

含核酸碱基的双亲聚合物纳米球的制备及性能

张笑, 何振峰, 李广全, 张瑀健, 陈云霞, 李国文
(吉林大学超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012)

摘要 设计并合成了含有核酸碱基腺嘌呤的双亲聚合物, 聚[聚乙二醇 600-5-氧-(6-腺嘌呤代己烷基)-异酞酸酯](PPEAHI), 研究了其在水溶液中的自组织行为, SEM 观测了该聚合物在水溶液中的聚集形态, 表明 PPEAHI 在水溶液中自组织成纳米球. 将纳米球水溶液冻干后, 用 FTIR 研究了 PPEAHI 聚合物上的腺嘌呤与底物胸腺嘧啶间的相互作用, 结果表明受体与底物的互补基团间形成了氢键, 发生了分子识别, 并用变温红外光谱进一步证实了氢键的形成.

关键词 双亲聚合物; 纳米球; 核酸碱基; 分子识别

中图分类号 O631 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)01-0208-04

在生物体系中, 分子自组织和分子识别是生物的基本功能和普遍现象, 如 DNA 通过互补氢键形成双螺旋结构^[1], 而生物超分子结构提供的疏水微环境则是进行分子识别的关键. 通常, 单体核苷酸在水溶液中不能通过氢键彼此键合, 这主要是由于环境水的竞争性使核酸的碱基对间几乎不可能形成氢键^[2,3]. 为模拟生物体系的分子自组织和识别功能, 在含水介质中实现分子识别的途径是将互补的官能基团引入聚集体(如囊泡和纳米球)的亲脂区, 可以防止水对氢键键合的影响^[2-4]. 因此, 在人工聚合物体系内进行分子识别的一个简单可行的方法是将含氢键相互作用的功能基团引入双亲物的疏水段, 通过自组织作用, 聚集成聚集体, 使目标功能基团进入聚集体的亲脂疏水区域, 排除环境水的竞争性干扰, 实现氢键识别; 同时, 氢键的形成又可以增强受体与底物间的分子相互作用^[5], 提高受体对底物的负载量, 如果底物是含有互补基团的药物, 则通过分子识别可以增强受体与药物间的相互作用, 进而提高聚集体受体的载药能力. 由于胶体纳米粒子制备容易且易与药物结合, 所以被广泛用于药物载体和靶向药物制剂的研究. 作为药物载体, 聚合物通常需要具备可降解性和生物相容性. 聚乙二醇(PEG)具有良好的水溶性^[6], 如果将 PEG 与含有核酸碱基的异酞酸酯疏水性单体聚合, 可以形成生物相容性好、又可降解的双亲聚合物, 通过自组织作用制备功能聚集体^[7], 实现聚集体内的分子识别. 本文以聚乙二醇 600(PEG600)和含腺嘌呤的异酞酸酯为单体, 合成了一种新型含核酸碱基的双亲聚合物, 在稀水溶液中自组织成纳米球, 通过红外光谱研究了在纳米球内聚合物的腺嘌呤与底物胸腺嘧啶的分子识别, 并通过变温红外光谱进一步研究了氢键的形成与断裂, 证实氢键的形成. 氢键的形成成为增强受体与底物间的相互作用, 提高受体对底物的负载量提供了一条可行的途径.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

所有的药品和溶剂均为分析纯, 1,6-二溴己烷、PEG600、腺嘌呤、NaH 和 5-羟基间苯二甲酸购于 Fluka 或 Aldrich 公司. 抗氧剂 1010 购于中国科学院化学研究所. 所有有机溶剂在使用前均经过干燥并重蒸处理, 水为二次去离子水.

Bruker Advance 500(500 MHz)型核磁共振仪, Bruker Vertex 80V 型傅里叶变换红外光谱仪, Mel-

收稿日期: 2008-04-29.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20674025, 20874037)资助.

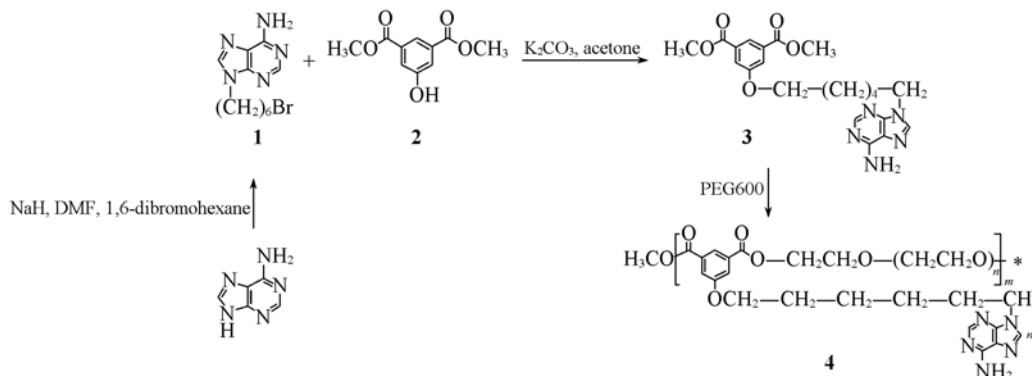
联系人简介: 李国文, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事双亲有机/聚合物的合成、聚集与功能的研究.

E-mail: lgw@jlu.edu.cn

Temp XT-40 型熔点仪, SHIMADZU CTO-10 vp 型凝胶渗透色谱仪(淋洗剂:四氢呋喃), JSM-6700F 型场扫描电镜, Zetasizer Nano-ZS 型动态光散射仪. 美国热电 Flash EA1112 型元素分析仪.

1.2 实验过程

聚[聚乙二醇 600-5-氧-(6-腺嘌呤代己烷基)-异酞酸酯](PPEAHI, **4**)的合成路线见 Scheme 1.



Scheme 1 Synthetic routes of poly(polyoxyethylene-600)-oxy-5-[6-(1-adenine) hexyl] isophthaloyl (**4**, PPEAHI)

1.2.1 催化剂的制备 按文献[8]方法制备. 将0.28 g 无水硫酸镁加入20 mL 无水甲醇中, 回流2 h, 冷却至室温再加入1.1 mL 钛酸四丁酯, 搅拌均匀, 备用.

1.2.2 9-(6-溴己基)腺嘌呤(**1**)的合成 按照文献[9]方法合成. 在N₂气保护下, 向250 mL 三颈圆底烧瓶中加入腺嘌呤(5 g, 0.037 mol)和氢氧化钠(1.38 g, 0.052 mol)及80 mL DMF, 于室温搅拌1 h. 在5 min 内将1,6-二溴己烷(0.043 mol)加入该混合液中, 继续反应72 h. 反应结束后将反应液过滤, 沉淀用大约5 mL 二氯甲烷洗涤, 将滤液混合并蒸除得到黄色固体粗产物. 经柱层析[V(氯仿):V(甲醇)=30:1, R_f=0.3]得到产物**1**, m. p. 126 ~ 128 °C; 产率12%; ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃), δ: 8.37 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 5.63 (s, 2H), 4.21 (t, 2H), 3.38 (t, 2H), 1.95—1.89 (m, 2H), 1.87—1.81 (m, 2H), 1.53—1.47 (m, 2H), 1.40—1.34 (m, 2H).

1.2.3 5-氧-(6-腺嘌呤代己烷基)-异酞酸酯(**3**)的合成 按照文献[10]方法合成化合物**3**. 在N₂气保护下, 将5-羟基间苯二甲酸二甲酯^[11](2.27 mmol)、无水碳酸钾(6.82 mmol)和10 mL 丙酮混合回流1 h. 再加入10 mL 9-(6-溴己基)腺嘌呤(**1**, 2.5 mmol)的丙酮溶液, 继续回流48 h. 反应结束后旋转蒸出溶剂, 残余物用水和氯仿萃取, 用无水硫酸镁干燥有机相, 过滤旋干后柱层析[V(氯仿):V(甲醇)=25:1, R_f=0.2]得到产物**3**. m. p. 84 °C; 产率67%; ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃), δ: 8.37 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.72 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 4.22 (t, 2H), 4.02 (t, 2H), 3.93 (s, 6H), 1.98 ~ 1.92 (m, 2H), 1.82 ~ 1.77 (m, 2H), 1.57 ~ 1.51 (m, 2H), 1.45 ~ 1.39 (m, 2H). 元素分析(C₂₁H₂₅N₅O₅)计算值(%): C 59.01; H 5.90; N 16.38; 实测值(%): C 58.62; H 6.35; N 16.41.

1.2.4 聚[聚乙二醇 600-5-氧-(6-腺嘌呤代己烷基)-异酞酸酯](PPEAHI, **4**)的合成 按照文献[8]方法合成化合物**4**. 在N₂气条件下, 将5-氧-(6-腺嘌呤代己烷基)-异酞酸酯(**3**, 1.0 mmol)、PEG600(1.0 mmol)和抗氧化剂(质量分数为0.22%)混合, 于120 °C搅拌1 h后冷却至室温, 在该混合体系中加入催化剂(质量分数为0.52%), 然后将反应体系抽真空, 并在3 h内逐步将反应温度升至200 °C. 反应结束后冷却至室温, 用氯仿和甲醇重结晶得到半固体产物**4**. ¹H NMR(500 MHz, CDCl₃), δ: 8.35 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.71 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 4.48 (t, 4H), 4.21 (t, 2H), 4.0 (t, 2H), 3.83 (t, 4H), 3.68 ~ 3.62 (bs, methylene protons of PEG main chain), 1.94 ~ 1.41 (m, 8H). GPC: M_n=1.84 × 10⁵, M_w=2.93 × 10⁵, M_w/M_n=1.59.

1.3 PPEAHI 纳米球的制备

按文献[12]方法制备PPEAHI纳米球. 在10 mL 容量瓶内, 将0.552 g 聚合物PPEAHI溶于色谱级的氯仿中, 用高纯氮气吹干溶剂, 使其在容器壁上形成薄膜. 加入去离子水并定容, 使其浓度达到3 × 10⁻⁴ mol/L, 在冰水浴中超声粉碎(JY92-2D型超声粉碎仪)10 min后, 用冰水浴冷却0.5 h, 恢复室温, 点硅片, 真空干燥待测扫描电镜. 将该混合溶液冷冻干燥(Model lyolab 3000型冻干仪), 使PPEAHI保

持在水溶液中的状态, 得到自组装纳米球.

2 结果与讨论

2.1 PPEAHI 的形态与粒度分布

PPEAHI 双亲聚合物的聚集形态见图 1. 由图 1 可以看出, PPEAHI 形成了椭圆形的纳米球, 直径约为 100 ~ 250 nm. 用动态光散射测试了 PPEAHI 纳米球水溶液的粒径分布, 结果见图 2. 由图 2 可以看到, PPEAHI 纳米球的粒径主要分布在 120 ~ 220 nm 的范围内, 与扫描电镜观察到的粒径相近.

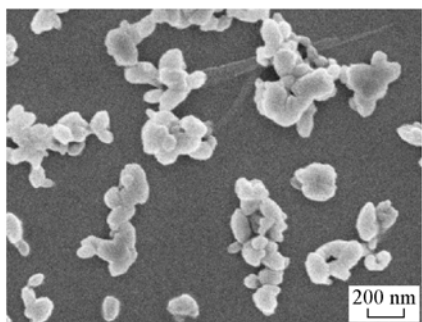


Fig. 1 SEM image of PPEAHI nanospheres

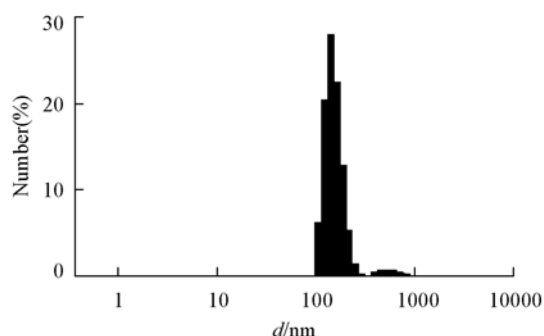


Fig. 2 Particle size distribution of PPEAHI nanospheres

2.2 PPEAHI 与胸腺嘧啶的分子识别

按照制备 PPEAHI 纳米球的方法, 制备 PPEAHI/thymine 混合纳米球 (PPEAHI 中腺嘌呤与胸腺嘧啶的摩尔比为 1:1), 冻干后, 与 KBr 压片, 测试红外光谱. 图 3 为聚合物 PPEAHI, PPEAHI 与胸腺嘧啶的混合纳米球及胸腺嘧啶单体的常温红外光谱.

从图 3 谱线 *a* 可以看出, 3329 cm^{-1} 为 PPEAHI 中腺嘌呤上伯胺基的伸缩振动峰, 3258 , 3181 , 3100 cm^{-1} 为伯胺缔合的 NH 伸缩振动峰^[13,14]. 在图 3 谱线 *c* 中, 3203 cm^{-1} 为胸腺嘧啶中氢键缔合的 NH 振动峰^[13,14], 3062 cm^{-1} 为胸腺嘧啶环上的 $=\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰. 谱线 *b* 为聚合物 PPEAHI 与胸腺嘧啶单体识别后的红外光谱可看到 3 个中强峰: 3323 , 3187 和 3062 cm^{-1} . 与谱线 *a* 和 *c* 对比可知, 3323 cm^{-1} 由 3329 cm^{-1} 位移而来, 并且其峰形变宽、变钝, 这说明腺嘌呤上的伯胺基发生了改变, 与底物胸腺嘧啶上的羰基发生了相互作用, 即通过互补基团形成了氢键, 使伯胺基峰向低波数位移; 伯胺缔合的 NH 伸缩振动峰 3258 , 3181 , 3100 cm^{-1} 在伯胺基与羰基形成氢键后消失; 胸腺嘧啶中氢键缔合的 NH 峰 3203 cm^{-1} 在识别后位移至 3187 cm^{-1} ; 3062 cm^{-1} 为胸腺嘧啶环上的 $=\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰, 未发生改变. 通常, N—H 与 C=O 间形成氢键后振动峰会向低波数位移^[15]. 这说明在 PPEAHI 与胸腺嘧啶的混合纳米球中, 聚合物 PPEAHI 上的腺嘌呤与底物胸腺嘧啶已经形成了氢键 (见 Scheme 2).

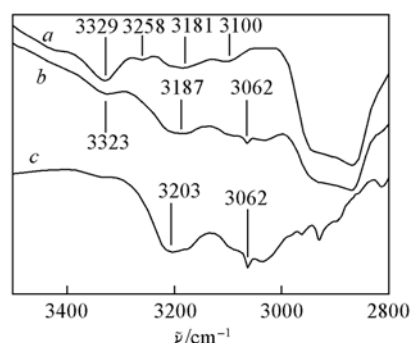
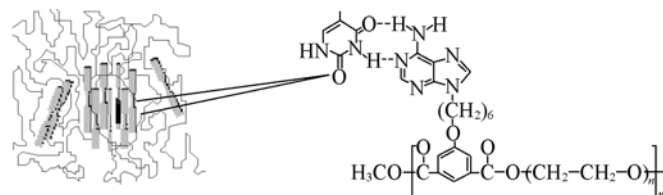


Fig. 3 FTIR spectra of the samples at room temperature
a. PPEAHI polymer nanospheres; *b*. PPEAHI/thymine nanospheres; *c*. thymine.



Scheme 2 Molecular aggregation progress of the PPEAHI and thymine and schematic drawing of the proposed interaction mode for PPEAHI/thymine molecules in core region of the nanospheres

为了进一步确认氢键的形成, 我们用变温红外进行研究. 图 4 为 PPEAHI 与胸腺嘧啶混合纳米球的变温红外光谱. 由图 4 可以明显观察到, 随着温度的升高, 腺嘌呤上 N—H 与底物胸腺嘧啶上 C=O

形成的氢键峰 3323 cm^{-1} 逐渐向高波数方向移动,并最终稳定在与识别前腺嘌呤上伯胺基峰 3329 cm^{-1} 相近的 3330 cm^{-1} 位置上,这说明 N—H 与 C=O 间形成的氢键已经断裂,腺嘌呤上的伯胺基的伸缩振动峰 3329 cm^{-1} 又重新出现;同样识别后的氢键峰 3187 cm^{-1} 在加热后也向高波数方向位移,稳定在胸腺嘧啶与腺嘌呤识别前氢键缔合的 NH 峰(3203 cm^{-1})相近的 3195 cm^{-1} 位置上;而胸腺嘧啶环上的 =C—H 伸缩振动峰 3062 cm^{-1} 则在加热前后没有任何变化.该变温红外光谱证实了在室温($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)时聚合物 PPEAHI 上的腺嘌呤与底物胸腺嘧啶已经形成氢键,并在加热后会逐渐断裂,恢复至识别前单体的状态.

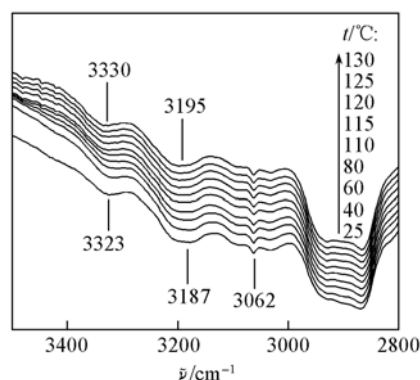


Fig. 4 Variable temperature FTIR spectra of PPEAHI/thymine nanospheres

参 考 文 献

- [1] Saenger W. . Principles of Nucleic Acid Structure[M], New York: Springer-Verlag, 1984
- [2] Nowick J. S. , Cao T. , Noronha G. . J. Am. Chem. Soc.[J], 1994, **116**: 3285—3289
- [3] Onda M. , Yoshihara K. , Kunitake T. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 1996, **118**: 8524—8530
- [4] Yuan J. , Liu M. . J. Am. Chem. Soc. [J], 2003, **125**: 5051—5056
- [5] ZHANG Xi(张希), SHEN Jia-Cong(沈家聰). Chin. Sci. Bull. (科学通报)[J], 2003, **48**: 1477—1478
- [6] Rathore O. , Sogah D. Y. . Macromolecules[J], 2001, **34**: 1477—1486
- [7] Kumar S. , Chen M. H. , Parmar V. S. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2004, **126**: 10640—10644
- [8] Zhang Y. , Zhang A. , Feng Z. . Act. Polymer. Sinica(高分子学报)[J], 2002, **2**: 167—171
- [9] James S. N. , Jenny S. C. , Glenn N. . J. Am. Chem. Soc. [J], 1993, **115**: 7636—7644
- [10] Leon J. W. , Kawa M. , Frechet J. M. J. . J. Am. Chem. Soc. [J], 1996, **118**: 8847—8859
- [11] Toshiharu Y. , Yuriko N. , Etsuko I. . Tetrahedron[J], 1997, **53**: 10239—10252
- [12] Moss R. A. , Li. G. , J. M. . J. Am. Chem. Soc. [J], 1994, **116**: 805—806
- [13] Shimizu T. , Iwaura R. , Masuda M. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2001, **123**: 5947—5955
- [14] Kyogoku Y. , Lord R. C. , Rich A. . J. Am. Chem. Soc. [J], 1967, **89**: 496—504
- [15] Anjie D. , Tong W. , Shiyou F. , *et al.* . J. Polymer Science: Part B[J], 1999, **37**: 2642—2550

Preparation and Properties of Amphiphilic Polymer Nanospheres Containing Nucleobases

ZHANG Xiao, HE Zhen-Feng, LI Guang-Quan, ZHANG Yu-Jian, CHEN Yun-Xia, LI Guo-Wen*

(State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract An amphiphilic polymer containing adenine, poly[(polyoxyethylene-600)-oxy-5-[6-(1-adenine)hexyl] isophthaloyl(PPEAHI), was synthesized. The self-organized behavior of the amphiphilic polymer in dilute aqueous solution was studied. The morphology of the aggregates was observed *via* SEM. The result indicates that the amphiphilic PPEAHI polymer is self-organized into nanospheres in dilute aqueous solution. The molecular recognition between adenine in PPEAHI polymer and thymine substrate was studied *via* FTIR, which implied that the hydrogen bonds were formed between complementary groups. The formation of H-bonds was further confirmed by variable temperature FTIR.

Keywords Amphiphilic polymer; Nanosphere; Nucleobase; Molecular recognition

(Ed. : D, Z)