

具生物活性的快速光交联生物可降解水凝胶的设计合成*

邓 超 王 荣 陈 维 孟凤华 程 茹 钟志远**

(江苏省先进功能高分子材料设计及应用重点实验室)

苏州大学材料与化学化工学部 苏州大学生物医用高分子材料重点实验室 苏州 215123)

摘 要 采用开环聚合方法合成了一系列水溶性生物可降解的低聚(丙交酯-co-丙烯酸酯碳酸酯)-*b*-聚乙二醇-*b*-低聚(丙交酯-co-丙烯酸酯碳酸酯)(OLAC-PEG-OLAC)三嵌段共聚物,并通过光交联方法方便制备得到具生物活性的新型生物可降解水凝胶.流变测试表明水凝胶储存模量(170~10000 Pa)和凝胶时间(0.8~8 min)均可通过调节丙烯酸酯碳酸酯(AC)单元数、聚合物浓度及光引发剂浓度等得到控制.降解实验表明水凝胶的降解速率可通过改变AC和丙交酯(LA)单元数进行调控.含巯基的生物活性分子如RGDC短肽可通过迈克尔加成反应直接链接到OLAC-PEG-OLAC上,由此可方便制备可注射性的具生物活性的生物可降解水凝胶.MG63成骨细胞实验表明RGDC短肽功能化的OLAC-PEG-OLAC水凝胶可很好地促进细胞黏附和生长.该快速光交联生物可降解水凝胶以其优异的凝胶、降解和生物功能化等性能可望为生物组织工程提供理想的三维活性多孔支架.

关键词 水凝胶,光交联,生物可降解,生物活性,RGD短肽,组织工程

生物可降解水凝胶由于具有高含水量、尺寸可调的多孔结构和良好的生物相容性等特点而被广泛地应用在药物释放和组织工程等生物医学领域^[1~4].可直接注射的、原位形成的水凝胶具有许多其它生物材料无法比拟的优点,例如(1)它可通过非侵入性方式移植到体内,避免了高创伤性外科手术;(2)活细胞、药物、蛋白质或其它生物活性物质可通过与凝胶前体混合,实现均匀包裹;(3)它与周围组织衔接紧密,可用于填充任何形状的缺损,修复形状复杂的组织等^[5~9].

原位形成生物可降解化学水凝胶的方法主要有光聚合交联^[10]、酶交联^[11,12]、迈克尔加成交联^[13~15]和点击化学交联^[16~18].光聚合交联由于凝胶速度快,反应条件温和,及凝胶时空可控等优点而尤其受到青睐.例如,Hubbell等报道丙烯酸酯端基官能化的低聚酯-*b*-聚乙二醇-*b*-低聚酯共聚物的水溶液在光引发剂和光辐照条件下原位形成生物可降解水凝胶^[19,20].该光交联水凝胶可用于蛋白质药物、DNA和软骨细胞的包裹^[21,22],并可用作受伤动脉的物理屏障,阻止血栓生成和减少内膜增厚的发生^[23].Zhong和Feijen等报道了

基于丙烯酸酯端基官能化的八臂聚乙二醇-寡聚丙交酯(star-PEG-OLA)星型嵌段共聚物的“立体复合-光聚合”双交联生物可降解水凝胶^[24].光交联方法也被用于制备海藻酸盐、透明质酸、壳聚糖、明胶和胶原等天然材料水凝胶^[25~29],用于蛋白质控制释放和生物组织工程.Hennink等通过光交联甲基丙烯酸甲酯侧链端基官能化的寡聚乳酸接枝聚(*N*-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)-*b*-PEG-*b*-寡聚乳酸接枝聚(*N*-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)三嵌段共聚物制备得到了力学性能较高和降解速率可控的生物可降解水凝胶^[30],并研究了其作为软骨组织工程支架的应用^[31].

脂肪族聚碳酸酯与脂肪族聚酯类似,具有优异的生物降解和生物相容性,已用于手术缝合线、药物控制释放和再生医学等领域^[32].与聚酯不同,聚碳酸酯主要通过表面降解方式降解,且避免了酸性降解产物的生成.聚酯降解产生的酸性微环境易于导致蛋白质变性,不利于细胞生长.但迄今为止,基于脂肪族聚碳酸酯的可注射性生物可降解水凝胶的报道还很少.我们最近报道了水溶性低聚丙烯酸酯碳酸酯-*b*-聚乙二醇-*b*-低聚丙烯

* 庆祝王佛松院士80华诞专稿;2012-12-25收稿,2013-01-29修稿;国家自然科学基金(基金号51003070和51273137)、国家杰出青年科学基金(基金号51225302)和江苏高校优势学科建设工程资助项目.

** 通讯联系人,E-mail:zyzhong@suda.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12426

酸酯碳酸酯 (OAC-PEG-OAC) 三嵌段共聚物和含巯基壳聚糖通过迈克尔加成反应原位制备酶可降解水凝胶^[33]. 结果发现 RGD 短肽可通过迈克尔加成反应方便引入到水凝胶, 有效促进 MG63 成骨细胞和 L929 成纤维细胞的黏附和生长.

本文报道具生物活性的原位形成的一类新型生物可降解水凝胶(图 1). 该水凝胶由水溶性低聚(丙交酯-co-丙烯酸酯碳酸酯)-*b*-聚乙二醇-*b*-低聚(丙交酯-co-丙烯酸酯碳酸酯) (OLAC-PEG-OLAC) 三嵌段共聚物通过光聚合交联制备得到. 结果表明水凝胶可在低光引发剂浓度和低光强度下快速形成. 水凝胶的交联密度、凝胶时间、力学性能和降解性能可通过改变聚合物的组成、引发剂浓度、聚合物浓度和紫外光照时间等加以控制. 含巯基的生物活性分子如 RGDC 短肽可在生理

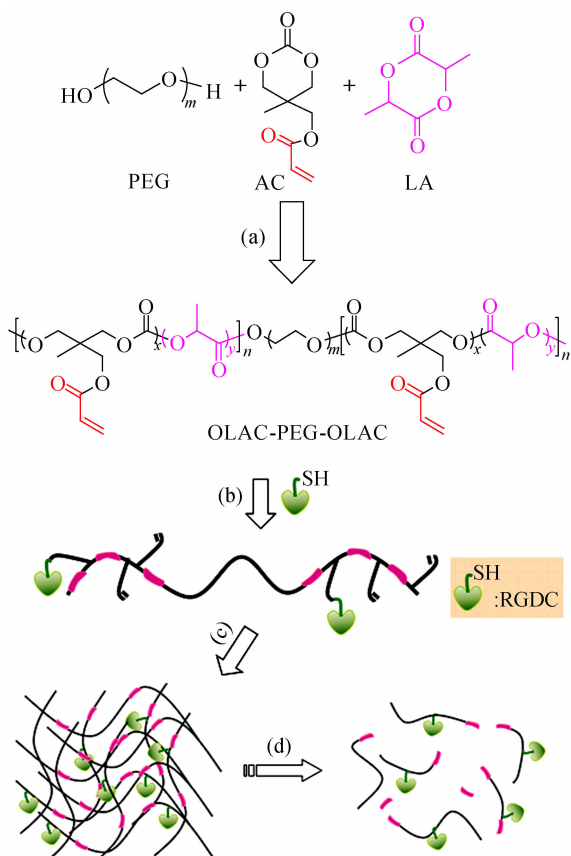


Fig. 1 Synthesis and biodegradation of functional photo-crosslinked biodegradable hydrogels based on OLAC-PEG-OLAC copolymers

a) Synthesis of OLAC-PEG-OLAC triblock copolymers by ring-opening copolymerization of lactide and cyclic acryloyl carbonate monomers; b) Conjugation of RGDC to OLAC-PEG-OLAC via Michael addition reaction; c) *In situ* forming hydrogels via photo-crosslinking; d) Hydrolytic degradation of hydrogels

条件下通过迈克尔加成反应高效地引入到 OLAC-PEG-OLAC 上, 由此可方便制备得到可注射性的具有生物活性的生物可降解水凝胶.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚乙二醇 (PEG, Alfa Aesar, $M_n = 6.0 \times 10^3$) 通过与甲苯共沸除水. D,L-丙交酯 (DL-LA, Purac, >99%) 用甲苯重结晶后使用. 环状丙烯酸酯碳酸酯 (AC) 单体依据文献合成^[34]. 双(双三甲基硅基)胺锌催化剂 (97%, Aldrich), 半胱胺酸 (Alfa Aesar, 99%), 光引发剂 Irgacure 2959 (I2959, Aldrich) 和 RGDC (苏州中科多肽有限公司) 购买后直接使用. 二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 通过氢化钙干燥回流后使用.

$^1\text{H-NMR}$ 用 Unity Inova 400 型 (400 MHz) 和 NMRststem (Varian, 300 MHz) 核磁共振波谱仪测定, 以氘代氯仿 (CDCl_3) 或氘代二甲亚砜 ($\text{DMSO-}d_6$) 为溶剂, 聚合物各质子峰以溶剂峰的化学位移为参考标准. 聚合物的分子量以及分子量分布由凝胶色谱仪 (GPC) 测定, 使用 Waters 1515 高效液相色谱泵, RI2410 检测器和 MZ-Gel (Mixed-C) 凝胶柱. 以 THF 为流动相, 流动速率为 0.8 mL/min, 温度为 30 $^\circ\text{C}$, 用单分散线性聚苯乙烯 (PS) 作标样. 凝胶模量与凝胶时间用哈克 RS6000 (赛默飞世尔公司) 流变仪测试, 转子直径 20 mm, 与样品之间的间距 0.1 mm, 频率为 1 Hz, 测试温度为 37 $^\circ\text{C}$. 流变仪上配置 UV 辐射装置, 其波长为 365 nm, 光强可调节为 0.38 mW/cm^2 , 0.76 mW/cm^2 或 1.50 mW/cm^2 .

1.2 合成 OLAC-PEG-OLAC 三嵌段共聚物

OLAC-PEG-OLAC 共聚物是以双(双三甲基硅基)胺锌为催化剂, PEG ($M_n = 6.0 \times 10^3$) 为引发剂, 二氯甲烷为溶剂, 在 30 $^\circ\text{C}$ 下共聚合 LA 和 AC 单体制备得到 (图 2), 聚合条件参考文献 [34] 方法. 共聚物以 OLAC-PEG-OLAC (x/y) 表示, 其中 x 和 y 分别代表 LA 和 AC 的单元数. 以合成 OLAC-PEG-OLAC (6/8) 为例: 在氮气保护的手套箱中, 将 1.125 g 的 PEG (0.188 mmol) 和 0.162 g 的 LA (1.125 mmol) 和 0.3 g 的 AC (1.5 mmol) 溶于 10 mL 的二氯甲烷溶剂中, 然后快速加入双(双三甲基硅基)胺锌催化剂溶液 (1 mL, 0.036 mol/L). 将反应瓶密封好转移出手套箱, 置于 30 $^\circ\text{C}$ 油浴中反应 3 天后, 终止反应. 用冰乙醚

沉淀 2 次,常温下真空干燥 24 h 得到产品.产率为 85%.¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 1.1 (m, CHCH₃, AC units), 1.4 (m, CH(CH₃)OH, LA end), 1.6 (m, CHCH₃, LA units), 3.6 (m,

PEG methylene protons), 4.2 ~ 4.4 (m, (CH₂)₃-CCH₃, AC units), 5.1 (m, CHCH₃, LA end), 5.2 (m, CHCH₃, LA units linking to AC), 5.8 ~ 6.4 (m, -CH=CH₂ AC units).

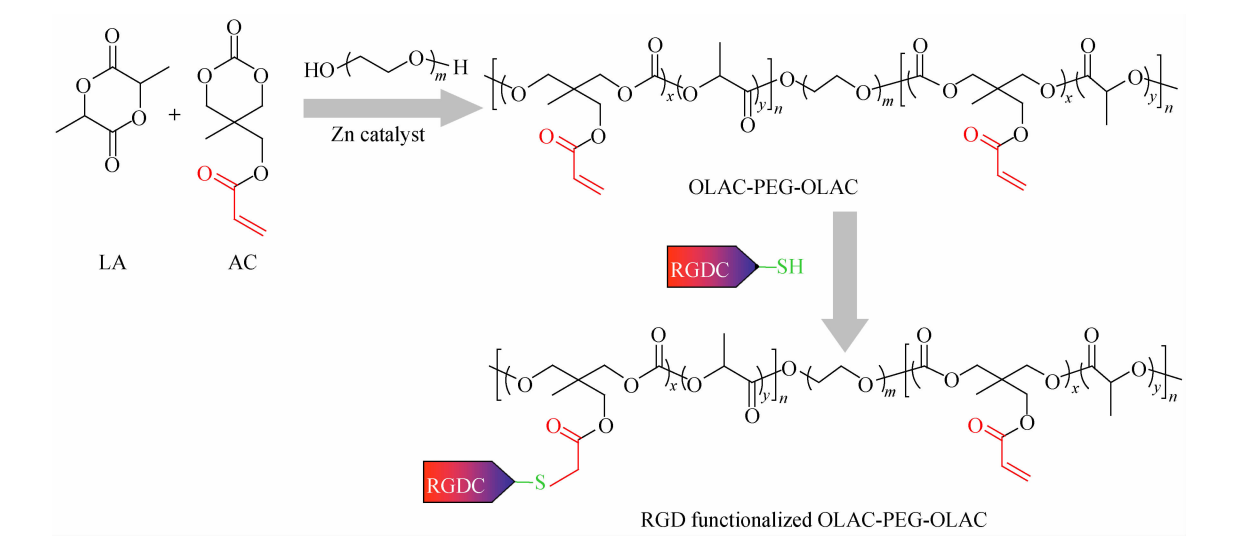


Fig. 2 Synthesis of OLAC-PEG-OLAC and RGDC-functionalized OLAC-PEG-OLAC

1.3 合成 RGDC 短肽功能化的 OLAC-PEG-OLAC 共聚物

RGDC 短肽功能化的 OLAC-PEG-OLAC 共聚物是在氮气保护和室温条件下,通过 OLAC-PEG-OLAC 与 RGDC 在 HEPES 缓冲溶液 (pH = 7.4, 20 mmol/L, 150 mmol/L NaCl) 中迈克尔加成反应制备得到 (图 2). 以 OLAC-PEG-OLAC (6/6) 共聚物的 RGDC 功能化为例:将 OLAC-PEG-OLAC (6/6) 共聚物和含巯基的 RGDC 短肽溶解在缓冲溶液中 (摩尔比 $n(\text{双键})/n(\text{巯基}) = 3/1$), 在氮气保护和室温条件下反应 2 h 后,透析除去未反应的 RGDC 短肽,冷冻干燥,得到 RGDC 功能化的聚合物.

1.4 光交联 OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的凝胶时间和力学性能

水凝胶以 0.05 wt% I2959 作为光引发剂,通过波长为 365 nm 的紫外光照 OLAC-PEG-OLAC 聚合物的 HEPES 溶液,交联制备得到. 水凝胶的凝胶时间和凝胶模量通过哈克 RS6000 流变仪测试. 凝胶时间定义为储存模量 (G') 与损耗模量 (G'') 相交处的时间. 研究了光引发剂浓度、聚合物浓度、AC 单元数等对凝胶模量和凝胶时间的影响.

1.5 OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的凝胶含量和平衡含水量的表征

水凝胶的凝胶含量是将制备好的水凝胶冷冻

干燥并称重 (W_d),再将冻干的水凝胶置于氯仿溶剂中除去自由的聚合物,然后真空干燥除去氯仿,重复此步骤直至干燥后的凝胶为恒重 (W_g). 凝胶含量 = $W_g/W_d \times 100\%$.

水凝胶的平衡水含量是将制备好的水凝胶冷冻干燥并称重 (W_d),再将干凝胶放在 2 mL 的缓冲溶液中,室温放置 4 天后取出称重 (W_s). 水凝胶的平衡含水量 = $(W_s - W_d)/W_d \times 100\%$.

1.6 OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的溶胀/降解行为

OLAC-PEG-OLAC (6/5, 6/8, 0/5, 2/5) 聚合物水凝胶由 25 wt% 聚合物溶液在 0.05 wt% I2959 光引发剂和紫外光照下 (365 nm, 强度为 60 mW/cm²) 辐照 5 min 制备得到. 水凝胶的溶胀/降解测试是将约 0.5 g 水凝胶 (厚约 5 mm, 直径约 10 mm, 重量为 W_0) 放置在 5 mL 的 HEPES 缓冲溶液中,在 37 °C 下溶胀一定时间后取出称重 (W_t),每种样品平行 3 组实验. 水凝胶的溶胀比 = W_t/W_0 .

1.7 细胞培养

用 MG63 成骨细胞来研究水凝胶的细胞黏附和生长性能. 将制备好的 OLAC-PEG-OLAC 和 OLAC-PEG-OLAC (RGDC) 水凝胶分别铺在 24 孔细胞培养板中,用钴辐射灭菌消毒. 然后在水凝胶上加入 1.0×10^4 细胞/孔和含 10% 牛血清蛋白的

培养基(DMEM),并在 37 ℃ 和 5% 二氧化碳条件下培养.用倒置荧光显微镜(Axiovert 40 CFL)观察成骨细胞在培养 1 天和 6 天后的黏附和增殖情况.

2 结果与讨论

2.1 OLAC-PEG-OLAC 共聚物的合成

OLAC-PEG-OLAC 三嵌段共聚物是在双(双三甲基硅基)胺锌催化作用下,通过 PEG 端羟基引发丙交酯(LA)和含丙烯酸酯的环碳酸酯(AC)的开环共聚制备得到(图 2)^[33, 34].通过调节 AC/LA 单体比及单体/PEG 比,我们设计合成了一系列组成和分子量不同的 OLAC-PEG-OLAC 共聚物,聚合结果见表 1.图 3 为 OLAC-PEG-OLAC 聚

合物的¹H-NMR 谱图,由图可清晰地观察到 PEG 的亚甲基峰(δ = 3.6),AC 单元的丙烯酸酯双键峰(δ = 5.8 ~ 6.4)、亚甲基峰(δ = 4.1 ~ 4.3)和甲基峰(δ = 1.1)及 LA 单元的次甲基峰(δ = 5.2)和甲基峰(δ = 1.6).聚合物中 AC 和 LA 组分的含量可以通过分别比较 AC 双键峰和 LA 的次甲基峰与 PEG 亚甲基峰的面积计算得到.结果表明共聚物的组成和分子量可通过 AC/LA 投料比和单体/引发剂比得到良好控制,分子量分布较窄(1.11 ~ 1.19)(表 1,Entries 1 ~ 6).采用同样的方法,我们也制备了不含 LA 的 OAC-PEG-OAC 嵌段共聚物(表 1,Entry 7).溶解试验表明所有共聚物在 25 wt% 浓度下都可溶解在 pH = 7.4 的 HEPES 缓冲溶液中.

Table 1 Synthesis of OLAC-PEG-OLAC triblock copolymers^a

Entry	Copolymer	DP(LA/AC)		$M_n \times 10^{-3}$		PDI ^c
		Design	¹ H-NMR	¹ H-NMR ^b	GPC ^c	
1	OLAC-PEG-OLAC (2/5)	2/8	2/5	7.2	7.1	1.19
2	OLAC-PEG-OLAC (3/5)	4/8	3/5	7.4	8.7	1.15
3	OLAC-PEG-OLAC (6/5)	6/8	6/5	7.8	7.9	1.18
4	OLAC-PEG-OLAC (6/3)	6/6	6/3	7.5	7.2	1.12
5	OLAC-PEG-OLAC (6/6)	6/12	6/6	8.0	8.0	1.11
6	OLAC-PEG-OLAC (6/8)	6/16	6/8	8.4	8.5	1.18
7	OAC-PEG-OAC	0/8	0/5	7.0	7.8	1.26

^a PEG has an M_n of 6.0×10^3 ; ^b Estimated by ¹H-NMR analysis; ^c Determined by GPC (eluent: THF, flow rate: 0.8 mL/min, standards: polystyrene)

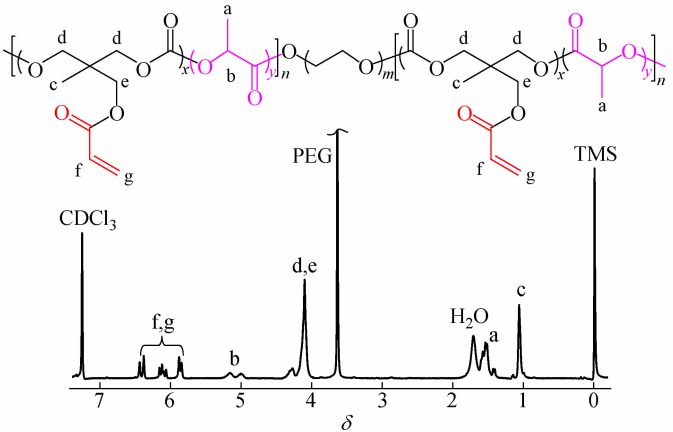


Fig. 3 ¹H-NMR spectrum (300 MHz, CDCl₃) of OLAC-PEG-OLAC copolymer (6/5)

2.2 RGD 短肽功能化 OLAC-PEG-OLAC 共聚物

OLAC-PEG-OLAC 聚合物侧链上的丙烯酸酯基团可通过迈克尔加成反应方便引入含巯基的生物活性分子,从而实现 OLAC-PEG-OLAC 聚合物材料的生物功能化(图 2).迈克尔加成反应在水

溶液中进行,反应条件温和,无需加入催化剂,且不产生任何副产物,有利于保持引入的生物活性分子的活性.在本实验,我们采用含巯基的 RGDC 短肽修饰 OLAC-PEG-OLAC 聚合物.图 4 是 RGDC 短肽功能化的 OLAC-PEG-OLAC 聚合物的¹H-NMR 谱图,位于 δ = 2.6 ~ 2.8, 5.1, 5.4,

7.0~8.5 的 RGDC 短肽峰和部分消失的丙烯酸酯双键峰证实了 RGDC 短肽被成功键合到 OLAC-PEG-OLAC 聚合物上. 通过比较反应前后

聚合物 AC 上双键峰的面积可以计算接枝到聚合物上的 RGDC 短肽量,结果表明 RGDC 短肽定量地接到了 OLAC-PEG-OLAC 聚合物上.

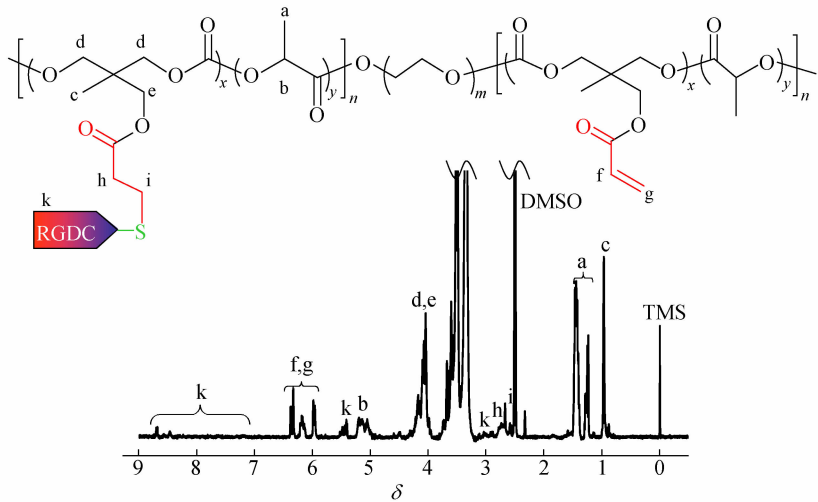


Fig. 4 ¹H-NMR spectrum (400 MHz, DMSO-*d*₆) of RGDC-functionalized OLAC-PEG-OLAC copolymer

2.3 水凝胶的制备和流变性能表征

水凝胶通过将 OLAC-PEG-OLAC 聚合物溶于 HEPES 缓冲溶液中,以 0.05 wt% I2959 为光引发剂,在 365 nm 的紫外光照下交联制备得到(图 1).光交联反应可通过红外光谱进行确认.如图 5,在 1577 cm⁻¹处的 C=C 伸缩振动峰随着紫外光照时间增长而减弱.辐射 20 s 后,C=C 峰变得很小,表明在实验条件下丙烯酸酯能快速进行光聚合交联反应.凝胶含量测试表明,OLAC-PEG-OLAC 溶液在 15% 聚合物浓度 20 s 光照辐射或 20%~25% 聚合物浓度 10 s 光照辐射下,凝胶含量达到 80% 以上(图 6),说明 OLAC-PEG-OLAC 聚合物溶液可在较短的时间内通过光交联原位形成水凝胶.

用流变仪研究了水凝胶形成过程中储存模量 (*G'*) 和损耗模量 (*G''*) 随时间的变化.图 7 是 OLAC-PEG-OLAC(6/6) 和 RGDC 功能化 OLAC-PEG-OLAC(6/6) 聚合物的 20 wt% HEPES 溶液,以 0.05 wt% I2959 为光引发剂,在 37 °C 条件下用 365 nm 紫外光(0.76 mW/cm²)交联制备水凝胶的流变曲线图.研究发现 OLAC-PEG-OLAC(6/6) 聚合物溶液在紫外光辐射仅约 3.2 min 后形成凝胶,且储存模量 *G'* 随着辐射时间延长而增大,在约 6.0 min 后达到平衡值,说明完成交联反应.引入 1 个或 2 个 RGDC 短肽到 OLAC-PEG-OLAC(6/6)后,凝胶时间分别略增长至约 3.6 min 和

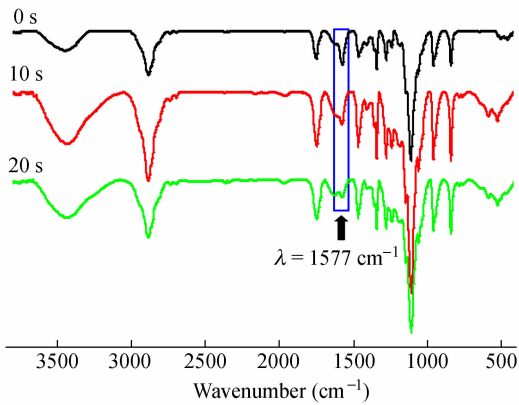


Fig. 5 FTIR spectra of OLAC-PEG-OLAC (6/5) copolymer in HEPES buffered saline (pH = 7.4) in the presence of 0.05 wt% I2959 initiator at 37 °C following different UV irradiation times (365 nm, 60 mW/cm²).

4.1 min,但水凝胶的最终储存模量和损耗模量变化不大.特别注意的是本实验采用的紫外光的强度仅为 0.76 mW/cm²,这远远低于文献中报道的用于光聚合水凝胶所使用的光强^[35, 36].因此,通过光聚合交联方法,由 OLAC-PEG-OLAC 可在低光强下快速原位制备 RGDC 短肽功能化的水凝胶.

我们系统研究了聚合物溶液浓度、光引发剂浓度和 AC 单元数对水凝胶流变性能的影响.图 8 (a)是 OLAC-PEG-OLAC (6/5) 聚合物溶液,在光引发剂浓度为 0.05 wt% 和紫外光强度为 0.76 mW/cm²的条件下,水凝胶的储存模量和凝胶时

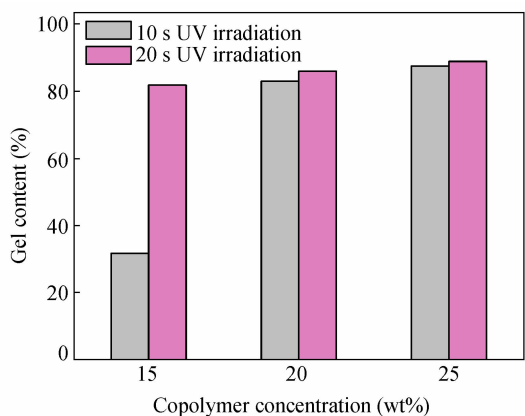


Fig. 6 Gel contents of OLAC-PEG-OLAC (6/5) hydrogels prepared from 15 wt% , 20 wt% and 25 wt% concentrations under UV irradiation (365 nm, 60 mW/cm²) with 0.05 wt% I2959 initiator in HEPES buffered saline at 37 °C for 10 s or 20 s

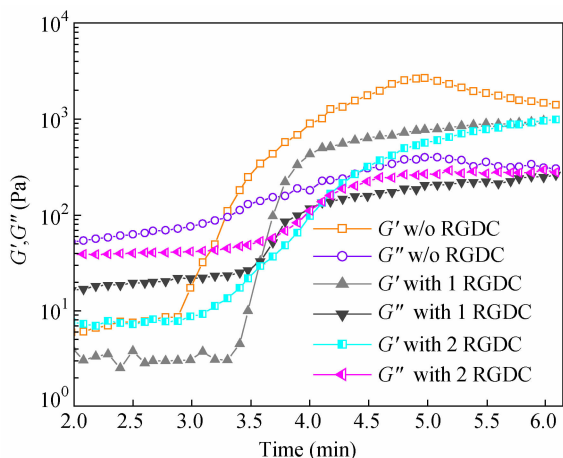


Fig. 7 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') as a function of UV irradiation time (365 nm, 0.76 mW/cm²) of OLAC-PEG-OLAC (6/6) and RGDC-functionalized OLAC-PEG-OLAC (6/6) in HEPES buffered saline (pH 7.4) at 37°C with 20 wt% polymer concentration and 0.05 wt% I2959 initiator

间随聚合物溶液浓度变化的情况. 结果表明随着聚合物溶液浓度从 12.5 wt% 增加到 20 wt%, 凝胶时间从 7.6 min 减少到 0.8 min, 储存模量从 2.8 kPa 增大到 4.0 kPa. 这是由于随着聚合物浓度的增加, 单位体积内能用于光聚合的丙烯酸酯基团增加, 从而导致交联反应速率和交联密度增加. 储存模量增加是由交联密度增加所致.

I2959 是毒性较低的一种水溶性光引发剂, 尤其是当用量控制在 0.01 wt% ~ 0.05 wt% 时无明显细胞毒性, 因此被广泛地用于生物材料的制备. 研究表明增加 I2959 光引发剂的浓度可以减

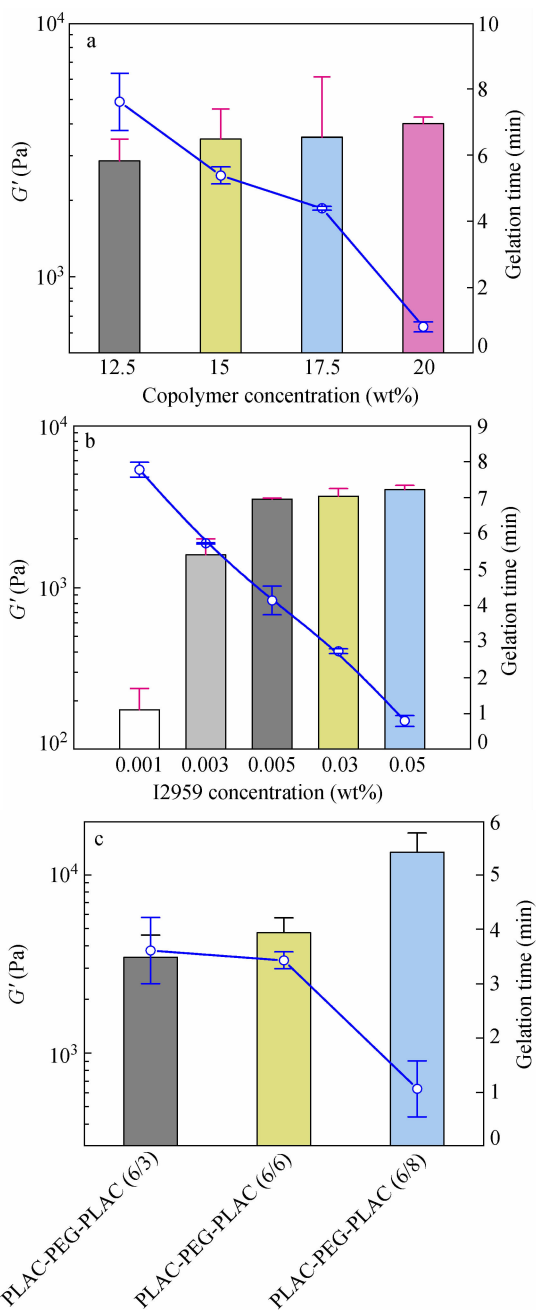


Fig. 8 Gelation time and storage modulus (G') of OLAC-PEG-OLAC copolymer hydrogels formed in HEPES buffered saline (pH = 7.4) at 37 °C under UV irradiation (365 nm, 0.76 mW/cm²): (a) as a function of polymer concentrations (I2959 initiator concentration was fixed at 0.05 wt%), (b) as a function of I2959 concentrations (OLAC-PEG-OLAC (6/5) at a polymer concentration of 20 wt% was used) and (c) as a function of AC units (I2959 initiator and polymer concentrations were fixed at 0.05 wt% and 20 wt% , respectively)

少凝胶时间和提高水凝胶的储存模量. 如图 8 (b), 随着光引发剂浓度从 0.005 wt% 增加到 0.05 wt% , OLAC-PEG-OLAC (6/5) 水凝胶的凝胶

时间从 7.7 min 减少到 0.8 min,储存模量从 0.17 kPa 增加到 4.0 kPa. 这主要是因为增加光引发剂量可以提高丙烯酸酯的聚合反应速率和程度,从而缩短凝胶时间,增加交联密度,提高水凝胶的力学强度. 值得注意的是 OLAC-PEG-OLAC (6/5) 可在极低 I2959 引发剂浓度(如 0.005 wt%)下快速形成水凝胶.

水凝胶的形成是基于 AC 单元上丙烯酸酯的光聚合交联,因此调节 AC 的含量可有效地控制水凝胶的凝胶时间和力学性能. 如图 8(c) 所示,含 3 个 AC 单元的聚合物溶液的凝胶时间为 3.6 min,而含 8 个 AC 单元的聚合物溶液在大约 1.0 min 时形成凝胶. 而且凝胶模量随着 AC 单元数的增加而增加,含 8 个 AC 单元的水凝胶的储存模量可达到 10 kPa 以上. 这是因为 AC 单元数的增加导致水凝胶的交联密度增加,从而提高了水凝胶的力学强度.

2.4 凝胶含量和凝胶的平衡含水量

研究了聚合物浓度和 LA 单元数对 OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的凝胶含量和平衡含水量的影响. 所用的水凝胶是在 0.05 wt% I2959 光引发剂浓度,紫外光辐射(365 nm, 60 mW/cm²)5 min 的条件下制备得到. 如图 9(a) 所示,随着 OLAC-PEG-OLAC (6/5) 聚合物溶液浓度从 15 wt% 增加到 25 wt%,凝胶含量由 87.3% 增加到 89.2%,而凝胶的平衡含水量从 940% 降低到 850%. 这可能是由于高浓度聚合物溶液含有更多的丙烯酸酯基团,有效增加了交联效率和交联密度. OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的凝胶含量在 82.8% 以上,说明光聚合交联反应比较完全.

在 AC 单元数一定的情况下,研究了 LA 单元数对凝胶含量和平衡含水量的影响. 如图 9(b) 所示,随着 LA 单元数从 0 增加到 6,OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的凝胶含量从 92% 降低到 87%,水凝胶的平衡含水量从 920% 增加到 1280%. 这主要是由于 LA 单元的引入致使在相同聚合物浓度下丙烯酸酯基团浓度有些微降低,从而导致交联密度有所降低.

2.5 凝胶的溶胀与降解行为

研究了 LA 和 AC 的含量对生物可降解 OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的溶胀和降解行为的影响. 如图 10(a) 所示,在含有相同量 AC 的条件下,水凝胶的降解速率随 LA 量的增加而明显加快. 含 LA 最多的 OLAC-PEG-OLAC (6/5) 水凝胶

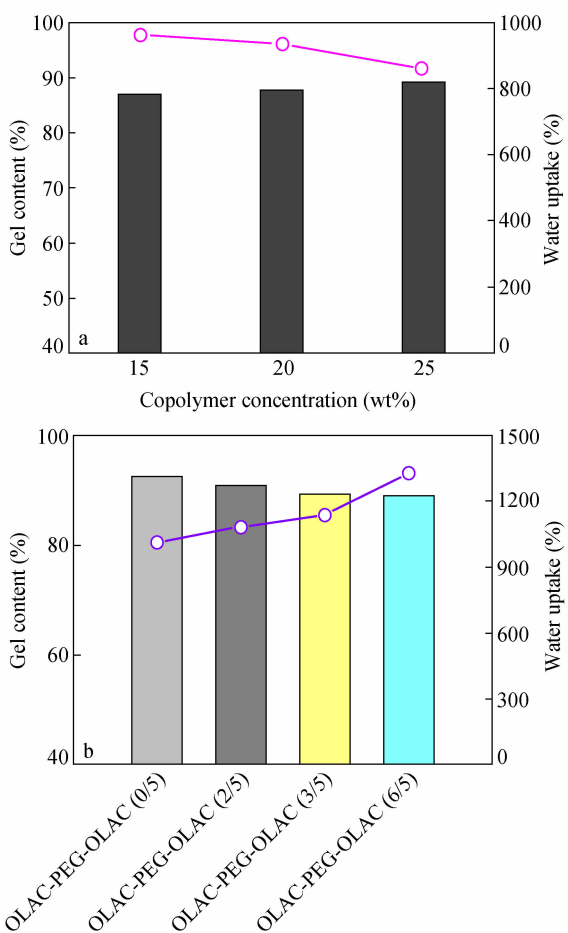


Fig. 9 Gel content and water uptake of OLAC-PEG-OLAC copolymer hydrogels formed in HEPES buffered saline (pH = 7.4) at 37 °C in the presence of 0.05 wt% I2959 initiator under UV irradiation (365 nm, 60 mW/cm²) for 5 min: (a) as a function of OLAC-PEG-OLAC (6/5) polymer concentrations and (b) as a function of LA units. Polymer concentration was fixed at 20 wt%.

在 45 天左右完全降解,OLAC-PEG-OLAC (2/5) 水凝胶在 90 天左右完全降解,而不含 LA 的 OAC-PEG-OAC 水凝胶在 90 天后没有显著降解. 图 10(b) 为含相同 LA 的 OLAC-PEG-OLAC (6/8) 和 OLAC-PEG-OLAC (6/5) 水凝胶的溶胀行为. 含 AC 较多的 OLAC-PEG-OLAC (6/8) 水凝胶完全降解约需 85 天,接近 OLAC-PEG-OLAC (6/5) 水凝胶降解时间的 2 倍. 与降解速率相对应,水凝胶的溶胀率也随着 LA 量的增加和 AC 量的降低而增加. 因此,OLAC-PEG-OLAC 水凝胶的溶胀和降解性能可通过调节 LA 和 AC 的含量得到很好控制.

2.6 细胞培养

初步研究了 MG63 成骨细胞在 OLAC-PEG-

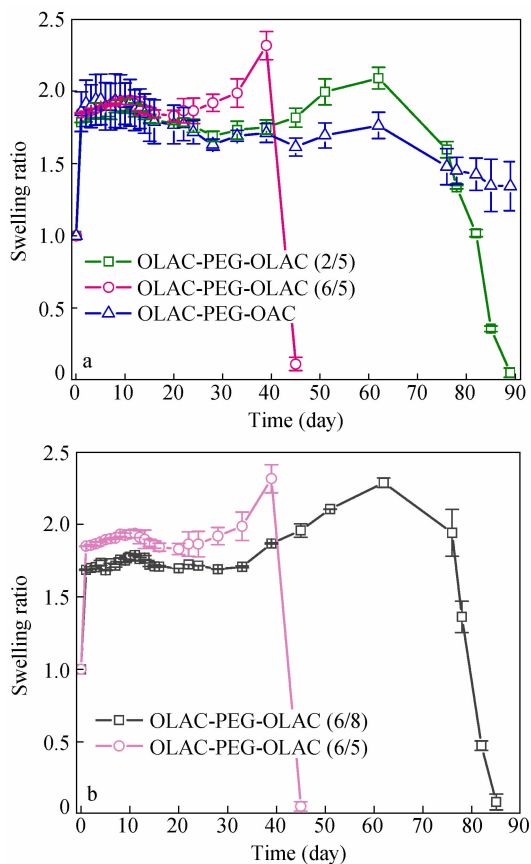


Fig. 10 Swelling/degradation profiles of photo-crosslinked OLAC-PEG-OLAC hydrogels formed in HEPES buffered saline (pH = 7.4) under UV irradiation (365 nm, 60 mW/cm²) at a polymer concentration of 25 wt% : (a) OLAC-PEG-OLAC (2/5), OLAC-PEG-OLAC (6/5), and OAC-PEG-OAC hydrogels and (b) OLAC-PEG-OLAC (6/8) and OLAC-PEG-OLAC (6/5) hydrogels

OLAC 水凝胶上培养 1 天和 6 天后的黏附和生长行为. 由图 11 可见, MG63 成骨细胞在培养 1 天后, 仅部分黏附在 OLAC-PEG-OLAC (6/6) 水凝胶上, 培养 6 天后细胞收缩成圆形(图 11(b)), 表明 OLAC-PEG-OLAC 水凝胶像其它水凝胶一样, 细胞黏附性能差, 不利于细胞生长. MG63 在含有 2 个 RGDC 短肽的 OLAC-PEG-OLAC (6/6) 水凝胶上培养 1 天后, 能很好地黏附, 6 天后细胞长满了整个培养板且维持了良好细胞形态(图 11(b)), 细胞黏附和生长情况与空白培养板上的成骨细胞相似(图 11(c)). 这说明通过迈克尔加成反应可将生物活性分子如 RGDC 短肽引入到 OLAC-PEG-OLAC 凝胶前体中, 从而方便制备得到具有生物活性的组织工程支架材料.

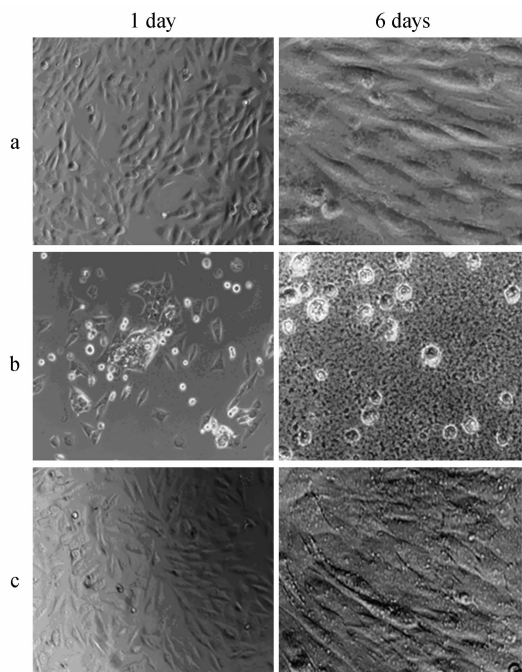


Fig. 11 Images of MG63 cells after 1day and 6 days culture on OLAC-PEG-OLAC (6/6) (a), OLAC-PEG-OLAC (6/6) with 2 RGDC (b) and tissue culture plastic (c)

3 结论

采用光交联方法原位快速制备了新型的生物可降解低聚(丙交酯-co-丙烯酸酯碳酸酯)-b-聚乙二醇-b-低聚(丙交酯-co-丙烯酸酯碳酸酯)(OLAC-PEG-OLAC)水凝胶. 该 OLAC-PEG-OLAC 的 HEPES 溶液可在模拟生理环境(37 ℃, pH = 7.4), 极低光引发剂浓度(如 0.005 wt% I2959)和极低紫外光强度(0.76 mW/cm², 360 nm)下, 快速原位形成水凝胶. 据我们所知, 这是首次报道如此低光强和低光引发剂浓度下的光交联水凝胶, 其有利于保持包裹药物、蛋白质和细胞等生物活性分子的活性, 同时降低水凝胶的细胞毒性. 而且水凝胶的凝胶时间、力学性能和降解性能可通过改变聚合物浓度、光引发剂浓度及聚合物中 LA 和 AC 的组成来得到精确控制. 此外, 含巯基的生物活性分子如 RGDC 短肽能方便定量地通过迈克尔加成反应引入到 OLAC-PEG-OLAC 聚合物中, 由此可方便制备得到可注射性的具生物活性生物可降解水凝胶. 初步细胞实验表明 RGDC 短肽功能化的 OLAC-PEG-OLAC 水凝胶可促进 MG63 成骨细胞的黏附和生长. 该快速光交联生物可降解水凝胶以其优异的凝胶、降解和生物功能化等性能可望为生物组织工程, 尤其是软骨组

织的修复,提供理想的三维活性多孔支架.

REFERENCES

1 Seliktar D. *Science*,2012,336(6085):1124 ~ 1128

2 Vermonden T,Censi R,Hennink W E. *Chem Rev*,2012,112(5):2853 ~ 2888

3 Ye Z,Zhou Y,Cai H,Tan W. *Adv Drug Deliv Rev*,2011,63(8):688 ~ 697

4 Deng C,Zhang P,Vulesevic B,Kuraitis D,Li F,Yang A F,Griffith M,Ruel M,Suuronen E J. *Tissue Eng Part A*,2010,16(10):3099 ~ 3109

5 Park M H,Joo M K,Choi B G,Jeong B. *Acc Chem Res*,2012,45(3):424 ~ 433

6 Van Tomme S R,Storm G,Hennink W E. *Int J Pharm*,2008,355(1-2):1 ~ 18

7 Yu L,Ding J. *Chem Soc Rev*,2008,37(8):1473 ~ 1481

8 Cong Truc H,Minh Khanh N, Lee D S. *Macromolecules*,2011,44(17):6629 ~ 6636

9 He C,Kim S W, Lee D S. *J Control Release*,2008,127(3):189 ~ 207

10 Nguyen K T,West J L. *Biomaterials*,2002,23(22):4307 ~ 4314

11 Jin R,Hiemstra C,Zhong Z,Feijen J. *Biomaterials*,2007,28(18):2791 ~ 2800

12 Jin R,Teixeira L S M,Dijkstra P J,Zhong Z,van Blitterswijk C A,Karperien M,Feijen J. *Tissue Eng Par A*,2010,16(8):2429 ~ 2440

13 Lutolf M P,Hubbell J A. *Biomacromolecules*,2003,4(3):713 ~ 722

14 Hiemstra C,van der Aa L J,Zhong Z,Dijkstra P J,Feijen J. *Macromolecules*,2007,40(4):1165 ~ 1173

15 Censi R,Fieten P J,di Martino P,Hennink W E,Vermonden T. *Macromolecules*,2010,43(13):5771 ~ 5778

16 Crescenzi V,Cornelio L,Di Meo C,Nardecchia S,Lamanna R. *Biomacromolecules*,2007,8(6):1844 ~ 1850

17 DeForest C A,Polizzotti B D,Anseth K S. *Nat Mater*,2009,8(8):659 ~ 664

18 DeForest C A,Anseth K S. *Nat Chem*,2011,3(12):925 ~ 931

19 Sawhney A S,Pathak C P,Hubbell J A. *Macromolecules*,1993,26(4):581 ~ 587

20 Fairbanks B D,Schwartz M P,Bowman C N,Anseth K S. *Biomaterials*,2009,30(35):6702 ~ 6707

21 Quick D J,Anseth K S. *J Control Release*,2004,96(2):341 ~ 351

22 Rice M A,Sanchez-Adams J,Anseth K S. *Biomacromolecules*,2006,7(6):1968 ~ 1975

23 Hillwest J L,Chowdhury S M,Slepian M J,Hubbell J A. *Proc Natl Acad Sci*,1994,91(13):5967 ~ 5971

24 Hiemstra C,Zhou W,Zhong Z,Wouters M,Feijen J. *J Am Chem Soc*,2007,129(32):9918 ~ 9926

25 Leipzig N D,Wylie R G,Kim H,Shoichet M S. *Biomaterials*,2011,32(1):57 ~ 64

26 Chung C,Beecham M,Mauck R L,Burdick J A. *Biomaterials*,2009,30(26):4287 ~ 4296

27 Nichol J W,Koshy S T,Bae H,Hwang C M,Yamanlar S,Khademhosseini A. *Biomaterials*,2010,31(21):5536 ~ 5544

28 Deng C,Li F,Hackett J M,Chaudhry S H,Toll F N,Toye B,Hodge W,Griffith M. *Acta Biomater*,2010,6(1):187 ~ 194

29 Liu W,Deng C,McLaughlin C R,Fagerholm P,Lagali N S,Heyne B,Scaiano J C,Watsky M A,Kato Y,Munger R,Shinozaki N,Li F,Griffith M. *Biomaterials*,2009,30(8):1551 ~ 1559

30 Censi R,Vermonden T,Deschout H,Braeckmans K,di Martino P,De Smed S C,van Nostrum C F,Hennink W E. *Biomacromolecules*,2010,11(8):2143 ~ 2151

31 Censi R,Schuurman W,Malda J,di Dato G,Burgisser P E,Dhert W J A,van Nostrum C F,di Martino P,Vermonden T,Hennink W E. *Adv Funct Mater*,2011,21(10):1833 ~ 1842

32 Feng J,Zhuo R X,Zhang X Z. *Prog Polym Sci*,2012,37(2):211 ~ 236

33 Yu Y,Deng C,Meng F,Shi Q,Feijen J,Zhong Z. *J Biomed Mater Res Part A*,2011,99A(2):316 ~ 326

34 Chen W,Yang H,Wang R,Cheng R,Meng F,Wei W,Zhong Z. *Macromolecules*,2010,43(1):201 ~ 207

35 Bonino C A,Samorezov J E,Jeon O,Alsberg E,Khan S A. *Soft Matter*,2011,7(24):11510 ~ 11517

36 Chen R T,Marchesan S,Evans R A,Styan K E,Such G K,Postma A,McLean K M,Muir B W,Caruso F. *Biomacromolecules*,2012,13(3):889 ~ 895

DESIGN AND SYNTHESIS OF RAPIDLY PHOTO-CROSSLINKABLE BIOACTIVE BIODEGRADABLE HYDROGELS

Chao Deng, Rong Wang, Wei Chen, Feng-hua Meng, Ru Cheng, Zhi-yuan Zhong

(Biomedical Polymers Laboratory and Jiangsu Key Laboratory of Advanced Functional Polymer Design and Application,
College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials, Soochow University, Suzhou 215123)

Abstract A series of water-soluble biodegradable oligo (lactide-*co*-acryloyl carbonate)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-oligo(lactide-*co*-acryloyl carbonate) (OLAC-PEG-OLAC) triblock copolymers were synthesized by ring-opening copolymerization of lactide (LA) and acryloyl cyclic carbonate (AC) and applied for *in situ* formation of novel bioactive biodegradable hydrogels *via* photo-crosslinking. The rheology measurements showed that gelation times (0.8 ~ 8 min) and storage moduli (170 ~ 10000 Pa) of hydrogels could be controlled by AC content, polymer concentration and photo-initiator concentration. The results of degradation tests displayed that degradation rates of these hydrogels could be tailored by AC and LA contents. Notably, the multiple acryloyl functional groups in OLAC-PEG-OLAC copolymers allowed direct conjugation of thiol-containing biomolecules like RGD peptides *via* Michael addition reaction prior to gelation, which provides a facile access to injectable bioactive biodegradable hydrogels. The preliminary cell experiments demonstrated that RGD peptide modified hydrogels could well support adhesion and growth of MG63 osteoblast cells. These rapidly photo-crosslinkable biodegradable hydrogels with controlled mechanical properties, tailored biodegradation rates, and versatile bio-functionalization form an excellent basis for the development of advanced bioactive tissue engineering scaffolds.

Keywords Hydrogel, Photo-crosslinking, Biodegradable, Bioactive, RGD peptide, Tissue engineering