

聚乳酸接枝改性纳米生物玻璃/PLGA 复合材料的制备、表面性质及生物活性

董树君^{1,2}, 于 婷², 魏俊超², 景遐斌², 周延民¹, 章培标², 陈学思²

(1. 吉林大学口腔医学院, 长春 130041;

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 高分子物理与化学国家重点实验室, 长春 130022)

摘要 以丙交酯开环聚合原位接枝改性的纳米生物玻璃(PLLA-g-BG)与聚丙交酯-乙交酯(PLGA)复合材料为研究对象,采用TGA, ESEM和EDX分析其接枝率,粒子分散性和表面元素分布,通过将兔成骨细胞种植于材料膜表面进行体外培养,采用荧光染色法、NIH Image J图像分析软件、MTT法和流式细胞术等手段检测细胞在材料表面的平均黏附数量、扩展面积比、增殖能力和细胞周期的变化,综合评价新型改性纳米复合材料的生物相容性和生物活性.结果表明,聚乳酸表面接枝改性可明显改善纳米生物玻璃粒子的团聚;PLGA中掺入一定比例的改性PLLA-g-BG可明显促进兔成骨细胞的黏附、扩展与增殖;改性纳米生物玻璃的应用可提高生物可降解聚酯材料的生物相容性和生物活性.

关键词 纳米生物玻璃;表面改性;聚丙交酯-乙交酯(PLGA);复合材料;生物活性

中图分类号 O636

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)05-1018-06

自1971年Hench等^[1]发现生物活性玻璃(Bioglass, BG)以来,由于其良好的诱导成骨能力而被广泛应用于整形外科和口腔科领域. BG一般为CaO-SiO₂-P₂O₅体系,部分含有MgO, K₂O, Na₂O, Al₂O₃, B₂O₃, TiO₂等. BG与生理溶液接触后,其中的Na⁺等离子与溶液中的H⁺迅速交换,导致局部环境pH值升高;SiO₂以Si(OH)₄的形式溶于溶液中,在界面处形成Si—OH,并在粒子表面形成富含硅溶胶的凝胶层.该层为钙磷的沉积提供了场所.开始钙磷层呈无定形状态,随着厚度和结晶尺寸的增加而转变成羟基磷灰石(HA)晶体. BG植入体内后,通过这种生物活性磷灰石层的形成而与硬组织甚至是软组织产生牢固的化学结合,且无纤维层包裹^[2].同时,其表面反应释放的可溶性硅、钙、磷和钠离子可以增强材料界面细胞的胞内和胞外反应,促进成骨细胞或其前体的增殖和分化^[3],调节成骨基因的表达以及生长因子的产生^[4-7].因此, BG具有很强的生物诱导活性,其诱导成骨的能力优于HA^[8].但是作为一种典型的无机材料, BG固有的脆性阻碍了其加工和应用.近年来,生物可吸收脂肪族聚酯材料[如聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)及其共聚物(PLGA)]作为骨组织工程支架引起广泛关注.将上述聚合物与BG纳米粒子结合,既可以利用BG的骨诱导活性,又由于聚合物的加入可以增强生物支架的力学性能.然而, BG纳米粒子由于其比表面积显著增大且表面存在大量的亲水基团,在与疏水的聚合物基体共混过程中将发生严重的团聚现象,从而在体系内形成应力集中点,当受力时将首先在该位置产生破坏,严重影响了材料的机械性能,所以复合之前对其进行表面改性是非常必要的^[9].

我们通过左旋聚乳酸(PLLA)对BG纳米粒子表面进行接枝获得到改性纳米生物玻璃(PLLA-g-BG).由于BG表面存在大量的硅羟基,因此可将其作为改性的桥梁,将聚乳酸分子引入到其表面,从而改善其界面相容性.将改性后的PLLA-g-BG与PLGA复合,能够得到力学性能优异的复合材料^[10].本文研究不同混合比例的新型改性PLLA-g-BG/PLGA纳米复合物的生物相容性和生物活性,探索其表面性质对成骨细胞黏附、扩展和增殖的影响,为其在骨组织工程中的应用提供理论依据.

收稿日期: 2009-01-13.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50673090, 50733003)和国家“八六三”计划(批准号: 2007AA03Z320)资助.

联系人简介: 周延民, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事口腔种植学科研究和临床工作. E-mail: zhouym@jlu.edu.cn

章培标, 男, 博士, 副研究员, 主要从事组织工程和生物医用高分子研究. E-mail: zhangpb@ciac.jl.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

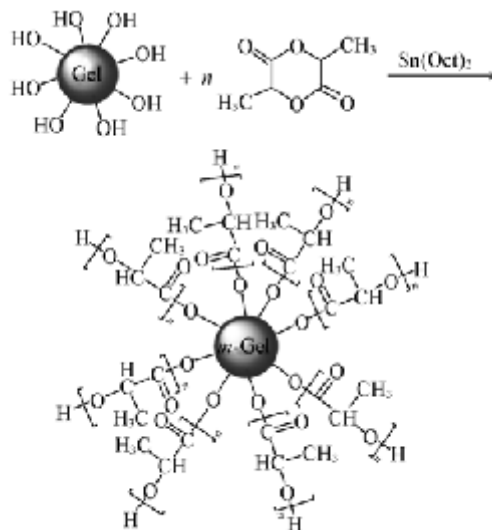
丙交酯(L-LA, 纯度 99%, Purac 公司); 辛酸亚锡(纯度 99%, Sigma 公司); Dulbecco's Modified Eagle Medium 干粉(DMEM, Gibco 公司); F12 Nutrient Mixture 干粉(F12, Gibco 公司); 标准胎牛血清(FBS, tbd); 胰蛋白酶(Gibco 公司); 异硫氰酸荧光素(FITC, Promega 公司); 噻唑兰(MTT, Solarbio 公司); 羟乙基呱嗪乙硫磺酸(HEPES, Sigma 公司). 正硅酸乙酯、磷酸氢二铵、乙酸乙酯均为国产分析纯. 热重分析仪(TGA, Q-500, TA); 场发射环境扫描电子显微镜(ESEM, XL30ESEM-FEG, FEL Company); 能量色散谱仪(EDX, Genesis2000); 荧光倒置显微镜(Nikon eclips TE2000-U); 数码摄像系统(Nikon DXM1200F); CO₂ 培养箱(SANYO); 全自动酶标仪(Thermo Multiskan MK3).

1.2 改性纳米生物玻璃/PLGA 复合物的制备

按文献[11]方法, 以正硅酸乙酯为硅源, 以磷酸氢二铵为磷源, 硝酸钙为钙源制备了直径为 40 nm 左右的纳米生物玻璃凝胶颗粒[BAG, $n(\text{SiO}_2):n(\text{CaO}):n(\text{P}_2\text{O}_5) = 37:54:9$].

改性生物玻璃合成路线如 Scheme 1 所示^[11].

将 10 g 纳米生物玻璃凝胶颗粒加入干燥的安瓶中, 于 90 °C 真空干燥 4 h, 在氮气保护下将 10 g 丙交酯加入安瓶, 同时加入 100 mL 甲苯和 0.01 g 催化剂辛酸亚锡, 在 120 °C 下开环聚合, 反应 48 h. 反应产物用氯仿洗涤多次, 回收固体产物并在 50 °C 下真空干燥 24 h, 得到表面接枝聚乳酸的生物玻璃(PLLA-g-BG). PLLA [分子量 80000 ~ 100000, $n(\text{LA}):n(\text{GA}) = 8:2$] 由长春应用化学研究所合成. 采用溶液法将 PLLA-g-BG 与 PLGA 按不同混合比共混, 制备质量分数分别为 10%, 20% 及 40% 的 PLLA-g-BG/PLGA 纳米复合材料, 并以 PLGA 为对照材料. 将上述材料分别溶于氯仿, 制成 1% 氯仿溶液, 铺膜于已硅化的方形盖玻片(24 cm × 24 cm) 和圆形盖玻片(直径 1.5 cm) 上, 真空干燥 48 h 后备用, 以未硅化的盖玻片(Glass)为对照. 新生乳兔由吉林大学基础动物实验中心提供.



Scheme 1 Modification process of the bioactive glass gel

1.3 材料的表征

1.3.1 热重分析(TGA) 改性生物玻璃的 PLLA 的接枝量采用热重分析(TGA) 进行确定. 测试在空气气氛中将样品从室温以 10 °C/min 的速度上升到 700 °C, 所用样品一般为 10 mg 左右.

1.3.2 ESEM 和 EDX 测定 采用 ESEM 观察 PLLA-g-BG 粒子的分散性, 同时, 分别采用 ESEM 和 EDX 对不同混合比例的 PLLA-g-BG/PLGA 复合物膜进行表面形貌观察和表面元素分析.

1.4 成骨细胞培养

采用组织块培养法, 取 24 h 内出生乳兔, 脱颈处死, 用体积分数为 75% 酒精浸泡消毒 5 min 后, 用 PBS 清洗 3 次, 置于大平皿内. 在无菌条件下切开头部皮肤及皮下组织, 完全显露颅骨, 将整块颅骨剪下, 将其修剪成 1 mm × 1 mm 的小块, 均匀分散于一次性塑料培养皿内, 晾干, 10 min 后缓慢加入 5 mL 的 DMEM/F12(体积比 1:1)(含 20% 胎牛血清、10 mmol/L HEPES、60 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 培养液, 注意勿使骨块漂浮, 尽量使其贴于皿底, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内培养, 每隔 2 d 更换新鲜培养液. 原代培养至细胞长满骨块间隙后, 吸出培养液, 转移骨块, 用 PBS 液洗涤 3 次后加入 0.25% 的胰蛋白酶消化并进行传代. 本实验所用细胞均为第三代兔成骨细胞.

1.5 材料的细胞黏附性

将涂有不同混合比例的 PLLA-g-BG/PLGA 薄膜的方形玻片放入 6 孔培养板中, 以 PLGA 和未涂膜

的方形玻片作为对照,紫外照射灭菌 60 min,以 5×10^4 个/孔接种兔成骨细胞,于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 7 d. 隔日换液,用荧光倒置显微镜定期观察细胞状态. 在第 1 天、第 2 天、第 3 天和第 7 天用异硫氰酸荧光素 (FITC) 对玻片上的细胞进行荧光染色,数码摄像系统拍摄细胞荧光照片,每种材料拍摄 9 张. 用 Image Tool 及 NIH Image J 软件分析细胞在材料表面的平均黏附数量和细胞面积比.

1.6 材料对细胞的增殖效应

按上述方法将涂膜的圆形玻片放入 24 孔培养板中,每组 3 个平行样,紫外灭菌 60 min,以 2×10^4 个/孔接种兔成骨细胞,于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 7 d,隔日换液,用荧光倒置显微镜定期观察细胞状态. 分别于第 3 天和第 7 天取出培养板,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 $100 \mu\text{L}$,放置培养箱中继续孵育 4 h 后弃去培养液. 每孔添加 $750 \mu\text{L}$ 盐酸异丙醇溶液 (0.4 mol/L),于培养箱内孵育 30 min,吹打混匀后每孔取 $200 \mu\text{L}$ 移入 96 孔培养板中,用全自动酶标仪在 540 nm 处检测各孔光吸收值.

1.7 复合材料对细胞周期的影响

取第三代生长良好的兔成骨细胞按上述方法以 5×10^4 个/孔接种于预先置入方形玻片的 6 孔培养板中,于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 7 d,隔日换液. 7 d 后,用 0.25% 胰蛋白酶将细胞消化制成单细胞悬液,转移至离心管中, 1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 PBS 悬浮细胞. 加入预冷的 95% 乙醇溶液,于 4°C 固定 30 min, 1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 PBS 离心洗涤 2 次,最后保留 $100 \mu\text{L}$ 的细胞悬液. 然后,加入 RNAase $100 \mu\text{L}$,于 37°C 水浴 40 min, 4°C 终止反应. 加入 50 mg/L 的碘化丙啶 (PI) $400 \mu\text{L}$, 4°C 染色 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期分布.

实验数据以 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 表示,用 SPSS 11.5 软件 ($P < 0.05$) 进行统计学处理.

2 结果与讨论

2.1 PLLA-g-BG 的接枝率

从图 1 的 TGA 分析结果可见,改性前的 BG 纳米颗粒升温后存在 3% 左右的热失重,可能与微量水分蒸发和合成过程中残留的有机物成分分解有关;接枝改性以后,在 300°C 附近出现了一个大的失重平台,为 PLLA-g-BG 颗粒表面的 PLLA 热分解所致. 由于聚合反应后的反应产物已经用氯仿反复洗涤,已经去除了吸附在粒子表面的 PLLA,因此,经计算可以得出 PLLA-g-BG 的接枝率为 13% .

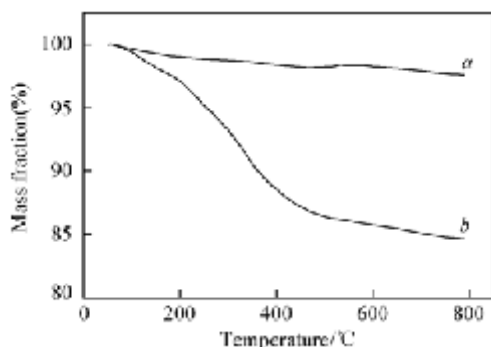


Fig. 1 TGA curves of BG (a) and PLLA-g-BG nanoparticles (b)

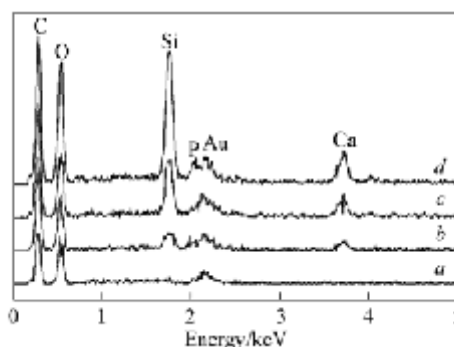


Fig. 2 Energy spectra of PLGA (a), 10% PLLA-g-BG/PLGA (b), 20% PLLA-g-BG/PLGA (c) and 40% PLLA-g-BG/PLGA (d)

2.2 PLLA-g-BG/PLGA 的表面元素分析和表面形貌

表面元素能谱分析结果 (图 2) 显示,与单纯的 PLGA 相比, PLLA-g-BG/PLGA 复合材料由于掺入了 PLLA-g-BG 纳米粒子,材料表面含有较丰富的 Si, Ca, P 等有利于矿化和成骨的元素. 随着复合物中 PLLA-g-BG 纳米粒子含量的增加,膜表面的上述 3 种元素相对比例也随之显著增加.

从扫描电镜照片 (图 3) 可以看到,采用溶液法将改性后的 PLLA-g-BG 纳米粒子与 PLGA 复合后,无机粒子可均匀地分散在 PLGA 膜表面. 与纯 PLGA 相比, PLLA-g-BG/PLGA 膜由于掺入了改性纳米粒子而形成了均匀的粗糙表面. 随 PLLA-g-BG/PLGA 中粒子含量的增加,材料表面的粗糙度明显增加. 在氯仿溶液中,未接枝改性的 BG 纳米粒子局部团聚现象明显,而经 PLLA 接枝改性后,其团聚现

象明显改善, 分散较均匀^[12]. 研究表明, 一定粗糙度的材料表面将有利于成骨细胞的黏附和生长^[12].

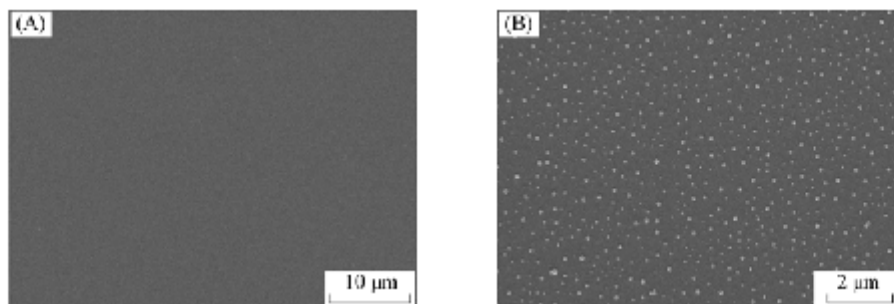


Fig. 3 SEM images of thin films of PLGA(A) and 40% PLLA-g-BG/PLGA(B)

2.3 材料的细胞黏附和扩展

理想的组织支架材料除了要求无细胞毒性, 还需要具备良好的界面性质, 有利于细胞的黏附和迁移^[12]. 通过在材料表面直接种植成骨细胞, 可以反映细胞与材料界面直接接触后的相互作用关系. 从图 4 的 FITC 荧光染色细胞图片可见, 兔成骨细胞于接种后 4 h 开始贴壁, 细胞略小呈圆形, 个别细胞展开成多角形; 12 h 后贴壁细胞明显增多; 3 d 后细胞黏附良好, 胞体充分展开, 有大量的细胞集落形成, 呈簇状生长; 7 d 后可见细胞增殖显著, 细胞集落进一步扩大. 细胞平均黏附数量分析结果显示, 12 h 时实验组的成骨细胞黏附数量均高于对照组. 其中, 20% PLLA-g-BG/PLGA 的细胞黏附数量最多, 10% PLLA-g-BG/PLGA 次之, 40% PLLA-g-BG/PLGA 的细胞黏附数量最少. 24 h 后实验组保持此种变化趋势, 但 40% PLLA-g-BG/PLGA 细胞黏附数量增加的幅度明显较其它组别少(见图 5).

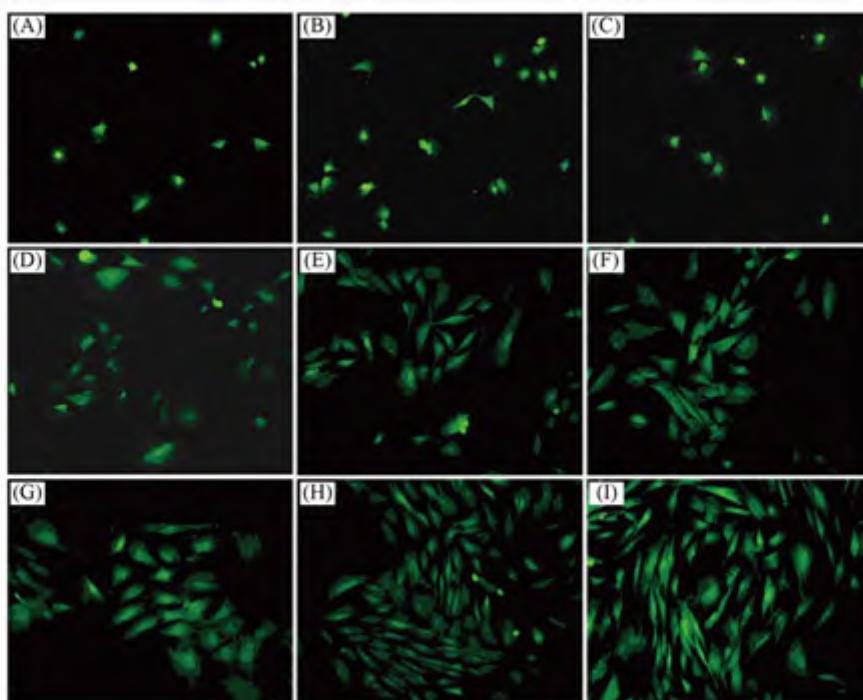


Fig. 4 Fluorescent photographs of osteoblasts adhered on the thin films of PLGA[(A), (D), (G)], 10% PLLA-g-BG/PLGA[(B), (E), (H)], 20% PLLA-g-BG/PLGA[(C), (F), (I)] cultured *in vitro* for 1 d[(A)–(C)], 3 d[(D)–(F)], and 7 d[(G)–(I)]

细胞面积比是细胞在材料表面黏附和扩展的综合评价指标. 经 NIH Image J 软件分析结果表明, 接种 1 d 时实验组细胞面积比均高于对照组; 3 d 时接枝改性的 PLLA-g-BG/PLGA 组细胞面积比增加明显, 其中 20% PLLA-g-BG/PLGA 成骨细胞的黏附面积最大; 到 7 d 时持续这种变化趋势, 20% PLLA-g-BG/PLGA 细胞面积比最大, 10% PLLA-g-BG/PLGA 次之, 40% PLLA-g-BG/PLGA 成骨细胞的黏附面积比最小(见图 6). 上述结果表明, 实验组各材料均有良好的细胞黏附性, 10% ~ 20% 的

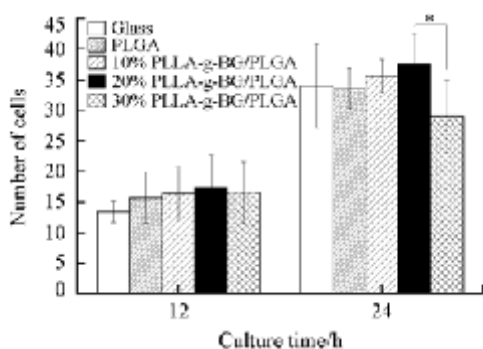


Fig. 5 Number of osteoblasts adhered on the thin films of different materials for 12 and 24 h (* $P < 0.05$)

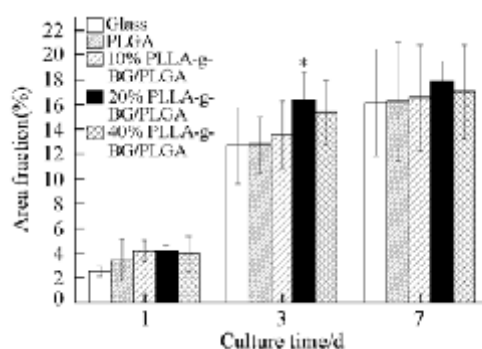


Fig. 6 Area fraction of osteoblasts cultured on the thin films of different materials for 1, 3 and 7 d (* $P < 0.05$)

PLLA-g-BG/PLGA有利于细胞的黏附和扩展, 而 PLLA-g-BG 含量过高反而会影响细胞的黏附性. 其可能机制与不同含量的 BG 纳米粒子在材料表面形成粗糙性、亲疏性和元素含量等界面性质不同有关. 含有过高钙磷元素的材料可加速成骨细胞的分化, 而减缓成骨细胞的增殖速度.

2.4 材料对细胞的增殖效应

MTT 法检测结果表明, 细胞培养后 3 d, PLLA-g-BG/PLGA 复合材料的 OD 值均高于对照组 PLGA 和 Glass, 其中以 10% 和 20% PLLA-g-BG/PLGA 的细胞增殖情况最好. 随着细胞培养时间的增长, 于培养后 7 d 各组 OD 值均有不同程度升高, 其中 20% PLLA-g-BG/PLGA 的细胞增殖最为明显 (见图 7). MTT 法的检测结果与上述的细胞黏附和扩展检测结果基本一致. 表明一定混合比例复合材料内的改性纳米生物玻璃不仅有利于成骨细胞的黏附和扩展, 还具有显著的促增殖作用 (见图 7).

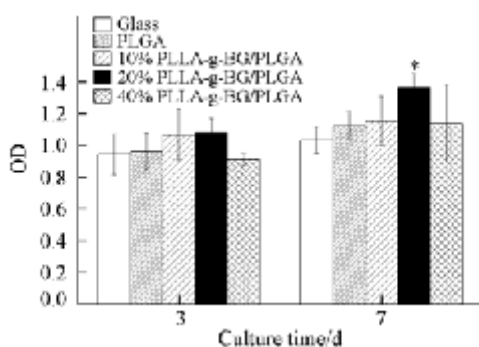


Fig. 7 MTT test of OD value histogram of osteoblasts cultured on different materials for 3 and 7 d (* $P < 0.05$)

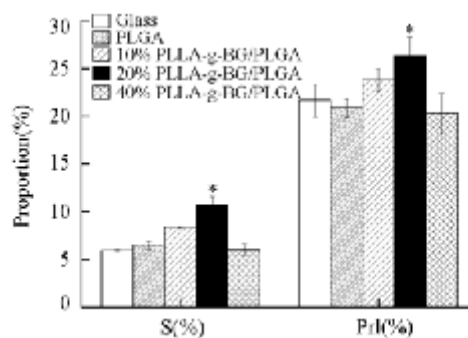


Fig. 8 FCM analysis of S(%) and PrI(%) of osteoblasts cultured on different materials for 7 d (* $P < 0.05$)

2.5 细胞周期分析

细胞的黏附及增殖是一个复杂的行为, 取决于材料的生物相容性和生物活性, 与材料表面的活性基团、亲疏性、离子释放以及表面形貌等众多因素有关. 为了进一步探讨新型复合材料对成骨细胞增殖影响的可能机制, 本实验还采用流式细胞术检测分析了在不同材料表面生长的兔成骨细胞的细胞周期. 一个完整的细胞周期包括: (1) G_1 期为 DNA 合成前期, 为下一步 DNA 复制和蛋白合成做准备; (2) S 期为 DNA 合成期, S(DNA 合成期细胞所占百分比)值越高, 则分裂活力强处于增殖旺盛的细胞比例越高; (3) G_2 期为 DNA 合成后期, 蛋白质和 RNA 在此期合成; (4) M 期为有丝分裂期. $(S + G_2 + M)$ 增殖指数 (PrI) 代表了细胞群体中增殖期细胞的数量, 在一定程度上可反映细胞的增殖状态. 流式细胞仪检测结果见图 8. 培养 7 d 时, 实验组中 10% 和 20% PLLA-g-BG/PLGA 成骨细胞的 S 值均升高, 其中以 20% PLLA-g-BG/PLGA 最为明显 ($P < 0.05$); 反映细胞增殖活力的增殖指数 PrI 值 ($S + G_2 + M$) 也以 10% 和 20% PLLA-g-BG/PLGA 的升高最明显, 其中 20% PLLA-g-BG/PLGA 组与其它各组比较具有显著差异 ($P < 0.05$). 40% PLLA-g-BG/PLGA 的 S 值和 PrI 值均与 PLGA 组接近, 但明显低于 20% PLLA-g-BG/PLGA. 上述结果表明, PLLA-g-BG 含量对复合材料的细胞增殖能力影响主要是改变了成

骨细胞的细胞周期. 良好的材料界面缩短了细胞的 G_1 期, 促使处于 G_1 静止期的细胞向 S 期细胞转变, 使核酸和蛋白质合成增加, 加强细胞分裂活动, 从而促进细胞的增殖.

综上所述, 通过掺入合适比例的改性纳米生物玻璃, 可改善聚酯类材料的表面界面性质, 使之更有利于成骨细胞在材料表面的生长和增殖, 提高了聚酯类材料的生物活性.

参 考 文 献

- [1] Hench L. L. , Splinter R. J. , Allen W. C. , *et al.* . Biomed. Mater. Res. Symp. [J] , 1971 , **2** : 117—141
- [2] Hench L. L. . Bioceramics Am. Ceram Soc. [J] , 1998 : 1705—1728
- [3] YANG Yan(杨艳) , YAN Shi-Feng(颜世峰) , LI Xiao-Xiu(李孝秀) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2008 , **29** (11) : 2294—2298
- [4] Hench L. L. , Polak J. M. . Third-generation Biomedical Materials Science[J] , 2002 , **295**(5557) : 1014—1017
- [5] Xynos I. D. , Hukkanen M. V. , Batten J. J. , *et al.* . Calcif Tissue Int. [J] , 2000 , **67**(4) : 321—329
- [6] Xynos I. D. , Edgar A. J. , Buttery L. D. , *et al.* . Biochem. Biophys. Res. Commun. [J] , 2000 , **276**(2) : 461—465
- [7] Gao T. , Aro H. T. , Ylanen H. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2001 , **22**(12) : 1475—1483
- [8] Xynos I. D. , Edgar A. J. , Buttery L. D. , *et al.* . Biomed. Mater. Res. [J] , 2001 , **55**(2) : 151—157
- [9] Jones J. R. , Hench L. L. . Mater. Sci. Tech. [J] , 2001 , **17** : 891—900
- [10] Wei G. B. , Ma P. X. . Biomaterials[J] , 2004 , **19** : 4749—4757
- [11] Liu A. X. , Hong Z. K. , Zhuang X. L. , *et al.* . Acta Biomater. [J] , 2008 , **4** : 1005—1015
- [12] Anselme K. . Biomaterials[J] , 2000 , **21**(7) : 667—681

Preparation, Surface Properties and Biological Activity of the Composite of Poly(lactide-co-glycolide) and Bioglass Nanoparticles Surface Grafted with Poly(L-lactide)

DONG Shu-Jun^{1,2}, YU Ting², WEI Jun-Chao², JING Xia-Bin², ZHOU Yan-Min^{1*},
ZHANG Pei-Biao^{2*}, CHEN Xue-Si²

(1. Stomatological School of Jilin University, Changchun 130041, China;

2. State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ gel bioglass (BG) nanoparticles with the diameter of 40 nm were synthesized by sol-gel approach. The surface of BG nanoparticles was grafted through the ring-open polymerization of the L-lactide to yield poly(L-lactide) (PLLA) grafted gel particle (PLLA-g-BG). The PLLA-g-BG was further blended with poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) to prepare the nanocomposites of PLLA-g-BG/PLGA with the various blend ratios of two phases. PLLA-g-BG accounted 10%, 20% and 40% in the composite, respectively. TGA, ESEM and EDX were used to analyze the graft ratio of PLLA-g-BG, the dispersion of nano-particles and the surface elements of the composites respectively. The rabbit osteoblasts were seeded and cultured on the thin films of composites *in vitro*. The cell adhesion, spreading and growth of osteoblasts were analyzed with FITC staining, NIH Image J software and MTT assay. The change of cell cycle was monitored by flow cytometry (FCM). The results demonstrated that the surface modification of BG with PLLA could significantly improve the dispersing of the particles in the matrix of PLGA. The nanocomposite with 20% PLLA-g-BG exhibited superior surface properties, including roughness and plenty of silicon, calcium and phosphorus, to enhance the adhesion, spreading and proliferation of osteoblasts. Our results indicate that the application of PLLA-g-BG with a certain blend ratio can improve the bioactivity and biocompatibility of biodegradable polyester.

Keywords Bioglass nanoparticle; Surface grafting; Poly(Lactide-co-glycolide) (PLGA); Nanocomposite; Bioactivity (Ed.: D, Z)