

## 主客体组装构建环糊精修饰基因微载体的研究\*

孙婕衍 常 皓 陈丽娜 王幽香\*\* 计 剑

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

**摘 要** 合成了二茂铁接枝聚乙烯亚胺(PEI-Fc),利用二茂铁与 $\beta$ -环糊精的主客体嵌套作用制备了环糊精修饰聚乙烯亚胺,核磁测定结果显示,每条 PEI-Fc 链上通过主客体作用嵌套的 CD 平均为 26 个.这种基于弱相互作用力的 $\beta$ -环糊精修饰聚乙烯亚胺能有效诱导 DNA 分子的缔合,在 N/P 值达到 3 以上时,可形成表面为正电荷、粒径为 150~250 nm 的球形粒子.在含 10% 胎牛血清的 DMEM 体外细胞培养基中,由于培养基中的蛋白质能够在粒子表面发生静电吸附,PEI-Fc/CD/DNA 基因微载体显示出良好的稳定性. HEK293 细胞培养结果显示,以表达绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP 为模型,以 N/P 值为 10 的 PEI/DNA 组装体作为对照,N/P 值为 3、5 和 10 的 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的转染效率均达到对照组的 2~3 倍,这种基于主客体组装构建的环糊精修饰基因微载体显著提高了基因转染效率.

**关键词** 非病毒基因载体,主客体组装,聚乙烯亚胺,环糊精

高效安全的非病毒基因传递体系的构建是目前基因治疗研究的热点之一<sup>[1,2]</sup>.聚乙烯亚胺(PEI)由于具有“质子海绵效应”是常用的一类非病毒基因载体,但较低的体内转染效率和较高的细胞毒性限制了它在临床中的应用<sup>[3-6]</sup>.环糊精是一种天然的低聚糖,已有研究表明环糊精具有辅助提高基因转染效率的作用且具有较低的细胞毒性,因而收到广泛关注<sup>[7,8]</sup>.主链上包含有 $\alpha$ -CD 的聚阳离子基因转染效率较不含 CD 的聚阳离子有明显提高<sup>[9,10]</sup>.Pack 等通过制备 $\beta$ -环糊精接枝的 PEI,显著提高了基因转染效率<sup>[11]</sup>.我们的研究结果也表明, $\beta$ -环糊精的接枝改性有利于小穴蛋白介导的内吞,可提高 HEK293 细胞的基因转染效率,但接枝率过高,由于 CD 间较强的氢键作用力,影响 DNA 分子的缔合<sup>[12]</sup>.另一方面,通过 $\beta$ -环糊精共价键合聚阳离子与 DNA 分子的层层组装,可将环糊精负载到基因传递多层膜中,可构建具有极高转染效率的 DNA 传递薄膜<sup>[13,14]</sup>.

但在目前的研究中,环糊精主要是通过共价键结合到聚阳离子载体上,由于合成步骤复杂,对 CD 接枝率的调控收到很大制约.本研究设计合成了二茂铁接枝的 PEI,利用二茂铁与 $\beta$ -环糊精的

主客体嵌套作用,获得了基于弱相互作用力的 $\beta$ -环糊精修饰聚乙烯亚胺,有望获得环糊精辅助的高效基因转染体系.采用该方法环糊精的负载方式温和简单,能灵活便捷地调控 CD 的含量.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

支化聚乙烯亚胺(PEI, 25 kDa)和二茂铁甲醛(ferrocene carboxaldehyde)购自 Sigma-Aldrich 公司, $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)购自 Aladdin 公司,鱼精蛋白脱氧核糖核酸(鱼精蛋白 DNA, 90%)购自 Amersco 公司,HEPES(free acid, 99%)购自上海生工,DMEM 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)购自 Gibco 公司.增强型绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-N1, Clontech)在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中扩增,通过 SDS 碱裂解法提取.其它试剂均为分析纯.

### 1.2 二茂铁接枝 PEI 的合成及表征

二茂铁接枝 PEI(PEI-Fc)的合成参照文献[15, 16]方法,分别将 0.25 g PEI 溶解在 10 mL 甲醇,0.187 g 二茂铁甲醛溶解在 3 mL 的甲醇中.在磁力搅拌下,将二茂铁甲醛溶液缓慢滴加到 PEI 溶液中,室温反应 2 h.将产物用截留分子量

\* 2012-03-30 收稿,2012-04-27 修稿;国家自然科学基金(基金号 50873089,21074110)、浙江省科技计划项目(项目号 2010C31025)、中央高校基本科研业务费专项资金(基金号 2011QNA4025)资助项目.

\*\* 通讯联系人, E-mail: yx\_wang@zju.edu.cn

为 3500 Da 的透析袋透析 48 h 后,冻干获得 PEI-Fc. 将产物溶解在二氯甲烷中,采用核磁 ( $^1\text{H-NMR}$ , DMX500, Bruker) 测定产物结构.

### 1.3 基于主客体作用的 CD 修饰 PEI 的制备及表征

将一定浓度 PEI-Fc 与过量  $\beta$ -CD 的溶液混合,超声 30 min 后,磁力搅拌 8 h. 将混合液用截留分子量 3500 Da 的透析袋透析 2 天,除掉未与 PEI-Fc 充分嵌套的环糊精,随后将溶液冻干获得基于主客体作用的 CD 修饰 PEI. 采用核磁 ( $^1\text{H-NMR}$ , DMX500, Bruker) 测定产物结构.

### 1.4 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的制备及表征

称取一定量基于主客体作用的 CD 修饰 PEI, 溶解在 HEPES 缓冲溶液中,与溶解在 HEPES 缓冲溶液中的 DNA 按所需 N/P 比混合,使 DNA 的最终浓度在  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ , 然后涡旋振荡使之充分作用,静置 20 min 后,获得 PEI-Fc/CD/DNA 组装体. 采用光散射粒径分布仪 (Zetasizer 3000HS, Malvern, UK) 测定基因超分子组装体的粒径分布及表面电位;采用透射电镜 (JEM-1200EX, NEC, Tokyo, Japan) 测定其微观形貌.

### 1.5 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的稳定性研究

将上述制备的 PEI-Fc/CD/DNA 组装体分别加入到 DMEM 及含 10% 胎牛血清 (FBS) DMEM 细胞培养基中,静置 3 h 后,采用动态光散射粒径分布仪测定组装体粒径的变化.

### 1.6 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的体外细胞转染实验

将 CD 修饰 PEI 在紫外光照射下静置 15 min 灭菌,然后将其与质粒 DNA 复合制备基因超分子组装体,加入到已在 24 孔板内培养 24 h 的 HEK293T 细胞中,使质粒 DNA 的最终浓度在  $10\mu\text{g}/\text{mL}$ , 细胞种植密度为  $3 \times 10^4$  细胞/mL, 在细胞培养环境中培养 48 h, 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. 将转染后的细胞用胰酶消化并最终悬浮于 1 mL PBS 缓冲液中,以空白 HEK293 细胞作为对照,采用流式细胞仪 (FACSCalibur, Bechton Dicknson) 检测表达绿色荧光蛋白的细胞数量,定量计算基因转染效率.

## 2 结果与讨论

### 2.1 PEI-Fc 的合成

PEI-Fc 溶于氘代二氯甲烷,测定核磁如图 1 所示.  $\delta = 2.0 \sim 3.0$  处的宽峰为支化 PEI 分子上

的氢谱峰,  $\delta = 4.04 \sim 4.13$  处为二茂铁上环戊二烯环上的氢谱峰,由此可知二茂铁已经接枝到了 PEI 上,根据计算 Fc 接枝率为 8.35%, 即每个 PEI 上平均含有 48 个 Fc.

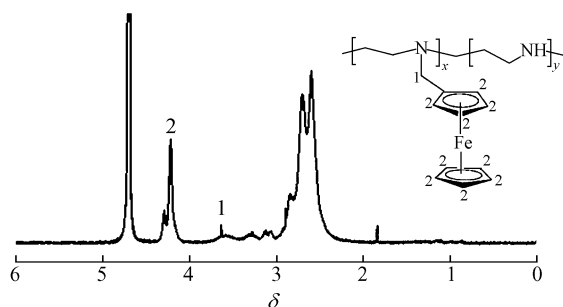


Fig. 1 The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum and the structure of PEI-Fc

### 2.2 基于主客体作用的 CD 修饰 PEI 的表征

将 PEI-Fc 与 CD 溶液充分混合,通过二茂铁与环糊精间的主客体作用制备基于弱相互作用力的 CD 修饰 PEI,其核磁谱图如图 2 所示.  $\delta = 2.0 \sim 3.0$  间为 PEI 上的氢谱峰,二茂铁上环戊二烯环上的氢谱峰发生明显的位移,同时在  $\delta = 5.05$  处观察到环糊精的特征谱峰,说明成功制备了基于主客体作用的 CD 修饰 PEI. 进一步计算得到每条 PEI-Fc 链上通过主客体作用嵌套的 CD 平均为 26 个.

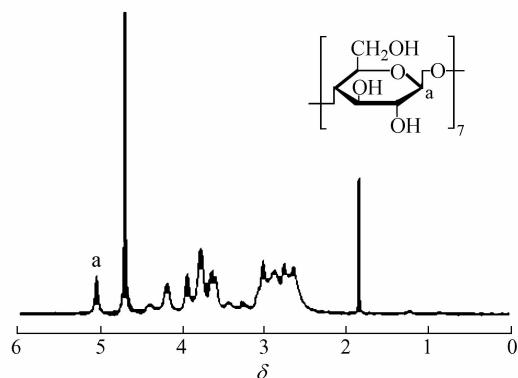


Fig. 2 The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of CD-modified PEI via host-guest assembly

### 2.3 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的制备及表征

将一定量的基于主客体作用的 CD 修饰 PEI 加入到 DNA 溶液中,制备不同 N/P 值的基因超分子组装体,采用动态光散射测定其表面电位,结果如图 3 所示. 当 N/P 值为 1 和 2 时,组装体的表面电位为负电荷,随着 PEI-Fc/CD 超分子化合物加入量的增大,表面电位逐渐增大,转变为正电荷. 直至 N/P 比为 7 时,表面电位稳定在  $+40\text{ mV}$

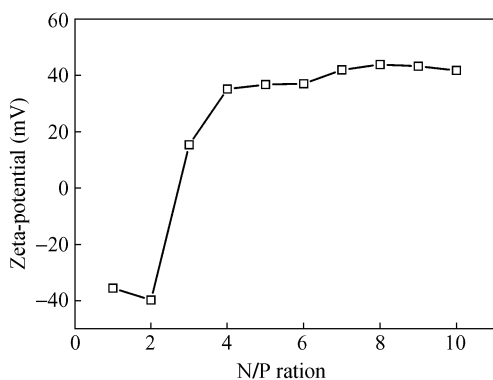


Fig. 3 The zeta-potential of PEI-Fc/CD/DNA polyplexes at different N/P ratios

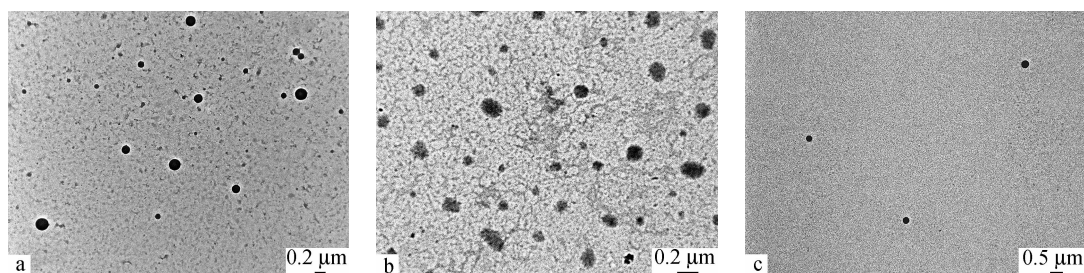


Fig. 4 TEM pictures of PEI-Fc/CD/DNA polyplexes at different N/P ratios of (a) 3, (b) 5 and (c) 10

## 2.4 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的稳定性研究

粒子的稳定性是影响基因转染效率的重要因素. 粒子一旦在体中发生聚集, 就易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的数量.

将制备的 PEI-Fc/CD/DNA 组装体分别加入到 DMEM 细胞培养基及含 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 静置不同的时间后, 采用 DLS 观察粒子的稳定性, 其中 0 h 表示 PEI-Fc/CD/DNA 组装体加入到上述溶液后立即测定粒径大小. 结果如图 5 所示, 表明不同 N/P 值的 PEI-Fc/CD/DNA 组装体在 DMEM 培养基中均不稳定, 发生明显的聚集, 粒径显著增大. 而当处于含 10% FBS 的 DMEM 细胞培养基时, 粒子则基本保持了原有的粒径和较好的分散性. 我们认为培养基中的蛋白质能够与粒子发生作用, 包裹在带正电荷的组装体表面, 从而避免了粒子的聚集, 实现了良好的分散性.

## 2.5 体外细胞培养

制备不同 N/P 值的基于主客体作用的 CD 嵌套 PEI-Fc/CD/DNA 基因超分子组装体, 以 N/P 值为 10 的 PEI/DNA 组装体作为对照. 以表达绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP 为模型, 体外培养

左右, 说明这种基于环糊精与二茂铁主客体作用形成的嵌套聚阳离子能有效诱导 DNA 分子的缔合, 形成表面为正电荷的纳米粒子.

采用 TEM 进一步研究 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的微观形貌, 如图 4 所示. 当 N/P 值为 3, 5 和 10 时, 基因超分子组装体均呈现较规整的球形结构, 粒径在 100 ~ 200 nm 间. 动态光散射结果表明, 在 N/P 值达到 3 以上, 基因超分子组装体的平均粒径均在 150 ~ 250 nm 之间, 与 TEM 测定结果一致.

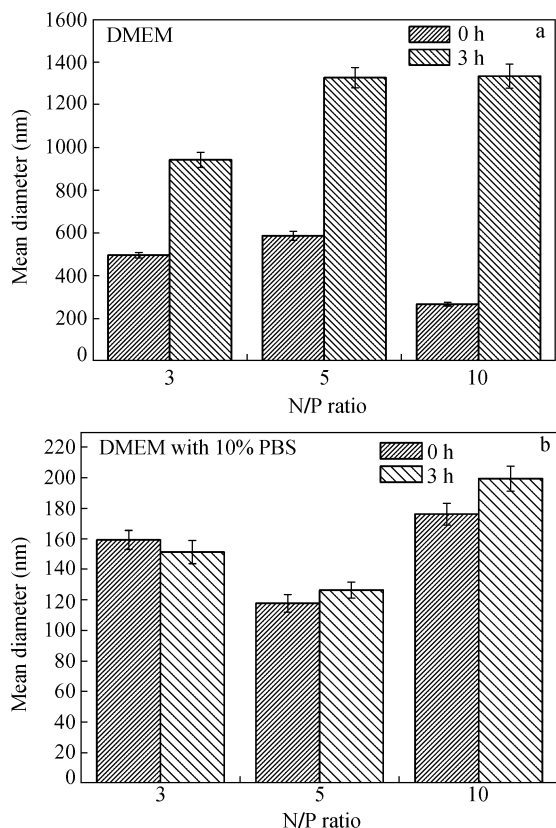


Fig. 5 The stability of PEI-Fc/CD/DNA polyplexes at different incubation time in cell culture mediums: (a) DMEM and (b) DMEM with 10% FBS

HEK293 细胞 48 h 后采用荧光显微镜研究绿色荧光蛋白的表达,如图 6 所示.结果显示,与 N/P 比为 10 的 PEI/DNA 组装体相比,N/P 比为 3、5、10 的 PEI-Fc/CD/DNA 组装体的转染效率均得到显著提高.采用流式细胞仪进一步定量测定上述基因超分子组装体的转染效率.结果显示,对照组的

N/P 值为 10 的 PEI/DNA 组装体转染效率为 7%,而 N/P 比为 3 和 5 时,PEI-Fc/CD/DNA 组装体的转染效率在 18% 以上,N/P 比为 10 的基因转染效率为 16%.细胞培养结果显示,这种基于主客体作用的 CD 嵌套基因超分子组装体显著提高了基因转染效率.

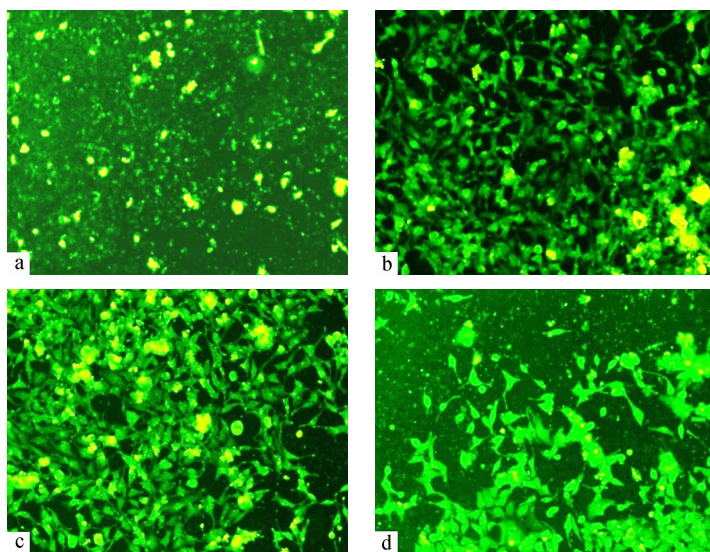


Fig. 6 The fluorescence images (100 $\times$ ) of different polyplexes transfection to HEK293 cells: (a) PEI/pEGFP-10, (b) PEI-Fc/CD/pEGFP-3, (c) PEI-Fc/CD/pEGFP-5 and (d) PEI-Fc/CD/pEGFP-10

### 3 结论

在本文中,我们合成了二茂铁接枝聚乙烯亚胺,利用二茂铁与 $\beta$ -环糊精的主客体嵌套作用制备了基于弱相互作用力的 CD 修饰 PEI,核磁测定结果显示每个 PEI-Fc 上通过主客体作用嵌套的 CD 平均为 26 个.这种基于弱相互作用力的 $\beta$ -环糊精修饰聚乙烯亚胺能有效诱导 DNA 分子的缔合,在 N/P 值达到 3 以上时,可形成表面为正电

荷、粒径为 150~250 nm 的球形粒子.而当处于含 10% 胎牛血清 DMEM 体外细胞培养基中,粒子则基本保持了原有的粒径和分散性,显示出良好的稳定性. HEK293 体外细胞培养结果显示:在环糊精的辅助作用下,PEI-Fc/CD/DNA 基因超分子组装体确实能够实现相对于纯 PEI 而言更高的转染率和更好的细胞相容性,这一结果为采用超分子组装技术构建新型的基因传递体系提供了可能.

### REFERENCES

- 1 Wagner E, Kloeckner J. *Adv Polym Sci*, 2006, 192: 135 ~ 173
- 2 Kim T I, Lee M, Kim S W. *Biomaterials*, 2010, 31: 1798 ~ 1804
- 3 Jiang X L, Chu Y F, Liu J, Zhang G Y, Zhuo R X. *Chinese J Polym Sci*, 2011, 29(4): 421 ~ 426
- 4 Wang Youxiang (王幽香), Chen Ping (陈平), Hu Qiaoling (胡巧玲), Shen Jiacong (沈家骢). *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2008, 29(11): 2289 ~ 2293
- 5 Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60: 247 ~ 266
- 6 Wang Y X, Zhu Y, Hu Q L, Shen J C. *Acta Biomater*, 2008, 4: 1235 ~ 1243
- 7 Yang C A, Li H Z, Wang X, Li J. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 89A: 13 ~ 23
- 8 Yang C A, Wang X, Li H Z, Ding J L, Wang D Y, Li J. *Polymer*, 2009, 50: 1378 ~ 1388
- 9 Davis M E, Pun S H, Belloq N C, Reineke T M, Popielarski S R, Mishra S, Heidel J D. *Curr Med Chem*, 2004, 11: 179 ~ 197
- 10 Burckbuchler V, Wintgens V, Leborgne C, Lecomte S, Leygue N, Scherman D, Kichler A, Amiel C. *Bioconjugate Chemistry*, 2008, 19(12):

2311 ~ 2320

- 11 Forrest M L, Gabrielson N, Pack D W. *Biotechnol Bioengin*, 2005, 89: 416 ~ 423
- 12 Li W Y, Chen L N, Huang Z X, Wu X F, Zhang Y F, Hu Q L, Wang Y X. *Org Biomol Chem*, 2011, 9(22): 7799 ~ 7806
- 13 Jessel N, Oulad-Abdeighani M, Meyer F, Lavallo P, Haikel Y, Schaaf P, Voegel J C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(23): 8618 ~ 8621
- 14 Hu Y, Cai K Y, Luo Z, Hu R. *Adv Engin Mater*, 2010, 12(1-2): B18 ~ B25
- 15 Merchant S A, Glatzhofer D T, Schmidtke D W. *Langmuir*, 2007, 23(22): 11295 ~ 11302
- 16 Zhu L Z, Zhou W B, Ji J A. *J Nanoparticle Research*, 2010, 12(6): 2179 ~ 2187

## CONSTRUCTION OF CYCLODEXTRIN-MODIFIED POLYPLEXES *via* HOST-GUEST ASSEMBLY

Jie-kan Sun, Hao Chang, Li-na Chen, You-xiang Wang, Jian Ji

*(MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization,*

*Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)*

**Abstract** Ferrocene-grafted polyethyleneimine (PEI-Fc) was synthesized *via* the reaction of ferrocene carboxaldehyde with branched PEI. The graft level of Fc was about 8.35%. Based on the host-guest interaction between ferrocene and  $\beta$ -cyclodextrin (CD), CD-modified PEI was successfully prepared. <sup>1</sup>H-NMR spectrum indicated that there were 26 CD molecules per PEI-Fc chain. CD-modified PEI *via* host-guest interaction showed effective DNA condensation ability. At N/P ratio above 3, the positive nanoparticles with diameter of about 150 ~ 250 nm were formed. At the cell culture medium of DMEM with 10% FBS, PEI-Fc/CD/DNA polyplexes showed excellent stability. It was probably due to the electronic adsorption of proteins on the surface of polyplexes. HEK293 cells culture results indicated that the transfection of PEI-Fc/CD/DNA polyplexes at N/P ratio of 3, 5 and 10 was almost 2 ~ 3 folds of that of PEI polyplexes at N/P ratio of 10. The CD modified PEI *via* host-guest interactions significantly improved the transfection efficiency.

**Keywords** Non-viral gene vectors, Host-guest assembly, PEI, Cyclodextran