

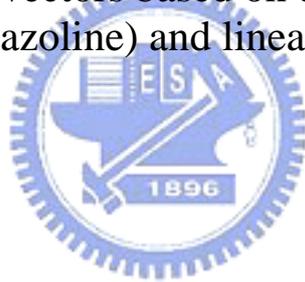
國立交通大學

應用化學系

碩士論文

聚噁唑啉/線性聚乙烯亞胺雙團聯共聚物製  
備奈米基因載體之研究

Novel gene delivery vectors based on diblock copolymers of  
poly(2-ethyl-2-oxazoline) and linear polyethylenimine



學生：姜厚任

指導教授：莊祚敏 博士

共同指導教授：薛敬和 博士

中華民國 九十四 年 七 月

## 摘要

本研究是以具酸鹼應答性及親水性之雙團聯共聚物 poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(2-ethyl-2-oxazoline-co-ethylenimine)(PEOz-b-P(EOz-co-EI)) 作為基因載體。此雙團聯共聚物之 P(EOz-co-EI) 鏈段為陽離子高分子，可與 DNA 經靜電作用結合成聚複合體(polyplex)；PEOz 則提供酸鹼應答性及親水性，一方面藉由細胞內酸鹼值的變化，使聚複合體解離進而釋放 DNA 至細胞中，另一方面提高聚複合體的穩定性。在分子之合成上首先以開環聚合得到末端帶有硫醇(sulfhydryl)之 PEOz，再將 PEOz 水解後得到 P(EOz-co-EI)，經由末端官能基之間形成雙硫鍵(disulfide) 使此二高分子結合為雙團聯共聚物。同時利用不同分子量及水解比例之 P(EOz-co-EI) 來探討雙團聯共聚物中 P(EOz-co-EI) 鏈段對雙團聯共聚物所造成的影響。並和未導入 PEOz 之 P(EOz-co-EI) 與分枝聚乙炔亞胺 (branched polyethylenimine, B-PEI) 作一比較。

實驗結果顯示 B-PEI 的高分子/基因重量比例 (P/D) 在 1 倍以上能將 DNA 完全包覆，P(EOz-co-EI) 則需 6 倍以上，而雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 在 P/D 比為 8 倍以上時能達到包覆效果。此外若 P(EOz-co-EI) 之水解比例由 76% 提高為 89% 則 P(EOz-co-EI) 或雙團聯共聚物包覆 DNA 所需要的 P/D 比可減少 2 倍。由粒徑分析得知雙團聯共聚物所製備的聚複合體大小約為 200 nm，且不論是在純水或 0.15M NaCl 水溶液中皆沒有凝集的現象，反之 B-PEI 與 P(EOz-co-EI) 聚複合體在 0.15M NaCl 的環境下會凝集成大顆粒。從界面電位的分析中，得到 B-PEI 與 P(EOz-co-EI) 聚複合體之表面電荷會因 P/D 比的增加而從陰離子轉變為陽離子，然而

PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體在達到特定 P/D 比之後即維持電中性。將 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體分別置於 pH 4.5 到 pH 7 的緩衝溶液中測試其對酸鹼的應答性，經由電泳分析後得知 P(EOz-co-EI) 鏈段分子量為 5000 或 5700 之聚複合體在 pH 5.5 以下的酸性環境中會解離並釋放 DNA，若 P(EOz-co-EI) 鏈段之分子量增加為 8600 或 9700，則在 pH 5.5 時聚複合體不會解離。

由細胞毒性的試驗中得知在高分子濃度為 10 mg/ml 時，B-PEI 與 P(EOz-co-EI) 之細胞存活率分別為 7% 和 30%，雙團聯共聚物則有 60% 的存活率，此外高分子中 P(EOz-co-EI) 鏈段之水解比例由 76% 提高為 89% 或分子量由 5700 增加為 9700，皆會降低約 10~20% 的細胞存活率。在細胞轉染上 B-PEI 及水解比例為 88% 或 89% 的 P(EOz-co-EI) 聚複合體皆能使細胞表現螢光基因，其發光強度約在 6000~8000，於酸鹼應答性試驗中能在 pH 5.5 下解離的 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體有約 3000~6000 的發光強度，而相對應之 P(EOz-co-EI) 聚複合體也約在 3000~6000，反之不會解離的聚複合體之發光強度約為 2000~4000，但相對應之 P(EOz-co-EI) 則有 3000~7000 的發光強度。

綜合以上的實驗結果，雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 相較於 P(EOz-co-EI)，不僅細胞毒性更低，所形成的聚複合體較為穩定，且在具酸鹼應答的特性下能保有與 P(EOz-co-EI) 相當的細胞轉染能力，因此本研究所合成之雙團聯共聚物為優良的陽離子高分子基因載體，故具有應用在基因治療的潛力。

## Abstract

In this study, non-viral vectors based on pH-responsive and hydrophilic diblock copolymers poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(2-ethyl-2-oxazoline-co-ethylenimine) (PEOz-b-P(EOz-co-EI)) had been synthesized. P(EOz-co-EI) was a cationic polymer, it could form complexes called “polyplexes” after mixing with DNA; PEOz was a pH-responsive and hydrophilic polymer which not only made the polyplexes more stable, but also facilitated the DNA releasing from the polyplexes under the pH value variations in cells. The PEOz and the P(EOz-co-EI) with varying molecular weight and percentage hydrolysis was obtained by cationic ring-opening polymerization and hydrolysis of the PEOz, respectively. Diblock copolymers were prepared via coupling the two kinds of polymers with disulfide bond. Furthermore, The characteristics of the diblock copolymers and their polyplexes also compared with those of P(EOz-co-EI) or commercially available branched polyethylenimine (B-PEI).

From the result of gel retardation assay, the diblock copolymer could completely condense plasmid DNA at a polymer/DNA weight ratio (P/D) of above 8, whereas P/D ratios of above 2 and 6 were required to B-PEI and P(EOz-co-EI) for DNA condensation, respectively. By increasing the percentage hydrolysis of P(EOz-co-EI), the P/D ratios of the diblock copolymer and P(EOz-co-EI) needed to ensnare DNA were both decreased. After analyzing particle sizes and zeta potentials, polyplexes formed by the diblock copolymers had diameter around 200 nm. With raising the P/D ratios, the polyplexes from negatively charged would convert into neutral particles, and they were stable both in pure water and

physiological condition such as 0.15M NaCl solution. However, the polyplexes made with B-PEI or P(EOz-co-EI) and plasmid DNA could possess positive charge on their surface at high P/D ratio, but they also showed aggregation under 0.15M NaCl solution. To investigate whether the polyplexes of the diblock copolymers could response to pH variation, they were incubated in various buffer solutions and then analyzed using gel retardation assay. The result indicated that those polyplexes would dissociate when the pH value of buffer solution below 5.5, however, the extent of dissociation depends on the percentage hydrolysis and molecular weight of P(EOz-co-EI) segment.

The in vitro experiments were shown that the toxicity of diblock copolymer is relatively lower than B-PEI and P(EOz-co-EI), but when the percentage hydrolysis or molecular weight of P(EOz-co-EI) segment increased, it would reduce the viability of the cells. The transfection efficiency of B-PEI was the highest, and P(EOz-co-EI) with high percentage hydrolysis also showed high transfection efficiency. Diblock copolymers which could dissociate under acidic condition with transfection levels as high as the corresponding P(EOz-co-EI), but the other diblock copolymers mediated less efficient transfection.

In conclusion, the diblock copolymers were not only less toxic, but the polyplexes formed were also more stable compared to P(EOz-co-EI). Besides, they could dissociated under acidic environment to facilitate DNA releasing. Thus, the transfection efficiency was enhanced to a level as high as P(EOz-co-EI). Therefore, the diblock copolymer was a better candidate for gene delivery than other cationic polymers often used.

## 誌謝

承蒙指導教授薛敬和老師及莊祚敏老師無論是在實驗上遭遇的各種問題或是實驗方式的規劃，皆提供了精闢的解答與建議，使本論文得以順利完成。而在學業或研究上悉心的指導、思考能力的訓練與待人處世上的教誨，讓我獲益匪淺、受用不盡，僅致上最深的謝意。

由衷感謝朱一民老師與劉英麟老師等口試委員在論文上的細心指正，並給予諸多寶貴的建議與想法，使本研究能更為完整。此外也感謝清大生科楊嘉鈴教授實驗室林樹熙學長在蟲螢光試劑的配製與螢光判讀儀使用上所提供的協助，使實驗得以順利進行。

感謝劉席瑋學長在我剛進實驗室時所給予的指導與鼓勵，使我獲益良多。此外特別感謝王朝輝學長對於本研究的啟蒙和教導，以及駱俊良學長在實驗上提供的幫助，讓我能克服許多的困難，在此我由衷的感謝。感謝朱立文、賴瑞陽、蔡協致、林哲平與張博荀學長在各方面所給予的協助，以及王竣鴻、林克閩、游一成及鄭經豪等同學彼此的相互關懷和激勵。感謝黃俊凱、林聖傑、余大全及施慶芳等學弟妹為研究生生活所平添的樂趣。

最後我要感謝父母的全力支持，在遭受挫折時能給予我鼓勵與勇氣，讓我能順利完成學業。再次感謝這兩年求學過程中所認識的師長、前輩及實驗室的大夥們，祝各位能擁有美好的未來。

# 目 錄

## 聚噁唑啉/線性聚乙烯亞胺雙團聯共聚物製備奈米基因載體 之研究

一、緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機與目的.....	3
二、文獻回顧.....	5
2-1 病毒載體.....	5
2-1-1 反轉錄病毒.....	5
2-1-2 腺病毒.....	7
2-1-3 腺相關病毒.....	7
2-2 非病毒載體.....	9
2-2-1 非病毒載體的轉染過程.....	9
2-2-2 微脂粒.....	11
2-2-3 陽離子高分子.....	14
2-3 聚乙烯亞胺.....	17
2-3-1 分枝聚乙烯亞胺.....	18
2-3-2 線性聚乙烯亞胺.....	20
2-4 共聚合高分子.....	21
2-4-1 聚乙二醇共聚合高分子.....	21
三、實驗方法.....	24
3-1 實驗藥品與儀器.....	25
3-1-1 實驗藥品.....	25
3-1-2 實驗儀器.....	26

3-2 高分子合成.....	28
3-2-1 藥品純化.....	28
3-2-2 名詞縮寫.....	28
3-2-3 親水性高分子 Poly(2-ethyl-2-oxazoline)之合成.....	28
3-2-4 P(EOz-co-EI)之合成.....	29
3-2-5 PEOz-b-P(EOz-co-EI)雙團聯共聚物之合成.....	30
3-3 高分子結構鑑定與分析.....	33
3-3-1 <sup>1</sup> H-NMR 分析.....	33
3-3-2 元素分析.....	33
3-3-3 UV 光譜分析.....	33
3-3-4 GPC 分析.....	33
3-4 聚複合體之基本性質.....	34
3-4-1 菌株培養與 DNA 純化及聚複合體製備.....	34
3-4-2 膠體電泳.....	34
3-4-3 粒徑與界面電位.....	35
3-4-4 酸鹼應答.....	35
3-5 高分子與聚複合體之生物性質.....	36
3-5-1 高分子之細胞毒性.....	36
3-5-2 聚複合體細胞轉染.....	36
四、結果與討論.....	38
4-1 合成 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 雙團聯共聚物.....	38
4-1-1 <sup>1</sup> H-NMR 結構鑑定.....	40
4-1-2 元素分析結果.....	44
4-1-3 UV 光譜分析結果.....	45
4-1-4 GPC 分子量鑑定.....	46

4-2 基本性質分析.....	49
4-2-1 質體 DNA 複製與萃取.....	49
4-2-2 聚複合體膠體電泳分析.....	50
4-2-3 聚複合體粒徑與界面電位分析.....	55
4-2-4 聚複合體酸鹼應答性分析.....	62
4-3 生物性質分析.....	64
4-3-1 高分子細胞毒性分析結果.....	64
4-3-2 聚複合體轉染效率分析.....	68
五、結論.....	76
六、參考文獻.....	78



## 圖目錄

圖 1-1. 雙團聯共聚物與 DNA 形成聚複合體之示意圖.....	4
圖 2-1. 反轉錄病毒載體感染細胞途徑.....	6
圖 2-2. 非病毒載體遞送基因的過程.....	10
圖 2-3. 各種脂質分子結構.....	13
圖 2-4. 各種陽離子高分子結構.....	14
圖 2-5. Chitosan 的化學結構.....	16
圖 2-6. 聚乙烯亞胺的各種形式與其所屬單體.....	17
圖 2-7. 分枝聚乙烯亞胺的聚合機構.....	18
圖 2-8. poly(2-ethyl-2-oxazoline)加酸水解為線性聚乙烯亞胺.....	20
圖 2-9. 核殼結構示意圖.....	22
圖 3-1. PEOz-SAc 之合成流程圖.....	31
圖 3-2. PEOz-Py 之合成流程圖.....	31
圖 3-3. P(EOz-co-EI)之合成流程圖.....	32
圖 3-4. PEOz-b-P(EOz-co-EI)之合成流程圖.....	32
圖 4-1. PEOz-SAc 寡聚合物之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	42
圖 4-2. PEOz-Py 寡聚合物之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	42
圖 4-3. p(EOz-co-EI)寡聚合物之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	43
圖 4-4. 高分子 P(EOz-co-EI)之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	43
圖 4-5. 雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI)之 <sup>1</sup> H-NMR 光譜圖.....	44
圖 4-6. PEOz-Sac 與 PEOz-Py 在甲醇溶液下之 UV 吸收光譜 (溶液濃度為 1 mM).....	45
圖 4-7. P(EOz-co-EI)與雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI)在甲醇溶液下之 UV 吸收光譜 (溶液濃度為 0.5 mM).....	46

圖 4-8. LI-76 與 4kI-76 之凝膠滲透層析圖.....	48
圖 4-9. 蟲螢光酶編碼質體 (luciferase encoding plasmid) pUHC-13-3 之圖譜.....	49
圖 4-10. B-PEI 及 P(EOz-co-EI) 聚複合體之膠體電泳分析 (圖中第一排 數字代表 P/D 比).....	52
圖 4-11. 質體 DNA 的結構 (a) 鬆弛 (relaxed) (b) 超螺旋 (supercoiled).....	53
圖 4-12. PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體之膠體電泳分析 (圖中第一排 數字代表 P/D 比).....	54
圖 4-13. B-PEI 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	56
圖 4-14. LI-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	57
圖 4-15. LI-89 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	57
圖 4-16. LII-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	58
圖 4-17. LII-88 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	58
圖 4-18. 4kI-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	60
圖 4-19. 4kI-89 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	60
圖 4-20. 4kII-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	61
圖 4-21. 4kII-88 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位.....	61
圖 4-22. LI-76 與 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體在各種 pH 值之酸鹼應 答分析圖 (圖中第一排數字代表 pH 值).....	63
圖 4-23. 活細胞中 MTT 的代謝反應.....	64
圖 4-24. B-PEI 與 P(EOz-co-EI) 在不同濃度下之 HeLa 細胞存活率 (n = 6).....	66
圖 4-25. LI-76 與 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 在不同濃度下之 HeLa 細胞存活 率 (n = 6).....	67
圖 4-26. 螢火蟲螢光酵素與螢光素之發光反應.....	68

圖 4-27. BSA 蛋白質濃度檢量線.....70

圖 4-28. B-PEI 聚複合體之轉染效率及蛋白質產量 (n = 3).....72

圖 4-29. P(EOz-co-EI) 聚複合體之轉染效率及蛋白質產量 (n = 3)...73

圖 4-30. PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體之轉染效率及蛋白質產量 (n = 3).....74

圖 4-31. DNA、P(EOz-co-EI) 及 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體最佳轉染效率與蛋白質產量之比較 (n = 3).....75



## 表目錄

表 3-1. PEOz 之合成條件.....	29
表 3-2. P(EOz-co-EI)之合成條件.....	30
表 4-1. 各高分子之元素分析結果與理論值之比較.....	44
表 4-2. PEOz 之數量平均分子量及分子量分佈.....	47
表 4-3. P(EOz-co-EI)之水解率及分子量.....	47
表 4-4. PEOz-b-P(EOz-co-EI)之組成與分子量.....	47
表 4-5. 各種高分子包覆 DNA 所需要的最少 P/D 比例.....	59



# 一、緒論

## 1-1. 前言

近代醫學發展讓人類對於疾病有深入的了解，並促進新藥的開發，造福無以數計的病患。然而在眾多已知的疾病中，諸如血友病、唐氏症、地中海型貧血等遺傳性疾病，目前並無藥物可根治。但隨人類在分子生物學上的進展及對遺傳物質的了解日深，促使以基因作為藥物的構想被提出，並用來對付遺傳性疾病或因後天性基因異常所導致的疾病，為傳統療法無法醫治之疾病帶來希望，使得基因治療成為深具潛力的新興醫學領域。

基因治療指的是將DNA或RNA送入基因異常細胞之細胞核中，取代或修補不正常之基因，乃至於提供新的功能性基因，使細胞能自行合成蛋白質或胜肽，以回復細胞正常生理功能而達到治療甚至預防疾病的目的<sup>1</sup>。早期認為單獨的核酸無法直接進入細胞中，會因在體內遭遇到血清中或細胞內的酵素分解，以及本身結構之負電性磷酸根與同樣帶負電之細胞膜互相排斥。近年Budker等人發現質體DNA(plasmid DNA)經由靜脈注射亦會有基因表現，卻容易累積在特定器官中，無法送往標的部位<sup>2</sup>。因此治療性基因要進入目標細胞核，需一有效的遞送系統或基因之載體 (vector)，載體的特性將影響到最終基因表現效果，是以載體之利用是基因治療中最重要的一環，因而有學者稱之為基因治療的阿奇里斯腱 (Achilles heel)<sup>3</sup>。

目前被廣為研究的基因載體主要分為病毒性(viral vector)與非病毒性(non-viral vector)兩類。病毒載體是將病毒的致病基因剔除後，再把功能性基因置入病毒顆粒中，利用病毒本身具有之感染力把基因送入標的細胞內來達到治療的目的。1990年9月美國國家衛生院的

Anderson與Blaese等人將正常的ADA(adenosine deaminase)基因殖入病患的淋巴細胞中，使其免疫系統恢復正常，被視為成功的基因治療首例<sup>4</sup>。病毒載體雖有較高的基因轉殖(transduce)效果，但卻容易引起身體的免疫反應，另在病毒基因插入感染細胞的基因中時，可能造成插入性突變，導致癌症產生之安全性問題。於1999年的實驗中，一名十八歲患有鳥胺酸氨甲基移轉酵素缺乏症(ornithine transcarbamylase)的男孩，以帶有正常基因之腺病毒進行治療，在4天後死亡，此事件使病毒載體於安全性上之顧慮限制了其運用價值。

一般用於基因轉染(transfection)的非病毒性方法有以下數種：(1)磷酸鈣共沉澱(calcium phosphate)；(2)顯微注射(microinjection)；(3)基因槍(gene gun)；(4)超音波(ultrasound)；(5)電穿孔(electroporation)；(6)微脂粒(liposome)；(7)陽離子高分子(cationic polymer)等。第一項技術利用磷酸鈣在細胞膜外創造一化學環境，使DNA能附著於細胞表面進而被吞噬進細胞內；顯微注射及基因槍是分別將基因及包覆基因的金微粒注射入細胞核或細胞中；超音波與電流可增加細胞膜的通透性，增加DNA進入細胞內進行表現的機會；陽離子高分子則透過和DNA之間產生靜電作用力包覆DNA，不會受到核酸分解酶的破壞，因此能在體內輸送至標的細胞中。目前非病毒載體以微脂粒與陽離子高分子載體的研究為主流，由於此類載體結構可改變，又適用於體內(in vivo)基因治療，為極具潛力的基因輸送系統。

## 1-2. 研究動機與目的

陽離子高分子為一種聚胺類，具有相當高的電荷密度，與DNA所形成之聚複合體比和微脂粒及DNA形成之脂複合體有較緊密的結構甚至較小的體積。在陽離子高分子中，分枝聚乙烯亞胺(branched polyethylenimine, B-PEI)為極具研究價值的聚合物型基因載體，有文獻指出分枝聚乙烯亞胺比陽離子微脂粒有更好的基因遞送能力<sup>5</sup>。分枝聚乙烯亞胺結構上包含有一級胺、二級胺與三級胺，氮原子的密度較其他聚合物高，因此能有效的包覆DNA，同時具有相當高的轉染效率。

除了B-PEI之外，線性聚乙烯亞胺(linear polyethylenimine, L-PEI)也同樣有相當高的基因傳輸效果，但其細胞毒性則比B-PEI低<sup>6</sup>。基於線性聚乙烯亞胺在基因載體上的應用潛力，本研究將聚噁唑啉 poly(2-ethyl-2-oxazoline) 與其水解產物—線性聚乙烯亞胺 (poly(2-ethyl-2-oxazoline-co-ethylenimine), P(EOz-co-EI))經由共價鍵結為雙團聯共聚物PEOz-b-P(EOz-co-EI)作為基因載體。PEI本身具水溶性，但與DNA結合為聚複合體(polyplex)後會變為疏水，容易產生凝集(aggregation)，因此利用親水性高分子PEOz來增加聚複合體的水溶性，延長在體內的循環時間。

PEOz除了具親水性外，尚有良好的生物相容性。此外PEOz有酸鹼應答的特性，可用於藥物制放的設計上，作為智慧型藥物載體，針對細胞內酸鹼值的變化來達到藥物標的(targeting)效果<sup>7</sup>。另外文獻指出，基因載體遞送基因至細胞內後，所包覆的核酸釋出與否是基因轉染過程中重要的關鍵<sup>8</sup>。因此本研究希望藉由PEOz的酸鹼應答效應，能有助於聚複合體在細胞中釋放DNA，進而增加轉染效率。

將DNA與雙團聯共聚物混合後，帶正電的P(EOz-co-EI)鏈段經

由靜電作用與帶負電的 DNA 結合在一起，並因電性中和後疏水性提高而聚集為核心，親水性的 PEOz 則圍繞在其外，構成所謂的核殼結構(core-shell structure)如圖 1-1 所示。

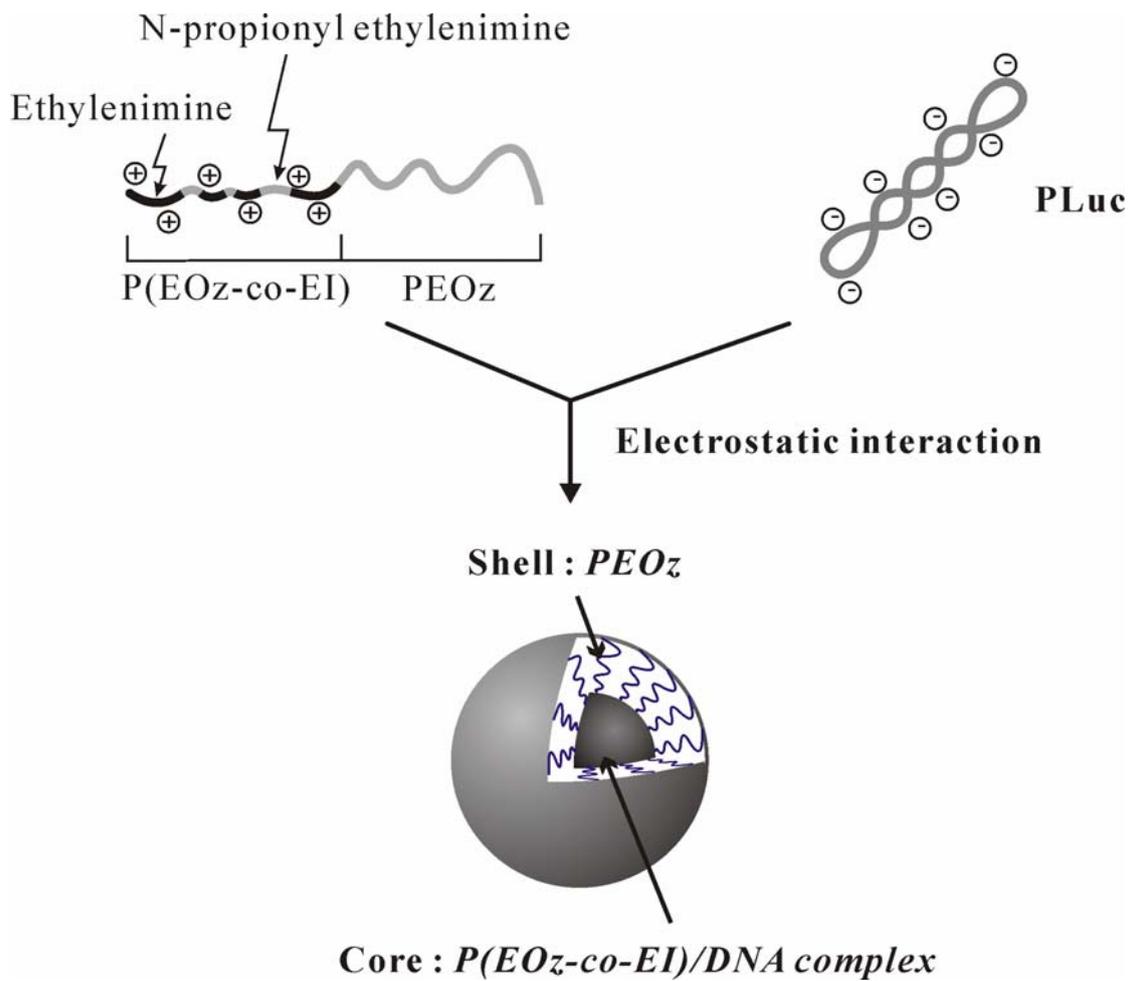


圖 1-1. 雙團聯共聚物與 DNA 形成聚複合體之示意圖

## 二、文獻回顧

### 2-1. 病毒載體

病毒是在漫長自然演化過程中存活下來沒有細胞結構的最小、最簡單之生命寄生形式。它們通常可以高效率地進入特定類型的細胞，表達自身蛋白並產生新的病毒顆粒。1960-1970 年間，由於對一些產生變性的病毒有了進一步的了解，科學家開始嘗試將病毒作為載體，將外來基因送入一個特定的細胞內，因此，病毒是首先被改造的基因治療載體。科學家刪除病毒中與致癌、致毒和複製相關的基因片段，再加上外源基因，成為具治療效果的病毒載體。此經過遺傳修飾的病毒可將外源治療基因帶入人體細胞，而不會使人致病。病毒由於是以感染宿主的方式生存，因此一般皆有相當高的感染力，基因表現能力也較強，使各種病毒載體諸如腺病毒(adenovirus)、腺相關病毒(adeno-associated virus)及反轉錄病毒(retrovirus)被廣泛地研究。然而病毒載體要實際用於基因治療之前，仍存在著許多的困難待解決，如可能重組成新病毒；引發宿主的發炎及免疫反應；導致癌症的產生；所能攜帶的基因容量有限制，以及不易大量生產等。

#### 2-1-1. 反轉錄病毒

反轉錄病毒為一帶有套膜(envelope)的小型RNA病毒，其含有兩條單股RNA基因體，基因體上有三個與病毒複製、包裝有關的基因(gag、pol、env)，末端為長重複序列(long terminal repeat, LTR)，LTR可控制病毒基因體嵌入宿主染色體中，也具有表現病毒基因所需要的啟動子(promoter)、加強子(enhancer)序列。反轉錄病毒感染的方式是利用病毒套膜上的糖蛋白與細胞膜上的受體結合進入細胞內(圖

2-1)<sup>9</sup>，使其能將所含的RNA釋出並進入細胞內，經由反轉錄酶的作用轉錄成雙股DNA，此雙股DNA會與核蛋白(nucleoprotein)結合形成嵌入前複合體(preintegration complex, PIC)，隨後此複合體會進入細胞核內，將DNA隨機嵌入宿主染色體中，產生穩定且持續性的表現。

反轉錄病毒載體是將上述之三種基因移除，取代以外來DNA，因所移除基因與複製有關，故病毒在進入宿主細胞後，已不能製造新病毒。反轉錄病毒雖能將基因嵌入宿主染色體中，但其只有在細胞進行有絲分裂，核膜分解時才能進入細胞核中，因此感染對象限於能分裂的細胞，使其無法用於神經細胞及心肌細胞的基因治療。由於病毒基因是隨機嵌入，有可能會阻隔或打斷正常基因序列，引發突變導致細胞癌化或產生有複製能力的野生型病毒(replication competent virus, RCV)。此外反轉錄病毒在活體內非常脆弱，會被活化之補體系統去活化。雖然有約 60%已核准的臨床實驗使用反轉錄病毒，但在成為一良好的基因載體之前，必須克服以上種種的不利因素<sup>10</sup>。

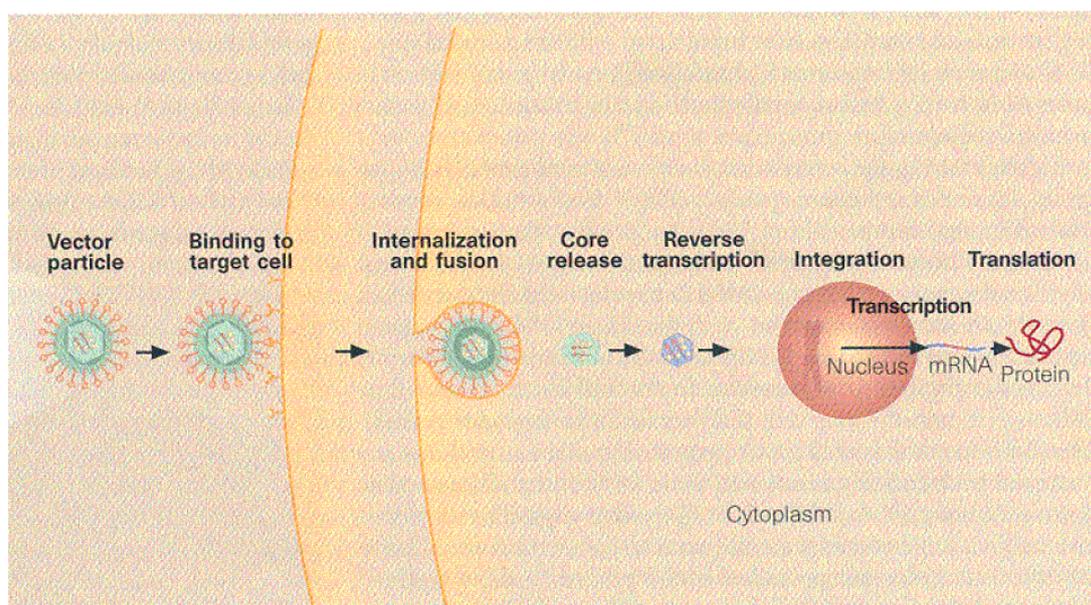


圖 2-1. 反轉錄病毒載體感染細胞途徑<sup>9</sup>

## 2-1-2. 腺病毒

腺病毒為一種不具套膜之DNA病毒，其內含長度約為 36Kb之線性雙股DNA，由一個二十面體的capsid所包覆<sup>11</sup>。目前已知有 40 多種血清型(serotype)的人類腺病毒，主要會造成人類呼吸道的感染。腺病毒載體常用於原位(in situ)及體內的基因遞送，以治療癌症或纖維囊腫(cystic fibrosis)，而為了使病毒載體在細胞內無法複製產生新的腺病毒，會剔除腺病毒基因體內與複製相關的E1 基因，同時移除與抑制宿主免疫反應相關但非必要的E3 基因，增加容納外來基因的空間。由於腺病毒本身結構大，能夠攜帶較大的外來DNA，此外，其感染的細胞不僅限於分裂與否，皆具有極高的感染效率，宿主範圍相當廣泛，因此可應用在許多不同的細胞上。

腺病毒無法如反轉錄病毒將基因嵌入染色體中，而是以episome的形式存在染色體外，因無法進行複製，在經過細胞不斷分裂後，病毒DNA可能因而消失，無法再表現，所以腺病毒載體僅有短暫性的基因轉殖效果。腺病毒載體的另一嚴重缺點為病毒的蛋白與外殼會引起強烈的發炎和免疫反應<sup>12</sup>，使被腺病毒載體感染的細胞在短期內就被消滅掉，進而降低基因表現的效果。然而人類與自然存在的腺病毒接觸以久，大多都已具有抗體，使腺病毒難以成為理想的基因載體。

## 2-1-3. 腺相關病毒

腺相關病毒是一小型無套膜的單股DNA病毒，為一種巴爾伐病毒(parvovirus)，雖名為腺相關病毒，但和腺病毒並不同，對人類並不具致病能力<sup>13</sup>。腺相關病毒基因體的兩端為反轉錄終端重複序列(inverted terminal repeats, ITRs)，是病毒用以複製的重要序列，因此必

須保留在病毒載體內，而基因體中間部分有cap及rep兩種基因，可被外來基因所取代。腺相關病毒一般需有其他病毒(如腺病毒或單純皰疹病毒(herpes simplex viral))共同存在下，才能自行複製基因體，若在缺少其他病毒的存在下，腺相關病毒便會將本身的基因體嵌入宿主細胞的染色體中<sup>14</sup>。野生型(wild type)的腺相關病毒在感染宿主細胞後，藉由DNA兩端的序列與其基因產物，可將自身的DNA嵌入人體第十九對染色體上，而隨著宿主的DNA一起複製、增殖及表現，直到宿主細胞被另一類病毒感染時才停止。

腺相關病毒除不具致病性外，不論細胞是否處於分裂的狀態下，皆可利用它來感染標的細胞，因此宿主範圍相當廣泛。加上不會如腺病毒引發宿主強烈的免疫反應，為目前最有發展潛力的病毒載體。然而因生產腺相關病毒載體需耗費大量人力，所能攜帶的外來基因大小又受到限制，如 AAV 的基因體外加 DNA 長度最多僅有 4.5kb，因而降低了其在基因治療上的價值。



## 2-2. 非病毒載體

雖病毒載體有優異的基因轉殖能力，但基於各種病毒自身的安全及免疫問題，利用非病毒載體作為基因治療的工具具有其必要性，因而目前已發展出許多獨特的非病毒載體系統，其中以微脂粒與陽離子高分子這兩種載體的研究最廣泛。在非病毒載體的研究中，所使用的核酸通常是以質體DNA(plasmid DNA)為主，其上有一段報導基因(reporter gene)，報導基因經轉錄及轉譯後所產生的蛋白質可透過簡易的方式量測，因此可作為評估轉染效率的依據。微脂粒包覆DNA所形成之複合物稱脂複合體(lipoplex)，陽離子高分子與DNA之複合物則稱為聚複合體(polyplex)<sup>15</sup>。非病毒載體雖不如病毒的轉殖效率高，但具有低毒性、低成本、穩定性佳、使用簡單、可大量製備、不會引起免疫反應等諸多優勢，而透過利用病毒遞送基因的機制，改良非病毒載體的結構以增加其轉染效果亦是可行的，因此在基因治療的應用上具有無限的潛力。

### 2-2-1. 非病毒載體的轉染過程

非病毒載體要將基因自細胞外送至細胞核中進而表現出蛋白質，牽涉到許多複雜的程序，包括：

1. 與細胞表面接觸
2. 內吞作用(internalization)
3. 進入核內體(endosome)
4. 自核內體脫離
5. 與載體分離
6. 進入細胞核

如圖 2-2 所示<sup>16</sup>，當脂複合體或聚複合體經由擴散作用至細胞外，通常會與細胞表面的物質作用，以進入細胞內。細胞膜上有許多的膜蛋白(membrane proteins)，包括醣蛋白(glycolproteins)和蛋白多醣(proteoglycans)，這些帶負電的蛋白質可調控物質的進出。因此若複合體帶有正電，與細胞膜接觸時會和這些蛋白質產生靜電作用，有利於複合體進入細胞中。

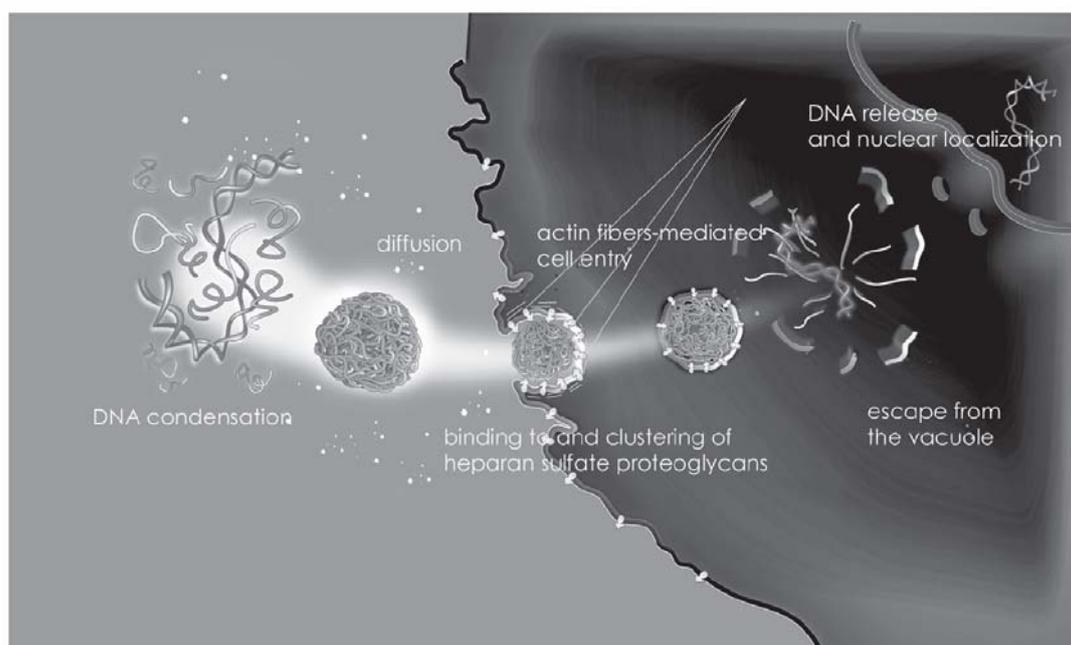


圖 2-2. 非病毒載體傳輸基因的過程<sup>16</sup>

複合體與細胞膜接觸後，會經內吞作用進入細胞，依不同的表面性質，其作用的方式有液相胞飲(fluid phase endocytosis)及吸附胞飲(adsorption endocytosis)。一般物質可透過液相胞飲進入細胞，因此不論是不帶電或帶正電的複合體皆能以此方式到達細胞內，但帶正電的複合體也可與膜蛋白產生作用，再以吸附胞飲的方式進入細胞中。

複合體藉由胞飲作用進入細胞後被包裹在核內體內，接著酸鹼值會逐漸下降至 pH 5.5 左右再與溶小體(lysosome)融合(fusion)，溶小體內的酵素與酸性的環境會造成 DNA 的分解，進而失去作用。因此複合體要能成功的進行轉染，必須在核內體與溶小體融合前脫離，即使非病毒載體具有保護 DNA 不受外在環境影響的能力，還是需要逃出溶小體才能達到轉染的目的。複合體進入細胞質後，要將所包覆的基因釋出，被釋放的基因必須通過核孔(nuclear pore)進入細胞核中，經過轉錄(transcription)與轉譯(translation)等程序最後產生標的蛋白質。

### 2-2-2. 微脂粒

微脂粒最初是在 1965 年，由 Bangham 等人將卵磷脂(lecithin)自蛋黃中萃取出來，再使其分散於水中所發現。微脂粒為磷脂質分子所組成的微小囊泡，此脂質為一兩性(amphiphiles)分子，即一端為親水性的極性頭基，另一端為疏水性的長碳鏈，因此具有表面活性。兩性脂質分子在水溶液中時，會因親疏水性產生規則排列，形成膠體粒子，如微胞(micelle)，在不同的條件下(如濃度、溫度、分子構造等)，其型態也各異。微脂粒具有中空的球型構造，是由一或數層脂質雙層膜(lipid bilayer)所圍繞而成，此脂質雙層為兩磷脂質之疏水端向內聚集，親水端裸露在外的層狀排列，與生物細胞膜類似，因此微脂粒可作為細胞膜間作用與膜蛋白質的系統模式。

基於微脂粒的特殊結構，吸引科學家嘗試將其作為藥物載體，如親水性藥物可被包覆在內部的水相環境中，油溶性藥物則負載於脂質雙層中，再加上微脂粒為天然的物質，具有良好的生物相容性(biocompatible)與生物可降解性(biodegradable)，所以被廣泛地運用於藥物釋放系統。在基因載體的應用上，Loke 利用陰離子微脂粒

(anionic liposome)來遞送反義寡核酸(antisense oligonucleotide)而得到不錯的體外(in vitro)轉染效果，但陰離子微脂粒需要鈣離子的輔助以增加包覆DNA的效率。另一方面，脂複合體進入細胞的主要途徑為胞飲作用，由於溶小體內的酵素具有分解脂複合體的能力，因此複合體必須在溶小體融合前脫離。Litzinger 等人以 DOPE(dioleoyl phosphatidylethanolamine)為基材形成酸鹼敏感性(pH sensitive)的微脂粒來遞送基因<sup>17</sup>，DOPE在酸性環境下能和核內體的脂質雙層膜融合，進而將DNA釋放至細胞質中，達到基因轉染的目的。然而，酸鹼敏感型微脂粒在血漿或是血清中的安定性不佳，且能釋出的DNA僅佔約 10%，大部分的DNA仍會留在核內體中並遭到分解<sup>18</sup>。

在 1987 年 Felgner 利用陽離子脂質 DOTMA(N-[1-(2,3-dioleoyl-oxy)propyl]-N,N,N-trimethyl ammonium chloride)所構成的微脂粒作為基因載體，並對COS-7 等細胞株進行轉染，結果顯示陽離子微脂粒的轉染能力優於其他的微脂粒<sup>19</sup>，因此目前微脂粒基因載體的研究皆以陽離子微脂粒為基礎。陽離子脂質如DOTMA、DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethyl-ammonium propane)<sup>20</sup>、DOGS(diocta-decylamidoglycyl spermine)<sup>21</sup>、DOSPA(2,3-dioleoyl-oxy-N-[2(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-di-methyl-1-propanaminium trifluoroacetate)等皆具有良好的基因傳輸能力 (圖 2-3)，其中DPPE與DOSPA在單一分子上有多個胺基，因而帶有較多的正電荷，對DNA的包覆力亦較好，對許多的哺乳動物細胞有較高的轉染效率。但陽離子微脂粒在體外實驗中顯示出對細胞有很強的毒性<sup>22</sup>，容易與血液中的白蛋白(albumin)、GAG(glycosaminoglycan)產生凝集，以及抑制免疫反應的調節等，為陽離子微脂粒在應用上必須謹慎面對的問題。

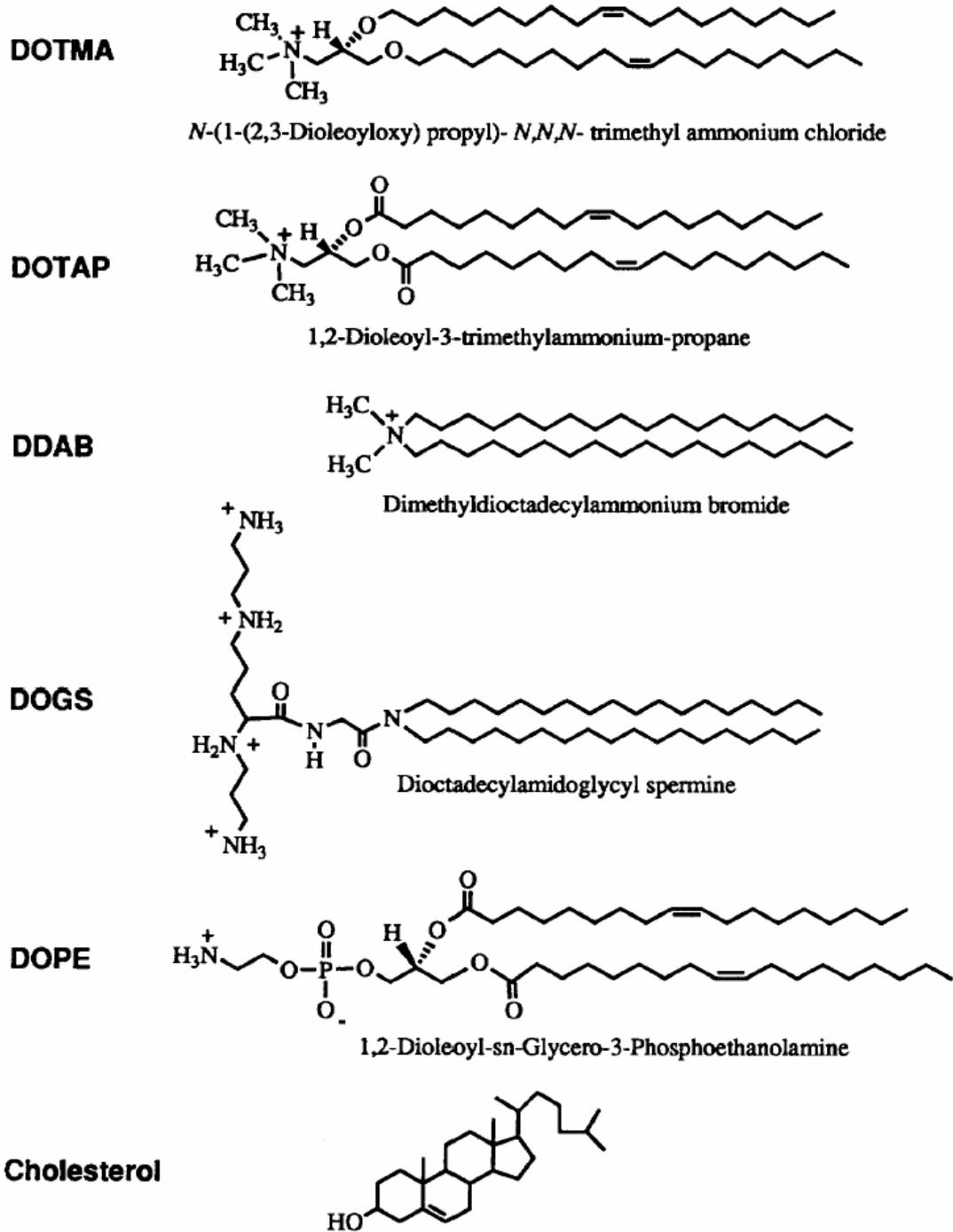


圖 2-3. 各種脂質分子結構<sup>20</sup>

### 2-2-3. 陽離子高分子

陽離子高分子通常是聚胺(polyamine)或是單體含有胺基(amino group)的高分子，在特定的環境下，如pH值低於胺之pKa的水溶液中，氮原子會因質子化(protonation)而帶有正電荷，能與DNA結構中帶負電的磷酸根經靜電作用而形成聚複合體。圖 2-4 為各種常見的陽離子高分子<sup>23</sup>，隨著結構以及分子量的不同，各種陽離子高分子有相異的轉染能力。然而，即使是同一種高分子，在製備聚複合體的條件有所改變，如高分子和DNA混合的順序、比例、均勻程度，高分子與DNA溶液的濃度、離子強度，以及聚複合體的大小、電性、表面特性等，皆會影響到最終的轉染效率。

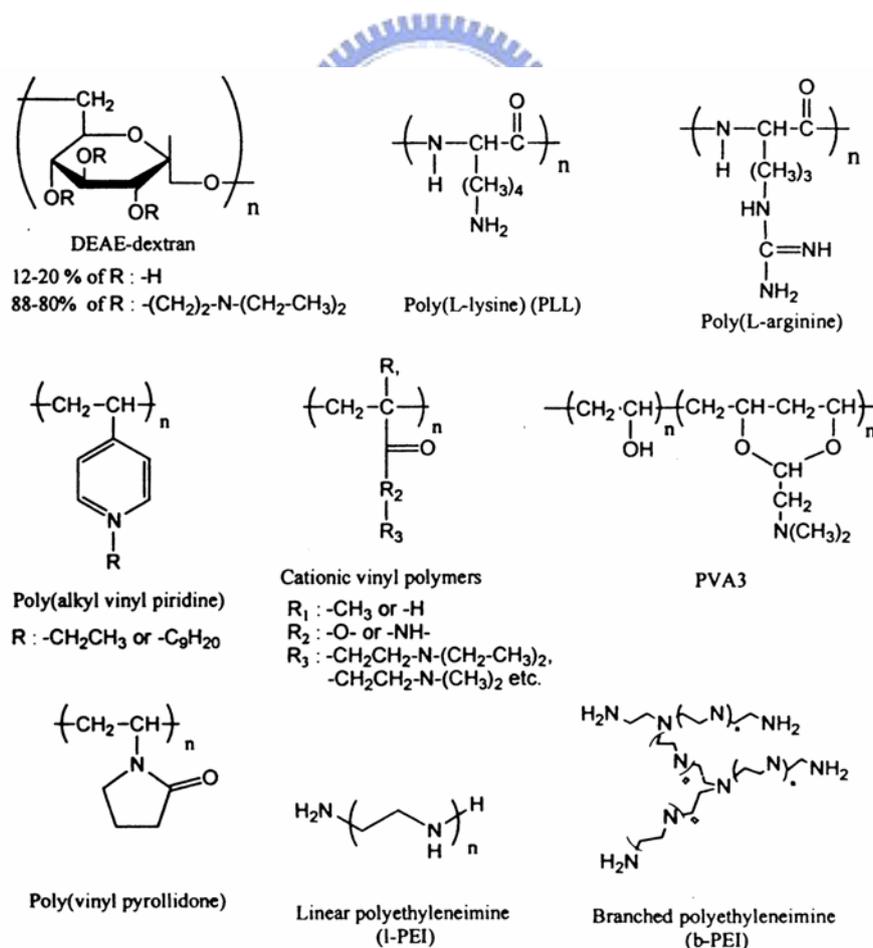


圖2-4. 各種陽離子高分子結構<sup>23</sup>

DEAE-dextran(diethylaminoethyl-dextran)是最早用於基因治療上的陽離子高分子。dextran是具水溶性的葡萄聚糖，其結構上有許多的羥基(hydroxyl group)可供改質(見圖 2-4)。由於dextran分子不具任何胺基提供帶正電的能力，因此必須將dextran上的羥基以化學反應取代為DEAE(diethylaminoethyl) group，由於DEAE上的三級胺會帶正電，因此可與DNA形成聚複合體。DEAE-dextran除了本身可當基因載體外，有研究顯示在DEAE-dextran的幫助下，可提高腺病毒基因載體進入細胞的效率約 45 倍<sup>24</sup>。Yamaoka等人發現帶電官能基DEAE與dextran的比例會影響聚複合體在基因轉染上的表現，實驗結果顯示DEAE-dextran的細胞毒性隨著DEAE含量的減少而降低，轉染的效果也跟著變差<sup>25</sup>。然而，DEAE-dextran的轉染效率低，細胞毒性高，以及不具生物可分解性，使其在實際應用上倍受限制。

除了DEAE-dextran，另一種常用於基因載體的聚糖為chitosan。chitosan是chitin去乙酰化(deacetylation)的產物，具有低毒性、良好的生物相容性及生物可分解性，在食品及醫藥方面有廣泛的用途。chitosan不同於dextran，其本身已具有一級胺的官能基(圖 2-5)<sup>26</sup>，因此不需改質即可與DNA形成聚複合體。chitosan將DNA包覆住後，能夠保護DNA不被核酸水解酵素(DNase)分解。文獻顯示<sup>27</sup>，chitosan的分子量及帶正電的單體含量會影響聚複合體的性質。為了得到穩定的聚複合體，帶電的單體必須佔有超過 65%的比率，而分子量在 30kDa 到 170kDa之間，能得到最佳的轉染效果，若在 1.2kDa或分子量過大，則基因轉染表現不佳。MacLaughlin等人利用 pH-sensitive endosomolytic peptide與聚複合體進行轉染，發現可增加基因的表現<sup>28</sup>，顯示可能由於chitosan在pH5.5 下的緩衝能力(buffering capacity) 不佳，使聚複合體要從核內體中釋放成為基因遞送上主要的限制。

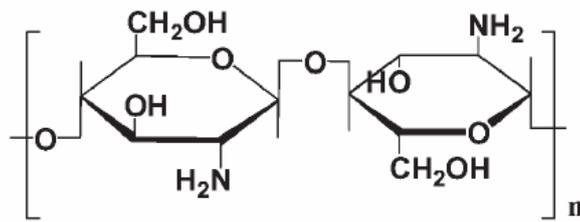


圖 2-5. Chitosan的化學結構<sup>26</sup>

PLL(poly(L-lysine))為目前運用最廣泛的一種陽離子高分子載體，從結構上可視為氨基酸lysine的聚合物，因此具有良好的生物可降解性(biodegradable)。在pH 7.4下，PLL側鏈上的一級胺會帶正電，提供充足的能力去包覆DNA，研究顯示在許多不同濃度的鹽溶液中，PLL皆能與DNA形成聚複合體<sup>29</sup>。但PLL和DNA作用之後，可能由於電性中和，使聚複合體變為疏水性，所以有凝集的傾向，且容易吸附血液中的蛋白質，進而被免疫系統辨識並清除。除了會產生凝集外，PLL本身具有相當的細胞毒性。PLL與DNA所形成的複合體經胞飲作用後，會被侷限在核內體甚至溶小體內，因此通常會利用添加chloroquine幫助聚複合體脫離核內體，來增加PLL聚複合體的轉染效率<sup>30</sup>。雖然作用機制還不是很清楚，推測可能是因chloroquine具有在核內體酸化的過程中，緩衝pH值下降的能力，同時也能幫助基因脫離載體。

## 2-3. 聚乙烯亞胺

聚乙烯亞胺為一種常見的聚胺高分子，用於紙張的生產過程中，以及洗髮精的製造和水的純化，近年在基因載體的研究上顯示出良好的轉染效果。依不同的聚合方式聚乙烯亞胺有分枝 (branched polyethylenimine, B-PEI) 及線性 (linear polyethylenimine, L-PEI) 兩種形式 (圖 2-6)<sup>31</sup>。PEI 的化學結構可視為兩碳原子與一氮原子所組成之重複排列，即每三個原子就有一個氮原子，相較於其他陽離子高分子，其氮原子密度最高，換句話說，電荷密度亦是最大的，因此能將大型的 DNA 分子如數百奈米的質體 DNA，濃縮 (condense) 成數十奈米的聚複合體粒子<sup>32</sup>，同時能保護 DNA 不受核酸水解酵素的降解。高電荷密度雖然有助於 DNA 的包覆，但也導致較強的毒性，不利於實際上的應用。

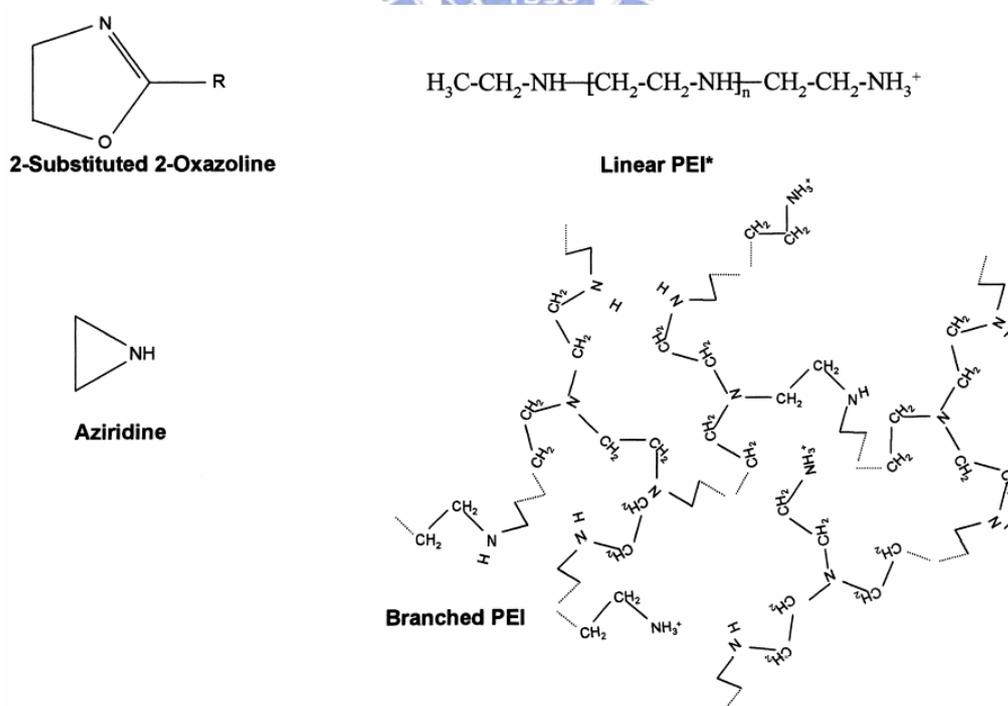


圖 2-6. 聚乙烯亞胺的各種形式與其所屬單體<sup>31</sup>

### 2-3-1. 分枝聚乙基亞胺

B-PEI是以aziridine為單體進行陽離子開環聚合得到的高分子(圖2-7)<sup>33</sup>，通常利用質子酸為起始劑，於聚合反應進行時，成長中的高分子鏈會與另一條高分子鏈作用而形成分枝，若分子鏈末端發生back biting，則在末端會形成一圓環而終止聚合反應。

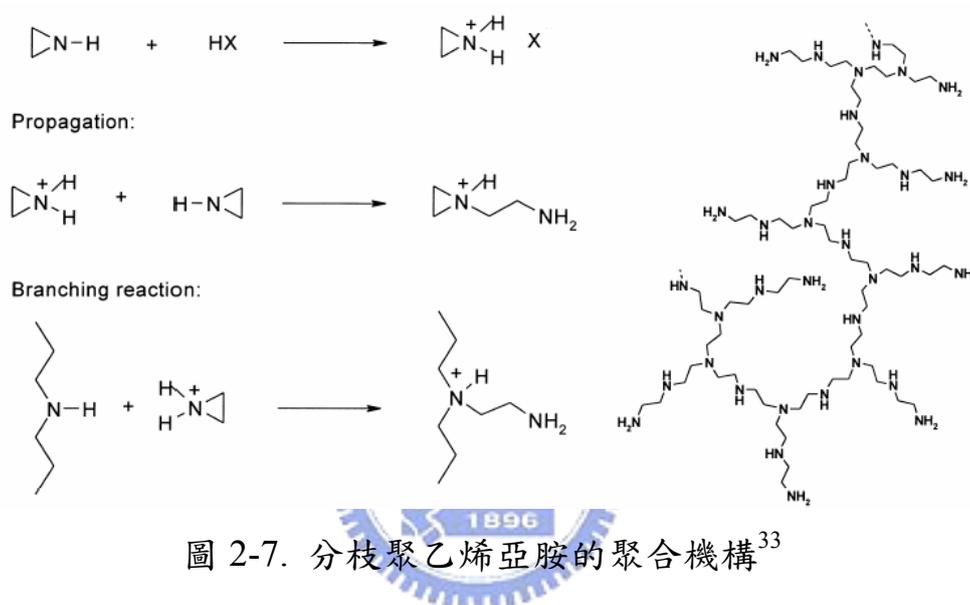


圖 2-7. 分枝聚乙基亞胺的聚合機構<sup>33</sup>

從結構上來看，B-PEI同時具有一級、二級和三級胺，各佔約 25%、50%、25%，這些胺基在不同的pH值下會產生質子化，進而提供B-PEI在酸性環境下極佳的緩衝能力。對於B-PEI在酸性溶液中的緩衝能力，Behr等人提出著名的質子海綿理論(proton sponge hypothesis)<sup>34</sup>，指出當聚胺類的聚複合體進入核內體後，可以緩衝核內體持續酸化的環境使pH不易降低，造成氫離子不斷湧入，基於需保持電中性的緣故，氯離子也隨之進入，造成核內體中氫離子與氯離子的濃度過高。為了平衡濃度梯度，大量的水隨之進入，使核內體的體積不斷的膨脹最終導致破裂，釋出內含物質。除此之外，氫離子的湧入也可能讓高分子內質子化的胺基增加，使分子內的靜電斥力變大，以至聚複合體

的體積擴增，進而撐破核內體，進入細胞質中。因此一般認為有緩衝能力的陽離子高分子皆具脫離核內體的特性，較其他非病毒型載體容易進入細胞內，而有較高的基因轉染效率。Boussif等人證明B-PEI的轉染效率和陽離子微脂粒DOGS相當，但比PLL高，然而在某些細胞上甚至有優於DOGS的表現。Pollard等人則將多種不同的複合體注射入細胞核或細胞質內，得到B-PEI不論是在細胞質或細胞核都有轉染的能力，反之陽離子微脂粒DOGS與DOTAP幾乎沒有轉染效果<sup>5</sup>，突顯出B-PEI在基因遞送上的高效率。

B-PEI 與 DNA 結合之聚複合體會隨著 B-PEI 和 DNA 的比例、濃度、所用溶劑的離子強度、混合的順序的差異而形成不同的大小及形狀。在適當的比例下，B-PEI 能將 DNA 完全包覆住，形成電中性的聚複合體，但此電中性的複合體會凝集，不利於基因的遞送。因此通常以較多的 B-PEI 與 DNA 混合，來得到帶正電的複合體，不但可透過靜電斥力使彼此分散，也有利於與負電性的細胞膜作用，增加進入細胞的機會。若溶劑的離子強度和質體 DNA 溶液的濃度較低時，可得到大小在 20-40 nm 之間的圓環狀(toroidal)聚複合體，但在高離子強度或與生理環境相同的離子強度(0.15M NaCl)下，凝集亦會發生，形成大小數百奈米的複合體顆粒。

B-PEI分子量對聚複合體也有影響。Godbey等人在體外實驗中發現，分子量越大轉染效率也越好(70kDa > 10kDa > 1.8kDa)，而分子量小於 1.2kDa則沒有轉染效果<sup>35</sup>。Fisher等人則是得到大分子量(1616kDa)較小分子量(11.9kDa)的PEI有較強的細胞毒性，同時轉染效率較低<sup>36</sup>。而Abdallah等人從體內實驗分子量越小轉染效率越佳(25kDa > 50kDa > 800kDa)<sup>37</sup>。顯示當分子量增加時，會提高轉染效率以及細胞毒性，但細胞毒性過高時則使轉染效率降低。

### 2-3-2. 線性聚乙烯亞胺

L-PEI 可以利用將高分子 poly(2-substituted-2-oxazoline) 進行加酸水解使側鏈丙醯基(propionyl group)斷裂來得到，如 poly(2-ethyl-2-oxazoline)，如圖 2-8。

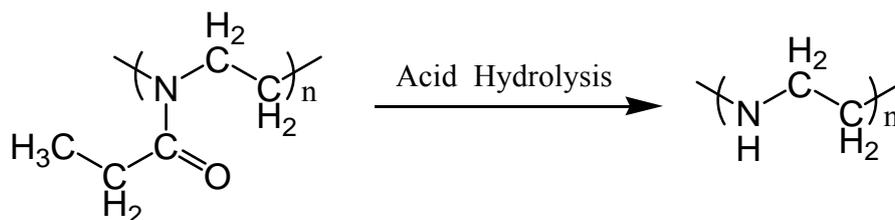


圖 2-8. poly(2-ethyl-2-oxazoline)加酸水解為線性聚乙烯亞胺

L-PEI在結構上僅有二級胺，於pH 4.5 到pH 9 之間才具有緩衝作用，因此在程度上不如B-PEI。目前在非病毒載體的研究上大多數皆採用B-PEI，但文獻指出L-PEI不僅有較低的毒性，同時能達到和B-PEI相同甚至更好的轉染效率<sup>38,39</sup>。如同B-PEI，L-PEI聚複合體在形成上，溶劑的離子強度對粒徑大小也有相對的影響。文獻顯示在 5%的 glucose水溶液中，聚複合體的粒徑約在 100 nm左右，而隨著高分子比例的增加，粒徑會逐漸縮小，但當溶劑為 0.15M NaCl時，粒徑增大至 1  $\mu$ m，且不受高分子與DNA比例的影響<sup>40</sup>。Wightman等人也觀察到類似的現象，當複合體製備於 75mM NaCl緩衝溶液中時，粒徑會隨著時間而越來越大，最終達到數  $\mu$ m的大小，所以L-PEI相較於B-PEI更易受離子強度的影響，造成聚複合體的不穩定。

L-PEI 的轉染效率及細胞毒性與水解比例有很大的關係，通常水解比例越高，基因轉染的效果越好，但毒性也越強，且在高濃度的情況下，仍會造成大量的細胞死亡。

## 2-4. 共聚合高分子

如前所述，電中性的聚複合體由於少了靜電排斥力而逐漸凝集，除此之外也可能因電荷被中和的關係使疏水性大增，助長凝集的程度進而沉澱，對於基因遞送而言是非常不利的因素。若增加陽離子高分子對DNA的比例，使聚複合體帶有正電，雖可解決上述的凝集發生，卻引發更高的細胞毒性，此外在體內傳輸時，會和血液中帶負電的蛋白質或是補體(complement)系統的蛋白質彼此吸附，導致被吞噬細胞(phagocyte)吞食或被內質網(reticuloendothelial systems)清除，以及和紅血球作用而造成肺栓塞(pulmonary embolism)<sup>41</sup>。

共聚合高分子(copolymer)可以結合數種高分子的優點，因此透過陽離子高分子與其他高分子形成共聚合高分子，可用以改善聚複合體的許多缺點。將陽離子高分子與親水性高分子合成為共聚合高分子，不但可增加聚複合體水溶性，延長在體內循環的時間，並能遮蔽(shielding)表面的正電荷，以及形成立體障礙，防止蛋白質的貼附。

### 2-4-1. 聚乙二醇共聚合高分子

目前最常用於共聚合高分子的親水性高分子為聚乙二醇(poly(ethylene glycol), PEG)。PEG是一種不帶電的聚醚(polyether)類高分子，有良好的水溶性、生物相容性及生物可降解性，因此廣泛的應用在醫藥及化妝品產業中。

幾乎所有的陽離子高分子皆可與PEG結合為共聚合高分子，包括PLL、PEI和pDMAEMA(Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))等。當共聚和高分子與DNA混合後，會形成具核殼結構(core-shell structure)的聚複合體，如圖 2-9，其外層(殼)為親水性的PEG，內部(核)

則是陽離子高分子與DNA所組成，因此有外圍親水中心疏水的特性，以及良好的結構穩定性<sup>42</sup>。

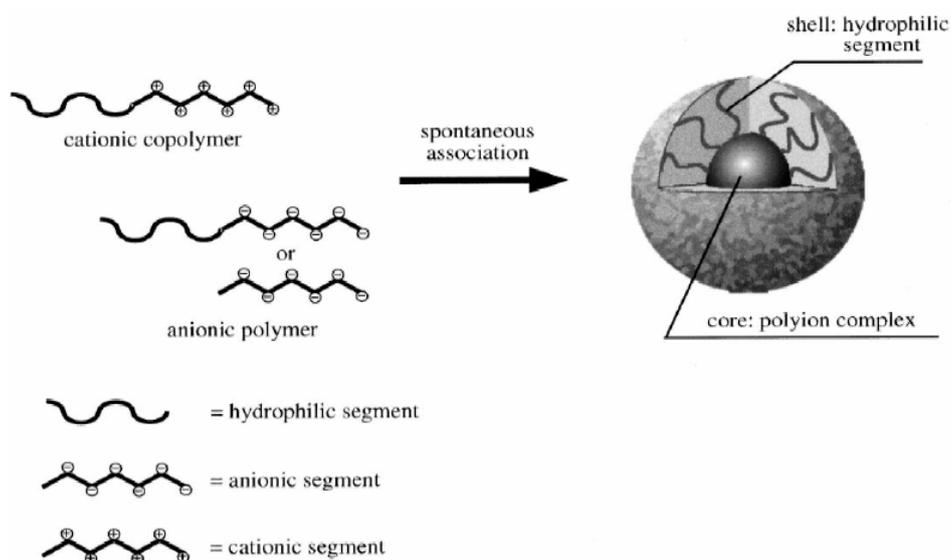


圖2-9. 核殼結構示意圖<sup>42</sup>

在共聚合高分子的合成上，可利用PEG為macroinitiator聚合陽離子高分子的方式，得到雙團聯共聚物(diblock copolymer)；或是以coupling reaction將陽離子高分子與PEG接合在一起，形成雙團聯共聚物或接枝共聚物(graft copolymer)。Kataoka等人以第一種方式得到PEG-b-PLL雙團聯共聚物<sup>43</sup>，在包覆DNA後得到大小約50 nm的聚複合體粒子，而負的界面電位證實已形成核殼結構，並具有和PLL一樣的DNA包覆力及抵抗核酸水解酶的能力。不同於PLL，溶劑的離子強度對PEG-b-PLL聚複合體的大小沒有影響，顯示PEG確實有穩定聚複合體的功效。此外Kim等人則利用coupling reaction得到PEG-g-PLL接枝共聚物<sup>44</sup>。相較於PLL，PEG-g-PLL對DNA的包覆能力稍差，但轉染效率卻有5-10倍的增加，並大幅降低對細胞的毒性。

由於B-PEI具有優異的轉染效率，但過高的毒性使其在應用上備

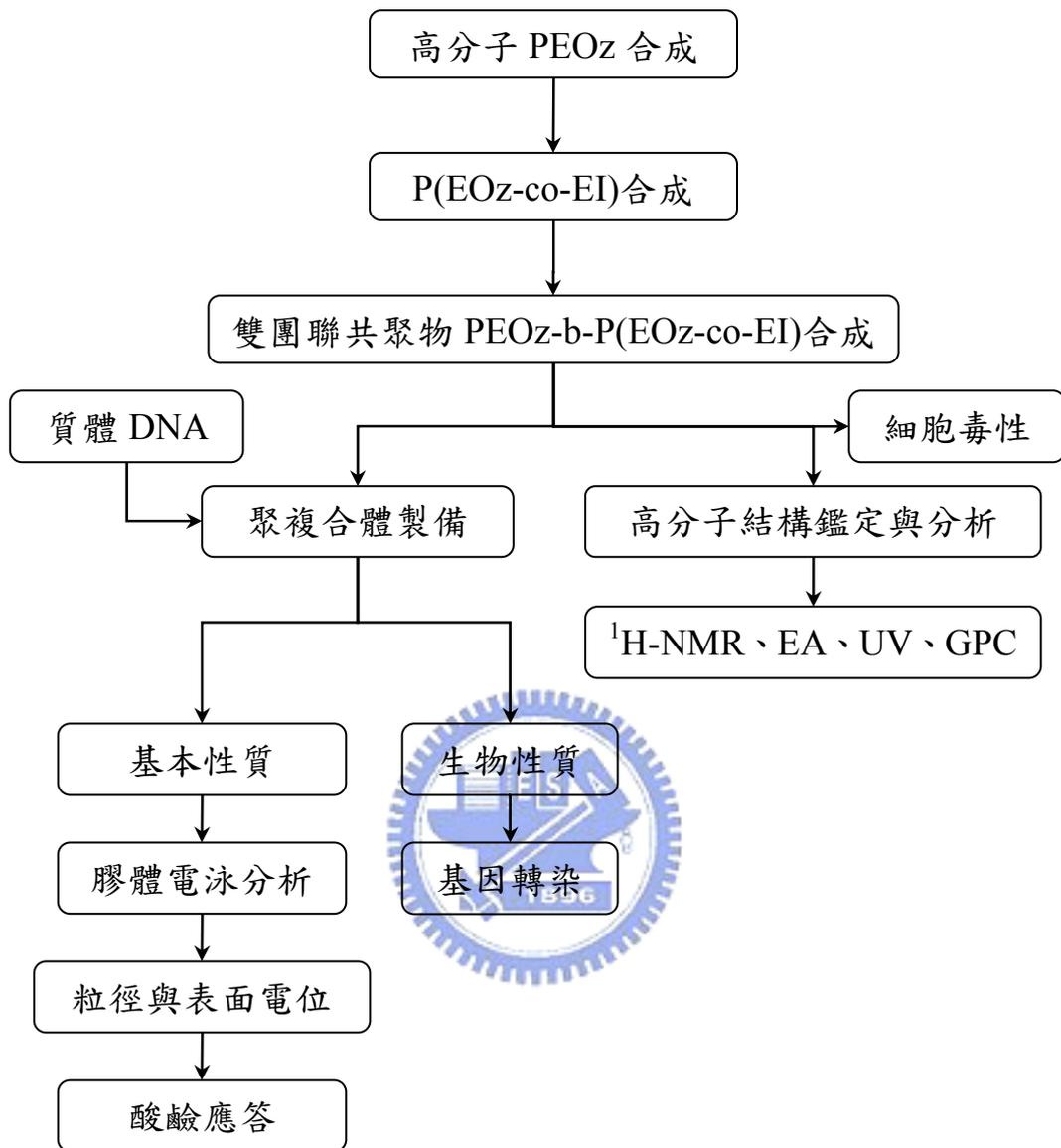
受限制，因而有許多研究者將其與PEG接合成共聚物來改善此項缺點。Choi等人合成具不同PEG/PEI比例的PEG-g-PEI接枝共聚物，並探討其與DNA形成聚複合體後之水溶性、細胞毒性及轉染效率<sup>45</sup>。結果顯示PEG-g-PEI聚複合體在水溶性上優於PEI聚複合體，細胞毒性則明顯降低，且PEI接上越多PEG會使聚複合體越容易溶在水中，同時對細胞的毒性也越低。在轉染效率方面，PEG-g-PEI聚複合體對細胞的效率皆遠低於PEI聚複合體，推測是因PEG所形成的立體障礙降低了聚複合體與細胞表面作用的機會，導致進入細胞的效果不佳。

Petersen等人將一系列具不同PEG分子量及接枝程度的PEG-g-PEI作為探討的對象<sup>46</sup>，在物理化學性質方面，發現除了PEG分子量小於5kDa的共聚物之外，聚複合體粒徑在0.15M NaCl的離子強度下都相當安定，並能減少紅血球的凝集，而隨著PEG分子量與接枝程度的增加，界面電位會逐漸下降。另外不同分子量的PEG對於PEI的DNA包覆能力影響不大，但相較於未接枝PEG的PEI，PEG-g-PEI需要較多的量以包覆DNA，顯示PEG會阻礙PEI與DNA的結合。在對細胞的測試中，當PEG的接枝率增加，對細胞的毒性就越低，但同樣也會使轉染效率下降。Frisch等人以PEG/L-PEI團聯共聚物作為基因載體同樣得到水溶性上升、細胞毒性及轉染效率降低的結果<sup>47</sup>。

因此，利用親水性高分子PEG對陽離子高分子改質可以增加聚複合體親水性，遮蔽陽離子高分子之正電荷達到穩定聚複合體的作用，此外尚能降低陽離子高分子的細胞毒性。然而對於PEI而言，PEG/PEI共聚物轉染效率不佳仍限制了其應用價值。

### 三、實驗方法

本研究在實驗的部分設計如下圖，詳細情形於下列各節描述之。



### 3-1. 實驗藥品與儀器

#### 3-1-1. 實驗藥品

- (1). ethyl-2-oxazoline, EOz (ACROS)
- (2). Acetonitrile, ACN (TEDIA)
- (3). Methyl p-toluenesulfonate (ALDRICH)
- (4). Potassium thioacetate, KSAc (ACROS)
- (5). 2,2'-dithiodipyridine (ACROS)
- (6). Acetone (TEDIA)
- (7). Ammonia in methanol solution, 7N (ACROS)
- (8). Dichloromethane, DCM (TEDIA)
- (9). Hydrochloric acid, 35 % (聯工)
- (10). Sodium hydroxide (聯工)
- (11). Methanol (TEDIA)
- (12). Ethanol, 99 % (NASA)
- (13). Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (GIBCO)
- (14). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide,  
MTT (ICN)
- (15). Trypsin 0.25 % in EDTA (GIBCO)
- (16). Trypan blue stain 0.4 % (GIBCO)
- (17). Fetal bovine serum, FBS (GIBCO)
- (18). Terrific broth, TB (Scharlau)
- (19). 含有質體 DNA—pUHC-13-3 之大腸桿菌為清華大學生命科學系  
楊嘉鈴教授所提供。
- (20). Agarose (Vegonia)
- (21). 5X Tris-Borate-EDTA buffer, TBE buffer (GeneMark)

- (22).Ethidium bromide, EtBr (GeneMark)
- (23).Ampicillin, Amp (Gerbu)
- (24).10 kb DNA ladder (Violet)
- (25).Loading dye 6X (Violet)
- (26).Protein assay (Bio-Rad)
- (27).Luciferase kit #E1531 (Promega)
- (28).Plasmid Maxiprep Kit (Lambda)
- (29).Branched poly(ethylenimine) ,Mw: 25000 (ALDRICH)

### 3-1-2. 實驗儀器

- (1) 旋轉蒸發器 (Rotary vacuum evaporator : EYELA)
- (2) 核磁共振光譜儀 (Nuclear magnetic resonance spectrophotometer,  
NMR : Varian UnityInova 500 nmr)
- (3) 凝膠滲透層析儀 (Gel permeation chromatography, GPC :  
Machery-Nagel NUCLEOGEL)
- (4) 粒徑分析儀與界面電位儀 (Zetasizer 3000HSa : Malvern  
Instruments Ltd)
- (5) 紫外光/可見光光譜儀 (UV/Vis spectrophotometer, UV/Vis : Perkin  
Elmer Lamda 2S)
- (6) 透析膜 (Dialysis tubing, MWCO 6000-8000, 10000 : Spectrum  
Medical Industries)
- (7) 96 孔盤酵素判讀儀 (Elisa Reader : Awareness Stat Fax 2100)

- (8) 迷你電泳槽 (Mini Electrophoresis Apparatus MP-100 : Major Science)
- (9) 紫外光箱 (UV light box : Major Science)
- (10) 無菌抽風櫥 (Laminar flow : 海天)
- (11) 恆溫培養箱 (Incubator : NAPAC Model 6100 CO<sub>2</sub>)
- (12) 倒立式相位差顯微鏡 (Phase contrast microscopy : Wild MPS 51S)
- (13) 離心機 (Centrifuge : KA-1000, KUBOTA)
- (14) 高壓滅菌鍋 (Autoclave : TM-329, Tomin)
- (15) 血球計數盤
- (16) 螢光強度判讀儀 (Luminometer : Wallac 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer)
- (17) 恆溫振盪水槽 (Shake bath : TKS)



## 3-2. 高分子合成

### 3-2-1. 藥品純化

(1). EOz : 以 calcium hydride 除水，減壓蒸餾後使用。

(2). ACN : 以 calcium hydride 除水，蒸餾後使用。

### 3-2-2. 名詞縮寫

(1). PEOz-SAc : 末端官能基為 thioacetate 之 poly(2-ethyl-2-oxazoline)

(2). PEOz-Py : 末端官能基為 2-pyridyldithio 之 poly(2-ethyl-2-oxazoline)

(3). P(EOz-co-EI) : Poly(2-ethyl-2-oxazoline-co-ethylenimine)

(4). PEOz-b-P(EOz-co-EI) : Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(2-ethyl-2-oxazoline-co-ethylenimine)

### 3-2-3. 親水性高分子 Poly(2-ethyl-2-oxazoline)之合成

#### (1). PEOz-SAc 之合成



高分子合成流程如圖 3-1。取單官能基起始劑 Methyl p-toluenesulfonate(MeOTs)置入 250mL 雙頸圓底燒瓶內，其中一瓶口以血清塞封住，另一瓶口裝設冷凝管並連至真空管線，經除氣三次後導入無氧無水之乾燥氮氣，以乾淨玻璃針筒注入 3 倍單體體積的乙腈。在油浴下升溫至 100°C 迴流，待溫度穩定後，再將 2-ethyl-2-oxazoline(EOz)加入瓶中反應，反應條件如表 3-1。反應完成後，以冰浴冷卻至 0°C 並在氮氣下加入 potassium thioacetate(KSAc)固體，在室溫下均勻攪拌反應 2-3 天，使其末端導入 thioacetate(SAc)官能基。將產物用旋轉蒸發器濃縮後溶解於丙酮，流過矽膠層析管柱以除去鹽類和雜質，反覆進行數次。最後，用乙醚進行再沉澱純化產物，再以真空烘箱乾燥 24 小時後得到棕色的固體產物，產率約 90 %。

表 3-1. PEOz 之合成條件

	PEOz1	PEOz2	PEOz3
MeOTs	0.37g(2mM)	0.19g(1mM)	0.74(4mM)
EOz	20ml(200mM)		
KSAc	0.7g(6mM)	0.35g(3mM)	1.4g(12mM)
reaction time	24hr	48hr	12hr

## (2). PEOz-Py 之合成

如圖 3-2 所示，在雙頭圓底燒瓶中加入上述步驟得到的 PEOz-SAc 與 5 倍莫耳數的 2,2'-dithiodipyridine，瓶口分別以血清塞封住及連通真空管線，經除氣三次後導入無氧無水之乾燥氮氣，以乾淨玻璃針筒注入含 NH<sub>3</sub> 的甲醇溶液，在室溫下均勻攪拌反應 1-2 天。將產物用旋轉蒸發器濃縮後溶解於二氯甲烷，用乙醚進行再沉澱，反覆數次，最後將得到的 PEOz-Py 以真空烘箱乾燥 24 小時，得到黃色的固體產物，產率約 85 %。

### 3-2-4. P(EOz-co-EI)之合成

陽離子高分子 P(EOz-co-EI) 的合成如圖 3-3。此高分子的合成方式為將 PEOz-Py 進行加酸水解，首先把上一步得到的 PEOz-Py 與純水及 HCl 溶液置於圓底燒瓶中，在 100°C 下反應 3 小時，反應條件如表 3-2。反應結束後冷卻至室溫，用 NaOH 調整 pH 值在 9-10 之間，再倒入分子量 3500 的透析膜中，以純水透析 3 天，將產物以旋轉蒸發器濃縮後置於真空烘箱乾燥 24 小時，產物為黃色的膠狀物，產率約 70 %。

表 3-2. P(EOz-co-EI)之合成條件

	PEOz1		PEOz2	
polymer	1g		1g	
water	8ml		11ml	
HCl solution	6ml	10ml	6ml	10ml

### 3-2-5. PEOz-b-P(EOz-co-EI)雙團聯共聚物之合成

雙團聯共聚物之合成如圖 3-4。將PEOz-SAc及 3 倍莫耳數的 P(EOz-co-EI)置於雙頸圓底燒瓶中，瓶口分別以血清塞封住及連通真空管線，經除氣三次後導入無氧無水之乾燥氮氣，以乾淨玻璃針筒注入含NH<sub>3</sub>的甲醇溶液，在室溫下均勻攪拌反應 2-3 天。產物以適當分子量(6000-8000 或 10000)的透析膜於純水中透析 3 天，最後以旋轉蒸發器濃縮後置於真空烘箱乾燥 24 小時，產物為黃色的膠狀物，存放於-20°C 冰箱中備用，產率約 75 %。

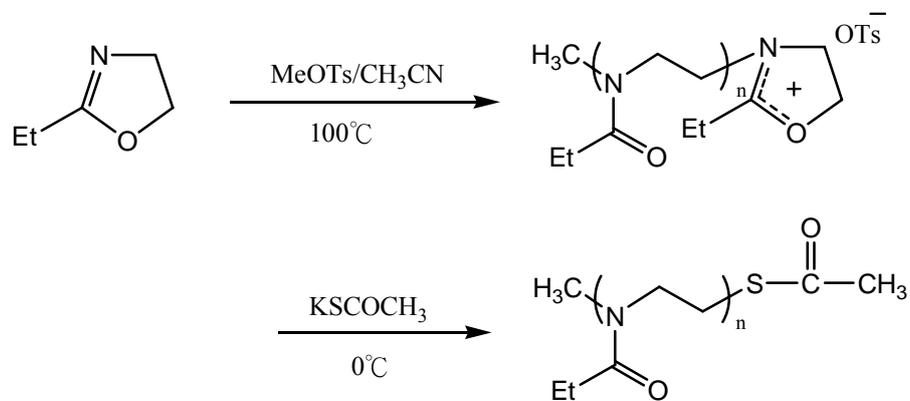


圖 3-1. PEOz-SAc 之合成流程圖

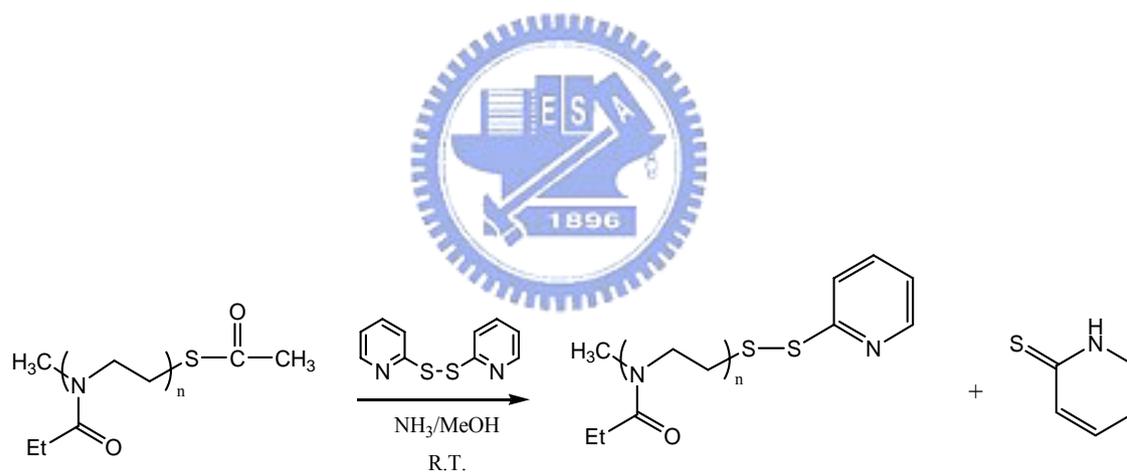


圖 3-2. PEOz-Py 之合成流程圖

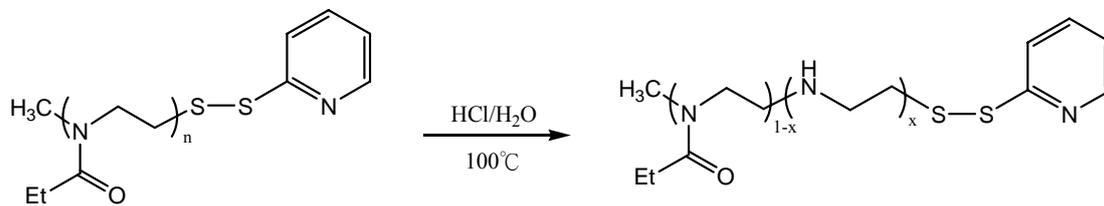


圖 3-3. P(EOz-co-EI)之合成流程圖

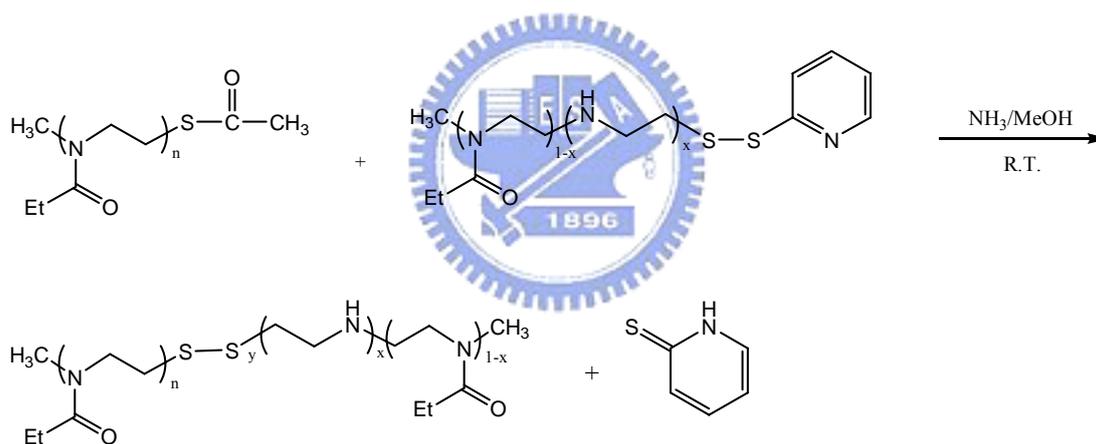


圖 3-4. PEOz-b-P(EOz-co-EI)之合成流程圖

### 3-3. 高分子結構鑑定與分析

### 3-3-1. $^1\text{H-NMR}$ 分析

在 $^1\text{H-NMR}$ 測定上，末端官能基要能夠明顯判別則高分子之聚合度(degree of polymerization, DP)或分子量必須夠低，因此在PEOz-SAc與PEOz-Py以及p(EOz-co-EI)的分析上皆採用低分子量的寡聚合物作為分析的對象。

$^1\text{H-NMR}$ 測定方式為將待測物溶解於 $\text{CDCl}_3$ 或 $\text{D}_2\text{O}$ 中，以四甲基矽烷(tetramethylsilane, TMS)為測量基準，經核磁共振光譜儀分析分子中氫之化學位移來斷定分子結構。

### 3-3-2. 元素分析

將純化後之高分子以元素分析儀測量碳、氫、氮、硫四種元素所佔的重量百分比，與理論推估之比例相互比較可用以判斷待測物結構。



### 3-3-3. UV 光譜分析

將純化後之高分子溶於 methanol 中，倒入石英比色管中，以紫外光/可見光光譜儀測量待測物溶液在波長 300-400nm 之間的吸收值藉以分析待測物中是否含有 pyridyl 官能基。

### 3-3-4. GPC 分析

將純化後之高分子以DMF配成溶液並以孔隙 0.22 $\mu\text{m}$ 之過濾板過濾後注入GPC中，可得重量平均分子量 (weight-average molecular weight,  $M_w$ )、數目平均分子量 (number-average molecular weight,  $M_n$ ) 及分子量分佈(polydispersity index, PDI)。流動相為dimethylformamide

(DMF)，流速 1 mL/min (40°C)，標準品為poly(methyl methacrylate) (PMMA) (Waters)。

### 3-4. 聚複合體之基本性質

#### 3-4-1. 菌株培養與 DNA 純化及聚複合體製備

細菌培養基的製備方法為取 47 g TB 加入純水至總體積 1 L，以高壓滅菌鍋於 121°C 下滅菌 30 分鐘，冷卻後加入 1 mL 抗生素 ampicillin(50 mg/mL)，置於 4 °C 冷藏保存。

菌株培養時取 200 mL 培養基加入 1 μL 含有 pUHC-13-3 質體 DNA 之大腸桿菌菌液，於 37 °C 下培養 16-18 小時。質體 DNA 的萃取與純化則依照 Plasmid Maxiprep Kit 步驟進行。DNA 溶液保存在 -20 °C。DNA 的濃度以 UV/Vis 測量波長 260 nm 之吸收度， $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$ 。DNA 的純度由  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  判斷，一般值在 1.8-2.0。

聚複合體的製備方法為將質體 DNA 稀釋為 0.04 mg/mL，另準備不同濃度的高分子溶液，其濃度以高分子/DNA (P/D) 的重量比例為基準，如當 P/D 為 5 時，高分子溶液的濃度即為 0.2 mg/mL。分別取 100 μL 的 DNA 與高分子溶液混合，混合均勻後於室溫下靜置 30 分鐘。

#### 3-4-2. 膠體電泳

取 0.2 g 洋菜膠體粉末(agarose gel)溶於 20 mL 1X TBE 緩衝溶液製備 1% agarose 溶液，以微波加熱直到洋菜膠體粉末完全溶解，待冷卻至 55 °C 後倒入含有齒梳的模具，使膠體產生孔洞供置放樣品。膠體凝固後拔掉齒梳，將凝膠移至電泳槽，倒入 TBE 緩衝溶液直至

蓋過膠體孔洞。取 1  $\mu\text{L}$  的 DNA 或聚複合體與 5  $\mu\text{L}$  的 6X 染劑均勻混合，於每個孔洞加入 5-12  $\mu\text{L}$  樣品。電泳電壓為 100 伏特，跑膠時間依 DNA 片段大小為準。接著將凝膠放進 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EtBr 染色 40 分鐘，置於紫外光箱觀察並以數位相機記錄影像。

### 3-4-3. 粒徑與界面電位

為了解生理環境對聚複合體是否有影響，分別用純水及 0.15M NaCl 溶液製備聚複合體，並稀釋至總體積 1 mL，以粒徑分析儀量測粒徑的大小。另外將純水配製的聚複合體用界面電位儀來測定表面的電荷量。

### 3-4-4. 酸鹼應答

首先製備 pH 值分別為 7.0、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5 的緩衝溶液，其中 pH 6.5 及 7.4 為磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffer)，pH 6.0 以下則為琥珀酸鹽緩衝溶液(succinate buffer)。取聚複合體 10mL 與 90mL 的各緩衝溶液混合，置於室溫下並於 1 小時後取出樣品，進行膠體電泳分析。



## 3-5. 高分子與聚複合體之生物性質

### 3-5-1. 高分子之細胞毒性

將HeLa人類子宮頸癌細胞以DMEM培養基培養在 37 °C，5 % CO<sub>2</sub>的恆溫培養箱中，以倒立式顯微鏡觀察其生長情形。等細胞長至八分滿，以 0.25 %trypsin-EDTA將培養皿中細胞打下，混合trypan blue，在顯微鏡下以細胞計數器計算細胞數目。於 96 孔培養盤中每孔種植  $1 \times 10^4$  個細胞。24 小時後，移除培養基以磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 沖洗 1 次。並加入含有不同高分子濃度之培養液。再過 24 小時，更換新鮮培養基 90  $\mu$ L 並加入 10  $\mu$ L MTT (5 mg/mL in PBS) 反應 4 小時。移除培養基，加入 100  $\mu$ L 的 DMSO/ EtOH(1:1) 溶液溶解產生之結晶物，以 96 孔盤酵素判讀儀讀取波長 570 nm 之吸收，波長 630 nm 為背景扣除值。陽性控制組(positive control) 之培養基不加任何高分子。以常見的基因治療用高分子載體 branched polyethylenimine (B-PEI) 作為陰性控制組(negative control)。實驗重複 6 次(n = 6)，細胞存活率(cell viability)的計算方式為：

$$\text{細胞存活率(\%)} = \frac{\text{吸收度}_{\text{sample}}}{\text{吸收度}_{\text{positive control}}}$$

### 3-5-2. 聚複合體之細胞轉染

如同毒性分析所用之細胞及細胞計數方式，在 6 孔培養盤中每孔種植  $2 \times 10^5$  個細胞。24 小時後，移除培養基以磷酸鹽緩衝溶液沖洗 1 次。每孔加入 2 mL 新鮮培養基與製備好之聚複合體溶液。在 37 °C，5 % CO<sub>2</sub>的恆溫培養箱中培養 2 天後移除培養基，以冰的PBS沖洗 1 次，每孔加入分解液(lysis buffer) 400  $\mu$ L 並以專用刮杓刮下細胞，收集細胞溶液以Vortex均勻混合 15 秒，以 12,000 rpm 離心 15 秒後保存於冰浴中。在測量試管中加入 20  $\mu$ L 細胞萃取液與 100  $\mu$ L 蟲螢光酶反

應試劑混合均勻後以冷光強度判讀儀量測冷光強度以計算轉染效率。

蛋白質含量分析方法為取 100  $\mu\text{L}$  細胞萃取液以純水稀釋 1 倍，再加入稀釋 5 倍後的蛋白質染劑 5 mL，混合均勻後室溫反應 10 分鐘。以 UV/Vis 測量波長 595 nm 之吸收度，對照蛋白質檢量線計算蛋白質含量。



## 四、結果與討論

### 4-1. 合成 PEOz-b-P(EOz-co-EI)雙團聯共聚物

陽離子開環聚合為一種活性聚合(living polymerization)反應，其特點為所得到的高分子分子量分佈較為均一，聚合度近似單體與起始劑的莫耳比。此外陽離子開環聚合常用來將 cyclic imino ether 經由開環聚合成線性的 poly(N-acylalkylenimine)，因此雜環分子 2-substituted-2-oxazoline 亦藉此方式得到 poly(N-acyl-ethylenimine)。一般用於聚合 2-substituted-2-oxazoline 之起始劑可分為兩種，單官能基起始劑如 methyl iodide、MeOTs (methyl p-toluenesulfonate)等，在反應時會產生一個活性端(living end)，即高分子末端的碳陽離子(carbanium)，分子鏈的成長只在單一方向。於反應終止時，由於離子的活性不會消失，加入另一種單體反應仍會繼續進行，可得到雙團聯共聚物。此外也可用親核性化合物(nucleophile)作為終止劑，在分子的末端導入官能基，與另一末端有官能基的高分子經由官能基之間的反應形成共價鍵來合成雙團聯共聚物，這種反應稱為 coupling reaction。而雙官能基起始劑像 bis(oxazolinium tosylate), 1,4-dibromo-2-butene 等的分子則具有兩個活性端，因而高分子的兩末端能同時成長，被利用來合成三團聯共聚物(triblock copolymer)。

本研究在雙團聯共聚物的合成上採用 coupling reaction 的方式並透過雙硫鍵(disulfide bond)來連接兩高分子 poly(2-ethyl-2-oxazoline) 及 poly(2-ethyl-2-oxazoline-co-ethylenimine)。由於細胞內之 glutathione 濃度為細胞外濃度的 50~1000 倍，因此雙硫鍵在細胞內會被還原而斷裂，但其在胞外環境中則相當安定<sup>48,49</sup>，不致影響到。一般 coupling reaction 常以官能基羧酸(carboxylic group)與胺基(amino group)的反應形成醯胺(amide)鍵，或羧酸與羥基(hydroxyl group)反應生成酯(ester)鍵作為共價鍵結，但若使用此類的鍵結方式於本研究上，因 P(EOz-co-EI) 在分子主鏈上有二級胺，將導致 PEOz 不僅會與

P(EOz-co-EI)的末端產生鏈結，也會接在主鏈上，形成接枝共聚物 (graft copolymer)，並增加P(EOz-co-EI)與DNA之間的立體障礙，降低包覆DNA的效率。由於硫醇基(sulfhydryl group)之反應具專一性，僅會與碳雙鍵(double bond)、雙硫鍵等官能基反應，因此可利用在兩高分子末端分別導入硫醇基與雙硫鍵來合成雙團聯共聚物。

基於要得到雙團聯共聚物，所以選擇單官能基起始劑 MeOTs 對 2-ethyl-2-oxazoline 進行聚合，為了在分子末端引入官能基，需在氮氣環境下進行聚合反應使分子末端的碳陽離子能夠保持活性，並在反應終止時加入 KSAc(protassium thioacetate)導入硫醇基，使 PEOz 末端帶有 thioacetate 的官能基。由於硫醇基在空氣中容易因氧化反應而產生偶合(dimerization)，而 thioacetate 可視為被乙酰基(acetyl)保護之硫醇基，因此 thioacetate 常用於硫醇類化合物的製備。將 PEOz 於酸性或鹼性環境下進行水解可以得到線性聚乙炔亞胺，為使 thioacetate 在線性聚乙炔亞胺的合成中不被水解產生硫醇基進而造成高分子偶合，同時提供雙硫鍵以與硫醇基反應，因此 PEOz 先以含氮之甲醇溶液在氮氣下將保護基脫去，再與 2,2'-dithiodipyridine 反應，經由 disulfide exchange 把末端官能基由 thioacetate 轉換為 2-pyridyldithio，之後於鹽酸溶液中進行水解使側鏈丙基(propionyl group)斷裂成為線性聚乙炔亞胺，即 P(EOz-co-EI)。最後將 PEOz 以含氮之甲醇溶液使 thioacetate 還原成硫醇基，與 P(EOz-co-EI)末端的 2-pyridyldithio 反應形成雙硫鍵之共價鍵結並得到 PEOz-b-P(EOz-co-EI)雙團聯共聚物。

#### 4-1-1. $^1\text{H-NMR}$ 結構鑑定

本研究在官能基的鑑定上以另外合成之分子量約 600 的 PEOz 寡聚合物作為基準。

### (1). PEOz-SAc 寡聚合物

將純化後末端帶有thioacetate官能基的PEOz寡聚合物溶於CDCl<sub>3</sub>中，經<sup>1</sup>H-NMR測定後結果如圖 4-1。從圖中可看出高分子PEOz有三個吸收峰，分別為： $-N(\text{COCH}_2\text{CH}_3)-$ ,  $\delta = 0.981$  ppm； $-N(\text{COCH}_2\text{CH}_3)-$ ,  $\delta = 2.353$  ppm； $-N(\text{COCH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $\delta = 3.422$  ppm，而末端甲基則是在 2.995 ppm。由PEOz結構上三個吸收峰的積分面積可知，thioacetate上甲基的氫與PEOz側鏈上亞甲基的氫位置重疊，另外也可看到thioacetate所造成主鏈末端位移至 2.915 ppm，顯示官能基確實鍵結在高分子上。

### (2). PEOz-Py 寡聚合物

圖 4-2 為純化後末端帶有 2-pyridyldithio官能基的PEOz寡聚合物溶於CDCl<sub>3</sub>後經<sup>1</sup>H-NMR測定的結果。從圖中可知PEOz結構上三個吸收峰的積分面積比例回復到結構中氫原子數之比例，而在 7.042 ppm、7.614 ppm、8.392 ppm三處出現pyridine環的吸收峰，代表thioacetate與氫完全反應，生成硫醇基後與 2,2'-dithiodipyridine進行disulfide exchange得到 2-pyridyldithio官能基，官能基之轉化率可由pyridine環與高分子末端之甲基(a)積分面積比值求得，轉化率約 94%。

### (3). P(EOz-co-EI) 寡聚合物

圖 4-3 為純化後末端帶有 2-pyridyldithio官能基的P(EOz-co-EI)寡聚合物溶於CDCl<sub>3</sub>後經<sup>1</sup>H-NMR測定的結果。PEOz經水解後在主鏈氮原子上的乙醯基會脫去，形成二級胺結構，所以在圖中可看到ethylenimine( $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ )在 2.766 ppm處有吸收峰產生，此外在

7.094 ppm、7.601 ppm、8.41 ppm三處有pyridine環的吸收峰。

#### (4). P(EOz-co-EI)

將所合成之高分子PEOz經部分水解得到之P(EOz-co-EI)在純化後溶於D<sub>2</sub>O測定<sup>1</sup>H-NMR，如圖 4-4。從圖中除了可看到PEOz結構上的三個吸收峰，水解後產生的ethylenimine則是在 2.768 ppm處有吸收，此外利用 *N*-propionyl ethylenimine (a) 與 ethylenimine (d) 及 *N*-propionyl ethylenimine側鏈上甲基(c)的積分面積比值可以計算水解比例，水解比例計算方式為：

$$1 - \frac{c/3}{(a+d)/4}$$

#### (5). diblock copolymer PEOz-b-P(EOz-co-EI)

圖 4-5 為雙團聯共聚物經純化後溶於D<sub>2</sub>O所測定的<sup>1</sup>H-NMR圖譜。從圖中可發現ethylenimine所佔的比例已減少，而經由計算反應物PEOz與P(EOz-co-EI)之ethylenimine與*N*-propionyl ethylenimine重複單元的比值與圖中 2.707 ppm及 3.413 ppm的積分面積比對照可證實為雙團聯共聚物。

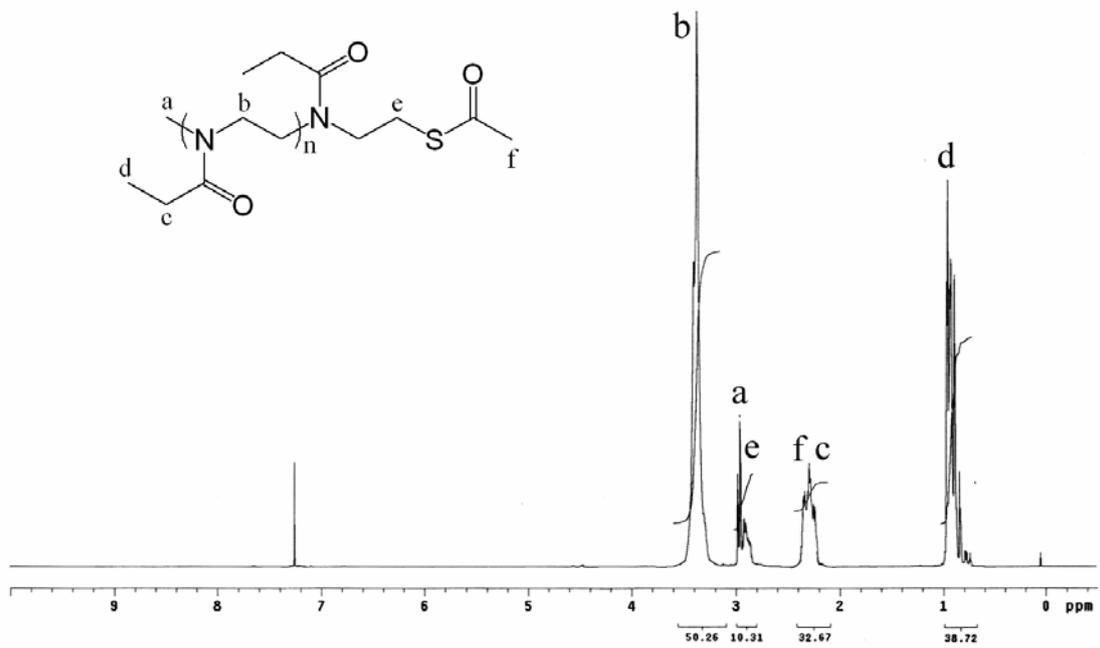


圖 4-1. PEOz-SAc寡聚合物之<sup>1</sup>H-NMR光譜圖

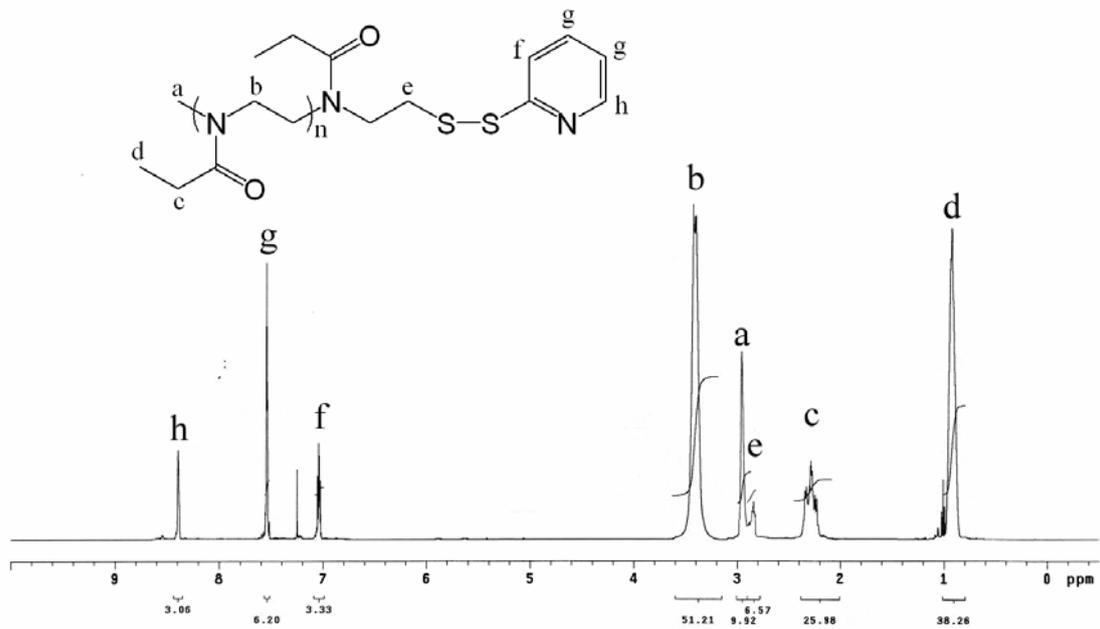


圖 4-2. PEOz-Py寡聚合物之<sup>1</sup>H-NMR光譜圖

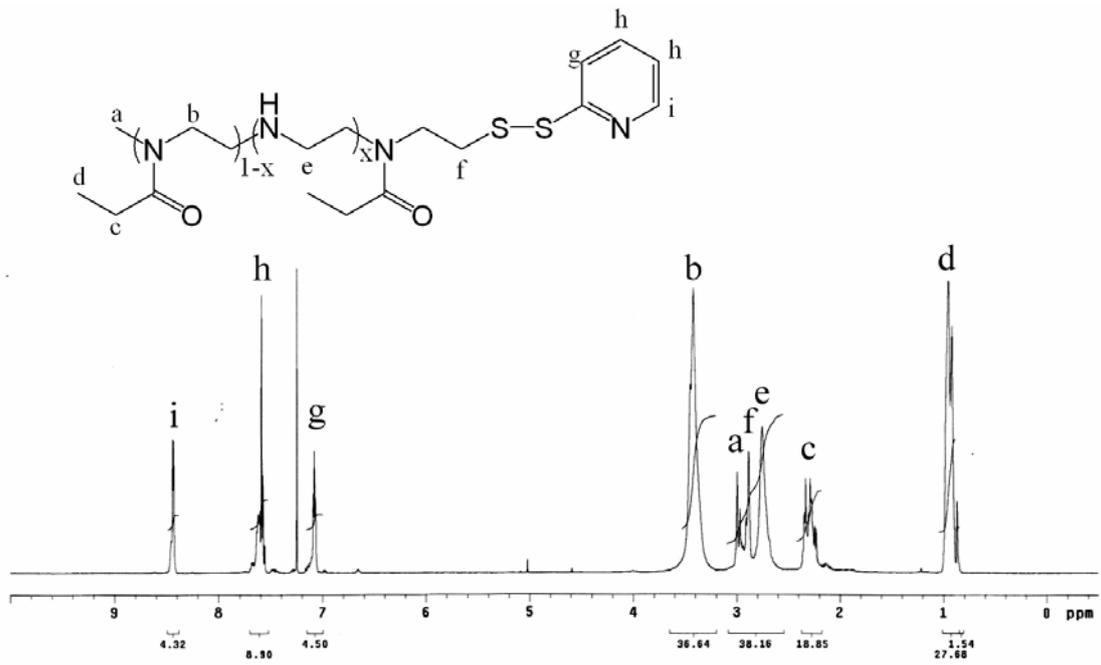


圖 4-3. P(EOz-co-EI)寡聚合物之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖

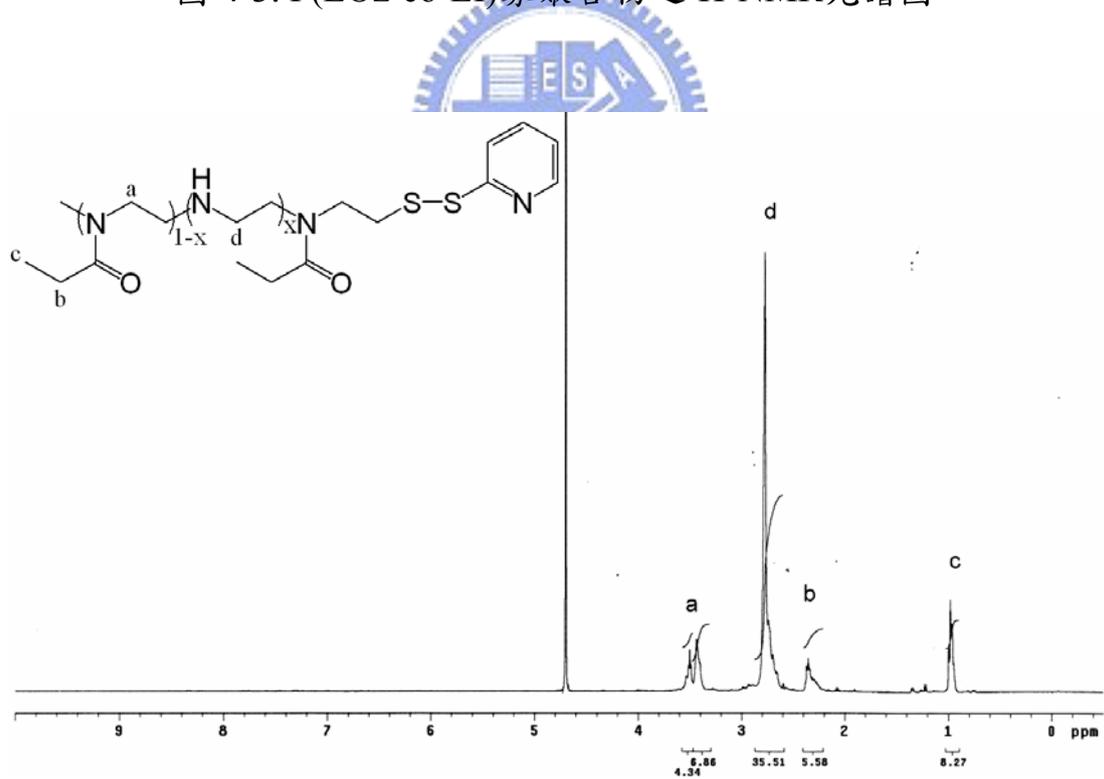


圖 4-4. 高分子P(EOz-co-EI)之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖

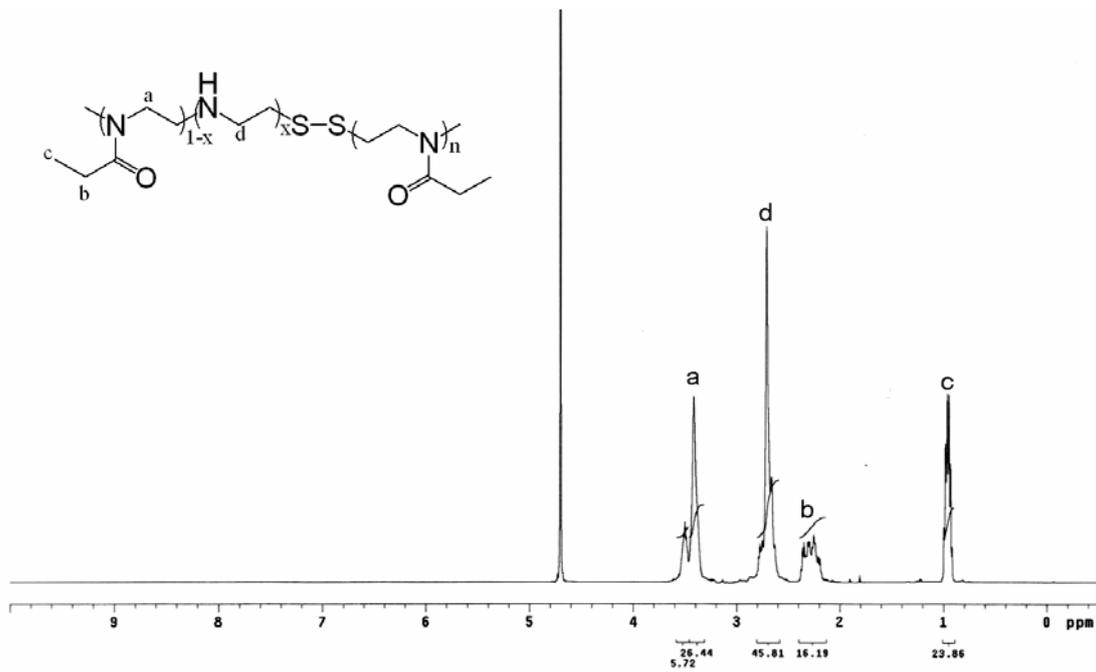


圖 4-5. 雙團聯共聚物PEOz-b-P(EOz-co-EI)之<sup>1</sup>H-NMR光譜圖

#### 4-1-2. 元素分析結果

將高分子以元素分析儀測量所含之碳、氫、氮、硫重量百分比，並與理論值做一比較，結果如表 4-1 所示。從表中可看出理論值與分析結果十分接近，因此證實各高分子已成功的合成出來。

表 4-1. 各種高分子之元素分析結果與理論值之比較

polymer		C	H	N	S
PEOz-Sac	理論值	60.39	9.13	14.00	0.32
	分析結果	60.42	9.08	14.01	0.36
PEOz-Py	理論值	60.35	9.08	14.05	0.64
	分析結果	60.36	9.01	14.09	0.68
P(EOz-co-EI)	理論值	57.47	10.46	24.35	1.10
	分析結果	57.54	10.48	24.31	1.03
PEOz-b-P(EOz-co-EI)	理論值	58.56	10.01	20.38	0.68
	分析結果	58.51	10.11	20.31	0.73

### 4-1-3. UV 光譜分析結果

由於 pyridyl 雜環在 UV 光譜下會有特定的吸收峰，所以可用來鑑定高分子上是否具有 pyridyl 官能基。將 PEOz-SAc 與 PEOz-Py 分別溶於甲醇溶液中，以 UV/Vis 測量其吸收值，結果如圖 4-6 所示。由圖中可看出 PEOz-Py 在 360 nm 處有一強烈吸收峰，顯示 PEOz 之末端官能基已由 thioacetate 轉變為 2-pyridyldithio。

將陽離子高分子 P(EOz-co-EI)與雙團聯共聚物 PEOz-b-p(EOz-co-EI)以甲醇溶解後測量其 UV 吸收光譜，結果如圖 4-7 所示。由於 p(EOz-co-EI)為 PEOz-Py 水解產物，所以末端仍保有官能基 2-pyridyldithio，在波長 360 nm 時有吸收值，反之雙團聯共聚物由於經過 disulfide exchange 已沒有 pyridine 官能基，因此沒有吸收峰產生。

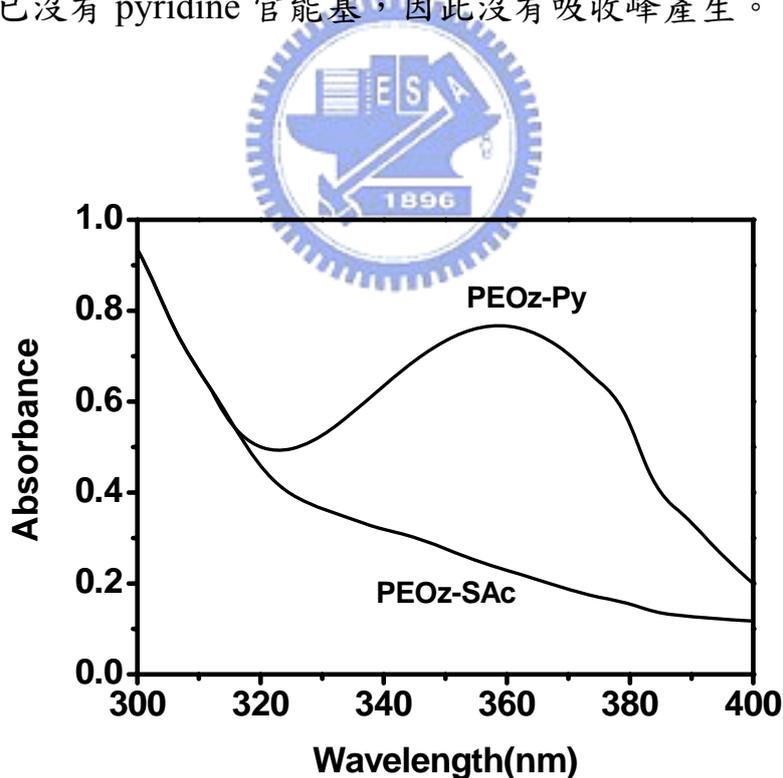


圖 4-6. PEOz-Sac 與 PEOz-Py 在甲醇溶液下之 UV 吸收光譜 (溶液濃度為 1 mM)

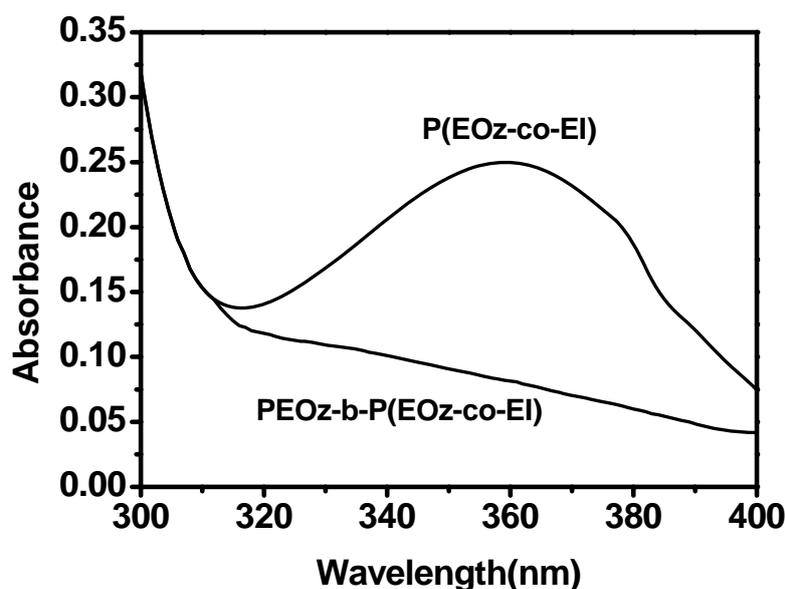


圖 4-7. P(EOz-co-EI)與雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI)在甲醇溶液中下之 UV 吸收光譜 (溶液濃度為 0.5 mM)

#### 4-1-4. GPC 分子量鑑定

GPC 為用來分析高分子分子量的層析技術。將所合成之 PEOz 以 GPC 作分子量的測定，結果如表 4-2。從表中可看到 PEOz 都有狹窄的分子量分布。

將 PEOz 1 及 PEOz 2 分別在兩種不同的酸性環境下水解，得到 P(EOz-co-EI)。如表 4-3 所示，PEOz 1 水解後之水解比例經  $^1\text{H-NMR}$  測定後為 76 % 及 89 %，分別命名 LI-76 與 LI-89，L 代表線性的聚乙烯亞胺，PEOz 2 之水解比例為 76 % 和 88 %，分別以 LII-76 與 LII-88 命名。P(EOz-co-EI) 的分子量利用 *N*-propionyl ethylenimine 的分子量 (FW 99) 及 ethylenimine 的分子量 (FW 43) 與水解比例經計算而得。以 LI-76 為例，水解前分子量為 10000，重複單元有 101 個，而水解比

例為 76 %，因此有 77 個 *N*-propionyl ethylenimine 與 24 個 ethylenimine，將各重複單元的數目乘上分子量相加後為 5700。

表 4-4 為將 PEOz 3 與上述四種 P(EOz-co-EI) 經 coupling reaction 後得到之雙團聯共聚物的分子量及 ethylenimine(EI) 單體含量，因 PEOz 3 的分子量約 4kDa，故雙團聯共聚物命名如表中所示。

表 4-2. PEOz 之數量平均分子量及分子量分佈

Polymer	Mn.	P.D.I.
PEOz 1	10000	1.12
PEOz 2	17000	1.20
PEOz 3	3600	1.18

表 4-3. P(EOz-co-EI) 之水解率及分子量

polymer	Hydrolysis (%)	Mn.
LI-76	76	5700
LI-89	89	5000
LII-76	76	9700
LII-88	88	8600

表 4-4. PEOz-b-P(EOz-co-EI) 之組成與分子量

copolymer	PEOz Mn.	EI content (%)	Copolymer Mn.
4kI-76	3600	56	9300
4kI-89	3600	66	8600
4kII-76	3600	63	13300
4kII-88	3600	73	12200

此外將線性聚乙烯亞胺 LI-76 與雙團聯共聚物 4kI-76 以 0.5M NaCl 水溶液溶解後，分別注入以純水為流動相之 GPC 進行分析，得到如圖 4-8 之層析圖。從圖中可看出 4kI-76 在層析管柱中之滯留時間 (retention time) 比 LI-76 來的短，顯示 4kI-76 之分子量確實大於 LI-76 之分子量。

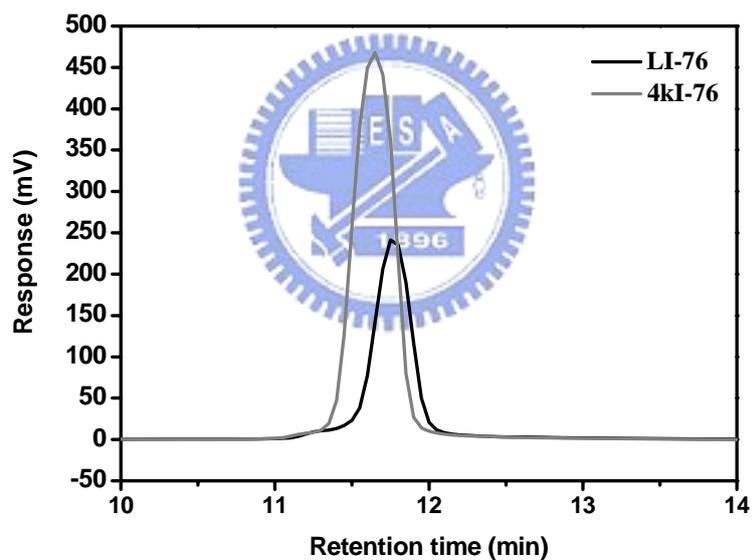


圖 4-8. LI-76 與 4kI-76 之凝膠滲透層析圖

## 4-2. 基本性質分析

### 4-2-1 質體 DNA 複製與萃取

質體DNA是一種存在於細菌染色體外的獨立環狀DNA小分子，可在宿主細胞中獨立進行複製(replication)，亦可以攜帶特定基因於宿主細胞中表現。本研究採用蟲螢光酶(firefly luciferase)基因作為報導基因，並鑲嵌在質體DNA pUHC-13-3 中，pUHC-13-3 大小為 5,160 個鹼基對(base pair) (圖 4-9)。由於pUHC-13-3 具有抵抗抗生素ampicillin的能力，以含有此質體DNA的大腸桿菌(*E. coli*)大量複製質體DNA時，加入ampicillin可以殺死此菌株以外的細菌，確保萃取出質體DNA的純度。菌株培養的時間控制在 16-18 小時，避免生長進入平原期。質體DNA萃取出來以純水配成溶液後，測量OD<sub>260</sub>得到濃度為 0.174mg/ml，而OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>在 1.9-2 之間，顯示製備的質體DNA純度很高。

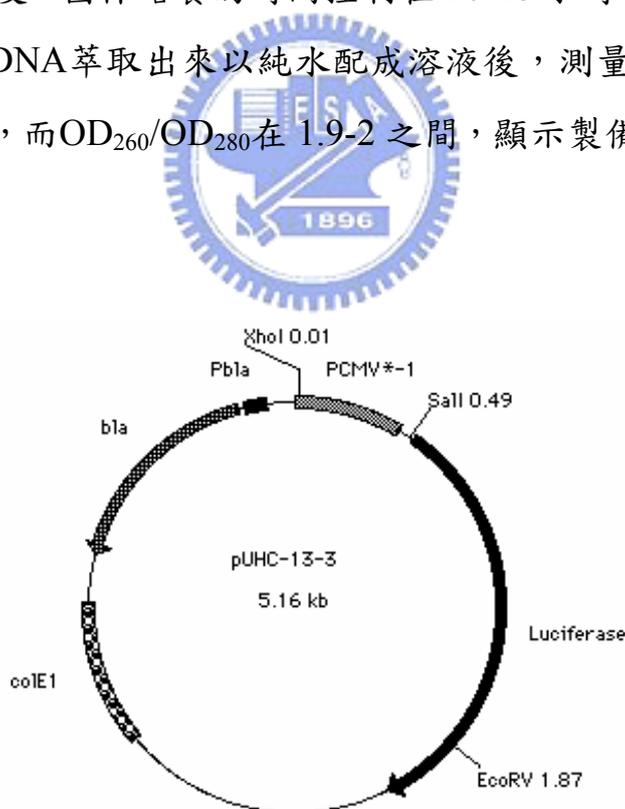


圖 4-9. 蟲螢光酶編碼質體(luciferase encoding plasmid) pUHC-13-3 之圖譜

#### 4-2-2. 聚複合體膠體電泳分析

電泳(electrophoresis)技術是基於在電場作用下，帶電的顆粒會向著其電性相反的電場方向移動，加以分離或區別不同的物質。帶電顆粒可以經由解離作用或表面上吸附其他帶電質點所造成，諸如各種離子，或是生物性大分子，如蛋白質、核酸、病毒顆粒、胞器等。電泳分析則是利用被分析物處於電場環境中，所帶電荷多寡的不同，而使得其在電場作用下具有不同的遷移速度來達到分析的目的。

電泳需有一介質，供作帶電顆粒泳動之場所，早期是在溶液中進行，但溶液的擴散現象大，不利於結果的觀察。之後改用噴濕的濾紙，但濾紙與分子間的吸引力大，導致摩擦力太大而發熱，會使分析物變質。此外由於 DNA 分子隨著鹼基對的增加，帶電量亦成比例增加，使得 DNA 分子不論長度均大約具相同的質量/電量比，因此並無法利用帶電性的差異而將之分離。後來發展出膠體電泳法，其是以半固態的膠體作為介質，不僅沒有在溶液下的擴散現象，產生的熱亦較少，且隨膠體製作的濃度不同，會在膠體中產生不同的孔洞大小。在濃度固定時，孔洞大小一致，則因大分子會移動的比小分子慢，所以可分離不同大小的分析物。

因此利用膠體電泳可分析 DNA 的純度、型態及 DNA 與高分子間包覆的緊密度，若 DNA 因變性導致結構變化或聚複合體的形成都可以由電泳結果來判斷。本研究使用洋菜膠(agarose gel)作為電泳的介質，將洋菜膠體熱溶後再冷凝，洋菜膠會以氫鍵形成凝膠。DNA 在膠體中經 ethidium bromide (EtBr) 染色，EtBr 會嵌入 DNA 鹼基中，以紫外線照射即放出螢光，可以肉眼觀察 DNA 的位置。

聚複合體的特性會隨著高分子/基因混合時的重量比例不同而改變，過少的高分子將無法中和 DNA 所具有的電荷，使整體偏向負電

性；反之聚複合體可能會因被未中和的高分子包覆在外層並帶有大量的正電荷。因此本研究亦將高分子與DNA製備成多種不同高分子/DNA重量比(P/D比)的聚複合體，並進行膠體電泳分析。在許多研究中分子量 25kDa的B-PEI皆表現出較佳的轉染效率，且已經商品化而容易取得，成為各種非病毒性基因載體在分析上的比較標準<sup>50</sup>，故本研究亦以此高分子作為各項實驗中的參考對象。圖 4-10 為分枝聚乙炔亞胺B-PEI與線性聚乙炔亞胺P(EOz-co-EI)聚複合體的電泳分析結果。在B-PEI的電泳圖中上下分別為負極與正極，所以帶負電的DNA marker與質體DNA在電場作用下會從放置樣品的槽孔(slot)中往下方跑。此外可看出質體DNA有 2 個帶狀條紋，分別是鬆弛 (relaxed)及超螺旋(supercoiled)結構(圖 4-11)，質體DNA在細菌內多為超螺旋結構，使佔有的體積較小，以節省空間，因此電泳時移動速度較快。與DNA maker的位置比對後可知萃取出質體DNA大約在 5,000 個鹼基對左右，和所採用的種類pUHC-13-3相符。

從圖 4-10，B-PEI 在 P/D 比為 0.5X 時仍有帶狀條紋，顯示可能有尚未與 B-PEI 接觸的自由 DNA 分子存在，當 P/D 比為 1X 時沒有任何的條紋產生，代表 B-PEI 已將 DNA 完全包覆，使 EtBr 不能嵌入 DNA 鹼基中而無法觀察到螢光。LI-76 與 LI-89 分別需要 8X 和 6X 的高分子來達到包覆的效果，同樣 LII-76 和 LII-88 也是 P/D 比分別在 8X 和 6X 能將 DNA 完全包覆。B-PEI 在結構中有一級胺，在純水中即質子化帶有大量正電荷，相較於 P(EOz-co-EI)有較高的電荷密度，因此僅需少量的高分子就能與 DNA 作用。而 P(EOz-co-EI)在不同水解比例下會帶有不同程度的正電荷，使基因包覆能力有所差異。

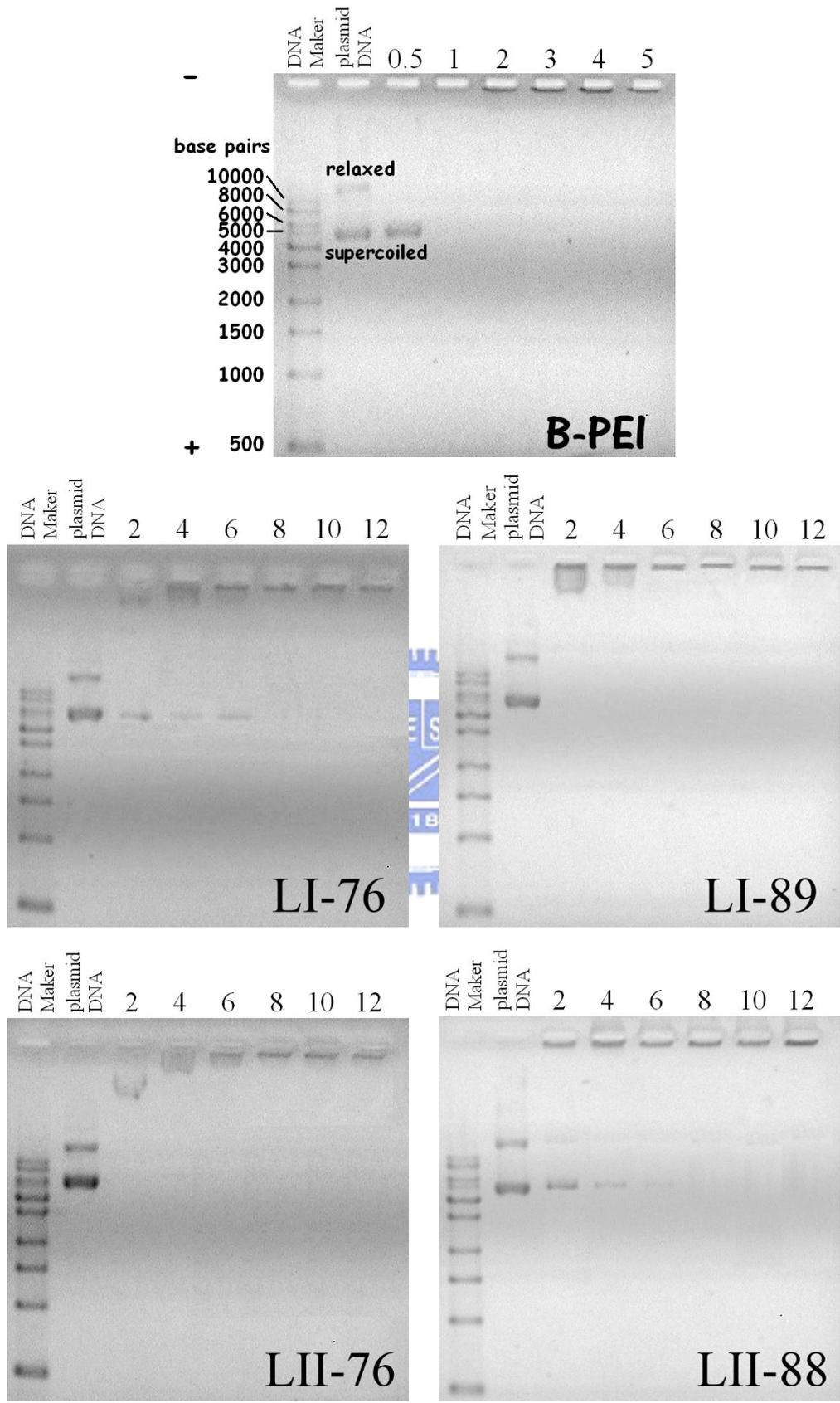


圖 4-10. B-PEI 及 P(EOz-co-EI) 聚複合體之膠體電泳分析 (圖中第一排數字代表 P/D 比)

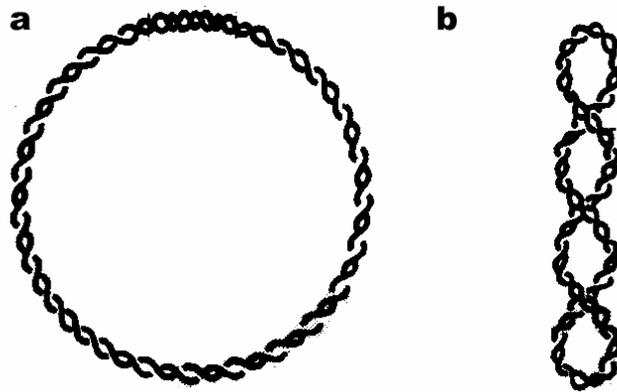


圖 4-11. 質體 DNA 的結構 (a) 鬆弛(relaxed) (b) 超螺旋 (supercoiled)



將雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體以電泳分析後結果如圖 4-12。從圖中可觀察到隨著高分子的量逐漸增加，聚複合體的移動性慢慢降低，其原因可能是整體帶電性由負電漸漸轉為電中性所致。結果顯示 4kI-76、4kI-89、4kII-76、4k289 分別在 14X、12X、10X、8X 時能完全包住質體 DNA，因此對於雙團聯共聚物而言，P(EOz-co-EI)鏈段的水解比例仍會影響到基因包覆能力。

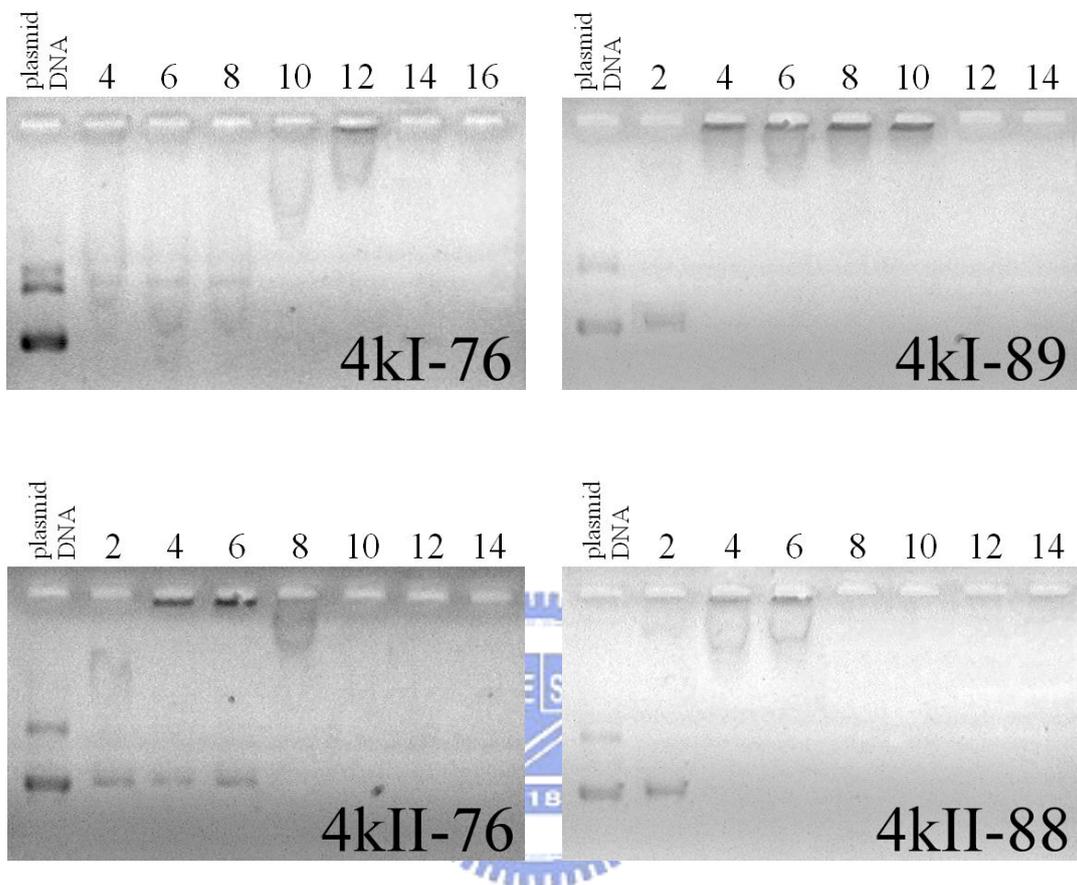


圖 4-12. PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體之膠體電泳分析 (圖中第一排數字代表 P/D 比)

### 4-2-3. 聚複合體粒徑與界面電位分析

為了能有效的進入細胞並進行轉染，聚複合體的結構要相當緊密且粒徑需夠小，而當在生物體內遞送時，聚複合體的粒徑也會影響在血液中的循環時間、於組織中的擴散、標的細胞的吞噬以及是否會被肝臟或脾臟中內質網細胞所清除。此外在不同的環境中，聚複合體可能會有不一樣的行為，導致粒徑的變化，進而造成在轉染效率上的各種表現。聚複合體表面電荷對於與細胞之間的作用也有相當大的影響；細胞膜上許多陰電性的蛋白質可以調控物質於細胞膜的進出，使帶有正電荷的聚複合體能夠輕易的經由內吞作用進入細胞，反之則不利於陰電性聚複合體的進入。但正電性的聚複合體有容易被蛋白質貼附的缺點，因此電中性的聚複合體可能會具有較好的基因遞送效果。

本研究測試聚複合體在純水中以及與生理環境之鹽濃度相同的 0.15M NaCl 水溶液中的粒徑大小和界面電位，以了解在不同溶液中聚複合體的行為。圖 4-13 為 B-PEI 聚複合體的分析結果，由圖中可以看出隨著 P/D 比逐漸增加，在水中的聚複合體粒徑慢慢變小，當 P/D 為 2 時，聚複合體達到穩定的狀態且大小約 100 nm，與文獻所測量到的大小相似<sup>51</sup>。界面電位亦隨 P/D 比的增加而越來越大，實驗結果顯示帶有負電以及不帶電的聚複合體有較大的粒徑，可能是因為凝集的現象所導致。但在 0.15M NaCl 溶液中，不論 P/D 比的大小，聚複合體的粒徑皆大幅增加 2~3 倍，因此 B-PEI 聚複合體也會因溶液中的離子而產生凝集。

同樣將 P(EOz-co-EI) 分別以純水與 0.15M NaCl 溶液製備聚複合體，並測量粒徑大小及界面電位隨 P/D 比的變化情況，結果如圖 4-14~4-17。從圖中可知所製備的聚複合體在純水中粒徑大約在 190 nm 左右，其中 LII-88 聚複合體具有較小的粒徑，大約為 170 nm。當

界面電位為負值或趨近於零時，聚複合體皆因凝集而有較大的粒徑，但隨 P/D 比的增加，界面電位在達到正值後，粒徑大小則變化不大，顯示帶正電的聚複合體由於靜電排斥力的關係而形成穩定的狀態。於 0.15M NaCl 離子強度的溶液中，所有 P(EOz-co-EI) 聚複合體皆有凝集的現象，且不論 P/D 比的高低、水解程度與分子量，粒徑都約在 400~500 nm 左右。

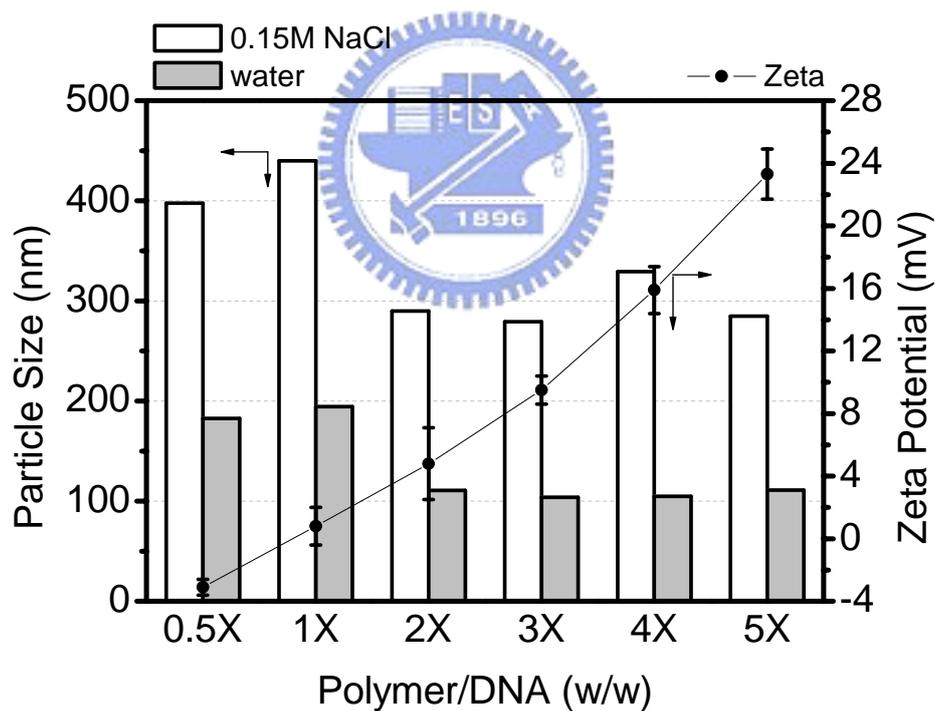


圖 4-13. B-PEI 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

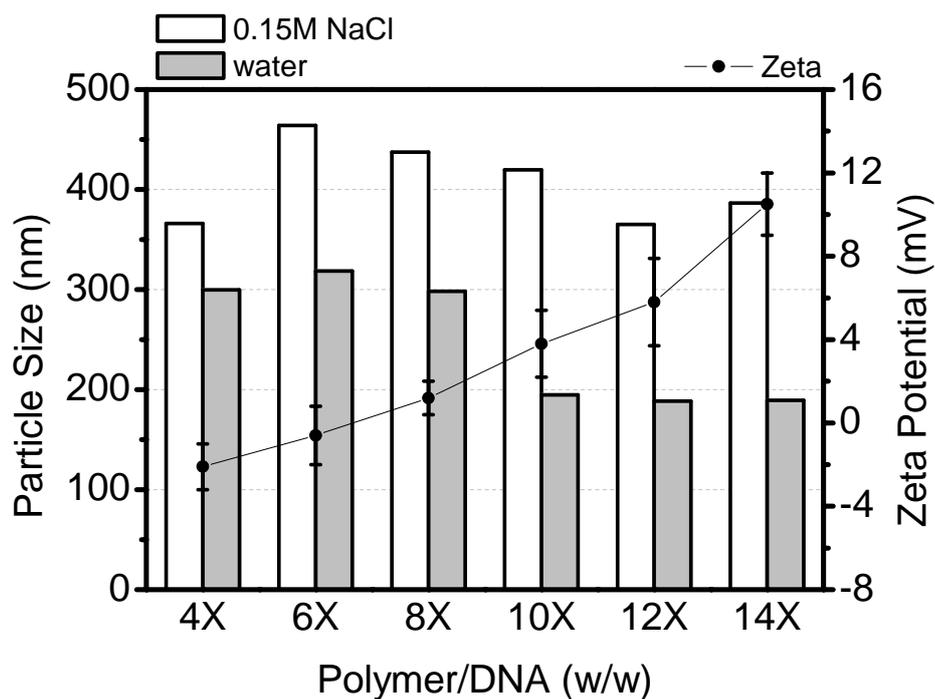


圖 4-14. LI-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

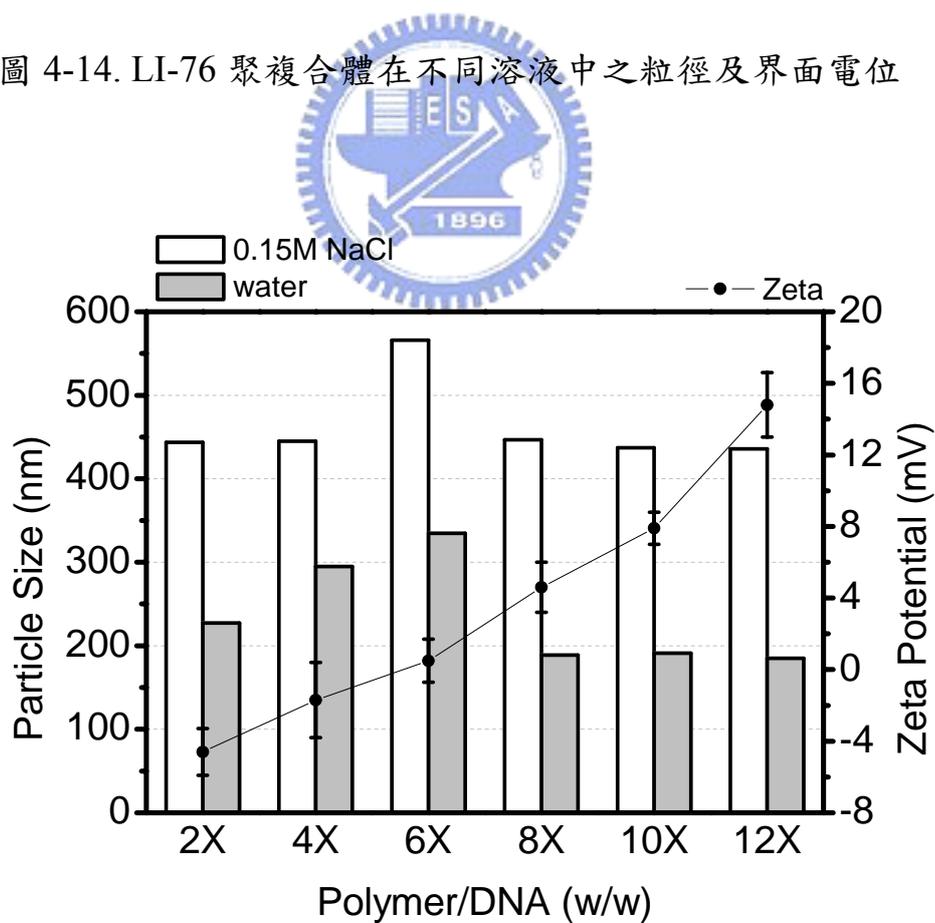


圖 4-15. LI-89 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

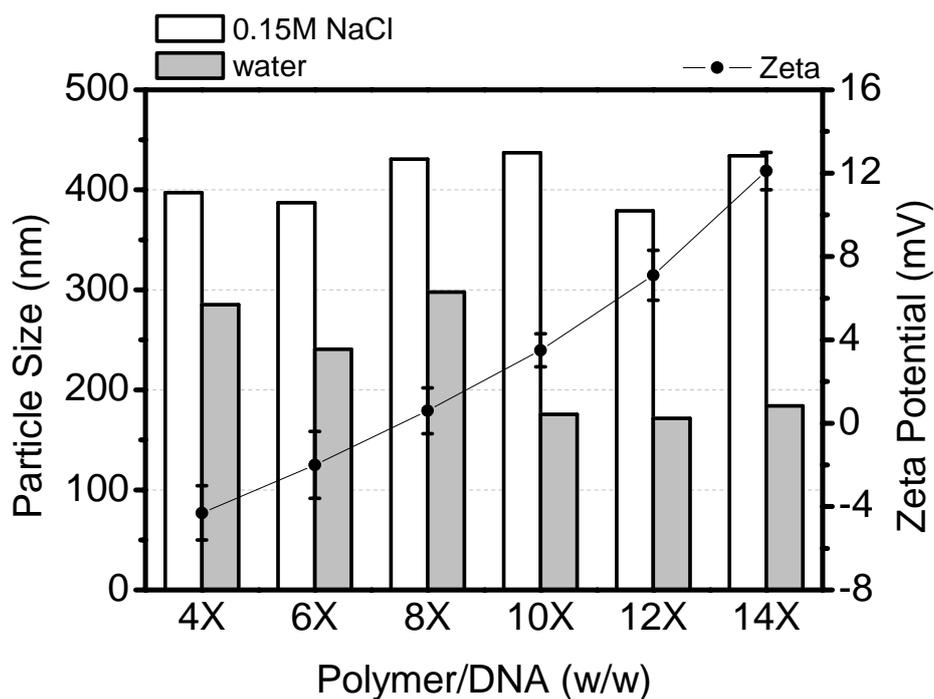


圖 4-16. LII-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

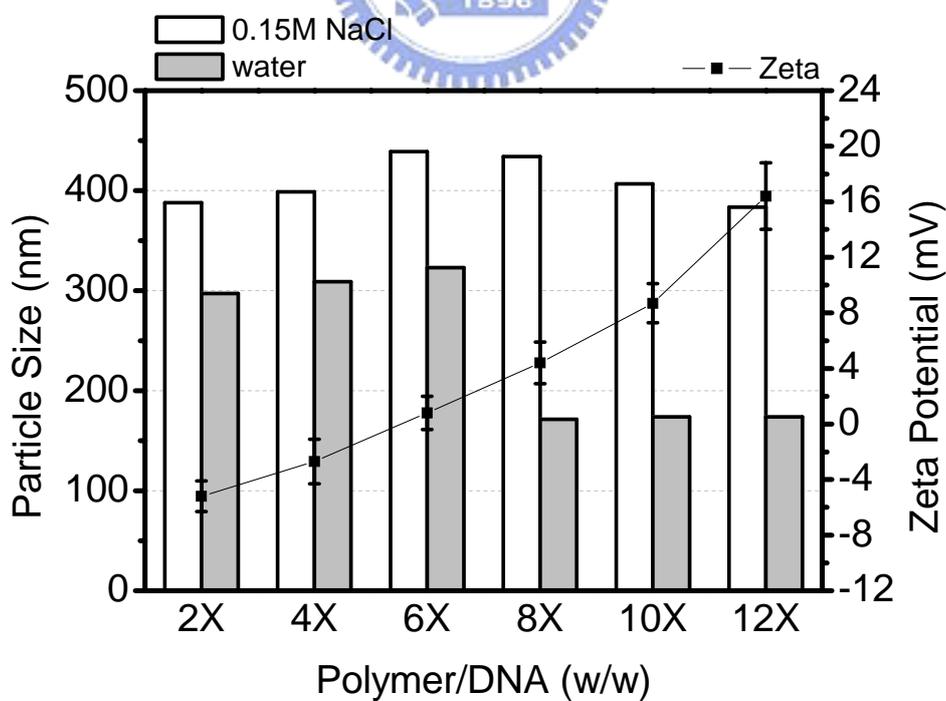


圖 4-17. LII-88 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

圖 4-18、4-19、4-20、4-21 為 PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體的粒徑與界面電位分析結果，由圖中得到聚複合體 4kI-76、4kI-89、4kII-76 和 4kII-88 分別在 14X、12X、10X、8X 時達到穩定的狀態，而當水解程度較高或分子量較大時，粒徑會較小，且隨著 P/D 比的提高，聚複合體粒徑由 300~400 nm 的凝集狀態減少到穩定時的 180~200 nm。在界面電位的變化上，也是隨 P/D 比逐漸增加，但當到達某一 P/D 比後，界面電位即不再增加，並維持在接近電中性，由於 PEOz 為非離子性的高分子，顯示 PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體的型態為核殼結構。而在 NaCl 溶液的測試中，PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體與在水中的粒徑大小差別不大，顯示親水性的 PEOz 確實有助於穩定聚複合體的結構。

綜合膠體電泳分析與粒徑及界面電位測量的結果，高分子與 DNA 要形成穩定的聚複合體所需的 P/D 比例則如表 4-5 所示。



表 4-5. 各種高分子包覆 DNA 所需要的最少 P/D 比例

polymer	P/D ratio for polyplex formation
B-PEI	2X
LI-76	10X
LI-89	8X
LII-76	10X
LII-88	8X
4kI-76	14X
4kI-89	12X
4kII-76	10X
4kII-88	8X

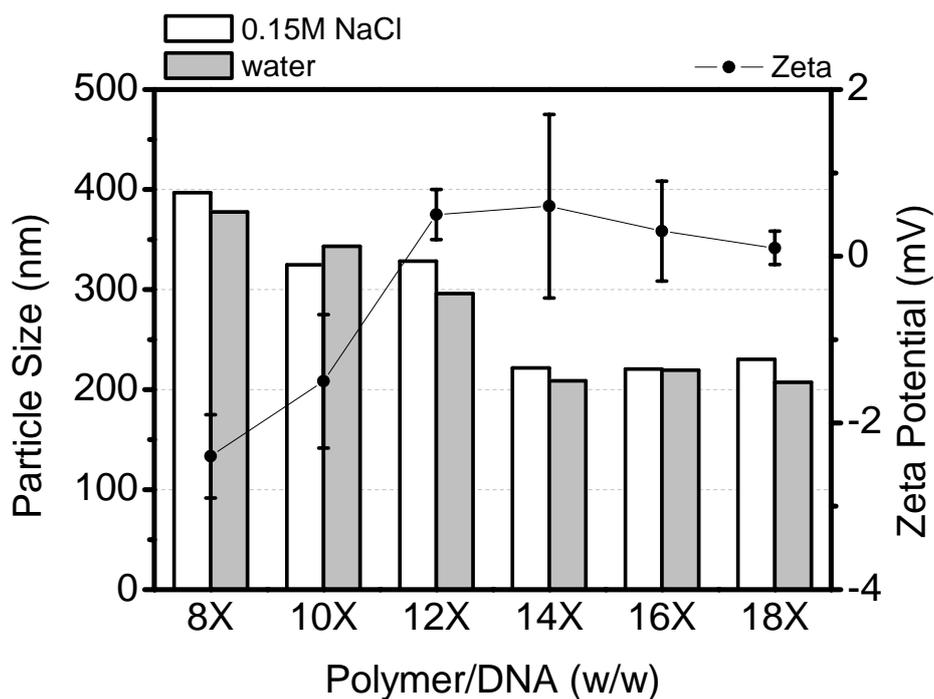


圖 4-18. 4kI-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

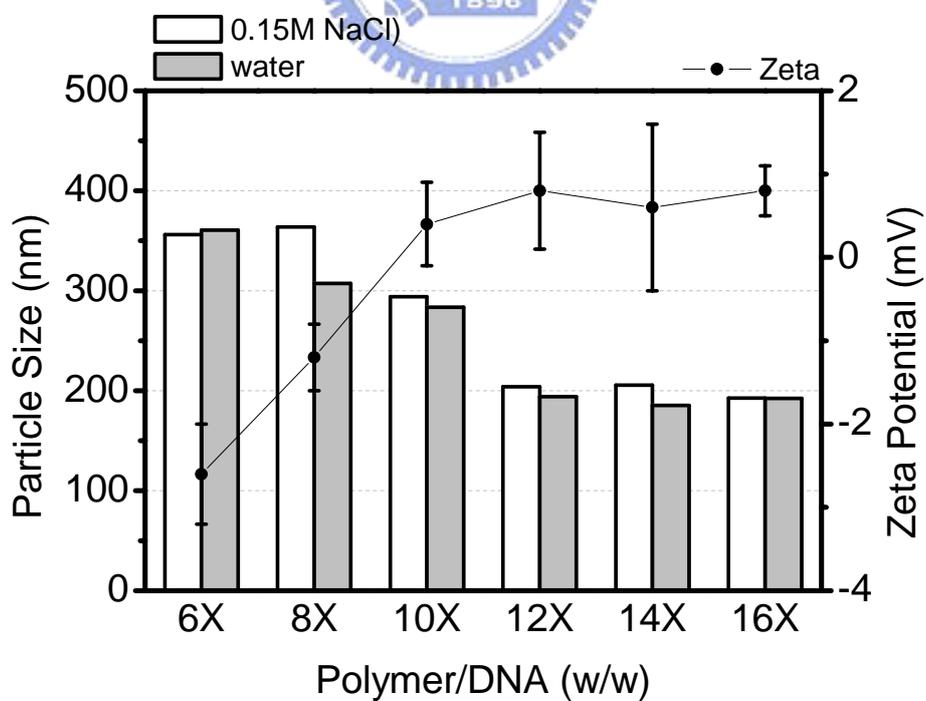


圖 4-19. 4kI-89 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

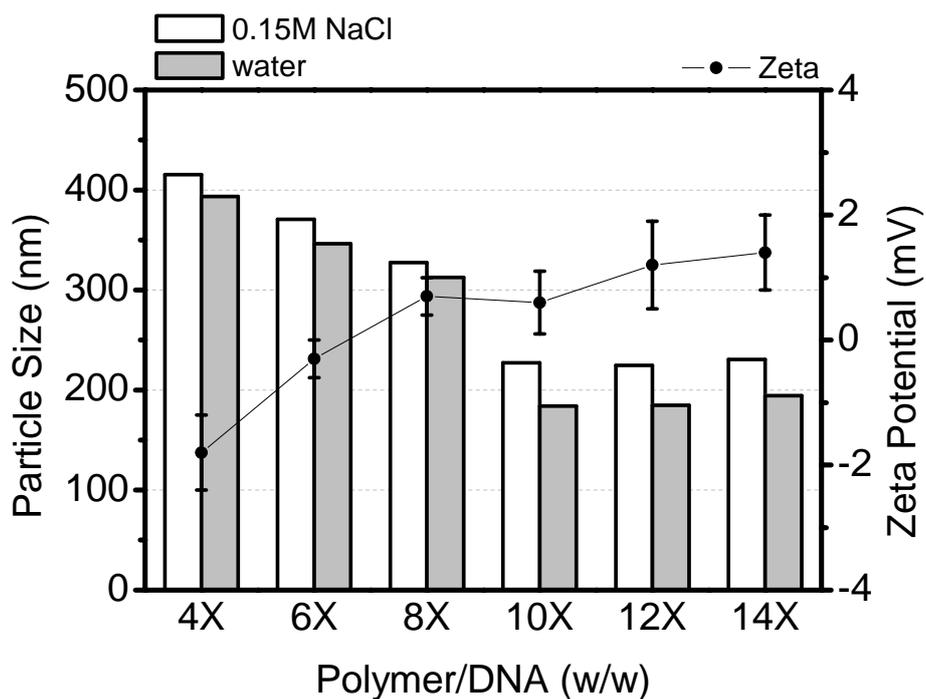


圖 4-20. 4kII-76 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

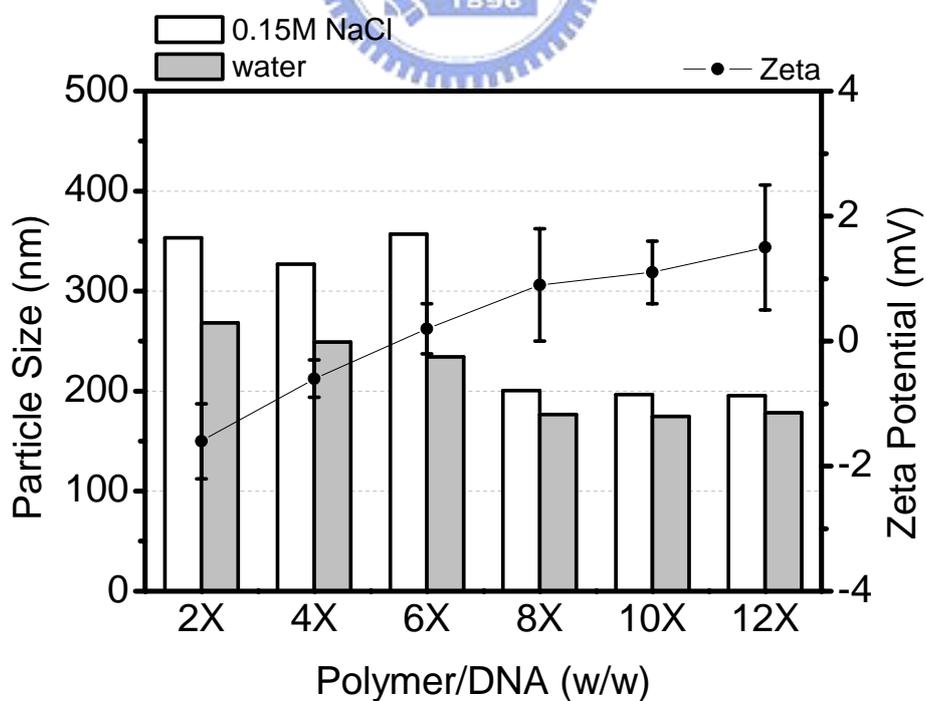


圖 4-21. 4kII-88 聚複合體在不同溶液中之粒徑及界面電位

#### 4-2-4. 聚複合體酸鹼應答性分析

PEOz 為一種具有環境應答性的高分子。如 PEOz 水膠在中性及鹼性環境下為膨潤狀態 (swelling)，在酸性環境下則呈現收縮狀態 (deswelling)。PEOz 對酸鹼值具有應答效果之原因為在 pH 較低的環境下，PEOz 會解離並在分子內與分子間產生氫鍵而聚集，形成緊密的結構。

為瞭解雙團聯共聚物在形成聚複合體後是否具有酸鹼應答的特性，首先以 pH 0.5 為間隔製備 pH 7 至 pH 4.5 等不同的緩衝溶液，再把聚複合體與緩衝溶液混合後，置於 37°C 的水浴中，並於 1 小時後取出部份樣品進行膠體電泳分析，結果如圖 4-22。從圖中可觀察到雙團聯共聚物 4kI-76 聚複合體在中性環境下，聚複合體仍很穩定，但在 pH 5.5、5 與 4.5 則可看到條狀紋路，代表聚複合體已解離，使 DNA 能被 EtBr 染色而發出螢光，4kI-89 聚複合體同樣在 pH 5.5、5 與 4.5 會產生解離。在 4kII-76 聚複合體的部分可看到在 pH 5.5 有輕微的解離，但隨著 pH 值下降聚複合體則會有明顯的解離現象，而 4kII-88 聚複合體只有在 pH 5 與 4.5 有輕微的解離，顯示當 P(EOz-co-EI) 鏈段的分子量提高造成 DNA 與高分子的結合較緊密，使 PEOz 不易將聚複合體解離，故 PEOz 在酸性環境下聚集所產生的力量必須要和陽離子高分子與核酸之間的作用力平衡，或是大於此靜電作用力，才能使聚複合體具有酸鹼應答的效果。為了瞭解 4kI-76 聚複合體的分解是否由 PEOz 所造成，同時對線性聚乙烯亞胺 LI-76 作試驗，結果得到 LI-76 聚複合體在不同環境下都相當穩定 (圖 4-22)，因此可推論藉由 PEOz 的酸鹼應答確實能使聚複合體結構改變進而將內含的核酸釋放出來。

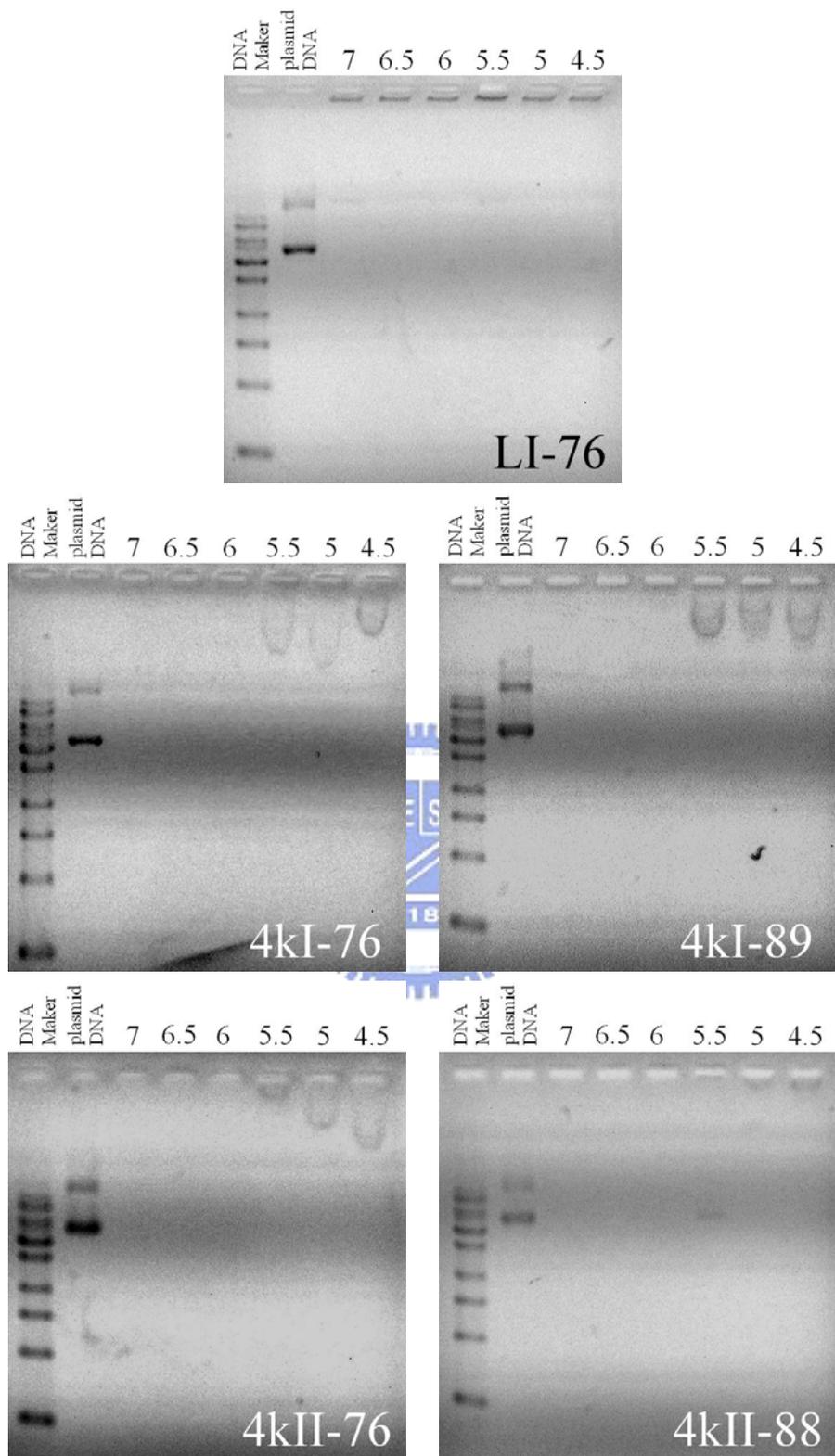


圖 4-22. LI-76 與 PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體在各種 pH 值之酸鹼  
 應答分析圖 (圖中第一排數字代表 pH 值)

### 4-3. 生物性質分析

#### 4-3-1. 細胞毒性分析結果

基因載體除了須具備遞送核酸的能力外，亦要求不會對細胞造成傷害，以免影響到細胞正常功能的表現或導致死亡。本研究用 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 來試驗高分子材料所引發的細胞毒性，進而了解不同結構對細胞會造成如何的影響。MTT Assay 或稱 Tetrazolium assay 是一般常用的細胞毒性試驗方法，MTT 為黃色水溶性固體，可被細胞內粒腺體 (mitochondria) 中的去氫酵素 (dehydrogenase) 代謝，將 tetrazolium ring 切斷還原成紫色不溶性沈澱物 formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-formazan) 並堆積在細胞中，以 DMSO 溶解再測量 570 nm 吸光值 (O.D.) 可得到 formazan 產量的多寡。因活細胞才具有活性的粒腺體酵素，故測得的吸光值會與活細胞數量成正比關係，因此利用 formazan 產量的多寡來評估細胞的存活率。活細胞代謝產生 formazan 之反應如圖 4-23 所示：

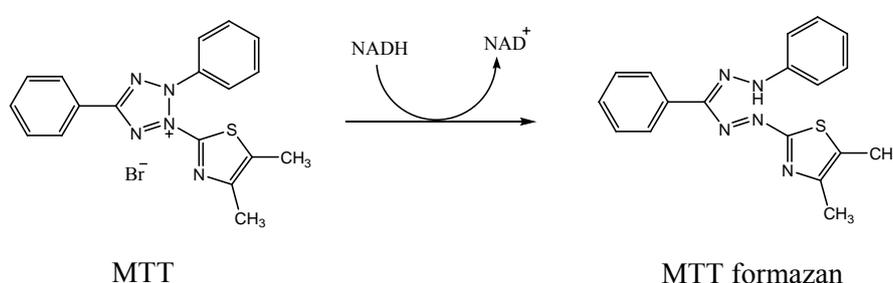


圖 4-23. 活細胞中 MTT 的代謝反應

圖 4-24 為人類子宮頸癌細胞 HeLa 在分別含有 B-PEI 與 P(EOz-co-EI)之培養基中培養 24 小時後得到的細胞存活率。結果顯示 B-PEI 在濃度大於 0.1 mg/ml 的存活率皆不超過 10 %，即使在 0.01 mg/ml 的濃度之下，活細胞也僅有約 55 %，因此 B-PEI 具有相當高的細胞毒性，其原因可能為 B-PEI 會造成細胞膜的破壞，使細胞死亡<sup>52</sup>。P(EOz-co-EI) 的細胞毒性明顯較 B-PEI 低，濃度在 0.1 mg/ml 時四種高分子的細胞存活率仍有 60 % 以上。而細胞存活率與水解程度有密切的相關性，水解比例較大則毒性也較高。可能由於所合成的分子量差異不大，因此無法看出分子量對細胞存活率的影響。

將 P(EOz-co-EI) 中毒性較低的 LI-76 與 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 對 HeLa 之細胞存活率作一比較，結果如圖 4-25。由圖中可看到在低濃度下細胞皆有 90% 以上的存活率，但濃度高於 1mg/ml 時細胞存活率明顯會受到雙團聯共聚物中 P(EOz-co-EI) 鏈段之水解比例與分子量的影響，水解率越高或分子量越大皆會使活細胞的數量減少。然而雙團聯共聚物的細胞毒性不論是 4kI-76 或 4kII-88 皆低於 LI-76，其中 4kI-76 在 10 mg/ml 的濃度之下仍有 60 % 的細胞存活，相較於 LI-76 有兩倍的提升，顯示 PEOz 可以有效降低 P(EOz-co-EI) 之細胞毒性。

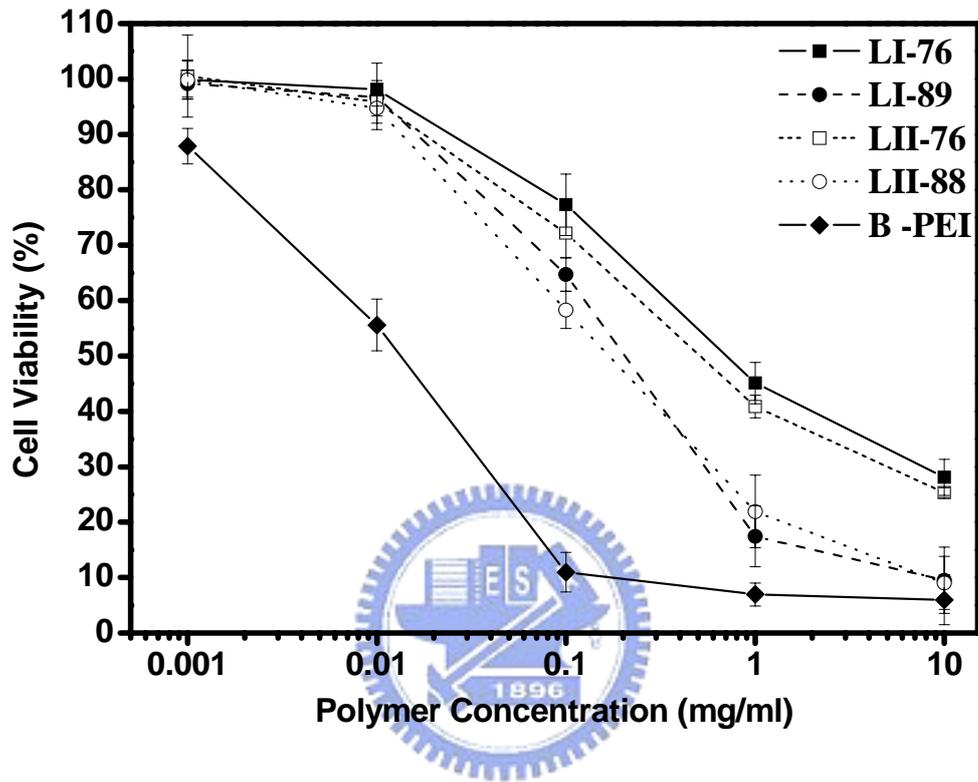


圖 4-24. B-PEI 與 P(EOz-co-EI) 在不同濃度下之 HeLa 細胞存活率 (n =

6)

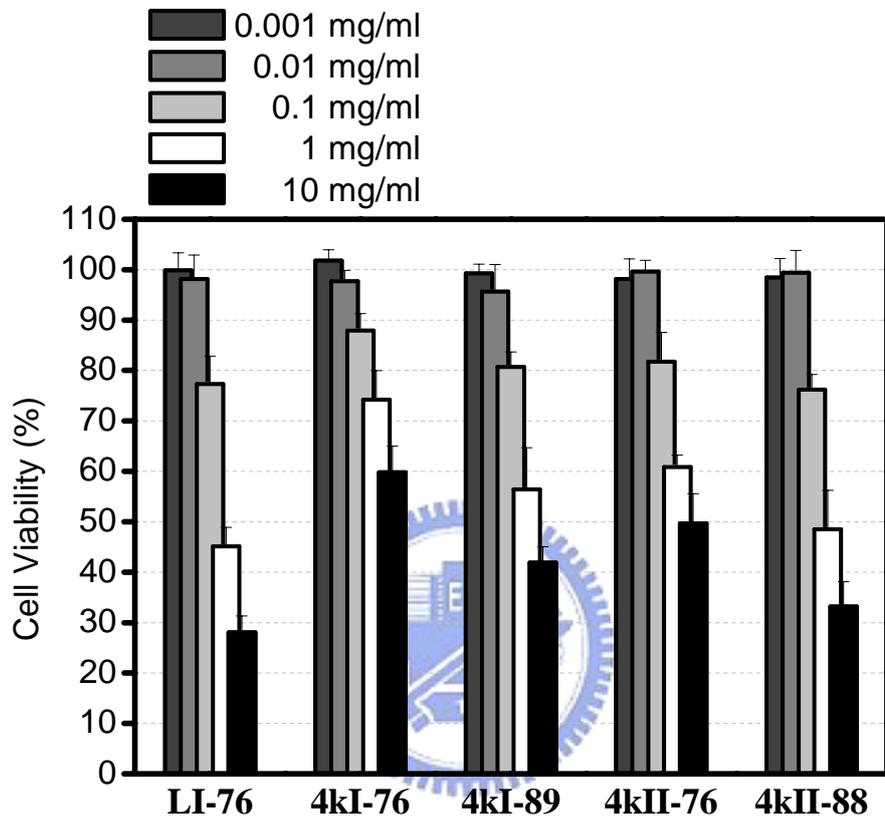


圖 4-25. LI-76 與 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 在不同濃度下之 HeLa 細胞存活率 (n = 6)

### 4-3-2. 轉染效率分析

生物冷光(bioluminescence)是在大自然中生物所發出的光之總稱，這些會發光的生物包括細菌、螢火蟲、昆蟲、水生藻類及動物等。這些光的產生可直接以肉眼觀察或利用儀器做科學化的判讀及計量，因此生物冷光成為現今分子生物學家所常應用的系統與研究的目標。然而並非所有會發光的生物體都可被利用，目前已被選殖出並應用於基因表現及報告者，只有細菌、螢火蟲及水母的冷光基因。螢火蟲的發光機制是靠螢火蟲螢光酵素(firefly luciferase)與蟲螢光素(luciferin)的作用而來，發光反應在常溫、常壓下非常有效率地進行，其中三磷酸腺苷(ATP)提供反應所需能量而產生複雜的氧化還原反應(圖 4-26)，這種反應是持續性得進行著。由於螢火蟲的發光過程不會有過多的熱，因此效率非常高，僅約 2-10 %的能量轉為熱量，而其餘能量完全用來發光，因此螢火蟲的光亦稱為「冷光」。

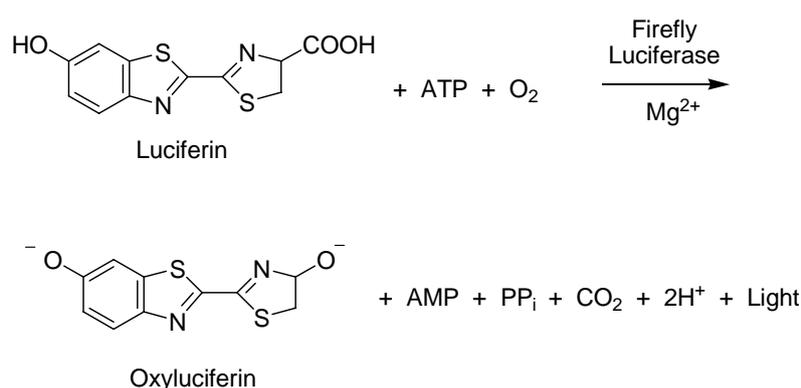


圖 4-26. 螢火蟲螢光酵素與螢光素之發光反應

螢火蟲的冷光基因被廣泛應用在基因載體的研究上，主要是由於以下原因：

- (1). 不需經轉譯後的修飾過程(post-translational processing)即可直接被轉譯成具酵素活性的蛋白質，所以可立即得到報導基因之活性。
- (2). 在目前已知的化學發光(chemiluminescence)反應中，其可產生最高量子效率的光產物，因此分析靈敏度非常高，並且在宿主細胞中無背景冷光(background luminescence)的出現，不會干擾定量分析的判讀。
- (3). 此分析方法非常簡單、快速、省時，一個樣品僅需數秒就能測量完成。

基於上述之優點，利用螢火蟲冷光基因來分析非病毒性載體的轉染效率為目前在基因治療上最常用之方式。

通常轉染效率較高的基因載體會使細胞產生較多的蟲螢光酶，並得到較大的冷光強度。冷光強度雖然與產生的蟲螢光酶數量成正比，但於實驗的操作上並無法保證所有實驗細胞的數目完全相同，增生或凋亡速率也一致，因此細胞產生的蛋白質總量可能也有所不同。為了提供一個比較基準，冷光的強度必須除以總蛋白質的數量，才是真正的轉染效率。

在轉染效率的測量上，冷光強度定量分析時依照市面上之蟲螢光酶檢驗系統(Luciferase assay system)指示取轉染後之細胞萃取液作分析，蛋白質的定量則以蛋白質染劑分析細胞萃取液中所含的蛋白質總量。染劑的檢量線以胎牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)反應 10 分鐘測量波長 595 nm 的吸收度繪製，如圖 4-27 所示。

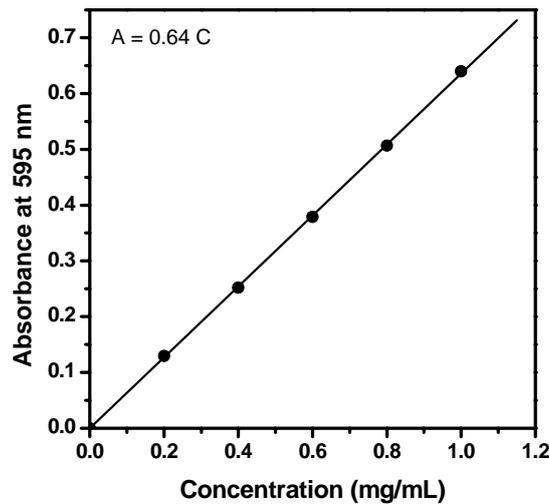


圖 4-27. BSA 蛋白質濃度檢量線

本研究在轉染效率的分析上，DNA 的使用量固定為 5  $\mu\text{g}$ ，並分別與 B-PEI、P(EOz-co-EI)及雙團聯共聚物混合配製成聚複合體，與 HeLa 共同培養 48 小時使細胞吞噬，再將細胞溶解並離心後取上清液測量相對發光值(relative light unit, RLU)與蛋白質含量。圖 4-28 為 B-PEI 於不同 P/D 比之轉染效率以及細胞所產生的蛋白質含量，由圖中可發現 B-PEI 的轉染效率隨著 P/D 比增加而提高，在 P/D 比為 2 時達到最大，接著又慢慢減少，蛋白質產量則是當高分子的比例逐漸增加而有明顯降低。由先前的實驗可知高分子的比例小於 1 時，聚複合體呈陰電性或電中性，顯示帶正電的聚複合體較容易被細胞吞噬，進而表現出較高的轉染效率。從細胞存活率的分析中 B-PEI 具有很強的細胞毒性，因此造成大量的細胞死亡，高分子濃度越高則存活率越低，而 P/D 比的增加也代表添加較多的高分子，所以使蛋白質總產量相對的變少，間接地限制轉染效果。

以線性聚乙烯亞胺 P(EOz-co-EI)和 PEOz-b-P(EOz-co-EI)分別對 HeLa 進行 Luciferase 基因的轉染，結果如圖 4-29 與圖 4-30 所示。由

圖 4-29 中可看出 LI-76 和 LII-76 在 P/D 比為 12 倍時達到最高的轉染效率，LI-89 與 LII-88 則為 10 倍，同時水解程度較大的 LI-89、LII-88 分別比 LI-76 及 LII-76 有較高的螢光產生量，但相對的蛋白質也較少，然而不論水解的比例大小，蛋白質產量皆隨著高分子比例的增加而有降低的趨勢。在雙團聯共聚物的部分從圖 4-30 中可看到 4kI-76、4kI-89、4kII-76、4kII-88 分別在 14X、12X、10X、8X 達到最大的螢光量，同樣可看到水解程度對轉染效率有相關性，水解比例較大者皆表現較強的轉染效率，在蛋白質產量方面，4kI-76 和 4kII-76 在任何 P/D 比中都差不多，4kI-89 和 4kII-88 雖然仍可見到下降的現象，但比相對應的線性聚乙烯亞胺之降幅已較為緩和。

圖 4-31 為將 DNA 直接對細胞進行轉染與各種高分子聚複合體的最佳轉染效率與蛋白質產生量所作之比較，從圖中可看出 DNA 的直接轉染產生的效果相當低，與全部高分子有將近 1000 倍的差距，然而卻有最高的蛋白質產量，顯示 DNA 對細胞所造成的影響不大。B-PEI 的轉染效率最高，與高水解率的線性聚乙烯亞胺 LI-89 和 LII-88 都有相當高的基因轉染效率，也產生最少的蛋白質，對於線性聚乙烯亞胺而言，在水解率相同的情況下，分子量對轉染效率沒有影響。雙團聯共聚物 4kI-76 和 4kI-89 之最佳轉染效率分別與線性聚乙烯亞胺 LI-76 和 LI-89 相當，但 4kII-76 以及 4kII-88 則有降低的趨勢。因此推測 4kII-76 與 4kII-88 可能是由於外層的 PEOz 接近電中性或立體障礙的關係，造成細胞吞噬的機率較低，而 4kI-76 與 4kI-89 則因為具明顯的酸鹼應答性，使進入細胞的聚複合體能有效地將 DNA 裸露出來，進而提升了轉染效率。

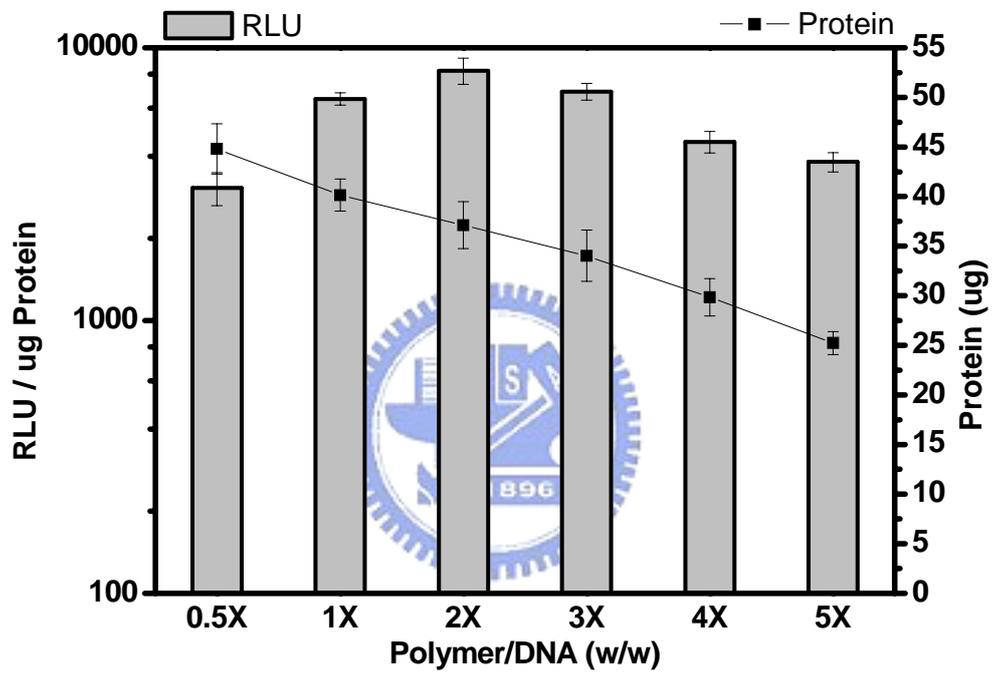


圖 4-28. B-PEI 聚複合體之轉染效率及蛋白質產量 (n = 3)

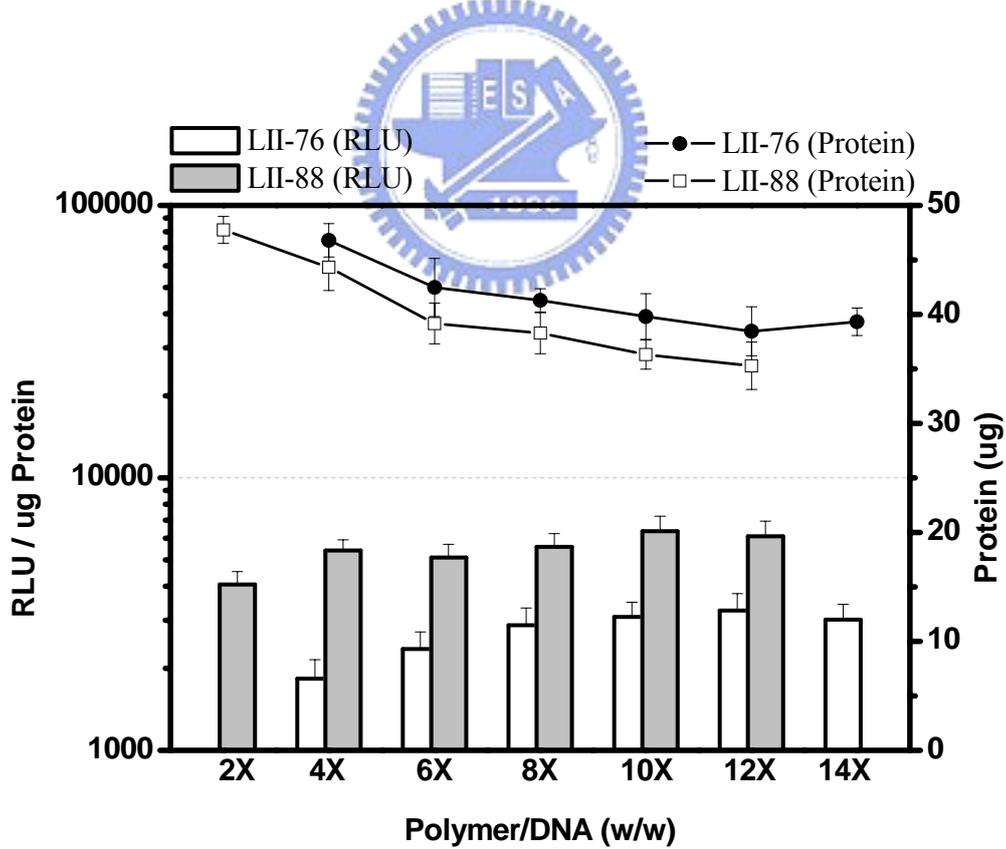
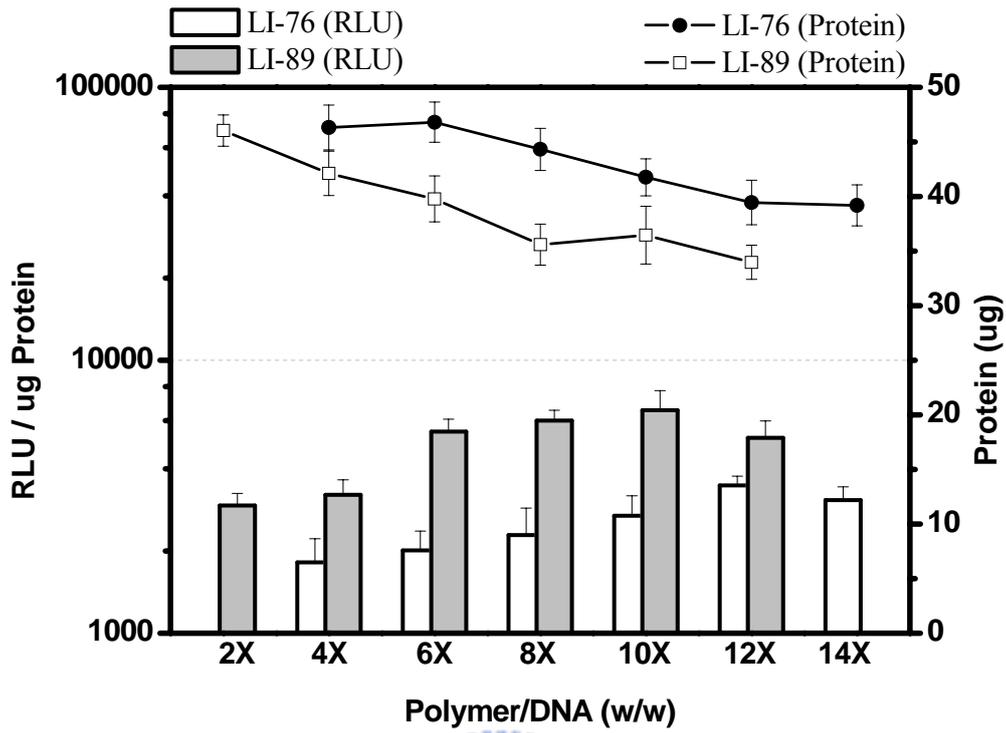


圖 4-29. P(EOz-co-EI)聚複合體之轉染效率及蛋白質產量(n = 3)

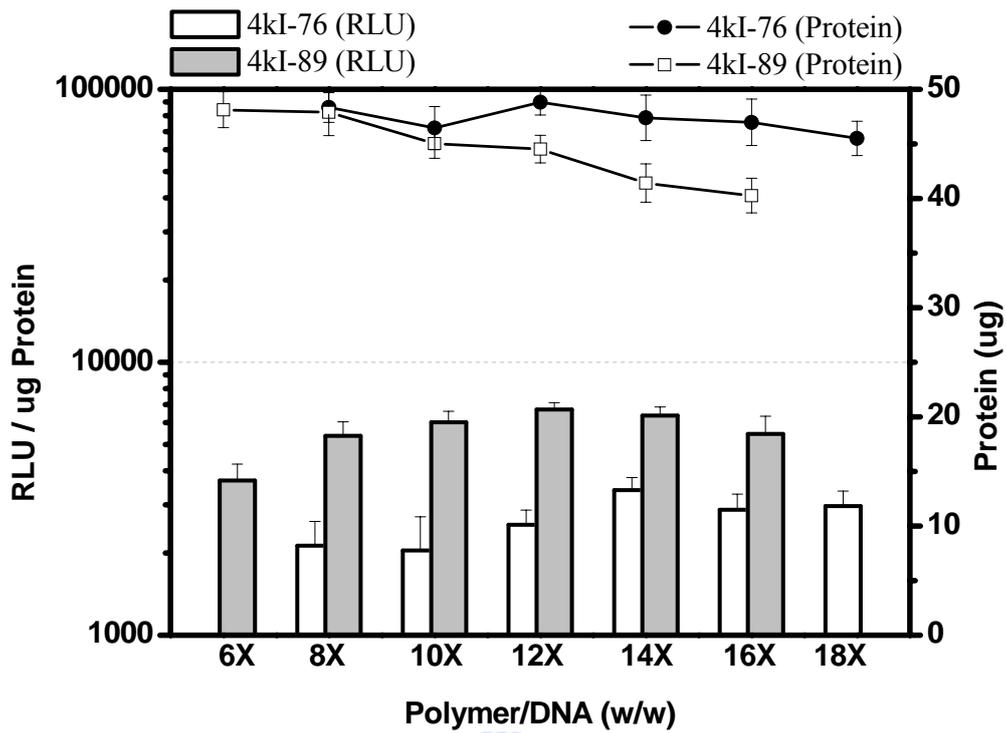


圖 4-30. PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體之轉染效率及蛋白質產量(n =

3)

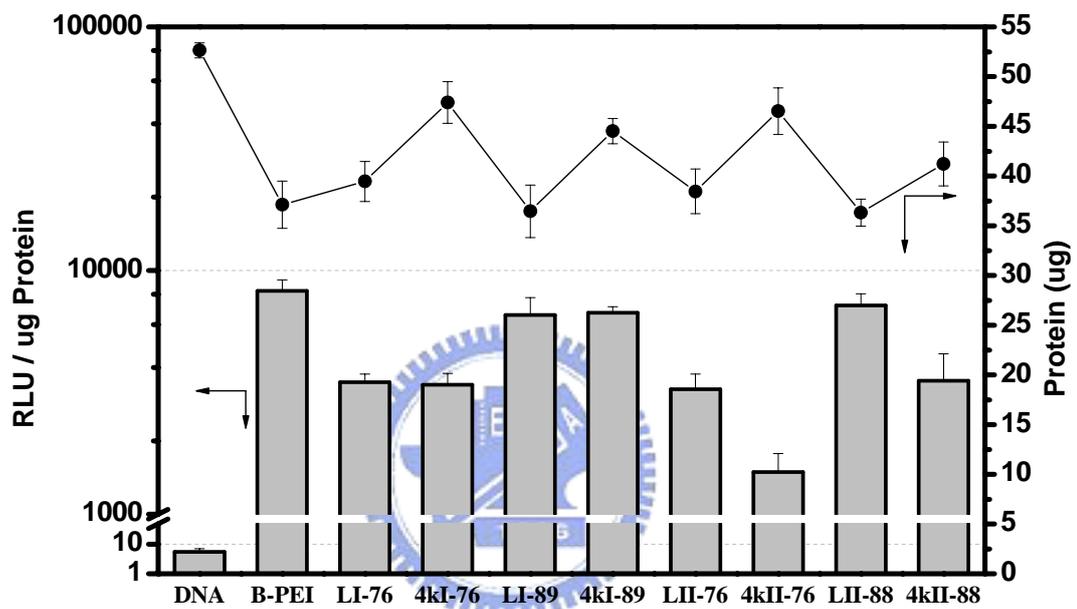


圖 4-31. DNA、P(EOz-co-EI) 及 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體最佳轉染效率與蛋白質產量之比較 (n = 3)

## 五、結論

由於陽離子高分子基因載體皆是透過胞飲作用進入細胞，並歷經核內體等酸性胞器，因此本研究以雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 作為基因載體，希望藉由 PEOz 對於酸鹼的應答幫助 DNA 與高分子脫離，使 DNA 能夠在細胞核中進行轉錄，進而提高基因表現的效果，同時降低對細胞的毒性。將雙團聯共聚物與 DNA 配製為聚複合體後，進行電泳分析，測量粒徑、表面電位、型態、酸鹼應答性、轉染效率以及高分子之細胞毒性，得到以下結論：

1. 雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 會隨線性聚乙炔亞胺 P(EOz-co-EI) 鏈段之水解比例與分子量的增加而有較強的 DNA 包覆能力。
2. 經由粒徑分析的結果得到 P(EOz-co-EI) 聚複合體的大小約在 190 nm，而 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體則為 200 nm 左右，P(EOz-co-EI) 鏈段的水解比例或分子量較高皆會使 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體有較小的粒徑。此外溶液的離子強度會造成 P(EOz-co-EI) 聚複合體的凝集，但雙團聯共聚物所形成的聚複合體則相當穩定。
3. 界面電位分析顯示 PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體表面為接近電中性的狀態。
4. PEOz-b-P(EOz-co-EI) 聚複合體確實具有酸鹼應答性，且在 pH 5.5 之下皆能造成聚複合體的解離。但解離的程度和 P(EOz-co-EI) 鏈段的大小有關係，P(EOz-co-EI) 鏈段越長則對酸鹼值變化的應答越不明顯。

5. 在細胞毒性的試驗中 B-PEI 的毒性最大，P(EOz-co-EI)次之，而隨著水解比例的增加，對細胞的傷害也越大，雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI)則有最高的存活率。
6. 在基因轉染中水解比例相對於分子量更具影響力，水解比例較大的線性聚乙烯亞胺之最佳轉染效率皆有趨近於 B-PEI 的表現。
7. 對酸鹼有明顯應答效果的 PEOz-b-P(EOz-co-EI)聚複合體之轉染效率近似 P(EOz-co-EI)聚複合體，反之則表現較低的基因轉染效果。

從上述的結果可知，雙團聯共聚物 PEOz-b-P(EOz-co-EI)相較於 P(EOz-co-EI)不但具有低細胞毒性，聚複合體的穩定性也較高，此外也具酸鹼應答性，而且能保有與 P(EOz-co-EI)相當的轉染效率。因此本研究所合成之雙團聯共聚物為優良的陽離子高分子基因載體，故具有應用在基因治療的潛力。

## 六、參考文獻

1. Mulligan R.C. The basic science of gene therapy, *Science* 260, 926-932, 1993
2. Budker V. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process, *J Gene Med* 2, 76-88, 2000
3. Verma I.M., Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects, *Nature* 389, 239-242, 1997
4. Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., Carter C.S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years, *Science* 270, 475-480, 1995
5. Pollard H., Remy J.S., Loussouarn G., Demolombe S., Behr J.P., Escande D. Polyethyleneimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells *J. Biol. Chem.* 273, 7507-7511, 1998
6. Brissault B., Kichler A., Guis C., Leborgne C., Danos O., Cheradame H. Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection, *Bioconj. Chem.* 14, 581-587, 2003
7. Wang C.H. and Hsiue G.H. Synthesis and Characterization of Temperature/ pH Sensitive Hydrogels Based on Poly(2-ethyl-2-oxazoline) and Poly(D, L-lactide), *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* 40, 1112-1121, 2002
8. Forrest M.L., Koerber J.T., Pack D.W. A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery, *Bioconj. Chem.* 14, 934-940, 2003
9. Anderson W.F. Human Gene Therapy, *Nature* 392, 25-30, 1998
10. Eglitis M.A. and Anderson W.F. Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells, *Biotechniques* 6, 608-614, 1988
11. Graham F.L. and Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors, *Mol. Biotechnol.* 3, 207-220, 1995
12. Yang Y. and Wilson J.M. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo, *J. Immunol.* 155, 2564-2570, 1995
13. Kotin R.M., Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy, *Hum. Gene Ther.* 5, 793-801, 1994
14. Hermonat P.L., and Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 6466-6470, 1984
15. Felgner P.L., Barenholz Y., Behr J.P., Cheng S.H., Cullis P., Huang L., Jessee J.A., Seymour L., Szoka F., Thierry A.R., Wagner E., Wu G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems, *Hum. Gene Ther.* 8, 511-512, 1997.

16. Zuber G., Dauty E., Nothisen M., Belguise P., Behr J.P. Towards synthetic viruses, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52, 245-253, 2001
17. Litzinger D.C. and Huang L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications, *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 201-227, 1992
18. Chu C.J., Dijkstra J., Lai M.Z., Hong K., Szoka F.C. Efficiency of cytoplasmic delivery by pH-sensitive liposomes to cells in culture, *Pharm. Res.* 7, 824-834, 1990
19. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 7413-7417, 1987
20. Zelphati O. and Szoka F.C. Liposomes as a carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotides: a real or magic bullet?, *J. Control. Release* 41, 99-119, 1996
21. Behr J.P. Gene Transfer with Synthetic Cationic Amphiphiles: Prospects for Gene Therapy, *Bioconj. Chem.* 5, 382-389, 1994
22. Fillion, M.C. and Phillips, N.C. Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery, *Int. J. Pharmaceut.* 162, 159-170, 1998
23. Yamaoka T. *Advance in Biomaterials and Drug Delivery Systems*, Princeton, Taipei, Taiwan, pp. 397, 2002
24. Gregory L.G., Harbottle R.P., Lawrence L., Knapton H.J., Themis M., Coutelle C. Enhancement of adenovirus-mediated gene transfer to the airways by DEAE dextran and sodium caprate in vivo, *Mol. Ther.* 7, 19-26, 2003
25. Yamaoka T., Hamada N., Iwata H., Murakami A., Kimura Y. Effect of cation content of polycation-type gene carriers on in-vitro gene transfer, *Chem. Lett.* 11, 1171-1172, 1998
26. Han S., Mahato R.I., Sung Y.K., Kim S.W. Development of biomaterials for gene therapy, *Mol. Ther.* 2, 302-317, 2000
27. Sato T., Ishii T., Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency, *Biomaterials.* 22, 2075-2080, 2001
28. MacLaughlin F.C., Mumper R.J., Wang J., Tagliaferri J.M., Gill I., Hinchcliffe M., Rolland A.P. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery, *J. Control. Release* 56, 259-272, 1998
29. Zauner W, Ogris M, Wagner E. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery, *Adv Drug Del Rev* 30, 97-113, 1998
30. Erbacher P., Roche A.C., Monsigny M., Midoux P. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA lactosylated PLL

- complexes, *Exp. Cell Res.* 225, 186-194, 1996
31. Godbey W.T., Wu K.K., Mikos A.G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery, *J. Control. Release* 60, 149-160, 1999
  32. Dunlap D.D., Maggi A., Soria M.R., Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery, *Nucleic Acids Res.* 25, 3095-3101, 1997
  33. von Harpe A., Petersen H., Li Y., Kissel T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery, *J. Control. Release* 69, 309-322, 2000
  34. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 7297-7301, 1995
  35. Godbey W.T., Wu K.K., Mikos A.G. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle, *J. Biomed. Mater. Res.* 45, 268-275, 1999
  36. Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsassner H.P., Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity, *Pharm. Res.* 16, 1273-1279, 1999
  37. Abdallah B., Hassan A., Benoist C., Goula D., Behr J.P., Demeneix B.A. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine, *Hum. Gene Ther.* 7, 1947-1954, 1996
  38. Wightman L., Kircheis R., Rossler V., Carotta S., Ruzicka R., Kurska M., Wagner E. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 3, 362-372, 2001
  39. Jeong J.H., Song S.H., Lim D.W., Lee H., Park T.G. DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline), *J. Control. Release* 73, 391-399, 2001
  40. Goula D., Remy J.S., Erbacher P., Wasowicz M., Levi G., Abdallah B., Demeneix B.A. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system, *Gene Ther.* 5, 712-717, 1998
  41. Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R., Wagner E., PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery, *Gene Ther.* 6, 595-605, 1999
  42. Kakizawa Y., Kataoka K. Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54, 203-222, 2002
  43. Katayose S., Kataoka K. Water-soluble polyion complex associates of DNA and

- poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer, *Bioconj. Chem.* 8, 702-707, 1997
44. Choi Y.H., Liu F., Kim J.S., Choi Y.K., Park J.S., Kim S.W. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier, *J. Control. Release* 54, 39-48, 1998
  45. Choi J.H., Choi J.S., Suh H., Park J.S. Effect of poly(ethylene glycol) grafting on polyethylenimine as a gene transfer vector in vitro, *Bull. Korean Chem. Soc.* 22, 46-52, 2001
  46. Petersen H., Fechner P.M., Martin A.L., Kunath K., Stolnik S., Roberts C.J., Fischer D., Davies M.C., Kissel T. Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system, *Bioconj. Chem.* 13, 845-854, 2002
  47. Kichler A, Chillon M, Leborgne C, Danos O, Frisch B. Intranasal gene delivery with a polyethylenimine-PEG conjugate, *J Control. Release* 81, 379-388, 2002
  48. Meister A., Anderson M.E. Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760, 1983
  49. Miyata K., Kakizawa Y., Nishiyama N., Harada A., Yamasaki Y., Koyama H., Kataoka K. Block cationer polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression, *J. Amer. Chem. Soc.* 126, 2355-2361, 2004
  50. Kunath K., Harpe A.V., Fisher D., Petersen H., Bickel U., Voigt K., Kissel T. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine, *J. Control. Release* 89, 113– 125, 2003
  51. Tang M.X., Szoka F.C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes, *Gene Ther.* 4, 823–832, 1997
  52. Bieber T., Meissner W., Kostin S., Niemann A., Elsasser H.P. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes, *J Control. Release* 82, 441-454, 2002