

·研究简报·

以光诱导 Fenton 反应控制 M-PEIs 纳米凝胶的粒径^{*}

徐冬梅^{1,2} 洪 军^{1,2} 孙汉文^{1,2} 宫培军^{1,2} 董 黎^{1,2} 盛康龙¹ 姚思德^{1**}

(¹ 中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800) (² 中国科学院研究生院 北京 100039)

关键词 光化学, 聚乙烯亚胺, 非病毒载体, 紫外线, 光助 Fenton 反应

基因治疗,就是将正常基因导入体内以弥补缺失或替换突变基因来医治囊性纤维化和血友病等^[1]多种疾病.而制备高效安全的基因转染载体至今仍是基因治疗的一个瓶颈.

非病毒类载体的基因转染效率目前虽不高,但由于其具有低毒、低免疫反应、无基因插入片断大小限制、制备方便、易保存等优点,越来越受到关注,聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)就是其中研究较多的一种.1995 年 Bossif 首先提出 PEI 在基因转染方面具有潜在应用前景^[2],随后越来越多的体内、体外基因转染实验表明 PEI 具有较高的基因转染效率^[2~4].

要使目的基因被成功载带到载体上,并输送到靶点进入需要治疗的病变组织细胞,往往对载体的粒径尺寸有一定要求.载体的分子量或粒径太小,其浓缩 DNA 的能力也就很小^[5],且无法附着于细胞壁上被细胞内吞.载体的分子量或粒径过大的缺点是,载体载带基因后无法被细胞以内吞方式吸收^[6];易在细胞壁上堆积(accumulate);毒性大于小粒径载体^[7].此外,靶向转染不同种类的细胞也需用不同粒径大小的载体.例如,脑部基因治疗通常要求小于 100 nm 的载体,这一尺寸的颗粒较易通过脑部毛细血管的血脑屏障^[8].因此,制备具有特定粒径尺寸、且在水中分散均匀的载体,在基因转染中具有重要意义.

近年来,光交联法制备高分子物质在国内外得到了广泛应用.该方法可以在室温操作且操作简单、设备投资小.其主要特点是有可能通过改变实验条件实现聚合物分子量或粒径尺寸的有效控制^[9].

本文介绍了一种使用光助 Fenton 反应制备粒

径可控的 M-PEIs (M 代表 Fe 原子) 纳米凝胶的方法,即 PEI 预聚物在水中自组装后和氯化亚铁络合得到络合纳米粒子,以双氧水作为引发剂,在 253.7 nm 的紫外光辐射下,络合纳米粒子交联,制备出粒径均匀的纳米凝胶(M-PEIs).该体系中亚铁离子通过 Fenton 反应催化 H₂O₂ 产生高活性的·OH 与 H₂O₂ 在酸性条件下光降解生成的·OH 一起协同实现 PEI 预聚物的交联或降解,同时 Fe³⁺ 与紫外光产生的协同效应可促进 Fe²⁺ 离子的再生,从而提高了 Fenton 反应的氧化效率.

1 试剂与仪器

PEI 预聚物购自日本东京化成工业株式会社,原液的质量浓度为 30%;实验中使用的水为三蒸水;氯化亚铁、双氧水等其它试剂为市售 AR 试剂.

8 W 低压汞灯系上海金光灯具厂的 ZSZ 系列紫外杀菌灯,该灯辐射以 253.7 nm 光波为主的短波紫外线.用英国 MARLEN 公司的 Zetasizer 3000HS 型光相干光谱仪(photon correlation spectroscopy, PCS)对纳米凝胶的粒径进行表征,测试温度为 25℃,入射激光波长为 633 nm,其偏振方向与散射检测光平面垂直,文中所采用数据为 Z 均分子量.使用 Nanoscope III a 原子力显微镜(AFM, Digital Instruments, USA)对纯化后的 M-PEIs 纳米凝胶进行形貌表征.

2 Photo-Fenton 反应合成 M-PEIs 纳米凝胶的机理

在 75 mL 三孔石英烧瓶中加入用三蒸水稀释的 PEI 预聚物,在机械搅拌(转速, 305 r/min)的同时,滴加 1 mol/L 的盐酸调节反应物的 pH 值.通入氮气排出体系中的溶解氧,并在氮气保护下加入一

^{*} 2006-04-17 收稿, 2006-08-15 修稿;上海市纳米专项(项目号 0243nm027)和中科院上海应用物理研究所前沿领域(项目号 55120212)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: yaoside@sinap.ac.cn

定量的 FeCl_2 水溶液(文中所有反应中 FeCl_2 和 PEI 氨基基团的摩尔比均小于 1:6)和交联剂 H_2O_2 , 以紫外灯照射该体系引发反应. 产物 M-PEIs 纳米凝胶的纯化方法是, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 的水相针式过滤器过滤后用截留分子量小于 1×10^4 的透析袋透析.

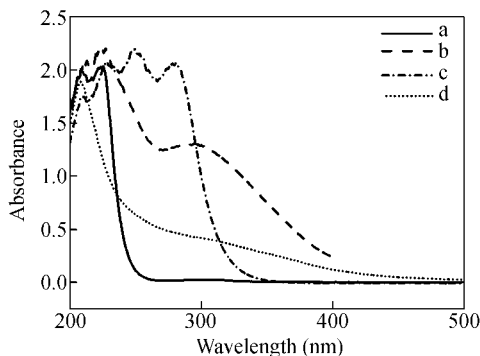
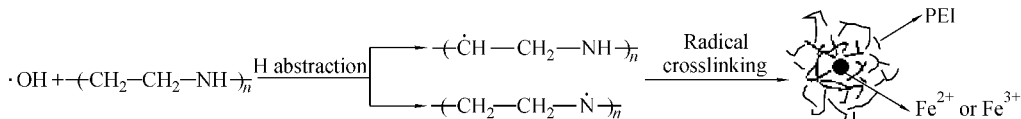
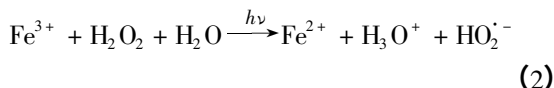
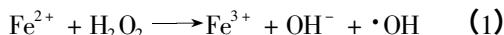


Fig. 1 UV spectra of (a) PEI prepolymer, (b) FeCl_2 , (c) H_2O_2 and (d) prepolymer + FeCl_2 at molar ratio of 18:1

体系中各组分及 PEI 预聚物和 Fe 离子络合后的紫外吸收谱如图 1(a)、(b)、(c)、(d)所示, 在 253.7 nm 波长处, PEI 预聚物没有吸收, FeCl_2 有一定的吸收, H_2O_2 有较强吸收, 而 PEI 与 Fe^{2+}

络合所得的纳米粒子也有吸收, 但比双氧水的吸收弱很多. 因此, 在整个体系中, FeCl_2 和 H_2O_2 发生 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 和 Fe^{3+} (反应式 1), 紫外线辐照后, 生成的 Fe^{3+} 按反应式(2)还原回 Fe^{2+} , 该反应决定了整个过程的反应速率^[10], 同时 H_2O_2 在酸性条件下也会被紫外光分解生成 $\cdot\text{OH}$ (反应式 3). Antonio 等^[12]认为 Fenton 体系在紫外光的照射下不仅可以加速 Fenton 反应($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$), 而且可以加速 Fenton-like 反应($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$). 如示意式 1 所示, $\cdot\text{OH}$ 引起的抽氢反应不具有选择性, $\cdot\text{OH}$ 不仅可抽取 CH_2 基团上的 H 原子, 也可抽取氨基上的 H 原子, 抽氢反应使被铁离子络合的 PEI 预聚物之间发生化学交联. 由此推测产物应是络合在 Fe 离子周围的 PEI 交联网状凝胶, 在凝胶的表面伸展着一些 PEI 链段.



Scheme 1 The mechanism of H abstraction

研究表明, M-PEIs 纳米凝胶的合成受多种因素的控制, 如 pH 值、交联剂浓度、 FeCl_2 浓度及光照时间等. 通过改变单个反应条件, 可研究 M-PEIs 纳米凝胶的粒径和反应条件的相关性, 由此来控制产物的粒径.

3 光照与否对产物粒径的影响

在非光照的情况下, FeCl_2 和 H_2O_2 组成的 Fenton 体系本身就能引发交联反应, 但因反应中亚铁离子浓度通常控制在较低浓度下, 所以形成的交联密度不高. 在同样的实验条件下比较非光照和光照两组产物的粒径(图 2)可以看出, 非光照产物粒径为双峰分布, 粒径不均匀, 而光照产物粒径呈单峰分布, 粒径均匀. 在光照情况下, 络合了预聚聚乙烯亚胺的 Fe^{2+} 离子被双氧水氧化为 Fe^{3+} , 使得聚乙烯亚胺络合物吸收 253.7 nm 紫外光的截面增加, 诱导了 PEI 的氧化降解; 另一方面, 光分解 H_2O_2 生成的 $\cdot\text{OH}$ 浓度更高, 在抽氢引

发 PEI 预聚物交联的同时也会进攻 PEI 主链, 导致 PEI 预聚物的降解. 因此在光照条件下, 光降解和光交联反应总是竞争存在, 在光照一段时间后, 二者会达到一定的平衡, 从而使产物的粒径趋于均匀化.

4 pH 值对粒径的影响

从图 3 可以看出, 随着盐酸加入量的增多, M-PEIs 粒径逐渐减小. pH 值的减小, 使体系的离子强度相应增大. H_2O_2 在酸性环境中更易光分解, 因此 $\cdot\text{OH}$ 的生成速率增大, PEI 预聚物自由基之间的交联反应速率相应加快. 和传统的自由基聚合反应一样, 交联密度与自由基浓度成正相关, 产物的粒径随反应速率的增加而逐渐减小.

5 双氧水浓度对粒径的影响

体系中双氧水用量的增加会使 $\cdot\text{OH}$ 自由基的有效生成速率增大, 生成的 M-PEIs 纳米凝胶粒子结构更加紧密, 粒径相应减小. 但是, 当双氧水增大

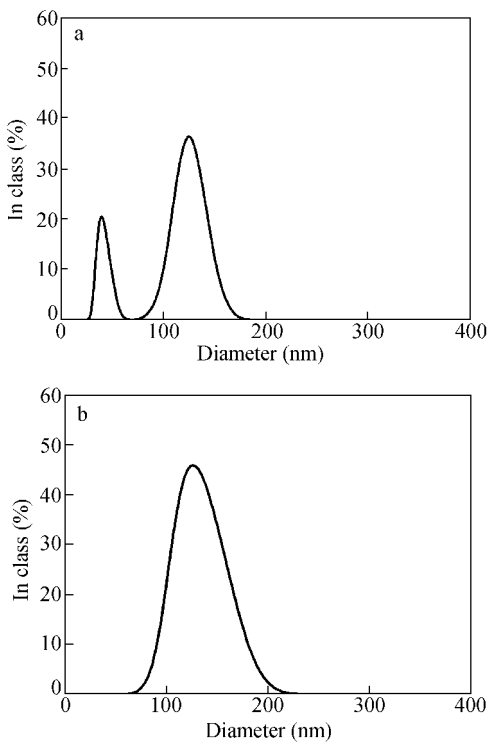


Fig. 2 The sizes were analyzed by PCS before UV irradiation (a) and after UV irradiation (b)
PEI prepolymer = 6% (weight ratio) ;FeCl₂ = 11 mg/mL ; H₂O₂ = 0.37% (voluml ratio) ;Irradiation time = 0.5 h

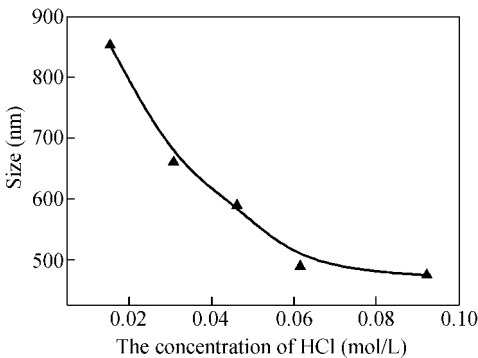


Fig. 3 Particle sizes of M-PEIs nanogels synthesized with different amounts of HCl
PEI prepolymer = 3.7% (weight ratio) ,FeCl₂ = 0.6 mg/mL ; H₂O₂ = 0.037% (voluml ratio) ;Irradiation time = 0.5 h

到一定量时,每个络合物纳米粒子被抽掉的氢原子数目急剧增多,导致其表面有相当多的活性自由基与游离的 PEI 预聚物分子发生反应,使已交联的络合物纳米粒子粒径继续增大.当双氧水加入量继续增大时,在胶束内部生成的·OH 有可能进攻 PEI 的主链,使得部分 PEI 分子链从 M-PEIs 纳米凝胶上降解下来,从而使 M-PEIs 粒径随着双氧水浓度的

进一步增加而有所减小,如图 4 所示.

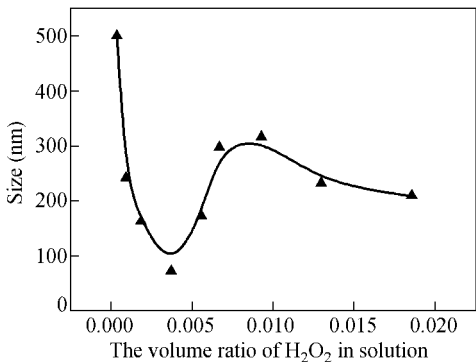


Fig. 4 Particle sizes of M-PEIs nanogels synthesized with different concentrations of H₂O₂
PEI prepolymer = 3.7% (weight ratio) ;FeCl₂ = 0.6 mg/mL ;
Irradiation time = 1 h

6 氯化亚铁浓度对粒径的影响

图 5 的实验结果显示,FeCl₂ 用量的增加会使 M-PEIs 纳米凝胶的粒径减小.首先,增多的 Fe²⁺ 离子提供了更多的络合中心,使得在 PEI 预聚物用量一定的条件下,络合纳米粒子的数目增多,产物 M-PEIs 的粒径就相应减小;其次,经 Fenton 反应后,络合的 Fe²⁺ 被双氧水氧化成 Fe³⁺,同时产生更多的·OH 自由基,导致预聚物之间交联程度更强,也可导致 M-PEIs 粒径减小.据雷乐成^[11]的结果推测,PEI 预聚物和 Fe²⁺ 生成的络合纳米粒子不如 PEI 预聚物和 Fe³⁺ 生成的络合纳米粒子对紫外光敏感,PEI 预聚物被 Fe³⁺ 诱导的光降解更强,因此 Fe³⁺ 的增多导致产物粒径减小.几种因素中,哪一种为主有待进一步深入研究.

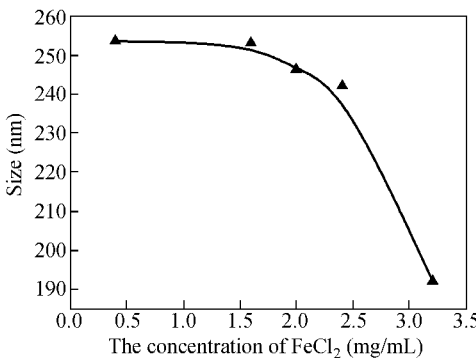


Fig. 5 Particle sizes of M-PEIs nanogels synthesized with different concentrations of FeCl₂
PEI prepolymer = 4.8% (weight ratio) ;H₂O₂ = 0.13% (volume ratio) ;Irradiation time = 0.5 h

7 反应时间对产物粒径的影响

反应时间对粒径的影响主要表现在光交联和光降解的竞争反应上. 辐照时间太短, 会使 H_2O_2 没有反应完全, 且光降解和光交联达不到平衡, 此时的产物粒径用 PCS 检测通常多分散系数偏大, 说明此时纳米凝胶的粒径分布不均匀. 辐照时间过长, 纳米凝胶的交联密度将过高, 从而更多氨基参与交联反应使得纳米凝胶表面的氨基数目减少, 这不利于基因转染载体载带 DNA. 以本文所使用的紫外灯装置, 紫外线辐照时间通常选择在 20 ~ 60 min 之间较为适宜.

8 纳米凝胶的形貌及组成

将 M-PEIs 的一个样品经真空冷冻干燥, 作原子力显微镜测试得到的结果如图 6 所示. 从该图可以看出, M-PEIs 纳米凝胶为球形, 其表面凹凸不平. 凝胶的具体结构及形貌用现有谱学还较难表征, 该工作还在进展中.

我们用光助 Fenton 法合成了粒径可控的聚乙烯亚胺纳米凝胶. M-PEIs 纳米凝胶合成操作简单、成本低廉, 除 FeCl_2 和 H_2O_2 外, 未添加任何表

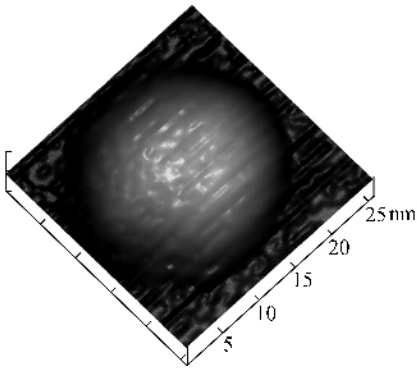


Fig. 6 The AFM 3-D images of M-PEIs nano hydrogels

面活性剂和引发剂. 该合成方法及产品已经申请国家发明专利^[12,13]. M-PEIs 纳米凝胶的粒径随体系 pH 值的增大而增大, 随氯化亚铁及双氧水浓度的增大而减小. 据此, 可通过改变反应条件控制产物粒径, 制备不同需要的 M-PEIs 纳米凝胶用作基因转染载体. 体外基因转染实验表明, M-PEIs 纳米凝胶具有相当的基因转染效率, 低的细胞毒性及免疫原性, 有关研究将另文报道.

REFERENCES

1 Anderson W F. Nature, 1998, 392 25 ~ 30
2 Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M A. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92 7297 ~ 7301
3 Petersen H, Kunath K, Martin A L. Biomacromolecules, 2002, 3 926 ~ 936
4 Godbey W T, Wu K J, Mikos A G. J Control Rel, 1999, 60 149 ~ 160
5 Petersen H, Kunath K, Martin A L, Stolnik S, Roberts C J, Davies M C, Kissel T. Bioconjugate Chem, 2002, 3 926 ~ 936
6 Cupers P, Veithen A. J Cell Biol, 1994, 127 725 ~ 735
7 Michael A, Gosselin, Guo W, Robert J L. Bioconjugate Chem, 2001, 12 989 ~ 994
8 Serguei V, Vinogradov, Elena V, Batrakova, Alexander V K. Bioconjugate Chem, 2004, 15 50 ~ 60
9 Kang Kai(康凯), Kan Chengyou(阚成友), Du Yi(杜奕), Li Yuzhong(李玉中), Liu Deshan(刘德山). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2004, (4) 580 ~ 584
10 Teixeira A C C S, Guardani R, Nascimento C A O. Ind Eng Chem Res, 2003, 42 5751 ~ 5761
11 Lei Lecheng(雷乐成). Acta Scientiae Circumstantiae(环境科学学报), 2000, 20 139 ~ 144
12 Yao Side(姚思德), Xu Dongmei(徐冬梅), Liu Yongbiao(刘永彪), Qiao Xiangli(乔向利), Yu Jiahui(余家会), Sun Hanwen(孙汉文), Sheng Kanglong(盛康龙). Chinese patent, 200510026477.8. 2006-03-08
13 Yao Side(姚思德), Xu Dongmei(徐冬梅), Liu Yongbiao(刘永彪), Qiao Xiangli(乔向利), Yu Jiahui(余家会), Sun Hanwen(孙汉文), Sheng Kanglong(盛康龙). Chinese patent, 200510026746.0. 2006-02-22

SIZE CONTROLLING OF M-PEIS NANOGELS *via* PHOTO-INDUCED FENTON REACTION

XU Dongmei^{1,2}, HONG Jun^{1,2}, SUN Hanwen^{1,2}, GONG Peijun^{1,2}, DONG Li^{1,2}, SHENG Kanglong¹, YAO Side¹

(¹ Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Science, Shanghai 201800)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract Photo-induced Fenton reaction was utilized in this paper to control the sizes of polyethylenimine hydrogels (M-PEIs, M, Fe atom) as gene delivery vector. H_2O_2 and FeCl_2 were mixed with PEI pre-polymer in water in a 3-neck quartz flask, and the mixture was stirred vigorously. M-PEIs nanogels dispersed very well in water could be prepared under illumination by use of low-pressure Hg lamps at room temperature. This system was protected from oxygen with N_2 . By changing reaction conditions, such as the pH value, reaction time and concentrations of solutes, sizes of M-PEIs nanogels could be controlled. It was found that the sizes of M-PEIs decreased with the pH value and the concentrations of FeCl_2 . The increasing of the initiator (H_2O_2) concentrations would make the particles more tighten, but might result in crosslinking or degradation of particles. A suitable irradiation time ensured formation of homogeneous nanogel products, but prolonged irradiation would cause degradation of nanogels. After photo crosslinking, the products were purified with membrane filters of $0.45\ \mu\text{m}$ and treated further by dialysis bags with size exclusion below 10 kDa in order to make them more stable for storage.

Key words Photochemistry, Polyethyleneimine, Nonviral vector, UV, Photo-Fenton reaction