

·研究简报·

## 一种仿细胞膜聚合物用于碳纳米管表面改性\*

徐方明 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** 以新型含有磷酸胆碱基的仿细胞膜两亲聚合物——胆固醇封端的聚(2-甲基丙烯酸氧基乙基磷酸胆碱)(CPMPC)为表面稳定剂实现碳纳米管的表面改性,利用两亲聚合物中的胆固醇疏水段与碳纳米管表面进行非共价键的稳定结合,通过两亲聚合物中聚(2-甲基丙烯酸氧基乙基磷酸胆碱)(PMPC)亲水段实现其水溶性和生物相容性.并以商业可获得的典型两亲分子,末端为胆固醇的聚氧乙烯(CPEG)和卵磷脂,为对照进行研究.研究表明 CPMPC 和 CPEG 均具有比卵磷脂更高的对碳纳米管进行分散的能力.而 CPMPC 改性的碳纳米管比 CPEG 改性的碳纳米管具有更优的稳定性和生物相容性,通过新型仿细胞膜聚合物改性的碳纳米管在生物医用领域有潜在应用.

**关键词** 碳纳米管, 磷酸胆碱, 细胞膜仿生, 生物相容性

作为一种优异的纳米材料,碳纳米管在生物传感器、生物反应器、热治疗、药物传递和基因传递等生物医学领域的潜在应用受到广泛关注.但碳纳米管难以在水或有机溶剂中进行溶解和分散的问题成为其在生物医学领域应用的主要技术障碍.在现有的解决其溶解性和分散性问题的种种方法中,通过使用两亲分子对碳纳米管进行物理分散的方法具有相当的优势.两亲分子的疏水段和碳纳米管表面发生非共价键相互作用,实现两亲分子在碳纳米管表面的结合,而亲水段则赋予碳纳米管分散性和水溶性.物理分散的方法简便易行<sup>[1]</sup>,而且在物理分散的过程中,碳纳米管的结构和优异性能被充分保留<sup>[2]</sup>.

然而物理分散方法中,用于分散碳纳米管的两亲分子一般本身具有潜在的毒性,成为限制这种方法在生物医学领域应用的主要因素之一<sup>[3]</sup>.最近的研究表明<sup>[4]</sup>,以胆固醇为疏水段,以仿细胞膜结构的聚甲基丙烯酸磷酸胆碱酯为亲水段的两亲性分子 CPMPC 所形成的胶束体系具有良好的生物相容性,能够有效地实现疏水性抗癌药物阿霉素的包埋与释放.

胆固醇和磷酸胆碱类磷脂分子都是细胞膜的重要组成部分,具有良好的生物相容性<sup>[5]</sup>.分子模拟的结果表明胆固醇和碳纳米管表面具有较强的

结合力<sup>[6]</sup>.此外,细胞膜外层带有等量正电荷和负电荷的卵磷脂的极性磷酸胆碱基团可以与水分子形成非常牢固的水合层<sup>[7]</sup>,人们已经采用卵磷脂作为稳定剂实现了碳纳米管在水溶液中的有效分散<sup>[8]</sup>.进一步的研究表明,随两亲分子中的亲水段分子量增加,其提供的空间排斥能力增强,因而对碳纳米管的分散能力也增强<sup>[9]</sup>.因此,通过对两亲分子的亲水段和疏水段进行合理的仿生设计,成为解决常规物理分散方法中两亲分子的毒性和分散能力较低等问题的可能途径<sup>[10]</sup>.

本文选用以胆固醇为疏水段,以仿细胞膜磷酸胆碱基聚合物为亲水段的两亲分子 CPMPC,并以商业可获得的典型两亲分子,末端含胆固醇的聚氧乙烯(CPEG)和卵磷脂为对照,通过紫外跟踪和细胞培养等手段,研究 CPMPC 用于改善碳纳米管的水溶性、稳定性和生物相容性的有效性.

### 1 经过两亲分子改性的碳纳米管的制备

仿细胞膜磷酸胆碱基两亲聚合物分子设计及其制备参照文献<sup>[11]</sup>方法进行,两亲分子  $\alpha$ -胆固醇-聚氧乙烯(CPEG)由 Nihon Emulsion Co. Ltd. 提供,所用聚合物的基本性质见表 1.卵磷脂购自上海华东师范大学化工厂.荧光光谱在 FP-770 (Japan Spectroscopic) 光谱仪上测定.碳纳米管购自深圳纳米港有限公司(多壁碳纳米管,直径 40

\* 2008-02-01 收稿,2008-05-09 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;\*\* 通讯联系人,E-mail: jijian@zju.edu.cn

~ 60 nm) 直接使用. 称取一定量的碳纳米管加入到特定浓度的两亲分子水溶液, 在 KQ2200 型超声清洗器中进行超声处理(100 W, 40 kHz) 超声处理 30 s 后, 静置一定时间, 取上层清液, 便得到经过两亲分子改性的碳纳米管的水溶液.

| Table 1 Properties of the amphiphilic polymers |                   |                          |
|------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|
| Sample                                         | $M_n$             | CMC <sup>a</sup> (mg/mL) |
| CPMPC                                          | 7917 <sup>b</sup> | $23.18 \times 10^{-3}$   |
| CPEG                                           | 2300 <sup>c</sup> | $3.24 \times 10^{-3}$    |

<sup>a</sup> Calculated from the excitation spectra of pyrene as a function of polymer concentrations in water; <sup>b</sup> Molecular weight from the <sup>1</sup>H-NMR results; <sup>c</sup> Molecular weight from supplier

2 不同浓度两亲分子水溶液分散碳纳米管能力测试

精确配制一系列不同浓度的两亲分子水溶液. 称取 25 mg 碳纳米管加入到 3 mL 上述溶液中, 超声处理 30 s, 静置 1.5 h, 取上清液稀释 31 倍后, 在 Shimadzu UV-2055 紫外光谱仪上测定 600 nm 处的紫外吸收值. 每个样本平行测定取平均值. 利用碳纳米管在 600 nm 处的吸收值与溶液中碳纳米管浓度的线性定量关系<sup>[12]</sup>, 对不同浓度的两亲分子对碳纳米管分散能力进行比较研究, 其结果见图 1. 结果表明, CPMPC 和 CPEG 对碳纳米管的分散能力随着聚合物溶液浓度的升高而增加, 而且在相同浓度下, CPMPC 溶液对碳纳米管的分散能力略高于 CPEG 的分散能力, 均显示出比卵磷脂溶液具有更高的对碳纳米管的分散能力. 进一步与标准曲线的对照实验表明, 1 mg/mL 的 CPMPC 水溶液可以有效分散碳纳米管的浓度为 1.705 mg/mL, 1 mg/mL 的 CPEG 的水溶液为 1.468 mg/mL, 而卵磷脂水溶液最高的分散能力为 0.326 mg/mL. 说明具有较长磷酸胆碱基聚合物链的 CPMPC 比单个磷酸胆碱基团的卵磷脂具有更强的分散能力.

3 聚合物水溶液分散碳纳米管的稳定性测试

称取 15 mg 碳纳米管加入到 3 mL CPMPC 和 CPEG 聚合物水溶液 (2 mg/mL), 摇匀后测定溶液在 600 nm 处的透光率在 6 h 内随时间的变化. 经过聚合物改性的碳纳米管在水溶液中的稳定性对比见图 2. 由于溶液的透光率与分散在溶液中的碳纳米管的浓度成反比, 因此透光率的增大表明碳纳米管在水溶液中的浓度降低. 结果表明, 经过 CPEG 改性的碳纳米管在水中沉降较快, 在 360 min 时透光率已经达到 11.0%. 而经过 CPMPC 改

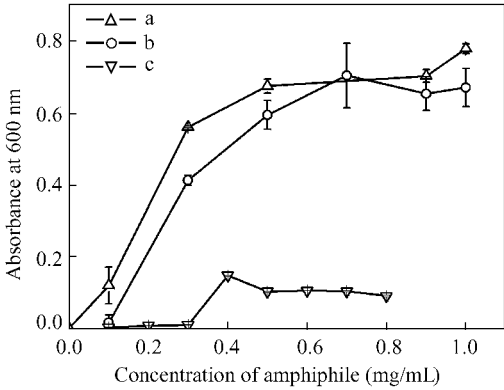


Fig. 1 Comparison of CNTs solubility in different concentrations of amphiphiles aqueous solution (a) CPMPC, (b) CPEG and (c) lecithin

性的碳纳米管在水中沉降缓慢, 具有显著的稳定性, 在 360 min 时透光率仅为 0.57%. 这说明 CPMPC 改性的碳纳米管比 CPEG 改性的碳纳米管在水溶液中的具有更好的稳定性.

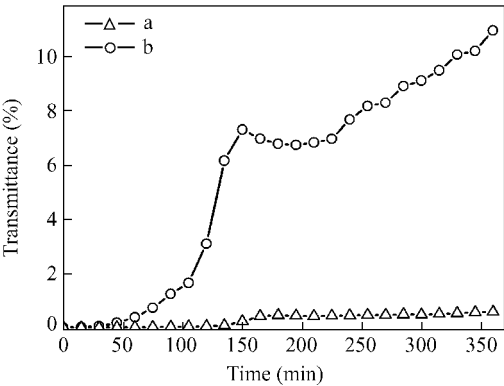


Fig. 2 Comparison of stability in aqueous solution between (a) CPMPC coated CNTs and (b) CPEG coated CNTs

4 经过聚合物改性的碳纳米管的细胞相容性评价

将人脐静脉内皮细胞系 HUVEC304 的细胞悬液种植到 96 孔聚苯乙烯培养板中, 每孔 8000 个细胞, 补加 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) 细胞培养液至 180  $\mu$ L 在 CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后, 加入 20  $\mu$ L 经过聚合物分散的碳纳米管水溶液, 控制碳纳米管的浓度为 30  $\mu$ g/mL, 聚合物浓度为 100  $\mu$ g/mL, 在空白对照样品中加入培养液 20  $\mu$ L, 继续培养不同时间后, 参照文献[4]的方法测定细胞活性和观察细胞形态. 细胞形态通过 BIO-RAD2000 激光共聚焦显微镜进行观察.

在控制培养基中碳纳米管的浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 聚合物浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  存在条件下, 人脐内皮细胞 HUVEC304 分别培养 24 h、48 h 和 96 h 后, 细胞活性检测结果见图 3. 经 CPEG 改性的碳纳米管存在条件下, 培养 24 h 后细胞的活性已经降至 40.7%, 并且随培养时间逐渐降低, 培养 48 h 后细胞活性为 25.3%, 而培养 96 h 后细胞的活性已经降至 7.7%, 表明经 CPEG 改性的碳纳米管具有明显的细胞毒性. 而在仿生聚合物 CPMPc 改性的碳纳米管存在条件下, 细胞培养 24 h、48 h 和 96 h 细胞后, 其活性分别为 99.0%、100.9%、98.8%, 显示出很小的细胞毒性. 可见经过细胞膜仿生聚合物 CPMPc 改性的碳纳米管比经过 CPEG 改性的碳纳米管具有更小的细胞毒性.

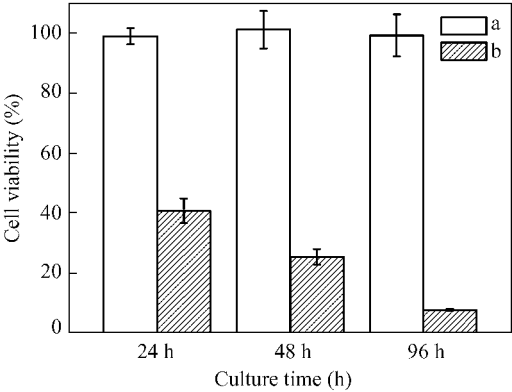


Fig. 3 The cell viability of HUVEC304 incubated with (a) CPMPc coated CNTs and (b) CPEG coated CNTs

在将经过聚合物改性的碳纳米管加入培养基并继续培养后, 通过荧光模式对细胞形态进行观察的结果见图 4. 在 CPEG 改性碳纳米管存在条件下, 细胞经过培养 24 h 后, 显示出圆形收缩状态, 而继续培养到 96 h 后, 已经没有可观察到的细胞存在. CPEG 改性的碳纳米管在细胞培养过程中显现出细胞毒性的原因可能在于 CPEG 这种两亲分子自身具有一定的细胞毒性<sup>[4]</sup>, 在碳纳米管的分散体系中, 溶液中残存的未与碳纳米管结合的两亲分子, 而且通过两亲分子分散碳纳米管的方法中, 可能存在碳纳米管上结合的两亲分子与溶液中残存的两亲分子的交换, 这就会在增溶体系中引入毒性. 与此明显不同的是, CPMPc 两亲分子由于自身具有优异的生物相容性<sup>[4]</sup>, 用于对碳纳米管进行改性, 细胞在所得碳纳米管分散体系中经过 24 h 和 96 h 的培养后, 其细胞形态均和自有培养基存在条件下的空白对照的细胞形态相近, 细胞呈铺展状态, 数量较多, 显示细胞呈正常的生长状态. 可见 CPMPc 改性碳纳米管的存在不会影响细胞正常生长.

细胞活性测定和细胞形貌观察的结果都表明, CPMPc 改性碳纳米管具有良好的细胞相容性.

5 结论

对两亲分子的亲水段和疏水段进行合理的仿生设计, 是解决物理分散碳纳米管方法中存在的

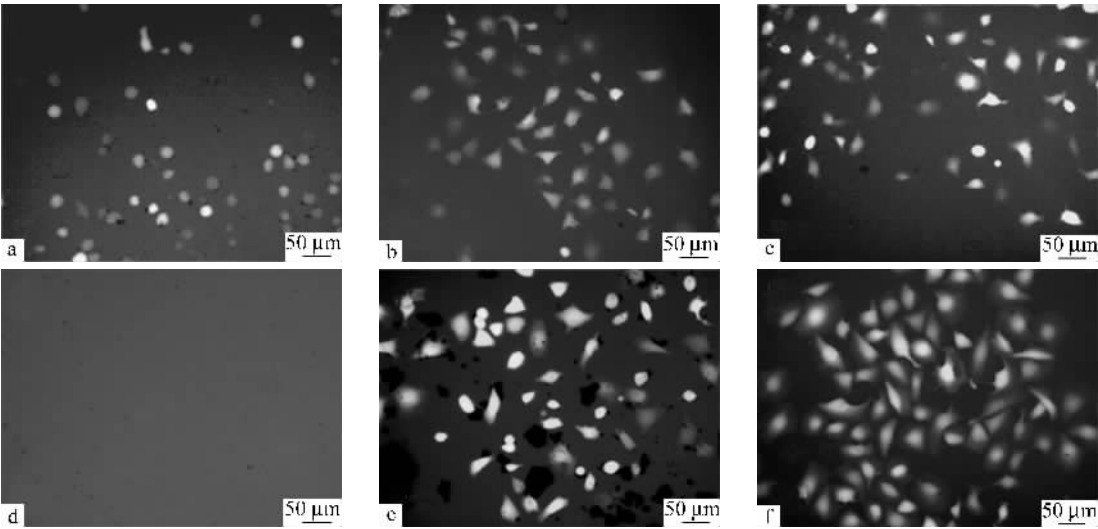


Fig. 4 Fluorescence micrographs of the HUVEC304 cells stained with FDA (a) incubated with CPEG coated CNTs for 24 h, (b) incubated with CPMPc coated CNTs for 24 h, (c) incubated in pure culture media for 24 h, (d) incubated with CPEG coated CNTs for 96 h, (e) incubated with CPMPc coated CNTs for 96 h, (f) incubated in pure culture media for 96 h. All the images were magnified 200-folds.

潜在毒性和分散能力低等问题的有效途径. 磷酸胆碱基细胞膜仿生聚合物 CPMPC 可有效改善碳纳米管的水溶性、稳定性和生物相容性,所获得的

高稳定性、高生物相容性碳纳米管在生物医学领域有广泛的应用前景.

REFERENCES

1 ChLin Y,Taylor S,Li H,Fernando K A S,Qu L,Wang W,Gu L,Zhou B,Sun Y P.J Mater Chem,2004,14 527 ~ 541

2 Yuan Wangzhang (袁望章),Zhao Hui (赵辉),Xu Haipeng (徐海鹏),Sun Jingzhi (孙景志),Lam J W Y,Mao Yu (毛宇),Jin Jiake (金佳科),Zhang Shuang (张双),Zheng Qiang (郑强),Tang Benzong (唐本忠). Acta Polymerica Sinica (高分子学报),2007,(10) 901 ~ 904

3 Isobe H,Tanaka T,Maeda R,Noiri E,Solin N,Yudasaka M,Iijima S,Nakamura E. Angew Chem Int Ed,2006,45 6676 ~ 6680

4 Xu J P, Ji J, Chen W D, Shen J C. J Control Release,2005,107 502 ~ 512

5 Yu Guanhua (余贯华), Ji Jian (计剑), Shen Jiacong (沈家骢). Acta Polymerica Sinica (高分子学报),2006,(1) 136 ~ 140

6 Raczynski P,Dawid A,Pietek A,Gburski Z. Journal of Molecular Structure,2006,792-793 216 ~ 220

7 Ishihara K,Nomura H,Mihara T,Kurita K,Iwasaki Y,Nakahayashi N. J Biomed Mater Res,1998,39 323 ~ 330

8 Wu Y,Hudson J S ,Lu Q,Moore J M,Mount A S,Rao A M,Alexov E,Ke C P. J Phys Chem B,2006,110(6) 2475 ~ 2478

9 Moore V C,Strano M S,Haroz E H,Hauge R H,Smalley R E,Schmidt J,Talmon Y. Nano Letters,2003,3(10) 1379 ~ 1382

10 Pu Ming (浦鸣), Ji Jian (计剑), Li Xiaolin (李晓林), Shen Jiacong (沈家骢). Acta Polymerica Sinica (高分子学报),2006,(5) 703 ~ 706

11 Xu J P, Ji J, Chen W D, Shen J C. Macromol Biosci,2005,5 164 ~ 171

12 Sun Y P,Huang W,Lin Y,Fu K,Kitaygorodskiy A,Riddle L A,Yu Y J,Carroll D L. Chem Mater,2001,13(9) 2864 ~ 2869

A CELL MEMBRANE BIOMIMETIC POLYMER FOR SURFACE  
MODIFICATION OF CARBON NANOTUBES

XU Fangming, XU Jianping, JI Jian, SHEN Jiacong

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

**Abstract** A novel biomimetic amphiphilic polymer, cholesterol-end-capped poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (CPMPC), was used as surfactant to achieve water soluble and biocompatible carbon nanotubes (CNTs). Crude CNTs were facilely dispersed in aqueous media by ultrasonication with the help of CPMPC, with cholesterol-end-capped PEG (CPEG) and lecithin as controls. The ability of the novel biomimetic amphiphile to solubilize and stabilize the CNTs was investigated by UV spectra. The solubility of CNTs in 1 mg/mL CPMPC and CPEG aqueous solutions was found to be 1.705 mg/mL and 1.468 mg/mL, respectively. The solubility of CNTs, in 0.8 mg/mL lecithin was, however, only 0.326 mg/mL. Furthermore, CPMPC coated CNTs precipitated quite slowly compared with CPEG coated CNTs, which indicated better stabilizing ability of CPMPC. Cell culture was used to evaluate the biocompatibility of the amphiphiles stabilized CNTs using MTT assay and cell morphology observation. While CPEG coated CNTs showed obviously detrimental effect on the growth of HUVEC304 cells, CPMPC coated CNTs did not exhibit obvious toxicity. The biocompatible CPMPC coated CNTs represent an excellent nano-object for potential biomedical applications.

**Keywords** Carbon nanotubes, Phosphorylcholine, Biomimetic, Biocompatibility