

功能化聚乳酸微球改性聚乳酸膜片表面及其细胞相容性*

陈达 计剑** 沈家骢

(浙江大学高分子科学与工程系 杭州 310027)

摘要 以两亲三嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO 及其氨基酸、多肽 RGD 衍生物作为微球制备过程中的表面稳定剂,低分子量的聚乳酸作为成核材料,采用 o/w 乳液溶剂挥发法制备得到表面含不同氨基酸的聚乳酸微球,荧光标记手段证明了氨基酸存在于微球的表面;利用溶胀嵌入固定法将微球固定到具有生物惰性聚乳酸膜片表面,制备得到了具有良好稳定性的微球改性聚乳酸生物惰性膜片;成骨细胞相容性测试表明,氨基酸尤其是多肽 RGD 在生物惰性聚乳酸表面的引入能较大程度地提高聚乳酸生物惰性表面的细胞相容性,能较好地诱导细胞行为如细胞粘附、增殖等过程的发生,为实现对细胞行为的诱导控制提供了一种新途径。

关键词 表面稳定剂, 功能化聚乳酸微球, 微球改性聚乳酸生物惰性膜片, 细胞相容性

诱导细胞行为的可控性对生物组织工程材料来说具有十分重要的意义,而聚乳酸(PLA)作为广泛应用的可生物降解组织工程材料,具有良好的生物相容性,无毒性以及优良的物理机械性能,但其表面缺乏具反应性的官能团,无法直接接枝生物活性因子,同时其表面易发生非特异性蛋白吸附作用,这些都不利于实现聚乳酸表面对细胞行为的诱导控制。在聚乳酸表面引入聚氧乙烯(PEO)链段,阻抗蛋白质的非特异性吸附^[1,2],形成生物惰性表面,然后再通过表面改性手段在生物惰性表面引入生物活性因子(如细胞外基质蛋白或其片段)诱导细胞的粘附、增殖^[3-5],是改善聚乳酸细胞相容性行为的有效途径之一。本文从一种新的设计手段出发,利用微球的核-壳结构特征,以两亲三嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO(Pluronic F68)及其氨基酸(或多肽 RGD)衍生物分别为微球表面稳定剂,低分子量聚乳酸(PLA)为微球成核材料,采用 o/w 乳液溶剂挥发法制备得到核-壳结构的聚乳酸微球,在微球表面引入细胞外基质蛋白片段(氨基酸或多肽 RGD);然后采用表面截留原理的溶胀嵌入固定法将这些微球结合到聚乳酸和两亲三嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO 的共混表面,制备得到功能化微球改性聚乳酸生物惰性表面,并采用成骨细胞培养,研究了该微球改性聚乳酸表面对诱导细胞粘附、增殖等行为的影响。

1 实验部分

1.1 试剂与原料

用作微球成核材料的低分子量聚乳酸 P(D, L-LA)(简称为 PLA)($M_n = 8000$)和用作聚乳酸基材的高分子量聚乳酸 P(D, L-LA)(简称为 PLA)($M_n = 200000$)均参照类似文献[6]方法制备;两亲三嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO(进口试剂 Pluronic F68,购自 BASF Cor., $M_n = 8400$),直接使用,用作制备生物惰性聚乳酸膜片的共混成分和微球制备过程中的表面稳定剂;末端桥联氨基酸(包括精氨酸、天冬氨酸、赖氨酸)和多肽 RGD 的两亲三嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO 衍生物参照文献[5]制备,用作微球制备过程中的表面稳定剂。

1.2 微球的制备与表征

功能化微球均采用乳液溶剂挥发法制备而成。将 5 mL 的油相(12 mg/mL 聚乳酸二氯甲烷溶液)在中速磁力搅拌条件下滴加入 50 mL 的水相(分别为一定浓度的两亲三嵌段共聚物 PEO-PPO-PEO 或其氨基酸(或多肽 RGD)衍生物的水溶液中,滴加完毕继续磁力搅拌约 0.5 h 左右,形成 o/w 乳液,然后再继续低速磁力搅拌 6 h 以上,挥发掉有机溶剂,微球固化后离心收集,倒去上清液,用去离子水清洗,洗去游离的表面活性剂,清洗完毕再离心,该过程反复 3 遍以上,最后配制成一定浓度的微球水悬浮液。为了便于描述,我们将上述采用五种不同的表面稳定剂 PEO-PPO-PEO、PEO-

* 2003-09-23 收稿,2003-11-26 修稿;国家重点基础研究发展规划项目(项目编号 G1999054305);** 通讯联系人

PPO-PEO 精氨酸衍生物、PEO-PPO-PEO 天冬氨酸衍生物、PEO-PPO-PEO 赖氨酸衍生物以及 PEO-PPO-PEO 多肽 RGD 衍生物制备得到的聚乳酸微球简称为 plu 微球、arg-plu 微球、asp-plu 微球、lys-plu 微球以及 RGD-plu 微球。

微球的粒径分布用粒径分布测定仪 (Mastersizer 2000) 测定, 采用荧光标记技术 (RITC) 标记其中一种表面稳定剂 PEO-PPO-PEO 赖氨酸衍生物, 并用激光共聚焦显微镜 (CLSM, BIO-RAD2000) 来观察 PEO-PPO-PEO 赖氨酸衍生物在微球中的分布。

1.3 聚乳酸微球改性聚乳酸表面的制备与表征

将高分子量聚乳酸和两亲共聚物 PEO-PPO-PEO 按质量比 9:1 的比例共混后溶于混合溶剂 (丙酮:二氯甲烷 = 1:1) 中, 浓度约为 40 mg/mL, 溶解完全后将溶液倾入到成膜器皿中, 室温放置 2 h 左右, 形成尚未干透、局部溶胀的聚乳酸膜片, 然后在膜片上加入一定浓度的微球水悬浮液, 自然放置一段时间后, 用去离子水清洗膜片, 将未结合牢固的微球洗脱, 真空烘箱中室温干燥, 再将干燥后的膜片用超声波清洗器清洗, 进一步洗脱未结合牢固的微球, 然后在真空烘箱中室温干燥 48 h 以上, 最后得到的膜片于干燥器中保存备用。

利用 CLSM 系统配备的图象处理软件 Laserpix

统计得到微球在改性膜片上的分布密度, 分析其分布密度变化情况来反映微球改性聚乳酸膜片的稳定性。同时采用扫描电镜 (SEM, JSM-5510LV) 对微球改性聚乳酸膜片的形貌进行了表征。

1.4 聚乳酸微球改性聚乳酸表面细胞相容性测试

成骨细胞的培养采用细胞系鼠成骨细胞 MC3T3 进行培养, 将制备得到的不同功能化表面的聚乳酸微球改性聚乳酸膜片灭菌消毒处理后, 置于 96 孔聚苯乙烯培养板 (TCPS) 内, 种植成骨细胞进行培养, 细胞种植密度约为 5×10^4 cell/mL。参照文献 [7~9] 对细胞的粘附、增殖以及活性进行测试。成骨细胞培养 72 h 后, 用荧光素二甲酯染料 (FDA)^[10] 对细胞进行染色, 用 CLSM 观察细胞形态。

2 结果与讨论

2.1 微球的制备与表征

采用不同的表面稳定剂制备得到了不同表面功能化的聚乳酸微球, 其粒径分布见表 1, D_{10} 表示直径小于某数值的微球数占总微球数的 10%, D_{90} 表示直径小于某数值的微球数占总微球数的 90%, D 表示微球的平均粒径。采用不同表面稳定剂制备得到的具有不同表面功能化的聚乳酸微球粒径分布范围为 2~5 μm , 平均粒径约为 3 μm 。

Table 1 Sizes distribution of PLA microspheres with different amino acids

Microsphere sample	Surface stabilizer (2 mg/mL)	D (μm)	D_{10} (μm)	D_{90} (μm)
Plu microsphere	PEO-PPO-PEO	2.978	2.144	4.423
Arg-plu microsphere	PEO-PPO-PEO arginine derivative	3.217	2.425	4.578
Asp-plu microsphere	PEO-PPO-PEO aspartic acid derivative	2.843	2.174	4.351
Lys-plu microsphere	PEO-PPO-PEO lysine derivative	3.052	2.342	4.806
RGD-plu microsphere	PEO-PPO-PEO RGD derivative	3.132	2.224	4.616

图 1 为采用罗丹明标记的 PEO-PPO-PEO 赖氨酸衍生物作为微球制备过程中的表面稳定剂制备的聚乳酸微球在 CLSM 下的扫描示意图, 从图中可以看出, 荧光物质罗丹明出现在微球的外层, 这也说明了作为微球的表面稳定剂两亲共聚物 PEO-PPO-PEO 氨基酸衍生物稳定地存在于微球的外表面。

2.2 聚乳酸微球改性聚乳酸表面的制备与表征

聚乳酸微球在改性聚乳酸表面能否稳定存在是采用溶胀嵌入固定法制备改性聚乳酸膜片成功的关键所在。本文对功能化微球改性聚乳酸膜片分别进行了稳定性测试, 表 2 是利用 CLSM 的图形处理软件 Laserpix 统计得到的 arg-plu 微球分布密度变化情况, 从表中可以看出经超声波清洗后

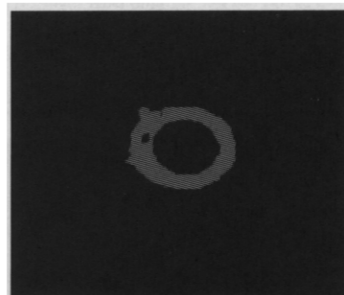


Fig. 1 CLSM scanning photo of fluorescence-labeled PLA microspheres

(Outside: rhodamine-labeled PEO-PPO-PEO lysine derivative)

表面微球掉下约 20%, 而于 PBS 缓冲液中浸泡 1 周后表面微球损失小于 5%, 而且清洗和浸泡过程都是粒径大的微球更易掉下来。稳定性结果很

Table 2 Stability test of arg-plu microspheres modified PLA membrane

Arg-plu	Before ultrasonic treatment	After ultrasonic treatment	Dipped in PBS for one week after ultrasonic treatment
Distributed density of microspheres(mm^2)	2842	2253	2144
Mean particle size(μm)	3.44	3.28	3.21
Ratio of the embedded particles area to the whole membrane area(%)	2.64	1.90	1.74

好地说明了当 Arg-plu 微球改性聚乳酸膜片经超声波清洗后 Arg-plu 微球能稳定存在于聚乳酸膜片上,其它样品也具有类似的稳定性结果。

本文采用表面截留的原理,将表面具有不同氨基酸的微球水溶液滴到被有机溶剂高度溶胀的聚乳酸膜表面,残存的有机溶剂使得微球和聚乳酸基材表面均发生溶胀和分子互穿,而有机溶剂的挥发及水对丙酮的萃取使微球和聚乳酸膜固定粘结在一起,从而实现了微球在改性表面的固定,达到了改性聚乳酸膜片的目的.微球能稳定地存在于聚乳酸表面也意味着采用溶胀嵌入固定法可成功获得具有一定分布密度的微球改性聚乳酸膜片。

图 2 为微球改性聚乳酸膜片和未改性聚乳酸膜片扫描电镜图,未改性聚乳酸膜片具有很平整的表面,而经微球改性后的聚乳酸膜片表面变得粗糙不平,从统计意义上来说微球在聚乳酸膜片上的分布比较均匀,而且可以明显看到微球被嵌入固定在聚乳酸膜片上,微球的平均尺寸大小约

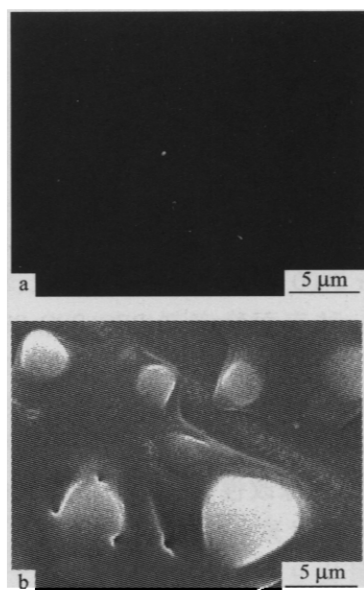


Fig. 2 SEM photos of virgin PLA membrane (a, 5000 \times) and microspheres modified PLA membrane (b, 5000 \times)

为 3 ~ 5 μm 。

表 3 反映了不同表面功能化的聚乳酸微球在改性聚乳酸膜片上的分布密度情况,从表中可以看出,不同表面功能化的聚乳酸微球改性聚乳酸膜片样品有着基本相同的微球分布密度(约为每平方毫米的聚乳酸膜片上有 2000 个微球)和基本相同的微球平均粒径(均为 4 ~ 6 μm)和微球嵌入面积比例,也即意味着不同样品之间具有大致相同的表面拓扑结构。

Table 3 PLA membranes modified with microspheres with different amino acids

Samples	Surface stabilizer	Distributed density of PLA microspheres on PLA membrane (mm^2)	Mean size of PLA particles distributed on PLA membrane (μm)	Ratio of the embedded particles area to the whole PLA membrane (%)
Plu	PEO-PPO-PEO	2054	4 ~ 6	2 ~ 6
Arg-plu-1	PEO-PPO-PEO arginine derivative	2009	4 ~ 6	2 ~ 6
Asp-plu	PEO-PPO-PEO aspartic acid derivative	2032	4 ~ 6	2 ~ 6
Lys-plu	PEO-PPO-PEO lysine derivative	2012	4 ~ 6	2 ~ 6
RGD-plu	PEO-PPO-PEO RGD derivative	2074	4 ~ 6	2 ~ 6

2.3 聚乳酸微球改性聚乳酸表面细胞相容性测试

图 3 中(a)、(b)和(c)图分别对应于不同表面功能化 PLA 微球改性 PLA 膜片的成骨细胞粘附率、增殖率以及细胞活性示意图,图中 PLA、PLA-plu 和 TCPS 分别对应于未改性的纯 PLA 膜片、PLA 和 PEO-PPO-PEO 的纯共混生物惰性膜片和聚苯乙烯培养板,而 plu、arg-plu、asp-plu、lys-plu 以及 RGD-plu 分别对应于 plu 微球、arg-plu 微球、asp-plu 微球、lys-plu 微球以及 RGD-plu 微球改性聚乳酸生物惰性膜片.从图中可以看出,样品

PLA-plu 由于表面 PEO 链段的存在可有效阻抗细胞外基质蛋白在其表面的吸附,并显著降低材料表面的细胞粘附和增殖;而样品 plu 的细胞相容性较样品 PLA-plu 在一定程度上有所降低,说明未功能化微球(plu 微球)在生物惰性表面的引入并不能改善成骨细胞的细胞相容性;但是在生物惰性表面引入功能化微球则具有完全不同的细胞相容性效果,样品 arg-plu、asp-plu、lys-plu 以及 RGD-plu 的细胞相容性都要明显好于样品 PLA-plu,而且碱性氨基酸功能化微球(arg-plu 微球、

lys-plu 微球)和多肽 RGD 功能化微球(RGD-plu 微球)的改善细胞相容性效果更明显,尤其是多肽

RGD 功能化微球的改善效果最好,其细胞相容性甚至超过了样品 PLA.

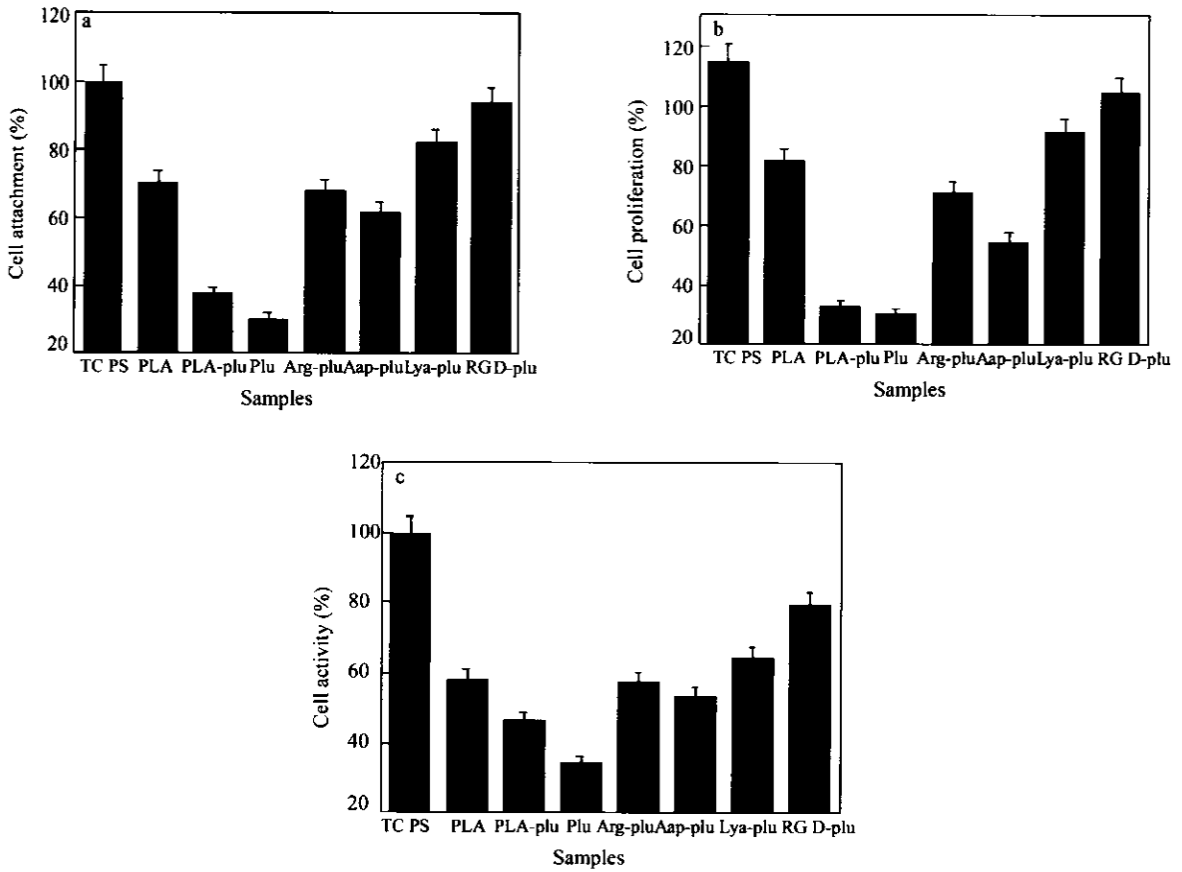


Fig. 3 Schemes of osteoblast compatibility of microspheres modified PLA membranes with different amino acids a) Cell attachment; b) Cell proliferation; c) Cell activity

图 4 为不同基材表面的成骨细胞经 FDA 染色后用 CLSM 观察和扫描的形貌示意图. FDA 是一种荧光染料,可以被细胞内酶水解生成荧光物质,该物质不能透过活细胞膜,而死细胞则可透过,因此 FDA 染色的 CLSM 图直接反映了材料表面活细胞的生长行为. 研究显示未功能化微球改性生物惰性表面(样品 Plu)成骨细胞数量少,细胞

形态铺展差;而碱性氨基酸功能化微球(Lys-plu 微球)和多肽 RGD 功能化微球(RGD-plu 微球)改性表面可有效提高成骨细胞的粘附数量,细胞铺展也较好,其细胞数量和铺展情况与 TCPS 基本相当,说明功能化微球在生物惰性表面的引入能很大程度地提高成骨细胞的细胞相容性,而且不同生物活性因子功能化微球的引入对细胞相容性

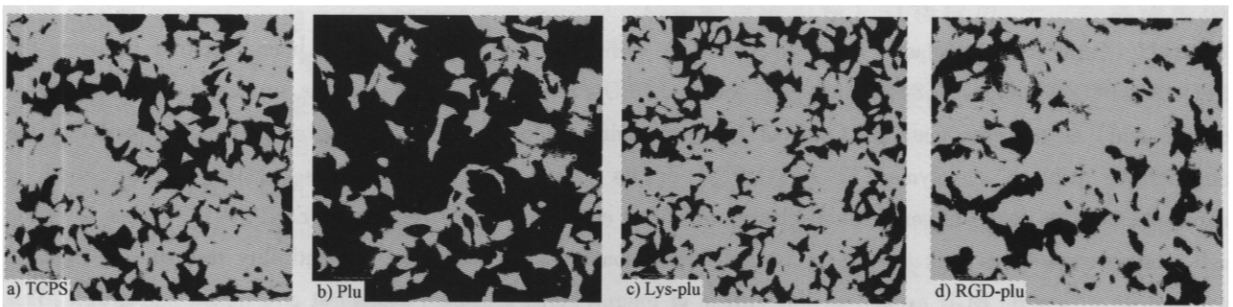


Fig. 4 Morphological CLSM photos of osteoblasts on different matrices a) TCPS; b) Modified PLA membrane with plu microspheres; c) Modified PLA membrane with lys-plu microspheres; d) Modified PLA membrane with RGD-plu microspheres (Bar: 150 μm)

改善程度不同,碱性氨基酸和多肽 RGD 的效果更明显,尤其是多肽 RGD 的改善效果最佳。

综上所述,本研究采用两亲共聚物 PEO-PPO-PEO 或其氨基酸(或多肽 RGD)衍生物作为微球制备过程中的表面稳定剂,制备得到了具有相同粒径分布范围而具有不同氨基酸(或多肽 RGD)表面的功能微球,荧光标记方法证明了氨基酸存在于微球的表面;然后通过溶胀嵌入固定法制备得到了具有不同氨基酸(或多肽 RGD)表面的功能微球改性的聚乳酸膜片,该功能微球改性膜片具有良好的稳定性。

成骨细胞的粘附率、增殖率和细胞活性的测试结果和细胞形貌显示采用聚乳酸和 PEO-PPO-PEO 共混制备的表面可通过 PEO 有效抵抗细胞的粘附

和增殖,这可能和 PEO 有效抵抗细胞外基质蛋白形成高生物惰性的表面有关。采用 PEO-PPO-PEO 制备的惰性微球改性聚乳酸/PEO-PPO-PEO 共混表面并不能提高细胞的粘附和增殖,而采用末端桥联氨基酸和多肽 RGD 的两亲共聚物 PEO-PPO-PEO 衍生物制备的功能微球改性表面则可显著提高成骨细胞的粘附、生长和活性,其中碱性氨基酸和 RGD 改性表面的作用尤其显著,这可能和碱性氨基酸和 RGD 对细胞的特殊诱导作用相关^[11-14]。这种生物活性因子(氨基酸或多肽 RGD)功能微球的截留修饰方式为细胞相容性的改性聚乳酸表面设计提供了新途径。进一步采用改变功能微球尺寸和分布密度,研究表面生物活性因子拓扑结构对细胞行为的影响的研究也正在进之中。

REFERENCES

- 1 Jeon S I, Lee J H, Andrade J D. *Journal of Colloid Interface Science*, 1991, 142: 149 ~ 158
- 2 Jeon S I, Andrade J D. *Journal of Colloid Interface Science*, 1991, 142: 159 ~ 166
- 3 Mooney D, Hansen L, Vacanti J, Langer R, Farmer S, Ingber D. *Journal of Cell Physiology*, 1992, 151: 497 ~ 505
- 4 Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M. *Exp Cell Res*, 1991, 193: 310 ~ 319
- 5 Zhu Huiguang(朱惠光). The Cytocompatible Surface Design on Poly(D, L-lactide) Tissue Engineering Scaffold(聚乳酸组织工程材料的细胞相容性表面设计研究). A Dissertation Submitted to Zhejiang University for Doctoral Degree(浙江大学博士学位论文), 2003
- 6 Andreopoulos A G, Hatzi E, Doxastakis M. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1999, 10: 29 ~ 36
- 7 Mosmann T. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65: 55 ~ 60
- 8 Zund G, Ye Q, Hoerstrup S P. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 1999, 15: 519 ~ 528
- 9 Risbud M V, Bhone M R, Bhone R R. *Journal of Biomedical Material Research*, 2001, 57(2): 300 ~ 312
- 10 Bancel S, Hu W S. *Biotechnological Progress*, 1996, 12: 398 ~ 408
- 11 Sechrist V F, Miao Y J, Niyibizi C. *Journal of Biomedical Material Research*, 2000, 49: 534 ~ 540
- 12 Anselme K. *Biomaterials*, 2000, 21: 667 ~ 681
- 13 Lebaron R G, Athanasiou K A. *Tissue Engineering*, 2000, 6(2): 85 ~ 100
- 14 Sawhney A S, Pathak C P, Hubbell J A. *Macromolecules*, 1993, 26: 581 ~ 597

SURFACE TAILORING OF POLY(LACTIC ACID) MEMBRANE VIA SURFACE-FUNCTIONALIZED MICROSPHERES TO PROMOTE CYTOCOMPATIBILITY

CHEN Da, JI Jian, SHEN Jiacong

(Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract Functiona poly(lactic acid) microspheres with core-shell structures have been prepared by using the PEO-PPO-PEO(Pluronic F68) or the ligand-tethered PEO-PPO-PEO derivatives as the surface stabilizer and poly(lactic acid) as the core material. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) investigation indicated that the amphiphillic triblock copolymer PEO-PPO-PEO or its ligand-tethered derivatives existed on the shell of microspheres. The ligand-tethered microspheres were then embedded in cell-resistant PEO-PPO-PEO films to create cell-interactive surfaces with discrete clustered-ligand domains. The osteoblast compatibility test showed that the amino acid or peptide RGD existed on the surface of microspheres promoted osteoblast attachment and growth. This simple surface treatment method may have potentials for tissue engineering and other biomedical applications.

Key words Surface stabilizer, Surface-functionalized poly(lactic acid) microspheres, Microspheres modified PLA bio-inert membrane, Cytocompatibility