

## 含 PEG 的聚氨基酸的制备及其细菌黏附性评价

王琴梅<sup>1</sup>, 张静夏<sup>2</sup>, 潘仕荣<sup>1</sup>

(中山大学 1. 附属第一医院//心血管研究所, 2. 药学院, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】采用嵌段共聚法将聚乙二醇(PEG)引入聚谷氨酸苄酯(PBLG)得到聚谷氨酸苄酯-聚乙二醇-聚谷氨酸苄酯两亲嵌段共聚物(PBLG-PEG-PBLG, 缩写为 GEG), 研究引入 PEG 对 GEG 膜表面细菌黏附性的影响。【方法】以端氨基聚乙二醇引发谷氨酸苄酯 N-羧酸酐开环聚合得到 GEG, 用凝胶渗透色谱、红外光谱、核磁共振谱和表面接触角对共聚物的结构和物理化学性质进行表征; 将聚合物膜悬浮在金黄色葡萄球菌的菌悬液孵育 24 h, 用扫描电镜观察细菌在聚合物表面黏附的情况。【结果】端氨基聚乙二醇能引发谷氨酸苄酯 N-羧酸酐开环聚合形成嵌段共聚物; 引入 PEG 不同程度地降低了材料表面的接触角, 减少了细菌在共聚物表面的黏附; PEG 嵌段在共聚物中的含量越高, 材料表面接触角越小, 黏附的细菌越少。【结论】将 PEG 引入 PBLG 能在某种程度上抑制细菌黏附。这种嵌段共聚物在组织工程和药学领域有潜在应用前景。

关键词: 聚谷氨酸苄酯; 聚乙二醇; 嵌段共聚物; 细菌黏附

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0525-04

## Preparation of Poly(amino acid) Containing PEG and Evaluation of Bacterium Adhesion on Polymer Surface

WANG Qin-mei<sup>1</sup>, ZHANG Jing-xia<sup>2</sup>, PAN Shi-rong<sup>1</sup>

(1. The First Affiliated Hospital//Institute of Cardiology and Angiology, 2. School of Pharmaceutical Sciences, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 Poly(ethylene glycol)(PEG) was introduced into poly(-benzyl L-glutamate)(PBLG) to obtain block copolymers (PBLG-PEG-PBLG, GEG) by block copolymerization, and the effect of introduction of PEG on bacteria adhering on GEG surfaces was assessed. 【Methods】 The block copolymers of poly(-benzyl L-glutamate) and poly(ethylene glycol) were prepared by ring-opening polymerization of -benzyl L-glutamate N-carboxyanhydride initiated by amine-terminated PEG (AT-PEG). Their structures, physical and chemical properties were characterized by gel permeation chromatography (GPC), infrared absorption spectroscopy (IR), <sup>1</sup>hydrogen-nuclear magnetic resonance spectrometer (<sup>1</sup>H-NMR) and surface contact angle with water. GEG membranes were incubated in the solution with *Staphylococci aureus* suspended for 24 hours, and then the adhesion of bacteria on their surfaces were observed under scanning electron microscope (SEM). 【Results】 GEG could be obtained by AT-PEG initiating the ring-opening polymerization of -benzyl L-glutamate N-carboxyanhydride. The introduction of PEG decreased the surface contact angle and the bacteria adhesion on polymer surfaces. With increasing the content of PEG in block copolymer, the surface contact angle and the adhered bacteria on surfaces of polymers decreased. 【Conclusion】 The introduction of PEG suppressed the adhesion of bacteria in some extent. The synthesized copolymers have potential use in the fields of pharmacy and tissue engineering.

Key words: poly(-benzyl L-glutamate); poly(ethylene glycol); block copolymer; Bacterium adherence

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):525-528, 532]

收稿日期: 2006-06-14

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(031684); 广东省科技计划基金资助项目(2005A30201006); 广州市科技攻关重点项目基金资助(2004Z2-E0024)

作者简介: 王琴梅(1971-), 女, 湖北荆门人, 博士, 讲师; 潘仕荣, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: qinmeiwang@gmail.com; E-mail: gzpsr@163.com

生物材料遭到细菌侵入,是植入感染发生的主要原因。细菌在生物材料表面黏附是感染发生的第一步<sup>[1]</sup>。因此,发展一种能抗细菌黏附的植入用生物医用材料意义重大。通常,人们将各种灭菌药品和消毒剂混入生物材料<sup>[2]</sup>,缺点是疗效短、灭菌范围窄,而且局部高浓度药物可能对细胞产生毒性。有采取对材料表面改性来减少细菌黏附,如在材料表面涂一层结合良好的银<sup>[3]</sup>,在材料表面接枝亲水性单体或高分子材料<sup>[4]</sup>,使材料表面内皮细胞化<sup>[5]</sup>等。合成的聚氨基酸与组织、细胞等生物成分有良好的生物相容性,被广泛应用在药学和组织工程支架材料等医学领域。我们设想,将具有优良的血液相容性和抗细菌黏附性的聚乙二醇 [Poly(ethylene glycol), PEG] 引入聚谷氨酸苄酯[poly(-benzyl L-glutamate), PBLG], PEG 可能有助于聚合物抑制细菌黏附。因与植入感染有关的优势菌群是金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等<sup>[1]</sup>,因此本实验通过嵌段共聚技术合成 PBLG-PEG-PBLG 嵌段共聚物后,选择金黄色葡萄球菌做为实验菌种,观察它们在聚合物表面黏附的情况。

## 1 实验方法

### 1.1 GEG 嵌段共聚物的制备

参照文献[6]的方法,先由谷氨酸和苯甲醇制备谷氨酸苄酯,再将谷氨酸苄酯和三光气反应制备谷氨酸苄酯 N-羧酸酐。将新制备的谷氨酸苄酯 N-羧酸酐、苯和二氧六环的混合溶液(体积比为 4:1)加入反应瓶内,浓度为 50 g/L。待谷氨酸苄酯 N-羧酸酐完全溶解后,加入适量引发剂端氨基聚乙二醇(本室自制,相对分子质量为 4 000)<sup>[7]</sup>,室温搅拌反应 72 h 后,将反应混合物倒入剧烈搅拌的无水乙醇中(乙醇与反应液的体积比为 10:1)使聚合物沉淀,静置 1 d,过滤,乙醚洗涤多次,真空干燥,所得聚合物再用水洗涤,真空干燥得浅黄色至白色蜡状固体。

聚合物的分子量由端氨基聚乙二醇及谷氨酸苄酯 N-羧酸酐的摩尔比调节。

PBLG 均聚物制备方法同共聚物,引发剂为三乙胺,产物为白色纤维状疏松固体。将采用上述方法得到的聚合物样品用四氢呋喃溶解,乙醚沉淀,40 ℃真空干燥,如此反复 2 次纯化后,分别用凝胶渗透色谱、红外光谱、核磁共振谱、表面接触角测定仪对共聚物的结构和物理化学性质进行表征。

### 1.2 聚合物膜的制备

采用铸膜法制膜:将纯化的聚合物溶于四氢呋喃和二氧六环的混合溶剂中(体积比为 3:1)制成 50 g/L 的均一溶液后,倒在水平玻璃模具中,待溶剂挥发后浸泡于蒸馏水中脱模。薄膜于 50 ℃真空干燥 72 h 后,用于与水的表面接触角和表面张力、细菌黏附性分析。

### 1.3 聚合物膜表面细菌黏附实验

将聚合物膜剪成 1 cm×1 cm 的正方形,依次用丙酮、乙醇超声洗涤 10 min 后浸泡在无水乙醇中过夜。实验前取出于紫外灯下照射 60 min,再用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)浸泡 30 min。大试管中加入 10 mL 肉汤培养基,塞上棉球;培养皿中加入 10 mL PBS(pH 7.4)配制的 20 g/L 琼脂,盖上盖后,高温高压灭菌。实验前 1 天把细菌从 4 ℃的冰箱里取出来传代 1 次。用接种环从传代后的斜面培养基上挑出一定量的细菌,振荡器上振荡使其分散,再配成  $6.4 \times 10^7$  /mL 的菌悬液。将预处理后的试片悬浮在菌悬液中,每个试管中放两片(每组样品数为 3),37 ℃旋摇培养 24 h,取出试片,无菌的 PBS 漂洗以除掉假黏附的细菌,其中 1 片用 25 mL/L 戊二醛/PBS 于 4 ℃固定过夜,系列乙醇脱水,临界点干燥,镀金,最后在 HITACHI X-650 扫描电镜上观察黏附细菌的形态;另 1 片表面黏附的细菌用超声波清洗器洗脱下来,然后用菌落记数法计数。

## 2 结果

### 2.1 聚合物的表征

图 1 是 GEG 的凝胶渗透色谱图(gel permeation chromatograph, GPC)。GEG 的 GPC 曲线为单峰,说明纯化后的聚合产物是纯粹的共聚物,无或有痕量可忽略低分子量级分存在(包括 PEG)。

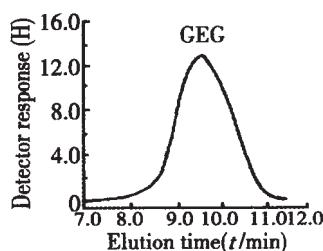


图 1 GEG 的凝胶渗透色谱图

Fig.1 Gel permeation chromatograph curve of GEG

图 2 从下至上分别为共聚物 GEG、均聚物

PBLG及共聚物与均聚物差减(GEG- PBLG)后的红外谱图(infrared absorption spectrum, IR)。PBLG和GEG的IR谱图无明显差别, 它们均在 $1729\text{ cm}^{-1}$ 处出现苯酯中C=O的伸缩振动峰; 在 $3286\text{ cm}^{-1}$ 处出现仲酰胺的N-H伸缩振动峰; 在 $1649\text{ cm}^{-1}$ 、 $1543\text{ cm}^{-1}$ 处分别出现 $\alpha$ -螺旋酰胺I和II的特征吸收峰, 说明共聚物分子中存在PBLG嵌段, 并以 $\alpha$ -螺旋形式存在<sup>[8]</sup>。GEG和PBLG的谱图经计算机差减处理后可以看见 $1107\text{ cm}^{-1}$

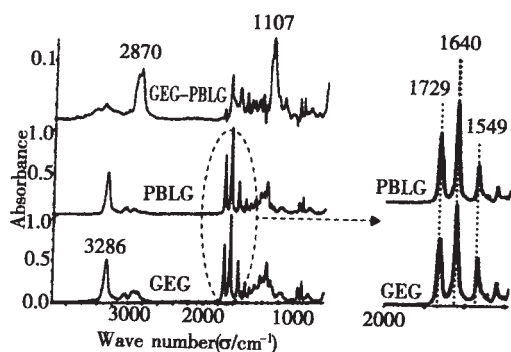


图2 GEG、PBLG及其差减红外光谱图

Fig. 2 IR spectra of GEG, PBLG and their subtraction

(C-O-C伸缩振动)和 $2870\text{ cm}^{-1}$ (C-H伸缩振动)处两个强的PEG的特征峰, 说明共聚物分子中也存在PEG嵌段。GEG样品的核磁共振谱( $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance spectrum,  $^1\text{H}$ -NMR)(图3)中峰的归属为:  $\delta = 3.64$ 是PEG嵌段中与氧相连的亚甲基质子的吸收峰( $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ ; 4H),  $\delta = 5.0$ 是PBLG嵌段中与苯环相连的亚甲基质子的吸收峰( $\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ; 2H), 说明共聚

物分子中同时存在PBLG和PEG嵌段。因为所用溶剂为氘代氯仿,  $\delta = 7.2$ 处的强吸收峰是PBLG嵌段中苯环上5个次甲基质子的吸收峰( $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ; 5H)和溶剂峰的叠加。GPC、IR和 $^1\text{H}$ -NMR的结果说明共聚物分子中同时存在PEG和PBLG嵌段。由于PEG的分子量已知, 通过PEG嵌段的亚甲基质子峰, PBLG嵌段 $\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 基团的亚甲基质子峰的峰面积比可计算出共聚物的组成、PBLG嵌段的数均分子量以及共聚物的数均分子量。计算公式如下:  $(M_{\text{PEG}}/44)/(M_{\text{PBLG}}/219) = (A_{\delta=3.64}) / (2A_{\delta=5.0})$ , 其中M为数均分子量, A为峰面积, 44为PEG重复单元的分子量, 219为PBLG重复单元的分子量。所得结果见表1。

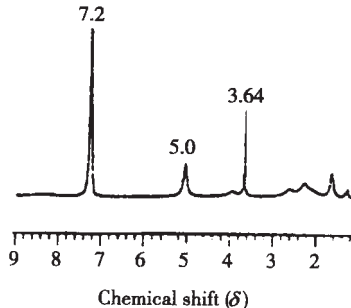


图3 GEG的 $^1\text{H}$ -NMR谱图

Fig.3  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of GEG

## 2.2 材料表面接触角和表面张力

随着PEG嵌段单体单元与GEG中总单体单元的摩尔比增加, 聚合物的表面接触角逐渐变小, 材料表面的亲水性逐渐增加。材料与水的表面接触角, 表面张力与PEG含量及分子量的关系见表1。

表1 合成聚合物的性质

Table 1 The properties of synthesized polymers

Sample	$n_e/n_i$	$M_n, n(\text{H-NMR})$	$[n_e/(n_e+n_i)] / (\%)$	Surface contact angle/ $(^\circ)$
PBLG	50/1 <sup>1)</sup>	24.2 <sup>2)</sup>	0	63.70 $\pm$ 0.92
GEG-4k-74	200/1	5.94	26	61.20 $\pm$ 2.05
GEG-4k-62	150/1	3.65	38	52.75 $\pm$ 2.74
GEG-4k-51	100/1	2.50	49	41.02 $\pm$ 3.01

$n_e/n_i$  The molar ratio of  $\alpha$ -benzyl L-glutamate N-carboxyanhydride and terminated amino groups in amine-terminated PEG.  $n_e$  is the molar number of monomeric units of PEG,  $n_i$  is the molar number of monomeric units of PBLG in copolymer. GEG-4k-74: GEG is the copolymer of PBLG-PEG-PBLG, 4k is the number-average molecular weight of PEG, 74 is the percent of the molar number of monomeric units of PBLG in the total molar number of monomeric units of PEG and PBLG in copolymer.

The molar ratio of  $\alpha$ -benzyl L-glutamate N-carboxyanhydride and triethylamine. The viscosity-average molecular weight of PBLG was determined at 25  $^\circ\text{C}$  by Ubbloehde viscometer in N,N-dimethylformamide,  $[\eta] = 2.9 \times 10^{-7} \text{ M}^{1.7}$ .

### 2.3 金黄色葡萄球菌在聚合物膜表面的黏附

菌落记数法测定金黄色葡萄球菌在聚合物膜表面黏附的细菌数量,结果见图 4,扫描电镜观察表面细菌的形态和黏附情况,结果见图 5。

由图 4,5 可以看出,含有 PEG 嵌段的聚合物表面黏附细菌的数量比均聚物都有不同程度减少,且随着 PEG 含量增加,材料表面接触角降低(见表 1),表面亲水性增加,黏附的细菌数量随之减少。

## 3 讨 论

研究认为,植入感染的发生取决于生物材料表

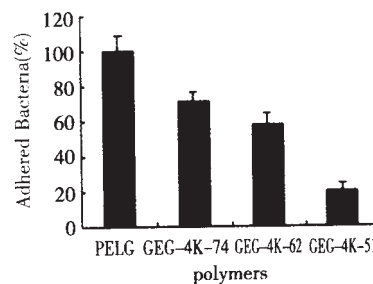


图 4 肉汤培养基中的金黄色葡萄球菌在不同聚合物表面的黏附情况

Fig.4 Staphylococci aureus adhering to different polymer surfaces in broth substrate(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

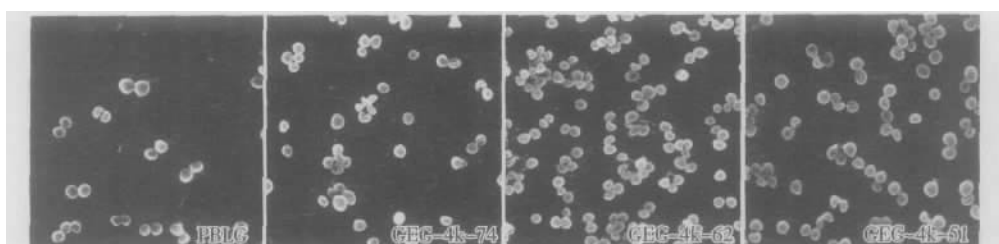


图 5 黏附在不同聚合物表面的金黄色葡萄球菌的扫描电镜图

Fig.5 SEM of Staphylococci aureus adhered on different polymer surfaces ( $\times 7000$ )

面是否吸附了特异性的蛋白质。细菌最初在生物材料表面的吸附是被动的。只有当材料表面吸附了特异性的受体蛋白时,细菌细胞表面配基和受体蛋白相互作用,细菌才能黏附在材料表面,并在植入物表面形成粘着牢固的生物膜。生物膜形成后,细菌对宿主的防御反应及抗菌治疗的抵抗力增强,感染发生的机率增加<sup>[1]</sup>。因此,蛋白质在材料表面吸附是细菌黏附的必要条件。如果阻断材料表面对蛋白质的吸附,就可以有效防止细菌黏附,进而阻止感染的发生。聚乙二醇是一种潜在的防腐剂,可有效阻止蛋白质吸附,并能抑制细菌生长<sup>[9-11]</sup>。基于此,我们将 PEG 引入 PBLG,希望增强共聚物的抗菌性。

由表 1 可知,通过调节引发剂端氨基聚乙二醇(I)与聚合单体(A)的摩尔比可控制聚合物的分子量及 PEG 在共聚物中的含量。A/I 越高,共聚物的分子量越大,PEG 在共聚物中的相对含量越低。

表 1,图 4,5 可见,PEG 的引入使 PBLG 膜表面的亲水性增加,并且 PEG 的相对含量越高,膜表面的亲水性越好,细菌在聚合物膜表面黏附越少。这是因为 PEG 对水具有低界面自由能、水溶性、柔顺性及高活动性,它可以很好地增加材料表面亲水

性<sup>[9]</sup>。此外,当嵌段共聚物膜悬浮在菌悬液中,海藻状高度亲水的 PEG 链向水性环境取向,在界面形成“聚合物刷子”,“刷子”内的高渗透压产生热力学斥力,在膜表面形成立体屏障,抑制蛋白质和细菌吸附在其表面<sup>[11]</sup>。经 PEG 改性后,材料表面细菌黏附减少的程度依赖于 PEG 分子在界面的堆砌密度。一般 PEG 在材料表面的堆砌密度越大,抑菌效果越好<sup>[10]</sup>。本文中,当 PEG 含量从 26%(GEG-4k-74)增至 38%(GEG-4k-62)和 49%(GEG-4k-51)时,共聚物表面黏附的金黄色葡萄球菌逐渐减少,分别为 PBLG 表面的 70.5%、57.2%、19.3%。

综上,本文通过双端氨基聚乙二醇引发谷氨酸苄酯 N-羧酸酐聚合,将 PEG 引入 PBLG 后得到两亲嵌段共聚物 PEG-PBLG-PEG,并研究了金黄色葡萄球菌在 PBLG 均聚物和 PBLG-PEG-PBLG 三嵌段共聚物表面的黏附情况,结果表明:聚合物中 PEG 含量越高,表面亲水性越好,与水的表面接触角越小,细菌在其表面黏附也越少。说明共聚物中引入 PEG 可帮助 PBLG 抑制细菌在其表面黏附。该材料在药物载体和组织工程支架材料方面具有极大的应用前景。

(下转第 532 页 to page 532)

维母细胞分泌的 HGF 因子与其受体 c-Met 结合后,可能通过与其他肿瘤中相类似的旁分泌通路激活其下游的信号分子,如 Stat3、MEK1/2 和 ERK1/2 等<sup>[10,11]</sup>促进骨肉瘤的增殖和转移。

综上所述,外源性 HGF 因子可以促进骨肉瘤细胞株 MG-63 和 HOS 的增殖和体外黏附能力,可能在骨肉瘤进展过程中起到十分重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] GOHDA E, TSUBOUCHI H, NAKAYAMA H, et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure[J]. *J Clin Invest*, 1988,81(2):414-419.
- [2] JUNBO H, LI Q, ZAIDE W, et al. Increased level of serum hepatocyte growth factor/ scatter factor in liver cancer is associated with tumor metastasis[J]. *In Vivo*, 1999,13(2):177-180.
- [3] LENGYEL E, PRECHTEL D, RESAU J H, et al. C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu[J]. *Int J Cancer*, 2005,113(4):678-682.
- [4] KNUDSEN B S, EDLUND M. Prostate cancer and the met hepatocyte growth factor receptor [J]. *Adv Cancer Res*, 2004,91(1):31-67.
- [5] 李智,林素暇,梁惠珍,等. 肝细胞生长因子/c-Met 系统在鼻咽癌中的表达及意义[J]. *中华病理学杂志*,

2005,34(2):75-79.

- [6] EFIMOVA E A, GLANEMANN M, LIU L, et al. Effects of human hepatocyte growth factor on the proliferation of human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Eur Surg Res*,2004, 36(5): 300-307.
- [7] KURSCHAT P, MAUCH C. Mechanisms of metastasis [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2000 , 25(6):482-489.
- [8] MACEWEN E G, KYTZKE J, CAREW J, et al. C-Met tyrosine receptor expression and function in human and canine osteosarcoma cells [J]. *Clin Exp Metastasis*,2003,20(5):421-430.
- [9] TOKUNOU M, NIKI T, EGUCHI K, et al. c-MET expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2001,158(4):1451-1463.
- [10] CRAMER A, KLEINER S, WESTERMANN M, et al. Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(4):805-816.
- [11] TANIGUCHI F, HARADA T, DEURA I, et al. Hepatocyte growth factor promotes cell proliferation and inhibits progesterone secretion via PKA and MAPK pathways in a human granulosa cell line[J]. *Mol Reprod Dev*,2004,68(3):335-344.

(编辑 黄小延)

(上接第 528 页 from page 528)

#### 参考文献:

- [1] CAMPOCCIAA D, MONTANAROE L, ARCIOLA C R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(11):2331-2339.
- [2] EIFF C V, JANSEN B, KOHNEN W, et al. Associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis[J]. *Drugs*, 2005, 65(2):179-214.
- [3] FRAENKEL D, RICKARD C, THOMAS P, et al. A prospective, randomized trial of rifampicin-minocycline-coated and silver-platinum-carbon-impregnated central venous catheters[J]. *Crit Care Med*, 2006,34(3):668-675.
- [4] WANG C C, CHEN C C. Anti-bacterial and swelling properties of acrylic acid grafted and collagen/chitosan immobilized polypropylene non-woven fabrics[J]. *J Appl Polymer Sci*, 2005, 98(1):391-400.
- [5] 林思聪. 高分子生物材料分子工程研究进展 [J]. *高*

分子通报, 1997, 1: 1-14.

- [6] 潘仕荣,黄宁芳,施锋,等. 聚 L-谷氨酸-苯酯合成的改进[J]. *生物医学工程学杂志*, 1990, 7(3): 321-324.
- [7] 王琴梅,潘仕荣,张静夏. 双端氨基聚乙二醇的合成和表征[J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34(10): 490-492.
- [8] HIGASHI N, KAWAHARA J, NIWA M. Preparation of helical peptide monolayer-coated gold nanoparticles[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 288(1): 83-87.
- [9] 杨隽,汪建华,童身毅. 低温等离子体改性铝片降低细菌黏附的研究[J]. *功能材料*, 2004, 35(5): 646-649.
- [10] KIM J H, KIM S C. PEO-grafting on PU/PS IPNs for enhanced blood compatibility-effect of pendant length and grafting density[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(9): 2015-2025.
- [11] Mai-ngam K. Comblike poly(ethylene oxide)/hydrophobic C6 branched chitosan surfactant polymers as anti-infection surface modifying agents [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 49(2): 117-125.

(编辑 黄小延)