

学校编码: 10384  
学 号: 20520131151568

分类号  
密级  
UDC

# 厦门大学

硕士学位论文

## PEG 类刷状聚合物的多肽功能化修饰及其与磷脂膜相互作用机制的研究

The functional modification of PEGylated brush-polymer by peptides and their interaction mechanism with phospholipid membrane

张欧阳

指导教师姓名: 吴川六 教授

专业名称: 分析化学

论文提交时间: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席:  
评阅人:

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于   年   月   日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。

声明人（签名）：

年   月   日

# 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	iii
<b>第一章 前言</b> .....	1
<b>1.1 刷状聚合物的特点及在生物材料领域中的应用</b> .....	1
1.1.1 刷状聚合物的特点 .....	1
1.1.2 聚合物在生物材料领域中的应用 .....	1
<b>1.2 基于 PEG 的表面功能化修饰</b> .....	4
1.2.1 PEG 表面功能化修饰的方法和特点 .....	4
1.2.2 PEG 表面功能化修饰的应用 .....	5
<b>1.3 提高生物分子材料与磷脂膜相互作用机制的研究</b> .....	9
1.3.1 细胞穿透肽 (CPP) 及其与磷脂膜相互作用的机制 .....	10
1.3.2 具有细胞穿透肽功能的富含胍基或精氨酸序列的转运分子 与磷脂膜的作用机制 .....	13
1.3.3 多肽序列中正电荷和疏水性氨基酸残基 (R, K 和 W) 调控 生物分子材料与磷脂膜的作用机制 .....	15
<b>1.4 研究现状和课题思路</b> .....	17
<b>第二章 PEG 类刷状聚合物的合成及功能化</b> .....	19
<b>2.1 前言</b> .....	19
<b>2.2 实验部分</b> .....	22
2.2.1 主要试剂 .....	22
2.2.2 实验方法和主要仪器 .....	23
<b>2.3 结果与讨论</b> .....	24
2.3.1 PEG 类刷状聚合物 Poly[(AEMA)-co-(OEGMA <sub>500</sub> )]的合成 与表征 .....	24
2.3.2 Poly[(AEMA)-co-(OEGMA <sub>500</sub> )]-Maleimide 的合成和表征 .....	26
2.3.3 多肽聚合物结合物 Poly[(AEMA)-co-(OEGMA <sub>500</sub> )]-Maleimide-Peptide 的合成与表征 .....	28
<b>2.4 结论</b> .....	32
<b>第三章 多肽-聚合物结合物与磷脂膜 (囊泡) 相互作用的调控</b> .....	33
<b>3.1 前言</b> .....	33
<b>3.2 实验部分</b> .....	35
3.2.1 主要试剂 .....	35
3.2.2 实验方法和主要仪器 .....	36
<b>3.3 结果与讨论</b> .....	37
3.3.1 不同类型的囊泡的合成和表征 .....	37
3.3.2 多肽序列中 R 和 K 对多肽功能化修饰的聚合物与不同磷脂膜	

---

相互作用的调控.....	44
3.3.3 多肽序列中 W 对多肽功能化修饰的聚合物与不同磷脂膜相互作用的调控.....	51
3.3.4 胆固醇对多肽功能化修饰的聚合物与磷脂膜相互作用的影响....	54
<b>3.4 结论</b> .....	<b>57</b>
<b>第四章 多肽-聚合物结合物与磷脂膜（细胞）相互作用的调控及其在运载蛋白质进细胞的应用</b> .....	<b>58</b>
4.1 前言.....	58
4.2 实验部分.....	60
4.2.1 主要试剂.....	60
4.2.2 实验方法和主要仪器.....	61
4.3 结果与讨论.....	62
4.3.1 多肽-聚合物结合物的荧光标记.....	62
4.3.2 荧光标记的多肽-聚合物结合物 P-M-FITC-Peptide 的紫外-可见光谱表征.....	63
4.3.3 P-M-FITC-Peptide 与磷脂膜（细胞）相互作用的研究.....	63
4.4 结论.....	68
4.5 展望.....	69
参考文献.....	70
硕士期间发表文章和奖励.....	80
致谢.....	81

---

## Contents

<b>Chinese Abstract</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 The characteristics of the brush-polymers and the application in the field of biological materials</b> .....	1
1.1.1 The characteristics of the brush-polymers.....	1
1.1.2 The application of brush-polymers in the field of biological materials.....	1
<b>1.2 The functionalized modifications of PEG</b> .....	4
1.2.1 The methods and characteristics of PEGylation.....	4
1.2.2 The application of the PEGylation for the functionalized modifications .....	5
<b>1.3 The mechanism research of improving the biological materials interact with phospholipid membrane</b> .....	9
1.3.1 Cell penetrating peptides (CPP) and its mechanism of interaction with phospholipids membrane .....	10
1.3.2 The interaction of the cell-penetrating Arginine or Guanidinium-rich molecular transporters with phospholipid membrane.....	13
1.3.3 The positive charge and hydrophobic amino acid residues (R, K and W) of peptide sequence for the modulation of the interaction of the biological materials with phospholipid membrane .....	15
<b>1.4 Research situation and subject ideas</b> .....	17
<b>Chapter 2 Synthesis and functionalization of PEGylation brush-polymers</b> .....	19
<b>2.1 Introduction</b> .....	19
<b>2.2 Experiments</b> .....	22
2.2.1 The main reagents .....	22
2.2.2 Experiments methods and instruments.....	23
<b>2.3 Results and discussion</b> .....	24
2.3.1 Synthesis and characterizations of Poly[(AEMA)-co-(OEGMA <sub>500</sub> )] .....	24
2.3.2 Synthesis and characterizations of Poly[(AEMA)-co-(OEGMA <sub>500</sub> )]-Maleimide ..	26
2.3.3 Synthesis and characterizations of Poly[(AEMA)-co-(OEGMA <sub>500</sub> )]-Maleimide-Peptide.....	28
<b>2.4 Conclusions</b> .....	32
<b>Chapter 3 The modulation of the interaction of Peptide-Polymer conjugates with phospholipid membrane (liposome)</b> .....	33
<b>3.1 Introduction</b> .....	33
<b>3.2 Experiments</b> .....	35
3.2.1 The main reagents .....	35
3.2.2 Experiments methods and instruments.....	36
<b>3.3 Results and discussion</b> .....	37
3.3.1 Synthesis and characterizations of the liposomes .....	37
3.3.2 The positive charge amino acid residues (R, K) of peptide sequence for the modulation of the interaction of the polymer with phospholipid membrane .....	44

---

3.3.3 The hydrophobic amino acid residues (W) of peptide sequence for the modulation of the interaction of polymer with phospholipid membrane .....	51
3.3.4 The influence of cholesterol on the modulation of the interaction of polymers with phospholipid membrane .....	54
<b>3.4 Conclusions</b> .....	<b>57</b>
<b>Chapter 4 The modulation of the interaction of Peptide-Polymer conjugates with phospholipid membrane (cells) and their application of the delivery of proteins into cells</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1 Introduction</b> .....	<b>58</b>
<b>4.2 Experiments</b> .....	<b>60</b>
4.2.1 The main reagents .....	60
4.2.2 Experiments methods and instruments .....	61
<b>4.3 Results and discussion</b> .....	<b>62</b>
4.3.1 Fluorescent labelling of Peptide-Polymer conjugates (P-M-FITC-Peptide) .....	62
4.3.2 Characterizations by UV-Vis of P-M-FITC-Peptide .....	63
4.3.3 The interaction mechanism studies of P-M-FITC-Peptide with phospholipid membrane (cells) .....	63
<b>4.4 Conclusions</b> .....	<b>68</b>
<b>4.5 Outlook</b> .....	<b>69</b>
<b>References</b> .....	<b>70</b>
<b>Publications list and awards</b> .....	<b>80</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>81</b>

## 摘 要

刷状聚合物的合成和在医学治疗的应用是目前纳米生物分子材料领域研究的热点。同时 PEG 化后的刷状聚合物更有优良的生物性能, 兼具多方面的优势, 因而被应用于多肽/蛋白质药物的功能化修饰、药物可控递送体系以及生物传感等方面。但同时这些材料在其应用中也面临着与生物磷脂膜的作用能力弱和进细胞效率低的问题。因此, 我们需要对材料表面进行电荷性质和疏水性质的调控以实现与磷脂膜的作用增强和进细胞效率的提高, 并更为深入研究其作用机制。本论文旨在通过构建不同氨基酸序列多肽功能化修饰的 PEG 类刷状聚合物形成的多肽-聚合物结合物的体系, 以实现 PEG 类刷状聚合物表面电荷性质和疏水性质的调控, 并在此体系的基础上研究电荷性质和疏水性质对与磷脂膜相互作用机制和细胞吸附效率机制的影响。

本论文共分为四章, 包括以下主要研究内容:

**第一章** 介绍了刷状聚合物的特点以及应用, 进一步介绍了基于 PEG 的功能化修饰的应用, 重点介绍了提高生物分子材料与磷脂膜相互作用机制的研究进展, 以及提高进细胞效率的方法和机制。并在此基础上提出了本论文的研究思路、内容及意义。

**第二章** 利用原子转移自由基聚合 (ATRP) 法, 分别将单体 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯盐酸盐 (AEMA) 与单体寡聚乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯 (OEGMA<sub>500</sub>) 合成 PEG 类刷状聚合物。并通过连接键 6-马来酰亚胺氨基己酸, 将聚合物侧链的部分氨基连接上不同的多肽, 对聚合物进行电荷性和疏水性质的调控。

**第三章** 构建简单高度模拟双分子层磷脂膜结构的不同类型的囊泡, 利用多肽功能化修饰的聚合物与包裹高浓度荧光素的囊泡的作用, 测量作用过程中荧光变化, 以及利用动态光散射研究其形态变化, 从而研究多肽-聚合物结合物与磷脂膜的作用原理和机制, 并筛选出与磷脂膜相互作用最佳的修饰方式。

**第四章** 最后利用细胞相关实验进一步研究多肽修饰的聚合物与磷脂膜的作用机制以及进细胞的效率问题, 细胞实验主要涉及了荧光 FITC 标记的多肽-聚合物结合物的共聚焦成像、流式细胞成像、细胞毒性、内吞抑制实验以及低温成像实验。



**关键词：** 刷状聚合物 PEG 功能化修饰 电荷性 疏水性 与磷脂膜相互作用  
进细胞效率

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

The synthesis and application in medical treatment of the brush-polymer are the hotspot in the research of nano biological molecules. At the same time, PEGylated brush-polymers have more excellent biological performance as well as advantages, and can be applied to functional modification of peptide/protein drugs, drug controlled delivery system and biological sensing, etc. But these materials in the applications are faced with the weak interaction with phospholipids membrane and the low efficiency into the cells. Therefore, we need to modulate the surface properties of the materials including charge and hydrophobicity in order to promote the interaction of them with phospholipid membranes, meanwhile study the interaction mechanism. In this work, a series of PEGylated brush-polymers containing a varying sequence of peptides were obtained. This PEGylated peptide-polymer conjugate can confer diverse charge and hydrophobicity. Based on this system, how the charge and hydrophobicity effect on the interaction of the molecule with phospholipid membranes was studied.

The paper can be divided into **four chapters**, including the following main contents:

**The first chapter:** This chapter introduces the characteristics of the brush-polymers and the application in the field of biological materials. Furthermore, the application of functionalized modifications based on PEG is introduced. We focus on the research progress of promoting the interaction of the biomolecular material with phospholipid membranes, and the methodology and mechanism that how to improving the efficiency into the cells. And on this basis, we proposed the research ideas, the main contents and its meaning of our work.

**The second chapter:** The PEGylated brush-polymer, Poly[(AEMA)-co-(OEGMA<sub>500</sub>)], was synthesized through ATRP of AEMA and OEGMA<sub>500</sub> at a certain ratio. To further facilitate the conjugation with peptides, these polymers were then reacted with 6-Maleimidocaproic acid (Maleimide), which leads to introduction of maleimide groups in polymers. Peptides of interest within which free thiol groups were introduced can then be conveniently conjugated to the polymers through thioether formation. As a result, we can modulate the charge and hydrophobicity of the polymers.

**The third chapter:** In this chapter, we design and synthesize the different types of liposomes that closely imitate lipid bilayers. In order to further study the interaction mechanism of PEGylated peptide-polymer conjugates with liposomes, we explored the interaction of peptide-polymer conjugate with liposomes encapsulated fluorescein (CF) in high concentration, and measure the intensity of fluorescence recovery. Meanwhile, we also measure the morphologic change of liposomes during the interaction by DLS. At the end, we hope we can obtain the optimizing peptide-polymer conjugates to transfer biomolecules into cells.

**The fourth chapter:** In this chapter, we further explored the interaction mechanism of PEGylated peptide-polymer conjugate with phospholipid membranes and their efficiency of cellular uptake in in vitro cell research. The main cell experiments are including the confocal fluorescence imagings, the flow cytometry imagings, the cell cytotoxicity, the cell experiment of endocytosis inhibitors and the low temperature of fluorescence imagings.

**Keywords:** Brush-polymer; PEGylated; Charge; Hydrophobicity;  
The interaction with phospholipid membranes; The efficiency of cellular uptake

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 刷状聚合物的特点及在生物材料领域中的应用

#### 1.1.1 刷状聚合物的特点

继最初的脂质体修饰生物材料分子以来,刷状聚合物为目前最为流行的一种高分子的修饰材料,它能够避免脂质体等修饰分子的不足,推动了生物材料表面性质改良的发展。刷状聚合物在实际应用中的优势是:生物相容性好、抗生物污染、稳定性好、材料抗腐蚀等。同时,刷状聚合物的合成中可使用的单体种类众多,采用的合成方法众多且合成步骤简单,反应条件温和又环保。因此,利用刷状聚合物修饰的生物分子材料可以实现比其他修饰方法更为有利的效果,刷状聚合物在各个方面有广泛的应用,如多肽/蛋白质的修饰保护、可控药物释放递送和生物传感等方面。

#### 1.1.2 聚合物在生物材料领域中的应用

##### 1) 聚合物在修饰多肽/蛋白质药物上的应用

刷状聚合物对多肽或蛋白质的修饰不仅能提高其在体内的循环周期,而且能保证多肽或蛋白质储存,运输和受其他环境影响后的稳定性。如图 1.1 所示: Thi H. Nguyen 等人利用聚(对-苯乙烯磺酸-PEGMA) 功能化修饰碱性成纤维母细胞生长因子(bFGF), 两者的复合物与蛋白质本身相比表现出了对热、酸性和蛋白质水解酶的稳定性,同时还保持其生物活性<sup>[1]</sup>。

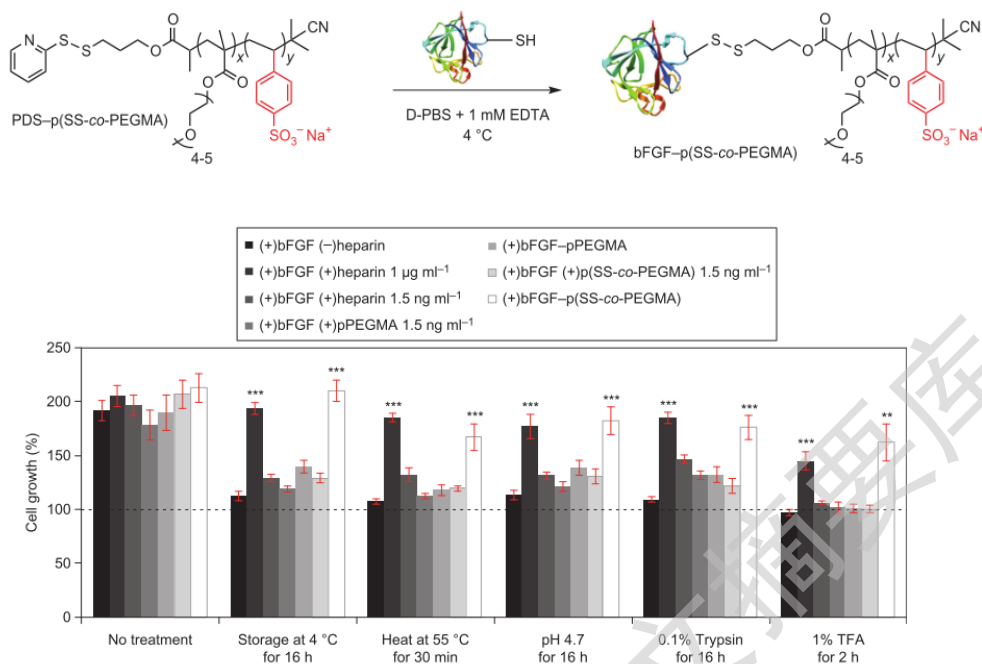
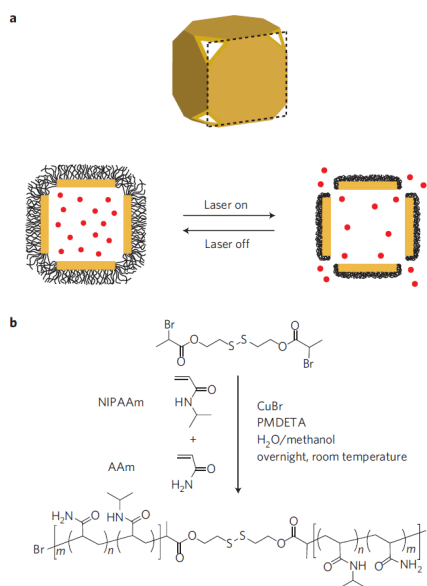


Figure 1.1 Example of stabilizing and brush polymer.

图 1.1 稳定的刷状聚合物-bFGF 结合物。

## 2) 聚合物在修饰纳米颗粒形成药物递送系统上的应用

Yavuz 等人合成金纳米笼，由 N,N-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAm) 和 N,N-异丙基丙烯酰胺-丙烯酰胺的共聚物 (PNIPAm-co-PAAm) 功能化修饰于金表面而利用激光加热法来实现可控释放<sup>[2]</sup>。他们使用与金纳米吸收带波长相当的激光束而未使用紫外-可见区的光照。如图 1.2 (a) 所示。功能化修饰的金纳米笼暴露于激光束下，能够吸收辐射并将其转换成热能，而热能达到低临界溶液温度 (LCST, 接近 32 或 39 度) 反过来又能使聚合物消散成 PNIPAm 和 PNIPAm-co-PAAm。实现从亲水合成物转变到折叠的疏水聚集体，从而达到可选择性的释放。最终，Yavuz 课题组实现了对 alizarin-PEG 和溶菌酶的光热激发的可控释放。



**Figure 1.2** Representation of the controlled release of alizarin-PEG and lysozyme by using photothermal responsive polymer brushes, triggered by a laser beam.

**图 1.2** 刷状聚合物修饰的金纳米笼。

### 3) 聚合物在生物传感上的应用

生物分子的检测，比如抗体、抗原、蛋白质、酶和 DNA 在生物医疗应用中均需要较高的灵敏性和准确性。以聚合物为基础的生物传感由于聚合物的修饰增强其灵敏性和易于携带，因此聚合物修饰的生物传感有着很好的应用前景，表 1.1 为刷状聚合物修饰的生物传感分子。

Akkahat 等人利用聚丙烯酸 (PAA) 修饰的生物素的探针检测抗生蛋白链菌素 (SA) [3]。由于生物素探针能够选择性与 SA 作用，因此他们利用荧光显微技术实现生物素对 SA 的传感探测。与此同时 Akkahat 等人利用这种方法实现了对 SA 和抗牛血清蛋白的双重检测[4]。在 Akkahat 等人进一步的研究中，他们利用聚甲基丙烯酸与聚-2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的共聚物修饰生物素传感探针可以检测到纳摩尔量的抗生物素蛋白 (AVD) 而且不受血清中其他的蛋白质的影响[5]。Barbey 等人利用聚甲基丙烯酸缩水甘油酯 (PGMA) 修饰的生物传感分子可以检测 SA 和 TNF $\alpha$ [6]。Tang 等人使用紫外-可见光刻技术将基于聚丙烯酸钠 (PSA) 和聚丙烯酸钠 (PGMA) 两种聚合物的生物传感分子准确检测 AVD 和 anti-IgG [7]。

聚合物	分析物	传感探针	使用技术
PAA	SA	biotin	Fluorescence microscopy
PAA	SA/anti-BSA	biotin/BSA	Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy
P(MA-ran-MPC)	血清中 AVD	biotin	SPR spectroscopy
PGMA	SA/Fab-AF467	biotin/TNF $\alpha$	Quartz crystal microbalance
PSA/PGMA	avidin/anti-IgG	biotin/ IgG	Fluorescence imaging

**Table 1.1** Polymer brushes that were employed for biosensing applications.

**表 1.1** 刷状聚合物在生物传感方面的应用。

注：PAA 为聚丙烯酸，P(MA-ran-MPC)为聚甲基丙烯酸与聚-2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的共聚物，PGMA 为聚丙烯酸钠，PSA 为聚丙烯酸钠；SA 为抗生蛋白链菌素，AVD 为抗生物素蛋白，IgG 为免疫球蛋白。

## 1.2 基于 PEG 的表面功能化修饰

### 1.2.1 PEG 表面功能化修饰的方法和特点

PEG (polyethylene glycol) 在功能化修饰生物分子材料的方面占据重要位置。FDA 已经批准使用 PEG 作为食品、化妆和药的载体或基底。尤其 PEG 对多肽/蛋白质的功能化修饰，可以维持多肽/蛋白质的生理稳定性以至于广泛用于应用于生物医疗方面，是生物医疗研究历史中的一个里程碑<sup>[8]</sup>。

PEG 是一种化学性质不活泼而且免疫原性较低的分子，因此，PEG 对多肽/蛋白质的功能化修饰后，PEG 的长链不仅能够提高多肽/蛋白质在体内的溶解性而且能够屏蔽多肽/蛋白质表面的活性位点从而使其稳定存在，这就是 PEG 的“疏水云”作用模型，如图 1.3 所示：在 PEG 的长链保持足够自由的情况下，PEG 通过疏水作用包裹多肽/蛋白质，同时与周围的水分子形成氢键从而实现对多肽/蛋白质的保护。PEG 较大的分子量也很大程度上减少了肾脏的清除。因而，通过 PEG 修饰的蛋白质的生物循环半衰期可以增加 5 倍甚至 100 倍<sup>[9]</sup>。此外，功能化修饰多肽/蛋白质的 PEG 的尺寸和数目也影响药物在体内的半衰期。比如分子量分别为 25 KD、40 KD 的 PEG 和分子量为 25 KD 的两条 PEG 分别对 Fab-

抗体功能化修饰, 修饰后的 Fab-抗体在小鼠血清中半衰期分别是未修饰的抗体的 15 倍, 17 倍和 27 倍<sup>[10]</sup>。另外 PEG 功能化修饰形成的“疏水云”的形状也是关键因素, 即: PEG 的树枝化尖端的点能够增强其更接近于多肽/蛋白质表面的位点, 即达到所谓的“伞效应”, 从而实现生物循环半衰期的显著增加<sup>[11-13]</sup>。

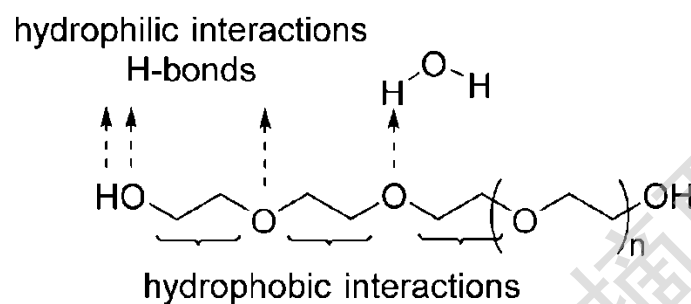


Figure 1.3 Hydrophilic and hydrophobic interactions of PEG.

图 1.3 PEG 的亲疏水作用。

因此, PEG 功能化修饰方法的特点是: (1) 增长生物循环周期, (2) 低毒性, (3) 有效避免肾脏清除, (4) 生物相容性好, (5) 低的免疫原性。目前有大概 7-8 种经过 PEG 化的多肽/蛋白类药物通过 FDA 的审批。虽然我们对 PEG 的功能化修饰值得关注的还有它存在的不足之处也就是 PEG 本身的多分散性所造成的分析上的难度以及有关降解的问题<sup>[14]</sup>, 但是, PEG 功能化修饰方法仍然是利远远大于弊, 被认为是多肽/蛋白质药物修饰中能够很好稳定多肽/蛋白质的最为重要的一种方式, 在各种生物医药应用领域中占据重要地位, 也是功能化修饰化学中最为重要的工具<sup>[15, 16]</sup>。

### 1.2.2 PEG 表面功能化修饰的应用

PEG 的功能化修饰起源于 1977 年 Abuchowski 等人对牛血清蛋白的修饰, 利用三聚氰酰氯偶联剂将 monomethoxy-PEG (m-PEG) 结合到牛血清蛋白上形成 BSA-PEG 结合物<sup>[17]</sup>, 经过 PEG 修饰的血清蛋白表现出了很低的免疫原性。进一步的研究表明 PEG 的修饰同时也延长了生理半衰期<sup>[17, 18]</sup>。PEG 修饰方法的优势使 PEG 的功能化修饰越来越受关注, 尤其对多肽/蛋白质独有的修饰效果, 使 PEG 成为了修饰多肽/蛋白质的明星分子。同时, PEG 是由 FDA 通过的一种能够键和到多肽/蛋白质药物的聚合物分子, 并且在多肽/蛋白质药物治疗各种疾



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库