半乳糖胺修饰阳离子型刷形嵌段共聚物的合成与表征

郝莹 张洋 何金林 尚修娟 张明祖 倪沛红*

(苏州大学材料与化学化工学部 江苏省先进功能高分子材料设计及应用重点实验室 苏州 215123)

摘要 利用两步原子转移自由基聚合(ATRP)和聚合物后修饰反应,制备半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA-Gal)-*b*-PDMAEMA。首先,通过 ATRP 法引发单体聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(PEGMEME)和聚乙二醇甲基丙烯酸酯(PEGMA)聚合,得到末端含氯基的无规共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA);再利用其作为大分子引发剂,引发水溶性单体甲基丙烯酸-2-(*N,N*-二甲氨基)乙酯(DMAEMA)进行 ATRP 反应,获得三组分两嵌段刷形共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA)-*b*-PDMAEMA;最后,利用 PEGMA 结构单元中的侧链羟基,经聚合物反应,键合具有肝靶向功能的半乳糖分子(Gal),成功获得 P(PEGMEME-*co*-PEGMA-Gal)-*b*-PDMAEMA。其中,PDMAEMA 侧基的二甲氨基[—N(CH₃)₂]在中性和弱酸性介质中可发生质子化,形成聚阳离子链段,能够缩合 DNA,用作基因载体。通过核磁共振氢谱(¹H NMR)、红外光谱(FT-IR)和凝胶渗透色谱(GPC),对聚合物的化学结构、分子量及分子量分布进行表征。利用凝胶阻滞电泳研究阳离子型嵌段共聚物与 DNA 的结合能力、利用动态激光光散射仪(DLS)测试聚阳离子/DNA 复合物的表面 zeta 电位值、粒径及粒径分布。通过细胞毒性试验(MTT 法)表征载体的生物相容性,并分别研究复合物对宫颈癌(HeLa)细胞和肝癌(HepG2)细胞的转染能力。实验结果表明,这种半乳糖胺修饰的阳离子型刷形共聚物具有较低的细胞毒性,在肝靶向基因输送中具有潜在的应用。

关键词 半乳糖胺;刷形共聚物;原子转移自由基聚合;基因载体

Synthesis and Characterization of PEGylated Brush-type Polycation Modified with Galactosamine

Hao, Ying Zhang, Yang He, Jinlin Shang, Xiujuan Zhang, Mingzu Ni, Peihong*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Jiangsu Key Laboratory of Advanced Functional Polymer Design and Application, Soochow University, Suzhou 215123)

Abstract Gene therapy has been generally regarded as a promising treatment for numerous hard curable diseases, such as cancer, genetic and infectious diseases. Seeking a safe and efficient vector plays the most challenging role in gene therapy. In the past decades, non-viral polycation has attracted much more attentions as a promising gene vector due to their good biocompatibility, high condensation ability, as well as easily-adjustable and controlled structures. In the present work, a series of galactosamine (Gal)-conjugated brush-type cationic copolymer P(PEGMEME-*co*-PEGMA-Gal)-*b*-PDMAEMA were prepared via a combination of two-step atom transfer radical polymerization (ATRP) technique and polymer reaction. Firstly, random copolymerization of poly(ethylene glycol)methyl ether methacrylate (PEGMEME) and poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) was carried out to yield the copolymer P(PEGMEME-*co*-PEGMA), which was further used as a macroinitiator to polymerize 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA), producing the cationic copolymer P(PEGMEME-*co*-PEGMA)-*b*-PDMAEMA. Finally, the brush-type copolymer P(PEGMEME-*co*-PEGMA-Gal)-*b*-PDMAEMA was obtained by the modification of pendent hydroxyl groups with galactosamine using *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) as the coupling agent. PDMAEMA is a well-known pH-sensitive polycation and has been widely applied for non-viral gene delivery, while the brush-type hydrophilic chains provide the carrier with favorable biocompatibility, prolonged blood circulation time, and reduced non-specific adsorption of proteins. PDMAEMA block would be partially protonated to afford some hydrophobic domains and positive charges at neutral condition, which can bind with DNA via electrostatic interaction to form polycation/DNA polyplex. The Gal moiety on the surface made the polyplex easily recognized by asialoglycoprotein receptors (ASGPRs) over-expressing hepatoma cells and internalized via a receptor-mediated endocytosis process. The chemical structures, molecular weights and molecular weight distributions of P(PEGMEME-*co*-PEGMA-Gal)-*b*-PDMAEMA copolymer were characterized by ¹H NMR, FT-IR, and GPC measurements. The DNA binding capacity of this copolymer was investigated by agarose gel electrophoresis and zeta potential measurements, which indicated that DNA migration could be completely retarded when the N/P ratio was higher than 1.5. The DLS

* E-mail: phni@suda.edu.cn; Tel.: 0512-65882047

Received March 15, 2014; published April 17, 2014.

Projects supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21374066 and 21074078), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province for Rolling Support (No. BK2011045), the Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions.

受国家自然科学基金(Nos. 21374066, 21074078)、江苏省基础研究计划(自然科学基金)——滚动资助项目(No. BK2011045)、江苏高校优势学科建设项目资助。

analysis demonstrated that the polyplex held an average particle size of about 106 nm. In addition, *in vitro* cytotoxicity (MTT assay) and transfection assays were also examined, the results showed that the copolymer possessed relatively lower cytotoxicity than branched PEI (25 kDa), and the transfection of polyplex into HepG2 cells was more efficient than that of HeLa cells studied by live cell imaging system owing to specific ligand-receptor interactions between Gal and ASGPRs on the surface of HepG2 cells. This study presents a facile strategy for the preparation of biocompatible polymeric micelles that will act as a promising platform for hepatoma-targeting delivery of genes.

Keywords galactosamine; brush-type copolymer; ATRP; gene delivery

1 引言

随着基因治疗的不断深入研究, 其在治疗遗传病、肿瘤等多种疾病中取得了突破性进展. 目前, 用于基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体. 非病毒载体由于其具有低免疫反应、结构可控和易于组装等优点而引起广泛关注^[1~4]. 作为一类常用的非病毒基因载体, 阳离子型聚合物具有较高的转运能力和转染效率, 但同时也存在一些问题, 例如: 稳定性较差、细胞毒性较高, 易与人体血液中的带负电荷组分结合而导致非特异性清除等. 为了解决这些缺点, 研究者一般是通过对阳离子型聚合物进行功能化修饰, 以降低载体的细胞毒性^[5~10]、并提高其转染效率^[11~14]. 研究发现, 通过引入一些亲水性聚合物链段^[15], 如聚乙二醇(PEG)和聚甲基丙烯酸羟丙酯(PHPMA)等, 可以屏蔽载体表面的正电荷. 而具有高密度侧链的刷形聚合物能够改变聚阳离子主链周围的微环境, 尤其是基于 PEG 的刷形聚合物, 可以屏蔽正电荷、降低载体毒性、延长载体在体内的循环时间, 并且具有抗蛋白非特异吸附性能^[16~18].

另一方面, 由于体内调理素作用以及肝脏微血管的非连续内皮连接, 通过静脉注射的纳米粒子载体可在短时间内抵达肝脏富集. 然而, 肝脏滤过是纳米粒子遇到的主要屏障, 大多数纳米粒子会迅速被 Kupffer 细胞从体内清除, 并不会通过内吞作用进入肝细胞. 因此, 在纳米粒子表面修饰具有肝靶向功能的配体分子, 可以增强其对肝细胞的靶向能力^[19~22]. 半乳糖分子是其中一种重要配体, 它能够与哺乳类动物肝细胞表面过度表达的外源凝集素发生特异性作用, 从而增强基因或药物的输送.

本文设计合成了半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA-_{Gal})-*b*-PDMAEMA.

如图 1 所示, 聚合物中 PDMAEMA 链段在中性条件下 (pH 7.4) 发生部分质子化带正电荷, 可以与带负电荷的 DNA 通过静电作用相结合, 形成外围含有具有抗蛋白吸附能力的亲水性刷形 PEG 链段的复合物; 同时, 复合物表面带有靶向分子半乳糖, 在肝靶向基因治疗中具有潜在的应用前景.

2 结果与讨论

2.1 结构表征

2.1.1 P(PEGMEME-*co*-PEGMA) 及 P(PEGMEME-*co*-PEGMA)-*b*-PDMAEMA 的结构表征

图 2 为本文涉及的几种共聚物的合成路线. 首先利用 ¹H NMR 验证无规共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA) 的结构^[23,24], 结果如图 3(A)所示. ¹H NMR(DMSO-*d*₆)谱图中的代表性化学位移如下: $\delta \sim 4.0$ [f 峰, P(PEGMEME-*co*-PEGMA)侧链中—COOCH₂—上的 H]; $\delta \sim 3.0$ [h 峰, P(PEGMEME-*co*-PEGMA)侧链中—O—CH₃上的 H]; $\delta 4.5 \sim 4.6$ [j 峰, PEGMA 侧链中—CH₂OH 上的 H]. 从而可以证明成功制得末端含氯基的无规共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA).

利用 P(PEGMEME-*co*-PEGMA)作为大分子 ATRP 引发剂, 引发单体 DMAEMA 进行聚合, 获得阳离子型嵌段共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA)-*b*-PDMAEMA. 图 3(B)为嵌段共聚物的 ¹H NMR 谱图, 从图中可以找到相对应各个质子的归属, 初步证明已经成功制得嵌段共聚物. ¹H NMR (DMSO-*d*₆)谱图中的代表性化学位移: $\delta \sim 3.5$ [j 峰, PDMAEMA 链段中—CH₂N(CH₃)₂ 上的 H]; $\delta \sim 4.0$ [f 峰, PDMAEMA 链段侧链中—COOCH₂—上的 H]; $\delta \sim 2.2$ [k'峰, PDMAEMA 侧链

图 1 半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEME-*co*-PEGMA-_{Gal})-*b*-PDMAEMA 与 DNA 形成复合物的组装示意图
Figure 1 Schematic depiction of the formation of P(PEGMEME-*co*-PEGMA-_{Gal})-*b*-PDMAEMA/DNA polyplex

中—N(CH₃)₂上的H]. 进一步通过GPC表征两种共聚物 P(PEGMEMA-*co*-PEGMA)及 P(PEGMEMA-*co*-PEGMA)-*b*-PDMAEMA 的分子量及分子量分布, 结果如表 1 所示, 从嵌段共聚物分子量的增长可以验证成功合成了目标产物.

根据图 3 中聚合物的特征化学位移峰面积, 可以利用下列公式计算得到各个嵌段的聚合度:

$$\frac{A_c}{3} = \frac{A_h}{3k}; \quad \frac{A_c}{3} = \frac{A_j}{m}; \quad \frac{A_c}{3} = \frac{A_{k'}}{6n}$$

图 2 半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA-*co*-PEGMA-_{Gal})-*b*-PDMAEMA 的合成路线

Figure 2 Synthesis route of P(PEGMEMA-*co*-PEGMA-_{Gal})-*b*-PDMAEMA copolymer

图 3 两种共聚物的 ¹H NMR 谱图: (A) P(PEGMEMA₁₆-*co*-PEGMA₇)和(B) P(PEGMEMA₁₆-*co*-PEGMA₇)-*b*-PDMAEMA₅₃

Figure 3 ¹H NMR spectra of (A) P(PEGMEMA₁₆-*co*-PEGMA₇) and (B) P(PEGMEMA₁₆-*co*-PEGMA₇)-*b*-PDMAEMA₅₃

表1 两种共聚物 P(PEGMEMA-co-PEGMA)和 P(PEGMEMA-co-PEGMA)-b-PDMAEMA 的化学组成、分子量及分子量分布

Table 1 Characterization data of the compositions, molecular weights, and molecular weight distributions of P(PEGMEMA-co-PEGMA) and P(PEGMEMA-co-PEGMA)-b-PDMAEMA copolymers

Samples	$\overline{M}_{n, GPC} / (g \cdot mol^{-1})$	$\overline{M}_{w, GPC} / (g \cdot mol^{-1})$	PDI
P(PEGMEMA ₁₆ -co-PEGMA ₆)	8670	11130	1.28
P(PEGMEMA ₁₄ -co-PEGMA ₇)	8810	11430	1.30
P(PEGMEMA ₁₆ -co-PEGMA ₇)	7650	9710	1.27
P(PEGMEMA ₁₆ -co-PEGMA ₇)	7560	9510	1.26
P(PEGMEMA ₂₁ -co-PEGMA ₃)	7460	9420	1.27
P(PEGMEMA ₁₆ -co-PEGMA ₆)-b-PDMAEMA ₃₃	12390	20600	1.66
P(PEGMEMA ₁₄ -co-PEGMA ₇)-b-PDMAEMA ₃₉	12960	21450	1.66
P(PEGMEMA ₁₆ -co-PEGMA ₇)-b-PDMAEMA ₅₃	15870	26980	1.70

$$\overline{M}_{n, NMR, P(PEGMEMA-co-PEGMA)} = 300k + 360m + M_{MBP} - 80 + 35 \quad (1)$$

$$\overline{M}_{n, NMR, P(PEGMEMA-co-PEGMA)-b-PDMAEMA} = \overline{M}_{n, NMR, P(PEGMEMA-co-PEGMA)} + 157n \quad (2)$$

其中, 字母 A 代表 1H NMR 谱图中特征峰的积分面积, 公式(1)和(2)分别对应图3(A)和(B); 下标 c, h, j 和 k' 分别代表 1H NMR 谱图中所对应的化学位移, k, m 和 n 分别代表三嵌段共聚物中 PPEGMEMA, PPEGMA 和 PDMAEMA 链段的聚合度, 300, 360 和 157 分别代表单体 PEGMEMA, PEGMA 和 DMAEMA 的分子量, 80 和 35 分别为 Br 和 Cl 原子的相对原子量。

通过红外光谱(FT-IR)进一步验证聚合物的结构, 如图 4 所示, 其特征吸收峰的归属如下: 1250~1270 cm^{-1} (ν_{C-O-C}); 1730 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$); 3450 cm^{-1} (ν_{OH}); 2845 cm^{-1} (ν_{C-H}); 2738 cm^{-1} [$\nu_{N(CH_3)_2}$]. 从图 4(A)可以观察到, 在 3500 cm^{-1} 和 1750 cm^{-1} 处分别为聚合物侧链上羟基($-OH$)以及羰基($C=O$)的特征吸收峰; 图 4(B)中, 2730 cm^{-1} 处为刷形嵌段共聚物侧链上甲基($-CH_3$)的特征吸收峰。

图4 两种共聚物的红外光谱图: (A) P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA₇); (B) P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA₇)-b-PDMAEMA₅₃Figure 4 FT-IR spectra of (A) P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA₇) and (B) P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA₇)-b-PDMAEMA₅₃

2.1.2 P(PEGMEMA-co-PEGMA-Gal)-b-PDMAEMA 的结构表征

首先, 利用 CDI 活化 PEGMA 结构单元侧链上的羟基, 接着与半乳糖胺反应, 获得半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA-co-PEGMA-Gal)-b-PDMAEMA. 从 1H NMR 谱图(图 5)中可以找到与各个质子相对应的化学位移, 在 δ 8.2~8.6, δ ~4.4 以及 δ ~5.8 的化学位移归属于半乳糖分子结构中的特征质子. 此外, 与图 3 对比可知, 在 δ 4.5~4.6 处对应于 PEGMA 侧链中 $-CH_2OH$ 上的质子峰已基本消失, 进一步验证了半乳糖与聚合物成功键合制得 P(PEGMEMA-co-PEGMA-Gal)-b-PDMAEMA 共聚物。

图5 P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA_{7-Gal})-b-PDMAEMA₅₃ 的 1H NMR 谱图Figure 5 1H NMR spectrum of P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA_{7-Gal})-b-PDMAEMA₅₃

2.2 P(PEGMEMA-co-PEGMA)-b-PDMAEMA 的凝胶阻滞电泳测试

凝胶阻滞电泳测试常用于研究基因载体对 DNA 的压缩能力, 即阳离子载体对 DNA 迁移的阻滞能力. PDMAEMA 链段在 pH 7.4 条件下, 可以部分质子化带

正电荷,因而可通过静电相互作用与 DNA 复合. 图 6 为阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA₇)-*b*-PDMAEMA₅₃ 对 DNA 的凝胶阻滞电泳结果. 泳道 1 为裸 DNA, 泳道 2~9 为阳离子嵌段共聚物与 DNA 的复合物, N/P 比依次为 0.3, 0.6, 0.8, 1.5, 2.5, 3.0, 8.0 和 14. 从图中可以观察到, 泳道 1 中 DNA 发生完全迁移; 随着 N/P 比的增大, DNA 逐渐被阳离子型聚合物固定住, 而当 N/P 比大于 1.5 时, 即泳道 5~9, DNA 可以完全被固定住, 说明聚合物中阳离子链段可以完全阻滞 DNA 的迁移. 上述结果表明, 阳离子型嵌段共聚物能够与 DNA 通过静电相互作用, 压缩 DNA 形成复合物, 作为基因载体.

图 6 阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA₇)-*b*-PDMAEMA₅₃ 对 DNA 的凝胶阻滞电泳结果. 泳道 1 为裸 DNA, 泳道 2~9 分别为嵌段共聚物与 DNA 在不同 N/P 比条件下的复合物(N/P 比分别为 0.3, 0.6, 0.8, 1.5, 2.5, 3.0, 8.0 和 14)
Figure 6 Agarose gel electrophoresis of P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA₇)-*b*-PDMAEMA₅₃/DNA polyplexes at various N/P ratios. Lane 1 is the naked DNA control; Lanes 2-9 correspond to N/P ratios of 0.3, 0.6, 0.8, 1.5, 2.5, 3.0, 8.0 and 14, respectively

2.3 复合物的 zeta 电位和粒径测试

通过 DLS 测试粒子表面的 zeta 电位值, 研究半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃ 与 DNA 的复合物在不同 N/P 比条件下表面电荷情况. 图 7 为共聚物/DNA 复合物在不同 N/P 比条件下 zeta 电位的变化. 从图中可以看出, 裸 DNA 的 zeta 电位值约为 -16.7 mV, 随着复合物中聚阳离子链段的增多, 即 N/P 比值的增大, 复合物表面的 zeta 电位值逐渐由负值变为正值, 并逐渐增加. 当 N/P 比约为 1.0 时, 复合物表面的 zeta 电位值接近中性, 与凝胶阻滞电泳结果一致. 当 N/P 比为 10.0 的时候, 复合物表面电位值为 23.3 mV, 从而验证了 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃ 可以与 DNA 发生静电相互作用, 形成复合物. 同时, 我们也利用 DLS 表征了嵌段共聚物/DNA 复合物的平均粒径和粒径分布, 结果如图 8 所示. 从图中可以看出, 复合物的平均粒径为 106 nm, 粒径分布为 0.150.

2.4 细胞毒性测试

细胞毒性测试是表征生物医用材料生物相容性的方法之一. 本文采用 MTT 法检测半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃ 对 HepG2 细胞的毒性, 并与商品化的支化聚乙

图 7 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃ 与 DNA 复合物在不同 N/P 比条件下的表面 zeta 电位变化曲线
Figure 7 Zeta potential change of P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃/DNA polyplexes at various N/P ratios

图 8 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃ 与 DNA 复合物在 N/P 比为 15 时的粒径分布柱状图
Figure 8 The particle size distribution histogram of P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃/DNA polyplexes at a N/P ratio of 15

子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃ 对 HepG2 细胞的毒性, 并与商品化的支化聚乙亚胺(PEI, 25 kDa)进行对比. 从图 9 可以看出, 在聚合物浓度较低时(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 对应的细胞存活率较高; 随着聚合物浓度增加, 由于阳离子型 PDMAEMA 链段增多, 毒性逐渐增大, 细胞存活率下降. 在较高的聚合物浓度条件下, 浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 与常见的聚阳离子支化的 PEI 体系对比, 我们合成的嵌段共聚物体系呈现相对稍高的细胞存活率, 从而证明该阳离子型刷形嵌段共聚物比常用的支化 PEI 的毒性低, 具有潜在的生物应用前景.

2.5 体外转染测试

半乳糖分子对哺乳动物肝细胞内一种高效内吞受体的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)具有特定的识别作用, 提高了受体介导的内吞机制和肝靶向运送, 从而增强基因或药物的输送. 我们研究了半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA_{16-co}-PEGMA_{7-Gal})-*b*-PDMAEMA₅₃ 对 HepG2 细胞的毒性, 并与商品化的支化聚乙

图9 P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA_{7-Gal})-b-PDMAEMA₅₃ 与支化 PEI(25 kDa)对 HepG2 细胞的毒性测试结果

Figure 9 *In vitro* cytotoxicity study of P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA_{7-Gal})-b-PDMAEMA₅₃ and branched PEI (25 kDa) with various concentrations against HepG2 cells by MTT assay

PDMAEMA₅₃ 与 DNA 形成的复合物在 N/P 比为 15 时, 分别对 HeLa 细胞和 HepG2 细胞的转染能力, 结果如图 10 所示, 均可以观察到细胞内绿色荧光蛋白(GFP)标记的 DNA 的绿色荧光, 说明复合物能够进入细胞, 实现 DNA 的转染. 并且, 从细胞荧光显微镜照片可以看出, 在相同条件下, HepG2 细胞内的绿色荧光比 HeLa 细胞内的更强, DNA 能够更有效地进入 HepG2 细胞, 说明半乳糖分子的引入有助于提高肝细胞对载体的内吞作用.

图10 P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA_{7-Gal})-b-PDMAEMA₅₃ 与 DNA 的复合物(N/P=15)在 HeLa 和 HepG2 细胞中的荧光显微镜照片

Figure 10 The fluorescence microscopy images of HeLa and HepG2 cells treated by the P(PEGMEMA₁₆-co-PEGMA_{7-Gal})-b-PDMAEMA₅₃/DNA polyplexes at a N/P ratios of 15. Scale bar = 50 μm

3 结论

本文结合两步 ATRP 反应和聚合物后修饰法成功制备了半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物 P(PEGMEMA-co-PEGMA_{Gal})-b-PDMAEMA. 其中, 半

乳糖分子赋予其肝靶向性, 刷形 PEG 亲水链段具有抗蛋白吸附性, 而 PDMAEMA 链段在 pH 7.4 条件下可以部分质子化带正电荷, 通过静电相互作用与 DNA 复合, 可用作肝靶向基因载体. 凝胶阻滞电泳、zeta 电位和粒径测试结果表明, 该共聚物可以压缩 DNA, 形成粒径约为 106 nm 的复合物纳米粒子. 体外毒性测试(MTT 法)结果表明, 对于 HepG2 细胞, 嵌段共聚物比支化 PEI(25 kDa)具有更低的细胞毒性. 体外转染测试结果表明, 由于半乳糖的引入, 聚合物/DNA 复合物对 HepG2 细胞具有更高的转染能力. 该半乳糖胺修饰的阳离子型刷形嵌段共聚物具有良好的生物相容性和较强的 DNA 压缩能力, 可望用作靶向基因治疗载体.

4 实验部分

4.1 试剂与仪器

试剂: 四氢呋喃(THF, 分析纯, 国药集团化学试剂); 用 KOH 干燥 3 d, 加入二苯甲酮作为指示剂, 用钠丝进行无氧回流, 直至呈深紫色, 使用前蒸出. 单体聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(PEGMEMA, $\overline{M}_n \approx 300 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)和聚乙二醇甲基丙烯酸酯(PEGMA, $\overline{M}_n \approx 360 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich); 用 THF 稀释后, 经中性 Al₂O₃ 柱去除阻聚剂, 将流出液旋蒸除去溶剂, 室温真空干燥后使用. 甲基丙烯酸-2-(*N,N*-二甲氨基)乙酯(DMAEMA, 工业纯, 无锡新宇化工), 在 CaH₂ 中干燥一天后减压蒸馏使用. 以下试剂均直接使用: 无水乙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、乙醚、二氯甲烷(CH₂Cl₂)、三乙胺(TEA)、正己烷均为分析纯(国药集团化学试剂); α -溴代丙酸甲酯 (MBP, 98%, Sigma-Aldrich); 氯化亚铜(CuCl, 99.999%, Alfa Aser); *N,N,N',N',N''*-五甲基二亚乙基三胺(PMDTA, 百灵威科技); Tris-硼酸缓冲液(TBE, 北京索莱宝科技); *N,N'*-羰基二咪唑(CDI, 苏州昊帆生物科技); 半乳糖胺盐酸盐(98%, 上海聚源生物科技); 小牛胸腺 DNA(Sigma-Aldrich); DMEM 培养基(Invitrogen); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, 98%, Sigma-Aldrich).

仪器: 核磁共振波谱仪(NMR, INOVA-400, Varian); 红外光谱仪(FT-IR, Nicolet 6700), 溴化钾压片制样; 凝胶渗透色谱仪(GPC, Waters 1515, Waters), 测定时以聚苯乙烯为标样, 流动相为 THF, 流动速率为 1.0 mL · min⁻¹, 测试温度为 30 °C; 动态激光光散射仪(Zetasizer Nano-ZS, Malvern), 测试温度为 25 °C, 利用 Zetasizer 软件进行数据处理; 酶标仪(PowerWave XS, Bio-Tek); 活细胞工作站系统(CELL'R, Olympus).

4.2 聚合物的合成

4.2.1 P(PEGMEMA-co-PEGMA)的合成

依次取 PEGMEMA (3.15 g, 10.5 mmol), PEGMA (1.62 g, 4.5 mmol), 10 mL 无水乙醇、引发剂 MBP (56.8

μL , 0.5 mmol), 配体 PMDETA (208 μL , 1 mmol)、催化剂 CuCl (0.0495 g, 0.5 mmol) 于干燥的支管瓶中, 充放高纯氮气三次以除去瓶中的氧气, 最后充入高纯氮气, 将密封的反应瓶置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中搅拌 5 h. 反应结束后, 加入 50 mL 无水乙醇稀释反应物, 使之通过装有中性 Al_2O_3 的柱子以除去铜盐, 旋转蒸发使溶液浓缩, 加入 20 mL 超纯水稀释, 用超纯水透析(MWCO 3500) 24 h 后, 经冷冻干燥得到浅黄色粘状物质(产率 86.7%).

4.2.2 P(PEGMEMA-co-PEGMA)-b-PDMAEMA 的合成

以无规共聚物 P(PEGMEMA-co-PEGMA) 作为大分子引发剂, 引发单体 DMAEMA 聚合. 依次称取 P(PEGMEMA-co-PEGMA) (1.87 g, 0.25 mmol), 15 mL 无水乙醇, PMDETA (104 μL , 0.5 mmol), CuCl (0.0258 g, 0.25 mmol) 加入干燥的 50 mL 支管瓶中, 充放高纯氮气三次, 最终充入高纯氮气, 并用针筒注入 DMAMEA (2.36 g, 15 mmol), 将密封的反应瓶置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中搅拌 5 h. 反应结束后, 加入 50 mL 无水乙醇稀释反应产物, 使之通过装有中性 Al_2O_3 的柱子以除去铜盐, 旋转蒸发使溶液浓缩. 用冰正己烷沉淀后, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 真空烘箱中干燥至恒重, 得到浅黄色透明粘状固体(产率 58.8%).

4.2.3 P(PEGMEMA-co-PEGMA- $_{\text{Gal}}$)-b-PDMAEMA 的合成

首先, 依次称取 P(PEGMEMA-co-PEGMA)-b-PDMAEMA (2.155 g, 0.1 mmol), CDI (0.227 g, 0.5 mmol) 加入干燥的 50 mL 支管瓶中, 充放高纯氮 3 次, 最终充入高纯氮气; 并用针筒注入 25 mL 无水 THF, 充分搅拌至溶解, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h. 反应结束后, 旋蒸除去 THF, 在正己烷与无水乙醚体积比为 8:2 的混合溶剂中沉淀得到白色粘状物质, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 真空烘箱中干燥至恒重, 得到浅黄色透明粘状固体 P(PEGMEMA-co-PEGMA- $_{\text{CDI}}$)-b-PDMAEMA(产率 80.3%).

随后, 称取半乳糖胺盐酸盐(0.05 g, 0.231 mmol) 和 P(PEGMEMA-co-PEGMA- $_{\text{CDI}}$)-b-PDMAEMA (0.2 g, 0.022 mmol) 溶解于 10 mL DMF 并加入干燥的 50 mL 支管瓶中. 向恒压滴液漏斗中加入 50 μL TEA 和 10 mL DMF, 在 30 min 内逐渐滴加到支管瓶中, 并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 24 h. 反应完毕后, 用超纯水透析(MWCO 1000) 12 h, 经冷冻干燥得到乳白色固体(产率 72%).

4.3 凝胶阻滞电泳测试

将聚合物与 DNA 分别溶解在 $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液中, 配成浓度均为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的聚合物和 DNA 溶液. 根据不同的 N/P 比, 将 DNA 溶液与聚合物溶液混合, 漩涡震荡使其混合均匀. 通过静电相互作用形成聚合物与 DNA 的复合物溶液. 将上述复合物溶液 (8 μL) 与 2 μL 的上样缓冲溶液(85%丙三醇和 15%溴酚蓝)混合, 点样到含有 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴乙锭 0.8% 的琼脂糖凝胶中. 电泳电压为 90 V, 时间为 30 min, 缓冲溶液为 $0.5\times\text{TBE}$. 利

用紫外光仪(M-15E, UVP)观察凝胶中 DNA 的迁移.

4.4 细胞毒性测试(MTT 法)

利用 MTT 法检测载体的细胞毒性. 将人肝癌细胞 (HepG2) 置于由 10% 热灭活性胎牛血清、1% 青霉素和链霉素组成的 DMEM 培养基中, 在 5% 的 CO_2 气体和 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养. 首先, 在 96 孔板中将细胞以每孔 50000 个细胞的密度排布于 100 μL 的含有 10% 血清的 DMEM 培养基中培养 24 h. 将不同浓度的聚合物溶液分别加入不同的孔内与细胞一起培养 24 h. 接着, 在每个孔中加入 20 μL 的 MTT 溶液($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 进一步培养 4 h. 最后, 吸走培养基并加入 150 μL DMSO, 通过酶标仪测试每一个孔在 570 nm 的吸光度(OD). 细胞的相对毒性即为 $[\text{OD}]_{\text{test}}/[\text{OD}]_{\text{control}}\times 100\%$, 其中, $[\text{OD}]_{\text{test}}$ 为聚合物溶液存在下的吸收值; $[\text{OD}]_{\text{control}}$ 为没有加聚合物溶液的对照组的吸收值.

4.5 体外转染测试

分别将 HeLa 和 HepG2 细胞置于由 10% 热灭活性胎牛血清、1% 青霉素和链霉素组成的 DMEM 培养基中, 在 5% 的 CO_2 气体和 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养. 细胞接种在仪器配套专用的培养皿(Φ 35 mm) 中贴壁生长, 培养 24 h. 按不同的混合比例来转染细胞. 在培养皿中加入合适体积的 DMEM 培养基, 一定量不同 N/P 比的复合物混合后震荡, 每孔加入 100 μL 上述混合液, 轻轻地摇晃培养皿, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 条件下培养 6 h, 吸走培养皿中的培养基, 再加入 500 μL 新鲜的培养基, 将细胞放回培养箱中下继续培养 30 h. 通过活细胞工作站系统观察细胞中 DNA 的绿色荧光表达情况.

References

- [1] O'Neal, W. K.; Zhou, H. S.; Morral, N.; Langston, C.; Parks, R. J.; Graham, F. L.; Kochanek, S.; Beaudet, A. L. *Mol. Med.* **2000**, *6*, 179.
- [2] Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259.
- [3] Xu, C. H.; Sui, M. H.; Tang, J. B.; Shen, Y. Q. *Chin. J. Polym. Sci.* **2011**, *29*, 274.
- [4] Yue, Y. N.; Wu, C. *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 152.
- [5] Gosselin, M. A.; Guo, W. J.; Lee, R. J. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 989.
- [6] Wang, J.; Mao, H. Q.; Leong, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9480.
- [7] Wang, D. A.; Narang, A. S.; Kotb, M.; Gaber, A. O.; Miller, D. D.; Kim, S. W.; Mahato, R. I. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1197.
- [8] Forrest, M. L.; Koerber, J. T.; Pack, D. W. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 934.
- [9] Zhang, W. D.; Cheng, Q.; Guo, S. T.; Lin, D. S.; Huang, P. S.; Liu, J.; Wei, T.; Deng, L. D.; Liang, Z. C.; Liang, X. J.; Dong, A. J. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6495.
- [10] Wang, Y.; Wang, L. S.; Goh, S. H.; Yang, Y. Y. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1028.
- [11] Zhao, X. B.; Lee, R. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1193.
- [12] Chiu, S. J.; Ueno, N. T.; Lee, R. J. *J. Controlled Release* **2004**, *97*, 357.
- [13] Pan, X. G.; Wu, G.; Yang, W. L.; Barth, R. F.; Tjarks, W.; Lee, R. J. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 101.
- [14] Shen, Y.; Hu, G. X.; Zhang, H. X.; Qi, L. L.; Luo, C. C. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*, 323. (沈银, 胡桂香, 张华星, 齐莉莉, 骆成才, 化学学报, **2013**, *71*, 323.)
- [15] Cui, L.; Li, Y.; Hou, X. D.; Gong, W. J.; Xu, Y. H.; Cao, A. M. *Acta*

- Chim. Sinica* **2007**, 65, 2181. (崔亮, 李洋, 侯小东, 宫文娟, 徐宇虹, 曹阿民, 化学学报, **2007**, 65, 2181.)
- [16] Sato, A.; Choi, S. W.; Hirai, M.; Yamayoshi, A.; Moriyama, R.; Yamano, T.; Takagi, M.; Kano, A.; Shimamoto, A.; Maruyama, A. *J. Controlled Release* **2007**, 122, 209.
- [17] Tria, M. C. R.; Grande, C. D. T.; Ponnampati, R. R.; Advincula, R. C. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3422.
- [18] Zhou, Z. L.; Yu, P. P.; Geller, H. M.; Ober, C. K. *Biomacromolecules* **2013**, 14, 529.
- [19] Liang, H. F.; Chen, C. T.; Chen, S. C.; Kulkarni, A. R.; Chiu, Y. L.; Chen, M. C.; Sung, H. W. *Biomaterials* **2006**, 27, 2051.
- [20] Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K. *Biomaterials* **2012**, 33, 4166.
- [21] Nicolas, J.; Mura, S.; Brambilla, D.; Mackiewicz, N.; Couvreur, P. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 1147.
- [22] Wu, J.; Sun, T. M.; Yang, X. Z.; Zhu, J.; Du, X. J.; Yao, Y. D.; Xiong, M. H.; Wang, H. X.; Wang, Y. C.; Wang, J. *Biomater. Sci.* **2013**, 1, 1143.
- [23] Zhai, S. J.; Wang, B. D.; Feng, C.; Li, Y. J.; Yang, D.; Hu, J. H.; Lu, G. L.; Huang, X. Y. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2010**, 48, 647.
- [24] Zhai, S. J.; Song, X. M.; Feng, C.; Jiang, X. Y.; Li, Y. J.; Lu, G. L.; Huang, X. Y. *Polym. Chem.* **2013**, 4, 4134.

(Lu, Y.)