

温敏梳状嵌段共聚物对 PS 微球阻抗蛋白吸附作用的研究^{*}

陶 蕊 马 桓 陈晓农^{**} 夏宇正 石淑先 焦书科

(北京化工大学材料科学与工程学院生物材料系 北京 100029)

摘 要 采用可逆加成断裂链转移聚合(RAFT)方法和大分子单体技术,制备了温敏性聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)-聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)与 PNIPAM-聚氧化乙烯(PEO)梳状嵌段共聚物,这些共聚物具有 PVP 或 PEO 支链.以溶菌酶为蛋白模型研究了所得共聚物对聚苯乙烯(PS)微球表面蛋白吸附的抑制作用.通过絮凝实验、激光散射法表观粒径测定、电泳迁移率测定及蛋白吸附量的定量数据比较了不同梳状结构的抗蛋白吸附效果.结果表明,预吸附梳状嵌段共聚物可有效阻抗蛋白吸附,亲水支链增加阻抗性能提高,即使环境温度高于 PNIPAM 的相转变温度也能阻抗蛋白吸附.透射电镜和共聚物胶体粒径测试表明,梳状嵌段共聚物阻抗蛋白吸附的机制是预吸附后 PVP 或 PEO 亲水支链在微球表面形成了阻隔层.通过 PS 微球的变温絮凝实验可评价预吸附聚合物的抗蛋白吸附性能,快速获得定性结果.

关键词 温敏聚合物, 梳状嵌段共聚物, 聚苯乙烯微球, 表面处理, 阻抗蛋白吸附

通过表面预吸附两亲聚合物赋予材料阻抗非特异性蛋白吸附的性能,进而改善生物相容性,是生物医用材料表面改性的一种方法,这种方法利用两亲聚合物的自组装特性,使其从水溶液中吸附到材料表面,形成阻隔蛋白的富水表层.两亲聚合物的分子设计和可控合成是实施此方法的关键.文献报道最多的预吸附聚合物是聚氧化乙烯(PEO)-聚氧化丙烯(PPO)-PEO 三嵌段共聚物^[1~6],该共聚物在疏水材料表面预吸附时,PPO 嵌段提供附着力,PEO 嵌段形成亲水表层并阻隔蛋白吸附.PPO 比较疏水,其链长过大时 PEO-PPO 共聚物水溶性差,难以用于材料表面的预吸附处理,因此用于预吸附的 PEO-PPO-PEO 三嵌段共聚物中,PPO 链长均不超过 70 个 PO 链节,这就使得预吸附层附着力的提高受到限制,影响预吸附层的稳定性.聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)是温敏水溶性聚合物,低温溶于水(亲水)、高温则不溶(疏水),最低临界溶解温度(LCST)为 32℃.具有温敏特性的 PNIPAM 有望成为良好的生物医用材料,研究表明以 PNIPAM 为主的温敏材料在药物控释、蛋白分离和酶固定化等方面具有众多潜在的应用^[7,8].PNIPAM 的温敏转变体现了 PNIPAM 既亲水又亲油的两亲特性,而且较其它水溶性聚合物具有更大的疏水性,是用于预吸附法的理想聚合物.2004 年 Ketelson^[9]率先报道,材料预吸附

PNIPAM 后,蛋白吸附量显著减少.PNIPAM 的优点是其低温水溶性不受分子量制约,可通过提高分子量增大在疏水表面的附着力,而且室温预吸附后吸附层的附着力随温度升高而增大(PNIPAM 疏水性提高),很适合在人类生理温度下使用.但是,PNIPAM 在温度高于 LCST 时与蛋白之间有疏水作用,因此预吸附 PNIPAM 的表面在温度较高时仍会吸附蛋白.为克服 PNIPAM 均聚物的这一不足,本文采用可逆加成断裂链转移聚合(RAFT)方法,设计合成 PNIPAM-聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)和 PNIPAM-PEO 两种梳状嵌段共聚物,以期使共聚物在材料表面吸附后能形成 PVP 或 PEO 亲水表层,从而在温度高于 LCST 时也能阻抗蛋白吸附.我们的前期研究^[10]证实,室温(25℃)时 PNIPAM-PEO 梳状嵌段共聚物预吸附层的抗蛋白吸附效果显著优于 PNIPAM 均聚物.为此,本文着重探讨高温(37℃)下,共聚物的抗蛋白吸附作用.上述两种共聚物中 PNIPAM-PVP 迄今鲜见文献报道,本文采用 RAFT 可控自由基聚合技术结合 PVP 大分子单体技术来制备该共聚物.

近年,纳米和亚微米粒子作为可注射的药物控制释放载体及医学诊断和免疫微球已被广泛研究,这些载体或微球几乎都是聚合物材料制成的,研究发现蛋白会在微球表面吸附^[11],导致排异反应以及粒子在生理环境中的聚集等问题,因此必

须改善材料的生物相容性. 在粒子表面构筑亲水层来抑制非特异性蛋白吸附是基本途径, 而且预吸附法被普遍采用^[1,4,12~14]. 基于这一背景, 本文以无皂乳液聚合法制备的单分散聚苯乙烯(PS)微球做为模拟疏水表面, 考察所得共聚物的预吸附及其阻抗蛋白(溶菌酶)吸附性能, 并通过微球在蛋白溶液中抗凝并/聚集性能的改善表征抗蛋白吸附效果, 建立一种快速比较不同预吸附聚合物阻抗蛋白吸附效能的评价方法.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

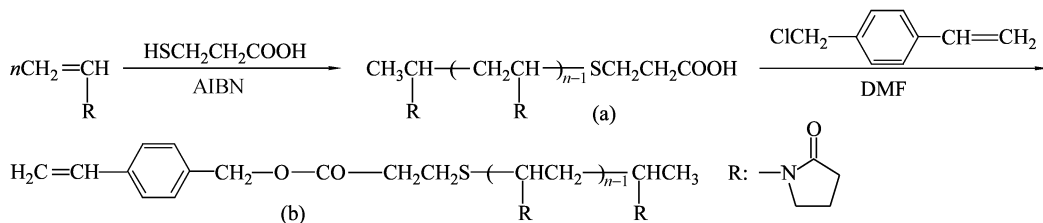
NIPAM(Acros, 纯度 99%), 甲苯/正己烷重结晶 2 次; PEO 大分子单体聚乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯(Aldrich), 分子量 2080, 50% 水溶液; VP(北京化学试剂公司), 减压蒸馏; 偶氮二异丁腈(AIBN, 北京化学试剂公司), 乙醇重结晶; β -巯基丙酸(Alfa, 纯度 99%); 氯甲基化苯乙烯(CMS, Acros, 纯度 90%); 苯乙烯(S, 北京东方化工厂), 减压蒸馏; 过硫酸钾(KPS, 北京化工厂), 重结晶精制; 1,4-二氧六环(DO, 北京化学试剂公司, 分析纯), 常压蒸馏; 链转移剂(苯基二硫代乙酸 1-苯乙酯,

PEPD), 按文献[15]方法制备, 纯度 97%; 溶菌酶(美国 Sigma 产品); 蒸馏水(自制). 其它试剂均为分析纯.

1.2 PVP 大分子单体的制备与表征

PVP 大分子单体按文献[16]方法制备, 反应式见示意式 1. 将乙醇(30 mL)、VP 单体(20 mL)、AIBN(0.8 g)、 β -巯基丙酸(1.5 g)混合, 抽排 20 min 充氮后封管, 60℃ 水浴中电磁搅拌 6 h, 停止反应, 向产物中加入乙醚产生沉淀, 再用四氢呋喃溶解沉淀物, 反复沉淀溶解 3 次以上, 收集最终沉淀物, 用蒸馏水溶解后冷冻干燥, 得到中间产物(a) 17.8 g(收率 85%). 将中间产物(8.24 g)与 DMF(40 mL)、CMS(1.77 g)、NaOH(0.16 g)混合, 置于 30℃ 水浴中反应 24 h, 后处理过程同中间产物. 最终产物 PVP 大分子单体的水溶液经透析膜(MWCO=1000)透析 7 天后, 冷冻干燥得到白色粉末状产物(b) 7.61 g(收率 76%).

PVP 大分子单体水溶液的紫外光谱由日立 U-3010 紫外光谱仪测定; 端羧基 PVP(a)的数均分子量由酸碱滴定法测定; 大分子单体的¹H-NMR 谱图由 Bruker av200 或 av700 核磁共振波谱仪测定, 测试所用溶剂为 D₂O.



Scheme 1 Reactions for the preparation of PVP macromonomer

1.3 梳状嵌段共聚物的制备与表征

PNIPAM-PVP 梳状嵌段共聚物通过 RAFT 聚合方法制备. 将 AIBN(0.002 g)、DO(24 mL)、PEPD(0.012 g)、NIPAM(3.00 g)混合, 抽排 20 min 充氮后封管, 60℃ 均聚 8 h, 取样获取均聚物后加入 VP 单体(0.16 g)与 PVP 大分子单体(0.32 g)的 DO 溶液, 再聚合 24 h, 产物经透析膜(MWCO=14000)透析 5 天后冷冻干燥得到产物 2.40 g. PNIPAM-PEO 共聚物用类似方法制备, 不同的是在第一步均聚 8 h 后加入 NIPAM 单体与 PEO 大分子单体的混合溶液再进行共聚.

聚合物的分子量及其分布由 Waters 710 凝胶渗透色谱仪(GPC)测定. 采用 3 个色谱柱串连(1 个 Waters Styragel HR 5E, 2 个 Shodex KF-804L),

Waters 600 泵送系统, 410 型折光检测器, 溶剂为四氢呋喃(THF, 含 2% 三乙胺), 单分散聚苯乙烯为标样, 温度 30℃, 流速 1 mL/min.

1.4 单分散聚苯乙烯微球的制备与表征

将分散介质水(150 g)在 70℃ 恒温水浴中加热, 通氮除氧 30 min. 加入单体苯乙烯(3.00 g)和引发剂 KPS(0.15 g), 于 70℃ 聚合 24 h, 升温至 98℃ 再反应 2 h, 出料. 聚合转化率 99.8%.

颗粒粒径和电泳迁移率(EM)由 zeta 电位/粒度仪(BIC Zeta PALS, BIC 90Plus)测定, 得到平均粒径为 298 nm, 粒径多分散指数为 0.048, 电泳迁移率为 $-2.50(10^{-8} \text{ m}^2/\text{V} \cdot \text{s})$.

1.5 吸附/絮凝实验

絮凝实验中考察了 5 种悬浮液, 分别是 PS 微

球与溶菌酶体系(1号);PS 微球、PNIPAM 均聚物与溶菌酶体系(2号);PS 微球、PNIPAM-PVP 共聚物与溶菌酶体系(3号);PS 微球、PNIPAM-PEO-1 共聚物与溶菌酶体系(4号);PS 微球、PNIPAM-PEO-2 共聚物与溶菌酶体系(5号)。

悬浮液中水相 NaCl 浓度为 0.001 mol/L, pH 值为 7.0±0.1, 水溶性聚合物、PS 微球以及溶菌酶的浓度均为 0.1 mg/mL。首先,在 PS 悬浮液中加入水溶性聚合物溶液,室温预吸附 24 h 后加入溶菌酶溶液,将悬浮液置于 37℃ 水浴中恒温 24 h 后观察絮凝情况并拍照记录,之后将其置于 2℃ 冰箱中冷却 24 h,观察并记录解凝状况。重复以上加热(37℃)与冷却(2℃)过程 2~3 次。

1.6 蛋白吸附的定量表征

用浓度为 0.001 mol/L 的 NaCl 水溶液配制 pH 为 7.0 的溶菌酶溶液,溶菌酶浓度范围为 0~120 μg/mL,采用 UV-2000 型(上海尤尼柯仪器有限公司)紫外/可见分光光度计测定室温下不同浓度的蛋白溶液在 280 nm 的透光率,获取蛋白浓度 c 与透光率 T 关系式(如式(1)所示,线性相关系数为 0.997)。

$$T = -0.445c + 99.1 \tag{1}$$

用 0.001 mol/L 的 NaCl 溶液配制 0.1 mg/mL 的 PS 微球悬浮液,用高速冷冻离心机于 10℃ 离心 1 h (1.9×10^4 r/min),取上层清液,测定 280 nm 的透光率 (T_0),计算该清液的吸光度 ($100\% - T_0$)。按前述(吸附/絮凝实验)悬浮液配方,将 PS 微球、预吸附了聚合物的微球分别与溶菌酶混合后于 25℃ 吸附 24 h,各取 5 mL 试样,在相同条件下离心 1 h,取上层清液,测定试样的透光率 T_i ,以 $T_i + (100\% - T_0)$ 作为蛋白溶液的实际透光率 T ,由式(1)计算清液中的溶菌酶浓度进而推算蛋白吸附量。

2 结果与讨论

2.1 PVP 大分子单体及 PNIPAM-PVP 和 PNIPAM-PEO 共聚物的结构

酸碱滴定测得端羧基 PVP(a) 的数均分子量为 2130。酸碱滴定证实端羧基 PVP 与 CMS 反应后羧基消失,产物的紫外光谱在 250.5 nm 位置出现吸收峰(文献值为 253 nm^[16]),¹H-NMR 图谱(图 1)上出现端基苯环的谱峰($\delta = 7.08 \sim 7.43$),从而确定所得产物为苯乙烯型 PVP 大分子单体。端羧基转变为苯乙烯端基后,根据滴定法端羧基 PVP 分

子量数值推算的 PVP 大分子单体(b)数均分子量为 2250,由 NMR 谱峰计算的数均分子量为 2200,与滴定结果吻合。

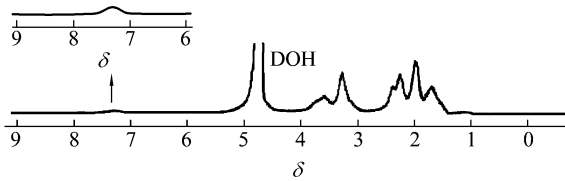


Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of PVP macromonomer

文献[17]证实,以 AIBN 为引发剂、PEPD 为链转移剂可实现 NIPAM 单体的 RAFT 活性聚合。本研究采用与此相同的方法制备 PNIPAM 均聚物(数均分子量 $4.0 \times 10^5 \sim 4.8 \times 10^5$, 多分散指数 1.2~1.4),并通过分段加料法制备 PNIPAM-PVP 和 PNIPAM-PEO 梳状嵌段共聚物。如图 2 所示,两种共聚物的第一嵌段均为 PNIPAM 均聚物。PNIPAM-PVP 的第二嵌段主链主要是 VP 结构单元,并含有 PVP 大分子单体聚合形成的苯乙烯链节,支链是 PVP。而 PNIPAM-PEO 的第二嵌段主链主要是 NIPAM 结构单元,并含有 PEO 大分子单体聚合形成的丙烯酸酯链节,支链是 PEO。共聚物的组成由¹H-NMR 波谱法测定,图 3 是 PNIPAM-PVP (A)、PNIPAM-PEO (B) 共聚物与 PNIPAM 均聚物 (C) 的谱图。用于共聚物组成计算的特征峰归属为 NIPAM 特征峰, a ($\delta = 1.13$, 6H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), e ($\delta = 3.88$, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); VP 特征峰, b ($\delta = 2.31$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-$), c ($\delta = 2.44$, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-$), d ($\delta = 3.30$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$); EO 特征峰, f ($\delta = 3.56$, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)。两种共聚物分别出现了 PNIPAM 均聚物所没有的共振峰,从而证实共聚物中存在支链结构,有关链节组成的计算结果列于表 1。对于 PNIPAM-PVP 共聚物,按¹H-NMR 谱峰计算的 VP/NIPAM 结构单元摩尔比为 1:11,这一比值高于聚合时小分子 VP 单体与体系内 NIPAM 单体的摩尔比(1:15),显然这是 PVP 大分子单体参与聚合的结果,表明了 PVP 梳状嵌段结构的形成。

此外,在 40℃ (高于 PNIPAM 的 LCST) 时聚合物溶液中胶体粒径测试结果显示,PNIPAM 均聚物 (M_n 为 4.2×10^5) 所形成的胶体粒径最大 (242 nm), PNIPAM-PVP 共聚物的胶体粒径最小 (133 nm)。而参照该共聚物 NIPAM/VP 链节比例配制的 PNIPAM 均聚物与 PVP 大分子单体混合物溶液

所形成的胶体粒径介于均聚物与共聚物之间(150 nm).这说明 PVP 可对 PNIPAM 胶体起稳定作用,形成更小的胶体,但游离 PVP 对 PNIPAM 胶体的稳定作用不及共聚形成的 PVP 支链.与 PNIPAM

不同,所得 PNIPAM-PVP 共聚物不溶于四氢呋喃,原因是该溶剂不能溶解 PVP.¹H-NMR、胶体粒径测试结果及溶解性实验证实该共聚物中存在带支链的 PVP 嵌段.

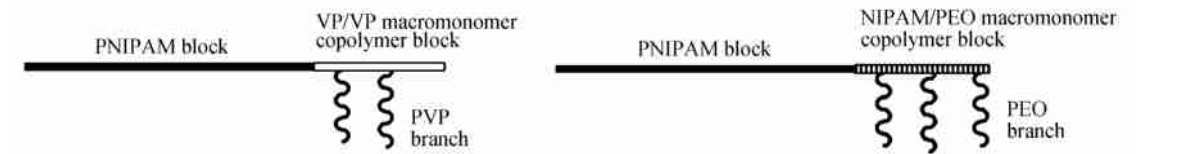


Fig. 2 Structures of PNIPAM-PVP and PNIPAM-PEO comb-block copolymers

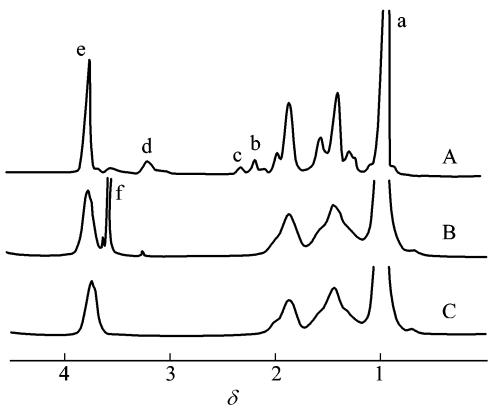


Fig. 3 ¹H-NMR spectra of PNIPAM-PVP (A), PNIPAM-PEO-2 (B) and PNIPAM (C)

聚合物的分子量及其分布由 GPC 测定,图 4 是代表性 GPC 曲线.表 1 给出了所制备聚合物的组成与分子量.从图 4 和表 1 可以看出,随着支链数量的增加,共聚物分子量分布变宽,但 PDI 均显著小于传统自由基共聚产物(曾以 AIBN 为引发剂分别制备了 EO 含量为 9.3 mol%和 21.5 mol%的 NIPAM/PEO 大分子单体的无规共聚物,GPC 测定的 PDI 分别为 2.53 和 4.04),而且 GPC 淋洗曲线均呈现单峰峰形,表明在嵌段共聚阶段,各分子链增加的分子量基本上相同.

2.2 絮凝现象

实验表明在原始 PS 微球悬浮液中添加溶菌酶会导致微球凝并,加热时发生絮凝,悬浮液由浑

Table 1 PNIPAM homopolymer and comb-block copolymers prepared by RAFT technique

Polymer	Composition(mol %)			Molecular weight (M _n)			PDI
	NIPAM	VP	EO	PNIPAM block	Comb branch	Copolymer	
PNIPAM	100			42000			1.20
PNIPAM-PVP	91.7	8.3		42000	2200	45800 ^a	
PNIPAM-PEO-1	93.7		6.3	43900	2080	48400	1.38
PNIPAM-PEO-2	88.7		11.3	47800	2080	58800	1.56
PNIPAM-PEO-3	12.6		87.4	47800	2080	90800	1.64

^a Calculated according to the M_n of PNIPAM block and the composition of PNIPAM-PVP copolymer

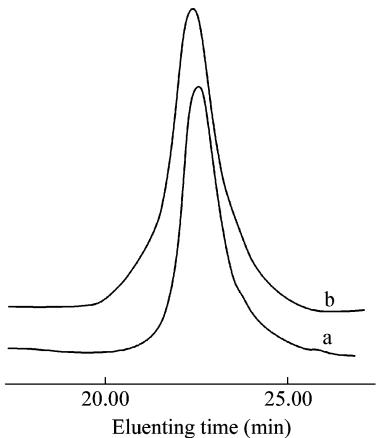


Fig. 4 GPC curves of PNIPAM (a) and PNIPAM-PEO-1 (b)

浊变为澄清,底部出现沉淀物.因此,通过絮凝的方法可考察溶菌酶在微球表面的吸附状况.图 5 (a~k)是 4 种 PS 悬浮液(1~3 号和 5 号)在加热与冷却时絮凝及解凝状况的照片.液相浑浊表明 PS 微球处于分散或解凝状态,液相澄清表明 PS 微球处于絮凝(沉淀)状态.

溶菌酶的等电点在 pH=10.5,在本研究条件下带正电荷,PS 微球表面带负电荷.因此,除疏水作用外溶菌酶还可通过静电吸引与 PS 微球作用,导致 PS 微球凝并(室温)或絮凝(高温).图 5(a~k)显示,(1)未经预吸附的 PS 悬浮液在 37℃发生了絮凝,液相变得澄清,降温至 2℃仍维持不变,说明溶菌酶在 PS 表面大量吸附,且由架桥效应造

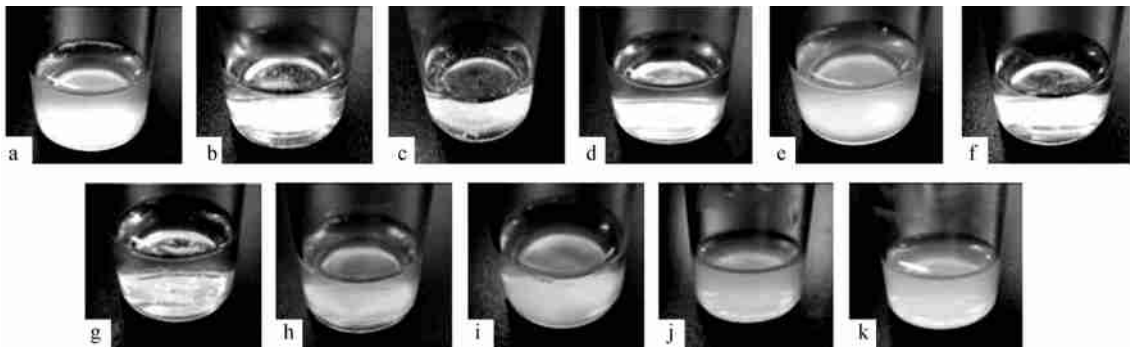


Fig. 5 Flocculation test results
a) Native PS/lysozyme suspension (sample 1), room temperature; b) Sample 1, 37°C; c) Sample 1, 2°C; d) PNIPAM pre-treated PS/lysozyme suspension (sample 2), 37°C; e) Sample 2, 2°C; f) Sample 2, 37°C cycle 2; g) PNIPAM-PVP pre-treated PS/lysozyme suspension (sample 3), 37°C; h) Sample 3, 2°C; i) Sample 3, 37°C cycle 2; j) PNIPAM-PEO-2 pre-treated PS/lysozyme suspension (sample 5), room temperature; k) Sample 5, 37°C

成不可逆絮凝(图 5a~c);(2)经 PNIPAM 均聚物预处理的 PS 悬浮液在 37°C 发生絮凝,降温后重新成为稳定均一的悬浮液,此现象在交替升/降温时重复出现.这表明,PNIPAM 在 PS 表面吸附形成阻隔层,溶菌酶不能直接作用于 PS 表面,37°C 时 PNIPAM 吸附层变得疏水,通过疏水作用吸附溶菌酶导致微球絮凝,降温后 PNIPAM 恢复亲水性,蛋白解吸,微球重新分散(图 5d~f);(3)共聚物 PNIPAM-PEO-2 预处理的 PS 悬浮液即使在 37°C 长时间加热也不絮凝(图 5j~k),说明该共聚物在 PS 表面吸附后形成了 PEO 亲水表层,即使温度高于 PNIPAM 的 LCST 也能阻断蛋白吸附;(4)EO 单元含量较低的 PNIPAM-PEO-1 预处理的 PS 悬浮液在首次升温时发生絮凝,降温后重新分散,第二次升温则不絮凝,使用 PNIPAM-PVP 共聚物时得到相同现象(图 5g~i).这说明当 PVP 或 PEO 支链较少时,预吸附阶段未能形成完整的亲水表层,只有经过升温、降温循环,所吸附的聚合物在 PS 表面经过分子链重排后,才能形成更完整的亲水表层.这也证明了亲水链节的含量对阻抗蛋白吸附的重要性.显然,PS 微球的絮凝或凝并取决于溶菌酶在其表面的吸附,这得到以下结果的证实.

2.3 亲水表层的形成

由于 PEO 的亲水性高于 PNIPAM,因此带 PEO 支链的 PNIPAM 水溶液在温度高于 PNIPAM 的 LCST 时,组装成以 PNIPAM 主链为核、PEO 支链为壳的纳米粒子,而不会象 PNIPAM 均聚物那样出现大颗粒或沉淀,向水相伸展的 PEO 支链对纳米粒子的稳定起到关键作用^[18,19].据此推断,本文所合成的梳状嵌段共聚物在 PS 表面吸附后,强

亲水性 PVP 或 PEO 支链应当处于吸附层的表层.这一推断得到以下实验结果支持.经测定,0.1% PNIPAM(M_n 为 47800)水溶液与 0.1% PNIPAM-PEO-2($EO=11.3\text{ mol}\%$)水溶液在 40°C 时所形成的胶体平均直径分别为 334 nm 和 165 nm,PNIPAM-PEO-2 由于 PEO 的稳定作用(处于胶体的外表面)可以形成更小的胶体.如前所述浓度为 0.1 mg/mL 的 PNIPAM 均聚物和 PNIPAM-PVP 共聚物溶液的粒径测定也给出类似的结果.图 6 是 PNIPAM-PEO-3($EO=87.4\text{ mol}\%$)胶体的透射电镜图像(0.1 mg/mL 水溶液,40°C 加热、稀释后取样滴于 TEM 专用铜网网栅上,于 40~50°C 干燥脱水后测定),此 TEM 图像显示该共聚物形成的胶体具有核壳形态特征,与文献[18,19]报道的带 PEO 支链 PNIPAM 聚合物所形成的核壳结构类似,湿态时向外伸展的 PEO 支链对聚合物胶体起稳定作用.

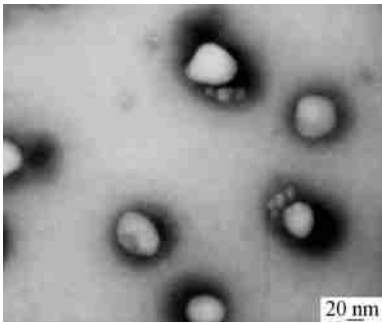


Fig. 6 TEM image of PNIPAM-PEO-3 colloid (dry)

尽管未能直接观测梳状嵌段共聚物在 PS 微球表面吸附后的形态,但是根据不同链段亲水性的差异,结合上述胶体形态特征,可以判定共聚物

吸附后 PEO 或 PVP 支链形成了亲水表层并阻挡蛋白在微球表面吸附,使得微球在蛋白溶液中凝并或絮凝程度减轻甚至消失.对蛋白吸附的阻抗程度则取决于共聚物中亲水支链对微球表面的覆盖程度,当共聚物中亲水支链数量较少时 PS 表面被亲水表层部分覆盖,蛋白(溶菌酶)仍能吸附在未覆盖表面,而当亲水支链数量较多时,亲水表层可完全覆盖 PS 表面,蛋白吸附被更有效地抑制.

2.4 蛋白吸附前后 PS 微球表观粒径与表面电荷的变化

为了进一步考察预吸附聚合物对蛋白吸附的阻抗作用,测定了 25℃ 时聚合物预吸附及溶菌酶吸附前后微球表观粒径的变化(图 7a).从图 7(a)可以看出,不同聚合物预吸附的 PS 微球在与蛋白接触后,表观粒径的变化量明显不同.未预吸附聚合物的 PS 微球(b),由于蛋白的大量吸附导致微球凝并,表观粒径增大幅度最大;预吸附 PNIPAM 均聚物后(c)表观粒径增幅有所下降;预吸附 PNIPAM-PVP(d)和 PNIPAM-PEO 的微球(e、f)表观粒径增值均显著减小,其中 EO 含量较大的 PNIPAM-PEO-2 所对应的粒径增幅最小.

此外,PS 微球表面带负电荷,电泳迁移率(EM)为负值,溶菌酶带正电荷,微球吸附溶菌酶后 EM 将向正值方向变化,EM 的变化量越大溶菌酶吸附量也越大.如图 7(b)所示,EM 增大幅度的变化趋势与上述表观粒径的变化趋势相同.显然,与 PNIPAM 均聚物相比,共聚物能更有效的阻抗蛋白吸附.

2.5 PS 微球表面预吸附聚合物阻抗蛋白吸附的定量表征

文献[11, 20]曾报道用高速离心-液相浓度测定法定量表征蛋白在微球表面的吸附量.本文采用类似的方法定量表征预吸附聚合物对蛋白吸附的阻抗作用,即通过紫外分光光度法测定液相蛋白的浓度,继而推算预吸附前后 PS 微球对蛋白的吸附量.经测定各种聚合物溶液(0.1 mg/mL,溶剂为 0.001 mol/L NaCl 水溶液, pH=7.0)在 280 nm 的透光率均大于 99%,表明各聚合物在 280 nm 几乎无吸收,可排除溶液中聚合物对蛋白浓度测定的干扰.离心后各吸附试样清液的透光率及对应的溶菌酶浓度列于表 2,从表中可看出预吸附了聚合物的 PS 微球所对应的液相透光率下降,说明液相具有更高的蛋白浓度,即被 PS 微球吸附的蛋白数量减少(表 2 中 $c_0 - c$ 数值降低).与未经预吸

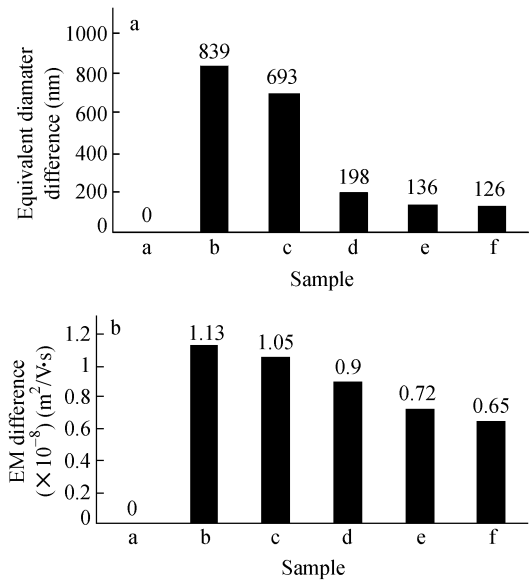


Fig. 7 Difference of equivalent diameter (a) and difference of electrophoretic mobility (b) of PS microspheres in suspension compared to native PS

a) PS, native diameter = 298 nm; b) Sample 1 (PS/lysozyme); c) Sample 2 (PS/PNIPAM/lysozyme); d) Sample 3 (PS/PNIPAM-PVP/lysozyme); e) Sample 4 (PS/PNIPAM-PEO-1/lysozyme); f) Sample 5 (PS/PNIPAM-PEO-2/lysozyme)

附的 PS 微球相比,预吸附了 PNIPAM 均聚物、PNIPAM-PVP 和 PNIPAM-PEO-2 后,微球对蛋白的吸附量分别减少了 58.4%、69.6%和 75.0%,从而证实聚合物的预吸附阻碍了蛋白吸附,而梳状嵌段共聚物阻抗蛋白吸附的效果优于 PNIPAM 均聚物,其中 PNIPAM-PEO-2 效果更为显著.

定量测试结果与粒径和电泳迁移率测定以及絮凝现象所反映的不同聚合物阻抗蛋白吸附效果的变化趋势相吻合.由此可见,通过絮凝状况的比较可快速反映出预吸附聚合物的抗蛋白吸附性能.尽管絮凝法不能获得蛋白吸附量的数值,但所提供的定性判据对指导预吸附聚合物的分子设计与合成具有现实意义,况且生物医用微球表面改性的一个基本目标是使其在生理环境中不出现凝并或絮凝.

综上所述,采用可逆加成断裂链转移聚合方法和大分子单体技术,制备了聚 N-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM)-聚 乙 烯 基 吡 咯 烷 酮 (PVP) 与 PNIPAM-聚 氧 化 乙 烯 (PEO) 梳 状 嵌 段 共 聚 物,以溶菌酶为蛋白模型研究了梳状嵌段共聚物在聚苯乙烯(PS)微球表面的抗蛋白吸附性能,得到以下

Table 2 Transmittance of aqueous phase of various PS suspensions and lysozyme concentration calculated

Treatment of PS	Native	PNIPAM	PNIPAM-PVP	PNIPAM-PEO-2
	PS	pre-treated PS	pre-treated PS	pre-treated PS
Transmittance(%)	72.6	62.1	60.1	59.1
Lysozyme concentration in aqueous phase(c , $\mu\text{g/mL}$)	59.6	83.2	87.7	89.9
$c_0 - c(\mu\text{g/mL})^a$	40.4	16.8	12.3	10.1
Decrease of lysozyme adsorption compared to native PS(%)	0	58.4	69.6	75.0

^a c_0 is 100 $\mu\text{g/mL}$, which was the original concentration of lysozyme introduced into the PS suspensions.

结论, (1)PNIPAM-PEO 和 PNIPAM-PVP 梳状嵌段共聚物在 PS 微球表面吸附后, PNIPAM 嵌段为内吸附层, PEO 或 PVP 支链形成亲水表层, 使得此类共聚物在温度高于 PNIPAM 相转温度(LCST)时也具有阻抗蛋白吸附性能, 共聚物中亲水支链增加抗蛋白吸附效果提高; (2)借助 PS 微球的变温絮凝实验可定性判断预吸附聚合物对微球表面蛋白吸附的阻抗性能.

REFERENCES

1 Tan J S, Butterfield D E, Voycheck C L, Caldwell K D, Li J T. *Biomaterials*, 1993, 14(11): 823~833

2 Green R J, Davies M C, Roberts C J, Tendler S J B. *Biomedical Materials Research*, 1998, 42: 165~171

3 Pavay K D, Olliff C J. *Biomaterials*, 1999, 20: 885~890

4 Jackson J K, Springate C M K, Hunter W L, Burt H M. *Biomaterials*, 2000, 21: 1483~1491

5 Bohner M, Ring T A, Rapoport N, Caldwell K D. *J Biomater Sci Polym Edn*, 2002, 13(6): 733~746

6 Bohner M, Ring T A, Caldwell K D. *Macromolecules*, 2002, 35: 6724~6731

7 Ma Xiaomei(马晓梅), Zhu Lu(朱路), Xi Jingyu(席靖宇), Zhao Xian(赵喜安), Tang Xiaozhen(唐小真). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2005, (2): 197~201

8 Lu Diannan(卢滇楠), Liu zheng(刘铮). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2004, (4): 573~579

9 Ketelson H A. US patent, A1, 0131870. 2004-07-08

10 Chen X, Pelton R. *Advanced Materials Research*, 2006, 11: 363~366

11 Hu Jie(胡杰), Li Songjun(李松军), Liu Bailing(刘白玲). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2004, (5): 763~765

12 Delgado A D S, Leonard M, Dellacherie E. *Langmuir*, 2001, 17: 4386~4391

13 Bousalem S, Yassar A, Basinska T, Miksa B, Slomkowski S, Azioune A, Chehimi M M. *Polym Adv Technol*, 2003, 14: 820~825

14 Heuberger R, Sukhorukov G, Voros J, Textor M, Mohwald H. *Adv Funct Mater*, 2005, 15(3): 357~366

15 Quinn J F, Rizzardo E, Davis T P. *Chem Commun*, 2001: 1044~1045

16 Akashi M, Kirikihira I, Miyauchi N. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 1985, 132: 81~89

17 Ray B, Isobe Y, Morioka K, Habaue S, Okamoto Y, Kamigaito M, Sawamoto M. *Macromolecules*, 2003, 36: 543~545

18 Wu C, Qiu X. *Physical Review Letters*, 1998, 80(3): 620~622

19 Virtanen J, Tenhu H. *Macromolecules*, 2000, 33: 5970~5975

20 Okubo M, Ahmad H. *Colloid Polymer Science*, 1998, 276: 470~475

THE EFFECT OF TEMPERATURE-SENSITIVE COMB-BLOCK COPOLYMERS ON PROTEIN ADSORPTION RESISTANCE OF POLYSTYRENE MICROSPHERES

TAO Rui, MA Huan, CHEN Xiaonong, XIA Yuzheng, SHI Shuxian, JIAO Shuke

(*Department of Biomaterials, College of Materials Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029*)

Abstract Thermo-sensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) and PNIPAM-poly(ethylene oxide) (PEO) comb-block copolymers with PVP and PEO hydrophilic branches, respectively, were synthesized using RAFT polymerization of NIPAM and PVP or PEO macromonomers. Polystyrene (PS) microspheres were treated in aqueous suspension with different copolymers obtained to allow polymer adsorbing on PS microsphere surface. Protein adsorption resistance of the PS microsphere with pre-adsorbed copolymer was evaluated, using lysozyme as the model protein, by flocculating test, particle coagulation (by dynamic light scattering), electrophoretic mobility measurement and quantitative analysis of protein adsorption. It was found that pre-adsorption of the comb-block copolymer on PS microsphere surface could effectively inhibit protein adhesion to the surface. A larger number of hydrophilic branches in the copolymer resulted in a better protein resistance both at room temperature and at temperatures higher than the LCST of PNIPAM. Transmission electron microscopy and dynamic light scattering measurements of the copolymer colloids confirmed that the hydrophilic branches formed an outer adsorb-layer and provided resistance to protein when the copolymer adsorbed on PS microsphere surface. Moreover, flocculation tests on heating and cooling of PS microsphere suspension in the presence of protein provided a simple and effective method to qualitatively evaluate the protein resistance of the polymers used for pre-adsorption treatment.

Key words Thermo-sensitive polymer, Comb-block copolymer, Polystyrene microsphere, Surface treatment, Protein adsorption resistance