

## Lys 调节 PLGA 纳米纤维的体外降解产物酸度的研究\*

包 敏 周雅慧 袁卉华 娄向新 张彦中\*\*

(东华大学化学化工与生物工程学院 上海 201620)

**摘 要** 采用向 PLGA 纳米纤维中添加碱性氨基酸——赖氨酸(Lys)的方法来降低降解产物的集酸程度. 用电纺丝技术制备载 Lys 的 PLGA/Lys 复合纳米纤维,并用 SEM、DSC、及力学测试等表征手段对该复合纳米纤维的形貌、热学性质以及力学性质等方面进行表征;研究 PLGA/Lys 复合纳米纤维中 Lys 的释放特性;对 PLGA 与 PLGA/Lys 纳米纤维进行体外降解实验,评价纤维降解过程中的形貌和降解液 pH 值;用已降解 8 周的纳米纤维降解液对血管平滑肌细胞进行培养,MTT 检测细胞毒性. 结果表明,在电压为 12 kV,注射速率 1.0 mL/h,温度 23 ℃,湿度 20%,接收距离 14 cm 时可以纺出形貌较好的 PLGA/Lys 复合纳米纤维,Lys 含量越多,复合纳米纤维的直径越细. 纳米纤维中 Lys 的含量影响 Lys 的释放特性. Lys 促进 PLGA 的降解并对改善其降解产物的酸度有一定的缓解作用,含 2% Lys 的纳米纤维降解 8 周后可以使降解液 pH 维持在 7.4 ~ 6.7 之间. 降解的酸性产物不利于平滑肌细胞生长,但含 Lys 降解液的培养基中细胞生长状态良好,这可能是由于 Lys 能减轻酸性降解产物对细胞功能的影响,同时也能为细胞增殖提供营养物质.

**关键词** 电纺丝, 乳酸-乙醇酸共聚物, 赖氨酸, 降解, 细胞相容性

近十年来,利用纳米技术模拟细胞生长的微环境制备仿天然细胞外基质(ECM)支架已引起了人们的极大兴趣,尤其是以电纺纳米纤维支架为代表. 电纺丝(electrospinning)是一种采用静电力制备纤维细度达纳米级的超细纤维制备技术. 由于电纺纳米纤维在尺寸和形态上对 ECM 组分的独特仿生特性,自 2002 年电纺纳米纤维被首次报道用于组织工程支架以来<sup>[1]</sup>,这类仿生纳米纤维已被广泛研究用于软骨、骨、皮肤、肌腱、韧带、血管和神经等组织的构建研究<sup>[2~5]</sup>,成为当今组织工程再生医学支架材料研究的热点. 众多研究结果表明,与其他传统的组织工程支架相比,纳米纤维支架能明显地促进细胞的黏附、增殖、分化及其他细胞功能的表达<sup>[6~8]</sup>.

在各类电纺材料中,脂肪族聚酯如聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、及乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)等由于具有优良的生物相容性、生物可降解和可吸收性、较高的力学强度等诸多优点,已成为在组织工程支架构建和临床实践中获得最广泛应用的生物可降解合成高分子材料. 但在实际

应用中,这些聚酯材料的降解产物呈现酸性从而带来的不利影响也引起了广泛的关注. 一般认为,PLGA 聚酯类材料的降解方式主要是水分子对酯键的破坏,引起酯键水解产生乳酸和乙醇酸低聚体或单体<sup>[9]</sup>. 这些酸性产物如果不能及时通过正常的新陈代谢过程排除体外,将会导致植入体周围的组织微环境的 pH 值降低,并且随着酸性产物的聚集,不仅会影响黏附在其上的细胞的生长、分化和胞外基质的合成,而且会引起植入体周围组织的局部无菌炎性反应,严重影响组织修复效果<sup>[10,11]</sup>.

为了改善生物可降解聚酯类材料的酸性降解产物问题,除了通过从根本上对聚酯聚合物的大分子结构进行重新设计来控制其降解行为以外<sup>[12]</sup>,采用在现有的已获得实际临床应用的聚酯材料中掺入添加剂显然是提供了一种简便可行的改进方法. 例如,通过将某些特定的添加剂(如碱性调节剂羟基磷灰石)的引入<sup>[13,14]</sup>,不仅可以调控聚酯材料的降解速率,而且在其释放出来后可以中和酸性降解产物,达到降低酸性降解产物对

\* 2013-09-09 收稿,2013-11-20 修稿;国家自然科学基金(基金号 51073032)、上海市科学技术委员会“浦江人才计划”(项目号 10PJ1400200)、中央高校基本科研业务费专项资金项目(项目号 11D10540)和教育部留学回国人员科研启动基金项目(基金号 11W10523).

\*\* 通讯联系人,E-mail: yzhang@dh. edu. cn

doi:10. 3724/SP. J. 1105. 2014. 13328

细胞功能的影响的目的.但是这些尝试中绝大多数研究都是用碱性无机盐来调控酸性降解产物的 pH<sup>[15~19]</sup>,而基于碱性氨基酸这种有机成分调控的研究工作相对较少<sup>[20,21]</sup>,关于如何调控电纺纳米纤维降解引起的 pH 变化的工作则还鲜见报道.

由于碱性氨基酸是宿主肌体的主要成分之一,同时又能自行参与机体的新陈代谢,因此,本研究通过在电纺 PLGA 纤维中引入具生物活性的碱性氨基酸组分赖氨酸(Lys),研究和制备出一种材料降解后可使组织微环境的 pH 呈中性的 PLGA/Lys 复合纳米纤维.首先制备了含 Lys 的 PLGA 复合纳米纤维,对含 Lys 的 PLGA 纳米纤维的形貌、热力学性能、降解行为及 Lys 对酸性降解产物引起的 pH 降低的调控能力进行了评估,最后,取降解液进行了体外的细胞相容性评价.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

L-Lys(Lys)购自国药集团化学试剂有限公司;PLGA(重均分子量 12000,LA:GA = 50/50)购自济南岱罡生物有限公司;分析纯级三氯甲烷( $\text{CHCl}_3$ )与 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)由上海凌峰化学试剂有限公司提供;磷酸盐缓冲液粉剂(PBS,pH = 7.4)购自迪申生物技术(上海)有限公司;人平滑肌细胞由上海第一人民医院提供;无支原体胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物技术有限公司;高糖培养基(DMEM)、青-链霉素和胰蛋白酶购自杭州吉诺生物技术有限公司.

TXR1020N30-30 型高压电源(大连泰思曼科技有限公司);KDS-100 型微量注射泵(美国 KD Scientific 公司);DDSJ-308A 导电仪(上海雷磁仪器厂);PHSJ-4/8 pH 计;JEOL JSM-5600 型扫描电镜(SEM);H5K-S 型万能材料测试仪(Hounsfield, UK);DSC-822 型差示扫描量热分析仪;DKZ-2 电热恒温振荡水槽(上海一恒科技有限公司);H05-1 恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器科技有限公司);DZF-6050B 真空干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);FA1004 电子分析天平(上海舜宇恒平科技有限公司);TU-1810 紫外可见分光光度计(北京市普析通用仪器有限责任公司);HF90  $\text{CO}_2$  培养箱(力康);TI-S 倒置荧光显微镜(日本 NIKON 公司).

### 1.2 PLGA 和 PLGA/Lys 纳米纤维的制备

PLGA 是一种脂肪族聚酯,易溶于  $\text{CHCl}_3$ 、四氢呋喃(THF)和 DMF 等有机溶剂.本文选用  $\text{CHCl}_3$  和 DMF 的混合溶剂( $\text{CHCl}_3$  和 DMF 的体积比为 3:1)作为 PLGA 的纺丝溶剂配制纺丝液(浓度为 25 g/L),利用电导仪测量溶液的电导率值,分析加入 Lys 对 PLGA 溶液电导率的影响.另外,配制 3 种含不同浓度(0.5%、1.0%、2.0%,相对于 PLGA)Lys 的 PLGA/Lys 溶液,Lys 在水溶液中的浓度为 40 g/L.由于 Lys 为水溶性物质不溶于有机相,因此纺丝液是分相的不均一体系,不适合进行静电纺丝,为了增加这些溶液体系的可纺性和稳定性,向上述纺丝液中加入少量(1  $\mu\text{L}$ )的 Span-80 乳化剂(Sigma),常温下磁力搅拌 12 h 后,超声乳化,使得 Lys 能够均一、稳定分散在 PLGA/ $\text{CHCl}_3$ /DMF 纺丝液中,液体颜色由黄色向浅黄色过渡,得到乳化液后进行纺丝.纺丝参数:电压为 10~12 kV,接收距离 10~15 cm,室温,环境湿度 20%左右.制备好的纳米纤维膜在真空干燥箱中至少干燥 48 h,以去除纤维中残留的溶剂.本论文中将 Lys(0.5%、1.0%、2.0%)/PLGA 一律简写为 PLGA/0.5% Lys、PLGA/1.0% Lys、PLGA/2.0% Lys.

### 1.3 形貌表征

PLGA 和 PLGA/Lys 纳米纤维的形貌通过扫描电镜(SEM)来观察.先在扫描电镜样品台上贴好导电胶,然后将干燥好的适当大小的 PLGA 和 PLGA/Lys 纳米纤维贴到导电胶上,样品喷金 30~40 s.然后,在 15 kV 加速电压下,用 SEM(JSM-5600LV 型)观察电纺纤维的表面形态,并拍照.用 Image J 1.40G 软件测量纳米纤维的直径.分析加入 Lys 对 PLGA 纤维表面形态及纤维直径分布的影响.

### 1.4 热学性能表征

用 DSC-822 型差示扫描量热分析仪检测 Lys 的加入对 PLGA 纳米纤维的热学性能的影响.升温速率为 10 K/min,温度范围为 40~100  $^{\circ}\text{C}$ .

### 1.5 力学性能表征

PLGA 和 PLGA/Lys 复合纳米纤维的力学性能测试是先剪取 5 条厚度均匀的长条形(1 cm  $\times$  5 cm)的纤维膜,然后用螺旋测微器测量每条纤维膜上 5 个不同点的厚度,取平均值.使用 H5K-S 型万能材料测试仪在 20  $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 53%的条件下测试纤维膜的力学性能.仪器设置参数为:

两钳口夹间距为 30 mm,拉伸速率 10 mm/min,力传感器范围 10 N,用下面的公式(1)、(2)计算即可得到应力-应变曲线.

$$\sigma(\text{MPa}) = \frac{P(N)}{10(\text{mm}) \times d(\text{mm})} \quad (1)$$

$$\varepsilon = \frac{l}{l_0} \times 100\% \quad (2)$$

其中, $\sigma$ 、 $\varepsilon$ 、 $P$ 、 $l_0$ 及 $l$ 分别表示拉伸过程中不同伸长变形时的应力、应变、拉伸力,以及两钳口夹之间样品条的原始长度(3 cm)和伸长长度.

1.6 Lys 体外释放测试

将载有 3 种不同浓度 Lys 的 PLGA 纤维膜剪成 1 cm × 1 cm 小块,准确称重,每种纤维膜设 3 个平行样.将纤维膜放入离心管中,加入 10 mL 的 PBS 溶液 (pH = 7.4),放入恒温水浴锅中,在 37 ℃ 恒温条件下以 100 r/min 匀速振荡.在预定时间从离心管中精确取出 1 mL 释放液,同时补加新鲜 PBS 溶液 1 mL.每次从释放液中取出 1 mL 对石英皿进行润洗后丢弃,然后再取出 3 mL 用 TU-1810 紫外可见分光光度计进行紫外吸光度测试.测得的吸光度值对应于标准曲线,计算得出释放液中 Lys 的浓度.

1.7 PLGA 及 PLGA/Lys 复合纳米纤维体外降解行为评价

将纯 PLGA 纳米纤维、PLGA/Lys 复合纳米纤维裁制成 1 cm × 1 cm 的正方形试样(厚度约 0.1 mm),每组 5 个试样,去污、蒸馏水冲洗,干燥后,加入 10 mL PBS (pH = 7.4) 缓冲液完全浸润样片,放入 37 ℃ 恒温水浴锅内进行降解实验.降解过程中不予任何干预措施,使降解系统保持常态.将降解了 20、40 与 60 天的纤维膜从 PBS 缓冲液中取出,吸除纤维表面的水分后将样品放在通风处自然风干,待试样完全干燥后,裁剪纤维膜制样,拍摄扫描电镜照片,观测纤维的形貌变化.同时,每周固定时间用 pH 计测定 4 种试样的浸泡液的 pH 值,绘制 pH 值变化曲线.

1.8 PLGA 及 PLGA/Lys 复合纳米纤维降解液的细胞相容性评价

1.8.1 配制 PLGA 降解液培养基和细胞培养

采用 24 孔培养板进行实验,每种降解液 4 个复孔.为了方便地观测到因 PLGA 降解而造成的细胞活性差异,本研究选取 PLGA 降解液来替代细胞与材料的直接接触进行评估<sup>[22,23]</sup>,因此实验组为 4 种纳米纤维降解 8 周后的降解液,设置 4

组实验组,即每一种降解液对应的孔内 200 μL DMEM 培养基滴加 200 μL 对应的降解液;阳性对照组为每孔内 400 μL DMEM 培养基.再将复苏好的平滑肌细胞液转移至 24 孔板中,每个孔中种植的细胞密度为 1 × 10<sup>4</sup> 个,然后放入 37 ℃ 细胞培养箱中培养.

1.8.2 平滑肌细胞的形貌测试

将培养到一定时间(1、4、7 天)的培养板从细胞培养箱中取出,在倒置荧光显微镜下观察细胞的形貌及生长情况.

1.8.3 MTT 法检测平滑肌细胞在降解液中的活性情况

MTT 法是一种用于检测细胞活力与细胞增殖的常用方法.步骤为:将培养到一定时间(1、4、7 天)的培养板从细胞培养箱中取出,吸掉原来的培养基,然后每孔加 360 μL 细胞培养基和 40 μL MTT,放入培养箱继续培养 4 h.当细胞与 MTT 充分反应后,吸去培养基,每孔加入 400 μL DMSO,摇床慢速震荡 20 min,使沉淀完全溶解.从每个孔移取 100 μL 溶液转入 96 孔培养板中,用酶标仪测定溶液在 490 nm 处的吸光值.

1.9 统计学方法

应用 Origin 8.0 统计软件进行统计学分析,数据以 M ± SD(平均值 ± 标准偏差)表示,组间比较采用 t 检验和方差分析.当任意两组数据差异概率  $p < 0.05$  时,则认为它们之间存在显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 Lys 的引入对 PLGA 纳米纤维形貌的影响

由图 1 中的 SEM 照片可以观察到 4 种纳米纤维的形貌.引入 Lys 的 PLGA 仍然具有较好的可电纺性,PLGA 纳米纤维(图 1(a))及 PLGA/0.5% Lys(图 1(b))、PLGA/1% Lys(图 1(c))和 PLGA/2% Lys(图 1(d))复合纳米纤维的直径分别为 (947 ± 32) nm, (880 ± 28) nm, (836 ± 35) nm 和 (576 ± 19) nm(图 1(e)).与 PLGA 纳米纤维的直径相比,随着 Lys 含量的增加,纤维直径会减小.主要是因为掺杂 Lys 引起了 PLGA 纺丝液的电导率增加(图 1(f)),溶液的表面电荷密度增加,最终导致电场力相对增加,有利于形成直径较细的纳米纤维<sup>[24]</sup>.

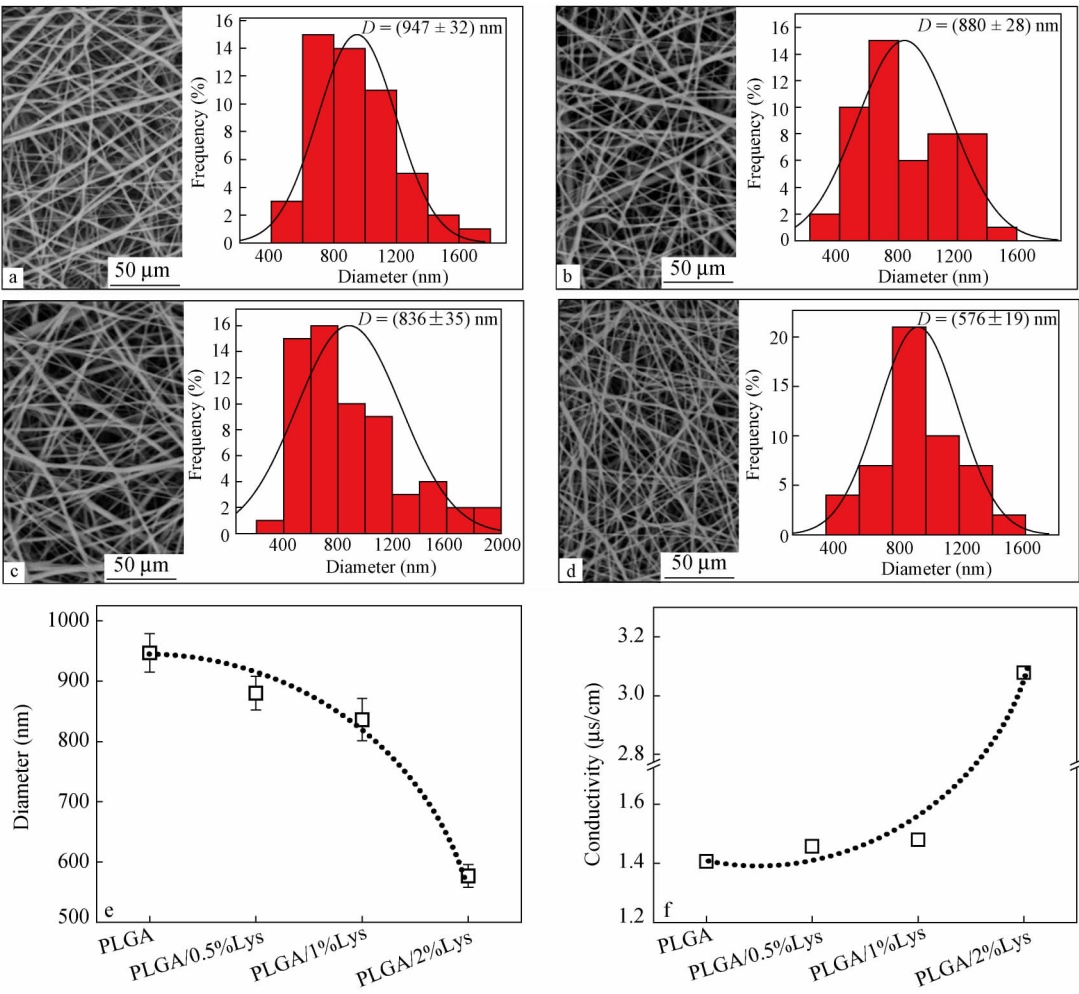


Fig. 1 SEM micrographs and diameter distribution histograms of electrospun: ( a ) PLGA, ( b ) PLGA/0.5 % Lys, ( c ) PLGA/1% Lys and ( d ) PLGA/2% Lys fibers; ( e ) Effect of the Lys content on the average diameter of PLGA nanofibers; ( f ) Relationship of conductivity versus Lys content in polymer solutions

## 2.2 Lys 的引入对 PLGA 纳米纤维热学性能的影响

图 2 是 PLGA 纳米纤维及含 Lys 复合纳米纤维的 DSC 曲线. 由 40  $^{\circ}\text{C}$  左右吸热峰开始下降的位置至 DSC 下降至最低点的位置分别作切线, 交点所对应的温度即为玻璃化转变温度 ( $T_g$ )<sup>[25,26]</sup>. 由图 2 可以分别得出 4 种纳米纤维的玻璃化转变温度, 纯的 PLGA 纳米纤维的  $T_g$  为 54.7  $^{\circ}\text{C}$ , 而 PLGA/0.5 % Lys、PLGA/1.0 % Lys、PLGA/2.0 % Lys 的  $T_g$  分别为 52.9、52.0 及 51  $^{\circ}\text{C}$ . 与纯 PLGA 相比, Lys 的引入会降低复合纳米纤维的  $T_g$ . 可能的原因是: 由于 Lys 为晶体, 当 Lys 添加到无定型聚合物 PLGA 中并随着温度升高至玻璃化转变温度附近时, 聚合物的晶相所占比例有所增加, 也就是说无规性会相应地降低, 因此宏观就表现为玻

璃化转变温度的降低.

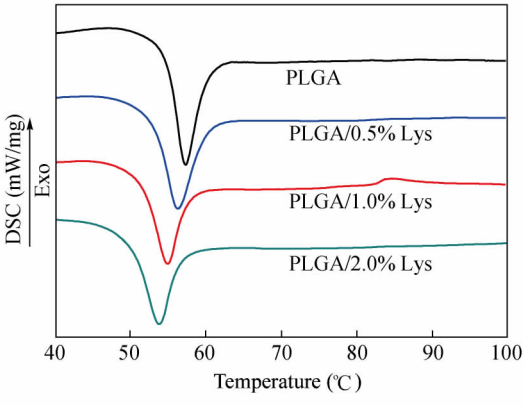


Fig. 2 DSC curves of the electrospun nanofibers of PLGA and PLGA/Lys with varied Lys loadings

2.3 Lys 的引入对 PLGA 纳米纤维力学性能的影响

由图 3(a) 和 3(b) 可知,随着 Lys 含量的增加,复合纳米纤维的力学性能和断裂强度呈递增式变化,表明 Lys 的引入会增强 PLGA 纳米纤维的力学性能.图 3(c) 表明 Lys 的加入有利于提高纳米纤维膜的杨氏模量,即加入 Lys 的复合纳米纤维抵抗形变的能力变强.然而,含 1.0% Lys 的纳米纤维的杨氏模量比其他两种含量 Lys 的复合纳米纤维的杨氏模量要大.这一现象的产生有可能是因为 Lys 的加入量会在一定范围内有利于增强纤维抵抗形变的能力,如果超出了范围,抵抗形变的能力就会下降.就本实验而言,可以猜测含

1.0% Lys 的复合纳米纤维有着较好的抵抗形变能力,在实际应用中可以根据需要选择合适比例的添加物.从图 3(d) 可以看出添加了 Lys 的复合纳米纤维的断裂延伸率相比于纯 PLGA 都有所降低,但影响不是太大.

Lys 的加入使得 PLGA 纳米纤维力学性能提高的原因可能是 Lys 的加入起到了一定的“交联”作用.Lys 分子中的氨基与羧基会与 PLGA 中的官能团形成氢键,增强了高聚物分子与 Lys 之间的作用力,而且 Lys 含量越高,与 PLGA 中的官能团结合形成氢键的数目也就越多,分子间作用力就越大,因此在宏观上会表现出含有 Lys 的纳米纤维更耐拉,不容易断裂.

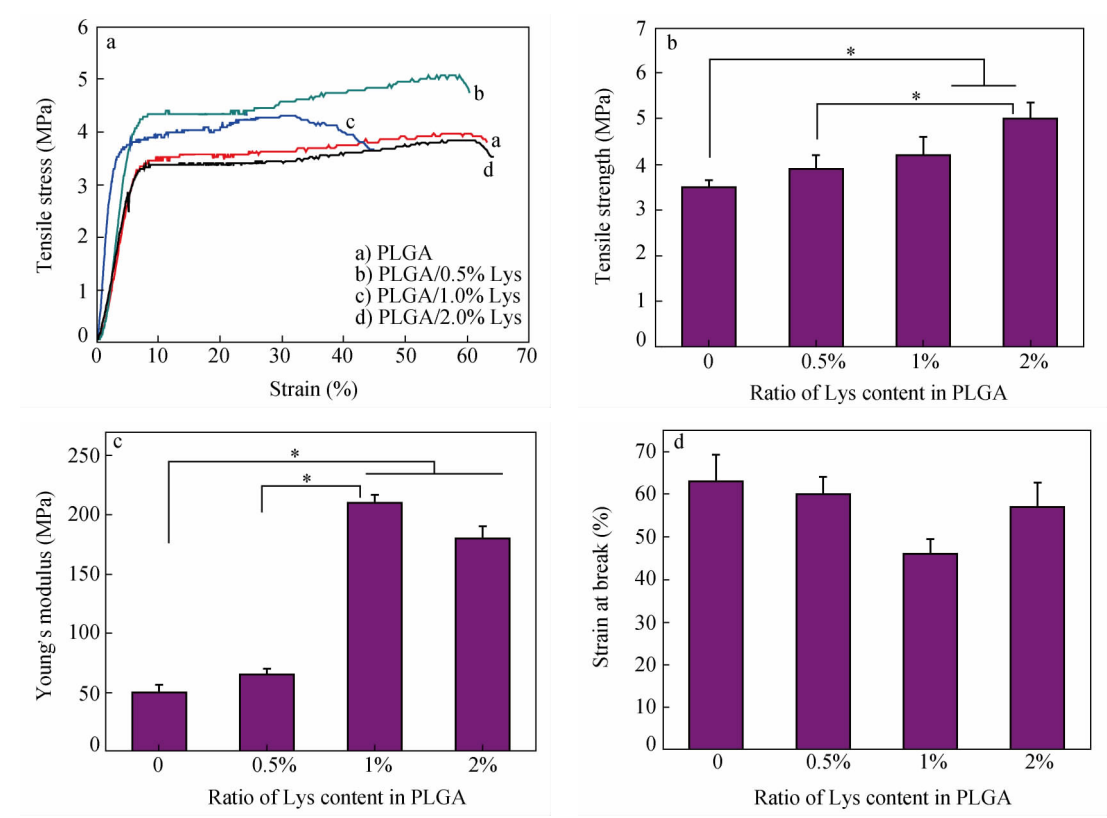


Fig. 3 Mechanical properties of the electrospun nanofibrous PLGA and PLGA/Lys membranes tested at room temperature: (a) typical stress-strain curves, (b) tensile strength, (c) Young's modulus and (d) strain at break

2.4 Lys 从 PLGA/Lys 纤维膜中释放动力学

Lys 从电纺 PLGA/Lys 纳米纤维中的释放动力学曲线如图 4 所示.可以看出,不同含量的 Lys 从电纺 PLGA/Lys 纳米纤维的释放过程都存在明显的初始突释现象,但含 2% Lys 的 PLGA/Lys 复合纳米纤维的突释现象较低.经过 25 h 后,PLGA/0.5% Lys 和 PLGA/1% Lys 复合体系均有 35% 左右的药物释放出来,而 PLGA/2% Lys 复合

体系在 25 h 后的释放量为 22.8%;随后,3 种体系均表现出缓慢释放,PLGA/0.5% Lys、PLGA/1% Lys 和 PLGA/2% Lys 的持续释放时间分别为 342 h、448 h 以及 506 h.50 ~ 100 h 期间累计释放率的变化速率基本一致,100 ~ 200 h 是 Lys 释放率较为平缓的时期.Lys 含量少的复合纳米纤维中 Lys 的释放速率大于 Lys 含量多的复合纳米纤维中 Lys 的释放速率,突释现象更为严重的原因

分析如下:(1)Lys 中的氨基与羧基对 PLGA 链段之间会形成氢键,增加了二者之间的作用力,而且随着 Lys 含量的增加,结合位点增多,作用力会增强,使氨基酸与 PLGA 结合紧密,不利于 Lys 的释放。(2)Lys 带正电荷,PLGA 带负电荷,当 Lys 含量越多时,正负电荷之间的作用力越大,使得 Lys 的释放速率降低。

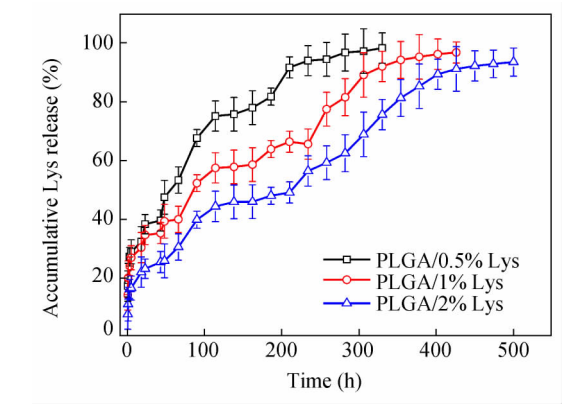


Fig. 4 Lys release profiles for the nanofibrous membranes of PLGA containing 0.5% , 1% and 2% of Lys

## 2.5 Lys 对 PLGA 纤维膜降解行为的影响

### 2.5.1 Lys 对 PLGA 纤维膜降解后形貌的影响

由图 5 可以发现,降解了 20 天的 4 种纳米纤

维虽然都发生了吸水溶胀,但还可以保持纤维的基本形貌,PLGA 表面比较平滑,其他 3 种复合纳米纤维表面已经出现了小孔,而且纤维有断裂的情况.纤维表面出现小孔有两点原因:(1)复合纤维中的 Lys 会从纤维表面释放出来,从而使纤维表面带孔,而且根据 Lys 的释放特性可以获知 20 天左右的时候 Lys 已经基本释放完全;(2)PLGA 在 PBS 缓冲液中有了初步的降解,降解程度不大,因此纤维表面的孔隙还比较小。

降解 40 天后 4 种纤维膜的形貌上较未降解时发生了较大的变化. PLGA(图 5(e))依旧可以保持纤维形貌但产生较多的纤维断裂,而 PLGA/0.5% Lys(图 5(f)), PLGA/1% Lys(图 5(g))和 PLGA/2% Lys(图 5(h))已经失去纤维形貌,并且都存在一定程度的溶胀与融合,溶胀/融合可能会使本来已经降解产生的微小孔隙又填充上,虽然仍然可以看到膜表面出现的一些小孔洞。

降解了 60 天的 4 种纳米纤维在扫描电镜下观测均已完全失去了纤维形貌,可以看到大量的孔隙形成,而且随着 Lys 含量的增加,PLGA 的降解程度是越来越大.说明 Lys 的加入有利于加快 PLGA 的降解,而且 Lys 含量越高,PLGA 降解程

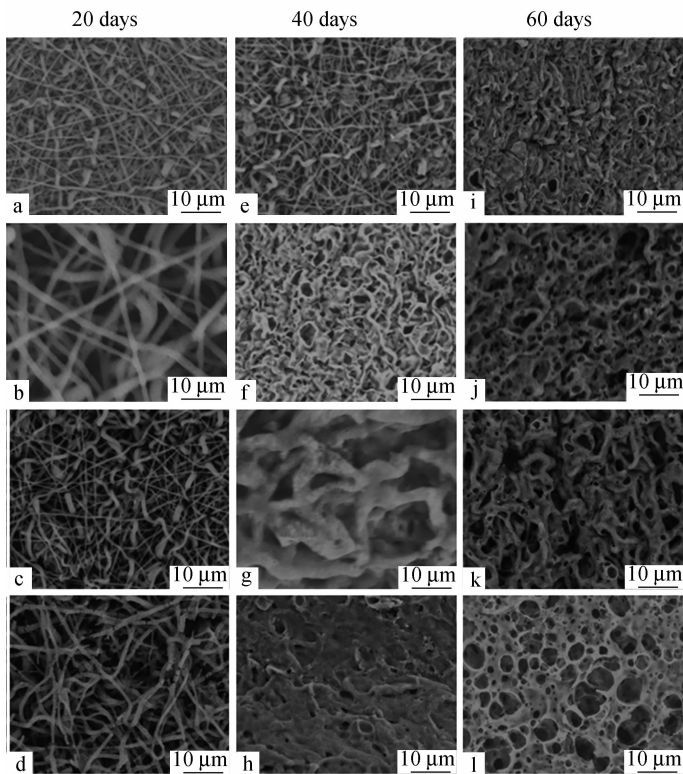


Fig. 5 SEM images of degraded fibrous PLGA and PLGA/Lys composite scaffolds after 20, 40 and 60 days of degradation: (a, e, i) PLGA, (b, f, j) PLGA/0.5% Lys, (c, g, k) PLGA/1% Lys and (d, h, l) PLGA/2% Lys

度越大. PLGA 降解速率变快的原因分析如下:  
(1)PLGA 在 PBS 缓冲液中降解的本质是酯键的水解反应. PLGA 因为降解会使纤维表面产生小通道,可以使之之前释放出的 Lys 通过孔隙进入纤维内部,Lys 为碱性添加物,即作为水解反应的催化剂,又可以与降解过程中产生的乳酸、乙醇酸反应,水解反应的化学平衡被打破,使得水解反应进行地更加完全;(2)PLGA 在降解过程中产生的酸性产物,同样可以作为水解反应的催化剂,对降解起到了自催化的作用<sup>[27,28]</sup>.

2.5.2 Lys 对 PLGA 纤维膜降解后 pH 值的影响  
本研究中,纳米纤维降解液的 pH 值是需要研究的一个重要参数,它反映了在 PLGA 中加入碱性氨基酸 Lys 来缓解 PLGA 降解过程中的集酸程度的能力大小.

由图 6 可知,Lys 的加入对 PLGA 降解过程的集酸程度有一定的缓解作用,使体系中的 pH 值降解 8 周时能维持在 7.4~6.7 之间,而 PLGA 本身降解产酸使体系 pH 值下降的幅度比较明显,降解到 8 周时,pH 值降低到 6.3.降解前 3 周,3 种复合纳米纤维 pH 值降低的幅度都不大,从第 3 周以后开始各纤维的降解液 pH 值有了大幅下降,但是对比 PLGA 来说,降低的幅度比较平缓.

因此,可以推断,随着 Lys 含量的增加,降解液 pH 值的降低越不显著,对于 PLGA 降解产酸的调节程度就越佳.

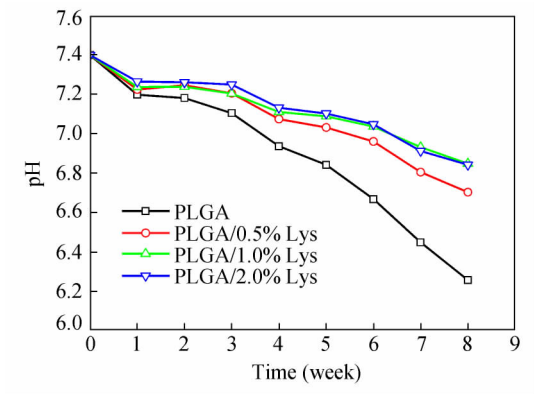


Fig. 6 Changes of pH values during PLGA and PLGA/Lys membrane degradation at 37 °C for 8 weeks

2.6 PLGA 及 PLGA/Lys 纤维膜降解液对细胞活力的影响

由图 7 中平滑肌细胞在不同培养基下培养的情况可以看出,平滑肌细胞对酸性环境十分敏感.培养第一天的时候,纯 PLGA 的降解液对细胞的损伤极大,随着培养时间的增长,从目镜观察到较多凋亡的平滑肌细胞,细胞生长状态不佳(图 7 (a), (e), (i)). 含有 Lys 的培养基中的细胞生

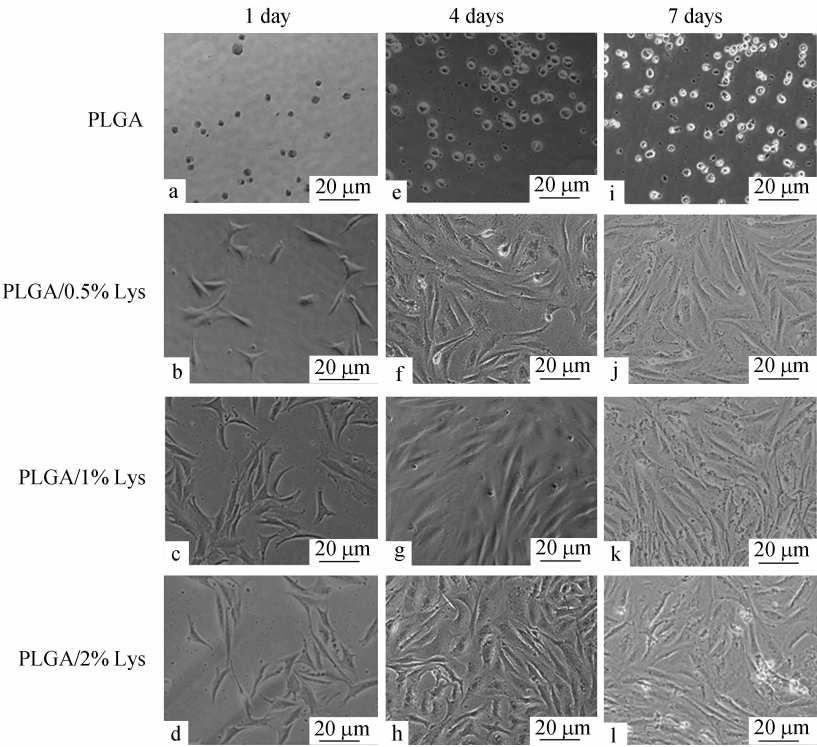


Fig. 7 Optical microscope images of smooth muscle cells cultured in the solution derived from degraded PLGA and PLGA/Lys nanofibers after 8 weeks of degradation

长情况则十分可观,PLGA 纳米纤维中 Lys 的加入不仅可以对降解过程中的集酸程度进行缓解,Lys 作为营养物质还对细胞的生长起到了促进作用.空白对照组只加了 DMEM 培养基培养细胞,一周以来的生长情况比较优良,死细胞数少(数据未显示).

定量的 MTT 细胞增殖结果(图 8)表明,除了用 PLGA 降解液培养的细胞数随着天数的递增而减少之外,其余 3 种含有 Lys 的 PLGA 降解液中培养的细胞都会有一定程度上的增殖.含 0.5% Lys 的降解液培养基中的细胞并不是依次递增

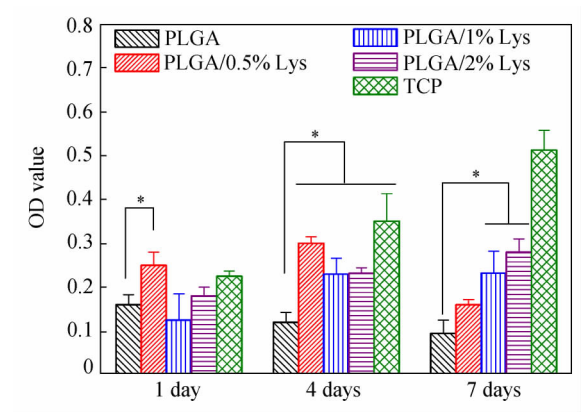


Fig. 8 MTT assay of the proliferation viability of smooth muscle cells cultured on TCP, PLGA degraded solution and PLGA/Lys degraded solutions (\*  $p < 0.05$ )

的,到了第 7 天的时候细胞数量有所下降;其余 2 种含 Lys 培养基中的细胞数目均随天数的增加而有所增加.可见,纯 PLGA 酸性降解液对细胞的增殖起到了阻碍作用,含 Lys 的 PLGA 降解液虽然也呈现弱酸性,但是 Lys 作为细胞的营养物质对细胞增殖起到的作用明显超过了弱酸性对细胞的不利影响.

3 结论

利用电纺丝技术制备出了纯 PLGA 和载 3 种浓度(0.5%、1.0%、2.0%)Lys 的 PLGA/Lys 的复合纳米纤维,制备出的纳米纤维形貌良好,平均直径在 576 ~ 947 nm 之间,随着 Lys 含量的增加,纤维直径依次减小.Lys 的引入,不利于维持 PLGA 的热稳定性.纳米纤维体外降解实验显示 Lys 的引入会促进 PLGA 的降解,使得纤维表面出现孔隙.Lys 的引入对 PLGA 降解过程的集酸程度有一定的缓解作用,使体系当中的 pH 值在研究时间范围内(8 周)均维持在 7.4 ~ 6.7 之间.利用 4 种纳米纤维降解 8 周后的降解液进行细胞培养,发现平滑肌细胞对酸性环境十分敏感,在纯 PLGA 降解液中培养的细胞数量会随培养天数的递增而降低,而降解液中含 Lys,对于细胞的增殖有促进作用.

REFERENCES

1 Li W J, Laurencin C T, Caterson E J, Tuan R S, Ko F K. J Biomed Mater Res, 2002, 60(4): 613 ~ 621

2 Sill T J, von Recum H A. Biomaterials, 2008, 29(13): 1989 ~ 2006

3 Barnes C P, Sell S A, Boland E D, Simpson D G, Bowlin G L. Adv Drug Deliver Rev, 2007, 59(14): 1413 ~ 1433

4 Pham Q P, Sharma U, Mikos A G. Tissue Eng, 2006, 12(5): 1197 ~ 211

5 Chew S Y, Wen Y, Dzenis Y, Leong K W. Curr Pharm Design, 2006, 12(36): 4751 ~ 4770

6 Kwon I K, Kidoaki S, Matsuda T. Biomaterials, 2005, 26(18): 3929 ~ 3939

7 Schindler M, Ahmed I, Kamal J, Nur-E-Kamal A, Grafe T H, Chung H Y, Meiners S. Biomaterials, 2005, 26(28): 5624 ~ 5631

8 Nisbet D R, Forsythe J S, Shen W, Finkelstein D I, Horne M K. J Biomater Appl, 2009, 24(1): 7 ~ 29

9 Li S M. J Biomed Mater Res, 1999, 48(3): 342 ~ 353

10 Athanasiou K A, Niederauer G G, Agrawal C M. Biomaterials, 1996, 17(2): 93 ~ 102

11 Cordewener F W, van Geffen M F, Joziassie A P, Schmitz J P, Bos R M, Rozema F R, Pennings A J. Biomaterials, 2000, 21(23): 2433 ~ 2442

12 Hoglund A, Malberg S, Albertsson A C. Macromol Biosci, 2012, 12(2): 260 ~ 268

13 Ji W, Yang F, Seyednejad H, Chen Z, Hennink W E, Anderson J M, van den Beucken J P, Jansen J A. Biomaterials, 2012, 33(28): 6604 ~ 6614

14 Zhao Minli(赵敏丽), Sui Gang(隋刚), Yang Xiaoping(杨小平), Deng Xuliang(邓旭亮), Hu Xiaoyang(胡晓阳). Chinese Journal of Biomedical Engineering(中国生物医学工程学报), 2006, 25(4): 476 ~ 480

15 Schiller C, Epple M. Biomaterials, 2003, 24(12): 2037 ~ 2043

16 Ara M, Watanabe M, Imai Y. Biomaterials, 2002, 23(12): 2479 ~ 2483

17 Ignatius A A, Betz O, Augat P, Claes L E. J Biomed Mater Res, 2001, 58(6): 701 ~ 709

18 Heidemann W, Jeschkeit-Schubbert S, Ruffieux K, Fischer J H, Jung H, Krueger G, Wintermantel E, Gerlach K L. *Biomaterials*, 2002, 23(17): 3567 ~ 3574

19 Quan Daping( 全大萍 ), Liao Kairong( 廖凯荣 ), Luo Binghong( 罗丙红 ), Lu Zejian( 卢泽俭 ). *J Biomedical Engineerin( 生物医学工程学杂志 )*, 2004, 21(2): 174 ~ 177

20 Zhao N, Xiong Z, Yang D, Xu L, Bai W, Xiong C. *Polymer Composites*, 2009, 30(12): 1771 ~ 1778

21 Zhou Wei( 周伟 ), Liu Bin( 刘彬 ), Dai Xiaozhen( 戴小珍 ), Zhou Chan( 周婵 ), Cai Shaoxi( 蔡绍哲 ), Sung Paul K L( 宋国立 ). *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research( 中国组织工程研究与临床康复 )*, 2008, 12(36): 7183 ~ 7186

22 Shi Guoqi( 史国齐 ), Chen Yuanwei( 陈元维 ), Qin Yingjie( 秦滢杰 ), Ding Yulong( 丁玉龙 ), Yu Xixun( 余喜讯 ), Zhang Xiaohua( 张小华 ), Wan Changxiu( 万昌秀 ). *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research( 中国组织工程研究与临床康复 )*, 2007, 11(26): 5086 ~ 5089

23 Fabian W C, Maarten F, van G, Cornelis A J, John P S, Ruud R B, Fred R R, Albert J P. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2433 ~ 2442

24 Zong X H, Kim K, Fang D F, Ran S F, Hsiao B S, Chu B. *Polymer*, 2002, 43(16): 4403 ~ 4412

25 Ge Jianhua( 葛建华 ), Lv Yupeng( 吕宇鹏 ), Li Musen( 李木森 ), Zhang Yujun( 张玉军 ), Ma Xiaobing( 马晓兵 ). *Journal of Materials Science and Engineering( 材料科学与工程学报 )*, 2010, 28(5): 684 ~ 687

26 Bao M, Zhou Q H, Dong W, Lou X X, Zhang Y Z. *Biomacromolecules*, 2013, 14(6): 1971 ~ 1979

27 Gopferich A. *Biomaterials*, 1996, 17(2): 103 ~ 114

28 Huffman K R, Casey D J. *J Polym Sci Pol Chem*, 1985, 23(7): 1939 ~ 1954

Effect of Lysine on Regulating Acidity of PLGA Nanofiber Degradation *in vitro*

Min Bao, Ya-hui Zhou, Hui-hua Yuan, Xiang-xin Lou, Yan-zhong Zhang\*  
(College of Chemistry, Chemical Engineering & Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620)

**Abstract** The objective of this study was to alleviate the acidity of PLGA nanofiber degradation *in vitro* by introducing the basic amino acid Lysine (Lys) into the PLGA nanofibers. PLGA and PLGA/Lys composite nanofibers were prepared *via* electrospinning, and the morphology, thermodynamic and mechanical properties of these nanofibers were characterized by SEM, DSC and mechanical testing, respectively. Release profiles of the Lys from the PLGA-based composite nanofibers were thereafter determined. Morphology of the degraded nanofibers and pH of the PBS solution, in which PLGA and PLGA/Lys nanofibrous mats were soaked at 37 °C for up to eight weeks, were assessed to detect the degradation behavior. Finally, cytotoxicity was performed by culturing vascular smooth muscle cells (SMCs) with fluid containing degraded product after eight weeks of degradation. It was found that the release kinetics of Lys from the electrospun PLGA/Lys nanofibers was Lys content dependent. Incorporation of Lys enhanced the degradation process of PLGA and mitigated the decrease of PBS solution pH (acidity). PLGA nanofibers containing 2% Lys are capable of maintaining the pH value between 7.4 and 6.7. Proliferation of SMCs was hindered in the presence of acidic products. But the SMCs grew well in the solution containing degraded products and Lys.

**Keywords** Poly(lactic-co-glycolic acid), Lysine, Electrospinning, Degradation, Cytocompatibility

\* Corresponding author: Yan-zhong Zhang, E-mail: yzzhang@dhu.edu.cn