

聚酰胺胺超支化聚合物的细胞毒性及抗菌性能

饶发明¹, 林 希², 黄维哲², 吴江渝^{2*}

(1. 武钢集团矿业有限公司乌龙泉矿, 湖北 武汉 430213;

2. 武汉工程大学材料科学与工程学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要:超支化聚合物合成方便、成本低廉, 具有高度支化的分子结构及大量末端官能团, 在杀菌试剂开发方面具有广阔的前景. 以乙二胺及丙烯酸甲酯为单体, 通过简单反应得到末端为氨基的聚酰胺胺超支化聚合物, 并研究了其作为抗菌试剂的生物活性. 以 HeLa 细胞为对象, 通过噻唑蓝(MTT)法测试了该超支化聚合物的细胞毒性, 并选用大肠杆菌和金黄葡萄球菌为对象, 对其抑菌活性进行了研究. 结果表明, 超支化聚酰胺胺在 0~20 mg/mL 质量浓度范围内毒性较小, 细胞存活率在 50% 以上; 超支化聚合物对革兰氏阳性菌金黄葡萄球菌的抑制效果较好, 在 0.05 mg/mL 质量浓度下即可实现完全抑制; 当质量浓度为 12.5 mg/mL 时, 对革兰氏阴性菌大肠杆菌可以完全抑制. 该类聚酰胺胺超支化聚合物有望开发成为安全高效的水处理杀菌试剂.

关键词:聚酰胺胺; 噻唑蓝; 抑菌活性; 水处理

中图分类号: TU991.25

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-2869.2013.08.007

0 引 言

抑制微生物生长和繁殖的工艺是水处理中非常重要的一环, 直接决定了水质及其使用范围. 传统的水处理抗菌试剂主要是含氯氧化剂, 如液氯、二氧化氯和氯胺等, 这些抗菌试剂在杀菌的同时会与水中的微量有机物发生化学反应, 生成三氯甲烷等具有高毒副作用的副产物, 严重影响人体健康. 因此, 各种水处理抗菌剂被广泛研究用以替代含氯试剂, 如纳米二氧化钛材料^[1]、纳米金属材料^[2]、有机无机杂化材料^[3-4] 以及一些生物活性分子^[5-6] 等. 超支化聚合物^[7-8] 是一类具有高度支化分子结构以及大量末端官能团的高分子化合物. 这类化合物合成方法简便, 制备成本低廉, 加上其独特的分子结构特性, 是理想的水处理试剂基体, 并已被用于絮凝脱色^[9] 及重金属离子移除^[10] 的研究.

聚酰胺胺型超支化化合物^[11-12] 是超支化聚合物的重要类别, 其末端具有大量的伯胺基团, 可以通过与细菌的细胞膜相互作用而抑制其生长繁殖, 因此超支化聚酰胺胺化合物可用于抗菌试剂开发. 本研究选用乙二胺和丙烯酸甲酯为原料, 首先反应生成小分子预聚物, 继而通过逐步升温使其聚合成具有高分子量和高度支化结构的超支化

聚酰胺胺化合物. 以 HeLa 细胞为实验对象对合成的超支化化合物进行了细胞毒性的测试. 以大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和金黄葡萄球菌(革兰氏阳性菌)为实验对象测试了超支化聚酰胺胺化合物的抗菌性能, 以期开发新型水处理抗菌试剂提供相关实验基础及理论依据.

1 实验部分

1.1 原料

乙二胺(国药集团化学试剂有限公司生产, 分析纯, 用前重蒸), 丙烯酸甲酯(国药集团化学试剂有限公司生产, 分析纯, 用前重蒸), HeLa 细胞由武汉大学化学与分子科学学院提供, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 和金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 均由华中师范大学生命科学学院提供.

1.2 超支化聚酰胺胺的合成

10 g 乙二胺溶于 5 mL 甲醇, 缓慢滴加 14.3 g 丙烯酸甲酯, 常温搅拌反应, 得到小分子预聚物. 所得预聚物通过 60, 80, 100, 120, 140 °C 逐步升温, 升温过程采用油泵真空处理, 得到黄色透明状固体, 用乙醚多次沉降后透析, 经冷冻干燥得到超支化聚酰胺胺化合物. 合成路线如图 1 所示. 所得超支化聚合物经核磁共振氢谱及红外光谱表征^[13].

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(51003081)

作者简介: 饶发明(1968-), 男, 湖北武穴人, 高级工程师, 硕士. 研究方向: 矿物加工及环境工程. * 通信联系人

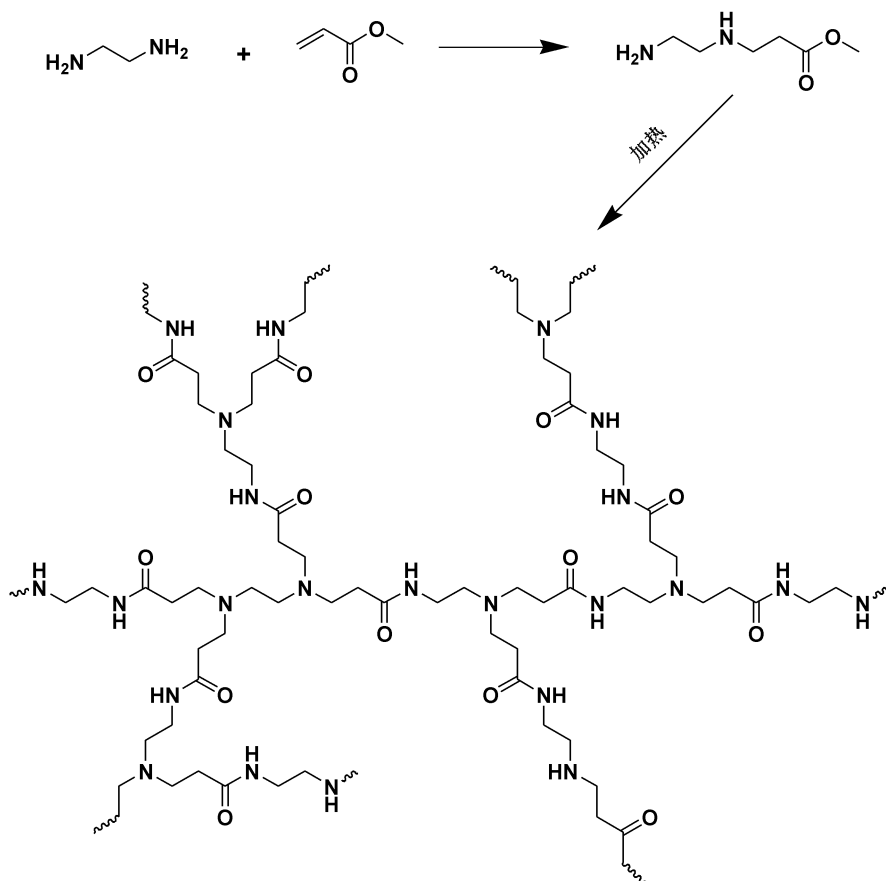


图 1 超支化聚酰胺胺的合成

Fig. 1 The synthesis of hyperbranched PAMAM

1.3 细胞毒性实验

选用 Hela 细胞,接种到 24 孔板中,细胞密度为 25 000 个/孔,在 DMEN 培养基中 37 ℃ 培养 24 h. 以培养基为溶剂,在 24 孔板中引入超支化聚酰胺胺化合物,最高质量浓度为 80 mg/mL,最低质量浓度为 0.002 44 mg/mL,并作空白对照. 24 h 后于 24 孔板中加入 MTT 试剂(终质量浓度为 0.05 mg/mL),反应 4 h 后,移除多余溶液,加入 DMSO,染色后细胞呈紫色,利用酶标仪测量吸光度,在 590 nm 处测得细胞溶液的吸收值,并计算细胞成活率.

1.4 抑菌实验

1.4.1 超支化聚酰胺胺对大肠杆菌的抑菌实验

选用大肠杆菌接种到 96 孔板 LB 培养液中生长,同时引入超支化聚酰胺胺化合物,最高质量浓度为 25 mg/mL,最低质量浓度为 0.012 2 mg/mL,并作空白对照. 将含有超支化聚酰胺胺的大肠杆菌培养液及空白对照置于摇床培养,每隔半小时对菌种生长情况进行测量,并记录结果.

1.4.2 超支化聚酰胺胺对金黄葡萄球菌的抑菌实验 选用金黄葡萄球菌接种到 96 孔板 LB 培养液中生长,同时引入超支化聚酰胺胺化合物,最

高质量浓度为 25 mg/mL,最低质量浓度为 0.012 2 mg/mL,并作空白对照. 将含有超支化聚酰胺胺的大肠杆菌培养液及空白对照置于摇床培养,每隔半小时对菌种生长情况进行测量,并记录结果.

2 结果与讨论

2.1 超支化聚酰胺胺的细胞毒性

图 2 是超支化聚酰胺胺化合物对 Hela 细胞的毒性测试结果:

细胞毒性实验结果说明,在较低浓度时($\ln C$ 值在 $-4.5 \sim -6$ 之间),超支化聚酰胺胺对 Hela 细胞的毒性较小,细胞成活率在 80% 以上,随浓度升高,化合物溶液的细胞毒性逐渐增大,但直到质量浓度为 20 mg/mL 时($\ln C \approx 3$),细胞成活率仍保持在 50% 以上. 继续增加浓度导致超支化聚酰胺胺的细胞毒性上升,质量浓度为 80 mg/mL 时,细胞成活率在 30% 左右.

超支化聚酰胺胺的细胞毒性来自于其表面大量的伯胺基团. 细胞由细胞壁,细胞质和细胞核组成,其中细胞壁含有大量的磷脂. 超支化聚酰胺胺表面的伯胺基带正电荷,易与带负电荷的磷脂结

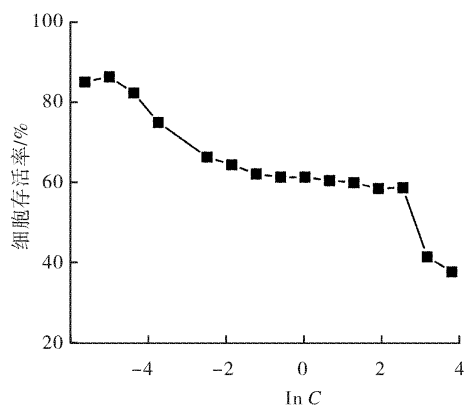


图 2 超支化聚酰胺胺对 Hela 细胞的毒性测试

Fig. 2 The test of cytotoxicity of hyperbranched PAMAM with Hela cells

注: $\ln C$ 为化合物质量浓度的对数值, C 的单位为 mg/mL .

合破坏细胞壁,从而导致细胞壁的破裂,使营养物质流出,细胞因此凋亡.

2.2 超支化聚酰胺胺的抗菌性能

2.2.1 对大肠杆菌(革兰氏阳性菌)的抑制结果

选取质量浓度为 25、12.5、3.125 mg/mL 和 1.563 mg/mL 超支化聚酰胺胺化合物的抑菌曲线作图,如图 3 所示.横坐标为细菌生长时间,纵坐标为细菌溶液吸光度,用以说明细菌的繁殖程度.空白对照,即不含超支化聚酰胺胺化合物的大肠杆菌生长情况.

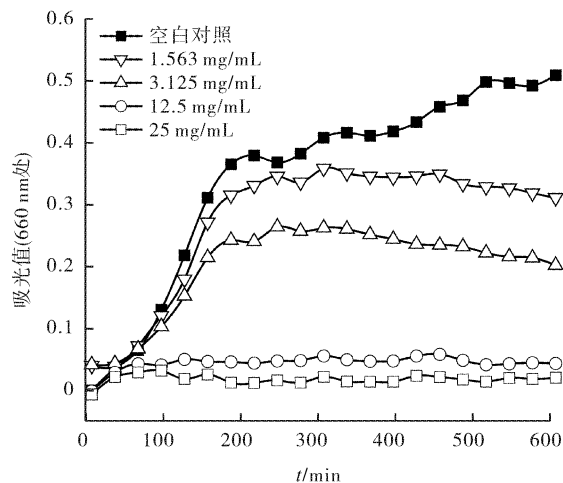


图 3 超支化聚酰胺胺对大肠杆菌的抗菌性能

Fig. 3 The antimicrobial activity of hyperbranched PAMAM with *Escherichia coli*

从图 3 中可知,在没有超支化聚酰胺胺存在时,大肠杆菌随时间增加繁殖程度变化明显,在约 3 h 之内繁殖较快,之后则速度放缓,但仍保持一定的生长趋势.在超支化聚合物浓度较低时(如 1.563 mg/mL 和 3.125 mg/mL),大肠杆菌在初期的生长速度虽略有下降,但仍然很快;而在 3 h 之后,溶液的吸光值基本保持不变,表明大肠杆菌的繁殖与消亡达到平衡.由此可知超支化聚酰胺

胺在低浓度时即有一定的抗菌性能.在浓度较高时(如 12.5 mg/mL 和 25 mg/mL),超支化聚酰胺胺则可以完全抑制大肠杆菌的生长.其抑菌效果略低于文献报道^[14].

2.2.2 对金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)的抑制结果 选取质量浓度为 25、3.125、0.4 mg/mL 和 0.05 mg/mL 超支化聚酰胺胺化合物的抑菌曲线作图,如图 4 所示.横坐标为细菌生长时间,纵坐标为细菌溶液吸光度,用以说明细菌的繁殖程度.空白对照,即不含超支化聚酰胺胺化合物的金黄色葡萄球菌生长情况.

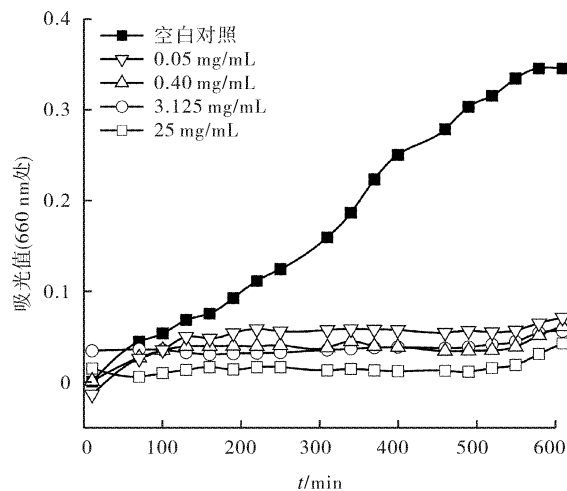


图 4 超支化聚酰胺胺对金黄色葡萄球菌的抗菌性能

Fig. 4 The antimicrobial activity of hyperbranched PAMAM with *Staphylococcus aureus*

从图 4 中可知,在没有超支化聚酰胺胺存在时,金黄色葡萄球菌随时间增加繁殖程度变化明显,在测试时间范围内基本保持一定的生长速度.在所测试的较大浓度范围内(0.05~25 mg/mL),超支化聚酰胺胺都可以显示出良好的抗菌性能,完全抑制金黄色葡萄球菌的生长.该化合物抑菌效果优于文献报道^[14].

从抑菌曲线可知超支化聚酰胺胺对大肠杆菌,金黄色葡萄球菌的生长都有一定的抑制作用,但抑制效果有所不同.其中超支化化合物对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌的抗菌效果要明显好于革兰氏阴性菌大肠杆菌.这与两种细菌的不同结构有关.革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的差别主要来自于它们的细胞壁结构不同.革兰氏阳性菌的细胞壁厚约为 20~80 nm,主要成分是肽聚糖和磷壁酸,二者含量占整个细胞壁质量的 90%.革兰氏阴性菌的细胞壁较薄,磷壁酸只占大约 5%,但是其细胞壁组分比较复杂,有一层阳性菌所不具备的外膜结构,对于外源分子形成了一层附加的屏障,从而阻止其与细菌进行作用.超支化聚酰胺胺

末端带有大量带正电荷的伯胺基团,属于阳离子抗菌剂。一般而言,阳离子抗菌剂通过破坏肽聚糖结构从而达到杀菌的目的。因此,超支化聚酰胺胺化合物对大肠杆菌的抑制效果不如金黄葡萄球菌。

通过合成得到的超支化聚酰胺胺对革兰氏阳性菌金黄葡萄球菌及革兰氏阴性菌大肠杆菌均有一定的抑制效果,特别是对于金黄葡萄球菌有较佳的抗菌性能,可以以此为基础开发具有超支化结构的水处理抗菌剂。

3 结 语

a. 以丙烯酸甲酯和乙二胺为原料,通过逐步升温法制备了超支化聚酰胺胺化合物,其末端带有大量伯胺基团。

b. 对合成的超支化聚酰胺胺进行了细胞毒性测试,结果表明其细胞毒性随质量浓度增加而增大,在 20 mg/mL 以下时细胞毒性较小,细胞存活率在 50% 以上。

c. 以革兰氏阳性菌金黄葡萄球菌及革兰氏阴性菌大肠杆菌为实验对象测试了超支化聚酰胺胺的抗菌性能,结果表明超支化聚酰胺胺对大肠杆菌和金黄葡萄球菌均有一定的抑制效果,在 12.5 mg/mL 时可以完全抑制大肠杆菌的生长,而在 0.05 mg/mL 浓度下即可完全抑制金黄葡萄球菌的生长。超支化聚酰胺胺化合物在水处理抗菌剂方面具有广阔的应用前景。

致 谢

本研究得到国家自然科学基金委员会的资助,特表感谢!

参考文献:

- [1] 李洁,孙体昌,齐涛,等. 抗菌性纳米材料在水处理中的应用现状[J]. 材料导报, 2008, 22(X):21-24.
LI Jie, SUN Ti-chang, QI Tao, et al. Applications of antibacterial nanoscale materials in water treatment[J]. Materials Review, 2008, 22(X): 21-24.
- [2] 高华生,垒一中,谭天思,等. Ag-CRG 水处理剂的制备与抑菌缓蚀性能试验[J]. 高校化学工程学报, 2002, 16(1):79-83. (in Chinese)
GAO Hua-sheng, LEI Yi-zhong, TAN Tian-si, et al. Preparation and properties of Ag-CRG as water treatment agent [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2002, 16(1): 79-83. (in Chinese)
- [3] Arkas M, Tsiourvas D. Organic/inorganic hybrid nanospheres based on hyperbranched poly(ethylene imine) encapsulated into silica for the sorption of toxic metal ions and polycyclic aromatic hydrocarbons from water[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170:35-42.
- [4] Arkas M, Tsiourvas D, Paleos C M. Organosilicon Dendritic Networks in Porous Ceramics for Water Purification[J]. Chemistry of Materials, 2005, 17(13):3439-3444.
- [5] 吴雪洁,孟云平,梁进忠. 新型抑菌剂 Tallofin(太乐芬)在循环水系统的应用[J]. 工业水处理, 2002, 22(2):43-45.
WU Xue-jie, MENG Yun-ping, LIANG Jin-zhong. Application of new bacteriostatic agent (Tallofin) to circulating water system [J]. Industrial Water Treatment, 2002, 22(2):43-45. (in Chinese)
- [6] 邹炳国,章德宏. 异噻唑啉酮衍生物凯松 CG 系列产品及下游水处理剂产品的应用及前景[J]. 化工技术与开发, 2007, 36(11):49-50.
ZOU Bing-guo, ZHANG De-hong. Application and prospect of isothiazolinone derivative and downstream product[J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2007, 36(11):49-50. (in Chinese)
- [7] Segawa Y, Higashihara T, Ueda M. Synthesis of hyperbranched polymers with controlled structure [J]. Polymer Chemistry, 2013, 4(6):1746-1759.
- [8] 张永文. 超支化聚酰胺胺的合成及其功能化研究[D]. 上海:上海交通大学化学化工学院, 2008.
ZHANG Yong-wen. Synthesis of hyperbranched polyamidoamines and their modifications [D]. Shanghai:Shanghai Jiao Tong University, 2008. (in Chinese)
- [9] 陈倩兰,杜英英,沈丽,等. 超支化聚酯季铵盐衍生物的絮凝脱色性能[J]. 印染, 2010, 36(17):1-3.
CHEN Qian-lan, DU Ying-ying, SHEN Li, et al. Flocculability of hyperbranched polyester quaternary ammonium derivatives [J]. Dyeing and Finishing, 2010, 36(17):1-3. (in Chinese)
- [10] Han K N, Yu B Y, Kwak S Y. Hyperbranched poly (amidoamine)/polysulfone composite membranes for Cd(II) removal from water[J]. Journal of Membrane Science, 2012, 396:83-91.
- [11] 杨灿,王义,段冲,等. 超支化聚合物的研究及应用[J]. 广州化工, 2012, 40(1):69-72.
YANG Can, WANG Yi, DUAN Chong, et al. Research and application of hyperbranched polymers [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2012, 40(1): 69-72. (in Chinese)
- [12] Hobson L J, Feast W. Poly (amidoamine)

- hyperbranched systems: Synthesis, structure and characterization[J]. Polymer, 1999, 40(5): 1279-1297.
- [13] 林希, 吴江渝. 超支化聚酰胺胺的合成及季胺化修饰[J]. 武汉工程大学学报, 2010, 32(11):73-76.
LIN Xi, WU Jiang-yu. Synthesis and modification of hyperbranched PAMAM[J]. Journal of Wuhan Institute of Technology, 2010, 32(11):73-76. (in Chinese)
- [14] 张峰, 陈宇岳, 张德锁, 等. 端氨基超支化聚合物及其季铵盐的制备与性能[J]. 高分子材料科学与工程, 2019, 25(8):141-144.
ZHANG Feng, CHEN Yu-yue, ZHANG De-suo, et al. Preparation and properties of amino-terminated hyperbranched polymers and its quaternary ammonium salt[J]. Polymer Materials Science and Engineering, 2019, 25(8): 141-144. (in Chinese)

Cytotoxicity and antibacterial of hyperbranched polyamidoamine compound

RAO Fa-ming¹, LIN Xi², HUANG Wei-zhe², WU Jiang-yu²

(1. Wulongquan Mine of Wuhan Iron & Steel Group Minerals Co., Ltd, Wuhan 430213, China;

2. School of Materials Science & Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Hyperbranched polymer is a kind of macromolecules with simple synthesis, low cost, highly branched structure and abundant end groups, and has the potential for the development of antibacterial agent. Amine-terminating hyperbranched polyamidoamine was synthesized with ethylenediamine and methyl acrylate as monomers, and its biological activities were investigated. The cytotoxicity of hyperbranched polymer was determined with Hela cells through 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) strategy. Its antimicrobial activity was assayed with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as the bacteria. The results show that hyperbranched polyamidoamine exhibits relatively low cytotoxicity in the concentration range from 0 to 20 mg/mL where more than 50% of the cells maintain viable; the synthetic hyperbranched polymer displays very good inhibition on the propagation of *Staphylococcus aureus* with an effective concentration of 0.05 mg/mL, while that for *Escherichia coli* is about 12.5 mg/mL. This synthesized hyperbranched polyamidoamine is a good candidate for safe and efficient antibacterial agent in water treatment.

Key words: polyamidoamine; MTT; cytotoxicity; antibacterial activity; water treatment

本文编辑: 张 瑞