

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00991

用于基因递送的普朗尼克化聚酰胺-胺树状聚合物研究

王翔^{1,2}, 丁雪鹰³, 武鑫¹, 丁宝月¹, 范伟¹, 高静³, 高申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433
2. 解放军 98 医院药械科, 湖州 313000
3. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 合成 P123 修饰的聚酰胺-胺(PAMAM)聚合物, 并研究其作为基因递送载体的可行性。**方法** 合成及表征了普朗尼克 P123 修饰的 PAMAM 树状聚合物, 选择 A375、293T 及 HepG2 细胞对其进行毒性实验(MTT 法), 选择 HepG2 细胞对其与质粒 DNA 形成的复合物进行转染实验, 并与聚乙烯亚胺(PEI)以及未修饰的 PAMAM 进行比较。**结果** 聚合物有较高的纯度, 粒径电位结果表明复合物符合基因递送的要求, P123 修饰 PAMAM 可以降低细胞毒性, 增加细胞体外转染效率。**结论** P123 修饰的 PAMAM 是一种适用于基因递送的新型的聚合物载体。

[关键词] 基因; 聚酰胺-胺; 转染; 细胞毒性; 普朗尼克

[中图分类号] R 916.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-0991-05

Research on pluronic P123ylated polyamidoamine dendrimers for gene delivery

WANG Xiang^{1,2}, DING Xue-ying³, WU Xin¹, DING Bao-yue¹, FAN Wei¹, GAO Jing³, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmacy, No. 98 Hospital of PLA, Huzhou 313000, Zhejiang, China
3. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To synthesize P123ylated polyamidoamine (PAMAM) copolymers and to evaluate the feasibility of using the copolymers as gene delivery agent. **Methods** Pluronic P123 modified PAMMA copolymers were synthesized and characterized. The cytotoxicity of the dendrimers was evaluated by the MTT assay using A375, 293T and HepG2 cells. The transfection efficiency of the complexes formed by plasmid with P123ylated PAMAM was evaluated using HepG2 cells. **Results** The P123ylated PAMAM copolymers had a high purity; the particle sizes and zeta potentials of the complexes were suitable for gene delivery. P123ylated PAMAM could decrease cytotoxicity and increase *in vitro* transfection efficiency. **Conclusion** P123ylated PAMAM is a new copolymers agent suitable for gene delivery.

[Key words] gene delivery; polyamidoamine; transfection; cytotoxicity; Pluronic

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9):991-995]

在过去的十几年中, 基因治疗取得了长足的进展^[1]。越来越多的非病毒载体用于基因递释系统, 如聚合物载体^[2-6]。相比病毒载体而言, 非病毒载体有许多明显的优势, 包括安全性、低免疫原性、对大 DNA 分子的转染能力等^[7]。因此, 研究重点被越来越多地放在非病毒基因载体上。然而, 对基因递释系统来说, 聚合物载体相对低的转染效率一直是个障碍。

树状大分子是一类有多支化中心和高度支化结构、表面具有极高的官能团密度、大小可以控制的新

型大分子。聚酰胺-胺 (polyamidoamine, PAMAM) 树状聚合物因具有生物相容性而被建议作为非病毒载体进行基因的递送^[8-9]。PAMAM 表面具有较高的电荷密度, 可以高度地压缩和保护质粒 DNA, 增加基因递送的效率^[10]。然而, 同其他聚合物载体一样, PAMAM 具有高毒性、低生物相容性和低水溶性等缺点^[8]。通过对其表面的修饰, 如使用 PEG^[11]、转铁蛋白^[12]、聚 N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺^[13] 或精氨酸^[14] 等, 可以克服上述的缺点, 提高转染效率。

普朗尼克 P123 是一种表面活性剂, 由亲水性的

[收稿日期] 2011-03-27 **[接受日期]** 2011-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金 (30973459, 30873178, 81072100). Supported by National Natural Science Foundation of China (30973459, 30873178, 81072100).

[作者简介] 王翔, 硕士生. E-mail: wangg0214@foxmail.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873715, E-mail: liullk@126.com

聚环氧乙烷和疏水性的聚环氧丙烷聚合而成,使用 P123 修饰 PAMAM,亲水性的基团能提高聚合物的稳定性,增加体内生物相容性,降低毒性,而疏水性的基团则对细胞有更好的亲和性,因此相对 PAMAM 来说更适用于基因递送^[15-16]。在本研究中我们合成了不同接枝度的 P123-g-PAMAM,并对其作为非病毒基因载体的各方面的性质进行了考察。

1 材料和方法

1.1 材料 聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI, $M_w = 25\ 000$) 和 PAMAM (G5.0, $M_w = 28\ 826$) 购于美国 Sigma 公司;普朗尼克 P123 ($M_w = 5\ 780$) 购于德国 BASF 公司;三光气购于上海达瑞精细化学品有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 购于上海延长生化科技发展有限公司;mPEG-SPA (纯度 > 98%, $M_w = 5\ 300$) 购于嘉兴博美生物技术有限公司;透析袋(截留分子量 14 000) 购于上海绿鸟科技发展有限公司;Plasmid Mega Kit 质粒大量提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司;胰蛋白酶、酵母提取物、琼脂均为英国 Oxoid 公司产品;BCA 试剂盒购于美国 Pierce 公司;荧光素酶检测试剂盒购于美国 Promega 公司;pGL3-Control Luciferase Reporter Vector 购于美国 Promega 公司;胰蛋白酶、MTT、DM-SO 购于美国 Sigma 公司;细胞培养液以及胎牛血清 (FBS) 均购于美国 Gibco 公司;293T、A375 和 HepG2 细胞由第二军医大学长海医院实验诊断科馈赠。使用 Milli-Q Plus 水纯化系统,其他试剂均为分析纯。

1.2 P123 的活化 将干燥的 P123 (0.550 g, 0.5 mmol) 溶于 40 ml 甲苯/二氯甲烷 (体积比 3 : 1) 中,加入三光气 (0.149 g, 0.5 mmol), 室温下搅拌过夜。将反应液抽真空,所得残渣重新溶解于 20 ml 无水甲苯和 10 ml 无水二氯乙烷混合液中。加入 NHS 0.137 g (1.2 mmol), 加入 0.2 ml 无水三乙胺,继续搅拌 4 h。抽真空,所得残渣溶解于 50℃ 100 ml 乙酸乙酯中,过滤,将滤液抽真空,旋转蒸发,挥去乙酸乙酯,冷却固化反应物,-20℃ 保存。平均回收率为 80%~85%。

1.3 P123 化 PAMAM 的合成 将 PAMAM (0.29 g, 0.01 mmol) 溶于 10 ml 的 PBS (pH 7.4) 中,按照不同摩尔比 (0.01, 0.02, 0.05 和 0.1 mmol) 加入活化的 P123,室温搅拌 24 h。所得溶液透析 72 h 以除去多余的 P123,冻干反应物^[17],得到不同接枝量的聚合物。合成路线见图 1。聚合物的

接枝量用 ¹H NMR 进行分析。根据峰面积计算每个 PAMAM 分子上和羰基邻近的亚甲基质子与 P123 中甲基质子峰面积比,可得到每个树状分子实际接枝量,每个 PAMAM 分子中与羰基相连的亚甲基有 256 个,每个 P123 分子中甲基有 70 个,计算公式为:

$$n = \frac{S_{-CH_3}}{S_{-CH_2-}} \times \frac{256 \times 2}{70 \times 3}$$

其中, S_{-CH_3} 为 P123 中甲基质子峰面积, S_{-CH_2-} 为 PAMAM 分子中所有与羰基邻近的亚甲基质子峰面积。

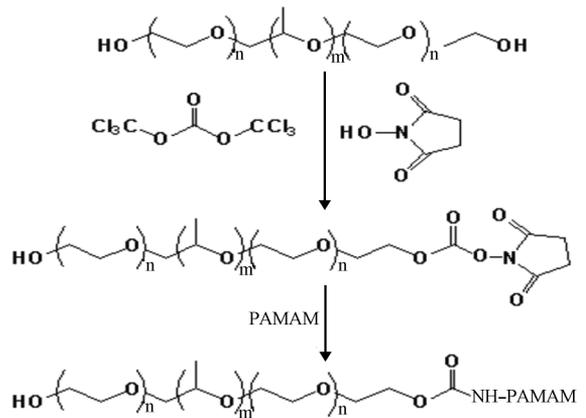


图 1 P123-g-PAMAM 合成路线图
Fig 1 Synthetic scheme of Solutol-g-PAMAM
PAMAM: Polyamidoamine

1.4 复合物粒径和电位测定 按照不同的氮磷比 (N/P) 稀释的 0.5 ml 聚合物和 0.5 ml (5 μg) DNA 溶液混合,涡旋 30 s,室温放置 30 min,制得复合物,用粒径/Zeta 电位测定仪 (英国马尔文公司) 测定粒径及电位,测定条件:25℃、固定角 90°、波长 600 nm。每组复合物平行测量 3 次。

1.5 复合物凝胶电泳阻滞分析 按上述方法制得的复合物进行琼脂糖凝胶电泳,以测定在不同 N/P 情况下聚合物对 DNA 的包裹情况。具体条件:1% (W/V) 琼脂糖凝胶 (含 0.5% EB)、1×TAE 缓冲液、电压 70 V、电泳时间 60 min,紫外投影仪 (上海复日科技有限公司) 观察并拍照。

1.6 细胞培养 将 293T 细胞置于 DMEM 培养液 (含 10% FBS), A375 和 HepG2 置于 RPMI1640 培养液 (含 10% FBS) 中,于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

1.7 复合物细胞毒性测定 将 3 种细胞分别用 0.1% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化,接种于 96 孔板 (美国 Costar 细胞培养板),细胞汇合度达到 50% 时加入 RPMI1640 (含 10% FBS) 或 DMEM (含 10% FBS) 培养液,培养 24 h,使细胞汇合度达到 70%~80%。

实验前,吸去培养液,每孔加入 20 μl 不同浓度的聚合物材料(20、40、80、120、160 $\mu\text{g}/\text{ml}$,以无血清 RM-PI1640 或 DMEM 作为溶剂)^[18],孵育 6 h 后换含有 10% FBS 的 RMPI1640 或 DMEM 培养液,继续培养 24 h,吸去培养液,加入 0.5 mg/ml MTT(PBS 为溶剂,过滤除菌)100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。吸去上清液,加入 200 μl DMSO,振荡 10 min,在 492 nm 波长处测定光密度(D)值。以未经聚合物处理的细胞作为对照(100%)。计算公式为:细胞活力(%) = $(D_{\text{实验组}} / D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.8 复合物细胞转染测定 将 HepG2 细胞按照 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ 的密度接种于 24 孔板(美国 Costar 细胞培养板),每孔加入 RMPI1640 培养液(含 10% FBS) 1 ml,培养 24 h,转染前,换上无血清的培养液,加入 200 μl 不同 N/P 的复合物[其中含 100 μl 聚合物和

100 μl (2 μg) pGL-3 质粒],每种复合物重复做 3 孔,孵育 4 h 后换含 10% FBS 的培养液继续培养 48 h,使用萤火虫荧光素酶检测试剂盒进行分析,用 Infinite M200 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)测量荧光活性,并用 BCA 蛋白定量试剂盒校正。

2 结果

2.1 P123 化 PAMAM 的合成 将纯化后的聚合物溶于 D_2O ,进行 ^1H NMR 分析,图 2A 为 P123 的核磁图谱,其中 1.1~1.4 的峰为 $-\text{CH}_3$ 单元质子峰,图 2B 为 PAMAM 的核磁图谱,2.4~2.7 的峰即为与羰基相连 $-\text{CH}_2-$ 单元质子峰,图 2C 为 P123-g-PAMAM 核磁图谱。图 2C 中未见其他峰出现,说明接枝聚合物有较高的纯度。通过计算我们得到不同接枝量的复合物,详见表 1。

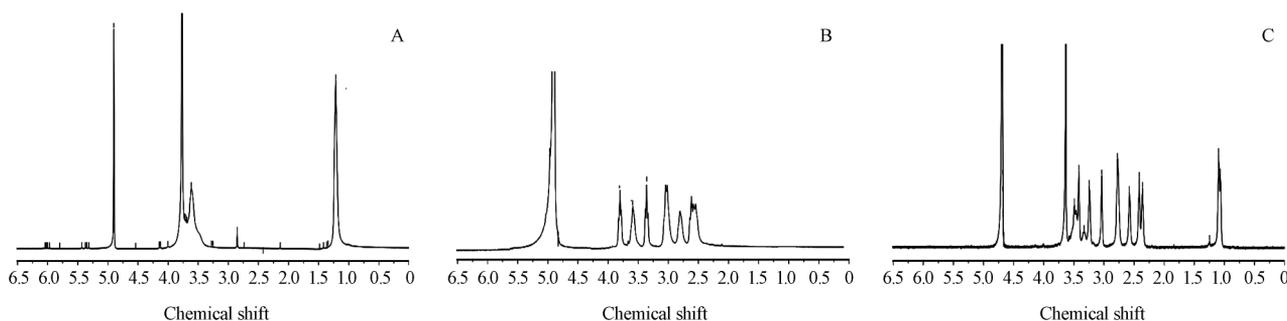


图 2 P123(A)、PAMAM(B)及 P123-g-PAMAM(C)的 ^1H NMR 图谱
Fig 2 ^1H NMR data of P123(A), PAMAM(B) and P123-g-PAMAM(C)

PAMAM: Polyamidoamine

表 1 合成聚合物的鉴定

Tab 1 Characterization of the synthesized dendrimers

Copolymer	P123 : PAMAM		Relative molecular mass ^b
	Feed ratio	Graft ratio ^a	
P123-1g-PAMAM	1 : 1	1.12	35 299.6
P123-2g-PAMAM	2 : 1	2.17	41 368.6
P123-5g-PAMAM	5 : 1	4.96	57 494.8
P123-10g-PAMAM	10 : 1	10.85	91 539

^a: As determined by ^1H NMR analysis of the copolymer samples.

^b: Calculated based on ^1H NMR data assuming that all polyether chains in the copolymer samples are linked to the PAMAM. PAMAM: Polyamidoamine

2.2 复合物粒径和电位测定 为考察聚合物结构对复合物粒径的影响,把不同接枝度的聚合物按不同的 N/P 与质粒 DNA 形成复合物。结果见图 3,复合物粒径均小于 250 nm。随着接枝度的增加,粒径有增大趋势,而随着 N/P 的增加,粒径有减小趋势。

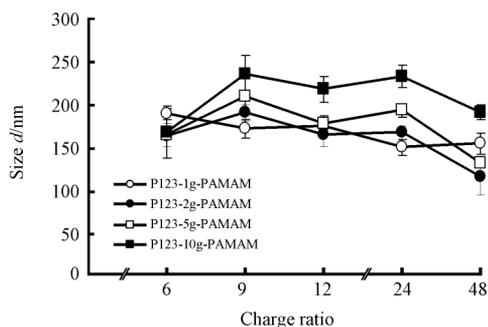


图 3 不同 N/P 复合物粒径图

Fig 3 Particle sizes of complexes at various N/P ratios

N/P: Nitrogen/phosphorus. $n=3, \bar{x} \pm s$

图 4 是不同 N/P 下复合物的电位值,修饰过的复合物比未修饰的 PAMAM 有着更低的电位。在修饰过的复合物中,随着接枝度的减小和 N/P 的增加,复合物的电位基本上呈增加的趋势。

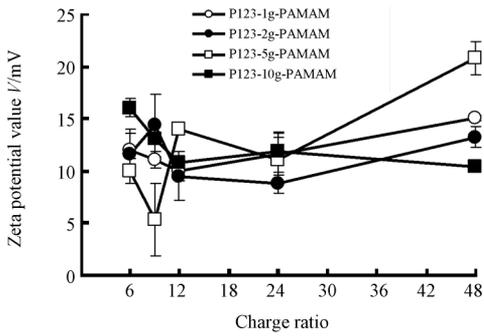


图 4 不同 N/P 复合物电位图

Fig 4 Zeta potential of complexes at various N/P ratios

N/P; Nitrogen/phosphorus. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 复合物凝胶电泳阻滞分析 从图 5 可以看出,复合物的 N/P 值在 2 时, DNA 便可以完全被包裹, 阻止其在电场中的迁移。

2.4 复合物细胞毒性测定 从图 6 可以看出, 通过对聚合物材料的修饰降低了复合物的细胞毒性, 这也与电位的结果一致, 随着复合物浓度的增加细胞毒性增强, 另外, 根据复合物对 3 种细胞的毒性作用来看, 我们发现复合物对 HepG2 的毒性小于另外 2 种细胞的毒性。

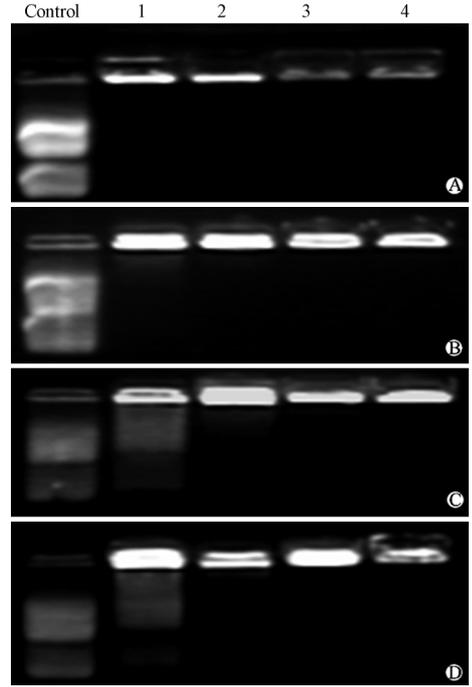


图 5 复合物凝胶电泳阻滞分析结果

Fig 5 Results of agarose gel electrophoresis of complexes

A: P123-1g-PAMAM; B: P123-2g-PAMAM; C: P123-5g-PAMAM; D: P123-10g-PAMAM. 1: N/P=1; 2: N/P=2; 3: N/P=4; 4: N/P=6. PAMAM; Polyamidoamine

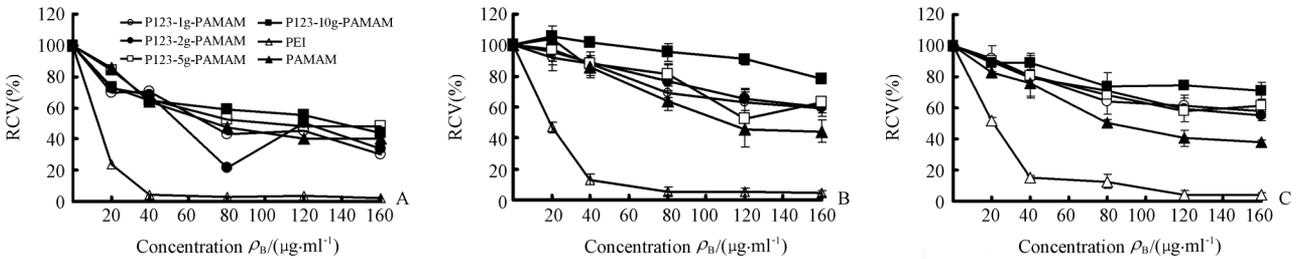


图 6 3 种细胞的 MTT 毒性测定结果

Fig 6 Cytotoxicity assay of three types of cells by MTT

PEI; Polyethylenimine; RCV; Relative cell viability; PAMAM; Polyamidoamine. A: A375 cells; B: HepG2 cells; C: 293T cells. $n=6, \bar{x} \pm s$

2.5 复合物细胞转染测定 影响复合物转染效率的一个重要的因素是 PAMAM 与 DNA 的缩放比, 也就是 N/P, 对不同接枝量的 P123-g-PAMAM 进行转染测定, 并与 PEI 以及未修饰的 PAMAM 进行对比, 由图 7 可以发现接枝复合物转染效率随着 N/P 的增加而增加, 相比未修饰的 PAMAM 转染效率并无减小, 略低于 PEI 的转染效率。随着接枝量的增加, 复合物转染效率有减小的趋势。

3 讨论

本实验合成了一种新型的阳离子聚合物载体用于基因递送, 即用普朗尼克 P123 修饰 PAMAM, 从核磁共振图谱可以发现合成的聚合物有较高的纯

度, 通过对其粒径以及电位的考察, 我们得出该聚合物粒径及电位适合基因递送^[19]。

本实验进一步对聚合物进行了细胞实验考察。在毒性实验中发现, 修饰过的 PAMAM 相对于未修饰的 PAMAM 有着更低的细胞毒性, 而且随着接枝量的增加, 复合物对细胞的毒性减小, 这可能是因为修饰过的复合物降低了表面电荷密度, 另外, 普朗尼克的亲水性基团也能降低细胞毒性。相比 A375 和 293T 细胞, 复合物对 HepG2 细胞毒性更低。在转染实验中, 重点考察了 HepG2 细胞, 发现随着接枝量的增加, 转染效率有减小的趋势, 由于 PEI 具有高细胞毒性, 我们认为 P123-g-PAMAM 可能是一种更安全有效的基因转染载体, 有待于进一步的验证。

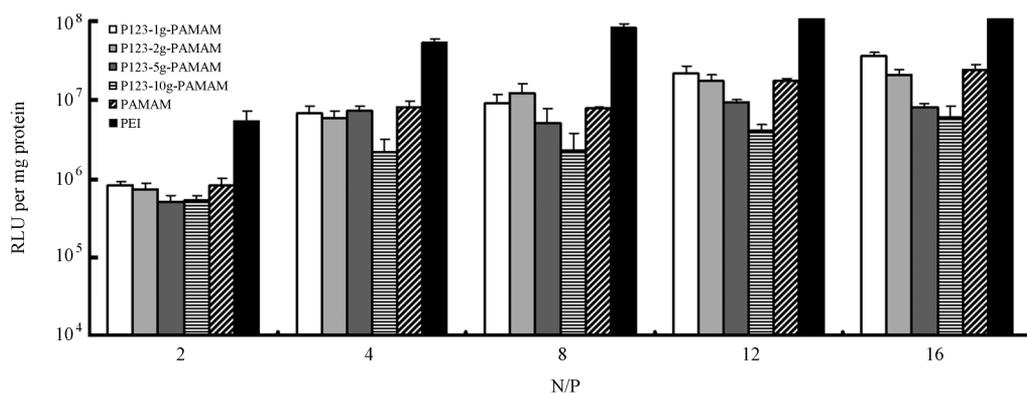


图7 复合物在 HepG2 细胞中的转染效率

Fig 7 Transfection efficiency of the complexes in HepG2 cells

RLU: Relative light unit. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

[参考文献]

- [1] Verma I M, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects[J]. Nature, 1997, 389: 239-242.
- [2] Kamiya H, Tsuchiya H, Yamazaki J, Harashima H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors[J]. Adv Drug Delivery Rev, 2001, 52: 153-164.
- [3] Trentin D, Hubbell J, Hall H. Non-viral gene delivery for local and controlled DNA release[J]. J Contr Rel, 2005, 102: 263-275.
- [4] Tomlinson E, Rolland A P. Controllable gene therapy pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems[J]. J Contr Rel, 1996, 39: 357-372.
- [5] Bisht S, Bhakta G, Mitra S, Maitra A. pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: highly efficient non-viral vector for gene delivery[J]. Int J Pharm, 2005, 288: 157-168.
- [6] Ogris M. Non-viral cancer gene therapy — what is best[J]? Drug Discov Today, 2003, 8: 63.
- [7] Anderson W F. Human gene therapy[J]. Nature, 1998, 392: 25-30.
- [8] Lee C C, Mackay J A, Szoka J F. Designing dendrimers for biological applications[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1517-1526.
- [9] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, Han E, Saltzman W M. Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery [J]. Macromolecules, 2002, 35: 3456-3462.
- [10] Braun C S, Vetro J A, Tomalia D A, Koe G S, Koe J G, Mid- daugh C R. Structure/function relationships of poly- amidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles[J]. J Pharm Sci, 2005, 94: 423-436.
- [11] Qi R, Gao Y, Tang Y, He R R, Liu T L, He Y, et al. PEG-con- jugated PAMAM dendrimers mediate efficient intramuscular gene expression[J]. AAPS J, 2009, 11: 395-405.
- [12] Kircheis R, Wightman L, Schreiber A, Robitza B, Rossler V, Kursa M, et al. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression of tumors after systemic ap- plication[J]. Gene Ther, 2001, 8: 28-40.
- [13] Fisher K D, Ulbrich K, Subr V, Ward C M, Mautner V, Blakey D, et al. A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced deli- very to the nucleus and elevated rates of transgene expression [J]. Gene Ther, 2000, 7: 1337-1343.
- [14] Nama H Y, Nama K, Hahn H J, Kim B H, Lim H J, Kim H J, et al. Biodegradable PAMAM ester for enhanced transfection efficiency with low cytotoxicity[J]. Biomaterials, 2009, 30: 665- 673.
- [15] Kabanov A V, Lemieux P, Vinogradov S, Alakhov V. Pluronic block copolymers; novel functional molecules for gene therapy [J]. Adv Drug Delivery Rev, 2002, 54: 223-233.
- [16] Batrakova E V, Kabanov A V. Pluronic block copolymers; evo- lution of drug delivery concept from inert nanocarriers to bio- logical response modifiers[J]. J Contr Rel, 2008, 130: 98-106.
- [17] Yin D F, Chu C, Ding X Y, Gao J, Zou H, Gao S. Nonionic am- phiphilic surfactant conjuncted polyethyleneimine as a new and highly efficient non-viral gene carrier[J]. Macromol Res, 2009, 17: 19-25.
- [18] Mukherjee S P, Davoren M, Byrne H J. *In vitro* mammalian cy- totoxicological study of PAMAM dendrimers-towards quantita- tive structure activity relationships[J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24: 169-177.
- [19] Guy J, Drabek D, Antoniou M. Delivery of DNA into mammali- an cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy[J]. Mol Biotechnol, 1995, 3: 237-248.

[本文编辑] 尹茶