

L-丙交酯- β -苹果酸共聚物的体外降解及细胞亲和性研究*

何 斌 万玉青 贝建中 王身国**

(高分子化学与物理国家重点实验室 中国科学院化学研究所 北京 100080)

摘 要 研究了具有功能侧基的新型生物降解高分子——[聚(L-丙交酯-co- β -苹果酸)](PLMA)在 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液中的降解和鼠的 3T3 成纤维细胞在共聚物膜表面的贴附及生长.研究了不同组成的共聚物在降解过程中的失重、表面形貌、组成及分子量变化,发现 PLMA 为本体降解,共聚物中苹果酸含量的提高可以加速降解,降解过程中聚苹果酸(PMA)链段附近的酯键先水解断裂.鼠的 3T3 成纤维细胞在聚 L-丙交酯(PLLA)均聚物和苹果酸含量为 4 mol%, 8 mol% 和 13 mol% 的共聚物膜上培养 5 h,细胞贴附率分别为 43%、71%、80% 和 43%. 3T3 成纤维细胞在苹果酸含量为 4 mol% 和 8 mol% 的共聚物膜上的生长情况好于在 PLLA 均聚物和苹果酸含量为 13 mol% 含量的共聚物膜上的生长.

关键词 聚(L-丙交酯-co- β -苹果酸), 生物降解, 细胞贴附

组织工程中常用的降解性高分子聚乳酸(PLA)由于其疏水性,导致细胞亲和性不好,使其在作为组织工程细胞支架材料的应用方面受到限制,因此寻找亲水性好的功能化生物降解性细胞支架材料成为组织工程研究的一个重要课题.

在生物降解性聚酯材料中引入氨基、羧基、羟基等亲水性基团不仅有利于提高和调节材料的亲水性,而且由于氨基、羧基、羟基和磺酸基等基团能够被细胞膜表面的配体识别,可以提供细胞的结合位点,因而可利用氨基、羧基、羟基等基团的化学反应将多肽、蛋白质、氨基酸等细胞亲和性好的生物分子固定到材料上,能够进一步提高材料的细胞亲和性.

文献报道的功能化的生物降解高分子有以下 3 种,以 α -苹果酸为功能侧基的人工合成生物降解性聚酯^[1]; α -氨基酸与 α -羟基酸的共聚物^[2-4]; 以及碳酸酯、呋喃糖与 α -羟基酸的共聚物^[5-10]. 聚苹果酸是以羧基为侧基的水溶性生物降解高分子,其降解产物苹果酸为人体三羧酸循环的中间产物,对人体无毒性.根据主链上形成酯键的羧基位置的不同,可以得到聚(α -苹果酸)和聚(β -苹果酸)两种不同的生物降解性高分子.由于合成路线长、收率低,分子量不高,苹果酸均聚物仅能作为药物载体使用^[11,12].

L-丙交酯- β -苹果酸共聚物(PLMA)是本实验室合成的一类新型功能化生物降解高分子^[13].它

带有侧基羧基,既能作为细胞识别位点,又能提高材料的亲水性,所以有望作为新的组织工程细胞支架材料.细胞支架上细胞的生长速率必须与支架的降解速率匹配,才能在细胞支架失去强度的同时,长成具有一定强度的组织或器官.本论文研究了 PLMA 共聚物在 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液中的降解行为,并通过研究鼠的 3T3 成纤维细胞在 PLMA 共聚物膜上的贴附对 PLMA 共聚物的细胞亲和性进行评价.

1 实验部分

1.1 聚合物与膜的制备

按文献[13]报道的方法将 L-丙交酯(L-LA)与苹果酸内酯- β -苄酯(MA)在异辛酸亚锡的催化下,130℃真空开环聚合 48 h.将聚合物在乙醇中沉淀,真空干燥后,在钨/碳黑催化下脱除聚合物上的保护苄基,得到 PLMA 共聚物.

细胞贴附用共聚物致密膜的制备是将 PLLA 均聚物和苹果酸含量为 4% (PLMA96/4), 8% (PLMA92/8) 和 13% (PLMA87/13) 3 个组成的共聚物溶于二氧六环,配成浓度为 8 wt% 的溶液,浇铸到玻璃板上,待溶剂挥发后,于 45℃ 真空干燥 3 天,做细胞贴附实验.

1.2 降解实验及样品的表征

共聚物降解用磷酸缓冲液的配制是称取 1.68 g 氢氧化钠和 6.8 g 磷酸二氢钾溶于 1000 mL

* 2003-08-13 收稿, 2003-09-18 修稿; ** 通讯联系人

容量瓶中,用三蒸水配成 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液.

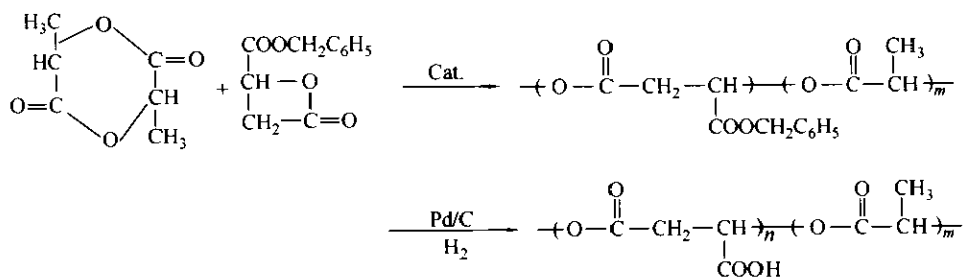
降解样品的制备是将约 0.3 克组成不同的 PLMA 共聚物放入聚四氟乙烯的模具中,在热板上加热到 170℃,压成厚度为 2 毫米的圆片,称取圆片重量后放入 10 mL 离心管中,加入 8 mL pH 7.4 的磷酸缓冲溶液.将封闭的离心管放入 37℃ 的恒温水浴摇床中进行降解,每周换一次磷酸缓冲溶液.到一定的降解时间后,取出降解试样,经真空干燥后再进行性能测试.

核磁共振(NMR),Bruker DMX-300 核磁共振仪.¹H-NMR 的测试样品以氘代二甲亚砜(DMSO-*d*₆)为溶剂,以 0.5% 四甲基硅烷为内标,在 Bruker DMX-300 核磁共振仪扫描 30 次,¹H-NMR 的工作频率为 300.130 MHz.

凝胶渗透色谱(GPC),WATERS 公司 Waters 2410 凝胶渗透色谱仪,色谱柱为 Shodex KF-800,数据处理软件为 Waters Millennium32.重均分子量(M_w)、数均分子量(M_n)和分子量分散系数(M_w/M_n)以单分散的聚苯乙烯的分子量或分子量分散系数为参照.对于不同的高分子,只能作为定性的工具考察分子量峰的形状和尺寸分布.GPC 的测试温度为 35℃,淋洗液为三氯甲烷,流速为 1.0 mL/min.

扫描电镜(SEM)测试,对降解样品的表面喷金,用 Hitachi S-530 在 15 kV 电压下观察样品表面.

DSC 测试,在 Mettler Toledo 822 Star⁺ System 上完成,升温速度为 10 K/min.



Scheme 1 The synthetic route of poly(*L*-lactide-*co*- β -malic acid)

1.3.6 CCD 显微成像观察试样的制备 将鼠的 3T3 成纤维细胞和软骨细胞在致密膜上培养一段时间,然后采用 3% 的戊二醛溶液在 4℃ 固定 24 h,用 PBS 将戊二醛洗净后,依次采用 50%, 70%, 95% 和 100% 的乙醇脱水(2 × 10 min).最后将样

1.3 细胞培养实验

1.3.1 培养基的配制 将 DMEM 干粉倒入 600 mL 三蒸水中溶解后,依次加入 *L*-谷氨酰胺 3 g、HEPES 5 g、碳酸氢钠 3.7 g、青霉素钠和硫酸链霉素各 10⁵ 单位,以及胎牛血清 100 mL,充分搅拌溶解后,再用三蒸水稀释至 1000 mL.上述培养基用不锈钢滤器过滤除菌后于 0~4℃ 下保存待用.

1.3.2 磷酸盐缓冲溶液(PBS)的配制 依次将 8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、2.90 g 十二水磷酸二氢钠和 0.2 g 磷酸二氢钾充分溶于 800 mL 三蒸水中,再稀释至 1000 mL.用高压灭菌锅于 0.1~0.5 MPa 下灭菌 20 min,自然冷却后取出,置于 0~4℃ 下保存待用.

1.3.3 胰蛋白酶消化液的配制 将 0.25 g 胰蛋白酶溶于 100 mL 的 PBS 中,过滤除菌后,于 0~4℃ 下保存待用.

1.3.4 细胞扩增 将细胞于 50 mL 的培养瓶中在 5% CO₂、37℃ 下培养 2~3 天,待细胞增殖至开始融合后,用 1 mL 0.25% 的胰酶液消化 1~2 min,然后加入 3 mL 培养基停止消化.将细胞吹打散成细胞悬液,用计数板计数后备用.

1.3.5 细胞贴附实验 将聚合物致密膜用打孔器切割成直径为 15 mm 的小圆片,以空气面朝上固定在 24 孔组织培养板的孔底部.经紫外光照 0.5 h 灭菌后,向每孔中加入 1 mL 细胞悬液(1 × 10⁵ ~ 2 × 10⁵ cells/mL),于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 2 h 后,用微量移液器去除培养液,并用 PBS 洗去未贴附细胞,最后加入胰酶将聚合物膜上的细胞消化下来计数,计算细胞贴附率.

品冷冻干燥、用 CCD 显微成像系统进行观察.

2 结果与讨论

2.1 共聚物的合成

按照文献[13]报道的方法合成共聚物,合成

路线如反应式所示.合成的脱保护前的共聚物的分子量及热性能如表 1 所示.

Table 1 The molecular weight and thermal property of poly(<i>L</i> -lactide- <i>co</i> -β-benzyl malate)						
MA content			Polymer			
Monomer feed	Copolymer ^a	Yield	<i>M</i> _n	<i>M</i> _w	<i>M</i> _w / <i>M</i> _n	Δ <i>H</i> _m ^b
0	0	97	221400	398600	1.8	-17.3
4	4	94	80010	179800	2.2	-10.5
6	6	92	66100	13200	2.0	-7.4
8	8	92	40700	79900	1.9	-2.6
13	14	91	43900	73400	1.7	0
19	20	85	32200	51500	1.6	0
26	27	80	13400	18100	1.4	0

^a From ¹H-NMR measurement; ^b From DSC measurement

由表 1 可以看到,共聚物的分子量和结晶熔融热(Δ*H*_m)随着苹果酸内酯-β-苄酯的提高而减小,当其含量高于 14% 时,DSC 谱图上结晶峰消失,共聚物为非晶共聚物.

2.2 聚(*L*-丙交酯-*co*-β-苹果酸)降解

将苹果酸含量为 4 mol % (PLMA96/4)、6 mol % (PLMA94/6)、19 mol % (PLMA81/19) 和 27 mol % (PLMA73/27) 的共聚物膜在 pH 7.4 的磷酸缓冲液中的降解行为进行了研究.

图 1 为降解样品在降解过程中的失重变化曲线. PLMA81/19 和 PLMA73/27 在降解 1 周内的失重都很大,失重率分别达到了 26.8% 和 34.3%; PLMA96/4 和 PLMA94/6 降解 1 周内的失重都较小,失重率分别为 1.8% 和 2.1%. PLMA81/19 和

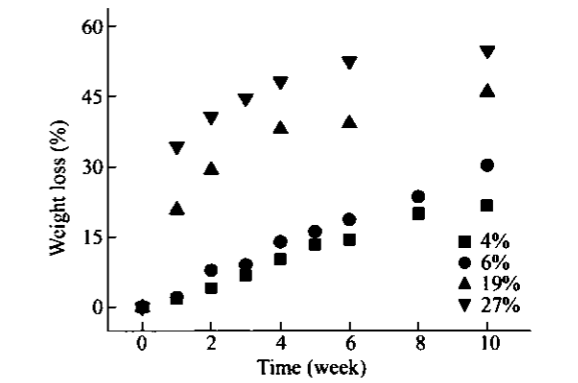
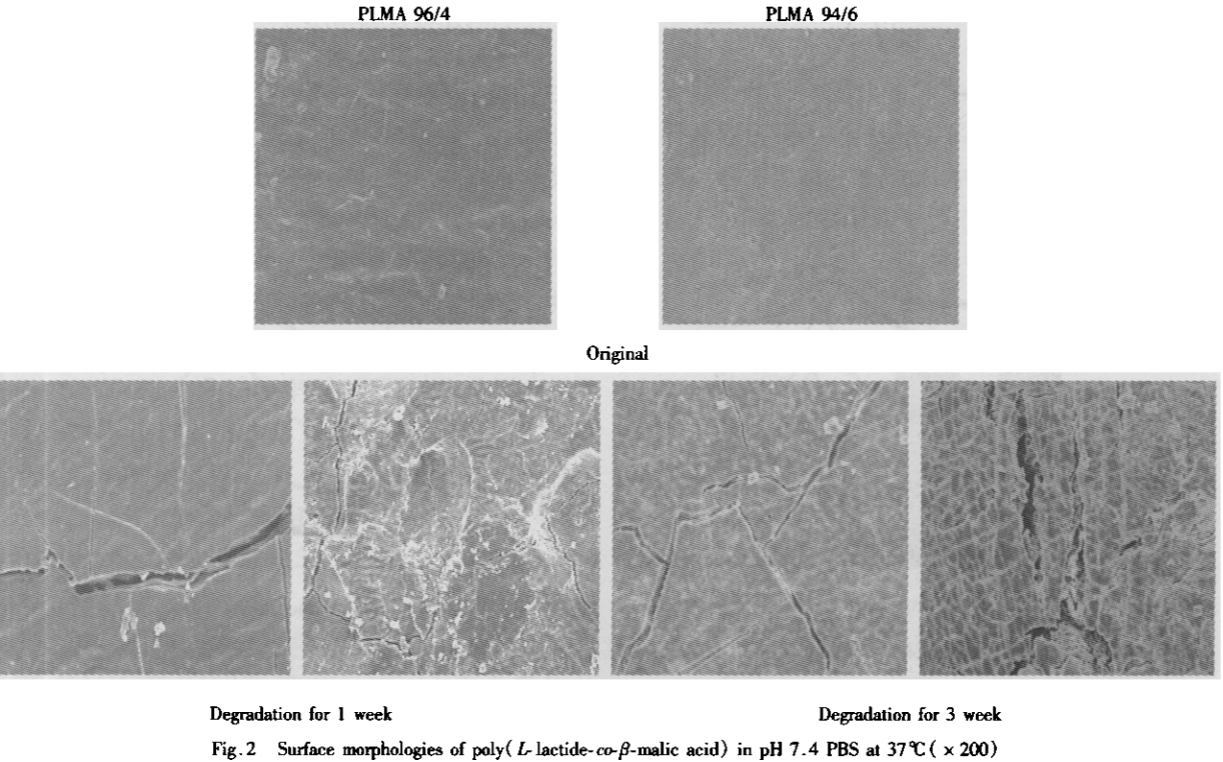


Fig. 1 Weight loss of poly (*L*-lactide-*co*-β-malic acid) during degradation in pH 7.4 PBS at 37°C

PLMA73/27 在降解四周后,失重率趋于平稳,分别稳定在 45% 和 58% 附近,而 PLMA96/4 和 PLMA94/6 的降解失重率呈线性增加.导致 4 种组成的共聚物的降解失重差别的原因因为 PLMA96/4 和 PLMA94/6 中 PLLA 的含量高,材料中 PLLA 的结晶阻碍水分子在样品中的渗透^[14], PLMA96/4 和 PLMA94/6 在第一周的失重少;而 PLMA81/19 和 PLMA73/27 为无定型态,水分子渗透到材料内部,使降解速度加快,共聚物的无定型区降解后,发生了诱导结晶,使共聚物的降解速度减缓,在降解的后阶段失重曲线随着降解时间的增加变得平缓.

图 2 是 PLMA96/4 和 PLMA94/6 降解样品表面形貌的扫描电镜图.可以看到,降解前的共聚物样品表面光滑,无裂缝,降解一周后,两种组成共聚

物样品的表面均出现裂缝,裂缝的数量和大小随着降解时间的增加而变大,降解三周后,样品的裂缝变多、变大.这是典型的本体降解的特征.通常由表面降解机理导致的降解行为,仅使材料表面受到侵蚀.因此降解过程中,能保持材料的整体形状,而本体降解则材料内部、表面同时发生降解,产生裂缝;不能保持形状完整.同时将表面放大后可以看见降解样品的表面越来越粗糙,这是因为样品表面降解后,使表面的粗糙度增加. PLMA81/19 和 PLMA73/27 的降解样品在第一周内就失重很多,材料已无足够的强度维持其形状,样品都变成粉末状.

图 3 为 PLMA81/19 在降解过程中组成变化的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱,图中打 X 的峰为溶剂峰.降解一周后,所有苹果酸(PMA)链段上的质子峰均消失(峰 3,4),而 PLLA 链段的质子峰依然存在,说明苹果酸已从主链上断裂,溶于水中,也证明与苹果酸连接酯键较 PLLA 内部的酯键更易水解.

图 4 为共聚物的分子量随降解时间变化的 GPC 曲线. PLMA96/4、PLMA94/6、PLMA81/19 和 PLMA73/27 的 GPC 降解曲线均有双峰出现,出现

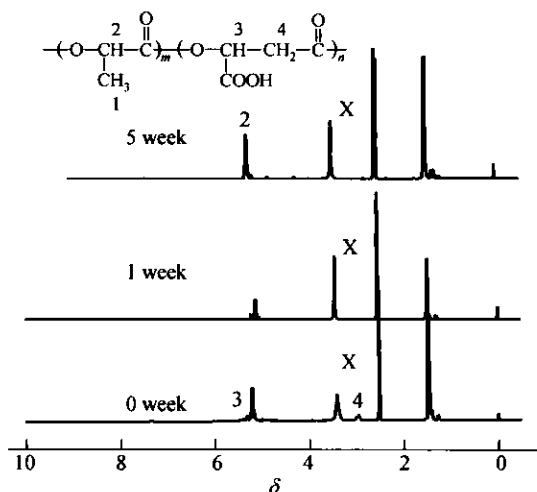


Fig. 3 The composition variation of poly(*L*-lactide-co- β -malic acid) (81/19) during degradation

双峰的时间分别为 10 周、6 周、3 周和 1 周,苹果酸含量越高的共聚物,越早出现双峰.这是由于共聚物降解过程中,苹果酸链段优先降解,溶于水中,剩下 PLLA 链段.残存的 PLLA 是结晶性高分子,它们的分子量不同,形态不同,结晶度不同,因而降解速度在 GPC 图上出现双峰. PLMA81/19 和

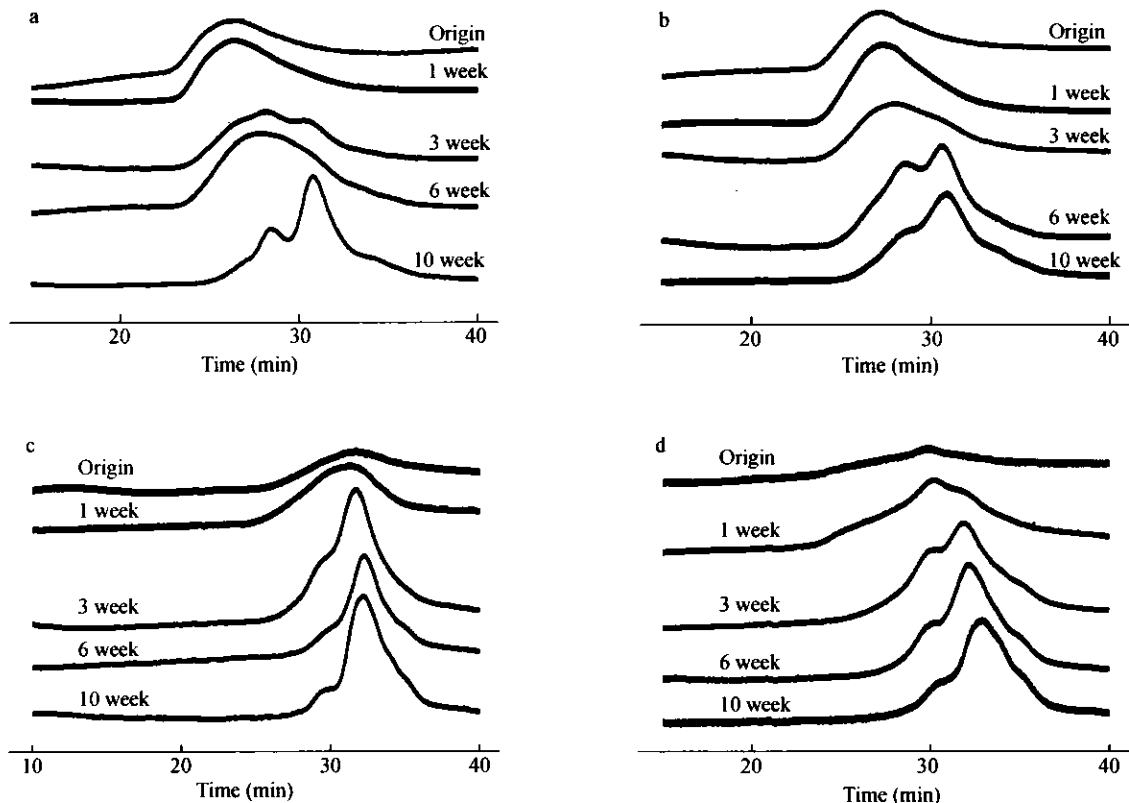


Fig. 4 Molecular weight variation of poly(*L*-lactide-co- β -malic acid) during degradation in pH 7.4 PBS at 37°C, the malic acid content in copolymer was (a) 4%; (b) 6%; (c) 19%; (d) 27%

PLMA73/27 降解前的样品在 GPC 曲线上的信号弱是由于 PLMA81/19 和 PLMA73/27 上有大量亲水性苹果酸单元,导致共聚物在三氯甲烷中溶解得不好,因此信号较弱;随着共聚物的降解,苹果酸单元从主链上脱去,使共聚物在三氯甲烷中的溶解性增加.因此,降解两周后的样品在 GPC 曲线上有很强的信号,这同时也证实了前面¹ H-NMR 的结论,共聚物中,亲水性的 PMA 链段先从主链上掉下来, PMA 链段附近的酯键在水解过程中先断裂.

2.3 聚(*L*-丙交酯-*co*- β -苹果酸)的细胞亲和性

细胞在材料表面的生长是通过贴附开始的,

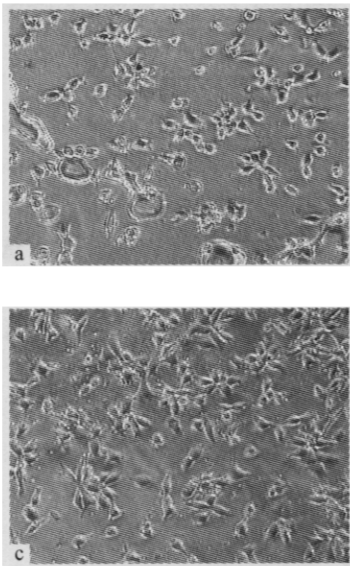


Fig. 5 Cell morphologies of mice 3T3 fibroblast on PLLA and poly(*L*-lactide-*co*- β -malic acid) copolymer membranes cultivated for 5 ($\times 150$)
a) PLLA; b) PLMA96/4; c) PLMA92/8; d) PLMA87/13

PLMA 共聚物膜上培养 5 h 的细胞贴附率. 3T3 成纤维细胞在 PLLA 均聚物、PLMA96/4、PLMA92/8 和 PLMA87/13 共聚物膜上培养 5 h 的贴附率分别为 43%、71%、80% 和 43%. 细胞在 PLMA96/4 和 PLMA92/8 共聚物膜上的贴附率远远高于在 PLLA 均聚物和 PLMA87/13 共聚物膜上的贴附率. 共聚物中苹果酸含量提高到 13%, 细胞识别位点的数量增加了, 细胞的贴附率反而下降, 这是因为细胞的贴附不仅与材料表面的细胞识别位点有关, 还与材料表面的亲水性有关. 当材料表面的水接触角为 50°~70°时^[15], 细胞在材料表面贴附良好, 而 PLMA87/13 表面过高的亲水性导致了细胞贴附率的下降.

图 7 为鼠的 3T3 成纤维细胞在 PLLA 均聚物、PLMA96/4、PLMA92/8 和 PLMA87/13 共聚物膜表面分别培养 24 h 的细胞生长情况. 细胞在 PLLA

细胞贴附的形态和贴附率可以反映材料的细胞亲和性好坏. 细胞亲和性好的材料, 成纤维细胞在材料表面成梭形, 贴附率高; 细胞亲和性差的材料, 成纤维细胞在材料表面成球形, 贴附率低. 图 5 为鼠的 3T3 成纤维细胞分别在 PLLA 均聚物和 PLMA96/4、PLMA92/8 和 PLMA87/13 共聚物膜表面培养 5 h 的细胞贴附形态. 由图中可以看到, PLLA 均聚物和 PLMA 共聚物膜表面均有大量的细胞. PLLA 均聚物膜和 PLMA87/13 共聚物膜表面的细胞多为球形, PLMA96/4 和 PLMA92/8 共聚物膜表面的细胞多为梭形.

图 6 为鼠 3T3 成纤维细胞在 PLLA 均聚物和

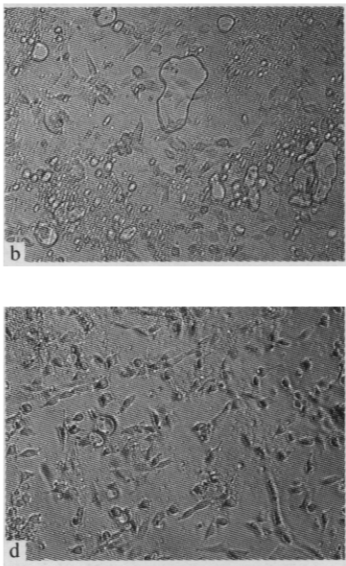


Fig. 6 The cell attachment of mice 3T3 fibroblast on PLLA and poly(*L*-lactide- *co*- β -malic acid) copolymer membranes cultivated for 5 h

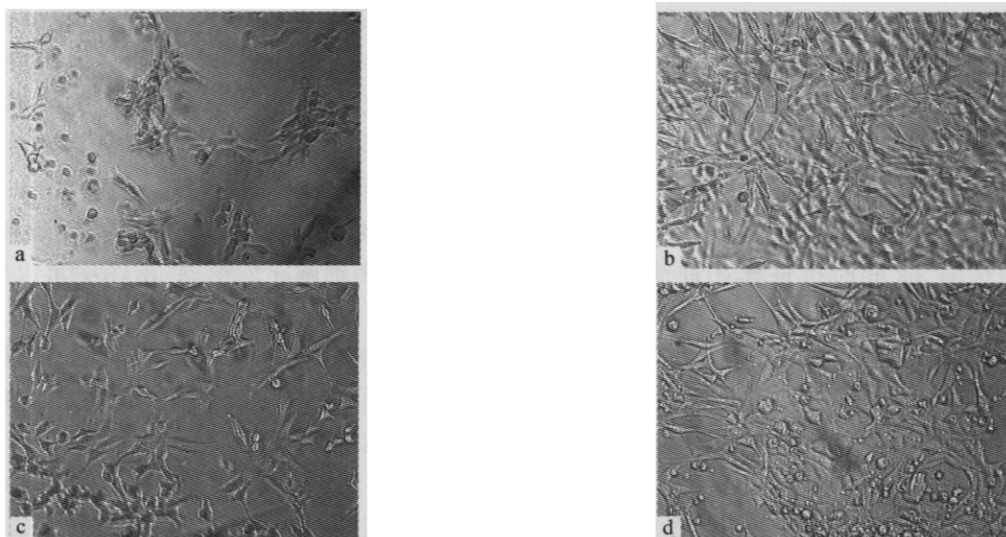


Fig. 7 Cell morphology of mice 3T3 fibroblast on PLLA and poly(*L*-lactide- α - β -malic acid) copolymer membranes for 24 h ($\times 150$)
a) PLLA; b) PLMA96/4; c) PLMA92/8; d) PLMA87/13

泌了大量的细胞外基质。

对比鼠 3T3 成纤维细胞在各种材料表面培养 5 h 和 24 h 的形态可以知道,细胞在 PLMA96/4 和 PLMA92/8 共聚物膜表面的贴附形态比在 PLLA 均聚物和 PLMA87/13 共聚物膜上的贴附形态好,说明 PLMA96/4 和 PLMA92/8 的细胞亲和性比 PLLA

均聚物和 PLMA87/13 的细胞亲和性好。综合上述共聚物的降解及细胞亲和性的研究结果,可以认为作为组织工程用的生物材料,应选择共聚物 PLMA96/4 和 PLMA92/8,它们具有合适的降解速度,能较长时间保持其力学强度,并且具有优良的细胞亲和性。

REFERENCES

- Kimura Y, Shiratani K, Yamane H, Kitao T. *Macromolecules*, 1988, 21: 3338 ~ 3340
- Ouchi T, Nozaki T, Okamoto Y, Shiratani M, Ohya Y. *Macromol Chem Phys*, 1996, 197: 1823 ~ 1833
- Ouchi T, Nozaki T, Ishikawa A, Fujimoto I, Ohya Y. *J Polym Sci Part A Polym Chem Ed*, 1997, 35: 377 ~ 383
- Wang D, Feng X. *Macromolecules*, 1997, 30: 5688 ~ 5692
- Chen X H, Gross A R. *Macromolecules*, 1999, 32: 308 ~ 314
- Kumar R, Gao W, Gross A R. *Macromolecules*, 2002, 35: 6835 ~ 6844
- Chen X, McCarthy S P, Gross R A. *Macromolecules*, 1997, 30: 3470 ~ 3476
- Barrera D A, Zylstre E, Lansburg P T, Langer R. *Macromolecules*, 1995, 28: 425 ~ 432
- Shen Y, Chen X, Gross R A. *Macromolecules*, 1999, 32: 3891 ~ 3897
- Shen Y, Chen X, Gross R A. *Macromolecules*, 1999, 32: 2799 ~ 2802
- Vert M, Lenz R W. *ACS Polymer Preprint*, 1979, 20(1): 608 ~ 611
- Braud C, Bunel C, Vert M. *Polym Bul*, 1985, 13: 293 ~ 299
- He B, Bei J Z, Wang S G. *Polymer*, 2003, 44: 989 ~ 995
- He B, Bei J Z, Wang S G. *Polymer for Advanced Technology*, 2003, 14: 645 ~ 652
- Horbett T, Schway M, Ratner B. *J Colloid Interface Sci*, 1985, 104: 28 ~ 39

DEGRADATION *in vitro* AND CELL AFFINITY OF POLY(*L*-LACTIDE-*co*- β -MALIC ACID)

HE Bin, WAN Yuqing, BEI Jianzhong, WANG Shenguo

(State Key Laboratory of Polymer Physics & Chemistry, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The degradation behavior of a novel functionalized biodegradable poly(*L*-lactide-*co*- β -malic acid) in pH 7.4 PBS was studied, and mice 3T3 fibroblasts were cultivated on copolymer films to evaluate the cell affinity of copolymers. The variation of weight loss, surface morphology, composition and molecular weight of copolymers were investigated. The results showed that the degradation of poly(*L*-lactide-*co*- β -malic acid) was bulk degradation, the malic acid could accelerate the degradation rate, the ester bonds near PMA segments hydrolyzed prior to the ester bonds in PLLA. The cell attachment rate of 3T3 fibroblasts on the surface of PLLA, PLMA96/4, PLMA92/8 and PLMA87/13 was 43%, 71%, 80% and 43%, respectively when cultivated for 5 h, the morphology of 3T3 fibroblast was better on the surface of PLMA96/4 and PLMA92/8 than that on the surface of PLLA and PLMA87/13 when cultivated for 24 h.

Key words Poly(*L*-lactide-*co*- β -malic acid), Biodegradation, Cell attachment