

## 壳聚糖在离子液体中均相接枝聚乙烯亚胺及其基因转运\*

陈会英<sup>1,2</sup> 张树彪<sup>2\*\*</sup> 彭孝军<sup>1</sup> 崔韶晖<sup>2</sup> 赵轶男<sup>2</sup> 张传敏<sup>2</sup> 韩 颖<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>大连理工大学化工与环境生命学部 精细化工国家重点实验室 大连 116024)

(<sup>2</sup>大连民族学院生命科学学院 国家民委-教育部生物资源与技术利用国家重点实验室 大连 116600)

**摘 要** 以离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐([BMIM]Cl)为反应介质和催化剂,采用羰基二咪唑为偶联试剂,均相合成了壳聚糖/聚乙烯亚胺接枝共聚物(CS-g-PEI).采用红外光谱、核磁共振氢谱等分析手段对接枝共聚物进行了表征,证实了聚乙烯亚胺在壳聚糖分子链上发生了接枝共聚,接枝率达到 42%.采用复凝聚的方法制备了 CS-g-PEI/DNA 纳米复合物,并利用动态光散射、透射电镜、凝胶电泳等技术对 CS-g-PEI/DNA 复合物的物理化学性质进行了表征.以人宫颈癌 Hep-2 细胞为宿主细胞,pGL3 荧光蛋白为报告基因,考察了 CS-g-PEI/DNA 复合物的体外转染性能.研究发现 CS-g-PEI 介导的荧光素酶质粒的表达较壳聚糖介导的荧光素酶的表达提高了大约 160 倍.MTT 毒性实验表明,CS-g-PEI/DNA 复合物在实验浓度范围内细胞毒性比较低.

**关键词** 非病毒基因载体,壳聚糖,离子液体,聚乙烯亚胺,接枝聚合物

基因治疗通过将外源基因导入到靶细胞核内以修复导致疾病的缺陷基因或者抑制导致疾病的有害基因,从而使机体恢复正常功能,达到治疗疾病的目的<sup>[1,2]</sup>.基因治疗技术为常规医疗手段难以治愈的疾病提供了新的治疗方法.基因治疗的关键在于开发安全、高效的基因递送载体.基因递送载体分为病毒和非病毒载体两类<sup>[3]</sup>.非病毒载体由于具有安全性好、免疫原性低、毒性低、携带基因能力强、易于批量生产及费用低等优点受到越来越多的关注.天然阳离子碱性多糖壳聚糖,是天然多糖甲壳素(chitin)完全或者部分脱乙酰化的产物,由 $\beta(1,4)$ 糖苷键连接 D-氨基葡萄糖和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖两个基本结构单元组成,具有良好的生物降解性、生物相容性、低生物毒性等优点,正成为非病毒基因载体的热门研究内容之一<sup>[4-8]</sup>.在低 pH 条件下,壳聚糖伯胺基团发生质子化带正电荷,与带负电荷的 DNA 形成聚电解质纳米复合物,从而通过空间位阻效应,有效地保护 DNA 免受 DNA 酶的降解.它还可某些肿瘤表面的多糖受体结合,增加该类基因载体的肿瘤靶向性.1995 年, Mumper 等首先使用壳聚糖作为载体将基因释放到细胞中<sup>[9]</sup>.但壳聚糖存在转染效率低的重大缺陷.研究表明,壳聚糖虽然能够打开细

胞间紧密连接,使亲水性成分转运入细胞<sup>[10]</sup>,但进入内涵体之后却很难从内涵体中释放出来,使基因难以进入细胞核进行表达.另外, DNA 与载体的分离较其他载体慢也是其转染效率低的原因之一<sup>[7]</sup>.

聚乙烯亚胺(PEI)的结构骨架中每 3 个原子中含 1 个氨基,有较强的 DNA 结合能力和细胞吸附能力,结合核酸之后,每 2~3 个氨基中即有 1 个可以被质子化,当溶酶体内的 pH 下降时, PEI 能够大量捕获质子,并引起  $Cl^-$  内流,导致溶酶体渗透性肿胀破裂,从而将 DNA 释放到细胞质.这种海绵效应能使 DNA 快速逃脱内涵体(endosome)免受核酸酶降解.但 PEI 作为基因递送载体表现出较高的细胞毒性<sup>[11]</sup>.

对壳聚糖进行 PEI 接枝,利用 PEI 的质子海绵效应克服壳聚糖/DNA 复合物进入内涵体之后难以逃逸的缺陷,从而达到提高壳聚糖的基因转染效率的目的<sup>[12,13]</sup>.但壳聚糖的高结晶性和难溶性使得许多对其改性修饰的化学反应只能在多相介质中进行,加之壳聚糖分子内和分子间的氢键作用,导致多相反应只能在其表面上进行,产率低,副产物多.最近随着壳聚糖溶解体系的深入研究,均相衍生化和均相接枝化的研究方法不断出

\* 2013-12-16 收稿,2014-01-14 修稿;国家自然科学基金(基金号 20876027,21176046)和中央高校自主科研基金(基金号 DC12010104)资助项目.

\*\* 通讯联系人,E-mail:zsb@dlnu.edu.cn

doi:10.11777/j.issn1000-3304.2014.13461

现<sup>[14]</sup>. 均相法不仅能够克服非均相法存在的缺点,而且在制备结构新颖的壳聚糖衍生物及有效控制产物取代度等方面具有显著的优点. 离子液体作为均相法反应介质已成为绿色化学领域的研究热点,逐步成为实现壳聚糖等难溶聚合物均相反应最有效的介质<sup>[15]</sup>. 另外,离子液体除了作为新型绿色溶剂,还可作为胺羰基化的催化剂<sup>[16]</sup>.

本研究以离子液体[BMIM]Cl为反应介质和催化剂,采用羰基二咪唑为偶合试剂,对壳聚糖进行PEI均相共价接枝,利用PEI质子海绵效应来提高壳聚糖基载体的转染效率,使壳聚糖基载体成为高效低毒的具有极大应用潜力的新型基因载体.

## 1 实验部分

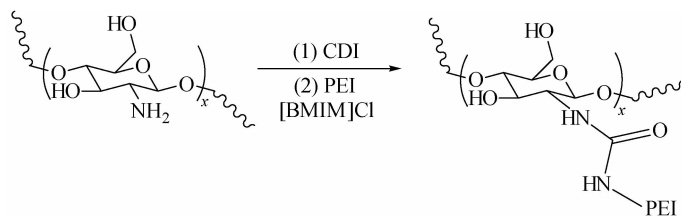
### 1.1 主要原料

壳聚糖(CS,  $M_w = 40000$ , 脱乙酰度 85%), 济南海得贝海洋生物工程有限公司, 使用前于 80 °C、真空充分干燥. [BMIM]Cl, 按照文献[17]制备, 使用前 100 °C 真空干燥至完全无水. 羰基二

咪唑(CDI), 分析纯, 北京偶联试剂有限公司. 聚乙烯亚胺(b-PEI,  $M_w = 600 \sim 1800$ ), 纯度 99%, 阿拉丁试剂有限公司. 聚乙烯亚胺(b-PEI,  $M_w = 25000$ ), 纯度 99%, Sigma 试剂有限公司. 质粒 pGFP-N2 和 pGL3, Promega 公司. 质粒提取纯化试剂盒, BioBasic Inc 公司. 细胞培养基 DMEM, Invitrogen 公司. 荧光素酶检测试剂盒, Promega 公司. 人宫颈癌细胞株 Hep-2, 上海细胞库. 其余试剂均为分析纯.

### 1.2 CS-g-PEI 在 [BMIM]Cl 中的均相合成

在反应器中加入 20 g [BMIM]Cl, 置入 80 °C 油浴中加热熔化. 加入 0.5 g 壳聚糖, 在氮气气氛下搅拌, 通过偏光显微镜观察, 搅拌至壳聚糖完全溶解. 称取适量的 CDI, 加入壳聚糖的 [BMIM]Cl 溶液中, 80 °C 下搅拌反应 4 h. 再加入适量的 PEI, 80 °C 反应 2 h. 转移至透析袋中(截留分子量 MWCO = 8000 ~ 14000), 去离子水透析 3 天, 冷冻干燥, 得到 CS-g-PEI (0.71 g). 其合成路线如示意图 1 所示.



Scheme 1 Scheme of homogeneous synthesis of CS-g-PEI

### 1.3 CS-g-PEI 的表征

将 CS、CS-g-PEI 分别经 KBr 压片后在岛津 IR-21 傅里叶红外光谱仪上进行傅里叶变换红外光谱测试.

核磁共振氢谱测试是将一定量的 CS、CS-g-PEI 分别溶解在  $CD_3COOD/D_2O$  溶剂中, 在 Varian Mercuryplus400 核磁共振谱仪上记录  $^1H$ -NMR 谱.

接枝率按公式(1)计算:

$$G = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中  $G$  为接枝率;  $W_0$  为壳聚糖初始质量;  $W_1$  为接枝共聚物质量.

### 1.4 CS-g-PEI/DNA 复合物的制备及表征

用复凝聚的方法制备 CS-g-PEI/DNA 纳米复合物. 将 CS-g-PEI 溶解于 pH 为 5.5 的 PBS 缓冲液中(浓度 1 mg/mL), 过滤灭菌后置于 4 °C 冰箱保存. 根据所要制备纳米复合物的氮磷比(质量

比)的不同, 取不同量的 CS-g-PEI 溶液与 DNA 溶液(0.5 mg/mL)在涡轮振动条件下快速混合, 然后在室温下孵育 30 min, 备用.

采用凝胶电泳对 CS-g-PEI 对 DNA 的延滞性能进行评价. 20  $\mu$ L 不同电荷比的 CS/DNA 复合物和 CS-g-PEI/DNA 复合物在 DYY-III2 型电泳仪上观测电泳条带, 琼脂糖凝胶浓度 0.8%, 电泳缓冲液为  $1 \times TEA$ , 电压为 90 V, 时间为 40 min.

采用透射电镜对 CS-g-PEI/DNA 复合物的形貌进行表征. 新鲜制备的 CS-g-PEI/DNA 和 CS/DNA 复合物滴载于铜网上, 自然风干 10 min 后, 采用 2% 的醋酸双氧铀负染 2 min, 在 JEM-1200 透射电镜(日本电子公司)下观察, 加速电压为 100 kV.

采用动态光散射(DLS)对 CS-g-PEI/DNA 和 CS/DNA 复合物的 zeta 电位进行表征: 在室温和 90°固定角条件下, 运用动态光散射仪来检测 CS/

DNA 和 CS-g-PEI/DNA 复合物的 zeta 电位. 为确保重现性, 每个样品重复检测 3 次.

### 1.5 细胞转染效果评价和 MTT 毒性评价

CS/DNA 和 CS-g-PEI/DNA 复合物 (1  $\mu\text{g}$  DNA/孔) 体外细胞转染效率采用 pGL3 蛋白为报告基因, 在 Hep-2 细胞中进行评价. 以  $5 \times 10^4$  细胞/孔的密度将 Hep-2 细胞接种到 24 孔板中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 18 ~ 24 h 后细胞融合度达到 80%. 转染前 2 h, 将完全培养基吸去, 用 PBS 洗涤两次, 加入 400  $\mu\text{L}$  无血清培养基和不同 N/P 比 (质量比) 的 CS-g-PEI/DNA 复合物 (每孔含 1  $\mu\text{g}$  DNA) 孵育 5 h 后, 将无血清培养基换成完全培养基. 48 h 后, 按照试剂盒所提供的说明书在 BioTek Synergy 2 多功能酶标仪上检测光子的强度. 用 BCA 检测出总蛋白的浓度, 从而将结果统一标准化成 RLU/mg 蛋白 (每毫克蛋白所对应的相对光子数)<sup>[18]</sup>.

复合物的毒性采用 MTT 法进行评价. 以  $1 \times 10^4$  细胞/孔的密度将 Hep-2 细胞接种到 96 孔板中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 24 h 后分别加入 20  $\mu\text{L}$  不同 N/P 比 (质量比) 的 CS-g-PEI/DNA, PEI-1.8/DNA, PEI-25/DNA 复合物. 培养 24 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  继续孵育 4 h, 终止培养. 小心吸取孔内培养上清液后, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  继续孵育 30 min. 选择 570 nm 波长, 在 SUNRISE 酶标仪上测定各孔吸光值, 检测前自动混匀 600 s. 细胞活性的表达结果为:

$$\text{细胞存活率}(\%) =$$

$$A_{570}(\text{sample})/A_{570}(\text{control}) \times 100$$

其中  $A_{570}(\text{sample})$  为聚合物及其复合物加入的孔的吸光值,  $A_{570}(\text{control})$  为只含培养基的孔的吸光值.

## 2 结果和讨论

### 2.1 接枝率计算

壳聚糖原料质量为 0.5 g, PEI 接枝的接枝壳聚糖质量为 0.71 g, 根据公式 (1) 计算得到接枝率为 42%. 说明以离子液体 [BMIM]Cl 为反应介质, 可以在无水条件下, 采用 CDI 为偶联试剂, 使 PEI 有效的与壳聚糖反应, 得到 PEI 共价接枝壳聚糖, 且达到 42% 的接枝率. 不同于原料壳聚糖只能溶于 0.5% 醋酸溶液, 接枝产物在生理 pH 条件下可以完全水溶, 42% 的 PEI 接枝率有效提高

了原料壳聚糖的水溶性.

### 2.2 CS-g-PEI 的 FTIR 和 $^1\text{H-NMR}$ 分析

图 1 给出了 CS-g-PEI 和 CS 的  $^1\text{H-NMR}$  谱图. CS-g-PEI 在  $\delta = 3.2 \sim 2.5$  范围内出现新的质子峰, 对应 PEI 的质子峰, 考虑到所用 PEI 的  $M_w$  为 600 ~ 1800, 而透析袋的 MWCO 范围为 8000 ~ 14000, 没有成功共价接枝到壳聚糖骨架的 PEI 经透析被分离, 因此图 1 中所给出的 PEI 质子峰来源于与壳聚糖共价接枝的 PEI 的质子峰. 由此可以得出结论, 小分子 PEI 已经成功共价接枝到壳聚糖上. 进一步分析峰面积, 可以得出平均 25 个 D-氨基葡萄糖结构单位上接有一个 PEI 分子. 与 2.1 节中计算得到的 42% 的 PEI 接枝率吻合.

CS-g-PEI 和 CS 的 FTIR 谱图如图 2 所示. 3380  $\text{cm}^{-1}$  对应于壳聚糖 O-H、N-H 的伸缩振动峰, 2860  $\text{cm}^{-1}$  附近为 C-H 的伸缩振动峰. 1650  $\text{cm}^{-1}$  对应于酰胺键中 C=O 的伸缩振动峰. 1030  $\text{cm}^{-1}$  和 1070  $\text{cm}^{-1}$  对应于醇羟基的 C-O 伸缩振动吸收峰, 而在 1140  $\text{cm}^{-1}$  附近为吡喃环中醚键伸缩振动引起的肩峰. 与 CS 相比, CS-g-PEI 在 2860, 1650 和 1100  $\text{cm}^{-1}$  附近的红外吸收峰强度有明显增加, 分别归属于 CS-g-PEI 中 PEI 部分 C-H 伸缩振动、NHCONH 中 C=O 伸缩振动、和 C-N 伸缩振动的贡献. FTIR 谱图分析表明, PEI 与 CS 发生了共价接枝, 与  $^1\text{H-NMR}$  测试结果一致.

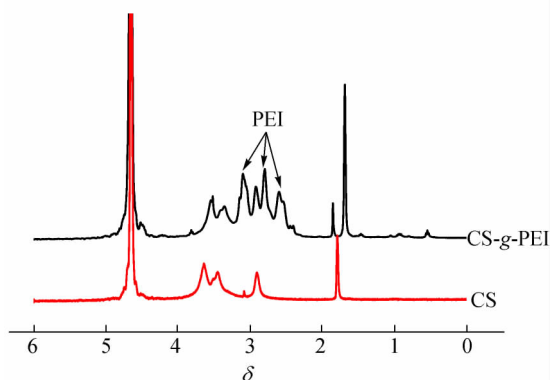


Fig. 1  $^1\text{H-NMR}$  spectra of CS and CS-g-PEI

### 2.3 凝胶电泳实验结果分析

图 3(a)、3(b) 分别给出了 CS/DNA 和 CS-g-PEI/DNA 复合物的凝胶阻滞电泳分析结果. 图 3(a) 中随着复合物中 CS 质量比的增加, DNA 被包裹得越来越多, CS/DNA 复合物 N/P 比值从 1 增加到 6 时, DNA 游离条带逐渐减少, N/P = 8 时,

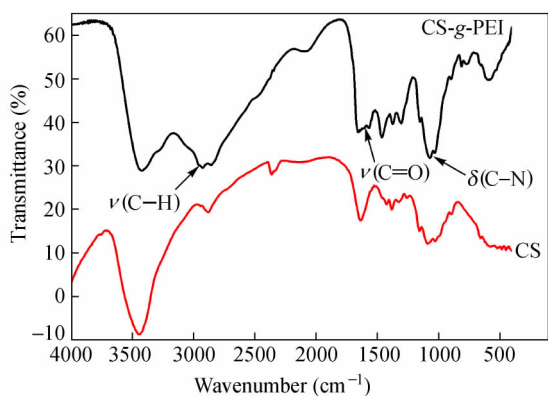


Fig. 2 FTIR spectra of CS and CS-g-PEI

DNA 游离条带完全消失,说明溶液中没有游离的 DNA,此时 DNA 被 CS 完全延滞.图 3(b)中 CS-g-PEI/DNA 复合物在  $N/P = 4$  时 DNA 游离条带几乎消失,说明此时溶液中剩余 DNA 已经很少,由此可知,在  $N/P = 4$  时,CS-g-PEI 即可完全压缩 DNA.通过对两图的对比分析可以得出:与 CS 相比,CS-g-PEI 可以在更低的  $N/P$  比完全延滞 DNA,说明 CS-g-PEI 具有比 CS 更好的压缩 DNA

的能力. PEI 本身携带有大量的氨基,在弱酸条件下,氨基质子化带正电, DNA 带负电,两者依靠静电吸附作用结合在一起;同时,因为 CS 对 DNA 具有延滞作用,两者共同作用,因此 CS-g-PEI 表现出比 CS 更好的压缩 DNA 的能力.

图 3(c)给出了 DNA 在 PBS ( $pH = 5.5$ ) 溶液中的凝胶电泳谱图,从图可以看出,在测定范围内改变 PBS 溶液与 DNA 溶液的体积比(固定 DNA 溶液体积),对 DNA 的延滞几乎没有任何影响,说明测定范围内 PBS 的酸性对 DNA 的延滞没有影响,因此可以得出结论,图 3(a)、3(b)中 DNA 的延滞归功于 CS-g-PEI 和 CS,而与所用溶剂无关.图 3(c)中 DNA 出现两条清晰的分离条带,同时也说明了所用质粒 DNA 在实验条件下的  $pH$  范围内稳定,没有发生断裂,在电泳前端的样品斑点是具有超螺旋构型的质粒 DNA,在电泳中游动最快,在电泳后方的另一个样品斑点是具有松弛构型的质粒 DNA,在电泳中游动较慢.从样品斑点的大小可以进一步判断所用质粒 DNA 在测定条件下以超螺旋结构 DNA 构型为主.

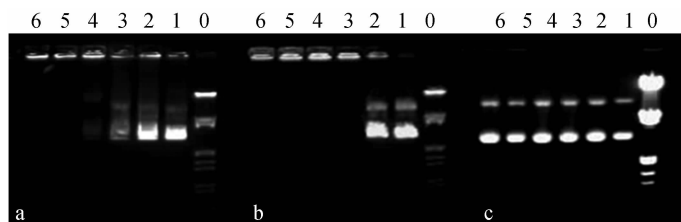


Fig. 3 Gel retardation assays of CS/DNA (a) and CS-g-PEI/DNA (b) nanoparticles, and PBS effect on DNA's retardation (c)

Lane 0: marker; 1:  $N/P = 1$ ; 2:  $N/P = 2$ ; 3:  $N/P = 4$ ; 4:  $N/P = 6$ ; 5:  $N/P = 8$ ; 6:  $N/P = 10$

## 2.4 形貌、粒径和 zeta 电位分析

图 4 给出了 CS/DNA 和 CS-g-PEI/DNA 复合物的透射电镜照片. CS/DNA 和 CS-g-PEI/DNA 复合物均呈现出不规则球形或者椭球形的形貌.与 CS/DNA 复合物对比,CS-g-PEI/DNA 复合物的尺寸稍小,这是因为 PEI 含有大量的氨基,与 CS 接枝之后,两者共同作用,比 CS 自身压缩 DNA 的能力强,更能有效压缩 DNA,因而与 DNA 形成的复合物的粒径更小.图 5 给出了动态光散射(DLS)测得的 CS/DNA 和 CS-g-PEI/DNA 复合物的水化粒径,两者的水化粒径均比透射电镜测得的粒径大,分别为 211 nm 和 168 nm,但 CS-g-PEI/DNA 复合物的水化粒径小于 CS/DNA 复合物,这一结果仍然与透射电镜测试结果一致.因为

CS-g-PEI/DNA 复合物表面正电荷多,因此其 zeta 电位比 CS/DNA 复合物高.图 6 给出的 zeta 电位测试结果表明,CS-g-PEI/DNA 复合物的 zeta 电位比 CS/DNA 复合物的 zeta 电位高出 22.1 mV. CS-g-PEI/DNA 复合物 zeta 电位为 28.7 mV,从这一数值可以推测 CS-g-PEI 与 DNA 可以形成比较稳定的复合物.从上述实验结果分析,可以得出结论:CS-g-PEI 与 DNA 可以形成大小为 100 ~ 200 nm、比较稳定的带正电的纳米复合物,具备适合作为有效基因递送粒子的物理化学性质.

## 2.5 转染效果评价

在 Hep-2 细胞中,以 pGL3 为报告基因,评价 CS-g-PEI 作为非病毒基因载体的体外转染效果,结果见图 7 所示. PEI-25000 是研究阳离子聚合物

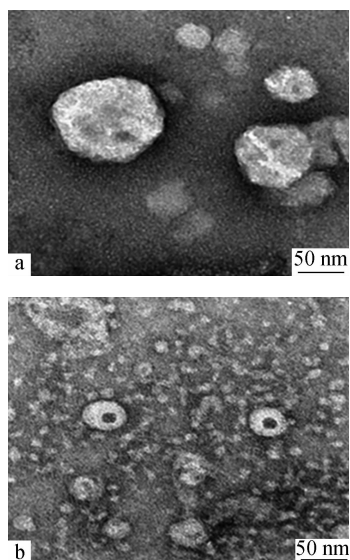


Fig. 4 TEM images of CS/DNA (a) and CS-g-PEI/DNA (b) nanoparticles (N/P = 6)

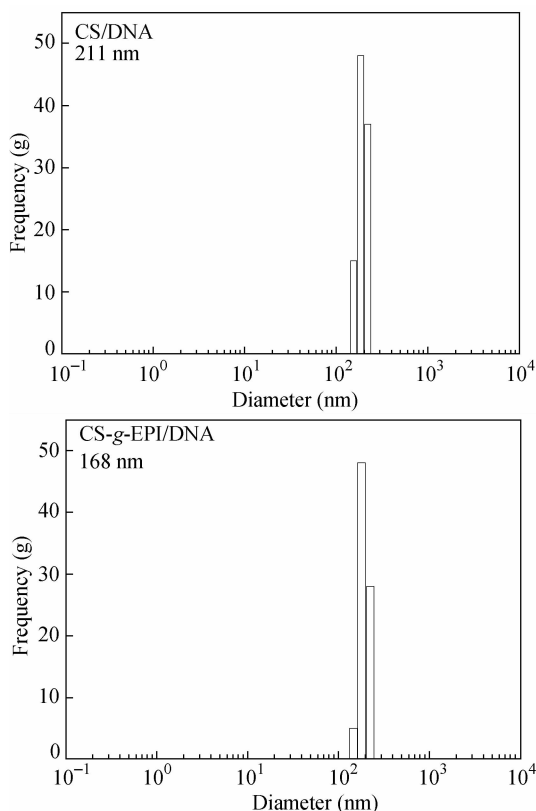


Fig. 5 Particle sizes of CS/DNA and CS-g-PEI/DNA (N/P = 6)

非病毒基因载体转染效率评价的金标准,本研究以 PEI-25000 作为正对照.从图 7 中可以看出,未进行 PEI 接枝的 CS 的转染效率在 N/P = 4 时达到最高,但均比 PEI-25000 和 PEI-1800 低,比 PEI-25000 低约 44 倍.而进行 PEI 共价接枝的 CS-g-PEI 在相同条件下的转染效率则得到大幅度的提

高,在 N/P = 6 时转染效率最好,比 PEI-1800 高 90 倍,比 PEI-25000 高出 37 倍,比 CS 则高出 160 倍.该转染结果表明,在离子液体 [BMIM]Cl 中均相合成的 CS-g-PEI 有望成为具有应用潜力的壳聚糖基非病毒基因载体.

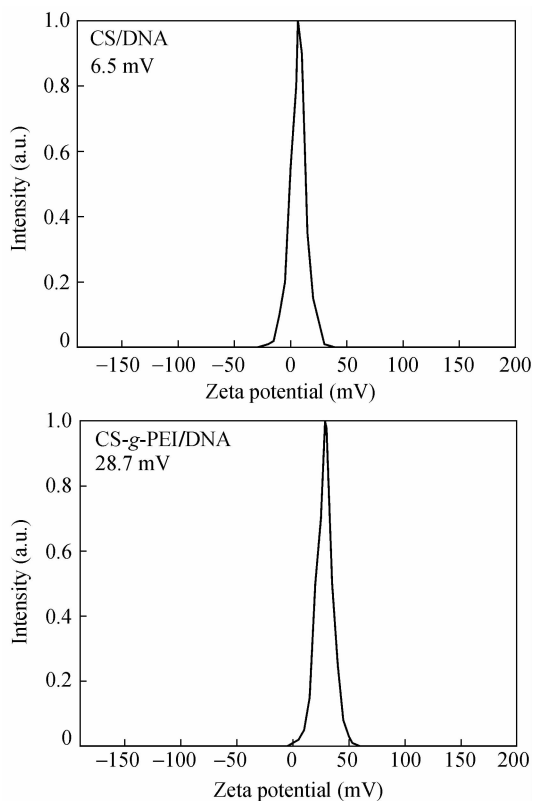


Fig. 6 Zeta potentials of CS/DNA and CS-g-PEI/DNA (N/P = 6)

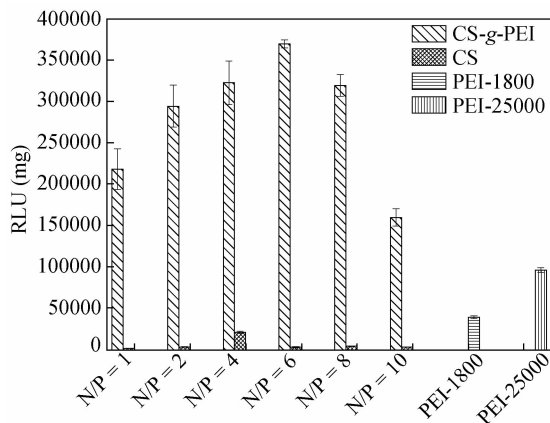


Fig. 7 Transfection efficiency of CS-g-PEI/DNA and CS/DNA at various N/P ratios on Hep-2 cells (pGL3 as report gene)

## 2.6 MTT 毒性分析

图 8 给出了 CS-g-PEI 在 Hep-2 细胞上的 MTT 细胞毒性评价结果.从图 8 的结果可以看

出, PEI-1800 在  $N/P = 4$  时的细胞存活率仅为 50% 左右, 达到了半数致死量; 而 PEI-25000 的细胞毒性更大,  $N/P = 4$  时的细胞存活率仅为 20%, 致死量达到 80%。而 CS-g-PEI 在所考察的  $N/P$  范围内, 细胞存活率均比 PEI-1800 和 PEI-25000 显著提高, 达到 70% ~ 80%; 毒性比 PEI-25000 低 4 倍, 比 PEI-1800 低 1.6 倍。说明 CS-g-PEI 的生

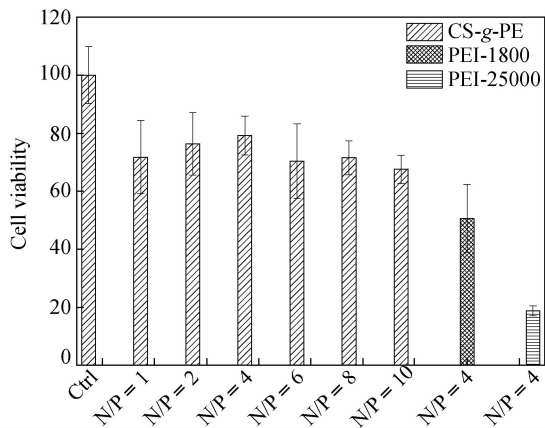


Fig. 8 Cytotoxicity of CS-g-PEI/DNA complexes at various  $N/P$  ratios on Hep-2 cell line

物安全性远远高于 PEI 类阳离子聚合物。该 MTT 细胞毒性评价结果进一步说明, [BMIM]Cl 中合成的 CS-g-PEI 是一种高效低毒的壳聚糖基非病毒基因载体, 具有很好的应用潜力。

### 3 结论

本研究采用离子液体 [BMIM]Cl 为均相反应介质, 采用 CDI 作为偶合试剂, 以 PEI 对壳聚糖进行共价接枝改性, 制备了 CS-g-PEI 壳聚糖基非病毒基因载体。通过 IR、 $^1\text{H-NMR}$  证实了接枝共聚物的生成, 接枝率达到 42%。TEM 和 DLS 等表征结果表明, CS-g-PEI 可以通过静电作用与 DNA 复合, 形成具有稳定表面正电荷和纳米尺寸大小的球形或椭球形。pGL3 荧光蛋白转染实验表明, CS-g-PEI 在 Hep-2 细胞中的转染效率比 PEI-25000 高出 37 倍, 比 CS 高出 160 倍。而且, CS-g-PEI 的细胞毒性在实验范围内均比较低, 比 PEI-25000 低约 4 倍。离子液体均相合成的 CS-g-PEI 有望成为高效低毒的壳聚糖基非病毒基因载体。

### REFERENCES

- Blau H, Khavari P. *Nat Med*, 1997, 3(6): 612 ~ 613
- Cariel D T, Gerritsen W R, Krul M R. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(8): 1197 ~ 1199
- Mulligan R C. *Sci*, 1993, 260(5110): 926 ~ 932
- Shi Xiaowen (施晓文), Li Xiaoxia (李晓霞), Du Yumin (杜予民). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2011, (1): 1 ~ 11
- Jiang Tingda (蒋挺大). *Fisheris Sci* (水产科学), 1997, 16(5): 31 ~ 33
- Kumar M N V, Muzzarelli R A A, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb A J. *Chem Rev*, 2004, 104: 6017 ~ 6084
- Gerrit Borchard. *Adv Drug Delivery Rev*, 2001, 52: 145 ~ 150
- Kim T H, Jiang H L, Jere D. *Prog Polym Sci*, 2007, 32: 726 ~ 753
- Mumper R J, Wang J, Claspell J M, Roll A P. *Proc Intern Symp Control Rel Bioact Mater*, 1995, 22(3): 178 ~ 179
- Zhou Xueqin (周雪琴), You Guifeng (由桂枫), Liu Dongzhi (刘东志), Yao Kangde (姚康德). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2009, (8): 781 ~ 785
- Baker A, Saltik M, Lehrmann H, Killisch I, Mautner V, Lann G, Christofori G. *Gene Ther*, 1997, 4: 773 ~ 782
- Jiang H L, Kim Y K, Arote R, Nah J W, Cho M H, Choi Y J, Akaike T, Cho C S. *J Control Release*, 2007, 117(2): 273 ~ 280
- Jiang H L, Kim T H, Kim Y K, Park I Y, Cho M H, Cho C S. *Biomed Mater*, 2008, 3(2): 1 ~ 7
- Han Xiaojin (韩小进), Cheng Chunzu (程春祖), Zhu Qingsong (朱庆松), Wu Changcheng (武长城). *J Chem Ind* (化工学报), 2010, 161(11): 3020 ~ 3024
- Zhu Qingsong (朱庆松), Han Xiaojin (韩小进), Cheng Chunzu (程春祖), Wu Changcheng (武长城). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2011, (10): 1173 ~ 1179
- Sima T L, Guo S, Shi F, Deng Y Q. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(45): 8145 ~ 8147
- Liu Yanmei (刘艳梅), Ying Ming (应敏), Yang Zhijie (杨志杰), Le Zhanggao (乐长高). *Chin J Org Chem* (有机化学), 2006, (26)9: 1286 ~ 1290
- Mao H Q, Roy K, Troung V L, Janes K A, Lin K Y, Wang Y, August J T, Leong K W. *J Control Release*, 2001, 70(3): 399 ~ 421

## Homogeneous Graft of Chitosan with Polyethylenimine in Ion Liquid and Its Application in Gene Delivery

Hui-ying Chen<sup>1,2</sup>, Shu-biao Zhang<sup>2\*</sup>, Xiao-jun Peng<sup>1</sup>, Shao-hui Cui<sup>2</sup>,  
Yi-nan Zhao<sup>2</sup>, Chuan-min Zhang<sup>2</sup>, Ying Han<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Fine Chemicals, Faculty of Chemical, Environmental and  
Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization-The State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education,  
College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600)

**Abstract** By using ionic liquid 1-butyl-3-methyl imidazolium chloride ([BMIM]Cl) as reaction solvent and catalyst, and 1,1-carbonyldiimidazole as a coupling reagent, chitosan grafted with low molecular weight polyethylenimine (CS-*g*-PEI) was synthesized in a non-aqueous homogeneous solution. <sup>1</sup>H-NMR and FTIR experiments characterized the composition of copolymer CS-*g*-PEI and confirmed that the chitosan chains were successfully grafted with polyethylenimine at a ratio of 42%. By using a coagulation method, CS-*g*-PEI/DNA complex nanoparticles were obtained, and their physicochemical properties were characterized with transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and Agarose gel electrophoresis assay. The transfection efficiency of CS-*g*-PEI was evaluated in Hep-2 cell lines with pGL3 as reporting genes. The gene expressing mediated by CS-*g*-PEI was 160 times higher than that by CS. MTT assays results showed that CS-*g*-PEI had low cytotoxicity in the range of the experimental dose. The results indicate that CS-*g*-PEI synthesized in ion liquid [BMIM]Cl has a very good potential as efficient and safe non-viral gene vectors.

**Keywords** Non-viral gene vector, Chitosan, Ionic liquid, PEI, Graftcopolymer

\* Corresponding author: Shu-biao Zhang, E-mail: zsb@dlnu.edu.cn