

基于低分子质量PEI的类PEG聚合物基因载体

张海燕^{1,2}, 荀苗苗^{1,2*}, 傅凯^{1,2}, 袁长春^{1,2}

(1. 中北大学 化学与化工学院, 山西 太原 030051; 2. 中北大学德州产业技术研究院, 山东 德州 253034)

摘要: 针对聚乙烯亚胺(PEI)类基因载体存在转染效率与细胞毒性难兼顾、血清稳定性差的问题, 本研究以低分子质量聚乙烯亚胺(PEI, 分子质量600 u)作为基准, 将其分别接枝至不同链长(二甘醇、三甘醇、四甘醇及五甘醇)的生物可降解类PEG聚酯骨架上, 成功构建了4种新型聚合物, 分别命名为L1~L4。采用核磁共振氢谱(¹H NMR)对所得聚合物的化学结构进行鉴定, 同时借助凝胶渗透色谱(GPC)测定其分子质量分布。进一步通过琼脂糖凝胶电泳实验考察该系列聚合物与DNA之间的结合能力。此外, 选用人骨肉瘤细胞(U2OS)、宫颈癌细胞(HeLa)和肝癌细胞(HepG2)作为体外模型, 以pEGFP-N1为报告基因, 在无血清环境中通过观测绿色荧光蛋白的表达水平, 对各聚合物/DNA复合物的转染性能进行评估, 并以PEI 25 ku作为对照。¹H NMR与GPC的结果证实目标聚合物合成成功。凝胶电泳结果表明, 所有聚合物均具有良好的DNA包裹能力。体外转染实验显示, 聚合物L3在3种细胞中均表现出最高的转染效率。尤其在U2OS细胞中, 该系列聚合物表现出显著高于PEI 25 ku的转染效率。该研究为开发高效、低毒、稳定性的非病毒基因载体提供了新的材料设计思路。

关键词: 基因载体; 类PEG结构; 生物可降解; 低分子质量PEI

中图分类号: Q599

文献标识码: A

doi: 10.62756/jnuc.issn.1673-3193.2025.08.0003

引用格式: 张海燕, 荀苗苗, 傅凯, 等. 基于低分子质量PEI的类PEG聚合物基因载体[J]. 中北大学学报(自然科学版), 2026, 47(4): 482-490.

Zhang Haiyan, Xun Miaomiao, Fu Kai, et al. PEG-like polymers based on low molecular weight PEI as gene vectors[J]. Journal of North University of China(Natural Science Edition), 2026, 47(4): 482-490.

PEG-Like Polymers Based on Low Molecular Weight PEI as Gene Vectors

Zhang Haiyan^{1,2}, Xun Miaomiao^{1,2*}, Fu Kai^{1,2}, Yuan Changchun^{1,2}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China;

2. Dezhou Industrial Technology Research Institute of North University of China, Dezhou 253034, China)

Abstract: To address the challenge of balancing high transfection efficiency with low cytotoxicity and poor serum stability in polyethylenimine (PEI)-based gene carriers, low molecular weight polyethylenimine (PEI, 600 u) was employed as the cationic core and grafted onto biodegradable PEG-like polyester backbones with varying chain lengths (diethylene glycol, triethylene glycol, tetraethylene glycol and pentaethylene glycol), successfully constructing four novel polymers designated as L1 to L4. The chemical struc-

收稿日期: 2025-08-07

基金项目: 山西省基础研究计划资助项目(202203021222026); 国家自然科学基金项目(52303017)

作者简介: 张海燕(1989—), 女, 讲师, 博士, 主要从事生物功能单体及聚合物性能的研究。E-mail: 20210142@nuc.edu.cn。

* 通信作者: 荀苗苗(1986—), 女, 讲师, 博士, 主要从事多功能介孔SiO₂载体构建及其基因/药物共传递的研究。E-mail: mmmxun@nuc.edu.cn。

tures of the obtained polymers were characterized by proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), while their molecular weight distributions were determined by gel permeation chromatography (GPC). Furthermore, the DNA binding affinity of these polymers was evaluated by agarose gel electrophoresis. In addition, three cell lines—cervical carcinoma (HeLa), human osteosarcoma (U2OS) and hepatocellular carcinoma (HepG2) served as in vitro models for evaluating the transfection efficiency of the polymer/DNA complexes under serum-free conditions using green fluorescent protein expression from the pEGFP-N1 reporter gene, with PEI 25 ku serving as a positive control. Both ^1H NMR and GPC analyses confirmed the successful synthesis of the target polymers. Gel electrophoresis indicated that all polymers exhibited good DNA-binding ability. In vitro transfection experiments demonstrated that polymer L3 achieved the highest transfection efficiency across all three cell types. Notably, in U2OS cells, the entire series of polymers demonstrated significantly higher transfection efficiency than PEI 25 ku. This study provides a new material design strategy for developing non-viral gene carriers with high efficiency, low toxicity, and enhanced stability.

Key words: gene vector; PEG-like structures; biodegradable; low molecular weight PEI

0 引言

作为一种新兴治疗手段,基因治疗通过递送外源基因来修正或代偿缺陷基因的功能,使细胞恢复常态,从而实现对相关疾病的有效干预^[1-2]。基因治疗一直以来的一大挑战是基因传递,裸基因(DNA 或 RNA)一般细胞摄取能力差,生物稳定性也差,所以很难发挥其生物学效应,需要一个合适的传递系统来克服这些障碍^[3]。随着基因治疗研究的不断深入,非病毒基因载体的开发日益受到重视^[4]。阳离子聚合物作为其中的重要分支,能够通过静电相互作用与DNA组装成纳米复合物,实现基因的有效负载^[5]。聚乙烯亚胺(PEI)凭借其独特的“质子海绵效应”,可有效促进复合物从内涵体中释放,因此展现出优异的转染性能,被视作当前最有效的聚阳离子基因载体之一^[6]。然而,PEI在生理环境中难以降解,且其性能与分子质量密切相关:高分子质量PEI虽然转染效率高,但细胞毒性显著;低分子质量PEI虽然毒性较低,转染效率却相应下降。这就促使研究者们不断地进行修饰或改造,以达到最佳的转染效果^[7-8]。

将低分子质量PEI制备成生物可降解型聚合物,使其保持低毒性的同时又具有高的转染效率;另外,可降解大分子的骨架在生物体微环境存在下,降解成小分子片段,这样便于DNA释放,同时又可以降低细胞毒性。例如,Li等^[9]通过支链PEI 1.8 ku和2,5-噻吩二羧基醛(TDA)交联

合成TDAPEI,与“黄金标准”PEI 25 ku相比,TDAPEI在细胞和动物研究中具有更高的转染效率和更低的毒性。Liu等^[10]先用肌醇(INO)与低分子质量PEI交联,再与半乳糖接枝的PEG链共轭,最终形成新型共聚物LA-PegPI,LA-PegPI/pDNA表现出低的细胞毒性和高的体外ASGPR阳性肝细胞转染效率。Ghodke等^[11]开发了一种以聚乙二醇-癸二酸的可降解聚酯为骨架,引入 β -环糊精构建的聚轮烷型阳离子载体(PRTx+)。研究结果表明,该体系具有良好的生物安全性,其体外转染效果与商品化转染试剂Lipofectamine 3000相当。

聚乙二醇(PEG)是一类应用广泛的生物医学材料,其优势体现在无毒性、优异的生物相容性以及强亲水性等方面^[12-14]。研究表明,将PEG引入基因载体体系后,可有效屏蔽载体与体内网状内皮系统之间的非特异性相互作用,从而降低巨噬细胞对其识别与清除,显著延长基因递送系统在血液循环中的保留时间^[15-17]。使用PEG对PEI进行功能化修饰,可有效掩蔽其表面多余的正电荷,从而显著降低材料对细胞的毒性。同时,亲水性PEG链段产生的空间位阻效应可有效抑制复合物聚集,从而提升载体/基因复合物的稳定性,延长其在血液循环中的驻留时间,促进复合物向靶组织与靶细胞的递送,最终增强体系的生物相容性与转染效率^[18]。例如,Liu等^[19]为了提高聚乳酸-乙醇酸(PLGA)和PEI载体的稳定性和转染效率,合成了PLGA-PEI-PEG-FA和PLGA-PEI-PEG-RGD共聚物,并与DNA形成纳米复合物

(NCs)。生物可降解 PLGA、亲水 PEG 和靶向基对 PEI 的修饰显著降低了 PEI 的细胞毒性, 且在其各自的临界 N/P 比以上, NCs 的转染效率显著提高。Zhu 等^[20]研究了 PEI-PEG 包覆介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN-PEG)用作药物载体的性能, 结果表明, MSN-PEG 具有良好的基因传递能力, 良好的结合、释放和对核糖核酸酶降解的保护作用。Wang 等^[21]研究以聚乙二醇接枝支化聚乙烯亚胺(PEI-g-PEG)作为聚阳离子基因载体, PEI 的 PEG 化修饰可以大大降低细胞毒性, 基因转染结果表明, 当功能基因编码在 PEI-g-PEG 载体上时, 能够在视网膜瘤细胞中实现多种功能蛋白的有效表达。Wang 等^[22]开发了一种以 PLA 为骨架、 Fe^{2+} -咪唑配位键交联、表面共价负载双基因药物、外部由 PEG 修饰的电荷可逆、配位交联型球形核酸(SNAs), 在结肠癌模型中实现了高效靶向治疗并展现出良好的生物安全性。

前期研究发现, Xun 等^[23]基于低分子质量 PEI 构建的生物可降解梳状聚合物在 U2OS 细胞中表现出优异的转染效率, 其 P1/DNA 复合物的转染能力较 PEI/DNA 复合物提高约 54 倍。然而, 在血清存在条件下, 此系列聚合物的转染优势并不突出。为进一步提升载体的生物相容性与血清稳定性, 本研究以低分子质量 PEI 600 u 为阳离子单元, 将其接枝至生物可降解的类 PEG 聚酯骨架, 构建一系列新型阳离子聚合物。该聚酯骨架由反丁烯二酸与不同链长的二醇缩水甘油醚通过缩聚反应制备, 其分子结构模拟 PEG 特性, 预期可延长复合物在血液循环中的驻留时间并增强血清耐受性; 同时, 可降解骨架的设计有助于降低复合物在细胞内的毒性。本研究通过凝胶电泳实验考察该系列聚合物对 DNA 的结合与保护能力, 并利用绿色荧光蛋白实验在不同细胞中评估其介导基因转染的效率, 旨在探讨该系列材料作为非病毒基因载体的应用潜力。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

凝胶渗透色谱(Waters 515 型仪器(OHPAK KB-803 凝胶柱)); 移液枪(德国 Eppendorf 公司); 加热反应器(Heidolph); 核磁共振波谱仪(Bruker AV 400 MHz); 真空泵(SHB-III 循环水式多用真空泵); 化学位移利用未氘代溶剂残余峰进行校准: $^1H\ NMR = 7.26(CDCl_3)$, $^1H\ NMR = 4.79$

(D_2O); 琼脂糖凝胶水平电泳仪, 全自动凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司); 恒温 CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); 倒置荧光显微镜(Nikon Eclipse TE 2000E 型仪器)。

反丁烯二酸(纯度(质量分数) $>99\%$); 二甘醇、三甘醇、四甘醇、五甘醇、对苯二酚、钛酸四丁酯(AR); 氯化锌、二氯甲烷、甲醇、环己烷、四氢呋喃(AR); PEI 25 kDa、二甲亚砜(Sigma-Aldrich); 0.22 μm 无菌滤膜购自 PALL; 无内毒素质粒提取试剂盒(TIANGEN); Loading Buffer(北京索莱宝公司); 琼脂糖(Life technologies); pEGFP-N1(Promega); 胎牛血清(FBS)、胰酶、双抗(链霉素-青霉素)、DMEM 培养基(美国 gibco)。

1.2 实验方法

1.2.1 类 PEG 聚酯的制备

类 PEG 聚酯是由反丁烯二酸与二元醇通过传统的两步法“酯化反应”和“缩聚反应”而得到。一般地, 将反丁烯二酸、二元醇、氯化锌、对苯二酚按物质的量比 1:3:0.01:0.006 进行反应。其中, 氯化锌作为一种催化剂, 对苯二酚作为自由基交联抑制剂^[24]。酯化反应在氮气氛围下 145 $^{\circ}C$ 反应, 直至理论量的水生成, 之后加入反应体系总质量 0.1% 的共催化剂钛酸四丁酯, 缩聚反应在 180 $^{\circ}C$, 压力逐渐从 5~15 Pa 反应 4 h 得到粗产物, 随后以热的氯仿为良溶剂来溶解, 并以甲醇为不良溶剂进行沉淀纯化 3 次, 最后经干燥获得目标聚酯产物。最终采用核磁共振氢谱表征类 PEG 聚酯结构(见图 1~图 4)及凝胶渗透色谱法测定其分子质量。

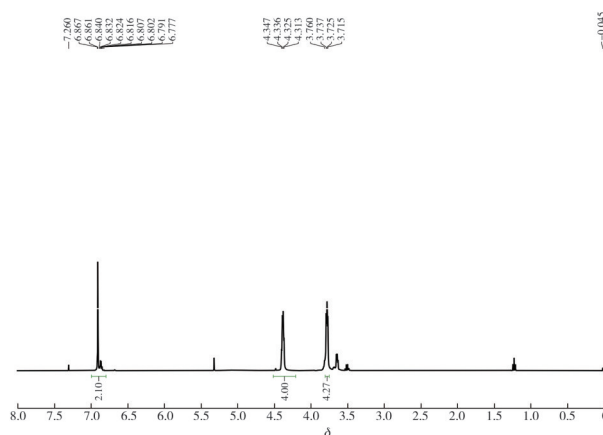


图 1 类 PEG 聚酯 2a 的核磁共振谱

Fig. 1 $^1H\ NMR$ spectrum of PEG-like polyester 2a

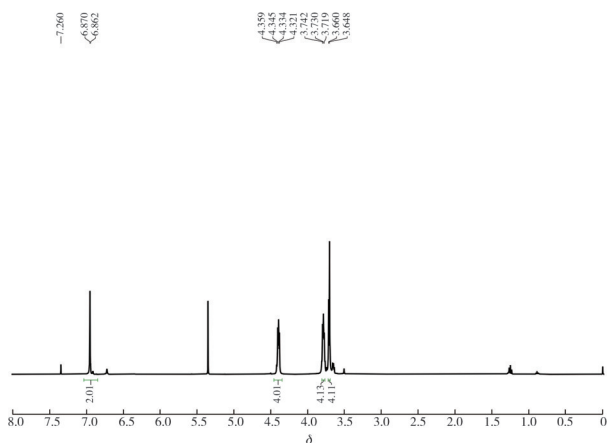


图 2 类 PEG 聚酯 2b 的核磁谱图

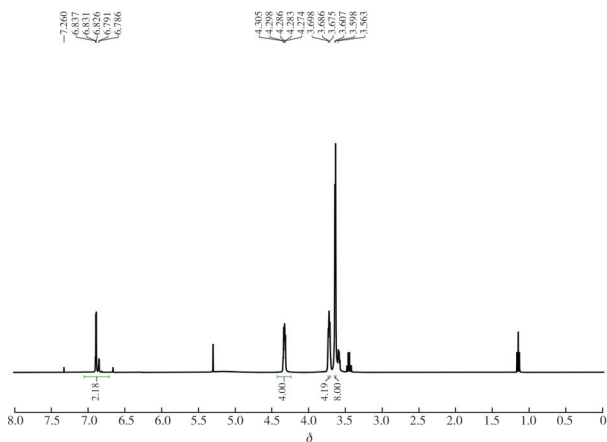
Fig. 2 ^1H NMR spectrum of PEG-like polyester 2b

图 3 类 PEG 聚酯 2c 的核磁谱图

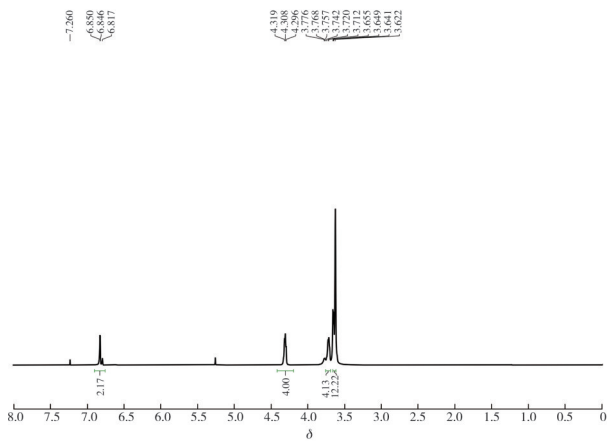
Fig. 3 ^1H NMR spectrum of PEG-like polyester 2c

图 4 类 PEG 聚酯 2d 的核磁谱图

Fig. 4 ^1H NMR spectrum of PEG-like polyester 2d

2a(产率31.44%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.87~6.78 (m, 2H, $-\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2-$), 4.35~4.31 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{CH}_2-$), 3.76~3.72 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$).

2b(产率28.13%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.87~6.83 (m, 2H, $-\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2-$), 4.36~

4.29 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{CH}_2-$), 3.75~3.71 (m, 4H, $2\times(-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-)$), 3.66~3.44 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

2c(产率23.37%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.84~6.79(m, 2H, $-\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2-$), 4.31~4.27 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{CH}_2-$), 3.70~3.66 (m, 4H, $2\times(-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-)$), 3.61~3.60 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

2d(产率24.61%): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.84~6.82(m, 2H, $-\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2-$), 4.33~4.19 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{O}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{CH}_2-$), 3.75~3.69(m, 4H, $2\times(-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-)$), 3.66~3.61(m, 12H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

1.2.2 目标聚合物 L 的制备

目标聚合物 L 是通过 Michael 加成反应得到的。PEI 600(1.26 mmol)和聚酯 2(1.26 mmol)分别溶解在 1.5 mL 无水甲醇和 1.5 mL 无水氯仿中,在 N_2 氛围下,将聚酯溶液缓慢滴加到 PEI 溶液中,混合溶液在 45 $^\circ\text{C}$ 下反应 48 h。反应结束后,将粗产物溶解于 0.5 mL 无水甲醇中,先后使用环己烷和四氢呋喃为不良溶剂来沉淀纯化:先以环己烷沉淀 2 次,再以四氢呋喃沉淀 1 次,经干燥后获得无色黏稠状目标聚合物。最终采用核磁共振氢谱表征聚合物 L 结构(见图 5~图 8)及凝胶渗透色谱法测定其分子质量。

L1(产率 49.17%): ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.27~4.14 (m, 1H, $-\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3.65~3.29 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.10~2.48 (m, 44H, $-\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$).

L2(产率 48.66%): ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.31~4.11 (m, 1H, $-\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3.73~3.28 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.05~2.51 (m, 48H, $-\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$ & $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

L3(产率 42.54%): ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.32~4.10 (m, 1H, $-\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 3.77~3.30 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.20~2.17 (m, 52H, $-\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$ & $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

L4(产率 41.11%): ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.32~4.11 (m, 1H, $\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$),

3.77~3.39 (m, 8H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.27~2.21 (m, 56H, $-\text{O}_2\text{CCH}(\text{PEI}_{600})\text{CH}_2\text{CO}_2-$ & $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$)。

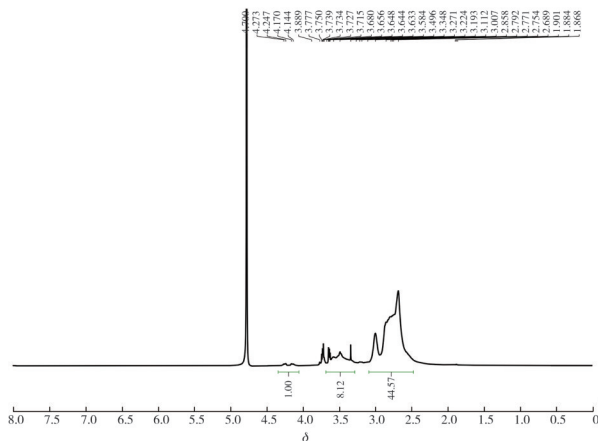


图5 聚合物L1的核磁谱图

Fig. 5 ^1H NMR spectrum of polymer L1

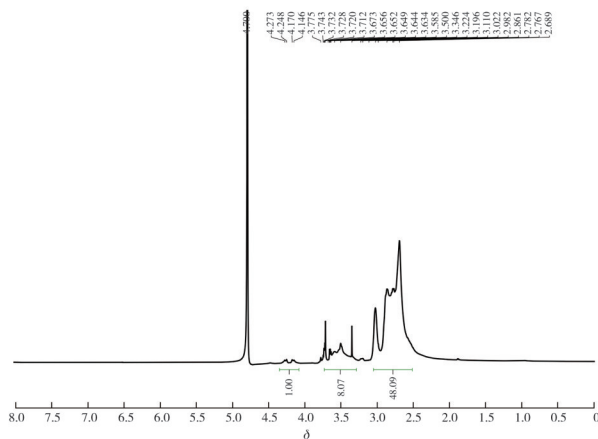


图6 聚合物L2的核磁谱图

Fig. 6 ^1H NMR spectrum of polymer L2

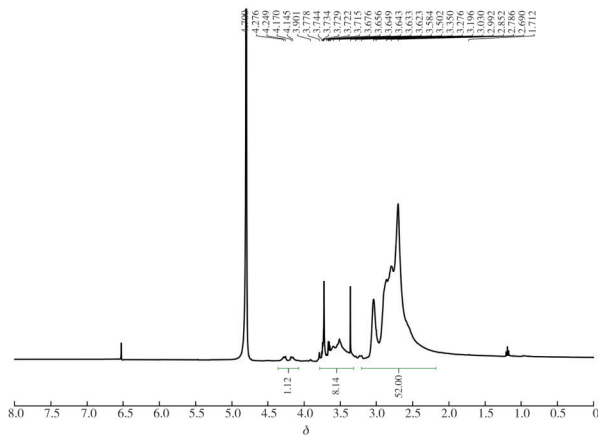


图7 聚合物L3的核磁谱图

Fig. 7 ^1H NMR spectrum of polymer L3

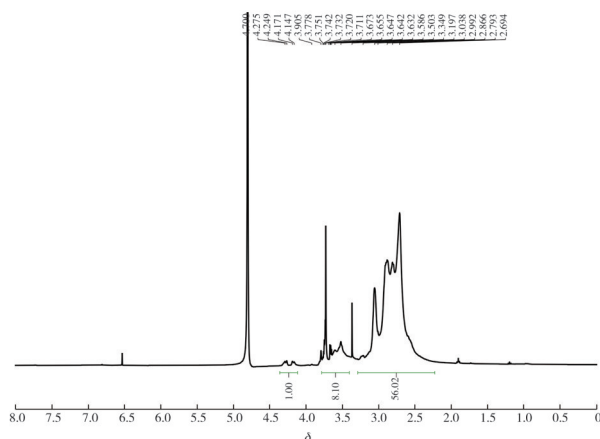


图8 聚合物L4的核磁谱图

Fig. 8 ^1H NMR spectrum of polymer L4

1.2.3 聚合物分子质量的测定

1) 类PEG 聚酯分子质量的测定: 采用凝胶渗透色谱法测定类PEG 聚酯的相对分子质量。样品以四氢呋喃为溶剂配制成1 g/L溶液, 在Waters 515型凝胶渗透色谱系统上完成分子质量测定, 分析条件设定为柱温维持在25℃, 流动相采用四氢呋喃, 流速控制为1.0 mL/min, 进样量50 μL。分子质量校正以窄分布的聚乙二醇为标准, 其分子质量范围为900~80 000。

2) 聚合物L分子质量的测定: 采用凝胶渗透色谱技术对目标聚合物的相对分子质量进行分析。待测样品以1 g/L的质量浓度溶解于磷酸盐缓冲液中。色谱系统为Waters 515型, 分离条件设定为: 柱温维持在25℃, 流动相采用乙腈体积分数为20%的0.2 mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液, 流速控制为0.5 mL/min, 单次进样体积为50 μL。分子质量标准曲线选用窄分布的聚乙二醇标样建立, 其分子质量覆盖范围为900~80 000。

1.2.4 聚合物L/DNA复合物的制备

为获得稳定的复合物体系, 本研究采用等体积复合方法进行制备。具体步骤为:

准确称取聚合物L并溶解于1 mL无菌去离子水(细胞实验用溶液需提前经0.22 μm滤膜过滤除菌)。将上述溶液用去离子水进行梯度稀释, 得到不同质量浓度的聚合物系列。各浓度聚合物溶液分别与等体积(5 μL)质粒DNA溶液混合, 在室温下静置孵育30 min, 即可获得具有不同质量配比的聚合物L/DNA复合物溶液。

1.2.5 提取和纯化质粒DNA

文中所用的增强型绿色荧光蛋白质粒pEGFP-N1在DH5α菌株中37℃大量扩增过夜,

随后,利用无内毒素质粒提取试剂盒对扩增产物进行分离、提取与纯化。利用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计在紫外吸收为 260~280 nm 处进行检验,并测定所提取出的质粒 DNA 的纯度和浓度,于 -20 °C 保存。

1.2.6 细胞培养

人骨肉瘤细胞 U2OS、宫颈癌细胞 HeLa 及肝癌细胞 HepG2 均以 DMEM 为基础培养基进行常规培养。培养基配制时,补加体积分数 10% 的胎牛血清,以及体积分数 1% 的双抗溶液(其中青霉素和链霉素的浓度分别为 100 kU/L)。细胞置于 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的恒温培养箱中扩增与传代。

1.2.7 凝胶电泳实验

参考 1.2.4 所述方法,制备聚合物 L 与 DNA 在不同质量比(0.1~6.4)下的复合物溶液,每份样品均加入 0.125 μg 的 pUC19 DNA。使用 PBS 缓冲液将复合物终体积调整为 15 μL,并在 37 °C 条件下孵育 30 min。随后,将 10×Loading Buffer 按照体积分数 30% 的比例加入溶液中,并充分混匀。取混合液点入预制好的 1% (即 1 g 琼脂糖溶于 100 mL TBE 缓冲液) 的琼脂糖凝胶上样孔内,以 TBE 缓冲液作为导电介质,在 150 V 稳压条件下电泳 30 min。电泳完毕后,将凝胶置于紫外凝胶成像分析系统中,通过紫外光激发观察 DNA 条带的迁移情况,实验中使用 Gelred 作为核酸染料。

1.2.8 体外转染实验

为评估聚合物 L/DNA 复合物的转染效率,选用 U2OS、HeLa 及 HepG2 三类细胞进行绿色荧光蛋白表达测试。所有细胞分别接种于 24 孔培养板,U2OS 与 HepG2 的接种量设定为每孔 1.1×10^5 个,HeLa 则为每孔 9×10^4 个。每孔补充 500 μL 培养基进行培养,置于 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱内生长。培养至细胞密度达到 80%~90% 时,开始进行转染实验。

按照 1.2.4 节所述方案制备不同质量比的聚合物 L/DNA 复合物。具体过程为:将聚合物溶液与 0.8 μg pEGFP-N1 质粒混合,用 Opti-MEM 培养基补足至 100 μL,室温条件下静置 30 min 使复合物复合充分。转染前,吸去孔板中原有培养基,每孔加入 400 μL 无血清培养基,随后将 100 μL 复合物溶液逐孔添加至细胞中。将培养板置于培养箱中继续孵育 4~5 h 后,移去上清,每孔更换为 500 μL 的血清体积分数为 10% 的新鲜培养

基,再次置于培养箱中培养 24 h。转染结束后,使用倒置荧光显微镜对各孔细胞的绿色荧光蛋白表达情况进行观察并拍照记录。本研究选用 PEI 25 ku 作为阳性对照,因其在转染实验中表现出较高的效率。

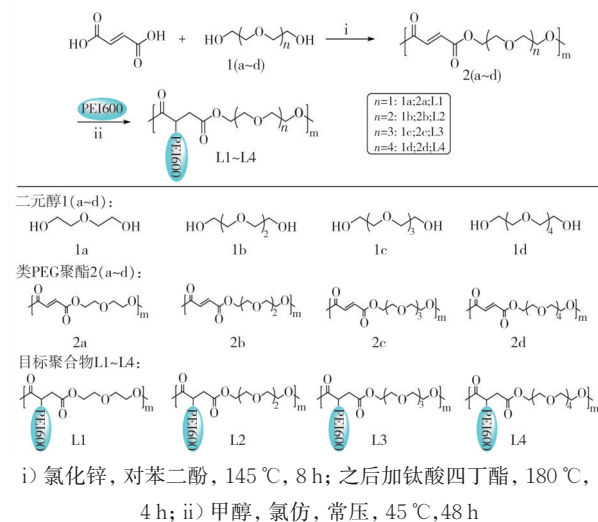


图 9 目标聚合物的合成路线及各化合物的结构式

Fig. 9 Synthetic route of target polymers and structures of different compounds

2 结果与讨论

2.1 聚合物 L 的合成与表征

目标聚合物 L1~L4 的制备方法如图 9 所示,将反丁烯二酸和不同的二元醇进行聚合反应。在此过程中,氯化锌是催化剂,钛酸四丁酯作为一种共催化剂,而对苯二酚则作为自由基交联抑制剂。将所得粗产物以热氯仿为良溶剂溶解,再以甲醇为不良溶剂进行 3 次沉淀纯化,以改善聚合物的分散性。随后,采用凝胶渗透色谱法测定类 PEG 聚酯的分子质量,见表 1,除了四甘醇与反丁烯二酸所生成的聚合物外,其它 3 个聚合物都有一个规律:二元醇的长度越长,所得到的聚合物分子质量越小。这可能是由于二元醇链长度增加导致空间位阻增大所致。对于目标聚合物,则是将类 PEG 聚酯与 PEI 600 u(单元的物质)的量比=1:1)在无水甲醇和无水氯仿作为溶剂的条件下,45 °C 反应 48 h 而得。粗产物经甲醇溶解后,依次以环己烷和四氢呋喃作为不良溶剂进行 3 次沉淀纯化。随后通过凝胶渗透色谱法测定该系列聚合物的分子质量,见表 2,所得到的聚合物随二元醇链长的增加而减小,其中, L1 和 L2 的分散度有些

大,说明分子质量的分布不是很均匀。对于所有聚合物L1~L4,它们存在连接链上碳链长度和氧个数不同的差异,这将影响聚合物的电荷密度。

表 1 类 PEG 聚酯的分子质量

Tab. 1 Molecular weight of PEG-like polyesters

化合物	$M_w/(g \cdot mol^{-1})$	PDI
2a	5 600	2.24
2b	3 482	1.76
2c	1 919	1.86
2d	2 515	1.93

2.2 聚合物 L 的凝胶阻滞实验

非病毒基因载体的实际应用是其与 DNA 形成复合物后,通过细胞转染进入细胞核,实现功能基因的最终表达。因此,为达成高效的基因递

表 2 目标聚合物的分子质量

Tab. 2 Molecular weights of target polymers

化合物	$M_w/(g \cdot mol^{-1})$	PDI
L1	63 446	6.61
L2	58 079	6.02
L3	23 264	2.98
L4	10 063	1.95

送,所用阳离子载体须具备较强的 DNA 结合能力,此作用可以通过琼脂糖凝胶电泳实验进行表征,结果如图 10 所示。可以看出,随着聚合物/DNA 质量比的增加,DNA 迁移受阻程度加剧。当质量比达到 0.8 时,所有聚合物 L1~L4 均可将 DNA 完全阻滞于加样孔内。表明该系列聚合物在质量比 ≥ 0.8 时,能通过与 DNA 的静电作用形成稳定的复合物,并实现对 DNA 的完全包裹。

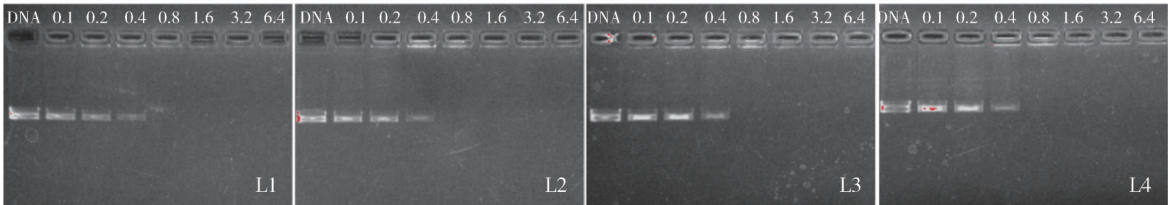


图 10 聚合物 L1~L4/DNA 复合物在不同质量比条件下的凝胶电泳实验结果

Fig. 10 Gel electrophoresis results of L1-L4/DNA complex under different mass ratios

2.3 聚合物 L/DNA 复合物的基因递送效率评价

利用荧光显微镜对聚合物 L1~L4/pEGFP-N1 复合物在 HeLa、HepG2 和 U2OS 细胞中的转染效果进行直观观察,并以公认高效的 PEI 25 ku (质量分数为 1.4)作为对照,复合物选用各自最佳质量比。如图 11 所示,在这 3 种细胞中,基于四甘醇构建的聚合物 L3/DNA 复合物均表现出最强

的绿色荧光蛋白表达。特别是在 U2OS 细胞中,该系列所有聚合物/DNA 复合物的转染效率都优于 PEI 25 ku,并且 L3/DNA 复合物的转染效率仍为最高。L1 和 L2/DNA 复合物相对较低的转染效率可能是由于其分散度太大,分子质量分布不均引起的,而对于聚合物 L4/DNA 复合物,可能是因为聚酯分子链中碳链长度和氧原子个数太多,屏蔽了聚合物中的正电荷导致的。

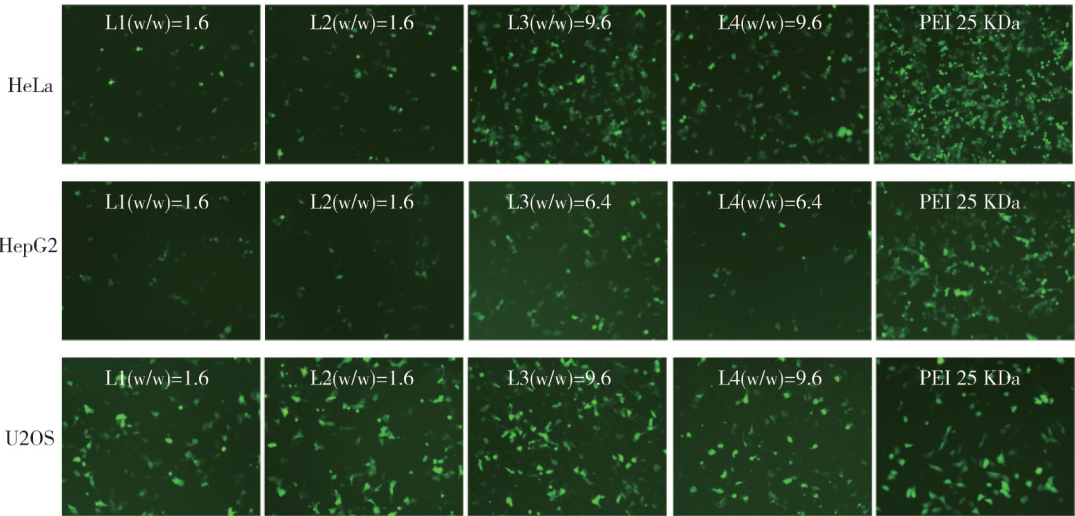


图 11 聚合物 L1~L4/DNA 复合物在无血清条件下对 HeLa、HepG2 和 U2OS 细胞的绿色荧光蛋白转染表达

Fig. 11 GFP expression mediated by L1-L4/DNA complexes in HeLa, HepG2 and U2OS cells under serum-free conditions

3 结 论

本文以低分子质量 PEI 600 u 为基准, 将其接枝到生物可降解类 PEG 骨架的聚酯上形成阳离子聚合物来研究其基因转染效率。这样可以兼具 PEI 的高转染活性与类 PEG 结构的稳定性和生物相容性。由四甘醇所生成的聚合物 L3/DNA 复合物在多种细胞中表现出卓越的转染效率, 尤其在 U2OS 细胞中的性能超越 PEI 25 ku, 同时其可降解性为潜在的毒性问题提供了解决方案。本文研究结果为开发高性能基因载体提供了有价值的设计思路。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors declare no relevant conflict of interests.

参考文献:

- [1] Kanu G A, Parambath J B M, Abu Odeh R O, et al. Gold nanoparticle-mediated gene therapy [J]. *Cancers*, 2022, 14(21): 5366.
- [2] 唐硕, 黄震. 磷硫代 siRNA 的 YAP 基因沉默活性研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2021, 58(5): 159-164.
Tang Shuo, Huang Zhen. Study on YAP gene silencing activity of phosphorothioate siRNAs[J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2021, 58(5): 159-164. (in Chinese)
- [3] 孙丹丹, 刘洪梅, 李燕, 等. 新型 Bola 两亲分子作为基因治疗药物输递载体的研究[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2012, 47(1): 12-16.
Sun Dandan, Liu Hongmei, Li Yan, et al. Research of a new bolaamphiphile as a gene therapy drug delivery vector[J]. *Journal of Shandong University (Natural Science)*, 2012, 47(1): 12-16. (in Chinese)
- [4] Li H Y, Peng E W, Zhao F, et al. Supramolecular surface functionalization of iron oxide nanoparticles with α -cyclodextrin-based cationic star polymer for magnetically-enhanced gene delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1884.
- [5] Liu H, Zhao X Y, Bai Y, et al. Amphiphilic cationic triblock polymers for p53-mediated triple-negative breast cancer gene therapy [J]. *Materials & Design*, 2022, 219: 110758.
- [6] Jerzykiewicz J, Czogalla A. Polyethyleneimine-based lipopolyplexes as carriers in anticancer gene therapies [J]. *Materials*, 2022, 15(1): 179.
- [7] Wen Y T, Pan S R, Luo X, et al. PEG- and PDMAEG-graft-modified branched PEI as novel gene vector: synthesis, characterization and gene transfection [J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2010, 21(8/9): 1103-1126.
- [8] Fang G, Zeng F, Yu C M, et al. Low molecular weight PEIs modified by hydrazone-based crosslinker and betaine as improved gene carriers [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 122: 472-481.
- [9] Li X M, Guo X S, Cheng Y, et al. pH-responsive cross-linked low molecular weight polyethylenimine as an efficient gene vector for delivery of plasmid DNA encoding anti-VEGF-shRNA for tumor treatment [J]. *Frontiers in Oncology*, 2018, 8: 354.
- [10] Liu L, Zong Z M, Liu Q, et al. A novel galactose-PEG-conjugated biodegradable copolymer is an efficient gene delivery vector for immunotherapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Biomaterials*, 2018, 184: 20-30.
- [11] Ghodke S, Mahajan P, Gupta K, et al. Biodegradable polyester of poly (ethylene glycol)-sebacic acid as a backbone for β -cyclodextrin-polyrotaxane: a promising gene silencing vector [J]. *Current Gene Therapy*, 2019, 19(4): 274-287.
- [12] Zhang X, Yao J, Zhang L H, et al. Synthesis and characterization of PEG-conjugated quaternized chitosan and its application as a gene vector [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 103: 566-572.
- [13] 林浩, 何东升, 涂家生. 聚乙烯亚胺非病毒基因载体结构修饰研究进展 [J]. *药学研究*, 2019, 38(11): 663-666.
Lin Hao, He Dongsheng, Tu Jiasheng. Development of polyethylenimine as non-viral gene vectors in structural modification [J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2019, 38(11): 663-666. (in Chinese)
- [14] Lutz G J, Sirsi S R, Williams J H. PEG-PEI copolymers for oligonucleotide delivery to cells and tissues [M]. New York: Humana Press, 2008: 141-158.
- [15] 崔亮, 李洋, 侯小东, 等. 聚乙二醇嵌段树枝状聚赖氨酸共聚物的合成及其基因载体研究 [J]. *化学学报*, 2007, 65(19): 2181-2186.
Cui Liang, Li Yang, Hou Xiaodong, et al. Studies on the synthesis of Poly(ethylene glycol)-b-dendritic Poly(L-lysine)s and their application as gene carriers [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2007, 65(19): 2181-2186. (in Chinese)
- [16] Yang Z, Jiang Z Z, Cao Z, et al. Multifunctional non-viral gene vectors with enhanced stability, improved

- cellular and nuclear uptake capability, and increased transfection efficiency [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(17): 10193-10206.
- [17] 王持, 潘仕荣, 吴红梅, 等. 聚酰胺-胺树枝状高分子的聚乙二醇改性及作为基因载体的性能[J]. *药学报*, 2011, 46(1): 102-108.
- Wang Chi, Pan Shirong, Wu Hongmei, et al. PEGylation of polyamidoamine dendrimer and the properties for gene vectors [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2011, 46(1): 102-108. (in Chinese)
- [18] Huang F W, Wang H Y, Li C, et al. PEGylated PEI-based biodegradable polymers as non-viral gene vectors [J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(11): 4285-4295.
- [19] Liu C Y, Xie Y C, Li X H, et al. Folic acid/peptides modified PLGA - PEI - PEG polymeric vectors as efficient gene delivery vehicles: synthesis, characterization and their biological performance [J]. *Molecular Biotechnology*, 2021, 63(1): 63-79.
- [20] Zhu Y X, Yue M, Guo T, et al. PEI-PEG-coated mesoporous silica nanoparticles enhance the antitumor activity of tanshinone IIA and serve as a gene transfer vector[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021: 6756763.
- [21] Wang J H, Wang H, Zhao P Y, et al. Hyperbranched star PEI-g-PEG as a nonviral vector with efficient uptake and hypotoxicity for retinoblastoma gene therapy application [J]. *Colloid and Interface Science Communications*, 2022, 50: 100647.
- [22] Wang S, Yi K L, Guan X Q, et al. Construction of charge-reversible coordination-crosslinked spherical nucleic acids to deliver dual anti-cancer genes and ferroptosis payloads [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 277: 134515.
- [23] Xun M M, Liu Y H, Guo Q, et al. Low molecular weight PEI-appended polyesters as non-viral gene delivery vectors [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 78: 118-125.
- [24] Liu C, Zeng J B, Li S L, et al. Improvement of biocompatibility and biodegradability of poly(ethylene succinate) by incorporation of poly(ethylene glycol) segments [J]. *Polymer*, 2012, 53(2): 481-489.