cells (right), using branched PEI (M_w 25 kDa) as a comparison.

Data represent the mean standard deviation ($n = 4$)

2.3 酸碱滴定

聚合物的缓冲能力决定 DNA 复合物从内涵体(Endosome)中逃逸的能力,从而直接影响质粒 DNA 的转染效率.聚合物和 $b\text{PEI}$ (M_w 25 kDa) 的缓冲能力($d[\text{OH}]/d\text{pH}$)由酸碱滴定法测定.如图 4 所示,与聚合物侧链的氨乙基(pK_a 约 10)和咪唑基(pK_a 约 7)的 pK_a 值相一致,PEAE(**P1**)和 PIPA(**P5**)分别在 $\text{pH } 8 \sim 11$ 和 $\text{pH } 5 \sim 8$ 范围内表现出相当高的缓冲能力.相应地,随着聚合物侧链中咪唑基团接枝比例的增加,**P2** ~ **P4** 在 $\text{pH } 5 \sim 8$ 范围内的缓冲能力逐渐增强、在 $\text{pH } 8 \sim 11$ 范围内的缓冲能力逐渐减弱.**P2** ~ **P4** 在 $\text{pH } 5 \sim 8$ 范围内的 $d[\text{OH}]/d\text{pH}$ 分别为 0.0017 、 0.0022 和 0.0036 ,均高于 $b\text{PEI}$ (0.0007).结果表明,聚(L-天冬酰胺)侧链上咪唑基团的引入可以大大提高聚合物的缓冲能力.根据质子泵假说^[8~10],**P2** ~ **P4** 的高缓冲能力将有助于其与 DNA 的复合物从内涵体

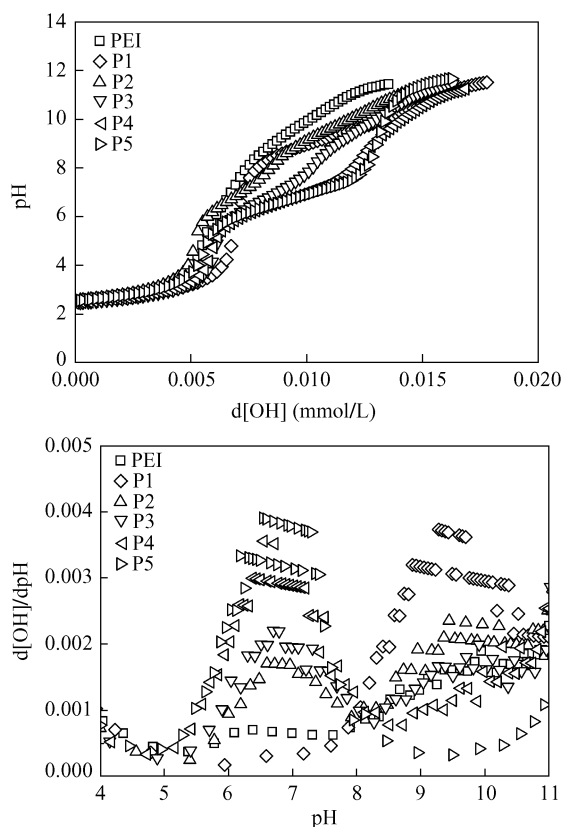


Fig. 4 Titration curve of polymers and branched PEI (M_w 25 kDa) (10 mmol/L amine) in 0.15 mol/L NaCl titrated with 0.1 mol/L NaOH

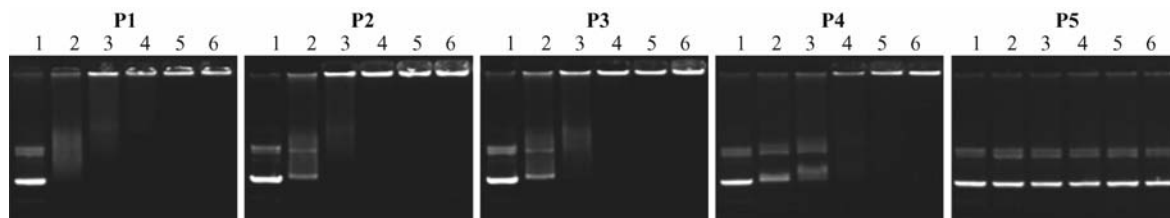


Fig. 5 Agarose gel electrophoresis images of polymer/plasmid DNA complexes

The polyplex composition (N/P ratio) was expressed as the molar ratio of amino groups in polymer to phosphate groups in DNA. Lane 1: Naked DNA, Lane 2~6: N/P ratio of 1, 2, 5, 10 and 20

2.4.2 复合物的粒径和 zeta 电位

聚阳离子通过静电相互作用与 DNA 形成复合物粒子,复合物的粒径和表面电荷直接影响细胞对复合物的摄取以及复合物在细胞内的运转^[18,19]. 小的尺寸和正的表面电荷有利于复合物与带负电的细胞膜表面相互结合,从而增强细胞对复合物的摄取,提高转染效率. 复合物的粒径和表面电荷由动态光散射法和电泳法测定,表面电

(pH 5.0 ~ 6.5) 中快速逃逸,避免 DNA 被更低 pH 的溶酶体中的各种核酸酶的降解,从而提高转染效率.

2.4 聚合物与质粒 DNA 的相互作用

2.4.1 凝胶电泳

聚阳离子对 DNA 的有效结合不仅可以保护 DNA 免受核酸酶的降解,同时可以中和 DNA 表面的负电荷,从而增加与带负电的细胞膜的相互作用,提高细胞摄取的几率. 聚阳离子与 DNA 的结合能力对于基因转染至关重要. 利用凝胶电泳研究聚合物与质粒 DNA 的相互作用. 图 5 显示了随 N/P 比增加,各聚合物/DNA 复合物的凝胶电泳结果. 除 PIPA(P5)外,所有聚合物都可以在较低的 N/P 比下,通过静电作用与 DNA 形成聚电解质复合物. 由于 DNA 表面的负电荷被中和, DNA 在凝胶中的运动受到阻滞. PAEA(P1)、P2 和 P3 在 N/P 比高于 5 时, P4 在 N/P 比高于 10 时,均能完全阻滞 DNA 在琼脂糖凝胶中的运动;而不含氨基的 PIPA(P5),即使在 N/P 比高达 20 时,仍无法阻止 DNA 的迁移. 该结果表明,聚合物侧链上的氨基可以有效地结合 DNA,并且随侧链中氨乙基接枝比例的减少,聚合物结合 DNA 的能力逐渐减弱.

荷用 zeta 电位表示. 图 6 为聚合物与 DNA 以不同 N/P 比形成的复合物的粒径和 zeta 电位的测量结果. 由图中可以看出,当 N/P 比为 1 时,聚合物不能完全中和 DNA 表面的负电荷,所形成的复合物的粒径略大(约 150 nm). 而在 N/P 比高于 5 时,所有的聚合物均可以与 DNA 形成直径在 100 nm 以下、表面带正电荷的复合物粒子;当 N/P 高于 10 时,粒子的表面电荷稳定在 +20 mV 左右.

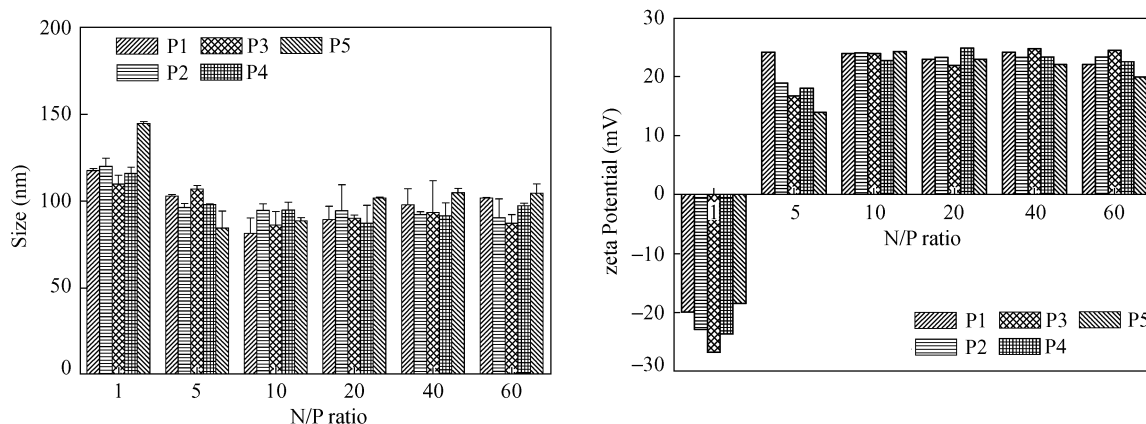


Fig. 6 Average size (left) and zeta potential (right) of polymer/plasmid DNA complexes measured by dynamic light scattering (DLS). The polyplex composition (N/P ratio) was expressed as the molar ratio of amino groups in polymer to phosphate groups in DNA.

2.5 聚合物介导外源 DNA 转染细胞

2.5.1 聚合物介导 pGL-3 转染细胞

以 pGL-3 为编码荧光素酶的报告基因,考察聚合物在 293T 和 COS-7 细胞中介导外源 DNA 的转染效率,选择具有高转染效率的聚阳离子 *b*PEI (M_w 25 kDa) 作为阳性对照. 各聚合物与 DNA 在 0.15 mol/L 氯化钠溶液中形成不同 N/P 比的复合物,在无血清 DMEM 培养基中转染细胞 4 h,细胞在完全 DMEM 培养基中继续培养 44 h 后,测定细胞中表达的荧光素酶的活性. 如图 7 所示, PAEA (**P1**) 与 PIPA (**P5**) 的转染效率均很低,而侧链同时接枝氨基乙基和咪唑丙基的共聚合物 (**P2** ~

P4) 的转染效率则显著提高. 随侧链中咪唑基团含量的增加,聚合物介导的转染效率逐渐增强. 在 293T 细胞中,当 N/P 比高于 40 时, **P4** 介导 pGL-3 的转染效率 (RLU/mg protein: $8.41 \times 10^9 \sim 1.61 \times 10^{10}$) 达到 PEI (4.48×10^9) 的 2 ~ 3 倍. 在 COS-7 细胞中,当 N/P 比高于 80 时, **P4** 介导 pGL-3 的转染效率 (RLU/mg protein: $2.53 \times 10^9 \sim 2.44 \times 10^9$) 与 PEI (2.49×10^9) 相当. 结果证实,聚阳离子作为基因载体不仅要能够有效地结合 DNA,同时聚阳离子的缓冲能力对于提高转染效率也具有重要作用.

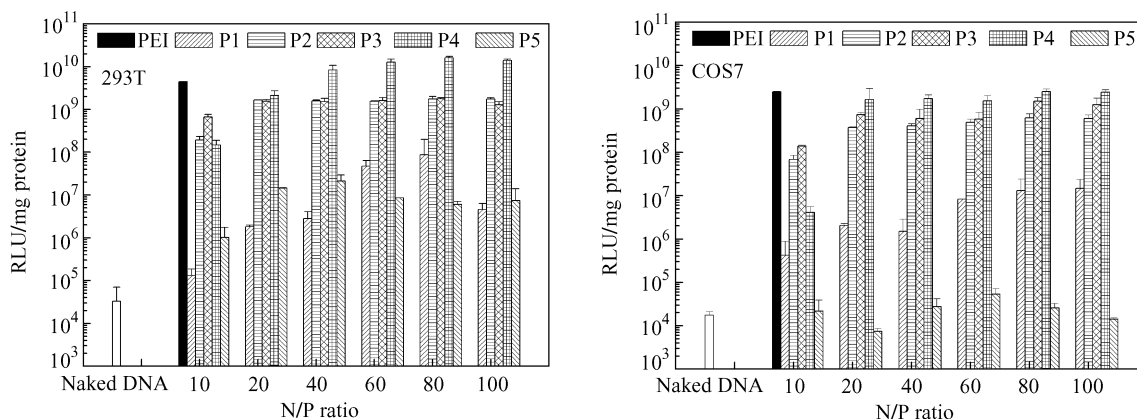


Fig. 7 *In vitro* transfection efficiencies of polymer/pGL3 complexes in 293T (left) and COS-7 (right) cells. Branched PEI (M_w 25 kDa) at its optimal N/P ratio of 10 was used as a control. Data represent the mean standard deviation ($n = 2$).

2.5.2 聚合物介导 pEGFP-C1 转染细胞

使用增强型绿色荧光蛋白基因 (pEGFP-C1) 进一步考察了聚合物/DNA 复合物在 293T 和 COS-7 细胞中的转染. 通过荧光显微镜观察表达绿色荧光蛋白的细胞. 图 8 的结果证实了聚合物

P1 ~ **P5** 介导 pEGFP-C1 转染细胞与 pGL-3 转染结果相符. 在较高 N/P 比, **P4** 介导 pEGFP-C1 转染 293T 和 COS-7 细胞中均发现大量表达绿色荧光蛋白的细胞,达到与 *b*PEI 相当甚至更高的转染效率.

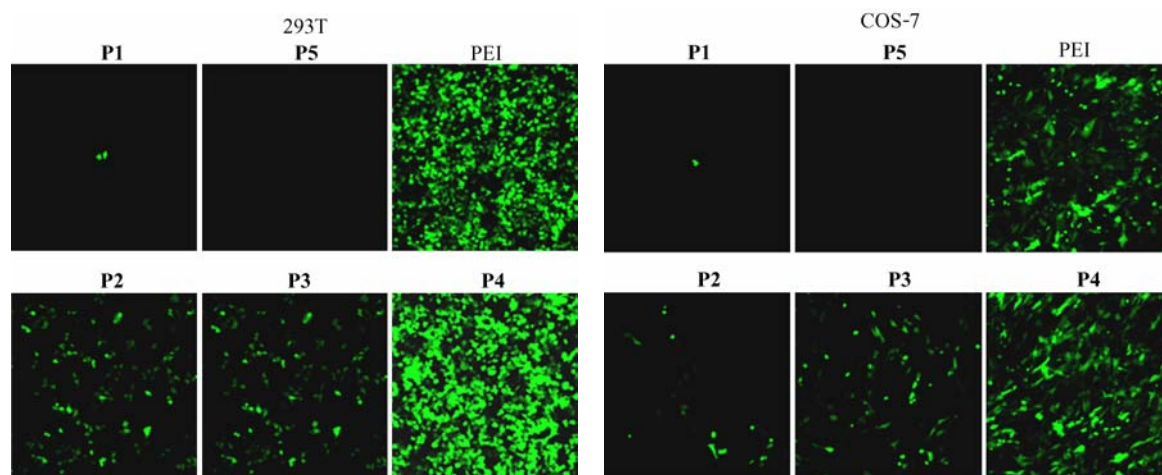


Fig. 8 Fluorescent microscope images of pEGFP transfected 293T (left) and COS-7 (right) cells

Polyplexes formed from **P1** ~ **P5** at N/P ratio of 80 for 293T cells and 100 for COS-7 cells; Polyplexes formed from branched PEI ($M_w = 25$ kDa) at its optimal N/P ratio of 10. The images were obtained at magnification of $200\times$.

3 结论

通过开环反应,合成了侧链接枝氨基与咪唑丙基的聚(L-天冬酰胺)衍生物聚阳离子基因载体.研究不同侧链接枝比例对聚合物结合DNA、介导外源DNA体外转染细胞的影响,发现侧链含氨基与咪唑丙基的聚(L-天冬酰胺)衍生物表现出极低的细胞毒性.侧链含伯氨基聚(L-天冬酰胺)衍生物都能够在较低的N/P比有效结

合DNA,形成表面带有正电荷的复合物纳米粒子.随侧链接枝咪唑基团比例的增加,聚合物的缓冲能力显著提高,介导外源DNA在细胞内的表达显著提高.与高细胞毒性的商品化bPEI(25 kDa)相比,P4具有低细胞毒性和高转染效率,作为新型聚阳离子载体具有应用潜力.新型聚(L-天冬酰胺)衍生物的构效关系也为设计新型聚阳离子基因载体提供实验依据和新的思路.

REFERENCES

- Putnam D. Nat Mater, 2006, 5: 439 ~ 451
- Pack D W, Hoffman A S, Pun S, Stayton P S. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4: 581 ~ 593
- Wong S Y, Pelet J M, Putnam D. Prog Polym Sci, 2007, 32: 799 ~ 837
- Tian H, Xiong W, Wei J Z, Wang Y, Chen X S, Jing X B, Zhu Q Y. Biomaterials, 2007, 28: 2899 ~ 2907
- Han S, Mahato R, Sung Y K, Kim S W. Mol Ther, 2000, 2: 302 ~ 317
- Neu M, Fischer D, Kissel T. J Gene Med, 2005, 7: 992 ~ 1009
- 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
- Boussif O, Lezoualch F, Zanta M A, Mergny M D, Scherman D, Demeneix B, Behr J P. P Natl Acad Sci Usa, 1995, 92: 7297 ~ 7301
- Akinc A, Thomas M, Klibanov A M, Langer R. J Gene Med, 2005, 7: 657 ~ 663
- Sonawane N D, Szoka F C Jr, Verkman A S. J Biol Chem, 2003, 278: 44826 ~ 44831
- Cavallaro G, Scirè S, Licciardi M, Ogris M, Wagner E, Giammona G. J Control Release, 2008, 131: 54 ~ 63
- Moon J R, Kim M W, Kim D, Jeong J H, Kim J H. Colloid Polym Sci, 2011, 289: 63 ~ 71
- Oba M, Miyata K, Osada K, Christie R J, Sanjoh M, Li W, Fukushima S, Ishii T, Kano M R, Nishiyama N, Koyama H, Kataoka K. Biomaterials, 2011, 32: 652 ~ 663
- Kim H J, Ishii A, Miyata K, Lee Y, Wu S, Oba M, Nishiyama N, Kataoka K. J Control Release, 2010, 145: 141 ~ 148
- Zhang M, Liu M, Xue Y N, Huang S W, Zhuo R X. Bioconjugate Chem, 2009, 20: 440 ~ 446
- Neri P, Antoni G, Benvenuti F, Coccola F, Gazzei G. J Med Chem, 1973, 16: 893 ~ 897
- Hobson L J, Feast W J. Polymer, 1999, 40: 1279 ~ 1297
- Bettinger T, Remy J S, Erbacher P. Bioconjugate Chem, 1999, 10: 558 ~ 561

POLYASPARTAMIDES GRAFTED WITH 1-(3-AMINOPROPYL)IMIDAZOLE AS LESS TOXIC AND HIGHLY EFFICIENT GENE CARRIERS

XUE Ya'nan¹, ZHANG Min¹, LIU Lei¹, LI Wenxin², HUANG Shiwen¹

(¹ Key Laboratory of Biomedical Polymers of Ministry of Education, Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

(² College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Polyaspartamides containing pendant imidazolyl propyl groups and amino ethyl groups were synthesized *via* ring-opening of polysuccinimide (PSI) reacting with N-Boc protected ethylenediamine and 1-(3-aminopropyl) imidazole. Polyaspartamides (**P1** ~ **P5**) with different grafting ratios were characterized by FTIR and ¹H-NMR spectra, which were well in accordance with the expected chemical structures. The cytotoxicity of polymers was evaluated by MTT assay. Compared to the commercial branched polyethyleneimine (PEI) (25 kDa) with an IC₅₀ of 15 µg/mL, **P1** ~ **P5** showed no significant cytotoxicity against both 293T cells and COS-7 cells. More than 90% cells still retained their metabolic ability even at the polymer concentration up to 0.8 mg/mL. The introduction of imidazolyl group into polymer side chains make them possess high buffer capacity between pH 5 and pH 7, which was 2 ~ 5 times higher than that of PEI. Gel electrophoresis assay and dynamic light scattering measurements were performed to characterize the polycation/DNA complexes. At an N/P ratio of above 5, all of the five polyaspartamide-based polycations can condense plasmid DNA to form nanosized (100 nm) polyelectrolyte complexes with positive surface charge (+20 mV). The transfection assay demonstrated that the transfection efficiencies of foreign DNA in 293T cells and COS-7 cells increased with increasing the contents of imidazolyl graft of polyaspartamides. **P4** with a grafting ratio of 1/3.7 (amino ethylene group to imidazolyl propyl group) showed the highest ability to deliver pGL-3 and pEGFP-C1 into both 293T cells and COS-7 cells. At the optimal N/P ratios, the gene expression efficiencies mediated by **P4** were comparable to or even 2 ~ 3 times higher than that of PEI. The results suggest that imidazole-containing polyaspartamides are a very promising class of novel polycations for highly efficient and less toxic gene delivery. The structure-gene delivery ability relationship of imidazole-grafted polyaspartamides will provide valuable insight into the development of novel nonviral gene carrier.

Keywords Gene delivery, Polycation, Polyaspartamide, Imidazole, Less toxic