

一种新型聚乙烯亚胺(PEI)载体的制备及表征

强 娜*, 梁 浩, 解 芳, 陶海霞, 李险峰, 刘立芳

(惠州学院 化学工程系, 惠州 516007)

摘要:设计一种新型的用于传输小干扰核糖核酸(siRNA)聚乙烯亚胺-聚类丙交酯功能聚合物。首先合成一类含功能基团羧基的丙交酯衍生物,对其进行了 ^1H NMR、GPC、DSC 表征,功能基团的密度可以通过与丙交酯共聚的单体的物质的量来调控,利用羧基与聚乙烯亚胺(PEI)分子上的氨基偶合,将小分子量 PEI 通过共价键连接到可生物降解的高分子主链骨架上,这种方法提供了一条途径来解决分子量与细胞毒性以及转染效率之间相互矛盾的关系。本文进一步研究了此体系在负载 siRNA 前后粒径及 zeta 电位的变化,颗粒粒径分布在 50~500nm 之间,Zeta 电位在 $-9\sim-35\text{mV}$ 之间。

关键词:聚乙烯亚胺; 小干扰核糖核酸; 功能基团; zeta 电位; 粒径

随着近代生物技术的不断发展,人们已从分子水平上认识某些疾病的根源,为基因治疗提供了理论基础。在基因治疗的研究中,关键问题是如何将基因载体有效、安全地递送到靶细胞中,基因传输载体是影响基因治疗效果的重要因素^[1]。基因传输载体主要包括两类:病毒载体和非病毒载体。病毒载体的转染效率比较高,并且正在临床实验的基因治疗载体中有 69% 是病毒载体^[2,3]。但仍存在以下缺点:(1) 尽管病毒载体已经不能再复制,没有致病性,但仍存在转化为致病病毒或在提纯的时候带入一些具有复制能力的病毒的可能性;(2) 具有免疫原性,有可能引起免疫反应;(3) 缺乏靶向性,成本高^[4]。非病毒载体主要是合成的带有正电的阳离子基因载体,合成载体的优点是安全性高、适应性好、制备容易且结构可控等优势逐渐成为基因传输领域的研究热点^[5]。非病毒载体主要包括脂质体、阳离子聚合物载体、复合载体等^[6]。与脂质体相比,阳离子聚合物载体相对稳定,结构可变,可进行适当改性以调整和改善载体的性能^[7~9],因此,使其越来越受到人们的青睞。在已经报道的众多阳离子聚合物载体中,聚乙烯亚胺(PEI) 由于具有独特的“质子海绵效应”而成为研究热点^[10],常用的 PEI 载体分子量约在 2.5×10^4 左右,但其在体内无法降解。有研究表明,将小分子量的 PEI 通过双功能基团偶联剂的连接,可以得到具有大分子 PEI 水平的转染效率且毒性较小的 PEI 衍生物^[11,12]。RNA 干扰(RNAi)技术的发展,出现了基于 PEI 载体在体外传输 siRNA 的报道,这些载体可有效负载并保护 siRNA 免于被核酸酶降解^[13]。因此,选用生物相容性良好且生物可降解的聚合物对 PEI 进行修饰是十分必要的,常用的聚合物有聚乙二醇(PEG)^[14]、聚氨基酸^[15]、聚酯类^[16~18]等。

本文设计合成一类含苹果酸单元的丙交酯的衍生物和丙交酯共聚,通过脱保护后,得到侧链含有功能基团羧基的衍生物,且功能基团的密度可以通过与丙交酯共聚的单体的物质的量来调控,利用羧基与 PEI 分子上的氨基偶合,将小分子量 PEI 通过共价键连接到可生物降解的高分子主链骨架上,借助主链的降解,得到“生物可降解”的 PEI 衍生物。同时,这种方法也提供了一条解决分子量与细胞毒性以及转染效率之间相互矛盾关系的途径。此外,本文还进一步研究了该体系在负载 siRNA 前后粒径和 zeta 电位的变化,以及其在基因转染方面有着良好的应用前景。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.04.009

收稿:2014-04-01;修回:2014-10-21;

基金项目:广东省教育厅项目(2013LYM_0088);惠州市科技计划项目(A512.0226);

作者简介:强娜(1980—),女,吉林舒兰人,博士,从事医用高分子材料研究;

* 通讯联系人,E-mail: qiangna93@163.com.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

苯甲醇、无水乙醇、无水乙醚、乙酸乙酯、三乙胺、异丙醇、四氢呋喃(THF)、二甲基亚砜(DMSO)吡啶和碳酸氢钠、亚硝酸钠均为 AR 级试剂,广州化学试剂厂产品;*L*-天冬氨酸为上海吉奥生化有限公司产品,溴代乙酰氯、33% HBr/CH₃COOH 和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为 Acros Organics 公司产品,三氟乙酸购于 Sigma-Aldrich,辛酸亚锡和十二醇为 Alfa Aesar 公司产品;无水乙醚用钠丝干燥后蒸馏,三乙胺用邻苯二甲酸酐回流,然后用 CaH₂ 回流,再蒸馏,*N,N*-二甲基甲酰胺用 4Å 分子筛干燥后减压蒸馏,*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)、ε-己内酯(ε-CL)为 Aladdin 公司产品,ε-CL 氢化钙干燥后减压蒸馏。

核磁共振分析(¹H NMR):Varian 公司的 Mercury-Plus 300 型超导核磁共振仪,5mm 样品管,温度 25℃。¹H NMR 测试的共振频率为 300MHz,样品浓度约为 10mg/mL,扫描 128 次。

凝胶渗透色谱分析法(GPC)法测定聚合物的相对分子质量及其分布,仪器为 Waters Breese 型凝胶色谱仪。洗脱剂为四氢呋喃,洗脱速率为 1mL/min,柱温 45℃,标样为单分散聚苯乙烯。仪器使用的泵为:Waters1515 型,检测器为:Waters2414 示差检测器。

热分析(DSC):TA instruments MDSC 2910, N₂ 气氛(40mL/min),测定二次升温曲线。每个样品质量为 3~5mg,升降温速率为 10℃/min,样品扫描温度范围为 0~100℃或 0~200℃。

1.2 3(s)-苄氧甲基-1,4-二噁烷-2,5-二酮单体(BMD)的合成

参考文献^[19]以 *L*-天冬氨酸为原料,经四步法合成 BMD。¹HNMR (300MHz, CDCl₃) δ 3.18(d, CH₂CO, 2H), 5.10(q, OCH₂CO, 2H), 5.18(s, CH₂Ph), 5.31(t, OCH, 1H), 7.35(s, C₆H₅, 5H)

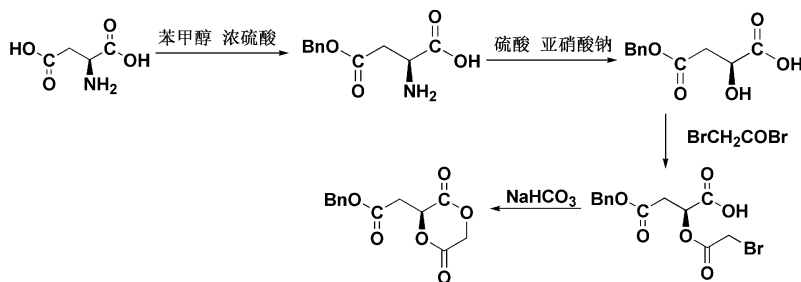


图1 BMD 单体合成

Figure 1 Synthesis route of BMD monomer

1.3 聚[(*L*-丙交酯)-*co*-(乙醇酸-*alt*-*L*-天冬氨酸苄酯)]的合成[P(LA-*co*-Bz-BMD)]

采用封管本体聚合方式制备共聚物。安瓿瓶经洗液浸泡(加热至 60~70℃)、洗净、烘干,干燥 24h 后备用。将一定摩尔比的经纯化后 BMD 单体与用乙酸乙酯重结晶的 *L*-LA (*n**L*-LA/*n*_{BMD} = 98/2, 95/5, 92/8)加入到干燥的 30mL 聚合管中,用氩气置换 3 次,加入月桂醇为引发剂并控制聚合物的分子量([M]/[I] = 700/1),再加入辛酸亚锡的甲苯溶液([M]/[Cat] = 1000/1),混合均匀,在室温下抽真空 2h 以除去残留的溶剂,封管,置于 100℃的油浴中反应 48h。反应结束后聚合管冷却至室温,沿瓶颈切断后,加入 5mL 氯仿将反应物完全溶解后,用 8~10 倍氯仿量的冷甲醇沉淀,重复溶解-沉淀两次,真空干燥 24h 得产物。所得共聚物分别为 P(LA₉₈-*co*-BMD₂)、P(LA₉₅-*co*-BMD₅)、P(LA₉₂-*co*-BMD₈)。

1.4 聚[(*L*-丙交酯)-*co*-(乙醇酸-*alt*-*L*-天冬氨酸)]的合成[P(LA-*co*-BMD)]

将上述所制得的共聚物 2g 分别溶于 20mL 三氟乙酸中,待其完全溶解后,在氩气保护下滴加 33% HBr/CH₃COOH 溶液 8mL,室温下反应 5h,将产物倾入到 200mL 乙醚中,过滤,得到的沉淀用无水乙醇洗涤三次,再用氯仿溶解-冷乙醇沉淀纯化,真空干燥 24h,得到系列含功能基团羧基的共聚物。

1.5 聚[(*L*-丙交酯)-*co*-(乙醇酸-*alt*-*L*-天冬氨酸)] (P(LA-*co*-BMD)) 共聚物羧基活化及接枝 PEI

以 P(LA₉₈-*co*-BMD₂) 为例, 0.5 g 脱保护后的聚合物(内含羧基物质的量约为 0.2 mmol)溶于 15 mL CHCl₃, 加入 NHS(0.05 g, 0.4 mmol), 在冰浴条件下加入 DCC(0.08 g, 0.4 mmol), 在此温度下反应 2 h, 然后室温反应 24 h, 反应完毕后, 用 0.45 μm 过滤头除去 *N,N*-二环乙基脲(DCU), 然后用冷乙醇沉淀, 得白色产物。0.08 g PEI(*M_n*=600、1800)溶于 5 mL DMSO, 加入事先溶解有 0.3 g 经 NHS 活化后的聚合物 THF(5 mL)溶液, 在室温下搅拌反应 24 h, 反应完毕后, 用 MWCO=3.5 kD 的透析袋在去蒸馏水中透析 3 d, 冻干得淡黄色产物。

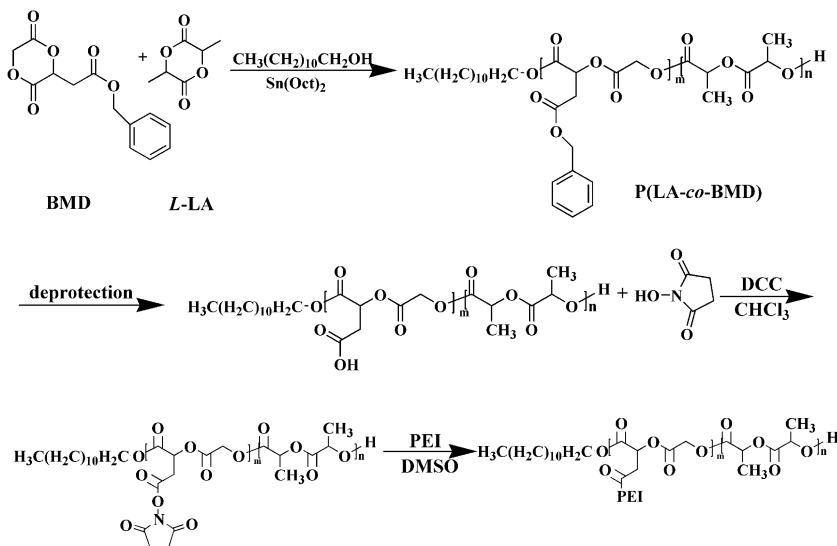


图 2 P(LA-*co*-BMD) 共聚物合成及偶联 PEI

Figure 2 Synthesis route of P(LA-*co*-BMD) copolymer and coupling with PEI

1.6 P(LA-*co*-BMD)-NHS-*g*-PEI/siRNA 纳米粒子的制备

将 10 mg P(LA-*co*-BMD)-NHS-*g*-PEI 载体溶于 2 mL 二氯甲烷中。在超声作用下缓慢滴加入 20 mL 超纯水(e. g. 0.1 μg siRNA)中形成乳浊液, 接着将该混合体系强烈涡旋 15 s, 挥发除去二氯甲烷, 所得产物置于 4℃ 下保存备用。

2 结果与讨论

2.1 共聚物的合成及表征

由于辛酸亚锡催化丙交酯类单体开环聚合的高效性, 在催化功能单体 BMD 与 *L*-LA 共聚时, 选择辛酸亚锡作为催化剂。虽然 BMD 的熔点为 150℃, 但当温度为 100℃ 时, *L*-LA 即可熔解, 此时 BMD 可溶解在 *L*-LA 中, 因此 BMD 与 *L*-LA 的共聚温度为 100℃ 即可, 高的反应温度会促进催化剂与苄基之间的反应, 而且由于竞争反应的存在, 反应时间不宜过长, 所以反应时间为 48 h。

图 3 为共聚物 P(LA-*co*-BMD) 的核磁氢谱图, 聚合物各组氢原子都在氢谱中有相应归属。g 和 h 为 *L*-LA 开环聚合后的特征峰, δ 1.6 ppm (g, 3H, CH₃), δ 5.1 ppm (h, 1H, OCH)。 δ 5.5 ppm 和 δ 4.5~4.6 ppm 处出现聚天冬氨酸苄酯链段亚甲基和次甲基的共振吸收峰, δ 5.1 ppm 处侧链苄酯基团亚甲基的共振吸收峰被 *L*-LA 开环聚合的特征吸收峰所覆盖, δ 7.3 ppm 处出现侧基苯环的共振吸收。通过 ¹H NMR 谱中有关共振吸收峰的相对积分强度的比值可计算出共聚物中功能单体 BMD 的含量。具体计算方法是利用 *L*-LA 开环聚合后的特征峰(g)与 BMD 的苄氧基中苯环质子的共振峰(b)的积分强度比, 即: $(I_g/6)/(I_b/5)$ 。结果显示共聚物中 BMD 的含量与投料比基本一致。结合图 4 为 $nL\text{-LA}/n_{\text{BMD}}$ 不同比例共聚物的 GPC 曲线, 从图中可以看到, P(LA₉₈-*co*-BMD₂)、P(LA₉₅-*co*-BMD₅)、P(LA₉₂-*co*-BMD₈) 三种共

聚物均呈现单峰分布,未见肩峰和双峰,结合核磁谱图可判断辛酸亚锡成功催化 *L*-LA 和 BMD 开环聚合。

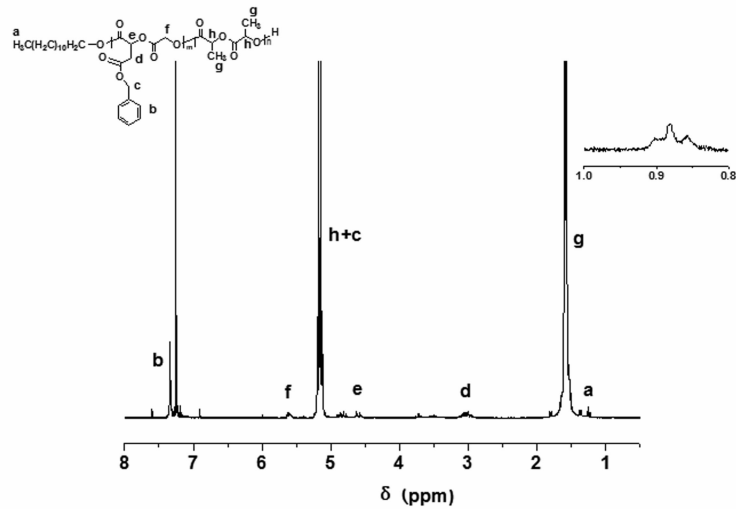


图 3 共聚物 P(LA₉₂-*co*-BMD₈)的核磁氢谱(CDCl₃)
Figure 3 ¹H NMR spectrum of P(LA₉₂-*co*-BMD₈) random copolymers(CDCl₃)

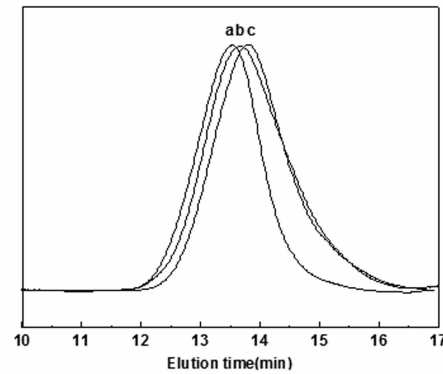


图 4 共聚物的 GPC 曲线
a: P(LA₉₈-*co*-BMD₂); b: P(LA₉₅-*co*-BMD₅); c: P(LA₉₂-*co*-BMD₈)
Figure 4 GPC traces of the obtained P(LA-*co*-BMD)
a: P(LA₉₈-*co*-BMD₂); b: P(LA₉₅-*co*-BMD₅); c: P(LA₉₂-*co*-BMD₈)

2.2 共聚物的热力学分析

图 5 为 P(LA₉₈-*co*-BMD₂)、P(LA₉₅-*co*-BMD₅)、P(LA₉₂-*co*-BMD₈) 三种共聚物的二次升温曲线图。DSC 测试三种预聚物的结晶熔融温度 150℃左右,结晶熔融温度及结晶熔融焓均低于 PLLA。表 1 给出了聚合物的热性质,相比于 *L*-LA 均聚物,P(LA-*co*-BMD)共聚物的 *T_g*、*T_m*、Δ*H* 随着功能单体 BMD 含量的变化而变化,随着功能单体含量的增加,*L*-LA 单元数的下降,结晶熔融温度及结晶熔融焓均下降,说明功能单体 BMD 的存在破坏了 PLLA 链段的结晶度,使其结晶性能下降。玻璃化转变温度随着功能单体 BMD 含量的增加而下降,虽然刚性基团苄基增加,但是由 DSC 测试结果可看出,P(LA-*co*-BMD)共聚物的结晶度受到严重破坏,P(LA₉₂-*co*-BMD₈)的结晶熔融焓只有 9.4J/g,结晶度非常低,所以相比于刚性基团增加导致 *T_g* 升高的趋势,结晶度对 *T_g* 的影响更为明显。

2.3 P(LA-*co*-BMD)-NHS-PEI/siRNA 纳米粒子粒径和 zeta 电位

PEI 的部分胺基会被质子化而带正电,因此可以与 siRNA 表面所带负电荷通过静电作用复合在一

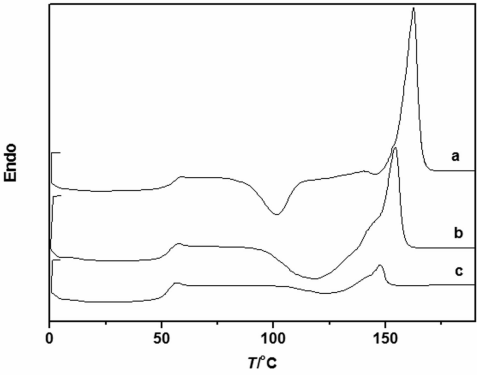


图 5 共聚物 P(LA-co-BMD)的 DSC 曲线

a: P(LA₉₈-co-BMD₂); b: P(LA₉₅-co-BMD₅); c: P(LA₉₂-co-BMD₈)

Figure 5 DSC thermograms of the obtained P(LA-co-BMD)

a: P(LA₉₈-co-BMD₂); b: P(LA₉₅-co-BMD₅); c: P(LA₉₂-co-BMD₈)

表 1 BMD 与 L-LA 共聚(十二醇为引发剂,辛酸亚锡为催化剂)

Table 1 Polymerization of BMD and L-LA initiated by dodecanol and catalyzed with stannous octanoate^a

L-LA theo/BMD	L-LAbNMR/BMD	M _n (theo)/(g•mol ⁻¹)	M _n ^c /(g•mol ⁻¹)	M _w /M _n ^c	T _g ^d /°C	T _m ^d /°C	ΔH _m ^d /(J•g ⁻¹)
100/0	100/0	—	—	—	60.8	177.2	93.6
98/2	98.0/2.0	1.0×10 ⁵	1.6×10 ⁵	1.03	55.9	162.4	55.6
95/5	95.4/4.6	1.0×10 ⁵	1.1×10 ⁵	1.12	53.7	154.2	54.8
92/8	93.6/6.4	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵	1.19	53.4	147.4	9.4

a. L-LA 与 BMD 在 100℃ 聚合 48h; b. 核磁氢谱(¹HNMR)检测; c. 凝胶渗透色谱分析法(GPC)测定聚合物的相对分子质量及其分布(洗脱剂为四氢呋喃,标样为单分散聚苯乙烯); d. N₂ 气氛,测定二次升温曲线,升降温速率为 10℃/min。

起。分别制备 N/P 比为 5、10 和 15 的 P(LA-co-BMD)-NHS-PEI/siRNA 纳米粒子;用纳米粒度及 zeta 电位分析仪对其进行表征,结果如图 6 所示,N/P 比对聚合物复合 siRNA 的能力起着至关重要的作用。其粒径范围在 50~500nm 之间,粒径随着 N/P 的增加而降低,随着功能单体含量的增加,纳米粒子的粒径是先降低后增大,这可能是由于随着功能单体即 PEI 含量的增加,对 siRNA 压缩能力增强,但是,随着偶联 PEI 含量的进一步增加,会产生聚集,导致粒径尺寸增大。以 N/P=5 复合 siRNA 后,其表面电位急剧下降,这很明显是由于负电的 siRNA 所带来的电位中和作用造成的。随着 N/P 从 5 继续增加到 15,复合物的表面电位也随之持续增加。相同 N/P 值复合物的 zeta 电位,随着 PEI 修饰度的增加而减小。

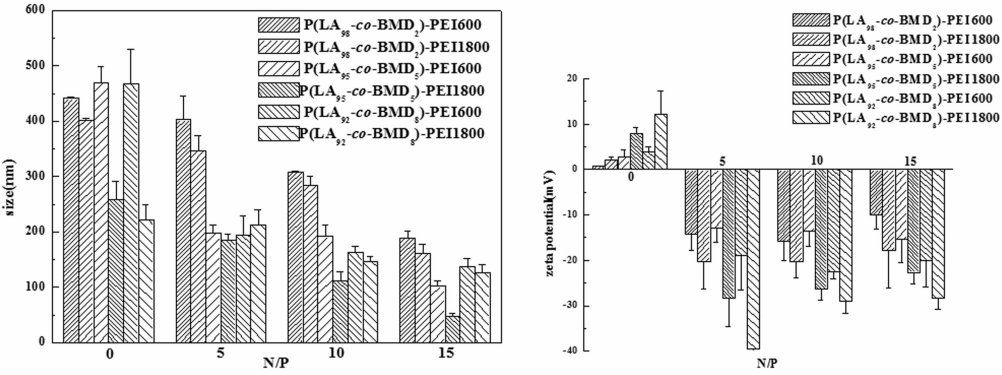


图 6 P(LA-co-BMD)-NHS-PEI/siRNA 粒径和 zeta 电位

Figure 6 Particle size and Zeta potential of P(LA-co-BMD)-NHS-PEI/siRNA

3 结 论

聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)是目前较受关注的非病毒载体,其介导的细胞转染效率同其细胞毒性存在相关性,分子量大的 PEI 转染效率高,但其细胞毒性较大^[20]。本研究在疏水性 PLLA 链段引入功能单体 BMD,利用其侧链上的羧基偶联 PEI,利用功能单体含量的不同来控制偶联 PEI 密度的不同,达到 PEI“低分子量、高密度聚集”,期待在提高转染效率的同时,降低其细胞毒性。本论文合成的这种可以结合并输送 siRNA 的新型载体,具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Lambert G, Fattal E, Couvreur P. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 47: 99~112.
- [2] Michel U, Malik I, Ebert S, Bähr M, Kügler S. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326: 307~312.
- [3] Fechner H, Sipo I, Westernann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Müller O, Vetter R, Erdmann V, Tschöpe C, Poller W. *J Mol Med*, 2008, 86: 987~997.
- [4] Lee M, Kim S W. *Pharm Res*, 2005, 22: 1~10.
- [5] Glover D J, Lipps H J, Jans D A. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 299~310.
- [6] Matsui K, Sasaki Y, Komatsu T, Mukai M, Kikuchi J, Aoyama Y. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 3935~3938.
- [7] Al-Dosari M S, Knapp J E, Liu D X. *Adv Genet*, 2005, 54: 65~82.
- [8] North S, Butts C. *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4: 249~257.
- [9] Akhtar S, Benter I F. *J Clin Invest*, 2007, 117: 3623~3632.
- [10] Garnett M C. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 1999, 16: 147~207.
- [11] Tiyyaboonchai W, Woiszwillo J, Middaugh R. *Eur J Pharm Sci*, 2003, 19: 191~202.
- [12] Wightman L, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E. *J Gene Med*, 2001, 3: 362~372.
- [13] Petersen H, Fechner P M, Martin A L, Kunath K, Stolnik S, Roberts C J, Fischer D, Davies M C, Kissel T. *Bioconjug Chem*, 2002, 13: 845~854.
- [14] Lee H, Jeong J H, Park T G. *J Control Release*, 2001, 76: 183~192.
- [15] Akinc A, Langer R. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78: 503~508.
- [16] Lim Y B, Kim C H, Kim K, Kim S W, Park J S. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 6524~6525.
- [17] Lynn D M, Langer R. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 10761~10768.
- [18] Lynn D M, Anderson D G, Putnam D, Langer R. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 8155~8156.
- [19] Taguchi K, Yano S, Hiratani K, Minoura N, Okahata Y. *Macromolecules*, 1988, 21: 3338~3340.
- [20] Jeong J H, Song S H, Lim D W, Lee H, Park T G. *J Control Release*, 2001, 73: 391~399.

Preparation and Characterization of A Novel Polyethylenimine(PEI)-Based Gene Carrier

QIANG Na^{*}, LIANG Hao, XIE Fang, TAO Hai-xia, LI Xian-feng, LIU Li-fang

(Department of Chemical Engineering, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: A novel polyethylenimine(PEI)-based gene carrier was used for carrying a plasmid encoding small interfering RNA(siRNA). A series of semicrystalline copolymers, especially with functional group carboxyl poly(L-lactide-co- β -malic acid) were synthesized. Random polymers P(LA-co-BMD) were first synthesized through ring-opening copolymerization of L-LA and 3(S)-[(Benzyloxycarbonyl)methyl]-1,4-dioxane-2,5-dione(BMD) in the presence of dodecanol as initiator and stannous octoate(Sn(Oct)₂) as catalyst. The structure of the copolymers was characterized by Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR), Gel Permeation Chromatography (GPC), and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The density of carboxyl groups were increased with the functional monomer. The PEI was coupling with the copolymer by amino groups. The modification of polymeric vectors has shown higher transfection efficiency and lower cytotoxicity. The micelles showed a significant reduction in surface zeta-potential ($-9 \sim -35\text{mV}$) and a much smaller particle size($50 \sim 500\text{nm}$).

Key words: Polyethylenimine(PEI); Small interfering RNA(siRNA); Functional group; Zeta-potential; Particle size