

胆固醇-聚(*D,L*-乳酸)的制备及软骨细胞相容性研究*

余贯华 计剑** 沈家骢

(浙江大学高分子复合材料研究所 杭州 310027)

摘要 依据胆固醇对细胞膜良好的热力学亲和力及可以调节细胞膜磷脂双分子层的结构和动态行为的生理学的特点,采用本体聚合的方法制备了胆固醇-聚(*D,L*-乳酸),经 GPC, $^1\text{H-NMR}$ 分析证明产物分子量与理论分子量有较好的一致性,证明了聚合物的分子量可以通过调节 *D,L*-丙交酯和胆固醇的量来控制.软骨细胞粘附率、增殖率以及 3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)细胞活性的观测结果表明相比纯聚乳酸,胆固醇-聚乳酸明显促进了细胞的粘附与生长.通过激光共聚焦显微镜观察细胞形貌结果显示相比胆固醇-聚乳酸表面,纯聚乳酸表面的细胞数量较少且大多团聚没有正常铺展,而胆固醇-聚乳酸表面的软骨细胞则分布均匀,铺展充分.以上结果证明了胆固醇的存在有利于软骨细胞的生长和粘附,预示着胆固醇-聚乳酸在软骨组织工程以及其他相关的生物医疗领域有着广阔的应用前景.

关键词 胆固醇, 聚乳酸, 软骨细胞相容性

由于在修复、重组和再造动物组织上的巨大应用前景,组织工程的研究已成为现代生物医用工程技术中最为活跃的研究之一.分子生物学、细胞生物学、材料科学,特别是高分子科学的发展,为采用聚合物骨架材料和细胞杂化系统在体外或体内诱导活细胞的生长分化、构建动物组织提供了十分有效的途径.良好的细胞相容性是组织工程材料的最基本要求^[1].聚乳酸由于其良好的生物降解性、生物相容性和可加工性,已广泛应用到组织工程支架制备中^[2].但是聚乳酸材料不具备细胞外基质材料的良好细胞亲和性能,低细胞亲和性成为制约其作为理想组织工程支架材料的主要障碍之一^[3,4].聚乳酸缺乏反应性官能团的化学结构决定了与各种第二单体进行共聚成为其改性的最主要方法.其中生物活性因子固定化的聚乳酸-聚氨基酸衍生物共聚物研究^[5,6]和通过改变亲-疏水性来设计的众多聚乳酸-聚氧化乙烯(PLA-PEO)共聚物的研究^[7,8,9]都有引人注目的结果.

胆固醇作为哺乳动物生物膜的重要组成部分,广泛分布于自然界.它对细胞膜具有热力学亲和作用并且能改变细胞膜的性质,可以调节磷脂双分子层的结构和动态行为,它在体内的平衡程度对细胞生存至关重要,对细胞的信号传导,细胞粘附和细胞迁移都很有意义.另外胆固醇的刚性骨架和羟基结构使其容易发生聚集,形成有空间

取向的三维结构,能自组装为模拟细胞膜的液晶态结构^[10,11].本文利用胆固醇为引发剂,引发丙交酯开环聚合制备了窄分布的胆固醇-聚(*D,L*-乳酸)(LC),并研究了共聚物的软骨细胞相容性.

1 实验部分

1.1 胆固醇-聚乳酸的合成

胆固醇(进口分装,分析纯)经丙酮重结晶,辛酸亚锡(Sigma-Aldrich 公司,分析纯)用于干燥甲苯配成 0.028 g/mL 溶液使用.*D,L*-丙交酯根据文献[7]方法制备,即加热分散有 5 g ZnO 的 250 mL 乳酸至体系沸腾,减压蒸出体系反应生成的水,到体系无水生成,继续减压、升温,蒸出浅黄色馏分,用乙酸乙酯重结晶 2~3 次,无水乙醚洗涤,室温抽真空干燥,得到白色结晶的丙交酯.将胆固醇与纯化后的 *D,L*-丙交酯分别按质量为 1.18 g 和 13.96 g(产物为 LC1)以及 1.07 g 和 26.58 g(产物为 LC2)加入安瓿瓶中,按丙交酯质量的 0.03% 添加辛酸亚锡催化剂,对体系反复抽真空-充氩 1 h,最后连续抽真空 1 h,酒精喷灯封管,150℃油浴反应 5 h 后,丙酮溶解产物,水沉析两次,室温抽真空充分干燥后贮于干燥器内备用.以四氢呋喃为流动相,聚苯乙烯为标样,用凝胶渗透色谱(Waters 515 HPLC pump, waters 2410 refractive index detector)表征产物分子量及分子量分布.产物结构

* 2004-09-16 收稿,2004-11-15 修稿;国家重点基础研究发展规划项目(项目号 G1999054305)和国家自然科学基金(基金号 20174035)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: jijian@zju.edu.cn

用核磁氢谱($^1\text{H-NMR}$, Avance DMX500)表征。

1.2 软骨细胞的培养

将胆固醇-聚乳酸共聚物配成 5% 乙酸乙酯溶液,涂膜于直径为 16 mm 的圆玻璃片上,室温干燥 24 h 后抽真空干燥过夜,紫外灯下照射 1 h,种入 24 孔组织培养板(TCPS)备用。取 3~4 周龄新西兰兔耳软骨细胞,调节细胞悬液密度为 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$,每孔种植 500 μL 。参照文献[12]对细胞的粘附、增殖以及活性进行测试。细胞粘附率的测定为:软骨细胞培养 24 h 后用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 遍除去培养基及未粘附的细胞,每孔加入 0.25% 胰酶 PBS 溶液 500 μL ,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 10 min,用枪头轻轻吹打使细胞分散成细胞悬液,在光学倒置显微镜(JNOEC)下用血球计数板计数,以 TCPS 表面细胞数为参照计算细胞粘附率。增殖率的测定为软骨细胞培养 72 h 后,用相同方法测定细胞个数,以粘附细胞数为参照计算增殖率。四唑盐(MTT)活性的测定是在细胞培养 72 h 后每孔加入 200 μL 5 mg/mL 的 MTT PBS 溶液,在培养箱中培育 4 h 后,小心吸弃培养上清液,每孔加入 300 μL DMSO,使结晶物溶解,选择 570 nm 波长,在酶连免疫仪上测定各孔吸光值,以 TCPS 为参照计算细胞活性。细胞形态的观

察采用荧光素二乙酸酯染料(FDA)^[13]对细胞进行染色后,在 Bio-Rad Radiance 2100 型激光共聚焦显微镜(CLSM)进行。

2 结果与讨论

2.1 胆固醇-聚乳酸的合成与表征

胆固醇-聚乳酸(LC)采用胆固醇为大分子引发剂,辛酸亚锡存在下本体引发丙交酯聚合(反应式如图 1)。聚合产物的 GPC 见图 2,图 2(a)为 LC1 的 GPC 谱峰,图 2(b)为纯胆固醇的 GPC 谱峰。GPC 谱图显示 LC1 为窄分布的单峰,未见明显未反应的胆固醇存在,说明用水沉析提纯后的聚合物中未反应的胆固醇含量很少。本文进一步对产物结构进行了核磁 H 谱表征。 $^1\text{H-NMR}$ (图 3)显示有胆固醇的吸收峰(δ 0.67~2.33,胆固醇中的一 CH_2 和— CH_3 ; δ 4.6,胆固醇与乳酸连接处 $(\text{CH}_2)_2\text{CH}-\text{O}$ 中 CH 的 H; δ 5.37,胆固醇双键中的一 $\text{CH}=\text{C}$)以及聚乳酸的吸收峰(δ ~1.5,聚乳酸单元的甲基 CH_3-CH ; δ 5.03~5.24,聚乳酸单元 $\text{O}=\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ 中 CH 的 H)。以 δ 4.6 的谱峰面积积分值与 δ 5.03~5.24 谱峰面积积分值之比计算 LC1 分子量,得到 LC1 的分子量 $M_n = 4339$ 。

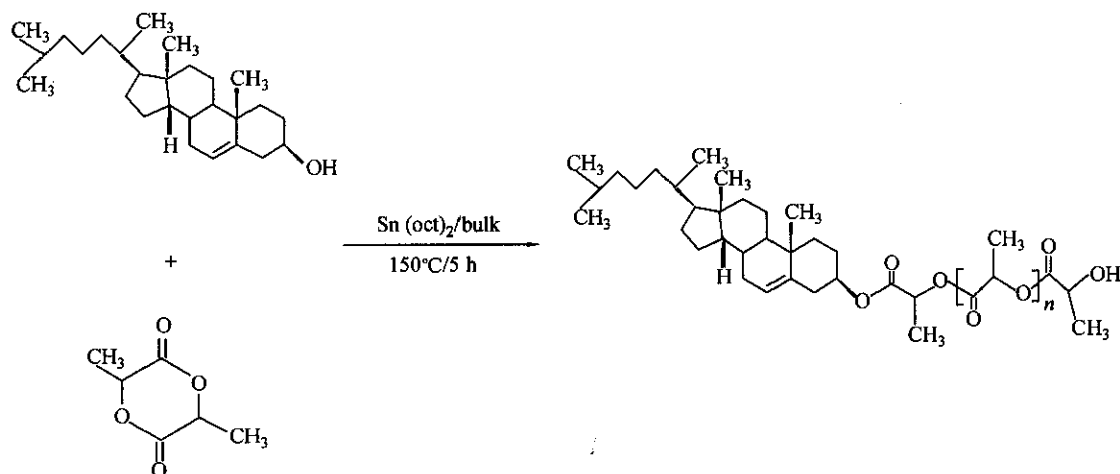


Fig. 1 Reaction scheme for the preparation of poly(*D,L*-lactide-cholesterol)

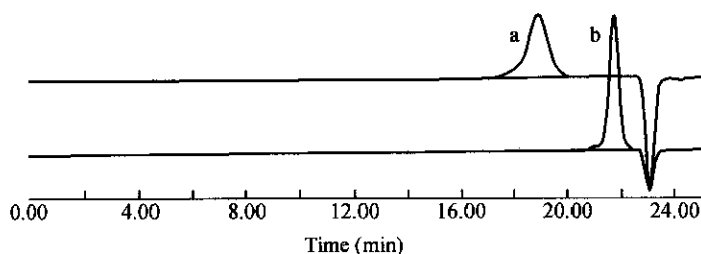


Fig. 2 GPC curves of LC1 (a) and cholesterol (b)

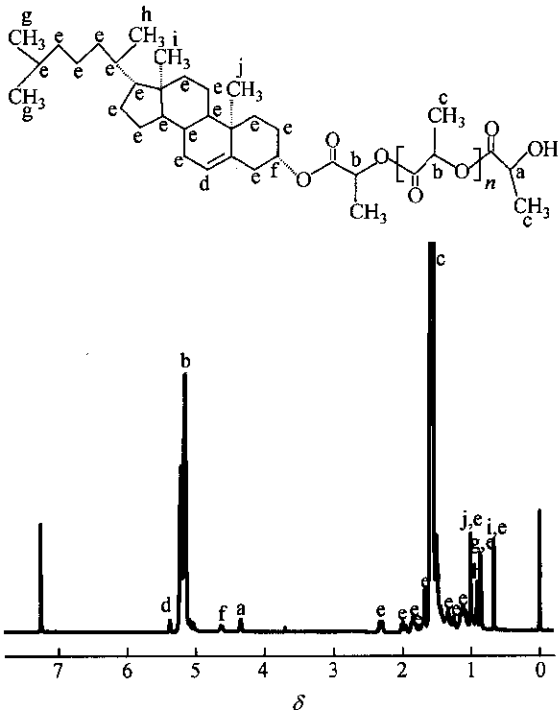


Fig. 3 ¹H-NMR spectrum of LC1 in CDCl₃

表 1 列了通过各种方法计算的产物分子量. 可以发现测得的分子量与理论投料分子量较为接近,说明封管聚合的方法可以有效控制反应,获得具有窄分布的高纯度 LC.随着产物分子量的升高,产率相应升高,产物的物理性状也由粘性固体过渡到白色粉末.

Table 1 Molecular weight of LC

	Theoretical	<i>M_n</i>	<i>M_n</i>	<i>M_w</i> / <i>M_n</i>	Yield after
	<i>M_n</i>	(¹ H-NMR) ^a	(GPC) ^b	<i>M_n</i> ^b	purification(%)
LC1	4961	4339	5300	1.06	45.5
LC2	9992	9832	9900	1.08	49.4

^a Determined by ¹H-NMR; ^b Determined by GPC using polystyrene as standards

2.2 胆固醇-聚乳酸的细胞相容性评价

本文进一步对 LC 进行了兔软骨细胞培养的研究,测定了粘附率、增殖率及 MTT 细胞活性,同时观察了细胞形貌.

软骨细胞粘附率测试结果(图 4)显示,相比纯聚乳酸,LC 的粘附率均有明显提高,说明胆固醇的存在有助于提高软骨细胞的粘附.软骨细胞是贴壁生长型细胞,因此粘附率的提高对促进软骨细胞的生长有着重要的意义.细胞增殖率结果(图 5)显示 LC 表面的软骨细胞生长较纯聚乳酸表面有显著提高,说明胆固醇的存在有利于软骨

细胞的分化生长.

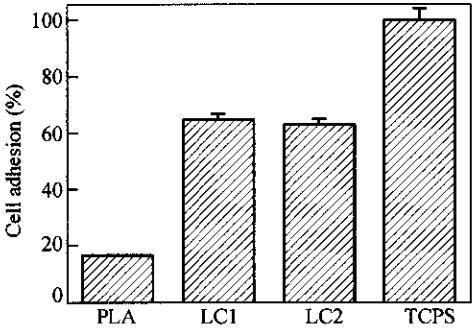


Fig. 4 Chondrocyte attachment on poly(*D, L*-lactide-cholesterol) and the control

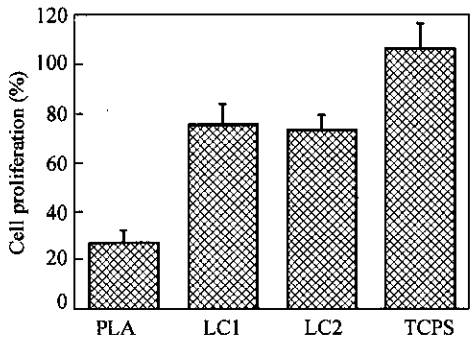


Fig. 5 Chondrocyte proliferation on poly(*D, L*-lactide-cholesterol) and the control

活细胞表现出一定的细胞活性,它是细胞存活、生长情况的反映,与细胞内线粒体的数目直接相关.而线粒体的数目与细胞数及单个细胞的活性有关.因此,细胞活性的大小取决于细胞数和单个细胞的活性.本文用 MTT 比色法测试不同表面细胞的活性^[14].图 6 为细胞活性结果.图中显示各种表面中,TCPS 表面有着最好的细胞活性,而纯聚乳酸表面的细胞活性则为最低,而经过改性后的表面即含胆固醇的表面较纯聚乳酸表面的细

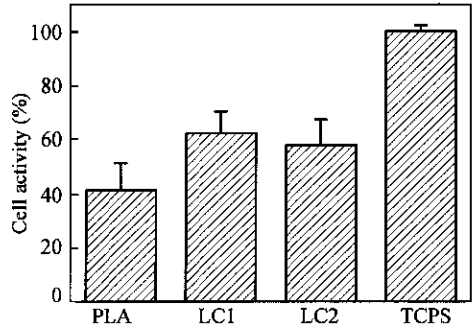


Fig. 6 Cell viability of chondrocyte on poly(*D, L*-lactide-cholesterol) and the control

胞活性有了明显提高,证明了胆固醇的存在对细胞活性也有明显促进作用。

本文进一步采用活细胞染料—荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA)对软骨细胞染色,然后用激光共聚焦显微镜对材料表面的活细胞行为进行了观察.FDA 是细胞膜完整性和细胞内酯酶

的指示剂^[13].FDA 染色后的细胞激光共聚焦显微镜照片(图 7)显示,未改性的 PLA 膜,细胞多呈团聚状态,不铺展,而且数量较少,而 LC 表面的软骨细胞则分布均匀,铺展充分,覆盖了整个材料表面,与 TCPS 表面的细胞生长形态接近,证明了胆固醇的存在有利于软骨细胞的生长和粘附。

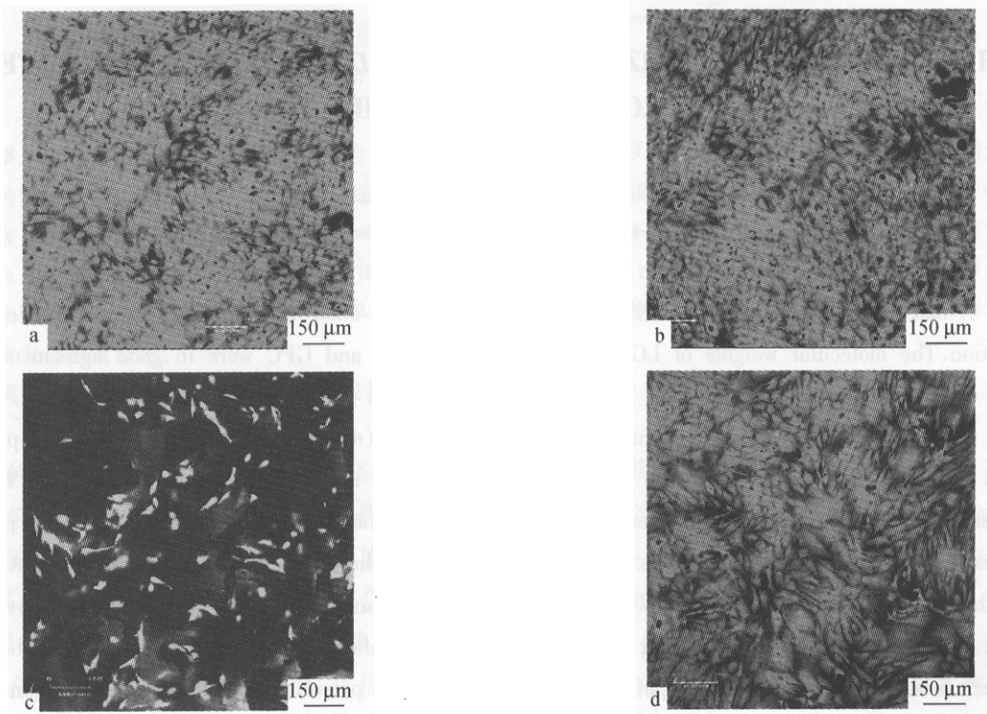


Fig. 7 CLSM images of the chondrocytes after cultured for 3 days on a)LC1; b)LC2; c)PLA; d)TCPS

综上所述,本研究采用胆固醇为引发剂,辛酸亚锡存在下本体引发丙交酯聚合,成功地获得了窄分布高纯度的胆固醇-聚乳酸(LC),软骨细胞培养的结果证明胆固醇的存在有利于细胞的粘附和生长,这可能与胆固醇对细胞膜良好的热力学亲和力及可以调节细胞膜磷脂双分子层的结构

和动态行为的生理学作用密切相关.由于胆固醇具有良好的软骨细胞相容性和表面自迁移特性,而聚乳酸链段和高分子量聚乳酸组织工程材料具有良好的共混相容性,可期望采用 LC 共混改性聚乳酸支架,提高支架的细胞相容性,使其在组织工程中得到更好的应用。

REFERENCES

- 1 Han D A, Hubell J A. *Macromolecules*, 1997, 30: 6077 ~ 6083
- 2 Luo binghong(罗丙红), Liao Kairong(廖凯荣), Quan Daping(全大萍), Lu Zejian(卢泽俭), Chen Yonglie(陈用烈). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2003, (6): 803 ~ 808
- 3 Cook A D, Rkach J S, Gao N N. *J Biomed Mater Res*, 1997, 35: 513 ~ 523
- 4 Nagasaki Y, Okada T, Scholz C. *Macromolecules*, 1998, 31: 1473 ~ 1479
- 5 Barrera D A, Zylstra E, Lansbury P T, Langer J R. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 11010 ~ 11011
- 6 Barrera D A, Zylstra E, Lansbury P T, Langer R. *Macromolecules*, 1995, 28: 425 ~ 432
- 7 Yuan Jianjun(袁建军), Li Yingshun(李英顺), Zhu Huiguang(朱惠光), Cheng Shiyuan(程时远), Jiang Lei(江雷), Feng Linxian(封麟先), Fan Zhiqiang(范志强). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2004, (1): 1 ~ 7
- 8 Tessmar J K, Mikos A G, Göpferich A. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 194 ~ 200
- 9 Chen Wenna(陈文娜), Yang Jian(杨建), Wang Shenguo(王身国), Bei Jianzhong(贝建中). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2002, (5): 695 ~ 698

- 10 Klok H A, Hwang J J, Iyer S N, Stupp S I. *Macromolecules*, 2002, 35: 746 ~ 759
- 11 Hwang J J, Iyer S N, Li L S, Claussen R, Harrington D A, Stupp S I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 9662 ~ 9667
- 12 Zhu H G, Ji J, Lin R Y, Gao C Y, Feng L X, Shen J C. *Biomaterials*, 2002, 23: 3141 ~ 3148
- 13 Bancel S, Hu W S. *Biotechnology Progress*, 1996, 12: 398 ~ 402
- 14 Situ Zhenqiang(司徒镇强), Wu Junzheng(吴军正). *Cell Culture(细胞培养)*. Xi'an(西安): Xi'an World Publishing Corporation(世界图书出版西安公司), 1996. 186

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY(*D, L*-LACTIDE-CHOLESTEROL) AND ITS CHONDROCYTE COMPATIBILITY PROMOTION

YU Guanhua, JI Jian, SHEN Jiacong

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

Abstract A narrow molecular weight distribution poly(*D, L*-lactide-cholesterol) (LC) was synthesized by bulk polymerization. The molecular weights of LC obtained from $^1\text{H-NMR}$ and GPC were in good agreement with the theoretical values, which indicate that the LC molecular weight can be adjusted by varying the *D, L*-lactide/cholesterol ratio. The chondrocyte cell attachment, proliferation and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) cell activity on LC and poly(*D, L*-lactic acid) (PLA) were investigated. The results showed that LC exhibited improved cell attachment and significantly better proliferation compared with pure PLA. The confocal laser scanning microscopy (CLSM) images showed that the number of chondrocytes on PLA films was less than that on LC. The chondrocytes on LC are spreading uniformly and completely while the chondrocytes on PLA are clotted and not in a normal spreading status. All the results above demonstrate that cholesterol-containing materials can construct a chondrocyte compatible surface and may have potentials for cartilage tissue engineering and other biomedical applications.

Key words Poly(*D, L*-lactic acid), Cholesterol, Chondrocyte compatibility