

• 基础研究 •

氟化聚乙烯亚胺衍生物构成的胶束载体的构建、表征及其在跨血-脑屏障递送中的作用研究

郭小塘^{1,2}, 卢席缘^{1,2}, 李聚学^{1,2*}

¹南京医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, ²江苏省人类功能基因组学重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 探讨由氟化聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)衍生物构成的纳米胶束的构建、表征及其在跨血-脑屏障(blood-brain barrier, BBB)进行基因递送中的作用。方法: 使用PEI和七氟丁酸酐(heptafluorobutyric anhydride, HFAA)通过化学反应合成PEI-HFAA, 随后通过酰胺反应连接芥子酸(sinapic acid, SA)得到产物PEI-HFAA-SA(简称SPF), 最终在SPF外包裹聚山梨酯80(polysorbate 80, PS80)得到最终产物PEI-HFAA-SA@PS80(简称SPFT)。通过傅里叶变换红外吸收光谱、核磁共振氟谱和核磁共振氢谱等对SPFT的分子键和元素组成进行分析, 并通过动态光散射实验、琼脂糖凝胶阻滞实验和扫描电镜观察对其水合直径、质粒吸附及保护能力、载体质粒复合体的稳定性和形貌进行进一步表征。探究SPFT在小鼠神经胶质瘤细胞Neuro 2a中的基因转染效率和细胞毒性, 通过尾静脉注射携带绿色荧光蛋白表达质粒的SPFT至C57BL/6J小鼠中, 观察其在脑组织中的分布情况以及BBB内细胞的基因转染效果。结果: 以SA和HFAA修饰以及PS80包裹的方法合成了SFPT。检测结果显示, SPFT水动力粒径100~200 nm, 并且对质粒有一定的携带和保护作用。SPFT携带质粒在体外表现出良好的转染能力和生物相容性。体内实验显示, 尾静脉注射后的SPFT在小鼠大脑中有聚集现象, 能够携带质粒穿越BBB并进行基因递送。结论: SPFT具有一定生物相容性和良好的穿越BBB及基因递送能力, 为脑部疾病的治疗药物递送提供了新的思路。

[关键词] 芥子酸; 血-脑屏障; 聚乙烯亚胺; 氟化修饰

[中图分类号] R943

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)08-1035-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN240414

Construction and characterization of nanomicelle carriers composed of fluorinated polyethyleneimine derivatives and their role in delivery across the blood-brain barrier

GUO Xiaotang^{1,2}, LU Xiyuan^{1,2}, LI Juxue^{1,2*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, ²Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the construction, characterization, and role of nanomicelles composed of fluorinated polyethyleneimine(PEI) derivatives in gene delivery across the blood-brain barrier(BBB). **Methods:** PEI-heptafluorobutyric anhydride (HFAA) was synthesized through a chemical reaction between PEI and HFAA, followed by amide reaction with sinapic acid(SA) to obtain PEI-HFAA-SA(referred as SPF). Finally, PEI-HFAA-SA@PS80(referred as SPFT) was obtained by encapsulating polysorbitol 80(PS80) within SPF. The molecular bonds and elemental composition of SPFT were analyzed using Fourier transformation infrared absorption spectroscopy, fluorine nuclear magnetic resonance(NMR), and hydrogen NMR spectroscopy. The hydrodynamic particle size, plasmid adsorption and protection capacity, stability and morphology of the carrier-plasmid complex were further characterized by dynamic light scattering experiments, agarose coagulation experiments and scanning electron microscopy observations, respectively. The gene transfection efficiency and cytotoxicity of SPFT were investigated in mouse glioma cell line Neuro 2a. SPFT carrying green fluorescent protein expression plasmid was injected into C57BL/6J mice by tail vein to observe its distribution in brain tissues and the effect of gene transfection within the BBB. **Results:** SA and HFAA were modified to synthesize SFPT, which was then wrapped in PS80. SPFT had a hydrodynamic particle size of 100 to 200 nm while exhibiting significant loading capacity for plasmids along with effective protection against degradation. *In vitro* experiments revealed that SPFT possessed excellent transfection ability and

[基金项目] 国家自然科学基金(82070872)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lijuxue@njmu.edu.cn

biocompatibility. *In vivo* experiments showed that SPFT accumulated in the brain successfully and crossed the BBB to deliver the gene effectively after tail vein injection into mice. **Conclusion:** SPFT exhibits a good biocompatibility and demonstrates an efficient gene delivery across the BBB, presenting a novel approach for drug administration in neurological disorders.

[Key words] sinapic acid; blood-brain barrier; polyethyleneimine; fluoridation

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(08): 1035-1043]

血-脑屏障(blood-brain barrier, BBB)是体内的重要屏障,由血管内皮细胞、血管周围星形胶质细胞端足和基底膜组成,具有维持脑内平衡、调节物质进出以及保护神经元的功能。在正常生理条件下,BBB的物质交换依赖于脑中血管内皮细胞上特定的受体,因此BBB会阻止大多数血源性分子进入脑实质^[1-2]。然而,由于BBB的这一功能,脑部疾病的诊断和治疗发展受到限制。近年来研究显示,阿尔茨海默病^[3]、卒中^[4]和脑肿瘤^[5]等脑部疾病的发病率越来越高,严重影响我国公众健康。由于化学药物的低递送效率和长时间服用引起的不良反应,这些疾病的治疗方法发展缓慢。尽管基因疗法因其高效性和治愈性在疾病治疗中占有一席之地,但由于现阶段其治疗缺乏特异性和屏障穿透性差,基因疗法在脑部疾病中的治疗也受到限制。因此,开发新的载体来搭载进行基因治疗的核酸,以克服BBB对脑部疾病诊疗的限制,从而系统且安全地递送治疗药物,是近年来需要攻克的难关之一。

近年来,随着纳米医学技术的发展,纳米载体递送体系成为促进药物跨生物屏障转运的热门工具。其中,阳离子聚合物因其制备简单、可修饰性强、对核酸具有保护作用、容易从溶酶体逃逸等特性,使其成为纳米医学基因治疗中不容忽视的一部分^[6]。聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)是最早发现的一类阳离子聚合物,其单体拥有大量的氨基,具备良好的携带核酸的能力、细胞摄取能力以及溶酶体逃逸能力^[7]。然而,PEI仍可能存在低特异性、高毒性和转染效率不足的问题。对此,研究者们通过各种修饰来保持其高转染效率的同时降低对细胞的毒性。早在2014年,Wang等^[8]提出氟化修饰制备纳米材料的策略,氟化修饰增强纳米颗粒的疏水性和疏油性,提高其细胞摄取和溶酶体逃逸能力;同时,由于修饰后具有生物惰性,与生物体内血浆成分相互作用较弱,其生物相容性也有所提高。因此氟化修饰策略可构建高效、低毒的基因递送载体^[9]。至今,氟化修饰聚合物被认为是具有较好前景的基因和蛋白质输送载体^[10-11]。

为了解决靶向性问题,经天然物质修饰的智能纳米递送体系在增强脑靶向性等方面受到越来越多的关注。经天然物质修饰后,其一方面减少炎症发生和细胞毒性作用,另一方面增强纳米颗粒的生物相容性。芥子酸(sinapic acid, SA)是芥末的主要成分,在植物界中广泛分布,同时存在于香料、水果、蔬菜、谷物和油料作物中。芥末可以在短时间内刺激大脑,同时研究表明SA可以穿越BBB,治疗受损的海马体神经元,帮助小鼠克服记忆障碍^[12];且SA修饰纳米材料后可使其穿越BBB,在大脑中积聚率可高达26.81%^[13],因此,SA具备穿透BBB的潜能。另一方面,聚山梨酯(polysorbate, PS)作为两亲性非离子表面活性剂,常用于增加胶体、蛋白质等生物制剂的稳定性。PS80是生物药物制剂中使用最广泛的表面活性剂之一,其修饰可以帮助材料通过BBB,并携带siRNA对脑损伤小鼠进行治疗^[14]。有研究指出,纳米颗粒经PS80包裹后,其结构与低密度脂蛋白颗粒相似,可与血浆中载脂蛋白(apolipoprotein E, ApoE)结合形成复合体,从而与BBB中血管内皮细胞上的低密度脂蛋白受体相互作用,使其被识别并内化,转运至BBB内^[15]。

因此,本研究设想借助SA对氟化的PEI进行修饰,并使用PS80进行包裹,以增强其跨BBB的基因递送效果,使其携带质粒进入BBB进行基因递送。

1 材料和方法

1.1 材料

七氟丁酸酐(heptafluorobutyric anhydride, HFAA)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺[1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC](TCI公司,日本),SA、PS80(上海阿拉丁公司),N-羟基丁二酰亚胺((N-hydroxy succinimide, NHS)、分子量为25 kDa的PEI(PEI_{25k})、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)(Sigma公司,美国),无水甲醇(Adamas公司,瑞士),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(上海吉至生化公司),Cy5.5(赛默飞公司,美

国), MEM 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素(10 000 U/mL)、0.25%胰酶、PBS(Gibco 公司, 美国), Cell Counting Kit(CCK)-8 试剂盒(杭州碧云天公司)、神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)抗体(Abcam 公司, 美国), 山羊抗兔 IgG(H+L)、Alexa Fluor Plus 555(Invitrogen 公司, 美国), DAPI、抗荧光衰减封片剂(北京索莱宝公司)。质粒 pHIV-Luciferase(#21375)分子量为 8 608 bp, 质粒 lentiCRISPR v2(#52961)分子量为 14 873 bp, 质粒 pLL3.7(#11795)分子量为 7 647 bp, 均购自武汉淼灵生物公司。

纳米粒径及电位分析仪(马尔文公司, 英国), 冷冻离心机、傅里叶红外光谱仪、CO₂细胞培养箱、Nanodrop 2000(Thermo 公司, 美国), 实验超净台(苏州安泰公司), 生物安全柜(Airstream 公司, 新加坡), 倒置荧光显微镜(Nikon 公司, 日本)、激光共聚焦显微镜 LSM 800(Zeiss 公司, 德国)、扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)(JEOL 公司, 日本), 琼脂糖凝胶电泳仪(上海天能公司), 酶标仪(Biotek 公司, 美国), 液体核磁仪(南京市鲁克公司)。

本研究所使用的 HEK293FT 和 Neuro 2a 细胞均来源于美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。本研究使用的小鼠为近交系 C57BL/6J, 购自南京医科大学医药实验动物中心。饲养为随机分笼, 每笼小鼠 5 只。饲养条件为标准化 SPF 环境: 温度 22 ℃、每日 06:00—18:00 给予光照, 小鼠的进食和饮水均自由进行。所有动物实验均在南京医科大学医药实验动物中心和伦理委员会批准下进行(NO. 210044)。

1.2 方法

1.2.1 纳米材料的合成及表征

PEI-HFAA(简称 PF)的合成: 称取 PEI_{25k} 100 mg 和 HFAA 40 mg, 分别溶于适量的无水甲醇中。将 PEI 溶液和 HFAA 溶液活化反应 4 h 后, 滴加三乙胺(triethylamine, TEA) 40 μL, 继续在搅拌器上搅拌反应 48 h。将合成产物放入已活化的 10 kDa 透析袋中, 在无水乙醇中透析 12 h, 然后在无水乙醇与超纯水的混合溶液中透析 12 h, 最后超纯水透析 24 h, 每 4 h 更换 1 次超纯水。透析结束后, 使用 10 kDa 超滤管在 5 000 r/min 离心 15 min 进行超滤, 收集上层液体进行冻干, 冻干条件为真空下 -80 ℃, 持续 10~12 h, 得到产物 PF。

PEI-HFAA-SA(简称 SPF)的合成: 称取 PF 100 mg、SA 26 mg、EDC 55 mg 以及 NHS 40 mg, 分别溶

于适量的 DMSO 中。将 SA 溶液、NHS 溶液和 EDC 溶液活化反应 4 h 后, 滴加 PF 溶液, 继续在搅拌器上搅拌反应 24 h。将合成产物放入活化后的 10 kDa 透析袋中, 在无水乙醇中透析 12 h, 然后在无水乙醇与超纯水的混合溶液中透析 12 h, 最后在超纯水中透析 24 h, 每 4 h 更换 1 次超纯水。透析结束后, 使用 10 kDa 超滤管在 5 000 r/min 离心 15 min 进行超滤, 收集上层液体进行冻干, 冻干条件为真空下 -80 ℃, 持续 10~12 h, 得到产物 SPF。

PEI-HFAA-SA@PS80(简称 SPFT)的合成: 称取适量的 SPF 和 PS80, 分别配制成 1 mg/mL 水溶液。取 180 μL SPF 水溶液, 滴加 20 μL 的 PS80 水溶液, 充分吹打混匀后, 室温静置 30 min, 得到 1 mg/mL SPFT 水溶液^[16]。

称取一定量的纳米材料进行傅里叶变换红外吸收光谱(Fourier transformation infrared absorption spectroscopy, FTIR)、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)氟谱(¹⁹F NMR)和 NMR 氢谱(¹H NMR)来分析修饰物是否修饰成功。

1.2.2 纳米载体搭载质粒形成复合体

根据实验需要的纳米材料与质粒的质量比, 将一定量的纳米材料水溶液与质粒的水溶液混合在超纯水中, 并用超纯水补充至合适的体积, 使用涡旋仪混合完全, 室温静置 30 min, 形成纳米材料包裹质粒的复合体。

1.2.3 载体质粒复合体的琼脂糖凝胶阻滞实验

琼脂糖凝胶制备: 称取 0.5 g 琼脂糖加入锥形瓶中, 加入 40 mL 1 × TAE 缓冲液(1.25% 琼脂糖), 放入微波炉中高火加热 2 min, 稍微摇匀后继续加热至二次沸腾, 使溶液完全澄清, 待溶液降至室温, 按 1:10 000 的比例加入核酸染料, 充分混合后缓慢倒入模具中, 待琼脂糖凝固后制备成胶。

琼脂糖凝胶阻滞实验: 固定质粒的质量, 按载体与质粒质量比为 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 配制载体质粒复合体。加入上样缓冲液, 80 V 电压反应 40 min, 利用凝胶成像系统进行成像并拍照记录结果。

1.2.4 纳米载体对质粒的保护

配制琼脂糖凝胶, 按载体与质粒的质量比为 4.0 配制载体质粒复合体, 孵育 30 min 后, 按照使用说明书加入 DNase I 和肝素, 在 37 ℃孵育 2~3 h, 设置两组对照组, 为不添加 DNase I 组以及裸露质粒添加 DNase I 组, 反应结束后, 加入上样缓冲液进行凝胶电泳。

1.2.5 水合粒径测定

利用激光粒度仪进行动态光散射(dynamic

light scattering, DLS)实验,测定载体质粒复合体的水合粒径。取适量的纳米材料与1 μg 质粒,按不同的质量比配制成混合物,室温孵育30 min后,用超纯水补充至1 mL,用粒径仪测定载体质粒复合体的水合粒径。每次测试重复3次,取平均值进行统计。

1.2.6 纳米载体质粒复合体稳定性实验

按载体与质粒质量比为4.0配制载体质粒复合体,孵育30 min后,利用激光粒度仪测定载体质粒复合体的水合粒径。随后将其在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,并在第0、24、48、72 h取出测定其水合粒径。

测定纳米胶束在不同溶液中稳定性时,配制好载体质粒复合体后,用900 μL 5%葡萄糖(glucose, Glu)溶液稀释,在第0、24、48 h测定其水合粒径。

1.2.7 细胞培养

HEK293FT细胞培养使用含10%胎牛血清FBS、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM高糖培养基进行培养。Neuro 2a细胞使用含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的MEM最低必需培养基进行培养。细胞培养条件为37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。细胞解冻后慢溶速冻,当细胞长满至90%~95%时传代,2 d换1次培养基。

1.2.8 CCK-8测定细胞活力

使用完全培养基将纳米材料稀释至6.25、10.00、12.50、20.00、25.00、50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,体积为100 μL 。实验前1 d,将Neuro 2a细胞铺于96孔板中,待细胞长至80%时更换为含不同浓度纳米材料的完全培养基。培养24 h后,吸除96孔板中的培养液,每孔加入100 μL 含CCK-8试剂的培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 处理30 min。测定450 nm波长处的吸光度值,计算细胞活力。

1.2.9 溶血实验

取适量C57BL/6J小鼠新鲜血液,2 000 r/min离心10 min,重复2~3次直至上清无色,取少量红细胞沉淀加入生理盐水或其他缓冲液,制得2%红细胞悬液(0.2 mL红细胞沉淀+10 mL生理盐水)。将不同浓度的纳米载体加入红细胞悬液中,制得不同终浓度的纳米载体红细胞混合溶液。双蒸水与生理盐水分别作为阳性与阴性对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h后,分别以2 000 r/min离心10 min,取100 μL 上清于96孔板中,测541 nm波长处的吸光度值,计算溶血率。

1.2.10 细胞转染

测试前1 d种板,待细胞密度达到80%时进行转染。按实验要求配制载体与含增强型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)质粒(pLL3.7)的复合

体,室温孵育30 min后,使用DMEM或MEM补足体积至500 μL ,对细胞进行换液。在培养箱孵育8 h后,换回完全培养基,继续孵育48 h。弃培养基进行细胞荧光染色实验,固定细胞后使用DAPI染色,通过倒置荧光显微镜观察荧光情况。

1.2.11 细胞内吞

将HEK293FT细胞接种于盖玻片上,待细胞长到合适密度时,按质量比为4.0制备SPFT-FITC/lentiCRISPR v2复合体,室温孵育30 min后,用DMEM或MEM补足体积至500 μL 。分别在孵育2、4、6 h后,弃去含载体质粒复合体的培养基进行细胞免疫荧光实验,置于共聚焦显微镜下观察。

1.2.12 纳米载体的体内分布

在固定的Cy5.5质量条件下,用5%Glu溶液将SPFT-Cy5.5及游离Cy5.5补足至200 μL ,现配现用。通过尾静脉注射将SPFT-Cy5.5或Cy5.5递送至C57BL/6J小鼠体内,分别在第0、24、36、44 h对不同的鼠进行尾静脉注射。随后在第48 h进行小鼠解剖,收集小鼠大脑并在活体成像仪上进行荧光观察。

1.2.13 纳米载体搭载质粒的体内转染实验

按体外转染实验探究出的最适质量比配制纳米载体质粒复合体,用5% Glu溶液补足体积至200 μL ,现配现用。通过尾静脉注射将载体质粒复合体递送至C57BL/6J小鼠体内,每3 d注射1次,共注射3次,注射结束后第3天取小鼠大脑进行冰冻切片。5%BSA室温封闭1 h,NeuN一抗在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;相应二抗室温孵育1 h;PBS洗涤3次,每次5 min;DAPI室温孵育10 min;抗荧光淬灭剂进行封片,激光共聚焦显微镜进行荧光成像。

1.3 统计学方法

使用SPSS 26.0软件进行数据分析。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。作图工具为Graphpad Prism 8,数据用均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SPFT的合成表征

通过一系列化学反应成功合成SPF纳米胶束(图1A)。对该材料进行了化学成分和化学键的表征。首先对中间产物PF和SPF的结构和成分进行了分析, ^{19}F NMR(图1B)显示,在-81、-119和-127处都出现了 $-\text{CO}-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CHF}_2$ 和 $-\text{CF}_3$ 的特征峰,表明氟元素的成功修饰^[17]。FTIR显示(图1C),与PEI_{25K}及PF相比,SPF在1 646 cm^{-1} 和1 560 cm^{-1} 出现了

酰胺键的特征峰,而在 $3\,393\text{ cm}^{-1}$ 的峰是游离—OH 的吸收峰^[18]。同时,¹H NMR 结果显示(图1D),产物 SPF 与 PEI_{25K} 的结构相比,在 3.2~3.5 处出现了 SA 修饰后的一O—CH₃特征峰,进一步验证了 SA 的成功修饰,随后合成 SPFT。

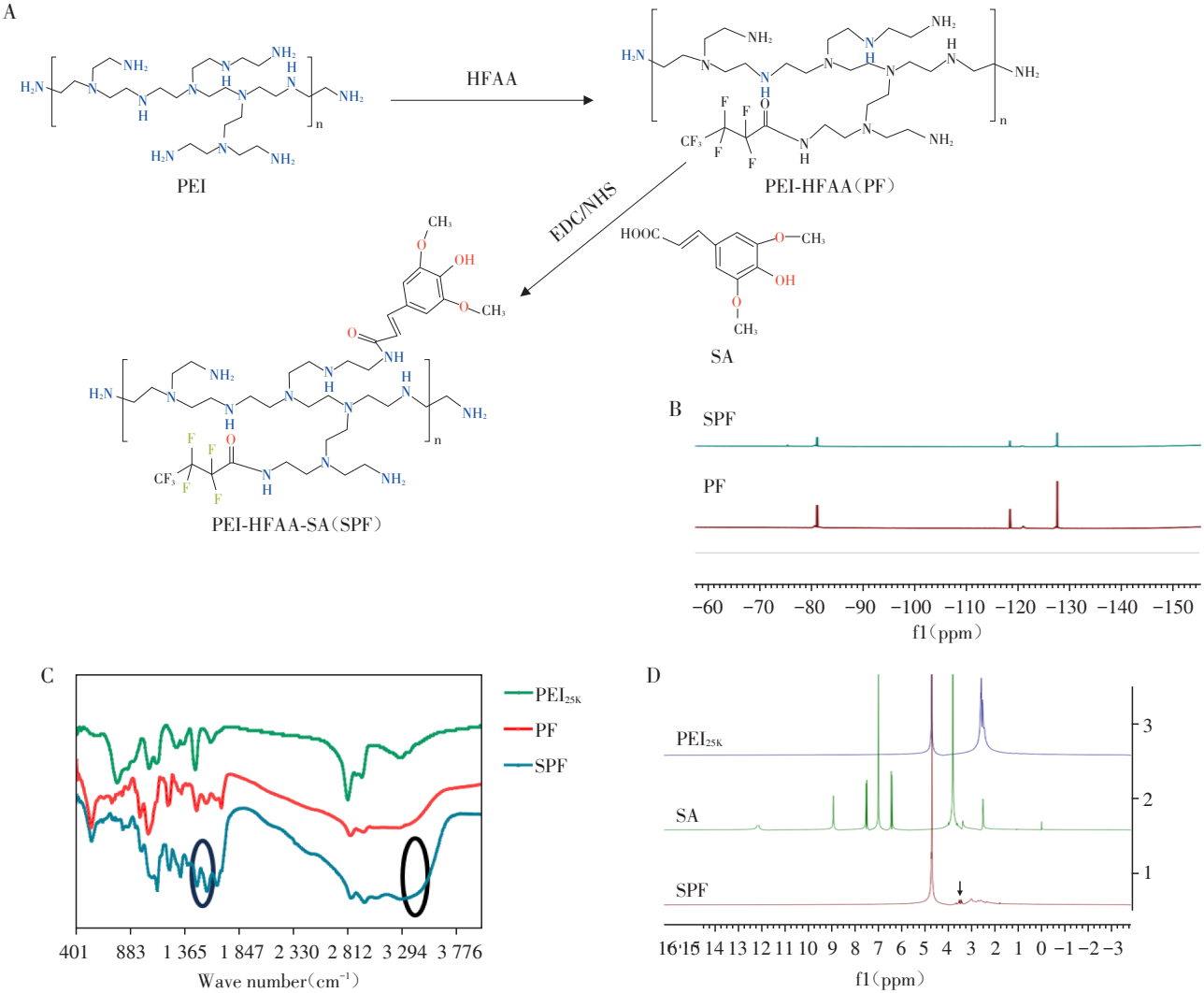
2.2 SPFT能够吸附质粒

氟化 PEI 所带的正电荷与质粒所带的负电荷通过静电吸附作用结合形成复合体,可以保护质粒避免降解。在 SA 修饰和 PS80 包裹后,SPFT 的结合能力仍需进一步检测。PEI_{25K} 和 SPFT 均与质粒(pHIV-Luciferase)在质量比为 0.2 时完全结合质粒(图2A)。由此可见,虽然 SA 的修饰以及 PS80 的包裹掩盖了部分 PEI_{25K} 上的氨基,但其质粒吸附能力未受影响,仍具有同等强大的质粒吸附能力,在低

质量比的条件下即可吸附结合质粒。

2.3 SPFT质粒复合体的粒径

适当大小的粒径意味着更容易穿越 BBB 进入细胞,转染效率更高。通过实验测定发现不同质量比下 SPFT 与质粒 pHIV-Luciferase 复合体的水合直径不同(图2B),为 100~200 nm。当载体与质粒的质量比 ≥ 4.0 时,复合体水合直径大幅降低,推测与 SPFT 质量增加有关。随着 SPFT 质量增加,复合体中氨基的数目也大幅度增加,SPFT 与质粒的结合也越发紧密。载体与质粒的质量比为 4.0 时,分散性指数(polymer dispersity index, PDI)较小,此时水合直径约 150 nm(图2B)。为了进一步探究复合体的质粒结合能力,选用分子量更大的 lentiCRISPR v2 质粒进行实验,结果显示,质量比为 4.0 时, lentiCRISPR v2



A: Synthesis process of SPF(PEI-HFAA-SA). B: The ¹⁹F NMR results of PF(PEI-HFAA) and SPF. C: FTIR spectra of PEI_{25K}, PF and SPF. The left circle corresponds to the characteristic peak of amide, while the right circle represents the characteristic peak of —OH. D: The ¹H NMR results of PEI_{25K}, SA and SPF. The arrow indicates the characteristic peak of SA.

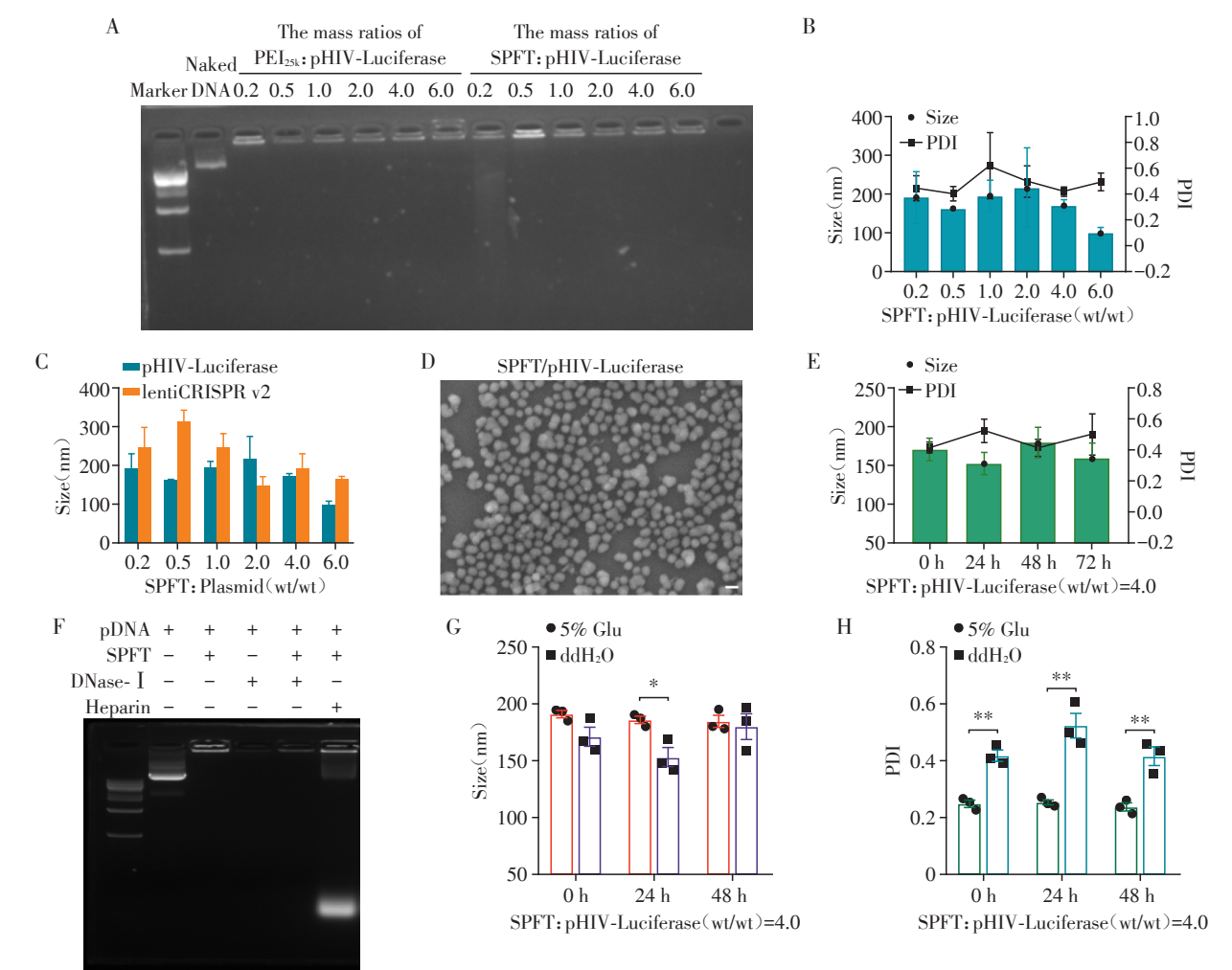
图1 SPF的合成及合成表征
Figure 1 Construction and characterization of SPF

组复合体的水合直径与 pHIV-Luciferase 组相比略有变大,但变化幅度在所有分组中变化最小(图2C)。综合考虑,选择了质量比为4.0进行后续实验。通过 SEM 观察 SPFT/pHIV-Luciferase 复合体的形貌和尺寸,SPFT/pHIV-Luciferase 复合体形貌规整且尺寸分布均一,粒径在 100 nm 左右(图2D)。

2.4 SPFT 质粒复合体具有良好的稳定性

稳定性分析是为了评估材料是否能够在长时间内稳定地包裹质粒,是载体表征中的一个重要指标。同时,水合直径是评估 SPFT 质粒复合体稳定性的关键指标之一。为了评估 SPFT 质粒复合体的稳定性,将其置于 4 ℃ 条件下,每 24 h(即在第 0、24、48、72 h)测定其水合直径。随着时间的推移,SPFT

载体质粒复合体的水合直径和分散系数的变化差异无统计学意义(图2E)。同时,使用肝素和 DNA 酶对其进行干扰,结果显示,SPFT 对质粒有保护作用,保持了其完整性(图2F)。考虑到小鼠体内实验需要用 5%Glu 进行溶液配制,在 5%Glu 的条件下评估载体质粒复合体的稳定性,5%Glu 溶液与水溶液相比,材料在 0 h 时的水合直径差异无统计学意义(图2G)。SPFT 质粒复合体在 5%Glu 中 48 h 内水合粒径无明显变化;但在水溶液中 SPFT 质粒复合体水合直径在 24 h 时略有降低,且在 48 h 时水合直径恢复。另一方面,5%Glu 溶液中 SPFT 质粒复合体的 PDI 显著降低(图2H)。综上所述,SPFT 质粒复合体表现出良好的稳定性。



A: Gel retardation experiments of naked DNA, PEI_{25k}/pHIV-Luciferase and SPFT/pHIV-Luciferase at various mass ratios. B: Dynamic light scattering (DLS) analysis of SPFT/pHIV-Luciferase with plasmids at various mass ratios. C: DLS analysis of SPFT with different plasmids at various mass ratios. D: SEM image of SPFT/pHIV-Luciferase (Scale bar=100 nm). E: Stability analysis of SPFT/pHIV-Luciferase plasmid complexes. F: Analysis of the ability of SPFT to protect the plasmid of pHIV-Luciferase. G: DLS analysis of SPFT/pHIV-Luciferase complexes in various solutions. H: PDI of SPFT/pHIV-Luciferase complexes in various solutions. Values were presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

图2 SPFT 质粒复合体的表征
Figure 2 Characterization of SPFT with plasmids

2.5 SPFT质粒复合体具有高效的体外细胞转染效率

HEK293FT细胞作为经典的细胞转染模型,常用于研究外源基因表达。使用载体搭载含增强型GFP基因的质粒pLL3.7对HEK293FT细胞进行转染实验。SPF和SPFT的转染效率远优于PEI_{25k},且SPFT与质粒的质量比为4.0时表现出最佳转染效果(图3A)。考虑到SPFT有更好的穿透BBB的能力以及潜在的毒性更低,认为SPFT是更优的基因载体材料。为了进一步评估SPFT作为基因载体的转染效果,在相同条件下、使用相同载体质粒质量比小鼠脑神经瘤细胞Neuro 2a进行转染实验。与PEI_{25k}/pLL3.7组相比,SPFT/pLL3.7在质量比为4.0的条件下对小鼠脑神经瘤细胞也表现出良好的转染效果(图3B)。

2.6 SPFT质粒复合体能够实现细胞内吞

了解纳米载体质粒复合体进入细胞的时间点有助于确定最合适的转染时机,从而优化该载体在基因

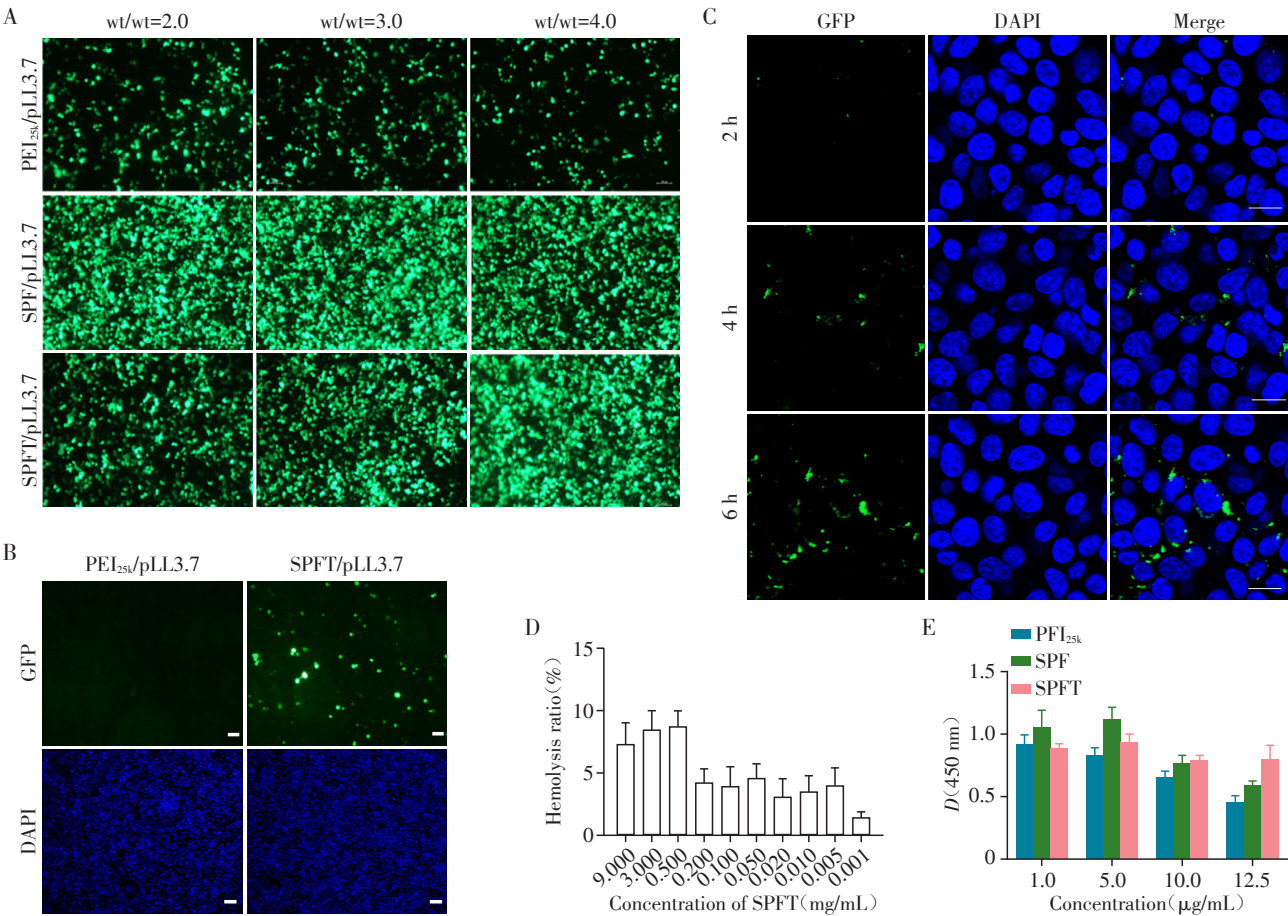
治疗中的应用。使用FITC标记SPFT,并用其搭载无荧光标记的质粒lentiCRISPR v2,分别在添加后2、4、6 h进行显微镜观察。SPFT在4 h可进入HEK293FT细胞内,其与质粒形成的复合体在细胞中的内吞具有时间依赖性,随着时间的延长,内吞量也增加(图3C)。

2.7 SPFT质粒复合体具有良好的生物相容性

根据国家标准GB/T16886-1,选用溶血实验评价材料的生物相容性,SPFT浓度≤0.200 mg/mL时溶血率<5%(图3D),符合生物材料的溶血实验要求^[19]。从细胞毒性上来看,CCK-8实验结果显示,无论SPF还是SPFT,其毒性都远低于PEI_{25k},当浓度≥10.0 μg/mL时,SPFT的细胞相容性明显高于SPF组(图3E)。

2.8 SPFT质粒复合体能够靶向小鼠脑内

为了进一步研究SPFT质粒复合体在生物体内的靶向效果,合成SPFT-Cy5.5并通过尾静脉注射的



A: Transfection capability of PEI_{25k}/pLL3.7, SPF/pLL3.7, and SPFT/pLL3.7 at various mass ratios in HEK293FT (Scale bar=80 μm). wt/wt: the weight of polymer/the weight of plasmid(pLL3.7). B: Transfection capability of PEI_{25k}/pLL3.7 and SPFT/pLL3.7 in Neuro 2a (Scale bar=80 μm). C: Cellular uptake of SPFT/lentiCRISPR v2 at 2 h, 4 h, and 6 h after the transfection in HEK293FT cells (Scale bar=20 μm). D: Analysis of hemolytic properties of SPFT at various mass concentrations. E: CCK-8 assay of PEI_{25k}, SPF, and SPFT at various mass concentrations. Values were presented as $\bar{x} \pm s_c$ (n=3).

图3 SPFT质粒复合体的细胞体外实验
Figure 3 Cellular in vitro assay of SPFT with plasmids

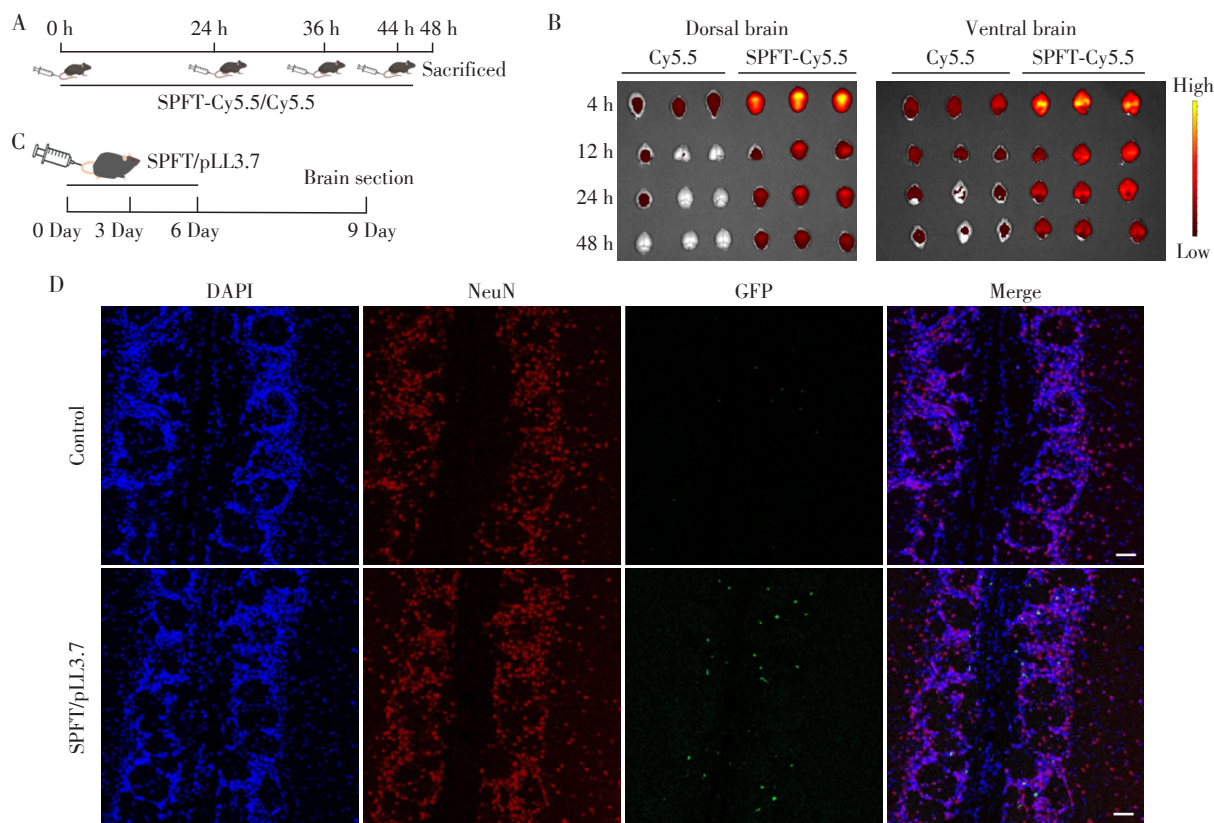
方式将其注射到小鼠体内,具体给药方案如图4A所示。结果显示,与游离的 Cy5.5 相比,SPFT 注射后 48 h 内在小鼠大脑中均有较好地富集,并且在注射后 4 h 时富集最多,随后随着时间的延长,富集逐渐减少。这表明 SA 修饰和 PS80 包裹增加了材料的靶向性和 BBB 的穿透能力(图 4B)。为了进一步研究 SPFT 在小鼠体内的靶向效果及基因递送效率,使用 SPFT 搭载含增强型 GFP 基因的质粒 pLL3.7,并通过尾静脉注射到小鼠体中,每 3 d 注射 1 次,共注射 3 次(图 4C)。在最后 1 次注射后的第 3 天,对小鼠大脑进行取材并进行冰冻切片,以观察 GFP 的富集情况。结果显示,与对照组相比,SPFT/pLL3.7 组小鼠嗅球处有微弱绿色荧光,具体位置为耳间 7.36 mm,前卤 3.56 mm,颗粒状岛叶皮质处(图 4D),这表明 SPFT 具有潜在的脑内靶向给药能力。

3 讨 论

随着社会老龄化的加快,脑部疾病的发生率越来越高,包括脑部肿瘤、帕金森病、阿尔茨海默病、

卒中等。由于 BBB 的存在,脑部给药受到了极大限制。现阶段,大脑给药系统包括侵入式和非侵入式技术^[20-21],侵入式技术指通过超声、手术等方法直接打开 BBB,使药物能够短暂进入大脑各区域。非侵入式技术主要利用内源性胞吞,如吸附介导^[22]和受体介导的载体胞吞作用^[23],使治疗药物通过 BBB 发挥作用。相比之下,非侵入式技术创伤较小,因此近年来成为克服 BBB 递送药物研究的热点^[24]。

本研究成功合成 PEI 衍生物 SPFT,并通过物理包裹的方式在其表面包裹 PS80,成功制备了 SPFT 纳米胶束。SPFT 纳米胶束具有携带和保护质粒的能力和好的转染能力,同时降低 PEI 原有的毒性,并增强了纳米胶束在小鼠脑部的精准递送能力。由于纳米胶束有良好的质粒携带能力,后续研究可以将其当作脑部疾病基因治疗的载体之一,为未来脑部疾病研究中的精准基因药物递送奠定了基础。本研究对该材料的生物安全性评估仍不充分,尽管细胞毒性和溶血实验表明氟化物和 SA 的修饰以及 PS80 的包裹使聚合物具有良好的生物相容性,



A: Schematic illustration of injection with SPFT-Cy5.5 *in vivo*. B: Fluorescent imaging of mouse brains with Cy5.5 and SPFT-Cy5.5 indicated the efficient delivery of SPFT into brain cells($n=3$). C: Schematic illustration of genome delivery mediated by SPFT/pLL3.7 *in vivo*. D: Fluorescence imaging of GFP after tailed vein injections *in vivo*(Scale bar=20 μm , $n=3$).

图4 SPFT在小鼠脑内的靶向分析

Figure 4 Analysis of SPFT targeting in mouse brain

为后续使用该材料搭载其他药物或者核酸进行大脑的靶向治疗提供了基础,但仍需系统性地评估其生物安全性。这包括对治疗小鼠的血常规和生化指标的分析以及主要器官的形态学观察等,从而全面了解纳米胶束的生物安全性。

本研究在小鼠体内检测 SPFT 搭载表达增强型 GFP 质粒的靶向效果和基因递送效率,发现通过尾静脉注射 3 d 后,在小鼠大脑嗅球处出现绿色荧光。因此认为 SPFT 能够跨越 BBB 并在小鼠嗅球处完成基因递送。然而,这些荧光没有与神经元有明显的共定位,原因可能是纳米材料被附近的免疫细胞吞噬后,在免疫细胞中发出绿色荧光。未来的研究将进一步改造 SPFT 材料,使其不但能跨越 BBB,还能够靶向神经元。

[参考文献]

- [1] LI J, ZHENG M, SHIMONI O, et al. Development of novel therapeutics targeting the blood-brain barrier: from barrier to carrier [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8 (16): e2101090
- [2] XIE J, SHEN Z, ANRAKU Y, et al. Nanomaterial-based blood-brain-barrier(BBB)crossing strategies[J]. *Biomaterials*, 2019, 224: 119491
- [3] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10284): 1577-1590
- [4] SPORNS P B, FULLERTON H J, LEE S, et al. Childhood stroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 12
- [5] BEHIN A, HOANG-XUAN K, CARPENTIER A F, et al. Primary brain tumours in adults [J]. *Lancet*, 2003, 361 (9354): 323-331
- [6] SHI L X, LIU X R, ZHOU L Y, et al. Nanocarriers for gene delivery to the cardiovascular system [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(24): 7709-7729
- [7] SUNG Y K, KIM S W. Recent advances in the development of gene delivery systems [J]. *Biomater Res*, 2019, 23: 8
- [8] WANG M, LIU H, LI L, et al. A fluorinated dendrimer achieves excellent gene transfection efficacy at extremely low nitrogen to phosphorus ratios[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3053
- [9] LV J, WANG H, RONG G, et al. Fluorination promotes the cytosolic delivery of genes, proteins, and peptides[J]. *Acc Chem Res*, 2022, 55(5): 722-733
- [10] XU J, LV J, ZHUANG Q, et al. A general strategy towards personalized nanovaccines based on fluoropolymers for post-surgical cancer immunotherapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(12): 1043-1052
- [11] WANG R, YANG S, XIAO P, et al. Fluorination and beta-ine modification augment the blood-brain barrier-crossing ability of cylindrical polymer brushes [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(19): e202201390
- [12] PANDI A, KALAPPAN V M. Pharmacological and therapeutic applications of Sinapic acid-an updated review[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(4): 3733-3745
- [13] WANG N, SUN P, LV M, et al. Mustard-inspired delivery shuttle for enhanced blood-brain barrier penetration and effective drug delivery in glioma therapy [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(5): 1041-1050
- [14] 金 铭. 聚山梨酯 80 修饰的神经毒素纳米粒鼻腔给药入脑实验研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2015
- [15] WEN L, JIAN H Q, XIANG L L, et al. BBB pathophysiology-independent delivery of siRNA in traumatic brain injury[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(1): eabd6889
- [16] WILSON B, SAMANTA M K, SANTHI K, et al. Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 2008, 1200: 159-168
- [17] 仇镇武. 含氟化合物核磁共振谱图集的研究与应用[D]. 广州: 广东工业大学, 2013
- [18] ZENZE M, SINGH M. Receptor targeting using copolymer-modified gold nanoparticles for pCMV-Luc gene delivery to liver cancer cells in vitro [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (9): 5016
- [19] 何秋星, 王学文. 磁性壳聚糖微球制备及生物相容性的研究[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(2): 221-225, 243
- [20] FERNANDES F, DIAS-TEIXEIRA M, DELERUE-MATOS C, et al. Critical review of lipid-based nanoparticles as carriers of neuroprotective drugs and extracts [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, 11(3): 563
- [21] JACKSON S, MEEKS C, VÉZINA A, et al. Model systems for studying the blood-brain barrier: Applications and challenges[J]. *Biomaterials*, 2019, 214: 119217
- [22] 范媛媛. 基于血脑屏障器官芯片探究纳米药物载体与血脑屏障的相互作用[D]. 济南: 山东师范大学, 2023
- [23] TERSTAPPEN G C, MEYER A H, BELL R D, et al. Strategies for delivering therapeutics across the blood-brain barrier[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(5): 362-383
- [24] 张欣蕊. 毛兰素及其转铁蛋白脂质体抗肝癌活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021

[收稿日期] 2024-04-24

(本文编辑: 陈汐敏)