

·研究简报·

类肝素超支化聚醚的制备、组装及其生物相容性的研究^{*}

胡晓芬 计 剑^{**}

(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 利用超支化的聚(3-乙基-3-羟甲基氧杂环丁烷)(HBPO)与 1,3-丙烷磺内酯反应,制备了磺酸基修饰的水溶性的类肝素超支化聚醚(HBPO-SO₃),¹H-NMR 和 FTIR 表征产物具有预期的结构.通过粒径分析仪、透射电镜(TEM)和荧光探针对聚合物在水溶液中的自组装行为进行表征,证明当 HBPO-SO₃ 在水溶液中的浓度大于 0.017 mg/mL 时,可形成尺寸在 25 ~ 70 nm 之间的具有疏水内核的胶束.复钙化凝血时间(PRT)的测定证明这种类肝素超支化聚醚具有良好的抗凝血性能,体外细胞活性测定和细胞形貌观察证明其具有良好的细胞相容性.

关键词 类肝素,超支化,自组装,生物相容性

超支化聚合物是一类具有高度支化结构的准椭球状大分子,其表面含有大量的活性末端官能团,有利于进一步的功能化设计使之在生物医药领域得到广泛应用^[1].目前,设计、合成可作为疏水药物控释载体的新型超支化聚合物成为该领域的研究热点之一^[2,3].Kontoyianni 等^[4]合成了聚环氧乙烷(PEO)修饰的超支化聚酯,利用其能在水溶液中形成稳定的单分子的特性,作为疏水抗癌药物紫杉醇的纳米载体.同时,关于利用超支化多臂共聚物的溶液自组装的研究在近几年得到深入研究.颜德岳等^[5~7]合成了一系列具有超支化聚醚内核的两亲性超支化多臂共聚醚,制备巨型聚合物囊泡、多分子复合胶束、巨型复合囊泡等新型的分子自组装体,并研究了这种分子自组装体对疏水药物的包载和控释.

生物医用材料的表面性能往往决定了其在生理环境中的作用,其中,材料表面的抗凝血性能是设计与血液直接接触的生物医用材料的关键.肝素是一种天然的抗凝剂,表面肝素化可有效延长聚合物纳米粒子的体内循环时间^[8,9],其中肝素分子中大量的硫酸酯基和氨基磺酸基是决定其抗凝性能的主要因素.因此,研究者设计合成了一系列磺酸基改性的聚合物,即“类肝素”(“heparin-like”)聚合物,并实验证明在聚合物结构中引入磺酸基官能团可有效改善聚合物的血液相容

性^[10,11].

本文通过对超支化聚醚的末端官能团进行磺酸基改性,将疏水的超支化聚(3-乙基-3-羟甲基氧杂环丁烷)转化为水溶性的类肝素超支化聚醚.研究类肝素超支化聚醚在水溶液中的自组装行为,对其作为疏水药物载体应用的可能性进行初步探索.并通过体外血液相容性实验和体外细胞培养,评价这种磺酸基改性的超支化聚醚的生物相容性及其作为生物医药材料的可能性.

1 试剂和仪器

超支化聚醚 HBPO ($M_w \approx 4354$, $M_w/M_n = 1.74$)由上海交通大学颜德岳提供;NaH(60%, moistened with oil, Fluck),1,3-丙烷磺内酯(Fluck),苾(Aldrich)直接使用;四氢呋喃(THF)使用前经 Na 处理重蒸.

¹H-NMR 谱用 DMX500(Bruker)核磁共振谱仪测试,TMS 为内标;FTIR 谱用 Vector2(Bruker)红外光谱仪测试;粒径分析由 Brookhaven 公司的 90Plus 粒度分析仪测定;用 JEM 1230 透射电子显微镜(JEOL Co.)观察聚集体形态;苾的荧光用 FP-770 荧光光谱仪(Japan Spectroscopic)测定,激发波长为 336 nm,发射波长为 394 nm,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm.

^{*} 庆祝杨士林先生 90 华诞专稿;2009-02-17 收稿,2009-03-02 修稿;国家自然科学基金(基金号 50830106)、浙江省自然科学基金(基金号 Y4080250)和教育部博士点基金(基金号 20070335024)资助项目;^{**} 通讯联系人,E-mail: jijian@zju.edu.cn

2 HBPO-SO₃ 的合成及自组装

将 HBPO(1.00 g, 8.6 mmol —OH)溶解于无水 THF 溶液(100 mL),在不断搅拌下中加入过量的 NaH(0.7 g),通氮气将生成的氢气带走.回流反应 12 h 后,加入 1,3-丙烷磺内酯(1.6 g, 12.9 mmol)继续回流 12 h.反应完毕,过滤反应液中的固体析出,得到的粗产品经透析除去杂质提纯,冻干得到白色固体产物,产率为 52%,HBPO 末端羟基的磺化度为 45%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, δ): 0.81 (—CH₂—CH₃), 1.28 (—CH₂CH₃), 1.78 (—OCH₂CH₂CH₂SO₃), 2.46 (—OCH₂CH₂CH₂SO₃), 3.14 ~ 3.42 (—CH₂OCH₂—, —CH₂OH, —OCH₂CH₂CH₂SO₃), 4.18 (—(CCH₂OCH₂)—). FTIR 峰 ν (cm⁻¹): 3435, 2967, 2926, 2867, 1364, 1204, 1116, 1046.

称取 10 mg HBPO-SO₃ 溶解于 10 mL 三蒸水,室温下磁力搅拌,得到 HBPO-SO₃ 的自组装胶束溶液.

3 HBPO-SO₃ 的生物相容性

3.1 复钙化凝血时间(PRT) 已预热至 37℃ 的人体抗凝血浆(已除 Ca²⁺)0.1 mL 和生理盐水(0.9% NaCl)0.1 mL 依次加入到 37℃ 水浴中恒温的硅化玻璃试管.加入已预热的 0.025 mol/L CaCl₂ 溶液 0.1 mL,同时开动秒表计时.将一根不锈钢小钩伸入溶液中均匀缓慢地搅动,并检查是否有纤维蛋白的形成.记录小钩上刚开始出现丝状物的时间,此时间即是复钙化凝血时间.以 0.1 mL HBPO-SO₃ 的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液代替生理盐

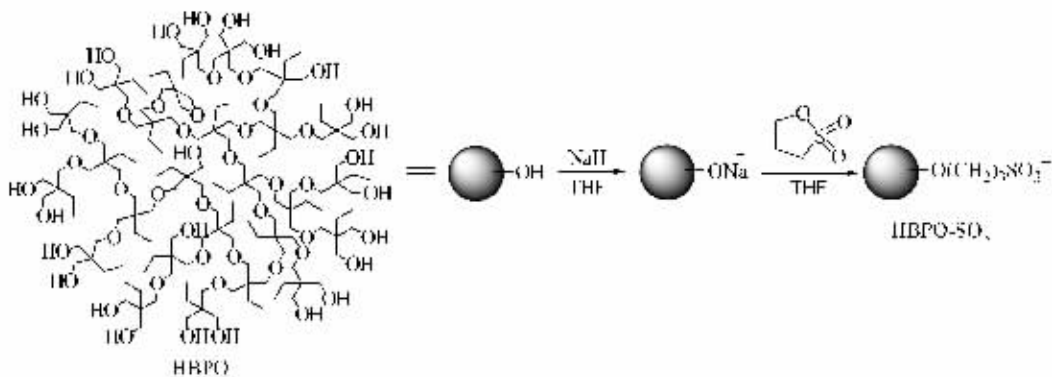
水,即可测定不同浓度的 HBPO-SO₃ 溶液的复钙化凝血时间^[12].每个样品至少重复 3 次,取平均值.

3.2 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 5000 个细胞,加入 180 μ 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 μ L 不同浓度的 HBPO-SO₃ 的 PBS 溶液,继续培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL 的 PBS 溶液)20 μ L,37℃ 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 μ L 二甲基亚砷(DMSO),轻轻震荡 20 min,酶标仪(Bio-Rad, model 550)测定各孔在波长 570 nm 处的光吸收值(DMSO 为空白),以该吸收值与未加聚合物的条件下进行的细胞培养(TCPS)所测定的吸收值的百分比表示细胞活性^[13].

3.3 细胞形态 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 类肝素超支化聚醚的合成、表征与自组装

超支化聚醚 HBPO 的分子末端具有大量的羟基,通过羟基与 1,3-丙烷磺内酯的反应在超支化聚合物外层引入磺酸基,将疏水的超支化聚醚转化为水溶性的类肝素超支化聚醚,从而提高聚合物的生物相容性(示意图 1).



Scheme 1 Synthesis route for the formation of HBPO-SO₃

核磁共振结果表明,由 1,3-丙烷磺内酯开环反应在超支化聚醚 HBPO 分子末端引入的官能团 —OCH₂CH₂CH₂SO₃ 中的 3 个亚甲基分别在 δ = 3.42, 1.78, 2.46 处出峰,且通过 δ = 1.78 处的亚

甲基特征峰与 δ = 0.81 处的甲基特征峰的积分面积比值即可计算出 HBPO 分子末端羟基的转化率为 45%.

磺酸基改性后的超支化聚醚的分子末端带有

大量的负电荷,其电荷斥力使得 HBPO-SO₃ 在水溶液中能形成相对稳定的单分子状态.图 1 是 0.01 mg/mL HBPO-SO₃ 溶液的 TEM 照片,其单分子的尺寸约为 5 nm,与之前的文献报道结果相似^[14].

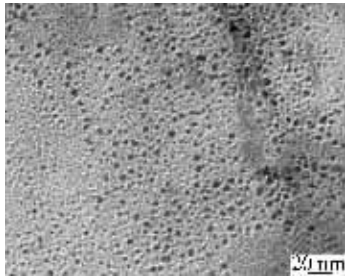


Fig. 1 TEM image of HBPO-SO₃ unimolecular micelles

另一方面,聚合物分子末端未参与反应的羟基促使这种类肝素的超支化聚醚在浓度较高的溶液中可通过氢键形成稳定的聚集体.本文用芘荧光探针的方法测定了 HBPO-SO₃ 在水中的临界胶束浓度(CMC).芘是一种高度疏水的芳香烃化合物,对周围环境极性的变化非常敏感.当 HBPO-SO₃ 的浓度高于 CMC 时,芘倾向于在聚集体的疏水内核中聚集,其光学性质发生变化.随着浓度的增加,HBPO-SO₃ 在水溶液中由单分子自组装形成聚集体,由此芘的激发光谱由 333 nm 向 338 nm 发生红移,同时发射光谱中 373 nm 和 393 nm 处峰的强度也发生明显的变化.分别以激发光谱中 I_{338}/I_{333} 的比值和发射光谱中 I_{373}/I_{393} 的比值对聚合物浓度作图,得到聚合物的 CMC,取平均值(图 2).HBPO-SO₃ 在水中的 CMC 为 0.017 mg/mL.另外,发射光谱中 383 nm 与 373 nm 处发射峰的强度比值(I_3/I_1)可用于指示探针芘所处微环境的亲疏水性, I_3/I_1 的比值越大,说明芘所处环境的疏水性越强.当 HBPO-SO₃ 的浓度低于临界胶束浓度时, I_3/I_1 约为 1.0,当 HBPO-SO₃ 的浓度高于临界胶束浓度时, I_3/I_1 约为 1.19.这一现象说明,HBPO-SO₃ 无论是处于单分子状态还是聚集体状态,都为探针芘提供了一个十分疏水的环境,对疏水小分子具有包载能力.

通过粒度分析仪测定 1 mg/mL HBPO-SO₃ 水溶液,聚集体的平均粒径为 32.5 nm.通过透射电镜观察 HBPO-SO₃ 聚集体的尺寸和形态.如图 3 所示,聚合物在 1 mg/mL 的水溶液中自发形成球形的胶束,其粒径在 25 ~ 70 nm 之间.随机统计不

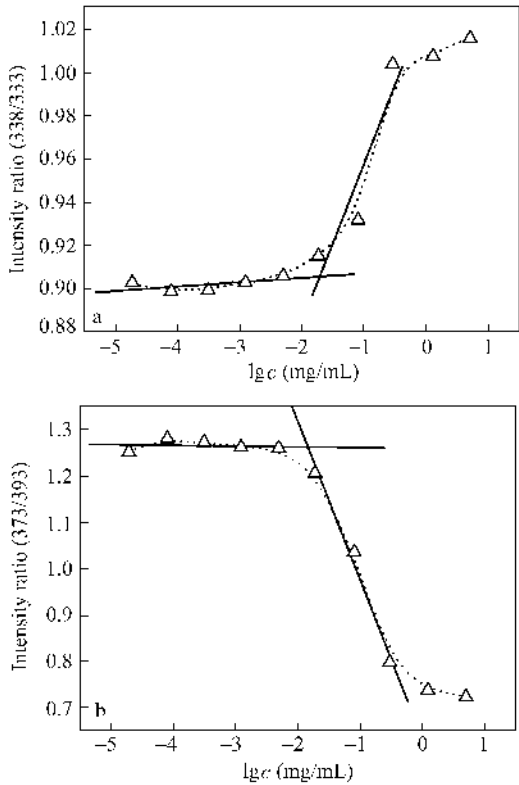


Fig. 2 (a) Pyrene I_{338}/I_{333} excitation intensity ratios plotted against polymer concentration and (b) pyrene I_{373}/I_{393} emission intensity ratios plotted against polymer concentration

同 TEM 照片中的 200 个聚集体,得到平均粒径大约为 44.7 nm,与粒径分析仪所得的结果基本相符.TEM 统计的粒径尺寸略大于粒径分析仪测定的粒径尺寸,可能是由于在 TEM 制样过程中,胶束在铜网上铺展引起的.

5 类肝素超支化聚醚的生物相容性

分子末端通过磺酸基改性后的超支化聚醚 HBPO-SO₃ 具有类肝素的性质,可望具有良好的血液相容性.以生理盐水为对照,测定不同浓度的 HBPO-SO₃ 溶液的复钙化凝血时间.PRT 结果表明,当 HBPO-SO₃ 浓度为 0.33 mg/mL 时,在实验进行的 1 h 内无凝血现象;当 HBPO-SO₃ 浓度降低至 0.0033 mg/mL 时,在 370 s 时出现凝血,但相较于对照样生理盐水(PRT = 283 s)而言,仍显示了一定的抗凝血性(图 4).因此证明无论是单分子状态还是胶束状态,改性后的超支化聚醚均显示了良好的抗凝血性能.

通过内皮细胞的培养,利用细胞活性测定和细胞形貌观察,对类肝素超支化聚醚 HBPO-SO₃ 的细胞相容性进行评价.MTT 法测定细胞活性的

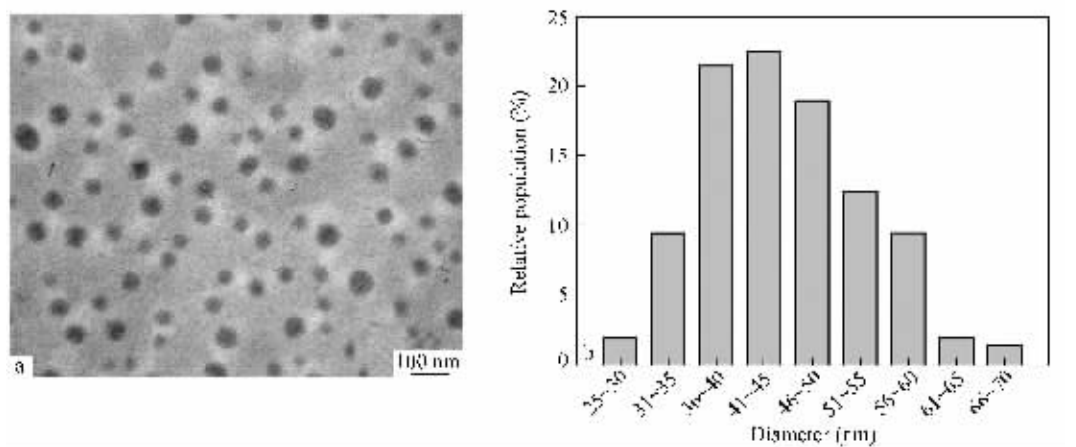


Fig. 3 (a) TEM image of HBPO-SO₃ micelles and (b) the statistic size distribution of HBPO-SO₃ micelles by TEM

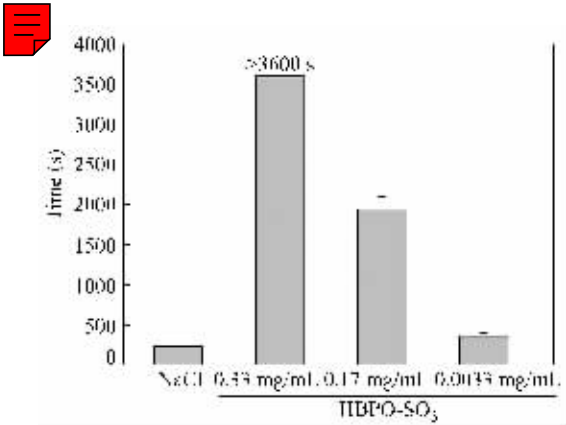


Fig. 4 Comparison of PRT obtained in the absence and presence of HBPO-SO₃

HBPO-SO₃ solutions with $c = 1, 0.5$, and 0.01 mg/mL were studied here; The concentration of HBPO-SO₃ in the clotting tube was 0.33 , 0.17 and 0.0033 mg/mL.

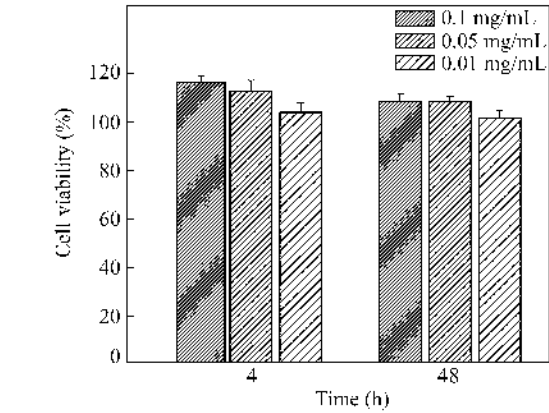


Fig. 5 The cell viability of cells in HBPO-SO₃ solutions and culture medium after 4 h and 48 h incubation time

HBPO-SO₃ solutions with $c = 1, 0.5$, and 0.1 mg/mL were added into culture media, respectively; The concentration of HBPO-SO₃ in the media was $0.1, 0.05$, and 0.01 mg/mL.

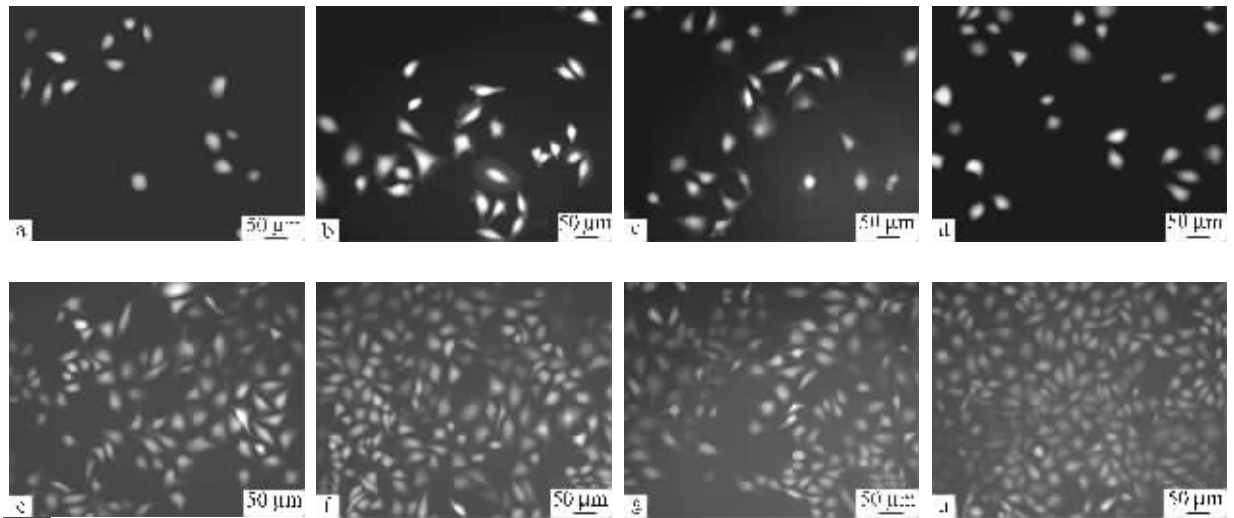


Fig. 6 Fluorescence micrographs of the cells in (a, e) 0.1 mg/mL, (b, f) 0.05 mg/mL, (c, g) 0.01 mg/mL HBPO-SO₃ containing media and (d, h) pure culture media, at 4 h (a ~ d) and 48 h (e ~ h) after seeding, respectively

结果表明,在细胞培养基中依次加入不同浓度的 HBPO-SO₃ PBS 溶液分别孵育 4 h 和 48 h,当聚合物溶液浓度达到 1 mg/mL,即在培养基中聚合物浓度为 0.1 mg/mL 时,细胞仍具有良好的活性(图 5).图 6 中细胞形貌的观察结果表明,在 HBPO-SO₃ 溶液中,细胞显示出良好的黏附和生长状态,并与对照组 TCPS 中的细胞生长状态一致.上述结果说明,类肝素超支化聚醚 HBPO-SO₃ 具有极低的细胞毒性和良好的细胞相容性.

6 结论

利用超支化的聚(3-乙基-3-羟甲基氧杂环丁烷)末端的羟基与 1,3-丙烷磺内酯反应合成了具

有大量磺酸基末端官能团的水溶性类肝素超支化聚醚 HBPO-SO₃. HBPO-SO₃ 在水溶液中可自发组装形成平均粒径约为 32.5 nm 的胶束,其内核为疏水的支化聚醚链,外层为带负电荷的磺酸基.分子末端的磺酸基使得超支化聚合物在单分子状态及聚集状态均体现了良好的抗凝血性能,同时这种聚合物具有低的细胞毒性和良好的细胞相容性,适用于与血液直接接触的体内环境.由于 HBPO-SO₃ 聚集尺寸基本小于 100 nm,且具有包载疏水小分子的能力,因此具有作为纳米药物载体的潜在应用价值.

REFERENCES

- 1 Zhong Ling(钟玲), He Xiaohua(贺小华), Zhou Yongfeng(周永丰), Yan Deyue(颜德岳), Pan Caiyuan(潘才元). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2007, (10): 986 ~ 992
- 2 Türk H, Shukla A, Rodrigues P C A, Rehage H, Haag R. *Chem Eur J*, 2007, 13: 4187 ~ 4196
- 3 Tziveleka L A, Kontoyianni C, Sideratou Z, Tsiourvas D, Paleos C M. *Macromol Biosci*, 2006, 6: 161 ~ 169
- 4 Kontoyianni C, Sideratou Z, Theodossiou T, Tziveleka L, Tsiourvas D, Paleos C M. *Macromol Biosci*, 2008, 8: 871 ~ 881
- 5 Hong H, Mai Y, Zhou Y, Yan D, Chen Y. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2008, 46: 668 ~ 681
- 6 Wan A, Kou Y. *J Nanopart Res*, 2008, 10: 437 ~ 448
- 7 Zhou Y, Yan D. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 4896 ~ 4899
- 8 Tamada Y, Murata M, Hayashi T, Goto K. *Biomaterials*, 2002, 23: 1375 ~ 1382
- 9 Passirani C, Barratt G, Devissaguet J P, Labarre D. *Pharm Res*, 1998, 15: 1046 ~ 1050
- 10 Kim Y H, Han D K, Park K D, Kim S H. *Biomaterials*, 2003, 24: 2213 ~ 2223
- 11 Aguilar M R, Rodríguez G, Fernández M, Gallardo A, San Roman J. *J Mater Sci: Mater Med*, 2002, 13: 1099 ~ 1104
- 12 Wuang S C, Neoh K G, Kang E, Pack D W, Leckband D E. *Adv Funct Mater*, 2006, 16: 1723 ~ 1730
- 13 Jia Lan(贾兰), Xu Jianping(徐建平), Ji Jian(计剑), Shen Jiacong(沈家骢). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2008, (11): 1108 ~ 1112
- 14 Dong W, Zhou Y, Yan D, Li H, Liu Y. *Phys Chem Chem Phys*, 2007, 9: 1255 ~ 1262

SYNTHESIS AND SELF-ASSEMBLY OF SULFONATED HYPERBRANCHED POLYETHERS AND THEIR BIOCOMPATIBILITY

HU Xiaofen, JI Jian

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

Abstract A novel water soluble sulfonated hyperbranched polyether (HBPO-SO₃), consisting of a hydrophobic hyperbranched poly(3-ethyl-3-oxetanemethanol) core and many sulfonate terminal groups, was designed as a promising heparin-like biomaterial. The micelle formation of the resultant HBPO-SO₃ in aqueous solutions was monitored by fluorescence spectroscopy using pyrene as a hydrophobic probe, and the critical micelle concentration (CMC) was determined to be 0.017 mg/mL. The analyses of transmission electron microscopy (TEM) clearly showed that all the sulfonated hyperbranched polyether samples aggregated into spherical micelles with diameters of 25 ~ 70 nm. The mean diameter of micelles determined by the laser scattering particle size distribution analyzer is about 32.5 nm. Compared with the saline solution used as a control in the plasma recalcification time (PRT) assay,

both HBPO-SO₃ micelles solution and unimolecular micelles solution could reduce blood clotting. In the case of HBPO-SO₃ at a concentration of 0.33 mg/mL, there were no signs of clotting even after 1 h. The toxicity of HBPO-SO₃ was assessed in vitro with ECV-304 cells using MTT method and found to be nontoxic for 48 h incubation up to a 0.1 mg/mL concentration. The cell morphology was also observed by confocal laser scanning microscope (CLSM). The results of CLSM revealed that the culture media containing HBPO-SO₃ up to 0.1 mg/mL had no negative effect on the attachment and proliferation of cells, compared with the control. Results from the PRT assay and cell culture declared that both HBPO-SO₃ micelles and the unimolecular micelles exhibited good hemocompatibility and low cytotoxicity. These experimental results suggest that HBPO-SO₃ could be a good candidate for hydrophobic drug carriers.

Keywords Heparin-like, Hyperbranched, Self-assembly, Biocompatibility