

细胞内转运载体超支化聚砜胺及其生物相容性

陈素芸¹, 孙国明², 姜磊¹, 李楠¹, 李培勇¹, 朱新远²

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科, 上海 200025;

2. 上海交通大学化学化工学院, 上海 200240)

摘要 通过制备超支化聚砜胺-异硫氰酸荧光素聚合物(PSA-FITC), 研究其生物相容性、肿瘤细胞对其内吞作用和正常小鼠体内的生物分布, 以探讨 PSA 作为载体进行药物和基因体内输送的可行性. 在碱性条件下共价结合 PSA 与 FITC, 形成荧光标记聚合物(PSA-FITC)后测定聚合物中 FITC 含量. 在不同时间点, 通过流式细胞术检测细胞对聚合物的内吞作用; 正常 balb/c 裸鼠尾静脉注射 PSA-FITC 24 h 后, 用小动物活体荧光成像系统研究各脏器聚合物分布. 不同浓度 PSA 与 3T3 小鼠成纤维细胞及 KB 人口腔上皮肿瘤细胞分别孵育 24, 48, 72 h 后, 通过 MTT 法测得其生物相容性. 结果表明, PSA 生物相容性良好, 72 h 的细胞半抑制浓度大于 1 mg/mL. 细胞摄入 PSA-FITC 高效快速, 3 h 阳性细胞百分含量为 $99.24\% \pm 1.03\%$, 且具有时间依赖性. 在正常小鼠体内, PSA 在各主要脏器或组织中无明显特异性浓聚. 超支化聚砜胺具有明显生物低毒性和高效细胞内转运特点. 由于其表面功能基团容易改性, 作为载体, 通过连接结合配体或抗体, 在肿瘤的主动靶向治疗中具有广阔的应用前景.

关键词 超支化聚砜胺; 细胞毒性; 细胞内转运; 生物分布; 生物相容性

中图分类号 O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)04-0825-05

抗肿瘤药物对正常组织细胞有明显的毒副作用. 理想的靶向药物输送系统(Targeted drug delivery system, TDDS)能有效地改善药物动力学, 增加药物水溶性并增加药物治疗指数, 从而在得到相同的治疗效果的同时减少用药剂量并降低全身性的不良反应^[1]. 除无免疫原性及生理环境下结构稳定等要求外, 理想的载体还应能够同时携带多个分子, 包括治疗药物、靶向配体或显像分子等^[2]. 在单个载体上携带多个配体, 通过协同作用可增强其与受体的亲和力^[3].

目前作为靶向药物输送系统的载体主要有脂质体、线性聚合物和树状大分子[如聚酰胺-胺, Poly(amido-amine), PAMAM]等. 与传统聚合物相比, 树状大分子有着结构及功能优势, 包括单分散性、精确的尺度结构、表面丰富功能基团等特性, 使之成为生物医药领域主要的研究对象^[4], 但其合成繁复, 得率低, 成本高, 应用受到一定限制^[3]. 与树状大分子不同的是, 超支化聚合物能够一步合成, 并具有三维立体高度支化结构和末端丰富功能基团. 本文采用一种末端为丰富氨基基团的高亲水性超支化聚合物: 超支化聚砜胺(PSA)为载体, 通过与荧光显像分子异硫氰酸荧光素(FITC)共价结合, 形成 PSA-FITC 聚合物. 对 PSA 装载 FITC 的能力、肿瘤细胞对其内吞作用、小鼠体内生物分布及其细胞生物相容性进行研究, 探索超支化聚砜胺作为载体, 向细胞内传递药物或基因的可行性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

4 代聚酰胺-胺(PAMAM-G4)为华东理工大学超细材料制备与应用教育部重点实验室馈赠; 二乙烯基砜(DV)、1-(2-胺乙基)哌嗪(AP)、FITC 均购自 Sigma 公司, 其中 DV 在使用前真空蒸馏纯化; 氯

收稿日期: 2008-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20574044, 50633010, 50773037)和新世纪优秀人才计划及上海市重点学科医学影像学及核医学资助.

联系人简介: 李培勇, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米材料生物医学应用研究. E-mail: peiyli@vip.sina.com

朱新远, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事超支化聚合物的合成、表征及功能化研究. E-mail: xyzhu@sjtu.edu.cn

仿、甲醇、二甲亚砜(DMSO)及 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)从 Amresco 公司购得;再生纤维素透析袋(MWCO: 1000)购自 Spectrum 公司;其余试剂如 DMEM 培养液等均为 Gibco 公司产品. NMR 仪(Varian MERCURY plus-400, Oxford magnet), 真空冷冻干燥仪(Christ α 1-2ld. plus, Marin Christ), 紫外分光光度计(Du600, Beckman), 流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson), 酶标仪(SpectraMax 190, Molecular Devices), 小动物活体荧光成像仪(NightOwl LB 983 Nc100, Berthold Technologies).

1.2 PSA 与 PSA-FITC 的制备与表征

采用 $A_2 + BB'_2$ 单体共聚法制备 PSA^[5], 并以 GPC(Jordi DVB Mixed Bed 10 mm \times 250 mm columns, 线性聚苯乙烯标定)及 NMR 进行表征. 根据核磁氢谱或定量碳谱的积分面积, 利用下式可以计算 PSA 的支化度(DB):

$$DB = (x_D + x_T) / (x_D + x_T + x_L)$$

式中, x_D , x_T 和 x_L 分别代表支化单元、末端单元和线性单元的摩尔分数.

将 PSA(80 mg, 2.6 μ mol) 与 FITC(15 mg, 38.5 μ mol) 分别以 10 mL 碳酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH=9.6) 溶解后混匀, 避光室温搅拌 12 h 以上. 将反应液进行透析并以真空冷冻干燥仪冻干, 得到 87 mg PSA-FITC 粉末, 收率 91%. 以相同碳酸盐缓冲液溶解 FITC, 以紫外分光光度法于 488 nm 处制作 FITC 标准曲线, 并测试聚合物吸光度.

1.3 细胞对聚合物的内吞作用

KB 人口腔上皮肿瘤细胞及 3T3 小鼠成纤维细胞购自中国科学院细胞研究所(上海), 以 RPMI 1640 及 DMEM 培养液, 含质量分数为 1% 青链霉素, 10% 灭活胎牛血清, 于 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养. 将 5×10^5 个 KB 细胞铺于六孔板上过夜, 加入 PSA-FITC, 分别孵育 30 min, 1 h 及 3 h. 以 PBS 洗涤 2 次, 每次 3 ~ 5 min. 胰酶消化后离心(1500 r/min, 5 min), 弃去上清液后以 PBS 重悬, 用流式细胞仪测定细胞荧光强度.

1.4 细胞毒性

以 5000 个 3T3 或 KB 细胞/孔的密度铺 96 孔板, 每个浓度设置 8 个复孔, 以 PAMAM-G4 为实验对照组, 以标准 MTT 法实验检测细胞存活率^[6].

1.5 荧光成像

为防止食物之自发荧光, 正常 8 周龄 balb/c 裸鼠($n=9$)(体重 20 ~ 30 g) 于实验前禁食 1 d, 尾静脉注射 PSA-FITC, 于注射后 24 h 进行小动物活体荧光成像. 将动物处死, 分离各脏器, 以冰 PBS 洗净后拭干, 平铺于黑纸上, 置成像仪暗箱内进行成像. 通过 WinLight 32 软件 ROI 功能计算各脏器荧光强度, 以 cts/pix/s 表示.

1.6 统计方法

采用 SPSS 软件(12.10) 进行方差分析和相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果与讨论

2.1 PSA 与 PSA-FITC 的制备与表征

GPC 测定苯甲酰氯封端的 PSA 数均分子量为 3.0×10^4 , 分子量分布为 1.3. ¹H NMR 和 ¹³C NMR 测定其支化度为 0.41, 其中伯胺基团含量约占 12% (摩尔分数). 以 UV-Vis 在 488 nm 处检测 PSA-FITC 聚合物吸光度, 由 FITC 标准曲线计算得到修饰后聚合物中 FITC 摩尔分数约占 8%.

PSA 是一种具有高度分支结构的新型材料, 合成简单, 具有低黏度、高流变性、良好的溶解性及大量末端官能团等一系列独特的理化特性. 实验结果表明, PSA 中伯胺基团约为 28 个. 研究报道 PSA 经不同长度烷基酰氯封端后平均每分子可捕捉 41.8 个刚果红及 18.9 个甲基橙分子, 远高于已报道的树状大分子的封装负荷^[7]. 同时其分子表面具有大量功能基团, 可根据需要接上不同分子. 因此 PSA 作为新型载体在生物医学领域有着广阔的应用前景.

2.2 PSA 的体外生物相容性

为了检验新型聚合物载体的生物相容性, 通常选择合适的孵育时间及足够高的浓度测定 IC₅₀ 数

据^[8]. 如图 1 所示, 将 PSA 与 KB 和 3T3 两种细胞分别孵育 24, 48 及 72 h 后, 均未产生明显细胞毒性. 当孵育至 72 h, PSA 浓度大于 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞活力开始明显下降, 高于 PAMAM-G4 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0.01$). 两种细胞的 PSA 半抑制浓度 (IC_{50}) 均大于 1 mg/mL (72 h). 当 PAMAM-G4 浓度大于 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 与之孵育的 KB 活力开始下降. PAMAM-G4 与 3T3 孵育 24 h 时细胞半抑制浓度可达到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而当孵育时间延迟至 48 h 后, 半抑制浓度下降为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Roberts 等^[9] 分别将浓度为 1 mmol/L 和 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的第 3 代和第 5 代氨基末端 PAMAM 与 V79 中国仓鼠肺成纤维细胞孵育 24 h 后, 发现有 90% 细胞死亡. Malik 等^[10] 比较了 PAMAM 分别以二氨基丁烷 (DAB)、二氨基乙烷 (DAE) 为核的树状大分子及聚左旋赖氨酸 (PLL) 等多种聚合物载体的细胞毒性, 得到了与 Roberts 相似的结论, 其半抑制浓度为 50 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 树状大分子的细胞毒性除代数及电荷数外更与其内核的化学性质十分相关^[8]. 我们采用的 PSA 为阳离子聚合物, 无内核, 且结构疏松, 电荷密度低, 导致分子运动能力增强, 这些特点使 PSA 呈现优异的生物相容性. 目前, 多种阳离子聚合物包括阳性脂质体、PEI、PAMAM 等作为药物及基因输送载体被广泛研究, 其高毒性使之于体内外的应用受到一定限制, 因此本研究中 PSA 优异的生物相容性让阳离子聚合物作为载体系统成功应用到体内成为可能.

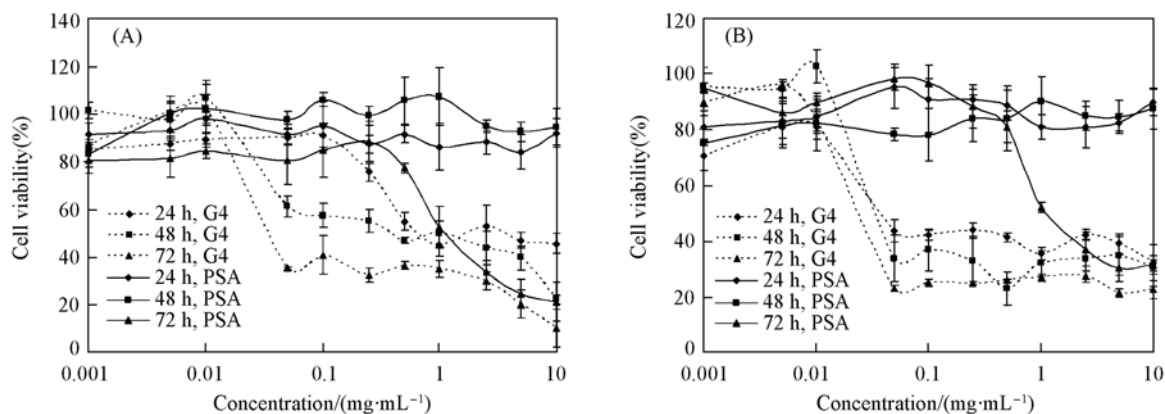


Fig. 1 Cytotoxicity of PAMAM-G4 and PSA against 3T3 (A) and KB (B) cells after incubation for 24, 48, and 72 h at a variety of concentrations

Viability of cells exposed to PSA was expressed as a percentage of the viability of cells grown in the absence of polymer.

2.3 流式细胞术

通过流式细胞仪检测细胞内荧光强度可量化细胞对 PSA-FITC 的内吞作用. PSA-FITC 与细胞孵育后, 细胞对 PSA-FITC 的摄入具有时间依赖性, 结果如图 2 所示. 孵育 30 min 后的统计结果表明, 共记录门内细胞 9843.8 ± 15.51 个. 其中 M1 (阴性) 细胞 9617.8 ± 68.79 个, M2 (FITC 阳性) 细胞 226 ± 56.08 个, 细胞内吞聚合物阳性百分含量为 $2.02\% \pm 0.89\%$. 同理得 1 h 阳性细胞百分含量为 $24.13\% \pm 3.3\%$, 3 h 阳性细胞百分含量为 $99.24\% \pm 1.03\%$. FACS 结果显示, 细胞对 PSA-FITC 有明显的内吞作用且与孵育时间成正比. Jevprasesphant 等^[11] 将第三代 PAMAM 以 FITC 标记后, 与 Caco-2 细胞孵育 3 h 后流式细胞术发现 M1 区荧光强度为 $87\% \pm 3\%$, 在相同孵育条件下略低于本文报道的 $99.24\% \pm 1.03\%$ 的细胞内荧光强度.

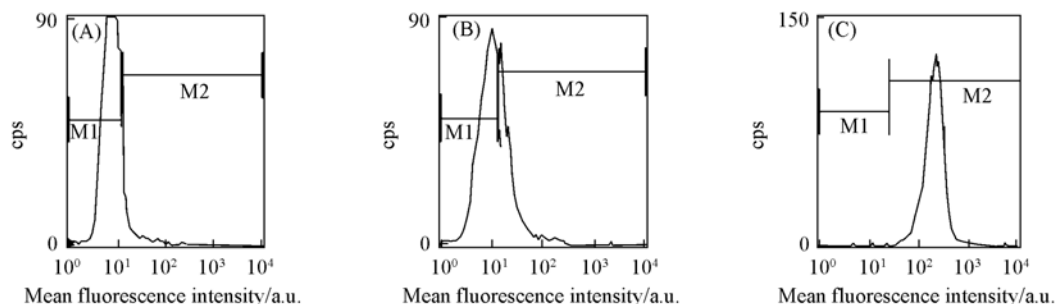


Fig. 2 Flow-cytometry results of KB cells incubated with FITC-labeled PSA

(A) 30 min; (B) 1 h; (C) 3 h. M1: mark 1; M2: mark 2 (FITC).

2.4 PSA-FITC 的组织、器官分布及成像

图3给出了正常小鼠尾静脉注射 PSA-FITC 后小动物活体荧光成像图及分离各内脏的荧光成像图。由图3(A)可见,注射后 24 h,小鼠全身分布荧光信号,且无明显浓集处;图3(B)显示皮肤、胃、小肠、肝脏、肾脏的荧光信号远强于其它脏器/组织($P < 0.05$)。表1显示,通过 ROI 功能计算不同组织器官的荧光信号强度依次为皮肤 > 胃 > 肝 > 小肠 > 肾 > 肌肉 > 肺 > 心 > 脾。脏器荧光成像显示,PSA-FITC 注射后 24 h,皮肤、胃、肠有较强荧光信号分布,这种状况可能与皮肤及消化道管壁含有较多胶原、弹力蛋白有关。胶原、弹力蛋白、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)等在紫外光(< 400 nm)或短波可见光(400 ~ 500 nm)的照射下能产生自发荧光^[12]。肝、肾显示一定的荧光信号分布与 PSA 性质有关:PSA 为阳离子聚合物,易被肝脏网状内皮系统识别吞噬而呈现较多分布,其它阳离子聚合物如 PEI, PLL, PAMAM 等在肝脏也有相应的分布特性^[10,13];肾小管细胞膜上的负电荷也能吸引携带正电荷的 PSA 结合而聚集于肾脏^[14]。肿瘤靶向给药能够选择性地将药物输送到特定的生理部位、器官、组织,同时减少对药物在正常组织的聚集,提高药物的治疗指数。目前,肿瘤靶向给药方式主要包括被动靶向及主动靶向^[15]。由于肿瘤组织血管系统高通透性,缺乏淋巴回流形成特异的 EPR 效应(Enhanced permeation and retention effect)使高分子材料更易集中于肿瘤处形成被动靶向作用。后者是利用抗原-抗体及配体-受体特异结合等实现药物的靶向输送。本研究中,PSA 于正常小鼠体内分布显示无明显浓集于特异脏器,可减少载药后对正常组织脏器的毒副作用,可连接肿瘤细胞表达特异抗原或受体相应的抗体、配体等达到主动靶向输送药物的目的,进一步的研究正在进行中。

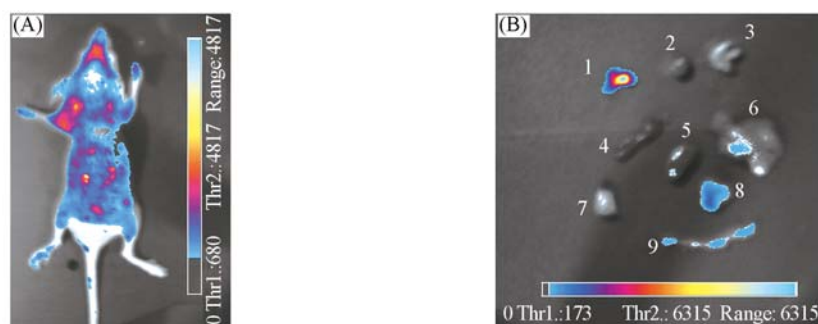


Fig. 3 Representative images of *in vivo* fluorescence imaging of normal nude mouse after intravenous injection of PSA-FITC conjugate(24 h)(A) and dissected organs of a normal balb/c mouse sacrificed at 24 h post-injection(B)

1. Skin; 2. heart; 3. lung; 4. spleen; 5. kidney; 6. liver; 7. muscle; 8. stomach; 9. intestine.

Table 1 Quantification of biodistribution of PSA-FITC in normal nude mice

Organ/tissue	Skin	Stomach	Liver	Intestine	Kidney	Muscle	Lung	Heart	Spleen
Mean Grey(cts/pix/s)	234.68	47.895	19.316	18.701	14.761	14.263	7.6646	6.7348	6.6852
Standard deviation(±)	17.046	8.976	4.6643	5.9954	6.012	4.048	1.163	4.0487	1.803

综上所述,PSA 有良好的生物相容性,并能被细胞高效快速内吞,于正常小鼠体内分布无明显浓集于特异脏器。因此,PSA 可作为新型药物、基因载体,在生物医学领域有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Patri A. K., Kukowska-Latallo J. F., Baker J. R. . Adv. Drug Deliv. Rev. [J], 2005, **57**(15): 2203—2214
- [2] Lee C. C., MacKay J. A., Fréchet J. M., *et al.* . Nat. Biotechnol. [J], 2005, **23**(12): 1517—1526
- [3] Tansey W., Ke S., Cao X. Y., *et al.* . J. Control. Release [J], 2004, **94**: 39—51
- [4] Tsutsumi T., Hirayama F., Uekama K., *et al.* . J. Control. Release [J], 2007, **119**(3): 349—359
- [5] Chen L., Zhu X. Y., Yan D. Y., *et al.* . Angew. Chem. Int. Ed. Engl. [J], 2006, **45**: 87—90
- [6] Mosmann T. . J. Immunol. Methods [J], 1983, **65**(1/2): 55—63
- [7] LIU Cui-Hua(刘翠华), GAO Chao(高超), ZENG Hao(曾浩), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J],

2005, **26**(10): 1941—1945

- [8] Duncan R. , Izzo L. . Adv. Drug Deliv. Rev. [J], 2005, **57**(15): 2215—2237
- [9] Roberts J. C. , Bhalgat M. K. , Zera R. T. . J. Biomed. Mater. Res. [J], 1996, **30**(1): 53—65
- [10] Malik N. , Wiwattanapatapee R. , Klopsch R. , *et al.* . J. Control. Release [J], 2000, **65**: 133—148
- [11] Jevprasesphant R. , Penny J. , Attwood D. , *et al.* . J. Control. Release [J], 2004, **97**(2): 259—267
- [12] LI Wei-Guang(李为光), GE Zhi-Zheng(戈之铮). Chin. J. Gastroenterol(胃肠病学)[J], 2007, **12**(7): 435—438
- [13] Kukowska-Latallo J. F. , Candido K. A. , Cao Z. , *et al.* . Cancer Res. [J], 2005, **65**(12): 5317—5324
- [14] Cheng Z. , Wu Y. , Xiong Z. M. , *et al.* . Bioconjugate Chem. [J], 2005, **16**: 1433—1441
- [15] Mao S. J. , Bi Y. Q. , Hui J. , *et al.* . Pharmazie [J], 2007, **62**: 614—619

Biocompatibility and Biodistribution of a Novel Cationic Polymer —— Hyperbranched Poly(sulfone-amine) as an Intracellular Delivery System

CHEN Su-Yun¹, SUN Guo-Ming², JIANG Lei¹, LI Nan¹,
LI Pei-Yong^{1*}, ZHU Xin-Yuan^{2*}

(1. Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Ruijin Hospital,
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Hyperbranched poly(sulfone-amine)(PSA) is a novel class of hyperbranched macromolecule. In order to assess its feasibility of using PSA as a drug delivery system, we synthesized PSA-FITC by conjugating a fluorescent diagnostic agent fluorescein isothiocyanate(FITC) to the terminal amino groups of PSA covalently. As measured by UV-Vis spectrophotometer at 488 nm, the resulting conjugate contained 19 molecules of FITC per unit of PSA, or 0.08 molecules of FITC per repeat unit of PSA. Cellular internalization ratio of PSA were studied by flow cytometry(FACS) and demonstrated that the cellular uptake was time dependent. The *in vitro* biocompatibility was examined by MTT method against 3T3 cell line and showed no notable effect on bioactivity of the cells. FITC labeled PSA was injected *i. v.* into normal nude mice. The optical imaging of dissected major organs/tissues revealed that preferential accumulation in specific organs was not observed at 24 h postinjection. The results suggest that PSA has characteristics of good biocompatibility, high efficiency of cellular uptake and modifiable surface function groups as well, which can serve as excellent platforms for a variety of therapeutic and imaging agents. It can be taken as an attractive drug/gene carrier system for intracellular delivery.

Keywords Poly(sulfone-amine); Cytotoxicity; Intracellular delivery; Biodistribution; Biocompatibility
(Ed. : H, J, Z)