

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00473

聚氨基酯载基因纳米粒的研究

王江峰, 鲁莹, 黄景彬, 邹豪, 张翮, 钟延强*

第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 合成一种新型阳离子聚合物聚氨基酯(PBAE), 并以此作为基因载体进行研究。**方法** 通过迈克尔加成反应合成 PBAE, 以自主装法制备 PBAE/pDNA 纳米复合物, 并考察 PBAE/pDNA 纳米复合物在 HEK293 细胞中的转染效率。**结果** 当 PBAE/pDNA 的质量比为 50:1 时, pDNA 被完全包裹; 在 HEK293 细胞转染实验中, 当 PBAE/pDNA 质量比为 200:1 时, 其转染效率高于阳性对照组 PEI/pDNA 的转染效率(43.3%±3.7% vs 30.3%±2.1%, $P<0.05$)。**结论** 带正电荷的 PBAE 能够通过静电作用浓缩包裹 pDNA, 在体外转染实验中具有较高的转染效率。

[关键词] 聚氨基酯; 纳米粒; 转染效率; 基因载体

[中图分类号] R 349.83 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0473-04

Polymers poly(β -amino esters) nanoparticles for gene delivery

WANG Jiang-feng, LU Ying, HUANG Jing-bin, ZOU Hao, ZHANG He, ZHONG Yan-qiang*

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To synthesize a new type of cationic polymers (β -amino esters)(PBAE) and to study its role as a gene vector. **Methods** PBAE was synthesized by the Michael addition reaction. PBAE/pDNA complex nanoparticles were prepared by self-assembly, and the gene transfection efficiency mediated by the nanoparticles into HEK293 cells *in vitro* was observed. **Results** When weight ratio of PBAE/pDNA was 50:1, pDNA was completely wrapped. And the transfection efficiency of PBAE/pDNA nanoparticles (PBAE/pDNA weight ratio being 200:1) was significantly higher than PEI/pDNA nanoparticles(43.3%±3.7% vs 30.3%±2.1%, $P<0.05$). **Conclusion** Cationic poly(β -amino esters) can electrostatically bind to and condense anionic DNA into nanometersized particles. PBAE/pDNA nanoparticles has a high transfection efficiency in *in vitro* transfection experiments.

[Key words] polymers poly-amino ester; nanoparticles; transfection efficiency; gene vectors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5):473-476]

成功的基因治疗很大程度上取决于是否有合适的载运系统, 目前进行研究的基因载体主要有两类: 病毒载体和非病毒载体。病毒型基因载体由于转染效率高而被较多地应用, 但病毒载体也存在着自身难以克服的局限性, 如诱导宿主免疫反应、潜在的致癌性、制备复杂生产不能规模化、靶向性差、所能装载的外源 DNA 大小有限等, 使其应用受到很大限制^[1-2]。因此, 低毒、低免疫反应、易组装、经济、便于大规模普及应用和可反复应用的非病毒型基因载体成为当今研究的焦点。阳离子脂质体和阳离子聚合物是目前广泛研究的两类非病毒型基因载体^[3-4]。

1987年, Felgner等^[5]首次报道了阳离子脂质体

可介导基因的体外转染。其后, 人们做了大量工作来研究阳离子脂质体作为基因载体。脂质体介导 DNA 主要依赖于组成脂质体的磷脂成分能促进细胞膜的融合, 加速 DNA 的转移, 它的主要优点是: (1) 脂质体与基因复合过程容易, 便于生产; (2) 脂质体是非病毒性载体, 与细胞膜融合后将目的基因导入细胞, 本身降解, 无毒、无免疫原性; (3) DNA 可得到保护, 不被灭活或被核酸酶降解。但是脂质体的制备重复性和储存稳定性较差, 而且溶酶体可以使进入细胞的脂质体降解, 这就限制了脂质体作为基因载体的应用^[6-7]。阳离子聚合物本身带有正电荷, 可以与带有负电荷的质粒 DNA (pDNA) 通过静

[收稿日期] 2011-01-04 **[接受日期]** 2011-03-23

[基金项目] 上海市科委纳米专项基金(0852nm04200). Supported by the Nanotechnology Foundation of Shanghai Science and Technology Committee (0852nm04200).

[作者简介] 王江峰, 硕士. E-mail: air008@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871285, E-mail: yqzhong@smmu.edu.cn

电作用紧密结合,形成聚合物与 DNA 的复合物,保护 DNA 不受 DNA 酶降解。水溶性的阳离子材料作为基因载体具有操作简单、稳定性好的优点,溶于水后直接与 DNA 的溶液混合即可进行转染,这已越来越受到人们的重视。常用的阳离子材料有聚乙烯亚氨 (polyethylenimine, PEI)、聚酰胺-胺 (PAM-AM)、聚左旋赖氨酸 (PLL) 等^[8-10]。阳离子聚合物运输基因药物的原理包括 7 个步骤:(1)基因与载体结合;(2)载体复合物被吸收到细胞内包涵体中;(3)复合物从包涵体释放到细胞质中;(4)细胞核吸收复合物;(5)DNA 与载体分离;(6)mRNA 表达;(7)蛋白质表达^[11]。

1970 年 Danusso 等^[12]首次报道了以二胺 (bi-functional amines)和二丙烯酸酯 (diacrylate esters)为原料,通过迈克尔加成反应合成了骨架中含有叔胺的线性聚氨基脂 [poly(β -amino esters), PBAE]。2000 年, Lynn 等^[13]首先以 N,N-二甲基乙二胺、哌嗪、4,4-丙基哌啶基哌啶作为二胺分别与 1,4-丁二醇二丙烯酸酯反应生成相应的 PBAE 并应用于基因的传递。PBAE 作为一种新型的阳离子聚合物基因载体,具有原料廉价、合成简单、结构多样、可降解、细胞毒性低和转染效率高等优点^[14-15],日益受到人们的关注。本研究主要采用迈克尔加成反应合成一种新型的 PBAE,并进行 PBAE 载基因纳米粒的研究。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 PEI(25 000,支链)、5-氨基-1-戊醇、1,4-丁二醇二丙烯酸酯均购自美国 Sigma 公司;DMSO 购自百灵威公司;琼脂糖、溴化乙啶(EB)、DNA marker(DSTM2000)由上海浩然科技有限公司分装;DMEM 购自奥地利 PAA 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;其他试剂购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。HEK293 细胞购自上海细胞研究所。凝胶成像仪购自上海复日科技有限公司;Zetasizer nano-ZS 测定仪购自英国 Malvern 公司;FACSCalibur 流式细胞仪购于德国 Zeiss 公司。

1.2 PBAE 的合成 精密称取 5-氨基-1-戊醇 450 mg(4 mmol)、1,4-丁二醇二丙烯酸酯 795 mg(4 mmol)置于 10 ml 带螺帽盖小瓶中,然后加入 4 ml CH₂Cl₂溶解,磁力搅拌,55℃下反应 48 h。反应结束后,反应产物按下列工艺进行纯化:将产物置于 10 ml EP 管中,加入 5 ml 乙醚,涡旋 5 min,离心(5 600×g,5 min),弃去上层溶液,反复 3 次。真空干燥除去有机溶剂即得并于 4℃ 储存、备用。以

NMR 鉴定其结构,以凝胶色谱测定其相对分子质量。反应原理见图 1。

1.3 PBAE/pDNA 纳米复合物的制备 取 pDNA 以醋酸盐缓冲液(pH=5,25 mmol/L)稀释至 60 μ g/ml。精密称取 PBAE 100 mg 溶于 1 ml DMSO 中(100 mg/ml,溶液 A)作为 PBAE 储备液。将 PBAE 储备液用醋酸缓冲液稀释至 12 mg/ml。按照质量比(PBAE/pDNA)为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 的要求稀释 PBAE。取 pDNA 溶液与各浓度的 PBAE 溶液等体积混合,涡旋 30 s,静置 30 min 即得到 PBAE/pDNA 纳米复合物。

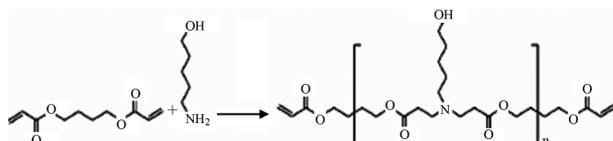


图 1 PBAE 的合成

Fig 1 Synthesis of PBAE

PBAE: Poly(β -amino esters)

1.4 PBAE/pDNA 纳米复合物包封率的测定 新鲜制备不同质量比的 PBAE/pDNA 纳米复合物。称取适量琼脂糖,加入适量 Tris-乙酸(TAE)溶液,加热溶解,配制 1.0% 琼脂糖凝胶溶液,室温冷却至约 60℃,加入 EB 溶液(500 μ g/ml)插入 DNA 染色,灌胶,加样,80 V 电泳 50 min,紫外投射仪观察并拍照(以 DSTM2000 为 marker,以裸 pDNA 为对照)。

1.5 PBAE/pDNA 纳米复合物粒径和 zeta 电位的测定 新鲜制备不同质量比的 PBAE/pDNA 纳米复合物,采用 Zetasizer nano-ZS 测定仪,测定纳米粒的粒径和 zeta 电位。

1.6 细胞转染实验 HEK293 细胞株用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)在 37℃、5%CO₂条件下连续培养,每 2 d 传代 1 次。在 24 孔板中以 5×10⁵个细胞/孔接种生长活跃的 HEK293 细胞,培养过夜,分别加入按照质量比为 50:1、100:1、200:1 制备新鲜的 PBAE/pDNA 纳米复合物,同时制备 PEI/pDNA 纳米复合物(N/P 为 10)作为阳性对照,质粒量为 3 μ g/孔。继续培养 48 h 后荧光显微镜下观察转染细胞,之后以流式细胞仪测定转染效率。

2 结果

2.1 PBAE 的结构表征 以 NMR 鉴定 PBAE 的结构,其¹H NMR 图谱见图 2。PBAE 溶于 DMSO-d₆中,1.2~1.45 (m, -NCH₂(CH₂)₃CH₂OH), 1.6(bs, -N(CH₂)₂COOCH₂CH₂-

和 $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_2\text{CH}_2^-$), 2.25 ~ 2.5 (m, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -和 $-\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{OH}$), 2.6 ~ 2.7 (m, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -), 3.4 (bs, $-\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{OH}$), 4.0 (bs, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2-\text{COOCH}_2\text{CH}_2^-$).

以凝胶渗透色谱测定 PBAE 相对分子质量, 其相对分子质量 M_w 为 $11\,012 \pm 1\,899$.

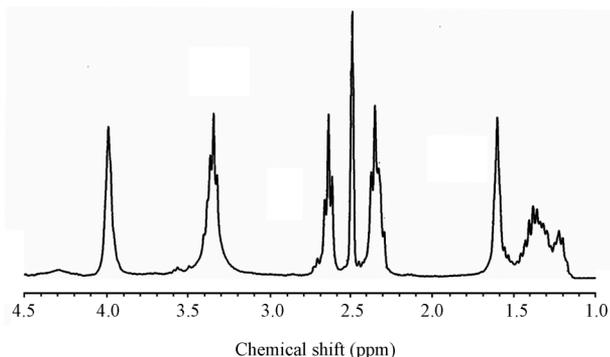


图 2 PBAE 的 ^1H NMR 图
Fig 2 ^1H NMR image of PBAE
PBAE: Poly(β -amino esters)

2.2 包封率的凝胶阻滞实验检测结果 PBAE 与 pDNA 以不同质量比复合形成纳米粒后的凝胶电泳结果如图 3 所示。PBAE 与 pDNA 的质量比为 50 : 1 时, DNA 条带消失, 即当质量比 $\geq 50 : 1$ 时, PBAE 能够完全包裹 pDNA。

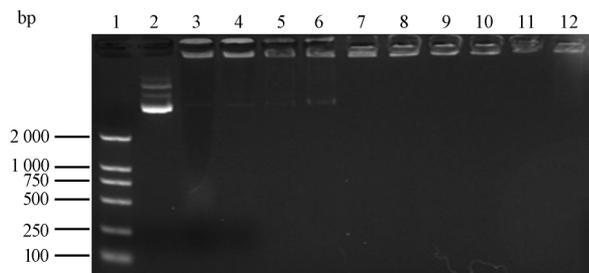


图 3 PBAE/pDNA 纳米粒凝胶阻滞实验

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of PBAE/pDNA nanoparticles

1: Marker; 2: Naked pDNA; 3-12: Complexes prepared at weight ratios of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100. PBAE: Poly(β -amino esters)

2.3 PBAE/pDNA 纳米复合物粒径和 zeta 电位的测定结果 PBAE/pDNA 纳米复合物粒径随质量比变化的趋势如图 4A 所示。从图中可以看出, 当 PBAE/pDNA 质量比为 10 : 1 时, 纳米复合物的粒径为 (256.2 ± 9.4) nm, 随着质量比的增大, PBAE/pDNA 纳米复合物的粒径随之减小, 最后粒径维持在 100 nm 以内。

PBAE/pDNA 纳米复合物 zeta 电位随质量比变化的趋势如图 4B 所示。从图中可以看出, PBAE/

pDNA 质量比对 PBAE/pDNA 纳米复合物电位影响不明显, PBAE/pDNA 纳米复合物 zeta 电位始终维持在 30 mV 左右。

2.4 细胞转染效率 基因转染 2 d 后, 荧光显微镜观察基因产物 GFP 的表达结果见图 5A, 随 PBAE/pDNA 的质量比增加, 基因表达增强。定量测定 GFP 的结果如图 5E 所示。结果表明 PBAE/pDNA 纳米粒的转染效率随着 PBAE/pDNA 质量比的增大而增大。此外在与阳性对照组 PEI/pDNA 的转染效率的对比实验中, 当 PBAE/pDNA 质量比为 200 : 1 时, 其转染效率高于 PEI/pDNA 的转染效率 $(43.3\% \pm 3.7\% \text{ vs } 30.3\% \pm 2.1\%, P < 0.05)$ 。

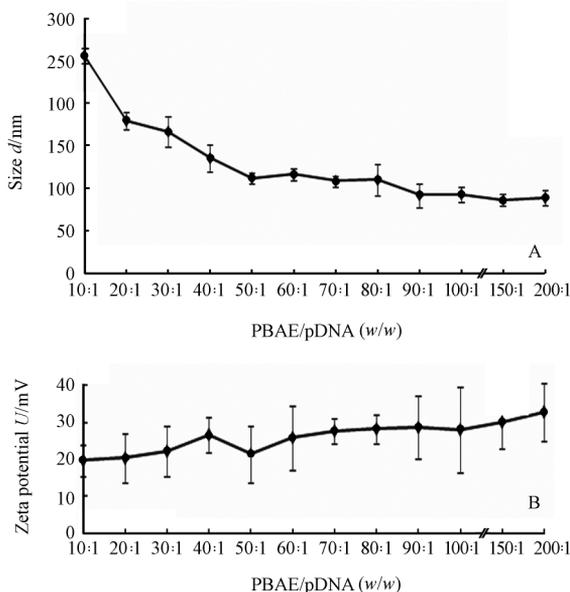


图 4 PBAE/pDNA 纳米复合物粒径 (A) 和 zeta 电位 (B)
Fig 4 Size (A) and zeta potential (B) of PBAE/pDNA nanoparticles with various weight ratio
PBAE: Poly(β -amino esters). $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

以二胺和二丙烯酸酯为原料通过迈克尔加成反应合成的 PBAE, 一方面表面带有大量氨基阳离子, 可以通过静电吸附包裹和浓缩带负电荷的 DNA 以保护 DNA 免受 DNA 酶的降解; 另一方面 PBAE 链中含有大量的酯键, 在生理 pH 值下易降解, 细胞毒性低。而以不同的二胺和不同的二丙烯酸酯反应可以得到不同类型的 PBAE, 所以 PBAE 作为基因载体具有很好的发展前景。

本研究以 5-氨基-1-戊醇和 1,4-丁二醇二丙烯酸酯为原料制备的线性 PBAE 为淡黄色黏稠状, 能溶于 DMSO、乙醇、四氢呋喃、氯仿、二氯甲烷等有机溶剂, 在中性 pH 值的水溶液中溶解度低, 但能够很好地溶于酸性水溶液中。该 PBAE 在 pH 为 5 的酸

性溶液中,当 PBAE/pDNA 质量比 $\geq 50 : 1$ 时能够完全包裹住 pDNA。PBAE/pDNA 纳米复合物的粒径与质量比有关,质量比增大粒径随之减小,最后粒径维持在 100 nm 以内。但是在实验中我们发现 PBAE/pDNA 质量比对 PBAE/pDNA 纳米复合物

zeta 电位影响不明显,PBAE/pDNA 纳米复合物 zeta 电位始终维持在 30 mV 左右,造成这种现象的原因可能是质量比较大,电荷比已经达到饱和。而在体外细胞转染实验中,我们发现 PBAE 的转染效率高于 PEI,提示 PBAE 作为基因载体具有高效性。

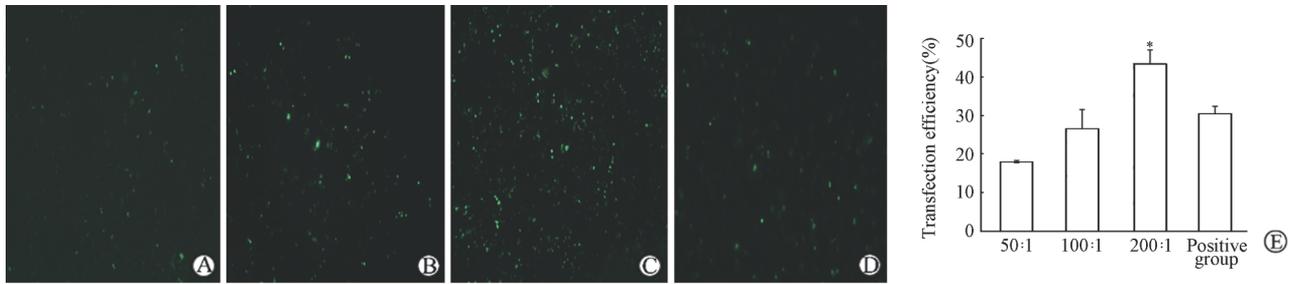


图 5 PBAE/pDNA 纳米粒在 HEK293 细胞中转染的荧光照片 (A~D) 及定量结果 (E)

Fig 5 Fluorescence images of GFP expression in HEK293 cells and quantitative results

A: PBAE/pDNA nanoparticles at weight ratio 50 : 1; B: PBAE/pDNA nanoparticles at weight ratio 100 : 1; C: PBAE/pDNA nanoparticles at weight ratio 200 : 1; D: Positive group (PEI/pDNA nanoparticles); E: *In vitro* transfection efficiency against HEK293 cells. * $P < 0.05$ vs positive group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

虽然 PBAE 在基因载体的研究应用中已经取得了一些成果^[16-19],但是人们对于具有靶向性 PBAE 的研究还比较少,因此继续筛选高效低毒的 PBAE 和修饰具有靶向性的 PBAE 衍生物将是未来研究 PBAE 基因传递系统的重点。

[参考文献]

[1] Sun J Y, Anand-Jawa V, Chatterjee S, Wong K K. Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors [J]. *Gene Ther*, 2003, 10: 964-976.

[2] Gore M E. Adverse effects of gene therapy: gene therapy can cause leukaemia; no shock, mild horror but a probe [J]. *Gene Ther*, 2003, 10: 4.

[3] Alakhov V, Klinski E, Lemieux P, Pietrzynski G, Kabanow A. Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1: 583-602.

[4] Kakizawa Y, Kataoka K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 203-222.

[5] Felgner P L, Gadek T R, Holm M, Roman R, Chan H W, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 7413-7417.

[6] Cristiano R J. Targeted, non-viral gene delivery for cancer gene therapy [J]. *Front Biosci*, 1998, 3: D1161-D1170.

[7] Pouton C W, Leonard W. Key issues in non-viral gene delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 34: 3-19.

[8] Chen T, Wang Z, Wang R, Lu T, Wang W. Polyethylenimine-DNA solid particles for gene delivery [J]. *J Drug Target*, 2007, 15: 714-720.

[9] Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown N B, D'Emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers [J]. *Int J Pharm*, 2003, 252

(1-2): 263-266.

[10] Elizabeth R G, Jean M J F. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 35-43.

[11] Green J J, Langer R, Anderson D G. A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 749-759.

[12] Danusso F, Ferruti P. Synthesis of tertiary amine polymers [J]. *Polymer*, 1970, 11: 88-113.

[13] Lynn D M, Langer R. Degradable poly(β -amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 10761-10768.

[14] Green J J, Shi J, Chiu E, Leshchiner E, Langer R, Anderson D G. Biodegradable polymeric vectors for gene delivery to human endothelial cells [J]. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17: 1162-1169.

[15] Zhong Z, Song Y, Engbersen J F, Lok M C, Hennink W E, Feijen J. A versatile family of degradable non-viral gene carriers based on hyperbranched poly(ester amine)s [J]. *J Control Release*, 2005, 109(1-3): 317-329.

[16] Anderson D G, Lynn D M, Langer R. Semi-automated synthesis and screening of a large library of degradable cationic polymers for gene delivery [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 3153-3158.

[17] Zugates G T, Tedford N C, Zumbuehl A, Jhunjhunwala S, Kang C S, Griffin L G, et al. Gene delivery properties of end-modified poly(β -amino ester)s [J]. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 1887-1896.

[18] Zugates G T, Anderson D G, Little S R, Lawhorn I E, Langer R. Synthesis of poly(β -amino ester)s with thiol-reactive side chains for DNA delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 12726-12734.

[19] Green J J, Chiu E, Leshchiner E S, Shi J, Langer R, Anderson D G. Electrostatic ligand coatings of nanoparticles enable ligand-specific gene delivery to human primary cells [J]. *Nano Lett*, 2007, 7: 874-879.