

基于聚(L-谷氨酸)树状分子的智能药物释放系统研究*

江 超 盛明明 何 斌 王 刚 吴 尧 顾忠伟**

(四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心 成都 610064)

摘 要 以天然氨基酸 L-谷氨酸为原料,通过收敛法合成了聚(L-谷氨酸)树状分子,通过半胱氨酸将抗肿瘤药物甲氨蝶呤(MTX)键合到聚(L-谷氨酸)树状分子上,构建氧化还原敏感的药物传输系统.用核磁($^1\text{H-NMR}$)等对载体以及载药粒子进行了表征.体外释放研究发现,载药粒子具有良好的氧化还原响应性,在不同浓度的还原剂二巯苏糖醇(DTT)作用下药物的释放速率明显不同,当 $\text{DTT} = 10 \text{ mmol/L}$ 时,药物释放较快, $\text{DTT} = 2 \text{ mmol/L}$ 次之,而 $\text{DTT} = 0.2 \text{ mmol/L}$ 时无释放现象.体外细胞实验结果表明,聚(L-谷氨酸)树状分子的细胞毒性低,载药粒子对 HepG2 细胞的增殖有明显的抑制作用.

关键词 聚(L-谷氨酸)树状分子,甲氨蝶呤(MTX),氧化还原敏感,药物传输系统

肽类树状分子是近些年来发展起来的一类新型生物医用材料^[1].肽类树状分子不仅具有普通树枝状分子的特征如规整性、高度支化、表面呈现高密度功能团、尺度为纳米级、通过可控制备可得到单一分子量等之外,还有类似蛋白的球状结构、良好的生物相容性和水溶性,同时可生物降解且降解产物无细胞毒性^[2-4].由于肽类树状分子的纳米尺度,其负载抗肿瘤药物在体内传输过程中还具有 EPR 效应^[5],能够被动靶向肿瘤细胞.肽类树状分子精确可控的结构,使其成为一种单分散的大分子,在药代动力学上具有很好的重现性.肽类树状分子作为药物载体不仅能够降低药物的不良反应,提高治疗指数,还具有增溶、增效、缓释、控释的功能^[6].肽类树状分子作为药物载体的研究已经引起了广泛的关注.

肽类树状分子作为药物载体与药物结合的方式可分为两种^[7-9]:一是物理包埋,药物被包裹在肽类树状分子中,通过扩散释放出来;二是共价键结合,药物通过对体内环境(如 pH 值、氧化还原、酶等)敏感的共价键固定到肽类树状分子上.共价键在体内环境的影响下断裂,释放出键合的药物.

本文利用聚(L-谷氨酸)第二代肽类树状分子外圈的功能团,通过引入氧化还原敏感的化学键^[10](二硫键)键合抗肿瘤药物甲氨蝶呤(MTX)^[11,12],利用细胞内外的氧化还原电势的差

异来实现药物的智能释放,同时将负载药物的聚(L-谷氨酸)肽类树状分子与肝癌细胞 HepG2 共培养,评价其体外抗肿瘤效果.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

卞氧基羰基(OBzl)保护的谷氨酸盐酸盐(分析纯,上海吉尔生化公司),叔丁氧基羰基(t-Boc)保护的谷氨酸(分析纯,上海吉尔生化公司),甲氨蝶呤(分析纯,上海阿拉丁试剂公司),钯碳催化剂(10% Pd/C,百灵威试剂公司),三氟乙酸(TFA,分析纯,成都爱斯特试剂公司),N-乙基二异丙胺(DIEA,分析纯,成都爱斯特试剂公司),4-二甲氨基吡啶(DMAP,分析纯,成都爱斯特试剂公司),1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI,分析纯,成都爱斯特试剂公司),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,分析纯,成都爱斯特试剂公司),苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU,分析纯,上海吉尔生化公司),1-羟基-苯并-三氮唑(HOBt,分析纯,上海吉尔生化公司),二氯甲烷(DCM),二甲基亚砜(DMSO),三乙胺(TEA),乙醚(Et_2O)无水乙醇等溶剂均要经过干燥、蒸馏等提纯后使用.核磁共振波谱仪(Mercury Plus 600 MHz, Varian 公司),紫外可见分光光度计(UV-Vis, Lambda 650S perkin Elmer)激光共聚焦显微成像系统(CLSM, Leica TCP

* 庆祝卓仁禧院士 80 华诞专稿; 2011-04-11 收稿, 2011-05-04 修稿; 四川省国际合作项目(项目号 2009HH0001)、科技部国际合作项目(项目号 2010DFA51550)和国家重点基础研究发展计划(973 计划, 项目号 2011CB606206); ** 通讯联系人, E-mail: zwgu@scu.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11101

SP5).

1.2 聚(L-谷氨酸)树状骨架的合成

N_2 保护下,将 1.249 g (3.0 mmol) 化合物 **2** 溶解于 35 mL 重蒸的 CH_2Cl_2 , 在冰浴条件下加入 1.4 mL (10 mmol) DIEA, 搅拌反应 0.5 h 后,加入 0.247 g (1.0 mmol) 叔丁氧基羰基(*t*-Boc)保护的谷氨酸. 搅拌均匀后,将 1.080 g (3.0 mmol) HBTU 和 0.407 g (3.0 mmol) HOBt 加入反应体系,在冰浴下搅拌 2 h,然后将体系升至室温反应 48 h. 将反应液用饱和碳酸氢钠溶液,5% 的硫酸氢钠和饱和食盐水交替洗 3 次后,用无水硫酸镁干燥,过滤,旋蒸除去溶剂后用 $CHCl_3/EtOAc/CH_3CH_2OH$ 混合溶剂进行柱层析分离得白色固体 **3**,产率 73%.

称取 0.433 g (0.5 mmol) 化合物 **3**, 用 1 mL 的 CH_2Cl_2 溶解后,在加入 9 mL 的 CH_3OH 稀释,后转移到高压釜中,加入 0.2 g 的 10% Pd/C 在 0.8 MPa 的 H_2 下室温反应 24 h,过滤,旋蒸,油泵抽干溶剂得到白色泡沫固体 **4**, 产率 95%.

N_2 保护下,取 0.101 g (0.2 mmol) 化合物 **4**, 溶于 1.0 mL 重蒸的 DMSO,冰浴下滴加 0.15 mL TFA. 反应 5 h, 减压蒸馏除去 DMSO 和部分 TFA. 加入 5 mL 无水 Et_2O 搅拌过夜. 旋转蒸发除去乙醚得到 0.074 g 化合物 **5** (NH_2 -G2 (Glu)- $COOH_4$), 产率 91%.

1.3 胱氨酸修饰甲氨蝶呤(MTX)的制备

化合物 **6** 的合成参考文献[13], 产率 73%.

化合物 **7** 的合成. N_2 保护下,将 0.20 g (0.4233 mmol) 的 MTX, 0.089 g (0.4656 mmol) 的 EDCI, 0.059 g (0.4656 mmol) 的 NHS 和 0.025 g (0.2172 mmol) DMAP 溶于 10 mL 重蒸的 DMSO, 搅拌 1 h 后,将 0.0953 g (0.4233 mmol) 的化合物 **6** 的加入反应体系,室温反应 48 h. 减压蒸馏除去 DMSO,在 CH_2Cl_2 中沉淀过滤得到黄色粉末固体 0.174 g. 称取 0.174 g (0.2633 mmol) 上述黄色粉末溶于 1.0 mL 重蒸的 DMSO,冰浴下滴加 0.1 mL TFA. 反应 5 h, 减压蒸馏除去 DMSO 和部分 TFA. 加入 5 mL 无水 Et_2O 搅拌过夜. 旋转蒸发除去乙醚得到 0.176 g 橘黄色粉末固体化合物 **7**, 产率 72%.

1.4 聚(L-谷氨酸)树状分子载药系统的制备

载有 4 个 MTX 的二代聚(L-谷氨酸)树状分子载药系统 NH_2 -G2 (Glu)-(S-S-MTX)₄ 的合成. N_2 保护下,将称取 0.02 g (0.0396 mmol) 的化合

物 **4**, 0.034 g (0.1782 mmol) 的 EDCI, 0.021 g (0.1782 mmol) 的 NHS 和 0.002 g (0.0198 mmol) DMAP 溶于 5 mL 重蒸的 DMSO, 搅拌 1 h 后,将 0.103 g (0.1782 mmol) 的化合物 **7** 的加入反应体系,室温反应 48 h. 减压蒸馏除去 DMSO,在分别在 CH_2Cl_2 , pH = 7.4 的 PBS 溶液,水中沉淀,冷冻干燥得到黄色粉末固体. 将上述固体用 TFA 脱去 Boc 保护,得到载有 4 个 MTX 的树状分子载药系统化合物 **8**.

1.5 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的聚(L-谷氨酸)树状分子载药系统的制备

N_2 保护下,将化合物 **5** 与等摩尔量的 FITC 在 DMSO 中室温搅拌 24 h^[14]. 其他操作如聚(L-谷氨酸)树状分子载药系统的制备相同,可得到 FITC 标记的树状分子载药系统 **8a**.

1.6 体外药物释放实验

MTX 的释放实验按下面的方法进行:分别取 1 mg MTX 纳米载药系统装在透析袋中封严,置于 15 mL 分别含有 10 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)、2 mmol/L DTT、0.2 mmol/L DTT 的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(PBS 中含有 20% 的 DMSO),水浴恒温于 37℃,搅拌速度 100 $r \cdot min^{-1}$,定时取样 0.2 mL. 同时补加相同体积的扩散介质. 用紫外可见分光光度计在 306 nm^[15] 测定吸光度,用 3 个不同 DTT 浓度的 PBS 混合液下 MTX 标准曲线计算释放的 MTX 浓度.

1.7 材料毒性实验与体外抗肿瘤效果评价

将 HepG2 细胞接种于 96 孔板置于 37℃、5% CO_2 、饱和湿度的细胞恒温培养箱中孵育 24 h,加入用 DMEM 溶液稀释的浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu g/mL$ 的 **5** 聚(L-谷氨酸)树状分子药物载体骨架(NH_2 -G2 (Glu)- $COOH_4$) 各组设平行样品 3 个,以细胞培养板中的细胞为阴性对照,分别培养 24、48、72 h 后弃掉培养液,用 PBS 洗 3 遍,每孔加入含 10% 的 CCK-8 培养液 10 μL , 37℃ 继续孵育 2 h 后用酶联免疫检测仪测定 490 nm 波长的光密度值(OD),按下列公式计算细胞存活率^[16]:

$$\text{存活率}\% = (\text{实验组 } OD_{490} - \text{空白组 } OD_{490}) / (\text{对照组 } OD_{490} - \text{空白组 } OD_{490}) \times 100\%$$

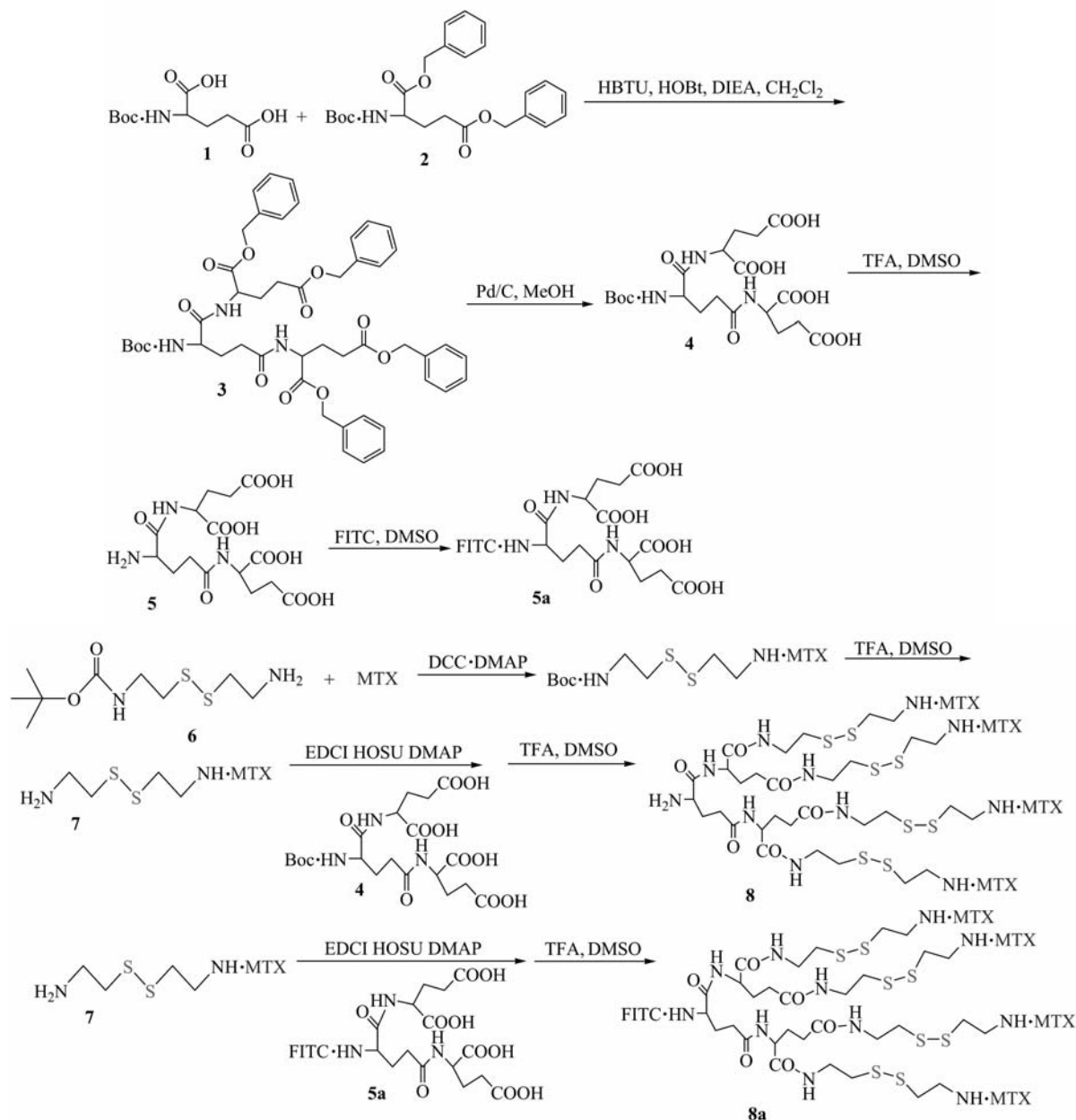
将 HepG2 细胞接种于 96 孔板置后,于 37℃、5% CO_2 、饱和湿度的细胞恒温培养箱中孵育 24 h,加入 DMEM 溶液稀释的浓度为 0.5、2.5、5、10、20 $\mu g/mL$ 的游离 MTX 和 0.7、3.5、7.0、14、28 $\mu g/mL$ 的 NH_2 -G2 (Glu)-(S-S-MTX)₄, 每组 3 个平行

样品,以细胞培养板中的细胞为阴性对照,分别培养 24、48、72 h,弃掉培养液后用 PBS 洗 3 遍,每孔加入 10% 的 CCK-8 培养液 10 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,用酶联免疫检测仪测定 490 nm 波长的光密度值(OD),按下列公式计算细胞存活率:

$$\text{存活率}\% = (\text{实验组 OD}_{490} - \text{空白组 OD}_{490}) / (\text{对照组 OD}_{490} - \text{空白组 OD}_{490}) \times 100\%$$

1.8 体外细胞摄取试验

玻底皿中接种上对数生长期的 HepG2 细胞,培养 24 h 后,细胞贴壁生长.将 FITC 标记的聚(L-谷氨酸)第二代肽类树状分子骨架 FITC-NH-G2(Glu)-COOH₄,同 FITC 标记的两个聚(L-谷氨酸)第二代肽类分子载药系统 FITC-NH-G2(Glu)-(S-S-MTX)₄,溶于灭菌的 PBS 溶液中,按照两个材料的 PBS 溶液/新的细胞培养液 = 1/9 的体积比将其混合均匀,混合后得到含骨架 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和药物载体系统浓度为 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养基.将其作为新的培养基换入到细胞已贴壁生长的玻底皿中.培养 2、4、6 h 后,弃去培养基,用 PBS 洗涤多次,加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(0.5 mg/mL)与细胞一起培养 30 min 将细胞核染色,最后加入 1 mL 的 PBS 溶液,用激光共聚焦显微成像系统在激发波长为 485 nm,散射波长为 595 nm,为细胞在同一光强度下拍片.



Scheme 1 Synthetic route of dendritic poly(L-glutamic acid) based drug-delivery system

2 结果与讨论

2.1 聚(L-谷氨酸)树状分子载药系统的合成

聚(L-谷氨酸)树状分子 **3** 以 HBTU/HOBt 为缩合试剂通过常规多肽缩合反应合成(示意图 1), 树状分子外围保护的羧基通过与胱氨酸修饰

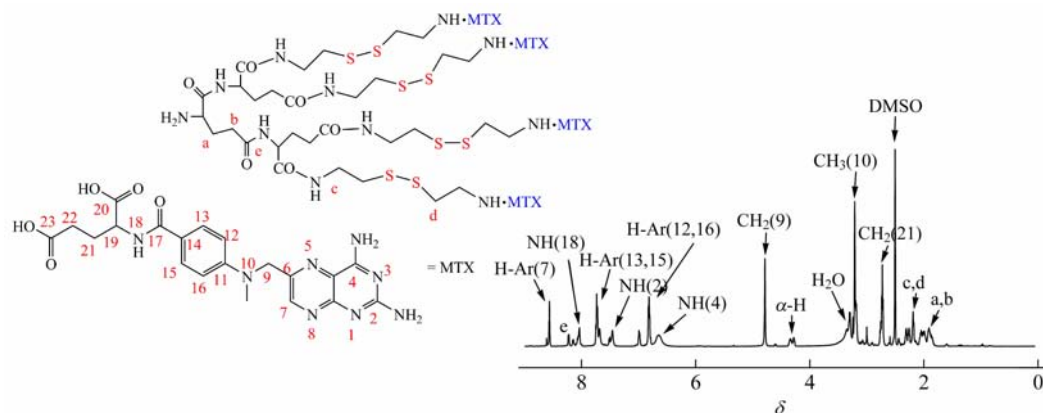


Fig. 1 ^1H -NMR spectra of MTX loaded dendritic poly(L-glutamic acid)

2.2 体外药物释放

谷胱甘肽(GSH)是细胞质中参与物质代谢的主要还原剂^[17-19]. 我们在体外药物释放实验中利用二硫苏糖醇(DTT^[20])模拟 GSH 对环境敏感载药系统的作用. 图 2 为 $\text{NH}_2\text{-G}_2(\text{Glu})\text{-(S-S-MTX)}_4$ 在 DTT 溶液中释放药物的机理. GSH 在细胞内的浓度(1 ~ 10 mmol/L)远远大于细胞外

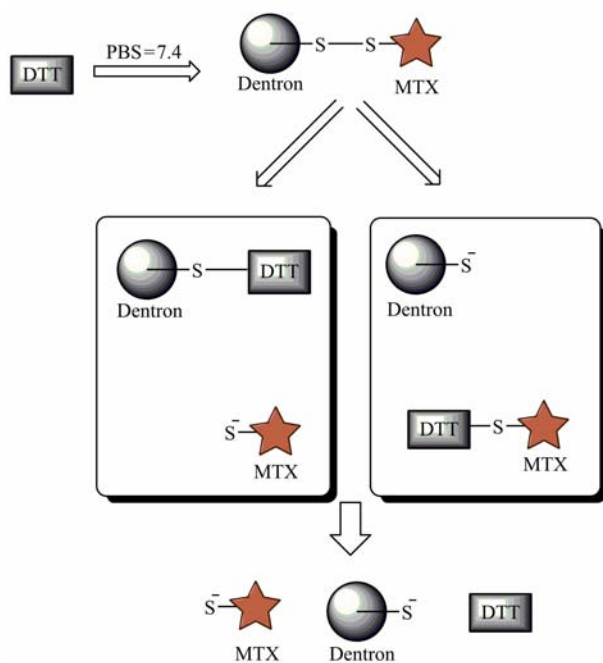


Fig. 2 The release mechanism of MTX from dendritic poly(L-glutamic acid) in the presence of DTT

的 MTX 反应得到对细胞内外氧化还原电势敏感的二硫键, 树状分子中二硫键的引入是制备氧化还原敏感药物载体的关键步骤. 从 ^1H -NMR 谱图(图 1)上可以看出 MTX 已通过二硫键成功链合到了树枝状分子上.

的浓度(2 $\mu\text{mol/L}$)^[21]. 体外药物释放分别在 10 mmol/L DTT、2 mmol/L DTT、0.2 mmol/L DTT 的 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液(PBS 中含有 20% 的 DMSO)中进行. 从图 3 可观察到药物释放的速率和最大释放量与 DTT 浓度密切相关. 药物释放的速率和最大释放量均为 10 mmol/L > 2 mmol/L, 在 0.2 mmol/L 时无释放现象. 载药系统能在 10 mmol/L 和 2 mmol/L DTT 溶液中释放, 说明 DTT 能够破坏载药系统中的二硫键, 使其断裂, 释放出 MTX, 而在 DTT 浓度为 0.2 mmol/L 时无释放, 说明只有当 DTT 达到一定浓度时, 其对二硫键才产生作用.

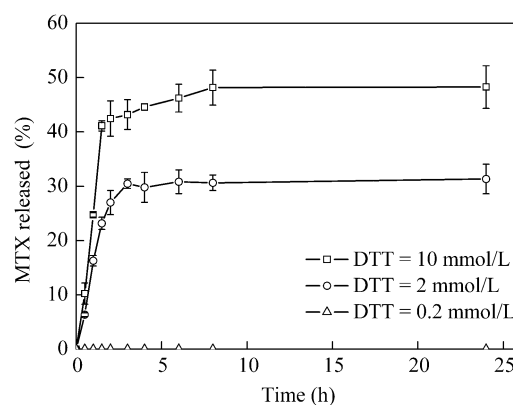


Fig. 3 The release profiles of MTX loaded dendritic poly(L-glutamic acid)

2.3 细胞毒性与体外抗肿瘤效果评价

图4~6显示的是材料的毒性和载药系统的体外抗肿瘤效果.在5个不同浓度和不同的孵育时间(24、48和72 h)下,空白材料与细胞共培养的细胞存活率均高于90%,说明聚(L-谷氨酸)树状分子骨架的细胞毒性低,可以作为药物载体.体外抗肿瘤效果的研究结果显示,与肿瘤细胞孵育24 h后,游离的MTX和载药系统在相同的药物浓度下,都表现出一定的抗肿瘤效果,40%以上的肿瘤细胞都被杀死,且游离MTX的抗肿瘤效果好于载药系统.这是因为游离MTX进入细胞后能够很快的起到药效,而载药系统中的MTX是通过二硫键链共价键合到树枝状分子的骨架上,需要在细胞内谷胱甘肽的作用下才能释放,所以短时间内游离MTX的抗肿瘤效果好于载药系统的抗肿瘤效果.孵育48 h后,HepG2细胞的存活率在50%以下,载药系统与游离MTX的抗肿瘤效果接近;而在72 h后,HepG2细胞的存活率降到20%以下,载药系统的抗肿瘤效果好于游离的MTX.这一结果充分说明通过二硫键键合MTX的聚(L-谷氨酸)树状分子载药系统对细胞内环境敏感,具有药物缓释的效果.

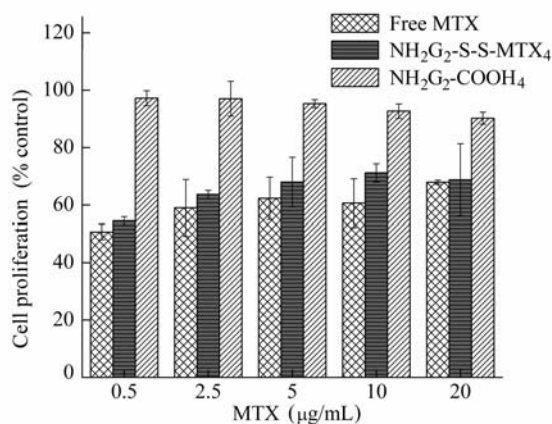


Fig. 4 The *in vitro* anti-tumor effects of MTX-loaded dendritic poly(L-glutamic acid) incubated with HepG2 cells for 24 h. The concentrations of MTX were 0.5, 2.5, 5, 10 and 20 µg/mL for each group.

2.4 体外细胞摄取试验

载药系统的体外细胞吞噬实验通过激光共聚焦显微成像系统(CLSM)来评价.在聚(L-谷氨酸)树状分子上固定FITC,通过FITC的绿色荧光和DAPI^[22]的蓝色荧光染细胞核来研究载药系统被细胞吞噬的过程.将FITC标记的聚(L-谷氨酸)第二代肽类树状分子骨架,同FITC标记的负

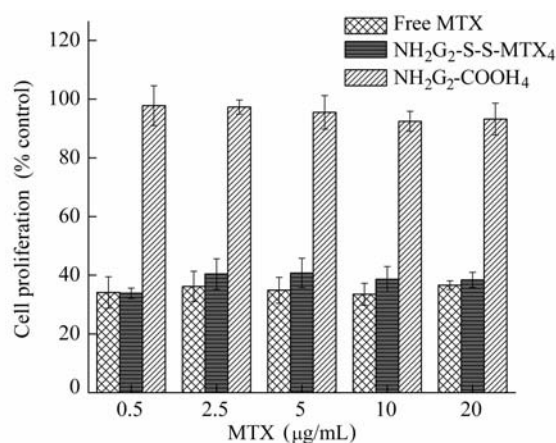


Fig. 5 The *in vitro* anti-tumor effects of MTX-loaded dendritic poly(L-glutamic acid) incubated with HepG2 cells for 48 h. The concentrations of MTX were 0.5, 2.5, 5, 10 and 20 µg/mL for each group.

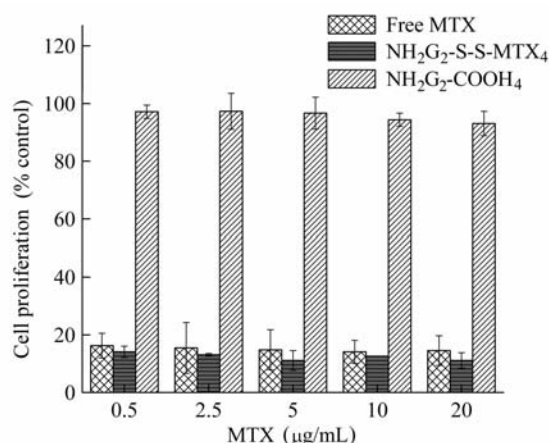


Fig. 6 The *in vitro* anti-tumor effects of MTX-loaded dendritic poly(L-glutamic acid) incubated with HepG2 cells for 72 h. The concentrations of MTX were 0.5, 2.5, 5, 10 and 20 µg/mL for each group.

载药物的聚(L-谷氨酸)第二代肽类树状分子载药系统与细胞HepG2共同孵育4h,用DAPI将细胞核染色,在CLSM下观察,实验结果如图7-8所显示,材料和载药系统都能顺利的进入细胞,载药系统具有更强的荧光,说明MTX有促进细胞对载药系统吞噬的作用.这是由于MTX的化学结构于叶酸相似,能够与对叶酸有依赖的酶结合^[23],从而促进细胞对载药系统的吞噬.

3 结论

通过胱氨酸将甲氨蝶呤(MTX)固定到聚(L-谷氨酸)肽类树状分子表面对其进行功能化,构建细胞内环境敏感的药物控释系统.在体外用

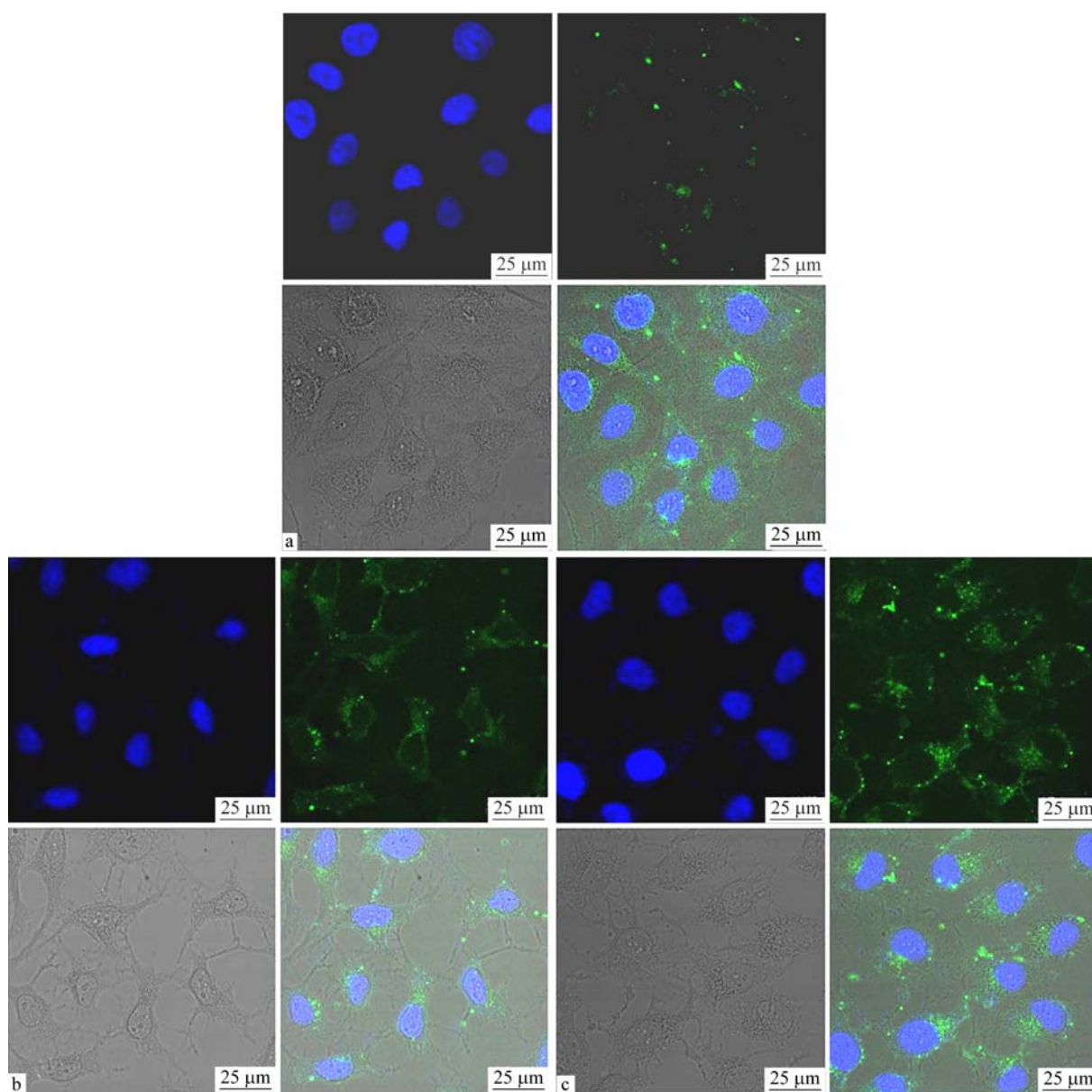


Fig. 7 Confocal laser scanning photographs of HepG2 cells treated with 2.0 $\mu\text{g/mL}$ dendritic poly(L-glutamic acid) immobilized with FITC for 2 h (a), 4 h (b) and 6 h (c)

DTT 模拟胞内的 GSM 研究了载药系统的药物释放行为,发现载药系统的药物释放量随 DTT 浓度的提高而增加.体外抗肿瘤研究的实验结果表明通过二硫键键合 MTX 的聚(L-谷氨酸)肽类树状

分子载药系统对细胞内环境敏感,具有药物缓释效果,对肿瘤细胞的杀灭效果好于游离的 MTX.体外细胞摄取实验发现 MTX 的类似叶酸的结构有利于促进肿瘤细胞对载药系统的吞噬.

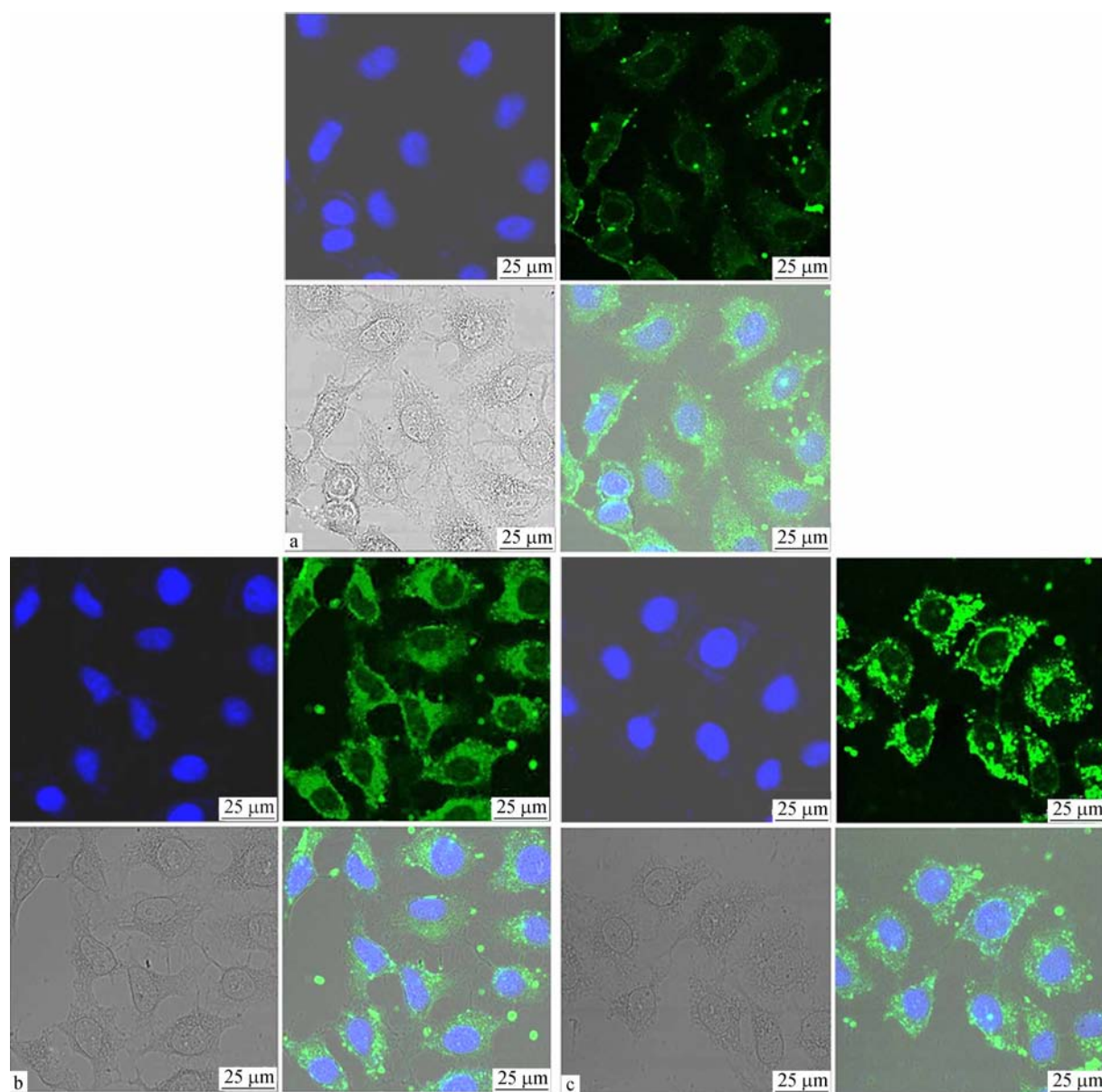


Fig. 8 Confocal laser scanning photographs of HepG2 cells treated with 2.0 $\mu\text{g/mL}$ MTX conjugated dendritic poly(L-glutamic acid) labeled with FITC for 2 h (a), 4 h (b) and 6 h (c)

REFERENCES

- 1 Bosman A W, Janssen H M, Meijer E W. *Chem Rev*, 1999, 99(7): 1665 ~ 1688
- 2 Li Wusong(李武松), Ji Yan(吉岩), Jia Xinru(贾欣茹), Wang Bingbing(王冰冰). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2006, (8): 712 ~ 716
- 3 Sadler K, Tam J P. *Rev Mol Biotechnol*, 2002, 90(3): 195 ~ 229
- 4 She Wenchuan(余汶川), Luo Kui(罗奎), He Bin(何斌), Ai Hua(艾华), Gu Zhongwei(顾忠伟). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2011, (2): 157 ~ 165
- 5 Iyer A K, Khaled G, Fang J, Maeda H. *Drug Discov Today*, 2006, 11(17): 812 ~ 818
- 6 Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown N B, Emanuele A D. *Int J Pharm*, 2003, 252(1-2): 263 ~ 266
- 7 Boas U, Christensen J B, Heegaard P M H. *New Molecular Tools*. London (UK): Roy Soc Chem, 2006. 56 ~ 61
- 8 Tekade R K, Kumar P V, Jain N K. *Chem Rev*, 2009, 109(4): 49 ~ 87
- 9 Boas U, Karlsson A J, Waal B F M D, Meijer E W. *J Org Chem*, 2001, 66(6): 2136 ~ 2145
- 10 Kurtoglu Y E, Navath R S, Wang B, Kannan S, Romero R, Kannan R M. *Biomaterials*, 2009, 30(11): 2112 ~ 2121

- 11 Furst D E, Kremer J M. Arthritis Rheum, 1988, 31(3): 305 ~ 314
- 12 Gardner-Medwin J M, Powell R J. Ann Rheum Dis, 1996, 55(6): 350 ~ 352
- 13 Parlow J J, Normansell J E. Mol Diversity, 1995, 1(10): 266 ~ 269
- 14 Majoros I J, Thomas T P, Mehta C B, Baker J R, Jr. J Med Chem, 2005, 48(19): 5892 ~ 5899
- 15 Pinhasi R I, Assaraf Y G. Biomacromolecules, 2009, 11(1): 294 ~ 303
- 16 Tao Yongzhen(陶咏真), Zhang Lina(张俐娜), Han Lu(韩露), Zeng Fanbo(曾凡波), Ding Kan(丁侃). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2009, (9): 852 ~ 859
- 17 Meister A, Anderson M E. Annu Rev Biochem, 1983, 52: 711 ~ 760
- 18 Arrick B A, Nathan C F. Cancer Res, 1984, 44(10): 4224 ~ 4232
- 19 Saito G, Swanson J A, Lee K. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(2): 199 ~ 215
- 20 Agrawal A, Dal-Hee M. ACS Nano, 2009, 3(9): 2495 ~ 2504
- 21 Rui H, Gang H, Joseph M F, Byoung-jin K, Neil S F, Vincent M R. J A Chem Soc, 2006, 128(4): 1078 ~ 1079
- 22 Pinhasi R I, Assaraf Y G. Biomacromolecules, 2009, 11(1): 294 ~ 303
- 23 Kono K, Liu M, Frechet J M. Bioconjugate Chem, 1999, 10(6): 1115 ~ 1121

DENDRITIC POLY(L-GLUTAMIC ACID) BASED SMART DRUG DELIVERY SYSTEM

JIANG Chao, SHENG Mingming, HE Bin, WANG Gang, WU Yao, GU Zhongwei

(National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract A redox-sensitive drug delivery system was fabricated. Dendritic poly(L-glutamic acid) was synthesized. Anti-tumor drug methotrexate (MTX) was immobilized on the dendritic poly(L-glutamic acid) *via* disulfide bonds using cystines as linkers. The disulfide bond was sensitive to glutathione in intracellular environment, thus to release the MTX from the dendritic poly(L-glutamic acid) backbones. The dendritic poly(L-glutamic acid) backbones and drug loaded conjugates were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR). The release profiles of the conjugates were investigated in phosphate buffer saline (PBS) with dithiothreitol (DTT) to simulate the intracellular environment; the results showed that the release rates were closely dependant on the concentration of DTT. Higher DTT concentration resulted in faster release. When the DTT concentration was lower than 0.2 mmol/L, MTX was not released from dendritic backbones. The conjugates were incubated with HepG2 cells to evaluate their anti-tumor effect *in vitro*. The dendritic poly(L-glutamic acid) was nontoxic to cells even when its concentration was as high as 20 $\mu\text{g/mL}$. The inhibition effect of the conjugates on tumor cells was better than that of free MTX after incubation for 72 h. Fluorescein isothiocyanate (FITC) was immobilized on the dendrmers and conjugates to trace the endocytosis. The MTX could promote the cell uptake for its folic acid mimetic structure.

Keywords Dendritic poly(L-glutamic acid), Methotrexate (MTX), Redox-sensitive, Drug delivery system