

·研究简报·

细胞膜仿生修饰树枝状聚酰胺-胺的研究^{*}

贾 兰 徐建平 计 剑^{**} 沈家骢

(浙江大学高分子科学与工程学系 教育部高分子合成与功能构造重点实验室 杭州 310027)

摘 要 利用 2-丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的双键与树枝状聚酰胺-胺表面的氨基进行 Michael 加成反应,实现树枝状聚酰胺-胺表面的磷酸胆碱仿生修饰,修饰过程用 FTIR、¹H-NMR 进行了表征.体外细胞活性测定和细胞形貌观察证实磷酸胆碱仿生修饰有效地改善了聚酰胺-胺树枝状聚合物的生物相容性,修饰后的聚酰胺-胺树枝状聚合物表面剩余的氨基仍然可以有效的与 DNA 复合,有可能作为一种潜在的基因载体得到广泛应用.

关键词 磷酸胆碱,聚酰胺-胺,树枝状聚合物,生物相容性,基因载体

树枝状聚合物作为一种人工合成的新型纳米材料,以其独特的结构和性能在生物医学领域受到了日益广泛的关注,在药物释放、基因传递和医疗诊断等方面具有广阔的应用前景^[1,2].树枝状聚合物作为一种新型纳米级基因载体,具有无免疫原性及遗传毒性的优点,成为该领域的研究热点之一^[3,4].

目前,聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状聚合物是基因载体领域中受到广泛关注的树枝状聚合物之一.PAMAM-DNA 复合物可保护 DNA 避免酶的降解,且 PAMAM 分子结构外表面具有大量的官能团,可以进行多重修饰.生物相容性和溶解性能是影响基因载体应用的因素之一.研究发现^[5],PAMAM 表现出浓度及大小依赖的毒性,其分子代数和浓度越高,细胞毒性越强.G5 代 PAMAM 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时显示出细胞毒性,而 G7 代 PAMAM 在 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下即可导致细胞死亡.随着研究的深入,人们开始关注树枝状聚合物的表面功能化修饰.Jevprasesphant 等^[6]的研究结果表明,用月桂酰基或 PEG 链对 PAMAM 树枝状聚合物进行表面修饰,可以明显降低其细胞毒性,提高其生物相容性.

模拟生物膜结构的新型生物相容性材料的研究引起了极大的关注.研究表明^[7],细胞膜外层具

有双性电荷结构的磷酸胆碱极性头部可以与水分子形成非常牢固的水合层,减弱蛋白与水的相互作用,可以有效地改善材料的血液相容性^[8,9].近年来,将细胞膜仿生的磷酸胆碱设计用于纳米材料的表面改性和设计,为解决纳米材料在生物医学应用中所面临的溶解性、稳定性和生物相容性等问题提供了良好的思路.与以聚氧乙烯为亲水段的聚合物胶束相比,以磷酸胆碱聚合物为亲水段的聚合物胶束显示出更为优异的生物相容性^[10,11].

本文通过对聚酰胺-胺树枝状聚合物进行设计和优化,从细胞膜仿生的设计出发,利用 2-丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的双键与聚酰胺-胺表面的氨基进行 Michael 加成反应,实现对聚酰胺-胺树枝状聚合物的磷酸胆碱基团修饰,提高其生物相容性,同时利用剩余的氨基与 DNA 有效的复合.通过体外细胞培养,研究细胞膜仿生改性对改善聚酰胺-胺树枝状聚合物生物相容性的有效性,对细胞膜仿生改性聚酰胺-胺树枝状聚合物作为基因载体应用的可能性进行初步探索.

1 试剂和仪器

PAMAM 树枝状聚合物合成按照文献^[12]的方法,以乙二胺和丙烯酸甲酯为原料,经反复进行 Michael 加成、酯胺解反应得到不同半、整代的

^{*} 2008-02-01 收稿,2008-05-05 修稿;国家自然科学基金(基金号 20774082,50703036)、国家高技术研究发展计划(863 计划,项目号 2006AA03Z329,2006AA03Z444)、浙江省科技计划项目(项目号 2007C24008)和教育部“新世纪优秀人才计划”(项目号 NCET-05-0527)资助项目;^{**} 通讯联系人,E-mail: Jijian@zju.edu.cn

PAMAM 树枝状聚合物,其中第 5 代的 PAMAM 简称为 G5.2-丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(APC)的合成按照文献[13]的方法进行.

红外光谱在 Vector2 (Bruker) 仪器上进行,核磁共振氢谱 $^1\text{H-NMR}$ 在 DMX500 (Bruker) 上进行,使用 Sartorius PB-10 pH 计进行电位滴定,紫外可见光谱在 Shimadzu UV-2055 上进行测试.粒径分析在 Brookhaven 公司的 90Plus 粒度分析仪上进行测试.

2 磷酸胆碱仿生修饰聚酰胺-胺的合成(G5-PC)

在 100 mL 三口烧瓶中加入 APC (4 g, 0.014 mol) 的甲醇溶液 (20 mL),通氮气保护,在 0°C 逐滴加入第 5 代 PAMAM (G5, 1 g, $4.85 \times 10^{-5}\text{ mol}$) 的甲醇溶液 (10 mL),滴加完毕后反应体系在 0°C 下继续搅拌 30 min,然后在室温下反应 72 h.反应完毕后经透析除去未反应单体,冻干得到粉末状固体产物 G5-PC 0.75 g ,产率为 44.3% .

3 树枝状聚合物的细胞相容性评价

3.1 细胞毒性 通过 (3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 法测试聚合物的细胞毒性.将内皮细胞 (ECV304) 种植在 96 孔细胞培养板中,种植密度为每孔 10^5 个细胞,加入 $180\text{ }\mu\text{L}$ 含 10% 牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM).细胞在培养箱中培养 24 h 后加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的 G5 或者 G5-PC 的磷酸盐缓冲液

(PBS) 溶液,继续培养 24 h,每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL 的 PBS 溶液) $20\text{ }\mu\text{L}$, 37°C 继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砷 (DMSO),轻轻震荡 20 min.测定各孔的光吸收值,以该吸收值与未加聚合物的单纯的培养基 DMEM 条件下进行的细胞培养 (TCPS) 上测定的吸收值的百分比表示细胞活性.

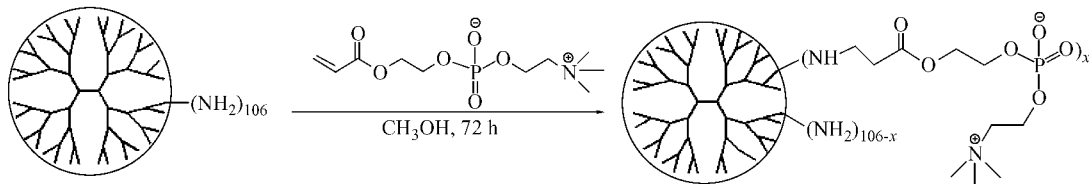
3.2 细胞形态的观察 用活细胞染料荧光素二乙酯 (FDA) 对细胞染色,然后用激光共聚焦显微镜进行细胞形态观察.

4 PAMAM-DNA 复合物的形成

参照文献[14]的方法,G5, G5-PC 和 DNA 的水溶液在使用前保存在 4°C ,将 G5 或 G5-PC 的水溶液与 DNA 的水溶液以一定 N/P 比 (从 0.2 到 20) 混合 (终体积 5 mL , DNA 的终浓度恒定为 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$),涡旋 30 s 后在室温孵育 30 min 形成复合物,用粒度分析仪测定不同 N/P 比下得到复合物的平均粒径. N/P 比等于 PAMAM G5 或 PAMAM G5-PC 中表面氨基个数比 DNA 中磷酸基团个数.

5 聚酰胺-胺的磷酸胆碱仿生修饰与产物表征

本文利用 2-丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱 (APC) 的双键与外层为氨基的 PAMAM 进行 Michael 加成,在 PAMAM 表面引入磷酸胆碱基团,从而实现仿生修饰,其过程如示意图 1 所示.



Scheme 1 Schematic representation for modification of G5 PAMAM by PC group

对仿生修饰前后的核磁共振的结果如图 1 所示. G5 中 $\delta = 2.36$ 对应于 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 中亚甲基的峰,与磷酸胆碱基团反应,在 G5-PC 的核磁图中移到 2.51. 与 G5 相比, G5-PC 的核磁共振谱图上在 $\delta = 4.28 \sim 4.30, 4.17 \sim 4.19, 3.91$ 和 $3.62 \sim 3.75$ 处新出现了 4 个峰,分别对应于磷酸胆碱基团中的 $-\text{CH}_2\text{OP}$, $-\text{POCH}_2$, $-\text{OCH}_2$ 和 $-\text{CH}_2\text{N}$ 的峰. 红外和核磁共振的结果表明 5.0 代 PAMAM 表面已接枝上了磷酸胆碱基团.

通过对 PAMAM 制备过程进行核磁跟踪,发现所制备的第 5.0 代 PAMAM 表面含有 106 个氨

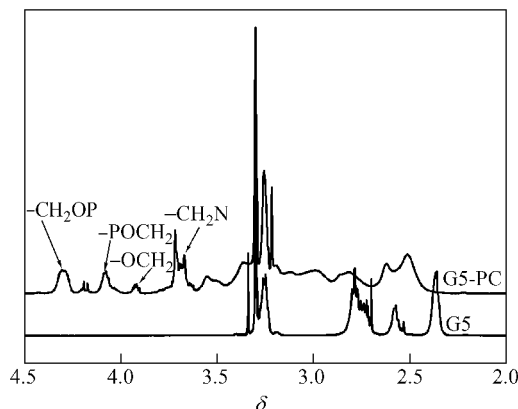


Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of G5 and G5-PC

基.对比接枝磷酸胆碱后的 5.0 代 PAMAM 的核磁共振结果,计算出 G5-PC 表面接枝上了 48 个磷酸胆碱基团.进一步的,通过电位滴定法对 PAMAM 的表面氨基含量进行了跟踪,仿生修饰后 PAMAM 的表面氨基个数为 54 个,由此,有 52 个表面氨基经过转化接枝上了磷酸胆碱基团.因此,核磁共振和电位滴定的结果都表明,每个 G5-PC 分子表面含有约 50 个磷酸胆碱基团.

6 树枝状聚合物的细胞相容性评价

通过内皮细胞的培养,利用细胞活性测定和细胞形貌观察,对仿生修饰过程对 PAMAM 的细胞相容性的影响进行了观察.图 2 给出了通过 MTT 法测定的细胞活性.结果表明,虽然在较低浓度下(0.1 mg/mL),不经磷酸胆碱仿生修饰的 5.0 代 PAMAM 的细胞毒性不大,但是,当浓度增加到 0.5 mg/mL 时,PAMAM G5 显示出明显的细胞毒性,当浓度增加到 2 mg/mL 时,细胞活性只达到 51%.而经过磷酸胆碱仿生修饰后,即使聚合物浓度增加到 2 mg/mL,其细胞都具有良好的活性,达到 99%,G5-PC 与 G5 相比,具有更低的细胞毒性和更好的细胞相容性.

图 3 中细胞形貌的观察结果也表明,尽管低

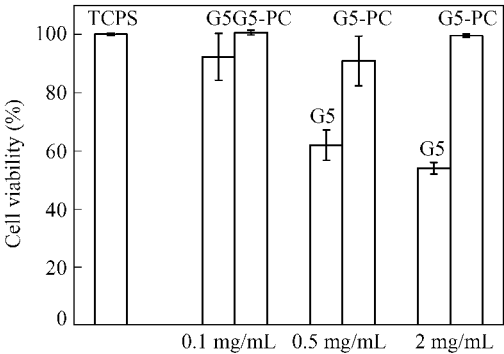


Fig. 2 Cell viabilities of the cells cultured with G5 and G5-PC with different concentrations

浓度时(0.1 mg/mL)时,未经修饰的 PAMAM 溶液中细胞生长状态较好,但是当浓度增加到 0.5 mg/mL 或 2 mg/mL,细胞的生长受到明显的抑制.而经过磷酸胆碱仿生修饰后,即使在聚合物溶液的浓度达到 2 mg/mL 时,细胞显示出良好的生长状态,并与对照组 TCPS 中的细胞生长状态一致.

细胞活性测定和形貌观察的结果都表明,磷酸胆碱仿生修饰能显著降低 PAMAM 的细胞毒性,改善生物相容性.

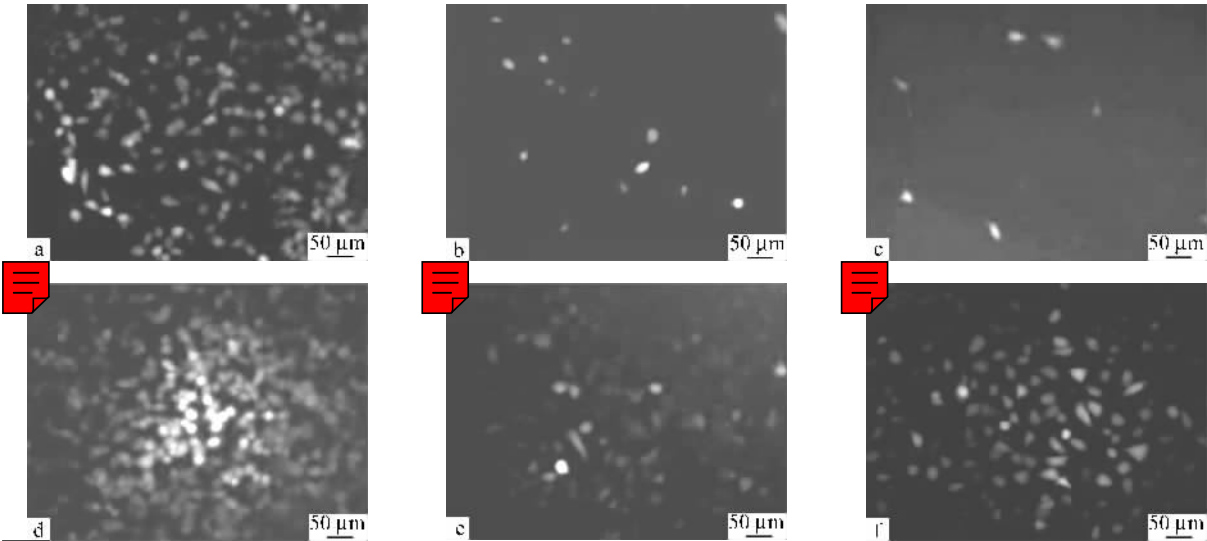


Fig. 3 Cell morphologies of the cells cultured with G5 and G5-PC with different concentration
a) G5,0.1 mg/mL ; b) G5,0.5 mg/mL ; c) G5,2 mg/mL ; d) G5-PC,0.1 mg/mL ; e) G5-PC,0.5 mg/mL ; f) G5-PC,2 mg/mL

7 PAMAM-DNA 复合物的形成

Zeta 电位的测定 G5 和 G5-PC 的 Zeta 电位分别为 + 22.4 mV 和 + 33.4 mV,说明磷酸胆碱修饰的 PAMAM 表面仍然带正电荷,这是因为磷酸胆

碱基团本身的链段并不长,不会屏蔽掉其表面的氨基.从图 4 中可以看出,在 N/P 比为 1 时 G5/DNA 和 G5-PC/DNA 复合物的粒径均达到最大值,N/P 比大于 1 后,复合物尺寸都迅速减小,大于 3

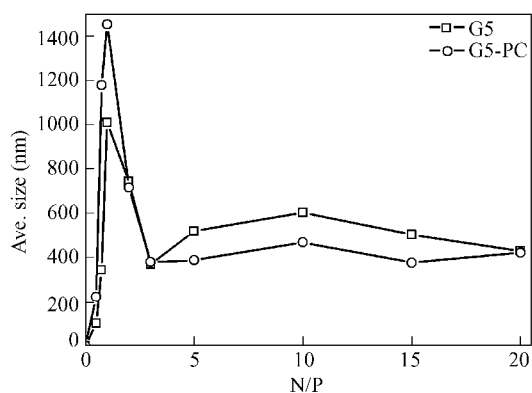


Fig. 4 Average size distribution of G5 and G5-PC in various N/P ratios ranging from 0.2 to 20

后,复合物尺寸均趋于稳定. G5-PC 与 DNA 复合能力与 G5 相当,磷酸胆碱修饰的 PAMAM 仍然可以有效的与 DNA 复合.

8 结论

利用 2-丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的双键与外层为氨基的 PAMAM 进行 Michael 加成,实现了对 PAMAM 的仿生修饰,仿生修饰过程有效的降低了材料的细胞毒性、增进了材料的生物相容性. 同时修饰后的 PAMAM 表面剩余的氨基仍然可以与 DNA 有效的缔合,仿生修饰后的 PAMAM 有可能作为一种潜在的载体广泛应用于基因传递.

REFERENCES

- Hu Hui(胡晖),Cao Zhonglin(曹中林),Fan Xiaodong(范晓东),Huang Yi(黄怡). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2006,(4) 574 ~ 580
- Wang Bingbing(王冰冰),Luo Yufei(罗宇飞),Jia Xinru(贾欣茹),Gong Yongmei(龚泳梅),Ji Yan(吉岩),Yang Ling(杨岭),Wei Yan(危岩). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2004,(2) 304 ~ 308
- Svenson S,Tomalia D A. Adv Drug Deliv Rev,2005,57 2106 ~ 2129
- Dufes C,Uchegbu I F,Schatzlein A G. Adv Drug Deliv Rev,2005,57 2177 ~ 2202
- Kang R,Cao L Z. Foreign Med Sci (Pediatr),2004,31 96 ~ 98
- Jeyprasesphant R,Penny J,Jalal R,Attwood D,McKeown N B,Emanuele A D. Int J Pharm,2003,252 263 ~ 266
- Ishihara K,Nomura H,Mihara T. J Biomed Mater Res,1998,39 323 ~ 30
- Hayward J A,Chapman D. Biomaterials,1984,5 135 ~ 142
- Lewis A L. Colloids and Surfaces B Biointerfaces,2000,18 261 ~ 275
- Xu J P, Ji J, Chen W D, Shen J C. J Contro Release,2005,107(3) 502 ~ 512
- Xu J P, Ji J, Chen W D, Shen J C. Macromol Biosci,2005,5(2) 164 ~ 171
- Tomalia D A, Naylor A M, Goddard W A. Angew Chem Int Ed Engl,1990,29 138 ~ 175
- Ruiz L, Hilbom J G, Leonard D, Mathieu H J. Biomaterials,1998,19 987 ~ 998
- Orberg M L, Schillen K, Nylander T. Biomacromolecules,2007,8 1557 ~ 1563

SURFACE ENGINEERING OF POLY(AMIDO-AMINE) *via* BIOMIMETIC PHOSPHORYLCHOLINE

JIA Lan, XU Jianping, JI Jian, SHEN Jiacong

(Department of Polymer Science and Engineering, Laboratory of Macromolecule Synthesis and Functionalization of Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Well-defined dendrimer, poly(amido-amine) dendrimer (PAMAM), was surface engineered *via* biomimetic phosphorylcholine (PC) to achieve a potential biocompatible candidate for gene delivery. PAMAM dendrimer is proven to be an efficient gene carrier itself, but it is associated with certain problems such as low water solubility and considerable cytotoxicity. PC-based polymers were designed with mimicking the biomembrane structure and widely used to improve the biocompatibility of various medical devices. Surface modification of PAMAM *via* phosphorylcholine is conceived to improve the biocompatibility of PAMAM. Generation 5.0 PAMAM dendrimer (G5) has been synthesized by divergent method with ethylenediamine as core. The surface of PAMAM was conjugated with PC groups via the Michael addition reaction between the 2-acryloyloxyethyl phosphorylcholine (APC) and the primary amines located on G5. After dialysis in distilled water and lyophilization, the PC modified PAMAM G5 (G5-PC) was obtained. The success of the PC modification of PAMAM was followed with FTIR and $^1\text{H-NMR}$ characterization. The average primary amino group numbers of the G5 and G5-PC were followed through $^1\text{H-NMR}$ and potentiometric titration. While there were 106 primary amine groups on the native PAMAM, the surface modification of PAMAM resulted in approximately 50 PC groups on the G5-PC and 56 primary amine groups were remained. Cell viability tests and morphology observation indicated that the cytotoxicity of G5-PC was much lower in ECV304 cell lines in comparison with that of native PAMAM G5. The biomimetic PC modification sufficiently improved the biocompatibility of the native G5. The surface charges of the G5 and G5-PC were measured *via* zeta potential measurements, and their zeta potentials were +22.4 and +33.4 mV, respectively. The positive surface charges allowed the G5-PC to form complexes with DNA as indicated by particle size analysis. These results suggested that the biomimetic phosphorylcholine surface engineered poly(amido-amine) dendrimers could be an excellent biocompatible candidate for gene delivery systems.

Keywords Phosphorylcholine, Poly(amido-amine), Dendrimers, Biocompatibility, Gene delivery