

# 基于 $\beta$ -环糊精与偶氮苯衍生物的基因传递体系构筑

唐 强\*, 张 弘, 周宝晗, 徐保明

(湖北工业大学材料与化学工程学院, 武汉 430068)

**摘要:**通过  $\beta$ -环糊精修饰聚乙烯亚胺(HPEI-CDs)与偶氮苯修饰聚乙二醇(Azo-PEG)的主客体作用,制备了 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 自组装体,并对其生理盐溶液稳定性、粒径形貌及光控特性进行了研究。结果表明,对比 HPEI-CDs/DNA 自组装体,PEG 的引入显著提高了其生理盐稳定性,借助 PEG 壳层的电荷屏蔽和 CD 氢键的协同作用,自组装体表面电位仅为 +3mV,粒径分布均匀,呈现球形结构。在 365nm 波长光照下, HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 的表面电位迅速增加,随着光照时间的延长,其  $\zeta$  电位最终增大到与 HPEI-CDs/DNA 相近水平,这表明偶氮苯(Azo)空间结构发生转变,PEG 层成功从组装体脱离。

**关键词:**光响应; 自组装;  $\beta$ -环糊精; 基因传递

## 引言

超分子化学是 21 世纪化学领域研究的热点之一,而自组装(self-assembly)正是超分子化学研究中关键的科学问题<sup>[1]</sup>。超分子自组装作为极具应用前景的新技术,已被广泛用于构建形貌和功能各异的纳米材料,这些材料被广泛用于药物及基因传递系统<sup>[2]</sup>。近年来,通过  $\beta$ -环糊精自组装合成的大量纳米药物传递体系和基因传递体系不断涌现,该类载体能提高药物或基因的传递效率,降低毒副作用,改性  $\beta$ -环糊精的阳离子聚合物由于具有制备简便、基因容量大、免疫原性低等特点,目前已经成为基因治疗载体的主要发展方向之一<sup>[3,4]</sup>。但由于人体血液中存在大量的负电荷蛋白,导致此类组装体在人体内容易发生聚集,减少了自组装体在人体内部的循环时间,进而影响 DNA 转染效率<sup>[5]</sup>。

本文报道了利用  $\beta$ -环糊精和偶氮苯衍生物的络合作用<sup>[6]</sup>,借助聚乙二醇电荷屏蔽和环糊精氢键协同作用,构筑了稳定的光控性基因传递体系。借助 PEG 壳层提高自组体内循环中的生理盐稳定性,但自组装体定位到靶向细胞后,利用环糊精和偶氮化合物设计的超分子囊泡体系,利用光照控制环糊精和偶氮苯衍生物的络合和解离状态,进而控制囊泡的形成、消失或者结构转变,达到自组装体解离和 DNA 释放的目的。

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂

超支化聚乙烯亚胺(HPEI, Mn=25k), Sigma-Aldrich 公司; 对甲苯磺酰氯, 天津大学科威公司;  $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)、甲氧基聚乙二醇胺(mPEG-NH<sub>2</sub>), 上海晶纯生化科技股份有限公司; 偶氮苯酰氯(AzoCOCl), 天津红岩化学试剂厂; 鱼精 DNA(钠盐), 上海通蔚生物科技有限公司。

### 1.2 HPEI-CDs 的合成

HPEI-CDs 的合成分成两步, 中间体 6-OTs- $\beta$ -CD 的合成方法见参考文献<sup>[7]</sup>。将 7.5g  $\beta$ -CD 和 0.8g 氢氧化钠溶于 65mL 水中均匀搅拌成澄清分散液, 在冰水浴条件下 30min 内逐滴加入溶有 1.3g 对甲苯

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.03.006

收稿:2019-06-14;修回:2019-10-10;

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究项目(B2018041);

作者简介:唐强(1982-),男,博士,讲师,从事功能高分子改性研究;

\* 通讯联系人, E-mail:31897819@qq.com.

磺酰氯的 5mL 乙腈溶液至分散液中,室温反应 3h。待反应结束抽滤除去沉淀物,置于冰箱冷藏过夜。然后用大量水与乙醇分别洗涤抽滤 2~3 次,真空干燥即得到中间产物 6-OTs- $\beta$ -CD。

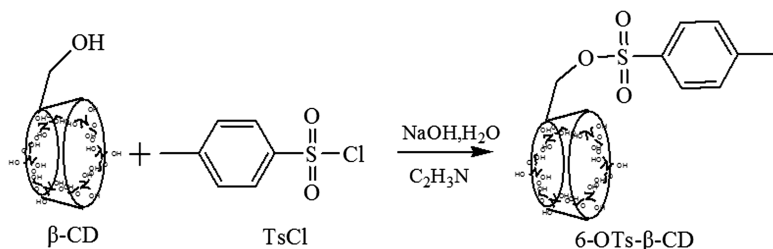


图 1 6-OTs- $\beta$ -CD 的合成

Figure 1 Synthesis of 6-OTs- $\beta$ -CD

HPEI-CDs 合成方法见参考文献<sup>[8]</sup>。将 0.5g HPEI 和 3.8g 6-OTs- $\beta$ -CD 溶于 30mL 的无水二甲基亚砜(DMSO)中,氮气保护条件下于 65℃ 反应 3 天,反应液用透析袋(MWCO6000)透析 4 天,透析液经过真空冷冻干燥得到目标产物 HPEI-CDs,环糊精(CD)接枝率通过<sup>1</sup>H-NMR 计算。

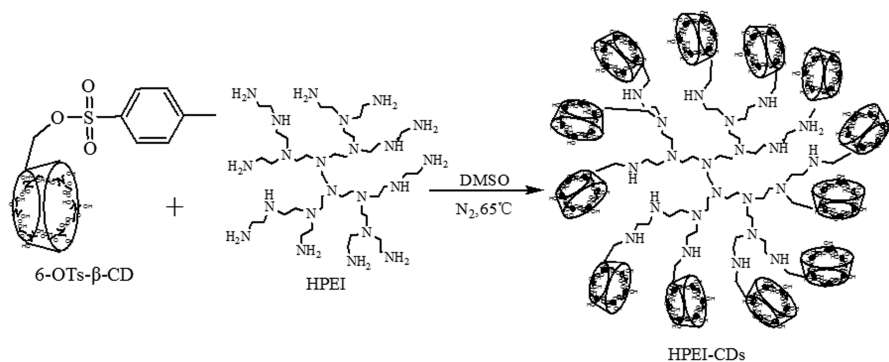


图 2 HPEI-CDs 的合成

Figure 2 Synthesis of HPEI-CDs

### 1.3 Azo-PEG 的合成

Azo-PEG 的合成方法见参考文献<sup>[9]</sup>。称取 0.6g 甲氧基聚乙二醇胺(mPEG-NH<sub>2</sub>),0.3g 偶氮苯酰氯和适量的氧化镁,溶解于无水 *N,N*-二甲基甲酰胺中,氮气保护条件下室温反应 24h。反应液抽滤除去过量的氧化镁,低温乙醚进行沉淀并抽滤洗涤 3 次,所得溶液采用透析袋(MWCO3500)透析 4 天,真空冷冻干燥得到目标产物 Azo-PEG。

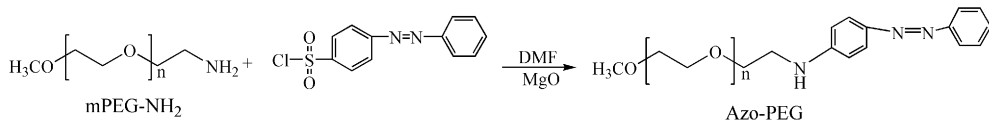


图 3 Azo-PEG 的合成

Figure 3 Synthesis of Azo-PEG

### 1.4 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体的制备

准确称取 *N*-2-羟乙基哌嗪-*N*-2-乙磺酸 4.8g,加入新鲜三蒸水定容至 1L,过滤除菌,分装后 4℃ 保存,即得 20mM 的 HEPES 缓冲液。采用 HEPES 缓冲液配置 100 $\mu$ g/mL 的鱼精 DNA 溶液,Azo-PEG 与 HPEI-CDs 以 Azo : CD=4 : 1 的摩尔比超声混合 15min,然后静置 1h,随后按体积比 1 : 1 与鱼精 DNA 溶液混合 5min,即得到 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体。同时,为了进行对比研究,采取类似的合成

方法配置了 HPEI-CDs/DNA 组装体。

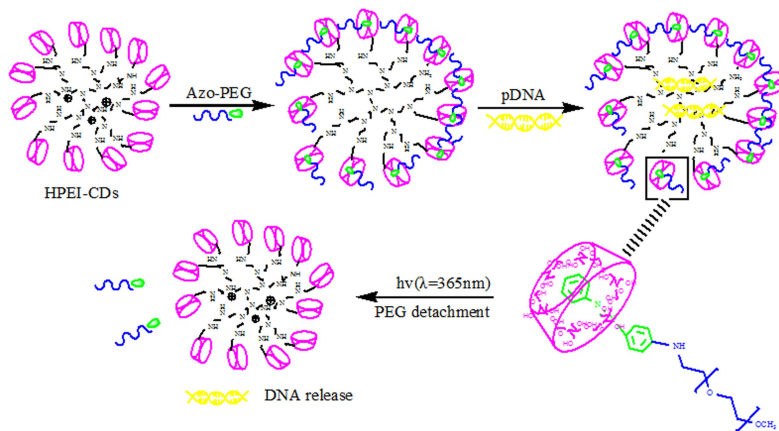


图 4 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体的自组装及解体

Figure 4 Self-assembly and disassembly of HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA assemblies

## 1.5 测试仪器及条件

$^1\text{H-NMR}$  采用 INOVA500M HZ 在  $25^\circ\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$  为溶剂, TMS 为内标进行测定; 动态光散射 (DLS) 采用 BrookHaven 公司的 BI-200SM 在  $25^\circ\text{C}$  光源功率 25mW, 激光波长 632.8nm, 90 角进行测定; TEM 采用 Philips 公司 TECNAI G2 F20 在 200kV 加速电压下测定; 表面电位采用 Zetasizer Nano-ZS/ZEN-3600 粒度仪测定; 紫外 (UV) 采用北京普析通用 T6 新世纪紫外-可见分光光度计进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HPEI-CDs 及 Azo-PEG 结构表征

HPEI-CDs 的  $^1\text{H-NMR}$  如图 5(a) 所示,  $\beta\text{-CD}$  中的 C 对应的质子峰  $\delta$ : 4.9ppm, HPEI 上的伯胺和仲胺的质子峰主要集中在  $\delta$ : 2.0~3.0ppm, 通过计算可得 CD 接枝率约为 3%, 一个 HPEI 分子大约接有 20 个 CD 分子。Azo-PEG 的  $^1\text{H-NMR}$  如图 5(b) 所示,  $\delta$ : 7.0~8.0ppm 是苯环的质子峰,  $\delta$ : 3.5ppm 是 PEG 上碳氧链段单元上的质子峰。

### 2.2 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体形貌

为了研究不同 N/P 比对组装体粒径的影响, 首先, 采用 DLS 对 HPEI-CDs/DNA 和 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 进行对比研究, 结果如图 6(a) 所示。在不同的 N/P 比下, HPEI-CDs/DNA 和 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体粒径呈现相同的变化趋势, 随着 N/P 比的增大而减小, 在相同 N/P 比下, HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 的尺寸整体小于 HPEI-CDs/DNA。同时对比不同 N/P 比下自组装体的表面电位, 如图 6(b) 所示, 研究发现 HPEI-CDs/DNA 组装体的电位随着 N/P 比增加而增大。而 PEG 基团的引入, 借助 PEG 层的电荷屏蔽作用, 自组装体的电位明显降低, 当 N/P 比增加到 10 时, HPEI-CDs/DNA 的表面电位为 +18.5mV, 而 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 的表面电位为 +3.5mV。

以上结果说明, 通过主客体作用, HPEI-CDs、Azo-PEG 以及 DNA 成功进行了自组装。通过 TEM (见图 7) 进一步发现, 不同 N/P 比下, 自组装体 HPEI-CDs/DNA 和 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 的颗粒形貌整体呈现均匀的球形, 且随着 N/P 比增大, 粒径呈现逐渐降低的趋势。

### 2.3 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 生理盐溶液稳定性

自组装体生理盐溶液浓度调节为 150mM, 通过 DLS 测定不同培养时间下自组装体的粒径大小来判断其稳定性, 结果如图 8 所示。研究发现, N/P 比为 4 和 6 时, 监测到 HPEI-CDs/DNA 组装体粒径增大到  $1\mu\text{m}$  附近, 出现了明显的聚集行为, 这是由于 HPEI 上的质子化仲胺和叔胺基团通过链段的柔性相

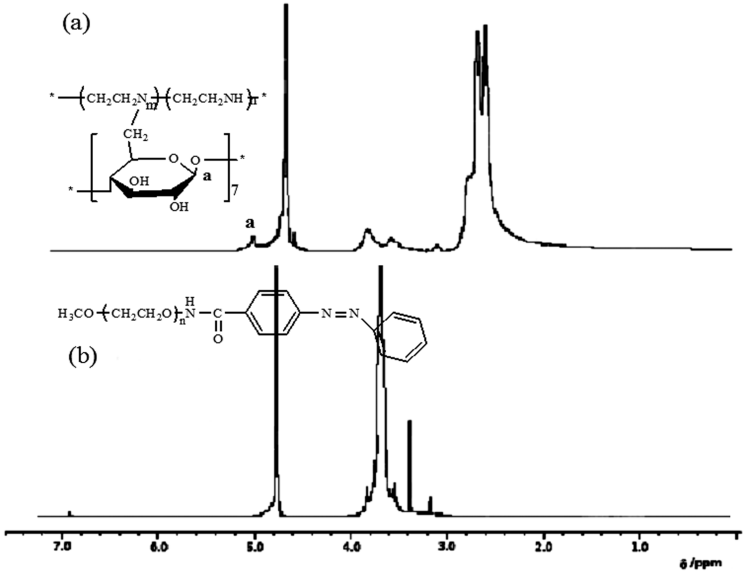


图 5 HPEI-CDs(a)和 Azo-PEG(b)的<sup>1</sup>H-NMR  
Figure 5 <sup>1</sup>H-NMR of HPEI-CDs (a) and Azo-PEG(b)

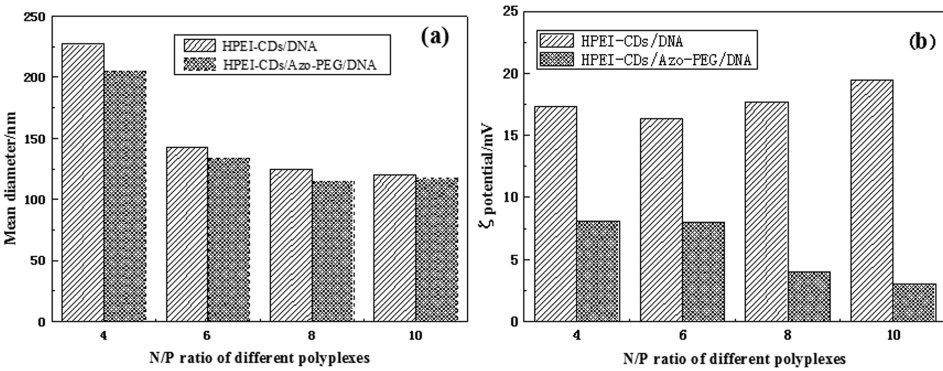


图 6 HPEI-CDs/DNA 和 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 的粒径(a)和电位(b)  
Figure 6 Particles sizes (a) and potentials (b) of HPEI-CDs/DNA and HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA

邻的自组装体之间形成了缠绕。同时,较低的 N/P 比导致 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体中 CD 含量不高,与之络合的 PEG 数量较少,自组装体的生理盐稳定性较差,但相比于 HPEI-CDs/DNA 有所提高。当 N/P 比提高到 8 和 10 时,由于 PEG 数量的增加,PEG 层的电荷屏蔽作用增强,HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体的稳定性明显提高。TEM 检测的 5h 后,HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体的颗粒形貌如图 9 所示,仍然保持规则的球形结构,粒径大小基本保持不变,说明 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 在较高 N/P 比下,能长时间稳定存在。

2.4 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体光控特性

偶氮苯(Azo)在 λ=365nm 光照条件下,分子结构可由反式结构转变为顺式结构,具有光致异构特性。而只有反式结构 Azo 与 CD 存在较强的络合作用,反式结构 Azo 的特性吸收波长 325nm,而顺式结构 Azo 的吸收波长在 428nm 处,因此通过紫外光光度仪考察了 PEG 化超分子组装体中 Azo 的光致异构的特性是否还能正常发生,结果如图 10(a)所示,在经过 10min 光照后,Azo 在 325nm 处的紫外吸收显著降低,而在 428nm 处吸收却有所增加。这说明超分子组装体中 Azo 保持了光致异构特性。

进一步通过 Zetasizer Nano-ZS/ZEN-3600 跟踪 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 组装体在不同光照时间

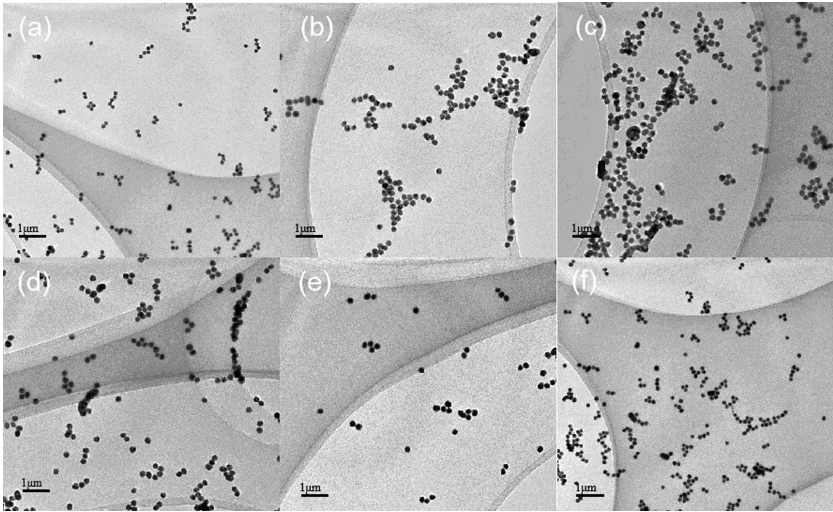


图 7 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 在 N/P 比值分别为 6(a,b)、8(c,d)和 10(e,f)条件下的透射电镜  
Figure 7 Typical TEM images of HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA at N/P ratio of 6(a, b), 8(c, d)and 10(e, f)

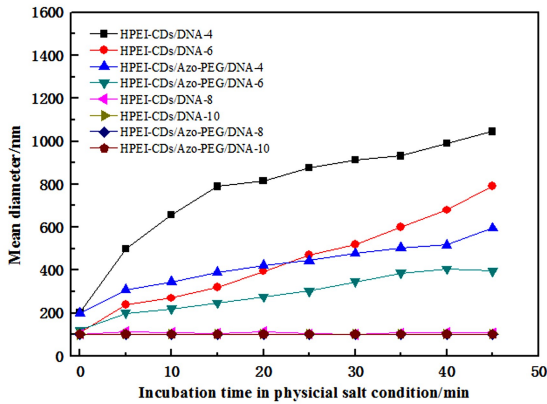


图 8 生理盐溶液条件下不同组装体的粒径聚集稳定性  
Figure 8 The aggregation stability of different polyplexes in physiological salt condition detected by DLS  
(0 min means at prepared condition)

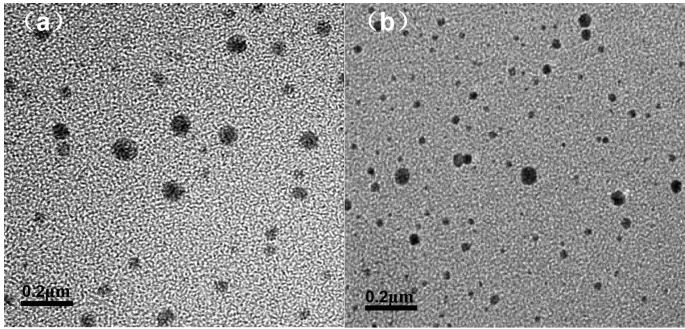


图 9 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA-8 (a) 和 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA-10 (b) 组装体透射电镜  
Figure 9 TEM images of HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA-8 (a) and HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA-10 (b) polyplexes

下的  $\zeta$  电位,结果如图 10(b)所示。研究发现,随着照射时间的延长, $\zeta$  电位逐渐缓慢增加,这说明 Azo-PEG 正在逐步地从 CD 空腔中脱离出来,当光照时间达到 25min 时,其  $\zeta$  电位增大到与 HPEI-CDs/DNA

相近的水平,表明大部分 Azo-PEG 层已经完全脱离。

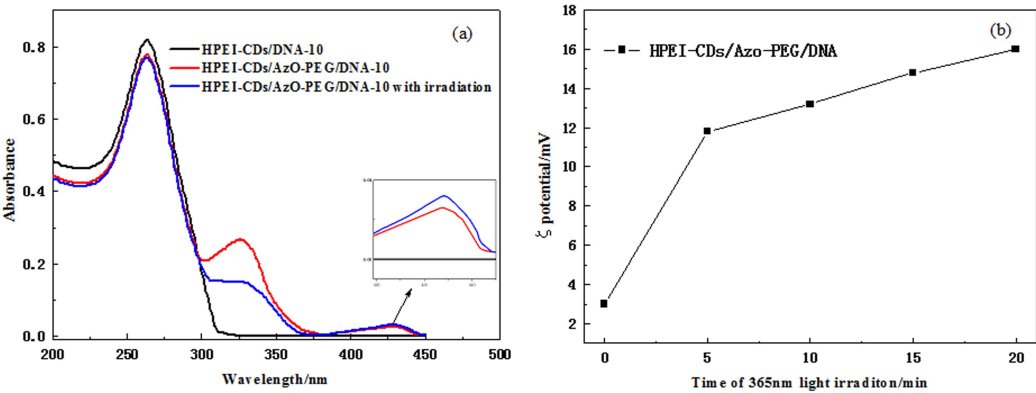


图 10 HPEI-CDs/DNA-10 和 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA-10 紫外吸收光谱(a)及电位随光照时间变化(b)  
Figure 10 HPEI-CDs/DNA-10 and HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA-10 UV absorption spectra (a) and potential changes with illumination time (b)

3 结论

利用环糊精和偶氮苯的主客体作用,构筑了具有光控特性的 HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA 自组装体。借助 PEG 壳的电荷屏蔽和 CD 的氢键协同作用,自组装体能在生理盐溶液中以粒径 110nm 左右的球形粒子长时间稳定存在。通过  $\lambda=365\text{nm}$  的紫外光照射下,自组装体中的 Azo 从反式结构转变成顺式结构,从而实现 PEG 层的脱离,这有利于自组装体的解离和 DNA 释放。

参考文献:

[ 1 ] Service R F. Science, 2005, 309(5731): 95~95.  
[ 2 ] Ooya T, Choi H S. J Am Chem Soc, 2006, 128(12): 3852~3853.  
[ 3 ] Liu W M, Xue Y N, Peng N. J Controlled Release, 2011, 21(35): 13306~13315.  
[ 4 ] Santos J L, Oliveira H, Pandita D. J Controlled Release, 2010, 144(1): 55~64.  
[ 5 ] Henry S M, El-Sayed M E H, Pirie C M. Biomacromolecules, 2006, 7(8): 2407~2414.  
[ 6 ] Zhang X, Wang C. Chem Soc Rev, 2010, 40(1): 94~101.  
[ 7 ] Petter R C, Salek J S, Sikorski C T. J Am Chem Soc, 1990, 112(10): 3860~3868.  
[ 8 ] Pun S H, Bellocq N C, Liu A. Bioconjugate Chem, 2004, 15(4): 831~840.  
[ 9 ] Ikeda T, Ooya T, Yui N. Polym J, 1999, 31(8): 658~663.

## Construction of Photo-responsive Gene Delivery System Based on $\beta$ -Cyclodextrin and Azobenzene Derivatives

TANG Qiang<sup>\*</sup>, ZHANG Hong, ZHOU Bao-han, XU Bao-ming

(School of materials and chemical engineering, Hubei university of technology, Wuhan 430068, China)

**Abstract:**Based on the host-guest interaction, HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA polyplexes was prepared by  $\beta$ -cyclodextrin modified with polyethyleneimine (HPEI-CDs) and azobenzene-conjugated with polyethylene glycol (Azo-PEG). The stability of its physiological salt condition, size, morphology and photo response were studied. The results showed that compared with HPEI-CDs/DNA polyplexes, the introduction of PEG significantly improved the stability under physiological salt condition. With the synergistic effect of PEG shell charge screening and CD hydrogen bonding, the surface potential of polyplexes was only +3mV, uniform and spherical microparticles were achieved. The surface potential of HPEI-CDs/Azo-PEG/DNA increased rapidly under 365nm wavelength illumination. With the extension of illumination time,  $\zeta$  potential eventually increased to a level close to that of HPEI-CDs/DNA, it indicated that azobenzene (Azo) was transformed from trans to cis-structure, light irradiation made Azo-CD inclusion complexes disassemble and lead to PEG shell detachment.

**Key words:**Photo response; Self-assembly;  $\beta$ -Cyclodextrin; Gene delivery