

用于基因传输及磁共振显像的聚乙烯亚胺-*g*- 聚己内酯共聚物的合成与表征^{*}

苑仁旭¹⁺ 左瑜芳²⁺ 肖中鹏¹ 黄文林² 帅心涛^{1**}

(¹中山大学化学与化学工程学院 广州 510275) (²中山大学肿瘤防治中心 广州 510060)

摘 要 采用可生物降解的聚己内酯改性聚乙烯亚胺,得到两亲性的接枝共聚物(PEI-*g*-PCL).该共聚物通过溶剂挥发法在水中自组装形成纳米粒子,其内部负载有超顺磁性四氧化三铁纳米粒子(SPIO)及质粒DNA(pDNA).研究表明,PEI-*g*-PCL聚合物自组装形成的颗粒为胶束状,无论是否负载SPIO纳米粒子都可以有效地负载pDNA,并对293细胞具有较高的转染效率.此类载体有望在基因转染的过程中利用磁共振手段进行实时、无创观测.

关键词 聚乙烯亚胺,聚己内酯,胶束,基因传输

基因治疗的关键是选择合适的方式,将该基因安全、高效地传输到特定的细胞中.聚乙烯亚胺(PEI)是目前最有效的基因传输聚合物,在PEI上引入一些亲油基团可以降低聚合物与质粒DNA(pDNA)间的相互作用,并同时增加复合物与细胞膜间的作用,有利于基因的转染和细胞对复合物的内吞. PEI被胆固醇^[1~3]、脂肪酸^[4]、聚酯^[5]、聚谷氨酸苄酯(PBLG)^[6,7]等亲油性物质改性已经被报道.相对于PEI均聚物,上述改性PEI载体复合pDNA后转染效率都有所提高且细胞毒性下降.此外,采用亲油性基团改性聚赖氨酸及树枝状大分子聚酰胺-胺(PAMAM)也已取得了类似的结果^[8~11].

与此同时,聚合物载体作为多功能肿瘤治疗平台的相关研究已受到了极大的关注.有文献报道用聚合物胶束作为磁共振显像(MRI)对比剂和抗肿瘤药物的双功能载体^[12,13],此类传输载体可以在进行疾病治疗的同时使用MRI监测治疗效果.超顺磁性氧化铁纳米粒子(SPIO)即是一种用途非常广泛的磁共振显像对比剂,而关于基因与SPIO结合的多功能载体研究尚鲜见报道.据此,本文设计了一种可以同时负载基因与显像试剂的聚合物载体,即采用亲油性聚己内酯(PCL)改性聚乙烯亚胺得到两亲性接枝共聚物PEI-*g*-PCL,其自组装形成的胶束的内核负载SPIO、外壳负载基因,以此来验证其作为多功能载体的可行性.

1 实验部分

1.1 试剂

十二醇,国药集团化学试剂有限公司,分析纯;辛酸亚锡(Sn(Oct)₂),Sigma,99%; ϵ -己内酯,Fluka,99%;4-二甲氨基吡啶(DMAP),Fluka,99%;PEI(25 kDa),BASF;*N,N'*-二环己基碳酰亚胺(DCC),国药集团化学试剂有限公司, $\geq 98\%$;四唑盐(MTT) Sigma,99%;超顺磁性四氧化三铁按文献[14]报道的方法合成,粒径为6 nm;RPMI1640培养基,Gibco.

1.2 仪器

产物的化学结构通过VARIAN Mercury-Plus 300型核磁共振仪进行分析鉴定;FT-IR, Nicolet/Nexus 670 红外光谱仪,样品均为KBr压片,扫描波长500~4000 cm⁻¹;GPC, Waters 凝胶渗透色谱仪(1525 Binary HPLC Pump, Waters 2414 Refractive Index Detector), Styragel[®] 7.8 $\times$ 300 mm HT3 色谱柱, THF为洗脱剂,洗脱速度1 mL/min,柱温30℃,标样为单分散聚乙二醇(PEG);胶束形貌采用热场发射环境扫描电镜(Quanta 400 FEG SEM)及TEM(JEOL JEM-2010HR)进行观测;胶束粒径采用Brooken Haven BI-200SM 动静态激光光散射仪进行测定,入射激光波长 $\lambda = 532$ nm,入射角 $\theta = 90^\circ$,温度为25℃;基因转染结果通过倒置荧光显微镜观测(Leica);凝胶电泳仪(北京市六一仪器产, DYY-III-7型),凝胶成像系统(Bio-RAD);流式

^{*} 2008-08-05 收稿,2008-09-25 修稿 国家自然科学基金(基金号 50673103)、博士点基金(基金号 20060558083)及广东省自然科学基金(基金号 7003703)资助项目; + 作者对本文有同等贡献; ** 通讯联系人, E-mail: shuaxt@mail.sysu.edu.cn

细胞计数仪(BECKMAN-COULTER,FC500)。

1.3 实验过程

1.3.1 聚(ϵ -己内酯)(PCL-OH)的合成 把 1.5 g 干燥的十二醇加入两口烧瓶中,70℃下真空干燥 8 h,加 3 滴 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ 继续干燥 0.5 h,然后加入 20 mL 干燥的 ϵ -己内酯,在 105℃搅拌反应 24 h,冷却后加入 5 mL 乙醇溶解未反应的 ϵ -己内酯,过滤,粗产品溶于 15 mL 四氢呋喃,沉淀在大量无水乙醚中,过滤后干燥得白色粉末状产物,产率 95%。

1.3.2 聚(ϵ -己内酯)丁二酸酯(PCL-COOH)的合成 把 5 g PCL-OH ($M_n = 2260$)加入两口烧瓶中,70℃下真空干燥 8 h,溶于 30 mL 三氯甲烷后加入 0.96 g 丁二酸酐,70℃回流反应 48 h,冷却后沉淀在冷乙醇中,离心,除掉上清液,室温真空干燥得白色粉末状产物,产率 86%。

1.3.3 聚己内酯接枝支化聚乙烯亚胺(PEI-g-PCL)的合成 参考文献中的方法^[15],把 500 mg PEI 加入到 50 mL 两口烧瓶中,70℃真空干燥 8 h,加入 20 mL 三氯甲烷,待聚合物溶解后加入 520 mg PCL-COOH ($M_n = 2260$),84 mg DCC 与 50 mg DMAP,室温反应 24 h. 所得混合溶液用透析袋(MWCO = 3.5 kDa)在三氯甲烷中透析 24 h,然后在无水乙醚中重沉淀,过滤干燥得白色黏稠状产物,产率 78.9%。

1.3.4 PEI-g-PCL 胶束的制备 称取 5 mg SPIO、20 mg PEI-g-PCL 溶于 3 mL 三氯甲烷中(空白胶束不加 SPIO),把上述溶液在超声作用下逐滴加入 20 mL 蒸馏水中,挥发除去三氯甲烷,用孔径为 220 nm 针头过滤器过滤,所得产物置于 4℃下保存备用,并采用动态光散射及电泳表征此类胶束。

1.3.5 琼脂糖凝胶电泳实验 在 0.9% 的 NaCl 溶液中,将材料 PEI-g-PCL、PEI-g-PCL-SPIO 按氮磷比(N/P)比 1、2、3、4、5 和 10 分别与携带绿色荧光蛋白报告基因的质粒(pEGFP-C2)在室温复合 15 min,然后与 $6 \times \text{DNA}$ 上样缓冲液混合,分别取 10 μL 样品在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳 45 min 后(电压 100V),溴乙锭染色,在紫外光下观察结果。

1.3.6 细胞转染实验 RPMI1640 加 10% 磷酸盐缓冲液培养的 293 细胞,以 4×10^4 细胞/孔接种在 24 孔板上,37℃下在 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,转染前换成不加血清的 RPMI1640. 以每孔转染 1 μg pEGFP-C2 计算,将聚合物按不同 N/P 比的量

与质粒混合,短暂振荡后室温复合 20 min,然后将该复合物加入对应的孔中,在 37℃下培养 4 h,吸弃转染液,加入含 10% 磷酸盐缓冲液的 RPMI 1640 培养基继续培养 24 h,在倒置荧光显微镜下观察转染效率。

2 结果与讨论

2.1 PEI-g-PCL 的合成

PEI-g-PCL 的合成路线如图 1 所示,用十二醇作为引发剂,以 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ 催化 ϵ -己内酯开环聚合得到端羟基聚己内酯(PCL-OH). 为了把 PCL 接枝到 PEI 上,首先采用丁二酸酐把其端基转化为可以与氨基反应的羧基(PCL-COOH). PCL-OH 与 PCL-COOH 的核磁谱如图 2 所示. 图 2 (A)中质子特征化学位移归属分别为, $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ) 0.9 (s, 3H, $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{O} -$), 1.25 (s, 22H, $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{O} -$), 1.40 (m, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{O} -$), 1.69 (m, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{O} -$), 2.32 (t, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{O} -$), 3.6 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.05 (t, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} -$). $\delta = 0.9$ 和 2.3 两处质子特征峰的积分面积比可以计算出 PCL-OH 的分子量,计算公式为 $M_n = 185 + 3/2(I_{2.3}/I_{0.9}) \times 114$. PCL-OH 由核磁计算得 $M_n = 2260$,而由 GPC 测得 $M_n = 2620$,分子量分布为 1.34,两者相近,且与设计分子量基本相符合. 对比两图可以发现图 2(B)中,与端羟基相连的亚甲基上的质子对应的化学位移消失($\delta = 3.6$),相应地在 $\delta = 2.65$ 处出现了新的化学位移,应该归属于丁二酸酯上亚甲基的质子($-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). 以上结果可以证明 PCL-OH 上的羟基已经转化为羧基,由核磁积分面积可以计算出端基转化率在 90% 以上,由核磁计算得到 PCL-COOH 的分子量为 2360。

采用 DCC/DMAP 作为催化剂,使 PCL-COOH 上的羧基与 PEI 上的氨基发生酰胺化反应. 从图 3 可以看出,除了 PCL 段上对应的质子化学位移外,在 $\delta = 2.5 \sim 2.9$ 处出现了 PEI 上 $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{NH}-$ 的质子化学位移. 同时,在 PEI-g-PCL 红外光谱中,不仅出现了 PCL 链段上 $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ 羧基在 1730 cm^{-1} 处的振动吸收峰和 PEI 上氨基在 3415 cm^{-1} 处的振动吸收峰,而且在 1658 cm^{-1} 处出现了酰胺化反应生成的 $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ 的特征峰。

成的 3 种聚合物的临界胶束浓度在 0.05 mg/mL 以下(茚三酮法). 胶束内部通常可以负载亲油性药物或蛋白质, 外部则负载基因, 从而成为多功能载体. 本文把亲油性的 Fe_3O_4 纳米粒子负载到胶束内部. PEI 上含有的大量氨基使胶束表面带有正电, 可以与带负电的 pDNA 通过静电作用复合. 复合后的胶束粒子能够作为潜在的 MRI 对比剂

与基因双载体. 本文采用溶剂挥发法制备 PEI-*g*-PCL 胶束. 为了确定样品的形貌与粒径, 在扫描电子显微镜 (SEM) 下进行了观测. 从图 4(a) 中可以看出, 胶束的粒径范围在 110 ~ 150 nm, 呈球状. 负载 SPIO 胶束的 TEM 的结果见图 4(b), 可以看到团簇状的 SPIO 聚集, 证明磁性粒子包裹在胶束之中.

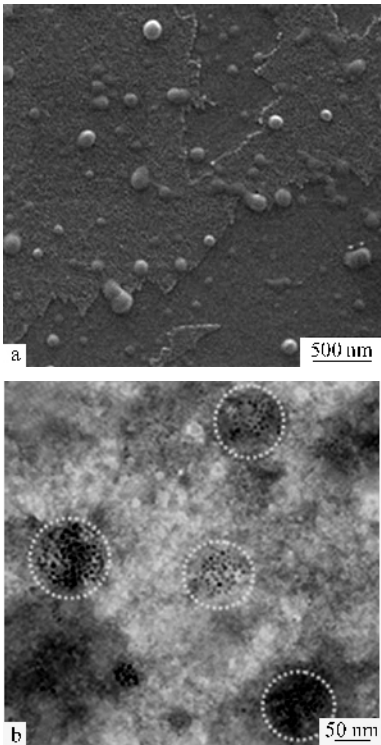
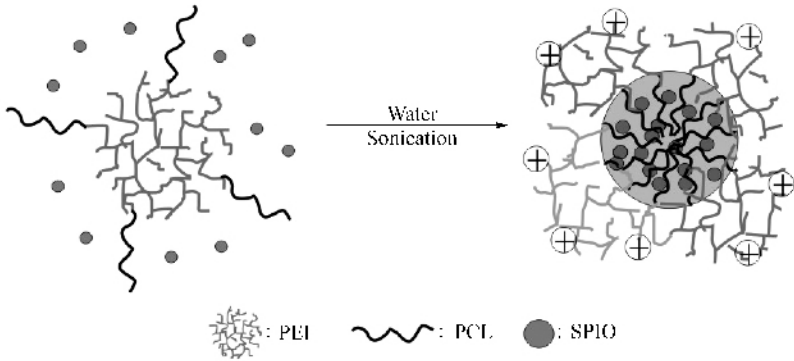


图 4 Scanning electron microscopy (SEM) images of PEI-*g*-PCL-2 micelle (a), and transmission electron microscopy (TEM) image of SPIO loaded micelle (b)
Four nanoparticles as examples were marked with dotted circles.

用动态光散射测定空白胶束和负载 6 nm SPIO 的胶束的粒径, 结果如图 5 所示. 其粒径范

围在 130 ~ 160 nm 之间, 粒径随着 PCL 链接枝率的增加而增大. 因为在水溶液中, 亲水性的 PEI 在胶束表面自由伸展, 而亲油性 PCL 则处于内部, 形成胶束的内核, 它的大小直接决定着胶束的粒径大小. 另一方面, 空白胶束与负载 SPIO 胶束的粒径没有明显差别. 如示意图 1 所示, SPIO 处于胶束内部, 并未真正占有流体力学体积, 因而也并未增加胶束的粒径. DLS 测得粒径大 SEM 观测到的结果, 这是由于 DLS 测定的是样品的总流体力学体积, 既包括疏水性的内核又包括亲水性的壳, 在水溶液中亲水性的 PEI 比较伸展, 而在干燥的 SEM 样品中, 亲水性的 PEI 外壳会随着水分的挥

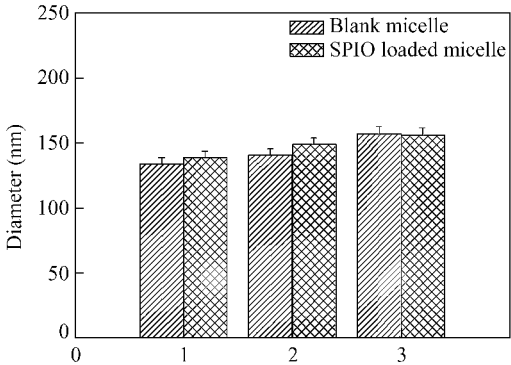


Fig. 5 Dynamic light scattering (DLS) histogram of blank polymeric micelles and 6 nm SPIO loaded micelles based on PEI-*g*-PCL copolymer (1 PEI-*g*-PCL-1, 2 PEI-*g*-PCL-2, 3 PEI-*g*-PCL-3)

发出现场陷,导致用 SEM 观测到的样品粒径偏小.

2.3 PEI-*g*-PCL 复合 pDNA 的能力

聚合物作为基因载体的必要条件是可以浓缩 DNA,即带有正电荷,因为浓缩的过程正是通过载体正电荷与 pDNA 负电荷间的静电作用来实现的. PEI-*g*-PCL 胶束的表面电位在 + 30 ~ 40 mV 之间,其复合 pDNA 的能力采用凝胶阻滞实验证明. 在凝胶电泳中,由于电场的作用,裸露的 DNA 朝正电极移动的距离与其分子量的对数成反比. 如

果此时 DNA 分子与某种载体结合,其在凝胶中的迁移作用便会受到阻滞,在特定的电压和时间内朝正电极移动的距离也就相应地缩短了. 琼脂糖凝胶电泳被用来研究 PEI-*g*-PCL 对 DNA 的复合效果. 图 6 给出了聚合物对 DNA 的阻滞实验结果. 从中可以看出随着 N/P 比的增加,复合物的电泳移动能力降低, N/P 比在 3 以上时能完全阻滞 DNA 的迁移,表明该胶束载体对 DNA 的浓缩效果好,形成的粒子致密. PCL 接枝对质粒的复合效果与纯 PEI 的复合能力相当,但比之前文献报道的

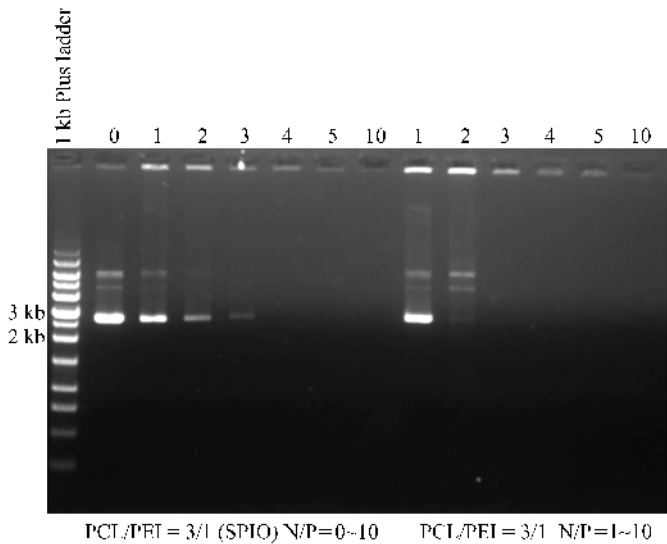


Fig. 6 Determination of DNA binding by gel retardation assay
Plasmid DNA is complexed with PEI-*g*-PCL-2-SPIO or PEI-*g*-PCL-2 at various N/P ratios and loaded into an agarose gel ;
Complexation of DNA prevents migration into gel.

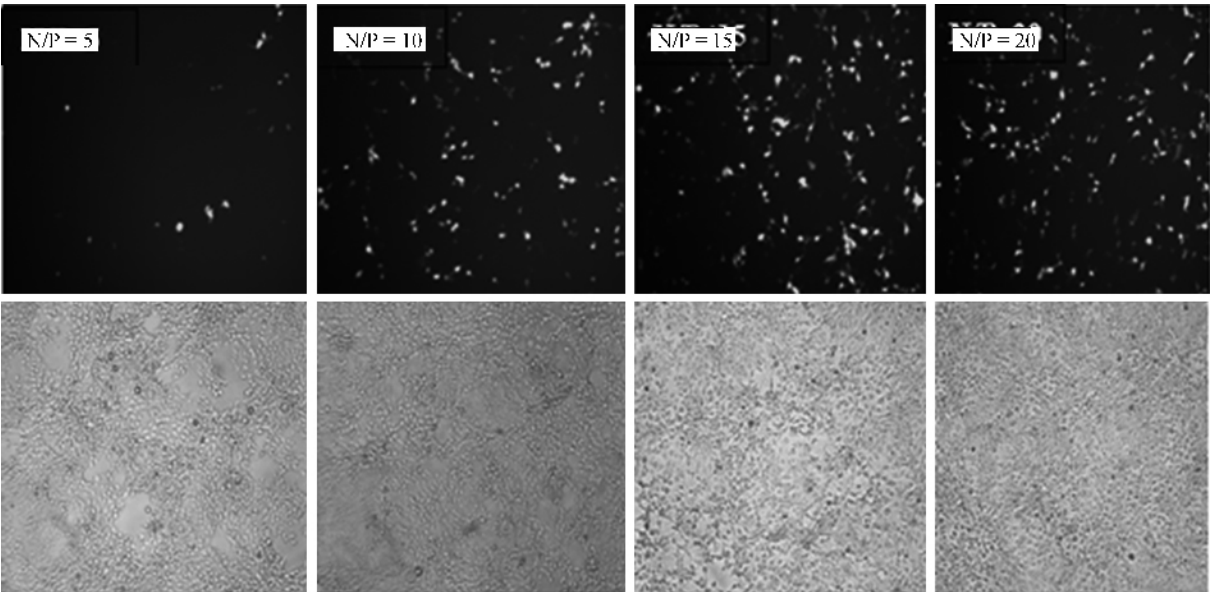


Fig. 7 Fluorescent microscope images of 293 cells tansfected with PEI-*g*-PCL-2-SPIO/pDNA complexes, at N/P = 5,10,15,20, respectively

两亲性 PEI 的复合能力强^[16]。载体引入 SPIO 后,其对 DNA 的复合能力并未受到影响。DLS 测试显示 PEI-*g*-PCL 胶束与 pDNA 所形成的复合物的粒径在 200 nm 左右。这也表明,该载体有望同时具有基因传输和 MR 显像功能。

2.4 PEI-*g*-PCL 细胞转染实验

用负载 SPIO 的 PEI-*g*-PCL-2 胶束 (PEI-*g*-PCL-2-SPIO) 复合可以表达绿色荧光蛋白的 pDNA (pEGFP-C2) 后转染 293 细胞,在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光强度,如图 7 所示。在 N/P = 5 ~ 20 的范围内,荧光强度逐渐增强,表明转染效率逐渐

提高,N/P = 15 时用流式细胞计数仪检测 PEI-*g*-PCL-2-SPIO/pEGFP-C2 的转染效率达到 70%。

3 结论

把 PCL 接枝到 PEI 上,制备了两亲性接枝共聚物。¹H-NMR 及 FT-IR 的表征证明合成了目的产物。该两亲性聚合物在水溶液中可自组装成球状胶束,能够同时负载 SPIO 和 pDNA,并对 293 细胞具有较高的转染效率。因此,此类载体具有作为 MRI 可见基因载体的潜力。

REFERENCES

- 1 Han S H, Mahato R I, Kim S W. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12: 337 ~ 345
- 2 Furgeson D Y, Cohen R N, Mahato R I, Kim S W. *Pharm Res*, 2002, 19: 382 ~ 390
- 3 Furgeson D Y, Chan W S, Yockman J W, Kim S W. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 840 ~ 847
- 4 Brownlie A, Uchegbu I F, Scätzlein A G. *Int J Pharm*, 2004, 274: 41 ~ 52
- 5 Wang C H, Hsiue G H. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 391 ~ 396
- 6 Tian H Y, Chen X S, Lin H, Deng C, Zhang P B, Wei Y, Jing X B. *Chem Eur J*, 2006, 12: 4305 ~ 4312
- 7 Tian H Y, Xiong W, Wei J Z, Wang Y, Chen X S, Jing X B, Zhu Q Y. *Biomaterials*, 2007, 28: 2899 ~ 2907
- 8 Brown M D, Schätzlein A, Brownlie A, Jack V, Wang W, Tetley L, Gray A I, Uchegbu I F. *Bioconjugate Chem*, 2000, 11: 880 ~ 891
- 9 Gómez-Valadés G, Molas M, Vidal-Alabré A, Bermúdez J, Bartrons R, Perales J C. *J Control Release*, 2005, 102: 277 ~ 291
- 10 Dung T H, Kim J S, Juliano R L, Yoo H. *Colloids and Surfaces A Physicochem Eng Aspects*, 2008, 313-314: 273 ~ 277
- 11 Kono K, Akiyama H, Takahashi T, Takagishi T, Harada A. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 208 ~ 214
- 12 Kim J Y, Lee J E, Lee S H, Yu J H, Lee J H, Park T G, Hyeon T H. *Adv Mater*, 2008, 20: 478 ~ 483
- 13 Nasongkla N, Bey E, Ren J M, Ai H, Khemtong C, Setti Guthi J, Chin S F, Sherry A D, Boothman D A, Gao J M. *Nano Lett*, 2006, 6: 2427 ~ 2430
- 14 Sun S H, Zeng H, Robinson D B, Raoux S, Rice P M, Wang S X, Li G X. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 273 ~ 279
- 15 Shuai X T, Merdan T, Unger F, Wittmar M, Kissel T. *Macromolecules*, 2003, 36: 5751 ~ 5759
- 16 Zhu J M, Tang A, Law L P, Feng M, Ho K M, Lee D L, Harris F W, Li P. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 139 ~ 146

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLYETHYLENIMINE-*g*-POLY(ϵ -CAPROLACTONE) COPOLYMER FOR GENE DELIVERY AND MAGNETIC RESONANCE IMAGING

YUAN Renxu¹, ZUO Yufang², XIAO Zhongpeng¹, HUANG Wenlin², SHUAI Xintao¹

⁽¹⁾ School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275)

⁽²⁾ Sun Yat-Sen University Cancer Center, Guangzhou 510060)

Abstract Gene therapy is a promising approach to treating diseases that caused by genetic defects or mutation. Non-invasive imaging of gene is a powerful tool in understanding the biodistribution and pharmacokinetics of vectors after *in vivo* administration. In the current research, amphiphilic copolymers, which were utilized to deliver a magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent and pDNA simultaneously, were obtained by modifying hyperbranched polyethylenimine with biodegradable hydrophobic segment (PCL). Synthesis of the copolymer was presented in details and chemical characterization of these copolymers was carried out using ¹H-NMR spectroscopy and FT-IR spectrum. The polyethylenimine-*g*-poly(ϵ -caprolactone) (PEI-*g*-PCL) could self-assemble into

nanoparticles were between 130 to 160 nm in diameter and displayed zeta-potentials between + 30 ~ 40 mV. The morphology investigated by SEM showed PEI-*g*-PCL aggregates were micellar structure. The MRI contrast agents-carrying capacity of these polymeric micelles was evaluated by using hydrophobic superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) as the model contrast agents. In addition, this kind of polymeric micelles have been evaluated *in vitro* as nonviral gene delivery systems. SPIO could be loaded into the hydrophobic core of PEI-*g*-CL micelle by emulsion/solvent evaporation technique. The PEI-*g*-PCL micelles were capable of complexing plasmid DNA into nanoparticles with diameters about 200 nm, and these complexes transfect 293 cells with high efficiency. These results suggest that PEI-*g*-PCL has the potential combined application in gene delivery and MRI diagnosis.

Keywords Polyethylenimine, Poly(ϵ -caprolactone), Micelle, Gene delivery