

## 用于输送 siRNA 的聚乙烯亚胺-聚乙二醇二丙烯酸酯纳米凝胶\*

李来胜<sup>1</sup> 童 景<sup>2</sup> 吴 卷<sup>1</sup> 杜金志<sup>1</sup> 王 均<sup>2,3\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学技术大学高分子科学与工程系 合肥 230026)

(<sup>2</sup> 中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230027) (<sup>3</sup> 合肥微尺度物质科学国家实验室 合肥 230027)

**摘 要** 阐述了一种新的用于输送小干扰核糖核酸(siRNA)的聚乙烯亚胺-聚乙二醇二丙烯酸酯纳米凝胶的合成及其表征.在反相微乳液体系中,聚乙烯亚胺(PEI)和聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG-DA)通过迈克尔加成交联得到纳米凝胶.<sup>1</sup>H-NMR 和 FTIR 的结果充分证明纳米凝胶的化学结构,而动态光散射则表明纳米凝胶的颗粒粒径均匀,约为 180 nm, zeta 电位为 37.9 mV.同时,MTT 结果表明纳米凝胶在高达 1 mg/mL 的浓度下对 MCF-7 细胞也基本没有毒性.凝胶阻滞实验证明纳米凝胶在体外可以通过静电相互作用稳定结合 siRNA.转染实验结果表明纳米凝胶与 GFP siRNA 的复合物能降低 MCF-7 KMRV 细胞(一种能稳定表达 GFP 蛋白的 MCF-7 细胞系)GFP 蛋白的表达.以上结果证明这种生物相容性的纳米凝胶可以结合并输送 siRNA 进入细胞,沉默相关基因的表达.

**关键词** 反相微乳液, RNA 干扰, siRNA 载体, 纳米凝胶, 基因治疗

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA(double-strand RNA, dsRNA)引发的序列特异性的转录后基因沉默机制<sup>[1]</sup>.长度约为 21 ~ 23 个碱基对的小干扰核糖核酸(small interfering RNA, siRNA),是 RNAi 的效应分子,在胞内通过 RNA 诱导基因沉默复合物(RNAi-induced silencing complex, RISC)的生成,序列特异性降解 mRNA,从而使目的蛋白表达量下调<sup>[2]</sup>. siRNA 其作为一种新药物治疗疾病已经显示了巨大的应用前景<sup>[3~5]</sup>,目前一些生物制药公司致力于 siRNA 药物研发,并且已有部分药物进入三期临床试验<sup>[6]</sup>.然而, siRNA 作为生物活性的核酸类物质,它的稳定性差,吸收率低, siRNA 的转运是其能否应用于临床的关键瓶颈,设计和合成安全有效的 siRNA 输运载体已经成为目前 siRNA 药物研发的重要方向.

纳米颗粒作为药物输运载体具有多方面的优点,如天然或合成的纳米颗粒具有非常好的生物相容性,不会对机体产生副作用,而且纳米颗粒其特有的纳米尺寸、大比表面积、高表面活性、强吸附能力等特点,容许其穿透极细的毛细血管并被细胞摄取,最终使药物在体内靶部位富集<sup>[7]</sup>.基于多种天然或合成的高分子的纳米颗粒在核酸类药

物的输运中具有良好的效果,引起了高度关注<sup>[8~12]</sup>.大量文献报道了基于水溶性聚阳离子如聚乙烯亚胺(PEI)、聚赖氨酸和透明质酸等的高分子用于质粒脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)输送的基因药物载体<sup>[13, 14]</sup>,最近也有用于 siRNA 输运的报道.相比较而言,带有正电荷的纳米尺度的空间网状的水凝胶(即纳米凝胶)在一定程度上具有更好的稳定性,合成相对简单,特别适合带有负电荷的水溶性核酸类药物分子的输运,在输送反义核酸方面已经显示了良好的应用潜力<sup>[15, 16]</sup>.

除采用乳液聚合方法合成粒径均一的球形纳米颗粒<sup>[17~20]</sup>外, Vinogradov 等还报道了运用改良的乳液溶剂蒸发法合成交联的聚乙烯亚胺和聚乙二醇的网状颗粒<sup>[21]</sup>.这些颗粒粒径分布在 40 ~ 300 nm,可以同带负电荷的寡核苷酸形成复合物,在体外实验中提高了寡核苷酸的细胞内吞.姚思德等也利用光诱导合成 PEI 纳米凝胶<sup>[22]</sup>.反相微乳液是在表面活性剂作用下,由水相高度分散在油相中形成的热力学稳定体系,油水界面上表面活性剂形成有序组合体,水核被表面活性剂单分子层包围,类似于“微型反应器”<sup>[23]</sup>.由反相微乳液制备的纳米颗粒不仅固含量高、分散快、粒径小

\* 2008-07-02 收稿, 2008-09-03 修稿, 国家高技术研究发展计划(863 计划, 项目号 2006AA02Z117)资助项目; \*\* 通讯联系人, E-mail:

jiwang699@ustc.edu.cn

且均一,而且高度稳定,已有的研究结果显示其非常适合于制备新型纳米药物载体<sup>[24]</sup>,包括用于蛋白或核酸类药物输送的纳米颗粒<sup>[24~26]</sup>.到目前为止,已经有大量文献报道了 PEI-PEG 聚合物作为基因载体,用以输送寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)、质粒 DNA 等基因药物<sup>[27~31]</sup>,其中 PEI-PEG 的合成多采用活化 PEG 后再与 PEI 反应的方法.我们在此项研究中,利用分子量为 800 道尔顿的 PEI(PEI800)和两端带不饱和和双键的聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG400-DA),在反相微乳液中通过麦克尔加成合成了带正电荷的纳米凝胶,研究了纳米凝胶的化学组成、粒径、分散度、zeta 电位等物理特性和细胞相容性,纳米凝胶结合 siRNA 的能力及其复合物转染 siRNA 的效果.

## 1 实验部分

### 1.1 原料与试剂

支链 PEI800、PEI25K ( $M_w$  分别为 800 和 25000)、噻唑蓝(MTT)、青霉素、链霉素购自 Sigma-Aldrich 公司,丙烯酰氯为市售试剂,使用前蒸馏两次纯化;牛血清白蛋白(BSA)购自加拿大 BBI 公司;Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> 购自 Invitrogen 公司;RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司.聚乙二醇 400(PEG400,  $M_n$  400,美国陶氏化学公司,医药级),反应前用甲苯共沸除水.环己烷、Span 80、Tween 60、十二烷基硫酸钠(SDS)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃(THF)、三乙胺、二氯甲烷均为国药集团化学试剂有限公司产品,其余试剂均为分析纯.实验用水为 MilliQ 水(水的电导率为  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ,测试温度为  $25^\circ\text{C}$ ).siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成,EGFP 的目的序列是 GCAAGCTGACCCTGAAGTTC,正义链是 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCdTdT-3',反义链是 3'-dTdTTCGUUCGACUGGGACUUCAAG-5'.

### 1.2 合成 PEG400-DA

于 500 mL 圆底烧瓶中装入无水二氯甲烷( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 200 mL),三乙胺(TEA, 5.06 g, 50 mmol)及聚乙二醇 400(PEG400, 5 g, 12.5 mmol),在  $0^\circ\text{C}$  的低温浴中搅拌 30 min 后,逐滴加入丙烯酰氯(4.53 g, 50 mmol).滴加完后继续搅拌 12 h,随后转移到  $25^\circ\text{C}$  下继续反应 24 h.反应结束后,过滤以除去三乙胺盐,并将二氯甲烷旋转蒸发,得到粗

产物先用 100 mL 四氢呋喃萃取,有机相再用  $0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{CO}_3$  洗涤 5 遍然后用水再洗涤 3 遍.最后用无水  $\text{MgSO}_4$  干燥,过滤并减压下除去溶剂后得到黏稠状产物.

### 1.3 聚乙烯亚胺-聚乙二醇二丙烯酸酯(PEI-PEG-DA)纳米凝胶的合成及表征

PEI800 和 PEG400-DA 在反相微乳液中通过麦克尔加成反应合成纳米凝胶.在 100 mL 圆底烧瓶中加入 20 g 环己烷,1.25 g Span80 和 3.75 g Tween60,超声形成透明均相乳液.将 30.6 mg PEI800 和 19.4 mg PEG400-DA 分别溶于 1 mL 水中,混合超声后迅速加入到反相微乳液中,超声 10 min 以均匀分散乳液,随后转移至室温搅拌反应 4 天,后用 120 mL THF 破解乳液,  $1.3 \times 10^4 \text{ r/min}$  高速离心上述溶液,弃上清,沉淀用 THF 超声混匀,反复离心(13000 r/min)洗涤 3 次,得到纳米凝胶,减压除去 THF 后用水溶解,冻干,  $4^\circ\text{C}$  保存备用.

核磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )在 AVANCE 300 (300 MHz)型超导核磁共振波谱仪(Bruker,瑞士)上室温测定,PEI-PEG 纳米凝胶以重水为溶剂,PEG400-DA 和支链 PEI800 以氘代氯仿( $\text{CDCl}_3$ )为溶剂,TMS 为内标.红外光谱是将待测物与 KBr 碾磨压制成片后,在 Bruker EQUINOX55 红外光谱仪上测得.粒径和 zeta 电位是用马尔文 Zetasizer Nano ZS90 仪器在  $25^\circ\text{C}$  下测量,分析软件是由马尔文公司提供的 Malvern Dispersion Technology Software 4.20.

### 1.4 扫描电子显微镜(SEM)

将 PEI-PEG 纳米凝胶溶液(1 mg/mL)滴在 230 目包被碳的铜网,室温下晾干后将样品台放入扫描电子显微镜中(日本电子公司 JSM-6700F),抽成真空后进行观察,加速电压为 5 kV.得到 SEM 图片.

### 1.5 细胞生长抑制实验

运用标准 MTT 法来评价纳米凝胶的细胞毒性,所用细胞是处于对数生长期的 MCF-7 细胞.在 96 孔板中按  $10^4$  细胞/孔的密度接种细胞,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 完全培养基(10% FCS + 50 U/mL 青霉素 + 50 U/mL 链霉素),置于  $37^\circ\text{C}$  的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h,然后,弃去原培养基,实验组(纳米凝胶、PEI800 和 PEI25K)每孔加入不同浓度梯度的聚合物 RPMI 1640 完全培养基,对照组加入 100  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 完全培养基,每组 3 个

复孔,37℃继续培养 24 h 后每孔加入 25  $\mu$ L MTT (5 mg/mL) PBS 溶液,继续 37℃孵育 2 h 后,每孔加入 100  $\mu$ L 细胞裂解液(20% SDS + 50% DMF)并于 37℃培养过夜,用酶标仪(Bio-RAD Model 680)在 570 nm 处测得各孔的吸光值(OD 值)。只含完全培养基的 MCF-7 细胞作为对照计算细胞生长抑制率。

### 1.6 纳米凝胶和 BSA 蛋白结合实验

将分别含 1 mg/mL 纳米凝胶、PEI800 和 PEI25K 的 45 mg/mL BSA 溶液置于 37℃恒温水浴箱中,孵育 3 h 后,高速离心 15 min( $2 \times 10^4$  r/min),弃上清,沉淀用水重悬,反复离心( $1.3 \times 10^4$  r/min)洗涤 3 次。用 SDS-PAGE 胶分离纳米凝胶和 BSA 复合物,采用 BIO-RAD 垂直板电泳槽进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度是 15%,浓缩胶浓度为 5%。样品上样液含 2% SDS,5% 巯基乙醇,10% 甘油,0.02% 溴酚蓝的 0.01 mol/L tris-HCl, pH = 8.0。100 V 下 2 h 后终止电泳。用 0.25% 考马斯亮蓝染色液(考马斯亮蓝 R2250 1.25 g, 225 mL 甲醇,45 mL 冰醋酸,定容至 500 mL)染色 1 h,脱色(225 mL 甲醇,45 mL 冰醋酸,定容至 500 mL)3 h,直到背景脱净为止,后在凝胶成像仪上观察分析。

### 1.7 纳米凝胶结合 siRNA 的阻滞实验

在 0.9% NaCl 溶液中,纳米凝胶和 40 pmol siRNA 按不同 N/P 比(纳米凝胶中氮摩尔含量与 siRNA 中磷摩尔含量的比率)混合,室温静置 30 min。上述纳米凝胶/siRNA 复合物溶液用非变性的聚丙烯酰胺胶分析。同样采用 BIO-RAD 垂直板电泳槽进行电泳。分离胶浓度是 10%,浓缩胶浓度为 5%。样品上样液含 10% 甘油,0.4% orange G 的 0.01 mol/L tris-HCl, pH = 8.0。95 V 下电泳 2 h 后,取出胶模,将分离胶置入 0.4% 溴化乙锭(EB)染色 5 min,后在紫外灯下观察电泳结果并照相。

### 1.8 纳米凝胶转运 siRNA

在 24 孔板中以  $4 \times 10^4$  细胞/孔的密度接种能稳定表达绿色荧光蛋白质(GFP)的 MCF-7 KMRV(一种能稳定表达 GFP 蛋白的 MCF-7 细胞系)细胞,每孔加入 1 mL RMPI 1640 完全培养基(10% FCS + 50 U/mL 青霉素 + 50 U/mL 链霉素)。置于 37℃的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 23 h 后,用无抗生素的 RMPI 1640 + 10% FCS 培养基替换原来的培养基,并继续培养 1 h。纳米凝胶与 40 pmol siRNA 按 N/P = 50 制备成纳米凝胶/siRNA 复合物。静置 30

min 后,加入到上述无抗生素的细胞中。以 Lipofectamine 2000™/siRNA(含 siRNA,复合物制备及转染实验步骤参照提供商说明)作为阳性对照,游离 siRNA 作为阴性对照。48 h 后,在倒置荧光显微镜(尼康 TE 2000)下观测 KMRV 细胞中绿色荧光蛋白表达情况。

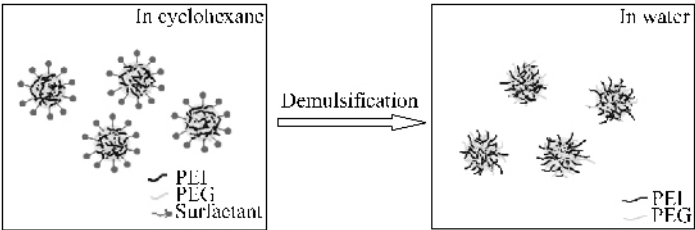
## 2 结果和讨论

### 2.1 纳米凝胶的合成及表征

PEG400-DA 是利用 PEG400 与丙烯酰氯反应制备得到,产率为 54%,类似的方法已经在文献中有报道<sup>[32]</sup>。PEI800 和 PEG400-DA 单体在反相微乳液中通过迈克尔加成聚合生成亲水性的纳米凝胶。PEI800 含有可质子化氮离子,故可以通过静电作用吸附带负电荷的 siRNA(siRNA 中的磷酸基团带负电荷)。PEG400-DA 可以赋予纳米凝胶良好的生物相容性,亲水性和稳定性。目前已有许多 PEG 衍生物用来增加蛋白质、脂质体、纳米颗粒的生物相容性,亲水性和稳定性,并延长其在体内的循环。

反相微乳液聚合是将水溶性单体溶于水中,然后借助于乳化剂分散于非极性液体中,形成油包水型(W/O)状态分散在油中(油为连续相)而进行聚合。此法实验装置简单、操作容易,并且可以人为控制粒径,而且微乳液属于热力学稳定体系,所得乳粒表面包有一层表面活性剂保护层,不易发生团聚。本研究采用以环己烷为油相,Span 80 和 Tween 60 为表面活性剂的反相微乳液体系合成纳米凝胶,环己烷、Span 80、Tween 60、水的重量比为 20/1.25/3.75/2。由这个比例所形成的反相微乳液粒径为 80 nm,分散度也比较小(PDI =  $0.175 \pm 0.090$ ),如图 1 所示,这说明此反相微乳液能形成粒径均一,大小合适的“微反应器”,非常适合形成分散度窄的纳米颗粒。PEI800 和 PEG400-DA 在表面活性剂包被的水中通过迈克尔加成反应生成结构成空间网状的纳米凝胶,如示意图 1 所示。聚合完成后,用过量的 THF 破乳,高速离心得到纳米凝胶。通过 THF 反复洗涤除去环己烷和表面活性剂,最后减压除去 THF,得到纳米凝胶,产率为 55%。

图 2 为纳米凝胶的扫描电镜图片,可以看出纳米凝胶为直径约 60 nm 左右的球体;而动态光散射所测的纳米凝胶粒径在 180 nm(图 1),与 SEM 照片显示粒径差异较大,这与文献[33]中报



Scheme 1 Schematic illustration of the nanogel synthesis using inverse microemulsion method

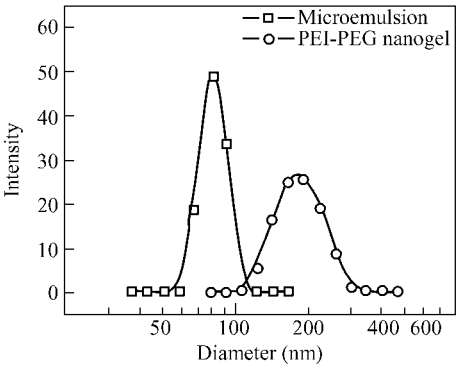


Fig. 1 Particle sizes distributions of microemulsion in cyclohexane and PEI-PEG nanogel in water measured by DLS

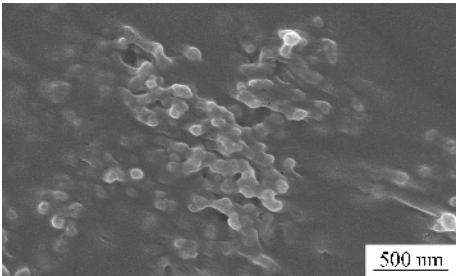


Fig. 2 SEM image of PEI-PEG nanogel

道的纳米凝胶溶胀前后的粒径变化相符.上述现象是因为动态光散射测得的粒径,是其在水溶液中处于完全溶胀状态下的结果,而 SEM 照片中的纳米凝胶是处于干燥状态.纳米凝胶在电镜下观察的和动态光散射所测得的粒径比,即纳米凝胶在湿态和干态的粒径比,大约为 3,这也说明合成的纳米凝胶是一种网状结构,在水溶液中具有良好的溶胀性能.

图 3 是 PEI800、PEG400-DA、纳米凝胶的核磁共振氢谱 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 和红外光谱图.从图 3(A) 中可以看到,相对于 PEG400-DA 和 PEI800,纳米凝胶谱图中 PEI 和 PEG 的特征峰都存在,而在  $\delta = 5.85, 6.15$  和  $6.45$  不饱和双键峰却消失,这表明

纳米凝胶是由 PEG400-DA 和 PEI 交联反应生成.在图 3(B) 的红外谱图中,与 PEG400-DA 相比,纳米凝胶在  $1670\text{ cm}^{-1}$  处也没有出现双键的伸缩振动峰,表明双键参与了交联反应.

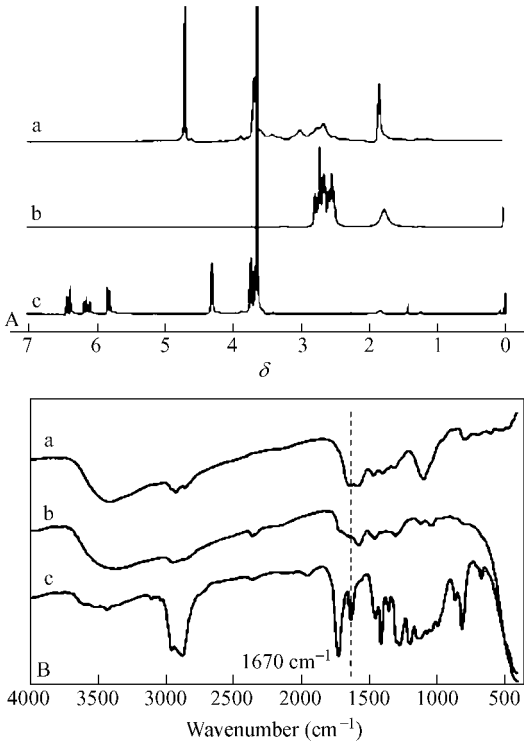


Fig. 3  $^1\text{H-NMR}$  (A) and FTIR (B) of PEI-PEG nanogel (a), PEI800 (b), and PEG400-DA (c)

2.2 纳米凝胶的细胞毒性评价

采用 MTT 法检测纳米凝胶针对 MCF-7 细胞系的细胞毒性.图 4 显示了不同浓度的纳米凝胶在与 MCF-7 细胞共培养 24 h 后的相对细胞活力.纳米凝胶在浓度高达到  $1\text{ mg/mL}$  时,相对细胞活力仍然在 90%,这说明在浓度高达  $1\text{ mg/mL}$  时,纳米凝胶都没有显示明显的细胞毒性.同样低分子量的 PEI800 在高浓度下也没有显示出细胞毒性.相比之下,分子量为 25 kD 的 PEI (PEI25K) 则表现出非常大的毒性.阳离子聚合物的细胞毒性可

能是由于聚合物在细胞表面的聚集,而引起重要的细胞膜功能损伤<sup>[34]</sup>,相对于 PEI25K,PEI-PEG 纳米凝胶的相对低毒性可能源自其低分子量的 PEI 和 PEG 的改性.因此,相对于常用的转染聚合物 PEI25K,纳米凝胶具有更好的细胞相容性.

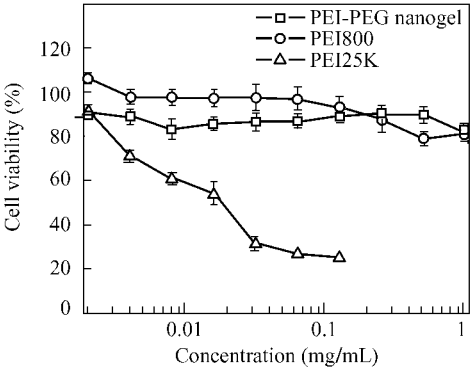


Fig. 4 Relative cell viability of MCF-7 cells after 24 h incubation with PEI-PEG nanogel, PEI800 and PEI25K

2.3 纳米凝胶和 BSA 结合实验

吸附在纳米颗粒表面的蛋白是纳米颗粒在血液中稳定性的一个重要参数<sup>[35]</sup>.已有文献报道选用 SDS-PAGE 分析纳米颗粒蛋白复合物<sup>[36]</sup>.我们选用纳米凝胶和生理浓度一致的 BSA 的相互作用来反映纳米凝胶在体内的稳定性.纳米凝胶和 BSA 在 37℃ 培养 3 h 后,高速离心,用 SDS-PAGE 来分析沉淀物的蛋白含量.如图 5 所示,游离的 BSA 中没有可见的蛋白条带,PEI800 中蛋白条带比较浅,可能因为小分子量的 PEI 结合 BSA 后,由于 PEI 分子量小,不易通过离心方法来分离.相对于常用的转染聚合物 PEI25K,纳米凝胶结合的蛋白量非常少,这主要是因为纳米凝胶中的 PEG 链段具有良好的抗蛋白黏附作用.这说明纳米凝胶

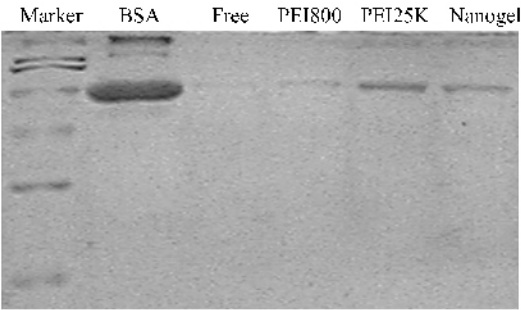


Fig. 5 SDS/PAGE analysis of precipitated fractions from the centrifugation of PEI25K and PEI-PEG nanogel in BSA solution. Lane 2 and lane 3 represent 10  $\mu$ g of BSA standard and BSA treated with saline instead of nanogel under the same procedure, respectively.

在体内血液环境中可能具有良好的稳定性,和在体内长循环的潜能.

2.4 纳米凝胶结合 siRNA 的凝胶阻滞试验

纳米凝胶的 zeta 电位为 37.9 mV,表明其可能通过静电结合带负电荷的 siRNA.在电场中,当 siRNA 被带正电荷的纳米凝胶结合后,有两种效应.第一种是相对分子量加大,泳动速度减慢甚至停滞;第二种是负电荷减弱,正电荷增强,使电泳速度甚至方向发生改变.我们保持定量 siRNA (40 pmol),改变 N/P 比,通过纳米凝胶结合 siRNA 延滞实验来研究纳米凝胶结合 siRNA 的能力.如图 6 所示,在  $N/P \geq 5$  时,相对于游离的 siRNA,纳米凝胶和 siRNA 复合物中就只能观察到极少量的 siRNA,且位置比游离 siRNA 靠后,应该是纳米凝胶和 siRNA 的复合物的泳动速度减慢所致.当 N/P 为 50 时,已基本没有亮带出现,表明 siRNA 已基本被完全结合.

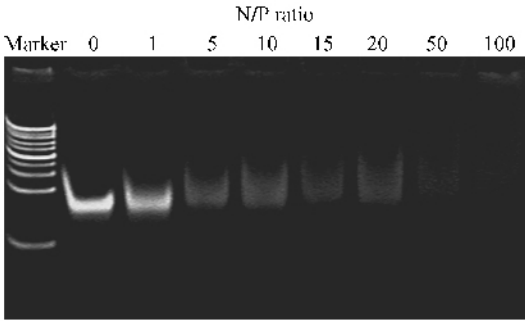


Fig. 6 Electrophoretic mobility of siRNA in nanogel/siRNA complexes at different N/P ratios

2.5 纳米凝胶运输 siRNA 沉默 GFP 的表达

我们选用经典的 GFP 基因沉默来评价纳米凝胶运载的 siRNA 的能力.纳米凝胶/siRNA 复合物转染 MCF-7 KMRV 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察 GFP 蛋白的表达情况.结果如图 7 所示,相对于游离的 siRNA,纳米凝胶/siRNA 复合物孔中绿色荧光强度明显减弱,效果与 Lipofectamine 2000TM/siRNA 复合物接近,提示 GFP 蛋白表达水平下降.而相对于阴性对照,游离 siRNA 没有显示明显的绿色荧光减弱,即 GFP 蛋白表达下降没有改变.先前已经证明纳米凝胶在浓度高达 1 mg/mL 时对细胞没有明显的毒性,说明纳米凝胶不会引起 KMRV 细胞蛋白表达水平的下降.从而证明纳米凝胶/siRNA 复合物能运载 siRNA 到 MCF-7 KMRV 细胞中沉默 GFP 基因而引起 GFP 蛋白表达水平下降.

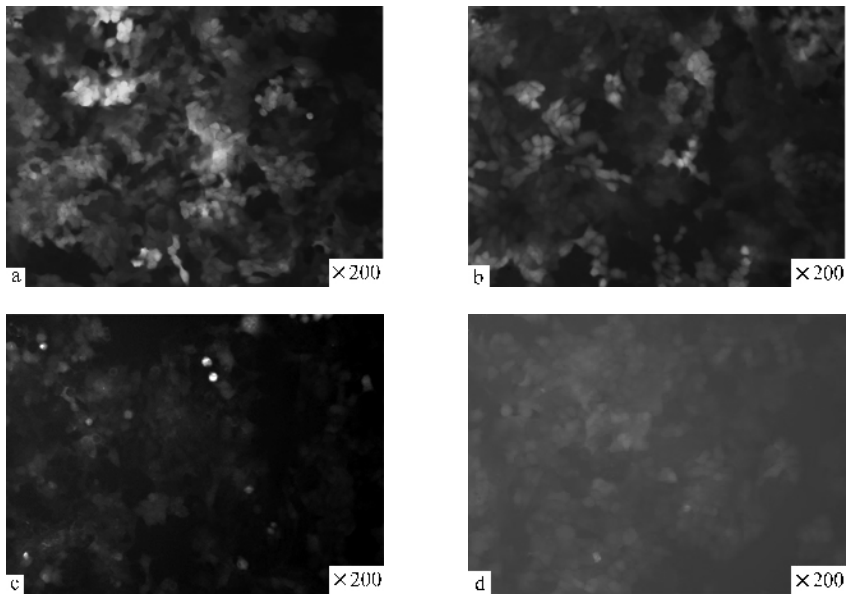


Fig. 7 Fluorescent microscope images of siRNA-transfected MCF-7 KMRV cells  
a) naked siRNA ; b) Negative control ; c) Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>/siRNA complex ; d) Nanogel/siRNA complexes at N/P = 50

3 结论

合成了一种可以结合并输送 siRNA 的 PEI-PEG 纳米凝胶,这种纳米凝胶具有合适的尺寸,良好的生物相容性和抗蛋白吸附功能.纳米凝胶可以结合并输送 siRNA 进入细胞内达到沉默 GFP 基因的效果.纳米凝胶富含铵离子,是具有活性的

反应性基团,可以进一步键连一些生物靶向分子如生物素、转铁蛋白、血管表面生长因子等肿瘤细胞,以达到主动靶向的目的.同时,纳米凝胶的中空网状结构也可以包载一些亲水性抗癌药物(如阿霉素),以达到化学药物与基因药物联合治疗的目的,在癌症治疗的 siRNA 和药物输运中具有良好应用前景.

REFERENCES

1 Fire A,Xu S,Montgomery M K,Kostas S A,Driver S E,Mello C C. Nature,1998,391 806 ~ 811  
2 McManus M T,Sharp P A. Nat Rev Genet,2002,3 737 ~ 747  
3 Dykxhoorn D M,Lieberman J. Cell,2006,126 231 ~ 235  
4 de Fougerolles A,Vornlocher H P,Maraganore J,Lieberman J. Nat Rev Drug Discov,2007,6 443 ~ 453  
5 Couzin J. Science,2002,298 2296 ~ 2297  
6 Melnikova I. Nat Rev Drug Discov,2007,6 341 ~ 342  
7 Torchilin V P. Adv Drug Deliv Rev,2006,58 1532 ~ 1555  
8 Weissleder R. Nat Biotechnol,2001,19 316 ~ 317  
9 Satchi-Fainaro R,Puder M,Davies J W,Tran H T,Sampson D A,Greene A K,Corfas G. Nat Med,2004,10 255 ~ 261  
10 Bromberg L. J Control Release,2008,128 99 ~ 112  
11 Azzam T,Eliyahu H,Shapira L,Linial M,Barenholz Y,Domb A J. J Med Chem,2002,45 1817 ~ 1824  
12 Azarmi S,Roa W H,Lobenber R. Adv Drug Deliv Rev,2008,60 863 ~ 875  
13 Ogris M,Brunner S,Schuller S,Kirchels R,Wagner E. Gene Ther,1999,6 595 ~ 605  
14 Jeong G J,Byun H M,Kim J M,Yoon H,Choi H G,Kim W K,Kim S J. J Control Release,2007,118 118 ~ 125  
15 Vinogradov S V. Curr Pharm Des,2006,12 4703 ~ 4712  
16 Oh J K,Drumright R,Siegwart D J,Matyjaszewski K. Prog Polym Sci,2008,33 448 ~ 477  
17 Antonietti M. Macromol Symp,1995,93 213 ~ 225  
18 Antonietti M,Bremser W,Schmidt M. Macromolecules,1990,23 3796 ~ 3805  
19 Antonietti M,Pakula T,Bremser W. Macromolecules,1995,28 4227 ~ 4233

- 20 Guo Zhenliang(郭振良), Wang Jintang(王锦堂), Zhu Hongjun(朱红军). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2001, (4): 489 ~ 493
- 21 Kohli E, Han H Y, Zeman A D, Vinogradov S V. J Control Release, 2007, 121: 19 ~ 27
- 22 Xu Dongmei(徐冬梅), Hong Jun(洪军), Sun Hanwen(孙汉文), Gong Peijun(宫陪军), Dong Li(董黎), Sheng Kanglong(盛康龙), Yao Side(姚思德). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2007, (4): 389 ~ 393
- 23 Nagarajan R, Ruckenstein E. Langmuir, 2000, 16: 6400 ~ 6415
- 24 McAllister K, Sazani P, Adam M, Cho M J, Rubinstein M, Samulski R J, DeSimone J M. J Am Chem Soc, 2002, 124: 15198 ~ 15207
- 25 Gaur U, Sahoo S K, De T K, Ghosh P C, Maitra A, Ghosh P K. Int J Pharm, 2000, 202: 1 ~ 10
- 26 Gupta A K, Madan S, Majumdar D K, Maitra A. Int J Pharm, 2000, 209: 1 ~ 14
- 27 Vinogradov S, Batrakova E, Kabanov A. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 1999, 16: 291 ~ 304
- 28 Neu M, Germershaus O, Behe M, Kissel T. J Control Release, 2007, 124: 69 ~ 80
- 29 Petersen H, Fechner P M, Martin A L, Kunath K, Stolnik S, Roberts C J, Fischer D. Bioconjugate Chem, 2002, 13: 845 ~ 854
- 30 Sirsi S R, Williams J H, Lutz G J. Human Gene Therapy, 2005, 16: 1307 ~ 1317
- 31 Kim S H, Jeong J H, Lee S H, Kim S W, Park T G. J Control Release, 2008, 129: 107 ~ 116
- 32 Sawhney A S, Pathak C P, Hubbell J A. Macromolecules, 1993, 26: 581 ~ 587
- 33 Oh J K, Siegwart D J, Matyjaszewski K. Biomacromolecules, 2007, 8: 3326 ~ 3331
- 34 Ryser H J. Nature, 1967, 215: 934 ~ 936
- 35 Wang Y, Ke C Y, Beh C W, Liu S Q, Goh S H, Yang Y Y. Biomaterials, 2007, 28: 5358 ~ 5368
- 36 Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggard T, Donnelly S C, Cagney G, Linse S, Dawson K A. Angew Chem Int Ed, 2007, 46: 5754 ~ 5756

## SYTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLYETHYLENIMINE-POLY(ETHYLENE GLYCOL) DIACRYLATE NANOGEL AS A siRNA CARRIER

LI Laisheng<sup>1</sup>, TONG Jing<sup>2</sup>, WU Juan<sup>1</sup>, DU Jinzhi<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Polymer Science and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

(<sup>2</sup> School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

(<sup>3</sup> Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, Hefei 230027)

**Abstract** Delivery of synthetic small interfering RNA (siRNA) remains the major obstacle to the therapeutic application of RNA interference. A novel nanogel that composed of hydrophilic polyethylene glycol and cationic polyethylenimine for siRNA delivery was synthesized and characterized. The nanogel was synthesized *via* inverse microemulsion polymerization of polyethylenimine with  $M_w = 800$  and poly(ethylene glycol) diacrylate ( $M_w = 400$ ). The successful synthesis of the nanogel was demonstrated by <sup>1</sup>H-NMR, FTIR characterizations. Dynamic light scattering measurements show that the nanogels have an average size of 180 nm, while the nanogels are positively charged with a zeta potential of 37.9 mV. Such nanogel is suitable for siRNA loading by electrostatic interaction, which has been further demonstrated by gel retardation assay. The cytotoxicity of nanogel against MCF-7 cells was evaluated using MTT method and it showed no significant cytotoxicity effect even at high concentration up to 1.0 mg/mL. The siRNA delivery efficiency of nanogel was evaluated by silencing green fluorescent protein (GFP) expression in MCF-7 KMRV cells that stably expressed GFP. The results indicated that the nanogel induced high gene silencing effect, which was comparable to that of Lipofectamine 2000TM. With proper particle size, strong siRNA binding ability and efficient gene silencing function, this nanogel/siRNA formulation is potential for efficient siRNA delivery in therapeutical application.

**Keywords** Inverse microemulsion, RNAi, SiRNA carrier, Nanogel, Gene therapy