

## 末端功能化的树枝状聚合物载体与质粒组装的 热力学和动力学\*

张 维<sup>1</sup> 刘相丽<sup>2</sup> 张 猛<sup>1</sup> 史清洪<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 天津大学化工学院生物化工系 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072)

(<sup>2</sup> 天津医科大学第二医院心脏科 天津心脏病学研究所 天津 300211)

**摘 要** 通过二代和四代聚酰胺-胺树枝状聚合物(G2 和 G4 表示)末端分别修饰苯丙氨酸和色氨酸合成了多种新型聚合物载体,进而考察了其于质粒的组装行为. 研究结果显示,Phe-G4 和 Trp-G4 与质粒组装为结构致密的纳米粒子,其中 Phe-G4 与质粒形成的纳米粒子更加紧密. 这一过程是由聚合物载体与质粒间的静电相互作用和结构重排共同驱动的. 此外,末端修饰方法显著降低了载体的细胞毒性. 细胞转染结果表明,Phe-G4 和 Trp-G4 成功介导质粒 pEGFP-CL 在 COS-7 细胞中表达,Phe-G4/pEGFP-CL 的转染效率提高到作为阳性对照的脂质体组的 4 倍以上. 因此, Phe-G4 载体是一种有应用潜力的新型基因传递系统.

**关键词** 聚酰胺-胺树枝状聚合物, 基因传递, 质粒组装, 光散射, 恒温滴定量热, 转染

外源基因高效导入靶细胞是实现基因治疗的重要途径,其前提就是 DNA 分子组装为致密的纳米粒子. 这种组装通常是通过核酸物质在多种相互作用力下的缩合来实现的<sup>[1-3]</sup>. 在病毒载体中,核酸物质通过与病毒蛋白的相互作用缩合为核小体核心粒子<sup>[1,3]</sup>;而在非病毒载体中,这一过程是在聚酰胺亚胺(PEI)、阳离子聚磷酸酯(PAGA)、聚赖氨酸(PLL)、树枝状聚酰胺-胺(PAMAM)等聚合物分子协助下完成的<sup>[1,4]</sup>. 目前,病毒载体虽在临床上获得巨大成功,但其安全性仍饱受质疑<sup>[3]</sup>;聚合物载体迄今则鲜有临床成功应用的范例. 聚合物载体与质粒复合物(polyplex)的尺寸瓶颈是主要原因之一. 质粒复合物的尺寸受到聚合物的电荷密度、分子量、疏(亲)水性以及分子结构等多种因素的影响<sup>[5,6]</sup>. 通过合成新的聚合物以及聚合物的修饰,聚合物与质粒的组装能力得以显著提升<sup>[7-9]</sup>. 但这与病毒载体所表现出的组装能力仍相距甚远. 美国基因治疗学会前主席 Brenner 曾预言,未来的基因治疗载体应当是一种模仿病毒某些功能的“合成病毒”载体<sup>[10]</sup>.

病毒自身高效的核酸分子组装能力是病毒载体转染效率的重要保证之一. 现有研究表明,多种

DNA 结合蛋白参与了病毒基因组的组装<sup>[3,11]</sup>;而在真核细胞中细胞核内致密核酸结构也是通过 DNA 附着缠绕于碱性组蛋白八聚体表面而形成的<sup>[1]</sup>. Aris 等<sup>[12]</sup>采用规模化制备的重组蛋白模拟病毒蛋白促进质粒的组装和细胞转染. Yoshihara 等<sup>[13]</sup>则合成了一种含有不同氨基和羧基比例的聚乙二醇(PEG)衍生物以模拟病毒蛋白将质粒在细胞内的转录速度提高了 20 倍以上. PAMAM 树枝状聚合物被认为是一种模拟蛋白质行为的高分子材料<sup>[14,15]</sup>,其与质粒可在低质粒浓度(1 ~ 10 ng/mL)下组装为小粒径(30 ~ 100 nm)多分散粒子<sup>[16]</sup>. 而 Choi 等<sup>[17]</sup>发现,末端修饰赖氨酸或精氨酸的 PAMAM 与质粒组装成的纳米粒子尺寸在 185 nm 以上. 目前,研究人员对于 PAMAM 聚合物与质粒的组装机制仍不清楚.

本文基于二代和四代 PAMAM 树枝状聚合物(以下简称 G2 和 G4)通过末端修饰苯丙氨酸(Phe)和色氨酸(Trp)合成了 4 种模拟蛋白功能的聚合物载体 Phe-G2, Phe-G4, Trp-G2 和 Trp-G4,进而考察了其于质粒组装的热力学和动力学行为并对其进行介导外源基因转染的能力和细胞毒性进行了评估.

\* 2012-11-12 收稿,2013-01-07 修稿;国家自然科学基金(基金号 20676099)和天津市应用基础研究计划(项目号 09JCYBJC06800)资助.

\*\* 通讯联系人, E-mail: qhshi@tju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12359

# 1 实验部分

## 1.1 材料与设备

聚合物 G2 和 G4 购自 Sigma 公司;叔丁氧基羰基-L-苯丙氨酸(Boc-Phe)和叔丁氧基羰基-L-色氨酸(Boc-Trp)、琥珀酰亚胺、二环己基碳化二亚胺(DCC)、三氟乙酸(TFA)、三乙胺等为吉尔生化(上海)有限公司的产品;编码增强型绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP-CL 购自美国 Promega 公司,质粒的制备采用 *E. coli* JM109 菌株;琼脂糖、溴化乙啶、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)等购自北京鼎国生物工程公司;其他试剂均为本地购置的市售分析纯试剂。

核磁共振氢谱<sup>1</sup>H-NMR 分析在 500 MHz 的 INOVA 超导傅立叶变换液相核磁共振仪上进行;Perkin Elmer 公司的 LS 55 型荧光分光光度仪用于溴化乙啶阻断实验中荧光强度分析;质粒及其复合物的流体力学半径  $R_h$  和均方根旋转半径  $R_g$  采用 Wyatts 公司 Dawn EOS 型激光光散射仪和 QELS 准弹性光散射仪测量;质粒结合中热量变化通过 VP-ITC 恒温微量热仪(GE Healthcare 公司)分析。

## 1.2 聚合物载体的制备与表征

本文研究用聚合物载体是通过 G2 和 G4 末端修饰 Phe 或 Trp 制备的. G4 修饰 Phe 的步骤如下:0.38 mmol 琥珀酰亚胺和 0.412 mmol DCC 加入到含有 84 mg/mL Boc-Phe 的 DMF 溶液(2 mL)中搅拌 7 h 后,转入 2 mL 含有 0.066 mL 三乙胺和 46.9 mg G4 的 DMSO 溶液中;在室温条件下搅拌并反应 7 天,反应产物经 40 mL 乙醚沉淀后在 4000 r/min 和 10 min 下离心收集沉淀;沉淀物经乙醚清洗 3 次并除去液相后,冷冻干燥获得 Boc-Phe 修饰的 G4(Boc-Phe-G4)。

脱保护反应步骤如下:上述产物加入 4.0 mL TFA 和 1.0 mL 苯硫基甲烷后,密封置于摇床中反应 8 h;脱保护产物经 50 mL 乙醚沉淀后,在 4000 r/min 下离心 10 min 收集沉淀物;沉淀物经乙醚清洗 3 次并除去液相后,冻干、透析处理后,获得 Phe 修饰的 G4(Phe-G4)。Phe-G4 核磁共振氢谱<sup>1</sup>H-NMR 在 25℃ 下于 D<sub>2</sub>O 溶液中进行。

Trp-G4 合成过程中,Boc-Trp 的浓度为 96.5 mg/mL,其他反应条件同 Phe-G4 的制备过程。

Phe-G2 合成过程中,G2 的加入量为 42.97 mg,其他反应条件同 Phe-G4 的制备过程。

Trp-G2 合成过程中,Boc-Trp 的浓度为 96.5 mg/mL,其他反应条件同 Phe-G2 的制备过程。

pEGFP-CL 导入 *E. coli* JM109 菌株制备研究所需质粒.经 LB 培养基培养的 JM 109 菌液离心收集菌体后,按照文献[18]的方法提取获得质粒 pEGFP-CL。

## 1.3 琼脂糖凝胶电泳

溶解于 20 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.4)中的 pEGFP-CL 与聚合物载体按氮磷比(N/P)为 0.17,0.33,0.66,1.67 和 3.33 混合后在 37℃ 下孵育 1 h 制得质粒复合物.此后,10 μL 新鲜制得的复合物样品在 0.7% 琼脂糖凝胶中于 100 V 条件下运行 40 min 后取出,置于 260 nm 紫外光下成像分析凝胶对复合物的阻滞作用。

## 1.4 溴化乙啶荧光排阻分析

复合物样品制备方法如前所述.0.42 μL 溴化乙啶加入到 60 μL 新制得的复合物溶液中;混合均匀并孵育 10 min 后,用 20 mmol/L HEPES 缓冲液将样品溶液稀释到 600 μL.以 600 μL 含有 0.42 μL 溴化乙啶的 HEPES 缓冲液为参比,在激发波长 260 nm 和发射波长 600 nm 下分别测定纯质粒以及样品溶液的荧光强度.最后,以纯质粒为基准计算复合物样品溶液相对荧光强度  $I_{RF}$  值以及荧光半数衰减对应的 N/P 值(用 IC<sub>50</sub> 表示)。

## 1.5 多角度激光散射实验

质粒和聚合物载体分别溶于经 0.1 μm 滤膜过滤处理的 20 mmol/L HEPES(pH = 7.4)缓冲液中,质粒浓度为 3 μg/mL;取 5 mL 新配置的质粒溶液置于 20 mL 闪光瓶中,然后依 N/P = 0.33 加入聚合物载体溶液.溶液混合均匀后置于与 QELS 联用的 DAWN EOS 检测池中,通过 ASTRA 软件(Wyatt 公司)测量不同角度光强随时间变化;其后,均方根旋转半径  $R_g$  通过 ASTRA 软件直接得出,流体力学半径  $R_h$  采用 QELSBatch 软件(Wyatt 公司)通过二级相关函数(two-order correlation function)和 Stokes-Einstein 方程求得。

分别吸取约 10 μL 的上述 G4/质粒和 Phe-G4/质粒复合物样本滴至铜网上并静置 2 min 后,用滤纸吸干水分;经醋酸双氧铀负染后,置于透射电子显微镜下观测复合物形貌。

## 1.6 恒温微量热实验

聚合物载体与质粒结合过程的量热学分析在 VP-ITC 中进行.实验步骤如下:将聚合物载体和质粒 pEGFP-CL 溶于 20 mmol/L HEPES 缓冲液

中,制得浓度为 8.4  $\mu\text{mol/L}$  和 8.2  $\text{nmol/L}$  样品溶液;将质粒 pEGFP-CL 溶液置于 1.43 mL 的样品池后,在 300 r/min 转速下滴定注射器中的聚合物载体溶液以每 20 s 滴定 10  $\mu\text{L}$  的速度滴定质粒溶液,共滴 25 次.同时,结合过程的稀释热通过聚合物载体溶液滴定 20 mmol/L HEPES 缓冲液确定.扣除聚合物载体溶液稀释热后,聚合物载体与质粒的结合反应热采用 Origin 软件计算得出,进而计算出结合过程的热力学参数.

1.7 细胞毒性和绿色荧光蛋白转染实验

本研究采用非洲绿猴肾细胞 COS-7 进行细胞毒性和 pEGFP-CL 质粒转染实验.将 COS-7 细胞转入 100 mL 培养瓶中后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液,于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱内孵育直至细胞铺满培养瓶;获得的细胞经 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的胰蛋白酶消化,更换新鲜含 10% FBS 的 DMEM 培养液制成悬浮液并计数;用同一培养液调整细胞数至  $1.5 \times 10^4/\text{mL}$  后,向 24 孔板的每孔中加入 1.0 mL 细胞悬浮液;将 24 孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱内孵育过夜后弃掉上清液,更换新鲜的无血清培养液待用.

聚合物载体溶于 20 mmol/L HEPES 缓冲液中,制得浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的溶液;将 5,50 和 200  $\mu\text{L}$  新鲜聚合物载体溶液分别加入 24 孔板并补加 20 mmol/L HEPES 缓冲液确保加样总体积恒定 (200  $\mu\text{L}$ ).0.9% NaCl 溶液作为空白对照.24 孔板于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱内培养 4 h 后,更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 24 h.聚合物载体相对毒性的大小通过细胞形态进行确定.

如前所述方法分别配制 N/P 为 0.33 和 1.67 的质粒复合物溶液.新鲜配制的质粒复合物溶液加入到 24 孔板中,每孔中质粒的最终含量为 5  $\mu\text{g}$ .实验中,采用 Liposome 转染试剂盒 (Promega 公司)作为阳性对照,0.9% NaCl 溶液为空白对照.24 孔板于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱内培养 4 h 后,更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 24 h 和 72 h 后,采用细胞计数方法统计表达绿色荧光蛋白的细胞数目.

2 结果与讨论

2.1 聚合物载体的合成和表征

从 G2 和 G4 出发,通过末端修饰方法分别合成了 Phe-G2,Phe-G4,Trp-G2 和 Trp-G4 等 4 种聚

合物载体.图 1 为 G2 和 G4 及其衍生物的  $^1\text{H}$ -NMR 氢谱结果,其中  $\delta = 4.65$  处尖锐的单峰为溶剂峰<sup>[19,20]</sup>.图中独立出现在  $\delta = 7 \sim 7.4$  处的质子峰与 Phe 和 Trp 的标准  $^1\text{H}$ -NMR 谱峰一致,表明 Phe 和 Trp 均修饰于 G2 和 G4 的末端.图 1(a) 中 G4 的特征质子峰出现在  $\delta = 2.44 \sim 3.25$  之间<sup>[19]</sup>.例如, $\delta = 2.44$  处对应于聚合物末端 ( $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) 的质子峰.根据其  $\delta = 7 \sim 7.4$  处 Phe 质子峰积分面积之比,可得计算出 Phe-G4 末端苯丙氨酸修饰数量约为 54. Trp-G4, Phe-G2 和 Trp-G2 末端氨基酸的修饰数量可同样计算得到分别为 48,11 和 14.

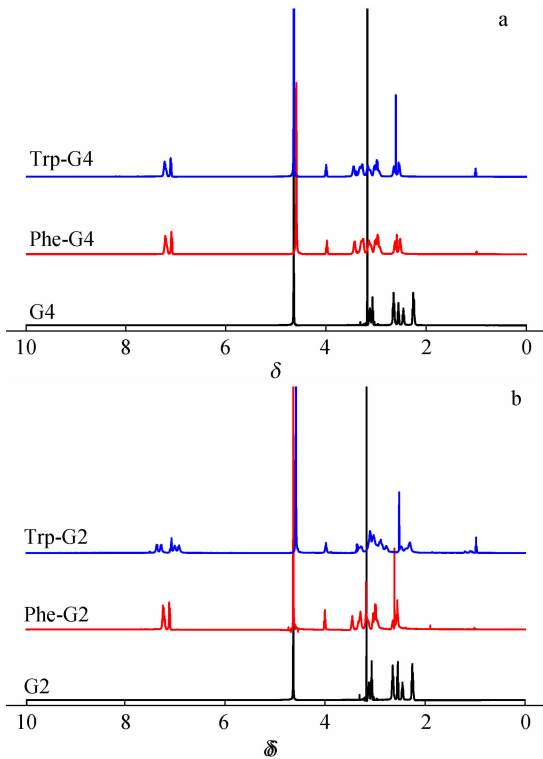


Fig. 1  $^1\text{H}$ -NMR spectra of the dendrimers and their derivatives of G4 (a) and G2 (b) in  $\text{D}_2\text{O}$

2.2 聚合物载体与质粒复合物的电泳阻滞分析

质粒的高效组装是实现外源基因跨膜输送的重要条件,这一过程始于聚合物载体与质粒的结合<sup>[21]</sup>.聚合物载体对质粒在凝胶中迁移的阻滞结果如图 2 所示.对于 G2 和 G4 而言,质粒在凝胶中迁移的阻滞现象出现在 N/P 为 0.67 时 (图 2 中电泳带 4~6).这种阻滞现象可归结为聚合物与质粒的结合中和了质粒所带负电荷并/或组装为尺寸更大的超分子结构.类似的情况也发生在聚合物载体 Trp-G4 中 (图 2(a) 中电泳带 14~16).对于尺寸较小的 Trp-G2 而言,载体对质粒的

阻滞作用发生在 N/P 值更高的条件下并在 N/P 为 3.33 情况下发生完全阻滞(图 2(b)中电泳带 14~16).这反映 Trp-G2 与质粒结合作用弱于未修饰的 G2.这一趋势在末端修饰 Phe 的载体上表现更为显著.Phe-G4 对质粒的阻滞现象在 N/P 为 0.17 时即可清晰地观察到(图 2(a)中电泳带 7)且随着电荷比增大而逐步强化.而 Phe-G2 在 N/P 为 3.33 时仍有部分质粒发生迁移,由此出现拖尾现象.这说明此时 Phe-G2 亦未完全地阻滞质粒在凝胶中的迁移(图 2b 中电泳带 11).由此可见,Phe-G4 与质粒具有较强的结合作用.

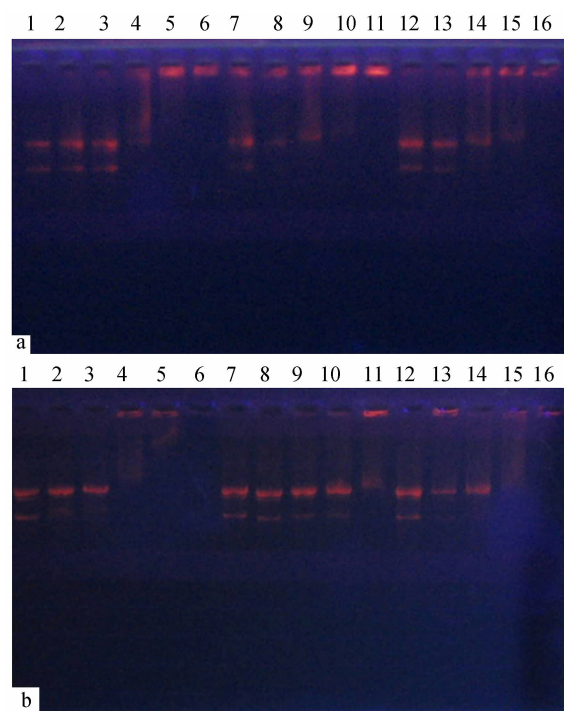


Fig. 2 Agarose gel band shift assay of G4-based dendrimer/plasmid polyplex (a), and G2-based dendrimer/plasmid polyplex (b)

Lane 1: plasmid; lanes 2~6 corresponded to PAMAM/plasmid polyplex with N/P ratios of 0.17, 0.33, 0.67, 1.67 and 3.33; Lanes 7~11 corresponded to Phe-modified PAMAM /plasmid polyplex with N/P ratios of 0.17, 0.33, 0.67, 1.67 and 3.33; Lanes 12~16 corresponded to Trp-modified PAMAM/plasmid polyplex with N/P ratios of 0.17, 0.33, 0.67, 1.67 and 3.33

### 2.3 质粒复合物的荧光排阻分析

以溴化乙啶为探针,进一步考察了聚合物载体与质粒复合物的性质,结果如图 3 所示.溴化乙啶分子可嵌入 DNA 碱基而发出荧光,这一嵌入是非碱基特异性的.从中可以看出,所有载体的  $I_{RF}$  值均随 N/P 比增大而降低并趋于  $(0.36 \pm 0.07)$ .类似的结果也出现在 PEO-*b*-PDEAEMA、不同代

数的 PAMAM 与质粒的结合中<sup>[22,23]</sup>.这一下降趋势在 G4 及其衍生物与质粒的结合过程中表现得更加显著.图 3(a)结果显示,G4 和 Phe-G4, Trp-G4 与质粒的结合导致  $I_{RF}$  值迅速下降,在 N/P 值为 0.17 时  $I_{RF}$  值迅速降至 0.6 以下.与此相对应的是,G2 及其衍生物与质粒的结合则导致  $I_{RF}$  值逐步降低.图 3(b)显示,末端修饰 Phe 或 Trp 的 G4 聚合物具有更低的  $IC_{50}$  值;与此相反,末端修饰的 G2 聚合物的  $IC_{50}$  值升高.由此进一步推断,Phe-G4 促进质粒的组装为较为致密的结构.

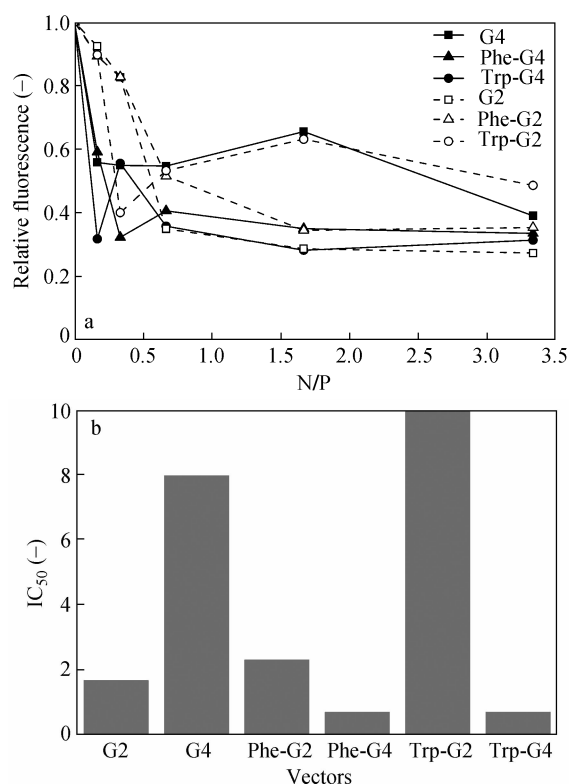


Fig. 3 Ethidium bromide exclusion assay (a) and  $IC_{50}$  values (b) of PAMAM-based polymer/plasmid polyplexes at N/P ratios of 0.17 to 3.33

### 2.4 质粒组装动力学

在间歇池模式(batch mode)下研究了聚合物载体与质粒结合动力学.N/P 为 0.33 时  $R_g$  和  $R_h$  结果如图 4 所示.当质粒、G2 或 G4 单独存在条件下,它们各自对应的  $R_g$  和  $R_h$  值维持恒定,质粒的  $R_h$  值为 65 nm.向质粒溶液中加入 G4 后,带负电荷的质粒与 G4 迅速结合导致  $R_g$  值迅速升高并在 10 min 后形成大尺寸稳定的复合物;复合物的  $R_g$  值为  $(176.9 \pm 1.0)$  nm.这一结果反映出 G4 与质粒的复合物较纯质粒更为松散.与此形成鲜明对照的是,G2 与质粒结合导致  $R_g$  值和  $R_h$  值均随着

结合时间逐步升高,反映出其无法形成稳定的复合物. Lai 和 van Zanten 也发现,虽然 DNA 与聚赖氨酸在组装过程伊始可形成尺寸更小的复合物,但随着时间的延长复合物聚集生成大尺寸粒子<sup>[24]</sup>. 图 4 结果亦表明, Phe-G4 或 Trp-G4 可与质粒形成较为稳定、致密的复合物,其中 Phe-G4 与质粒复合物的  $R_g$  和  $R_h$  值分别为  $(41.1 \pm 1.9)$  和  $(43.7 \pm 0.3)$  nm. 由此可见, Phe-G4 与质粒复合物具有比纯质粒更小的稳定尺寸. 上述数值在 N/P 增至 1.67 时仍维持基本恒定(结果未显示). 这一动力学结果也被图 5 中复合物在透射电子显微镜下的形貌所证实. 从中可以发现, Phe-G4/质粒复合物的形貌尺寸(白色亮斑)明显小于 G4/质粒复合物. 这进一步表明, Phe-G4 与质粒结合迅速组装成了更加有利于质粒跨膜迁移的小尺寸复合物结构.

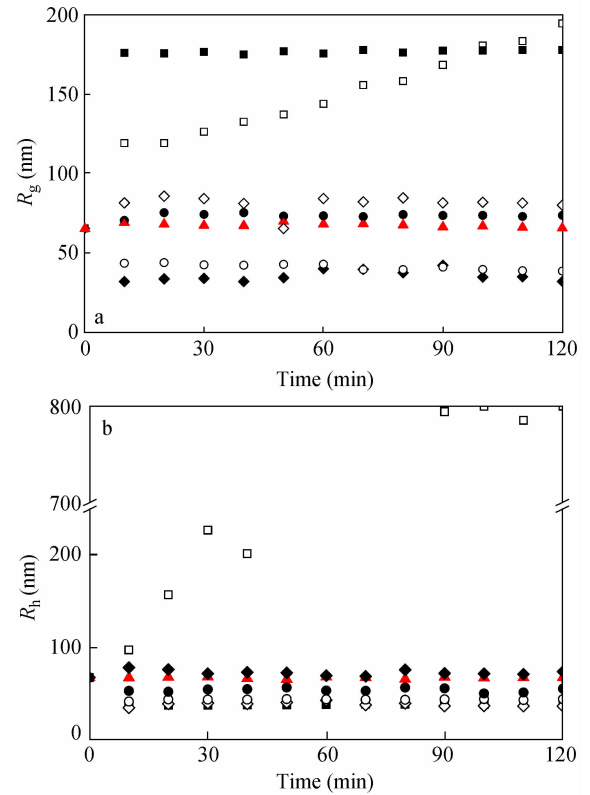


Fig. 4 The values of  $R_g$  (a) and  $R_h$  (b) of PAMAM dendrimers/plasmid polyplex measured by MALLS: (▲) DNA, (□) G2/ DNA, (■) G4/ DNA, (◇) Phe-G2/ DNA, (◆) Trp-G2/ DNA, (○) Phe-G4/ DNA and (●) Trp-G4/ DNA

2.5 质粒结合的量热学行为

采用恒温微量热仪以  $N/P = 1.67$  为滴定终点条件下研究了聚合物载体与质粒结合的量热学

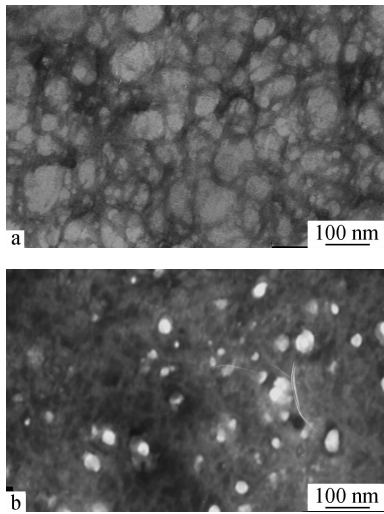


Fig. 5 TEM images of G4/plasmid (a) and Phe-G4/plasmid (b) polyplex at N/P ratio of 0.33

变化. Phe-G2 和 Phe-G4 滴定质粒的量热学结果如图 6 所示. 从中看出, 聚合物滴定质粒的过程首先表现为典型的放热过程, 由此说明最初聚合物载体与质粒的结合是由静电相互作用驱动的. 随着滴定过程的进行 ( $N/P \geq 0.33$  后), 由于电荷中和静电相互作用逐渐消弱, 质粒的结合由放热过程转为吸热过程, 表明此时结合过程由质粒结构的重排和复合物聚集所驱动. 上述过程中, Phe-G4 与质粒结合过程热量变化更显著. 这反映出 Phe-G4 与质粒的结合作用更强且质粒的组装是由静电相互作用和结构重排共同驱动形成小尺寸复合物的过程. 聚合物载体与质粒结合过程的热力学参数如表 1 所示. 聚合物载体 G2 与质粒无法形成稳定的复合物, 因此仅采用聚集物形成前的量热数据进行拟合. 从中可以看出, 单位点模型拟合的结果表明 G2 和 G4 与质粒的结合作用是一放热反应, 表明这一过程是由静电作用驱动的且随着聚合物代数的增加而升高. 这与近期 Jensen 等的报道相一致<sup>[25]</sup>. 末端修饰氨基酸的聚合物载体无法用单位点模型拟合, 采用三位点模型可获得较好的拟合. 热力学参数结果显示, 末端氨基酸的修饰导致载体与质粒间结合的  $\Delta H_1$  值明显降低且其随着树枝状聚合物代数  $Gx$  的增大更加显著, 表明两者间的静电相互作用增强. 这也同时反映在结合常数  $K_1$  的变化上. 此外, 末端修饰氨基酸的 G4 载体 (Phe-G4 和 Trp-G4) 的  $\Delta S_3$  值均大于 0, 反映出其是一熵驱动的过程. 这说明 Phe-G4 和 Trp-G4 与质粒的结合中伴有显著的结

Table 1 Thermodynamic parameters of PAMAM dendrimers/plasmid interaction

|            | $K_1 \times 10^{-3}$ | $\Delta H_1 \times 10^{-3}$ | $\Delta S_1$ | $K_2 \times 10^{-3}$ | $\Delta H_2 \times 10^{-3}$ | $\Delta S_2$ | $K_3 \times 10^{-3}$ | $\Delta H_3 \times 10^{-3}$ | $\Delta S_3$ |
|------------|----------------------|-----------------------------|--------------|----------------------|-----------------------------|--------------|----------------------|-----------------------------|--------------|
|            | (mol)                | (kJ/mol)                    | (kJ/k·mol)   | (mol)                | (kJ/mol)                    | (kJ/k·mol)   | (mol)                | (kJ/mol)                    | (kJ/k·mol)   |
| G2/DNA     | 329.0 ± 33.8         | -0.0546 ± 0.0029            | -0.15        | —                    | —                           | —            | —                    | —                           | —            |
| Phe-G2/DNA | 49.8 ± 9.4           | -1.14 ± 0.20                | -3.74        | 13.5 ± 2.3           | -0.883 ± 0.079              | -2.89        | 19.1 ± 2.6           | -2.70 ± 0.68                | -8.87        |
| Trp-G2/DNA | 44.4 ± 5.4           | -1.62 ± 0.02                | -5.31        | 17.4 ± 1.7           | -0.268 ± 0.051              | -0.865       | 7.93 ± 0.69          | -10.8 ± 0.79                | -35.4        |
| G4/DNA     | 430.0 ± 28.2         | -0.180 ± 0.005              | -0.66        | —                    | —                           | —            | —                    | —                           | —            |
| Phe-G4/DNA | 159.0 ± 13.0         | -2.25 ± 0.17                | -7.41        | 13.4 ± 1.7           | -8.93 ± 2.20                | -29.4        | 135 ± 9              | 4.18 ± 2.10                 | 13.8         |
| Trp-G4/DNA | 131.0 ± 9.0          | -3.05 ± 0.19                | -10.0        | 9.51 ± 0.48          | -14.9 ± 2.0                 | -49.2        | 126 ± 8              | 6.77 ± 2.09                 | 22.3         |

构重排. Phe-G2 和 Trp-G2 与质粒结合的  $\Delta S_3$  小于 0. 由此进一步说明, 上述不同代数聚合物载体与质粒的不同结合机制.

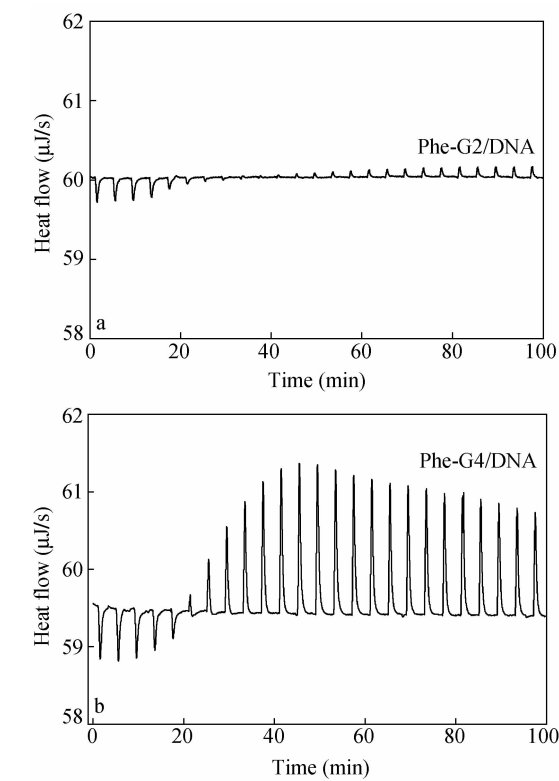


Fig. 6 Calorimetric titration of Phe-G2 (a) and Phe-G4 (b) into pEGFP-CL solution at 25℃

2.6 pEGFP-CL 质粒转染实验

考察了合成的聚合物载体与 pEGFP-CL 复合物在 COS-7 细胞中的转染并通过细胞形态评估了聚合物载体的毒性. 图 7 为 5 μL 聚合物载体溶液条件下培养 24 h 后的 COS-7 细胞形态. 从中可以看出, 相对于空白对照 (图 7(a)) 而言, G4 对细胞形态有较为明显地影响, 导致视野中大部分细胞收缩而出现光致密体. 而末端修饰氨基酸的 Phe-G4 和 Trp-G4 对于细胞形态的影响在实验条件下可以忽略. 这反映出末端修饰氨基酸方法显著降低了 G4 载体的毒性. 同样结果也发生在 G2

载体上. 但是, 在聚合物载体加入量达到 50 μL 后, 载体同样导致 COS-7 细胞形态的改变, 出现明显的光致密体 (结果未显示). 本文细胞转染实验中聚合物载体的用量小于 2 μL. 以脂质体转染为阳性对照, 本文考察了 pEGFP-CL 在 COS-7 细胞中的转染效率. 表 2 结果显示, G4/pEGFP-CL 和 G2/pEGFP-CL 的转染效率要明显低于脂质体/pEGFP-CL, 而纯质粒在 COS-7 细胞中未转染. 相较于 G4, Phe-G4/pEGFP-CL 和 Trp-G4/pEGFP-CL 转染效率有了显著的提升. N/P = 0.33 时, Phe-G4/pEGFP-CL 和 Trp-G4/pEGFP-CL 转染效率分别提升到了 1.33 和 1.11 倍; 在 N/P = 1.67 时, 其数值达到了 4.44 和 3.89 倍. 另一方面, Phe-G2/pEGFP-CL 和 Trp-G2/pEGFP-CL 转染效率则很低, 仅 Trp-G2/pEGFP-CL 在 N/P 值为 1.67 条件下有较稳定的转染.

3 结论

本文通过聚酰胺-胺树枝状聚合物 G2 和 G4 末端分别修饰 Phe 和 Trp 合成了模拟蛋白功能的新型聚合物载体 Phe-G2, Phe-G4, Trp-G2 和 Trp-G4, 进而考察了其 与质粒组装的热力学、动力学、复合物结构以及转染效率. 研究结果显示, Phe-G4 和 Trp-G4 与质粒组装为结构致密的纳米粒子, 其中 Phe-G4 与质粒的结合作用更强且由此组装成的纳米粒子更加紧密. 量热学测量表明, 这一过程是由载体与质粒间的静电相互作用和结构重排共同驱动的. 此外, 合成的新型聚合物载体对 COS-7 细胞形态的影响在低载量 (5 μL) 下可忽略; 而未修饰载体则对细胞形态有显而易见的影响. 这说明末端修饰方法在很大程度上降低了载体的细胞毒性, 安全性得以明显提高. pEGFP-CL 质粒转染的结果表明, Phe-G4 和 Trp-G4 成功介导质粒 pEGFP-CL 跨 COS-7 细胞膜输送和胞内表达, 其中 Phe-G4/pEGFP-CL 的转染效率提高到阳性对照的 4 倍以上. 由此可见, Phe-G4 载体不仅是一

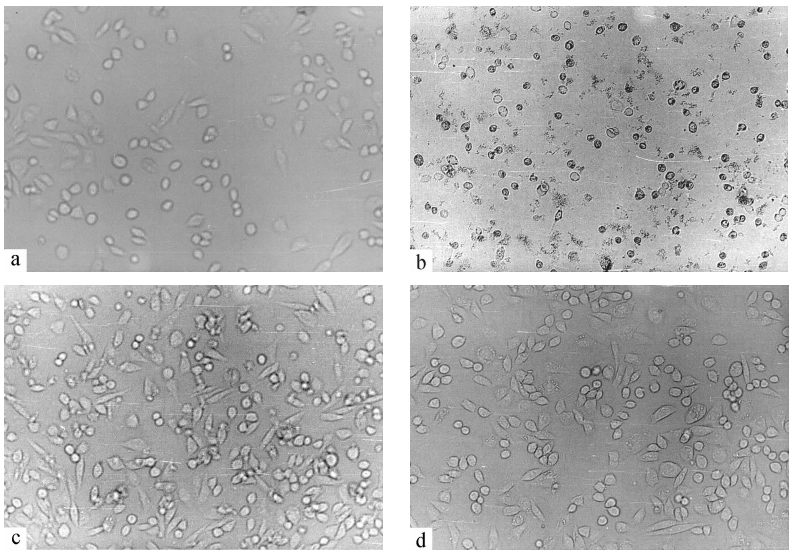


Fig. 7 Images of COS-7 cells cultured by 0.9% NaCl (a), G4 (b), Phe-G4 (c) and Trp-G4 (d) after 24 h under optical microscopy

| Table 2 The efficiency of in vitro transfection of PAMAM dendrimers/pEGFP-CL polyplexs in COS-7 cells at 24 and 72 h |      |                                                   |  |                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------|
| Polymer                                                                                                              | N/P  | Relative efficiency at 24 h ( % positive control) |  | Relative efficiency at 72 h ( % positive control) |
| G4                                                                                                                   | 0.33 | 42.9                                              |  | 22.2                                              |
| G4                                                                                                                   | 1.67 | 0                                                 |  | 0                                                 |
| Phe-G4                                                                                                               | 0.33 | 129                                               |  | 133                                               |
| Phe-G4                                                                                                               | 1.67 | 343                                               |  | 444                                               |
| Trp-G4                                                                                                               | 0.33 | 42.9                                              |  | 111                                               |
| Trp-G4                                                                                                               | 1.67 | 257                                               |  | 389                                               |
| G2                                                                                                                   | 0.33 | 0                                                 |  | 0                                                 |
| G2                                                                                                                   | 1.67 | 28.6                                              |  | 0                                                 |
| Phe-G2                                                                                                               | 0.33 | 14.3                                              |  | 0                                                 |
| Phe-G2                                                                                                               | 1.67 | 14.3                                              |  | 0                                                 |
| Trp-G2                                                                                                               | 0.33 | 0                                                 |  | 0                                                 |
| Trp-G2                                                                                                               | 1.67 | 157                                               |  | 156                                               |
| Liposome                                                                                                             | —    | 100                                               |  | 100                                               |
| DNA                                                                                                                  | —    | 0                                                 |  | 0                                                 |

种具有较大应用潜力的新型基因传递系统,也可 计思路。  
为现有聚合物载体的优化和新载体的开发提供设

REFERENCES

1 Ainalem M L, Nylander T. Soft Matter, 2011, 7(10):4577 ~ 4594

2 Huang Shiwen(黄世文), Zhuo Renxi(卓仁禧). Chin Sci Bull(科学通报), 2003, 48(5):405 ~ 409

3 Xu C H, Sui M H, Tang J B, Shen Y Q. Chinese J Polym Sci, 2011, 29(3):274 ~ 287

4 Park T G, Jeong J H, Kim S W. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(4):467 ~ 486

5 Grigsby C L, Leong K W. J Roy Soc Int, 2010, 7:S67 ~ S82

6 Sun X, Zhang N. Mini-Rev Med Chem, 2010, 10(2):108 ~ 125

7 Kim T, Seo H J, Choi J S, Jang H S, Baek J, Kim K, Park J S. Biomacromolecules, 2004, 5(6):2487 ~ 2492

8 Wang C H, Hsiue G H. Bioconjug Chem, 2005, 16(2):391 ~ 396

9 Xue Yanan(薛亚楠), Zhang Min(张敏), Liu Lei(刘磊), Li Wenxin(李文鑫), Huang Shiwen(黄世文). Acta Polymerica Sina(高分子学报), 2011, (8):874 ~ 882

10 Ferber D. Science, 2001, 294(5547):1638 ~ 1642

11 Dame R T. Mol Microbiol, 2005, 56(4):858 ~ 870

- 12 Aris A, Villaverde A. Trends Biotechnol, 2004, 22(7): 371 ~ 377
- 13 Yoshihara C, Shew C Y, Ito T, Koyama Y. Biophys J, 2010, 98(7): 1257 ~ 1266
- 14 Chow Hak-Fun(周克勋). YouJi HuaXue(有机化学), 1997, 17(1): 72 ~ 75
- 15 Svenson S, Tomalia D A. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(15): 2106 ~ 2129
- 16 Eichman J D, Bielinska A U, Kukowska-Latallo J F, Baker J R, Jr. Pharm Sci Technolo Today, 2000, 3(7): 232 ~ 245
- 17 Choi J S, Nam K, Park J, Kim J B, Lee J K. J Control Release, 2004, 99(3): 445 ~ 456
- 18 Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: CSHL Press, 2001. 387 ~ 395
- 19 Huang R Q, Qu Y H, Ke W L, Zhu J H, Pei Y Y, Jiang C. Faseb J, 2007, 21(4): 1117 ~ 1125
- 20 Hobson L J, Feast W J. Polymer, 1999, 40(5): 1279 ~ 1297
- 21 Rungsardthong U, Ehtezazi T, Bailey L, Armes S P, Garnett M C, Stolnik S. Biomacromolecules, 2003, 4(3): 683 ~ 690
- 22 Tan J F, Too H P, Hatton T A, Tam K C. Langmuir, 2006, 22(8): 3744 ~ 3750
- 23 Braun C S, Vetro J A, Tomalia D A, Koe G S, Koe J G, Middaugh C R. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005, 94(2): 423 ~ 436
- 24 Lai E, van Zanten J H. Biophys J, 2001, 80(2): 864 ~ 873
- 25 Jensen L B, Pavan G M, Kasimova M R, Rutherford S, Danani A, Nielsen H M, Foged C. Int J Pharm, 2011, 416(2): 410 ~ 418

## THERMODYNAMICS AND KINETICS OF PLASMID ASSEMBLY WITH TERMINALLY-FUNCTIONALIZED DENDRIMER VECTORS

Wei Zhang<sup>1</sup>, Xiang-li Liu<sup>2</sup>, Meng Zhang<sup>1</sup>, Qing-hong Shi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Biochemical Engineering, Key Laboratory of Systems Bioengineering of Ministry of Education,  
School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

(<sup>2</sup> Department of Cardiology of the Second Hospital and Tianjin Institute of Cardiology, Tianjin Medical University,  
Tianjin 300211)

**Abstract** The high-efficient assembly of plasmid DNA by polymers has become important for successful delivery of gene materials into the target cells. In this research, four polymers were synthesized by coupling phenylalanine (Phe) and tryptophan (Trp) to poly(amidoamine) dendrimers of generation 2 (G2) and 4 (G4), respectively, so as to mimic the function of viral proteins. Then, the assembly of the plasmid DNA and polymeric vectors was investigated with agarose gel electrophoresis, ethidium bromide displacement assay and dynamic light scattering. The results indicated that Phe-G4 and Trp-G4 could self-assemble with the plasmid DNA to form more compact nano-sized particles with hydrodynamic radii of *ca.* 40 nm. It was driven by electrostatic interaction and structural rearrangement. Moreover, Phe-G4 and Trp-G4 exhibited high cell viability in COS-7 cell lines, meaning low cell toxicity of the polymeric vectors. The plasmid pEGFP-CL was transfected successfully *in vitro* by both Phe-G4 and Trp-G4 and the transfection efficiency of Phe-G4/plasmid DNA polyplexes was over four-times higher than that of liposome-mediated delivery method. In concern with these results, it is confirmed that Phe-G4 is a potential candidate as a high-efficient gene delivery system.

**Keywords** Poly(amidoamine) dendrimers, Gene delivery, Plasmid assembly, Light scattering, Isothermal titration calorimetry, Transfection