

自组装共混制备 PEG 化基因载体

王幽香, 陈 平, 胡巧玲, 沈家骢

(浙江大学高分子科学与工程学系, 高分子合成与功能构造教育部重点实验室, 杭州 310027)

摘要 通过含 PEG 链段的两亲聚合物的自组装共混, 制备了基于疏水作用力的新型 PEG 化非病毒基因载体. 分别选用胆固醇-聚乙二醇和聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇作为共混改性剂, 研究两亲聚合物的种类对组装体在生理盐溶液中的稳定性及基因转染效率的影响. 结果表明, 疏水驱动力的大小是获得稳定的 PEG 化基因超分子组装体的关键. 通过对两亲聚合物中疏水链段的选择调控, 可制备稳定的 PEG 化基因超分子组装体, 提高基因传递体系在生理盐溶液中的稳定性及基因转染效率. 通过自组装共混, 为新型 PEG 化基因超分子组装体的制备提供了切实可行的新方法.

关键词 非病毒基因载体; 超分子组装; 自组装共混

中图分类号 O631.3

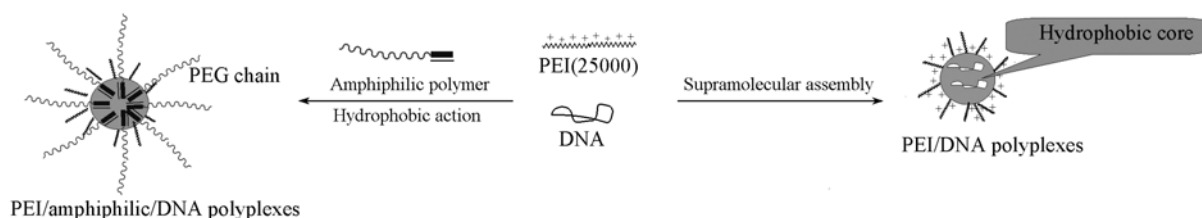
文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)11-2289-05

基因治疗是将人的正常基因或有治疗作用的基因通过一定方式导入人体靶细胞以纠正基因的缺陷或者发挥治疗作用, 从而达到开发治疗疾病目的的生物医学新技术^[1]. 由于裸 DNA 分子易被核酸酶水解, 难以在体液中稳定存在, 开发新型的高效安全和组织特异性的非病毒基因传递体系具有非常重要的意义. 由于采用超分子组装技术制备的非病毒基因传递体系具有合适的纳米尺寸、可控的结构、良好的生物相容性, 因而显示出巨大的发展潜力及应用前景^[2~5].

聚乙烯亚胺具有较强的浓缩 DNA 分子的能力, 能与 DNA 通过静电吸引形成电荷中和的疏水性核, 而过量聚阳离子则在外层形成保护壳层, 是常用的一类非病毒基因载体^[6~10]. 但这类组装体在生理盐溶液中不稳定, 易发生聚集而被网状内皮系统清除出体内, 限制了治疗基因到达靶向细胞及组织细胞的数量^[11, 12]. 制备聚乙二醇(PEG)化的基因超分子组装体可以有效地解决上述问题. 通过化学键合的方式可以制备 PEG 化的聚阳离子, 但影响了基因载体缔合 DNA 分子的能力^[13].

我们采用胆固醇-聚乙二醇的共混改性, 通过聚阳离子与 DNA 静电中和形成的疏水性核与胆固醇之间发生的疏水性作用力, 成功地制备了基于疏水作用力的稳定的 PEG 化基因载体, 显著提高了生理盐溶液中的稳定性和基因转染效率^[14]. 疏水性的驱动力是采用胆固醇-聚乙二醇共混改性制备 PEG 化基因超分子组装体的关键. 含 PEG 链段两亲聚合物的种类很可能会影响形成的基因超分子组装体的性质, 本文选用不同种类的两亲聚合物作为共混改性剂, 利用其疏水链段与 PEI/DNA 静电中和形成的疏水性核之间发生的疏水性作用力, 制备不同的基因超分子组装体(结构见 Scheme 1), 研究两亲聚合物的种类对组装体的稳定性及基因转染效率的影响.



Scheme 1 Formation illustration of PEGylated polyplexes based on hydrophobic interaction via facile blend of PEG-containing amphiphilic polymer

收稿日期: 2008-05-30.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50403021, 50873089)和浙江省自然科学基金(批准号: Y407173)资助.

联系人简介: 王幽香, 女, 博士, 副教授, 主要从事生物医用高分子材料的研究. E-mail: yx_wang@zju.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂

支化聚乙烯亚胺(bPEI, $M_w = 25000$)购自 Sigma-Aldrich 公司; 胆固醇-聚乙二醇(CPEG, PEG 的聚合度为 30)由 Japan Emulsion Co. Ltd 公司提供; 聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇(Pluronic F68 和 F108)购自 BASF 公司; pEGFP(4733bp)购自 Clonetech 公司; 鱼精 DNA(钠盐, 高纯级)和羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPEs, 高纯级)购自 Amresco 公司.

1.2 PEG 化基因超分子组装体的制备

分别配制 CPEG, F68, F108 与 PEI 的混合溶液, 其中 PEG 链段与 PEI 的摩尔比为 2:1. 在 NaCl 浓度为 20 mmol/L, pH 为 7.4, $n(N)/n(P)$ (PEI 中含有的 N 原子与 DNA 分子中含有的 P 原子的摩尔比) 值为 10 的条件下, 将上述混合溶液加入到等体积的 DNA 溶液中, 漩涡混合并静置 30 min, 得到 PEG 化的基因超分子组装体 PEI/CPEG/DNA, PEI/F108/DNA 和 PEI/F68/DNA.

1.3 基因超分子组装体在生理盐溶液中的稳定性实验

将上述组装体在生理盐溶液中静置一段时间, 采用光散射粒径分布仪 (90 plus/BI-MAS, Brookhaven, Holtsville) 在室温下测定组装体的粒径大小及分布; 采用原子力显微镜 (AFM, SPA400, SEIKO) 在轻敲模式下测定其微观形貌; 采用紫外-可见光谱 (UV-2550, Shimadzu, Japan) 测定 650 nm 波长处基因超分子组装体溶液的透过率^[15].

1.4 基因转染试验

制备含 pEGFP 的基因组装体, 并在生理盐溶液中静置 10 h 后用于基因转染. 将 HEK293T 细胞种植到 24 孔聚苯乙烯细胞培养板中, 细胞种植密度为 1×10^5 细胞/孔. 置于 37 °C 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养, 使细胞融合率达到约 70%. 每孔加入含 2 μ g pEGFP 基因组装体溶液继续培养 36 h 后, 采用荧光显微镜观察转染细胞的形貌及绿色荧光蛋白的表达.

2 结果与讨论

2.1 基因超分子组装体的稳定性

Jones 等^[8]发现, PEI 和 DNA 分子通过静电中和可形成疏水性核, 而过量聚阳离子则在外层形成保护壳层. 在疏水性核形成的同时, 两亲性聚合物的疏水性链段则通过疏水性作用力引入到核中, 从而制备 PEG 化的基因超分子组装体^[16]. 可见, 疏水性的驱动力是采用两亲性聚合物共混改性制备稳定的 PEG 化基因超分子组装体的关键.

采用紫外-可见光谱、动态光散射粒径分布仪研究基因超分子组装体在生理盐溶液中的稳定性. 图 1 为基因超分子组装体在生理盐水溶液中的紫外-可见光谱的透过率随时间变化的曲线. 由于在 650 nm 处, PEI 与 DNA 分子没有明显的特征吸收峰, 在相同浓度下, 组装体溶液的透过率与组装体的尺寸密切相关^[15]. 在生理盐水溶液中静置 1 h 后, PEI/DNA 组装体溶液的透过率迅速下降, 说明组装体不稳定, 形成很大的聚集体, 动态光散射测定结果也证实了这一点. 当静置时间达到 2 h 后, 组装体尺寸甚至达到微米级.

而经胆固醇-聚乙二醇和聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇共混改性的组装体则显示出不同的特性. 对于 PEI/CPEG/DNA 组装体, 在生理盐浓度下放置 0 ~ 60 min, 溶液的透过率首先降低, 随着时间的进一步延长, 组装体溶液的透过率则基本保持不变. 与动态光散射粒径分布测定结果吻合. 当组装体的盐浓度调节至 150 mmol/L 时, 由于离子浓度的增

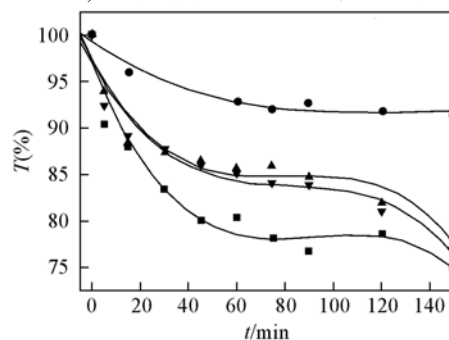


Fig. 1 Influence of amphiphilic polymer on turbidity of gene assembly in physiological salt condition
 ■ PEI/DNA; ● PEI/CPEG/DNA; ▲ PEI/F108/DNA;
 ▼ PEI/F68/DNA.

大(制备时 NaCl 浓度为 20 mmol/L)导致 PEI 与 DNA 分子之间的静电作用力减弱, 组装体的尺寸明显增大, 使溶液的透过率首先降低; 随着放置时间的延长, 透过率保持在恒定的水平, 动态光散射测定结果表明, 组装体的尺寸保持在 200 ~ 300 nm 范围内。

已有研究表明, 通过 CPEG 的共混改性, 可以制备基于疏水作用力的 PEG 化基因超分子组装体, 而壳层 PEG 链段的存在使组装体在生理盐水溶液中的稳定性显著提高^[14]。而与 PEI/DNA 组装体相比, PEI/F68/DNA 和 PEI/F108/DNA 在初始的 2 h 内的透过率显著提高, 但随着放置时间的延长, 迅速降低, 说明通过聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇共混改性的组装体在生理盐水溶液中不稳定, 粒径测定结果表明, 当在生理盐水溶液中放置 3 h 后, 尺寸明显增大。

由图 1 可以看出, 在生理盐水溶液中放置 1 h 后, PEI/DNA, PEI/CPEG/DNA, PEI/F68/DNA, PEI/F108/DNA 组装体即显示出很大差异。

采用原子力显微镜观察基因超分子组装体此时的微观形貌(图 2), 可见在生理盐溶液中放置 1 h, PEI/DNA 组装体已形成很大的聚集体; PEI/CPEG/DNA 则依然保持规整的球形结构, 尺寸在 200 nm 左右; PEI/F68/DNA 和 PEI/F108/DNA 已有部分形成很大的聚集体。由此可见, 两亲聚合物的种类确实对基因超分子组装体的稳定性产生很大影响。

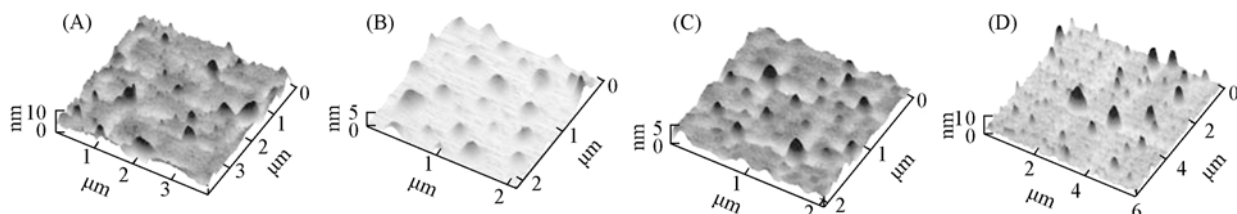


Fig. 2 Three-dimensional AFM images of gene assembly incubated for 1 h under a physiological condition

(A) PEI/DNA; (B) PEI/CPEG/DNA; (C) PEI/F68/DNA; (D) PEI/F108/DNA.

Jones 等^[8]认为, 聚阳离子与 DNA 形成的缔合体具有核壳结构, 其中部分 PEI 与 DNA 分子电荷中和形成疏水的核, 而过量聚阳离子则在外层形成保护壳层。我们认为含 PEG 链段的两亲聚合物就是利用其疏水基团与电荷中和的疏水性核之间发生的疏水性作用力而引入到基因组组装体中 (Scheme 1), 因此疏水性作用力的大小必将影响这种新型 PEG 化组装体在生理盐溶液中的稳定性。将 CPEG 与 PEO-PPO-PEO 两种两亲性聚合物的疏水性基团相比较, 胆固醇的疏水性较 PPO 更强, 因此在 PEG 摩尔含量相同的条件下, 经 CPEG 共混改性可制备稳定的 PEG 化基因超分子组装体, 因而在生理盐溶液中具有更高的稳定性; 而聚丙二醇的疏水性相对较弱, 通过 F68 和 F108 共混制备的基于疏水作用力的 PEG 化基因超分子组装体不够稳定, 随着生理盐溶液中放置时间的延长, 逐渐发生聚集。

2.2 两亲聚合物种类对基因转染效率的影响

以表达绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP 为模型, 将制备的基因超分子组装体在生理盐溶液中放置 10 h 后, 转染 HEK293T 细胞。转染 36 h 后用荧光显微镜观察基因表达的情况。以 PEI/DNA 组装体作

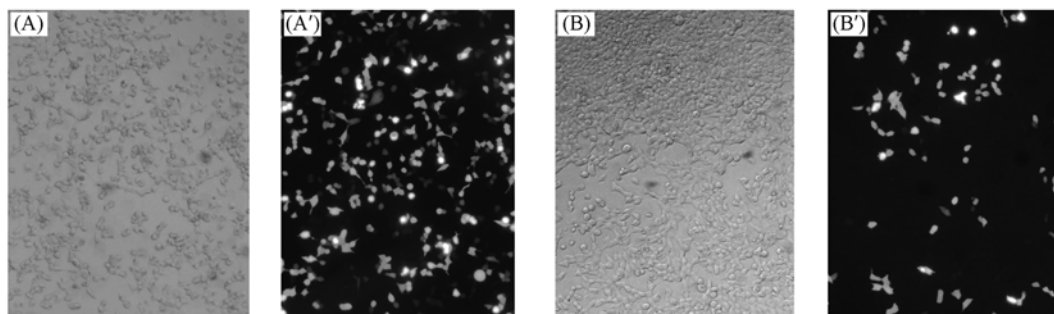


Fig. 3 Phase-contrast images (A, B) and fluorescence images (A', B') of HEK293T cells transfected by PEI/pEGFP polyplexes prepared at $n(N)/n(P)$ ratio of 10

(A, A') Salt concentration is 20 mmol/L; (B, B') salt concentration was adjusted to 150 mmol/L and the PEI/pEGFP polyplexes were incubated for 10 h to transfection.

为对照, 在 NaCl 浓度为 20 mmol/L 条件下制备的 PEI/DNA 组装体直接用于基因转染[图 3(A)], 发现基因转染率很高, 绝大多数细胞中均可观察到绿色荧光蛋白的表达; 而将 PEI/DNA 组装体在生理盐溶液中静置 10 h 后, 转染 HEK293T 细胞, 仅观察到少数细胞的表达, 转染效率显著降低[图 3(B)]. 由于细胞间具有保护细胞膜作用的多聚化蛋白和糖类(细胞外基质)的存在, 从而使相对较大的 DNA 传递体系难以逾越^[13,17]. 在生理盐溶液中放置 10 h 后, PEI/DNA 组装体形成微米级的聚集体, 导致转染效率显著降低.

经 CPEG 和 PEO-PPO-PEO 两亲性聚合物共混改性后的组装体, 在生理盐溶液中放置 10 h 后, 基因转染效率存在很大差异(图 4). 与 PEI/DNA 组装体相比, PEI/CPEG/pEGFP 组装体的转染效率显著提高, 而 PEI/F68/pEGFP 和 PEI/F108/pEGFP 组装体的转染效率则略有提高.

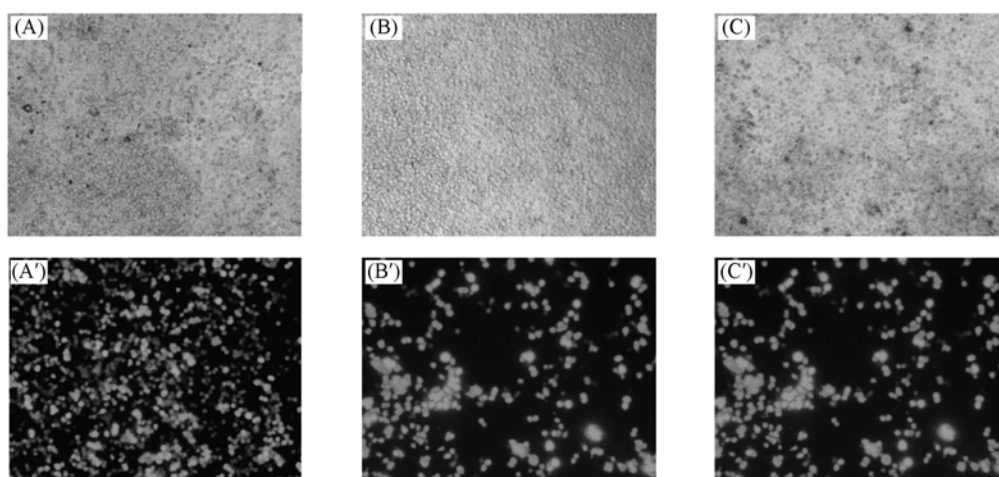


Fig. 4 Phase-contrast images(A, B, C) and fluorescence images(A', B', C') of HEK293T cells transfected by polyplexes incubated for 10 h under a physiological condition

(A) PEI/CPEG/pEGFP; (B) PEI/F68/pEGFP; (C) PEI/F108/pEGFP.

组装体转染效率的差异与生理盐溶液中的稳定性密切相关. PEI/CPEG/DNA 组装体由于在生理盐溶液具有良好的稳定性, 合适的粒子尺寸使其依然保持较高的基因转染效率; 由于通过 PEO-PPO-PEO 两亲性聚合物共混, 很难获得稳定的 PEG 化基因超分子组装体, 随着生理盐溶液中放置时间的延长, 尺寸逐渐增大达到微米级尺寸, 较大的粒子尺寸导致较低的细胞内吞率, 从而影响基因的表达效率.

以上研究结果证明, 通过含 PEG 链段两亲性聚合物的共混改性, 可制备基于疏水作用力的新型 PEG 化基因超分子组装体. 而疏水性作用力的大小是组装体稳定性的关键, 因此两亲性聚合物的种类对组装体的性质产生很大的影响. 选择合适的两亲性聚合物, 可制备稳定的 PEG 化基因超分子组装体, 提高基因传递体系在生理盐溶液中的稳定性及基因转染效率. 通过简便的两亲聚合物的自组装共混, 为新型 PEG 化基因超分子组装体的制备提供了切实可行的新方法.

参 考 文 献

- [1] GU Jian-Ren(顾健人), CAO Xue-Tao(曹雪涛). Gene Therapy(基因治疗)[M], Beijing: Science Press, 2002
- [2] Wang Y. X., Shen J. C.. Chinese Science Bulletin[J], 2005, **50**(4): 289—294
- [3] Ren K. F., Ji J., Shen J. C.. Biomaterials[J], 2006, **27**: 1152—1159
- [4] El-Aneed A.. J. Control. Release[J], 2004, **94**: 1—14
- [5] XU Hai-E(徐海娥), YAN Cui-E(闫翠娥). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(1): 169—172
- [6] Ren K. F., Ji J., Shen J. C.. Macromolecular Rapid Communication[J], 2005, **26**: 1633—1638
- [7] Wang Y. X., Chen P., Shen J. C.. Biomaterials[J], 2006, **27**: 5292—5298
- [8] Jones N. A., Hilli R. C., Stolnik S., *et al.*. Biochim. Biophys. Acta[J], 2000, **1517**: 1—18
- [9] Peng Q., Zhong Z. L., Zhuo R. X.. Bioconjugate Chem. [J], 2008, **19**: 499—506
- [10] WANG You-Xiang(王幽香), SHEN Jia-Cong(沈家聪). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(4):

790—792

- [11] Vinogradov S. V. , Bronich T. K. , Kabanov A. V. . Bioconjugate Chem. [J] , 1998 , **9** : 805—812
- [12] Petersen H. , Fechner P. M. , Fischer D. , *et al.* . Macromolecules[J] , 2002 , **35** : 6867—6874
- [13] Kursa M. , Walker G. F. , Roessler V. , *et al.* . Bioconjugate Chem. [J] , 2003 , **14** : 222—231
- [14] Wang Y. X. , Chen P. , Shen J. C. . Colloids and Surfaces B: Biointerfaces[J] , 2007 , **58** : 188—196
- [15] Sharma V. K. , Thomas M. , Klibanov A. M. . Biotechnology and Bioengineering[J] , 2005 , **90**(5) : 614—620
- [16] Ogris M. , Steinlein P. , Kursa M. , *et al.* . Gene Ther. [J] , 1998 , **5** : 1425—1433
- [17] Ogris M. , Walker G. , Blessing T. , *et al.* . J. Controll. Rel. [J] , 2003 , **91** : 173—181

Construction of PEGylated Polyplexes *via* Self-organizing Blend

WANG You-Xiang* , CHEN Ping , HU Qiao-Ling , SHEN Jia-Cong

(Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization of Ministry of Education ,
Department of Polymer Science and Engineering , Zhejiang University , Hangzhou 310027 , China)

Abstract An easy and favorable approach has been developed to prepare hydrophobic-driven PEGylated polyplexes *via* self-organizing blend of PEG-containing amphiphilic polymer. Poly(ethylene glycol) cholesterol ether and PEO-PPO-PEO was chosen as an amphiphilic polymer respectively. The results indicate that different amphiphilic polymers have great influence on the stability and transfection efficiency of polyplexes under physiological condition. Hydrophobic interaction is the key point to fabricate stable PEGylated polyplexes. By selecting the proper amphiphilic polymer, stable PEGylated polyplexes were fabricated successfully to improve stability and transfection efficiency at a physiological salt concentration. This facile approach to prepare the PEGylated polyplexes *via* self-organizing blend may have great potential in non-viral gene vector research and application.

Keywords Non-viral gene vector; Supramolecular assembly; Self-organizing blend

(Ed. : W , Z)