

电活性可生物降解纳米复合材料 PAP/op-HA/PLGA 的制备及成骨活性

邬海涛^{1,2}, 于 婷³, 朱庆三², 焦自学¹, 危 岩⁴, 章培标¹, 陈学思¹

(1. 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;

2. 吉林大学第一医院, 长春 130021;

3. 吉林大学第二医院, 长春 130041; 4. 清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 以苯胺五聚体(AP)与聚乳酸(PLA)的三嵌段共聚物(PAP)与表面接枝低聚乳酸的纳米羟基磷灰石(op-HA)和聚丙交酯-乙交酯(PLGA)的复合物共混, 制备了电活性可降解纳米复合材料 PAP/op-HA/PLGA, 采用紫外-可见光谱、循环伏安扫描和标准四探针法分析其电化学特性及电导率. 采用 ESEM 观察其膜表面形貌, 用接触角评价其亲水性. 通过在材料膜表面接种兔成骨细胞进行体外培养, 采用荧光染色、NIH Image J 图像分析和 Real-time PCR 综合评价细胞在材料表面的黏附、扩展(细胞面积比)和成骨相关基因的表达水平, 以此评价新型电活性纳米复合骨修复材料 PAP/op-HA/PLGA 的表面性质和生物活性. 结果表明, PAP/op-HA/PLGA 的电导率较低(5×10^{-6} S/cm), 但具有良好的电化学氧化还原性能, PAP 质量分数为 0.1% 时, 材料的亲水性明显改善, 成骨细胞的黏附和扩展明显增强. 培养 7 d 时骨形态蛋白-2(BMP-2)和骨连接蛋白(Osteonectin)的基因表达水平明显提高, 而对 I 型胶原蛋白的基因表达无明显影响. 表明 PAP/op-HA/PLGA 具有良好的细胞相容性和成骨活性.

关键词 苯胺五聚体; 嵌段共聚物; 纳米羟基磷灰石; 聚丙交酯-乙交酯; 导电高分子; 成骨活性

中图分类号 O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2011)05-1181-07

近年来, 导电高分子以其特有的电化学和物理性质, 以及在生物传感器、神经探针、药物释放的调节器、引发器及自氧化剂等生物医学方面的潜在应用而备受关注^[1]. 从 20 世纪 90 年代初开始, 国外很多学者已经探索聚吡咯(PPy)在组织工程领域中的应用^[2,3]. Wong 等^[3]证明了导电高分子能够有效地控制哺乳细胞的形状和生长, 并研究了其生物相容性及对细胞的刺激响应能力. 然而, 作为一种组织工程支架材料, 目前限制导电高分子应用的一个关键问题是其不可降解性. 材料在体内停留时间过长, 会引起组织免疫反应. 因此, 发展生物可降解导电高分子材料是非常有意义的工作.

聚苯胺(PANi)性质稳定, 合成简便, 是一种非常有前途的导电高分子材料. 聚苯胺及其衍生物可作为生物相容性的基质材料, 使心肌成肌细胞(H9c2)和膀胱嗜铬肿瘤细胞(PC12)在其上能够良好地黏附、生长和分化^[4,5]. 将苯胺低聚体与脂肪族聚酯形成共聚物, 可以得到既有导电性又能生物降解的材料, 同时由于脂肪族聚酯具有良好的生物相容性, 使共聚物材料的生物相容性得到提高^[6,7]. 另外, 目前聚苯胺等导电高分子材料用于神经细胞和心肌细胞的诱导研究较多, 而对成骨细胞生长和分化影响的研究报道较少.

本文根据文献[7,8]中的方法先合成既有电活性又可生物降解的苯胺五聚体(AP)与聚乳酸(PLA)的三嵌段共聚物(PAP)和低聚乳酸接枝修饰的纳米羟基磷灰石(op-HA), 然后将 PAP 与 op-HA 和聚丙交酯-乙交酯(PLGA)的复合物共混, 形成电活性可降解纳米复合骨修复材料 PAP/op-HA/PLGA. 通过物理化学表征和成骨细胞培养, 研究其作为骨组织工程修复材料的潜在应用.

收稿日期: 2010-12-07.

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

联系人简介: 章培标, 男, 博士, 副研究员, 主要从事生物高分子研究. E-mail: zhangpb@ciac.jl.cn

朱庆三, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事骨科基础与临床研究. E-mail: drzqs@yahoo.com.cn

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

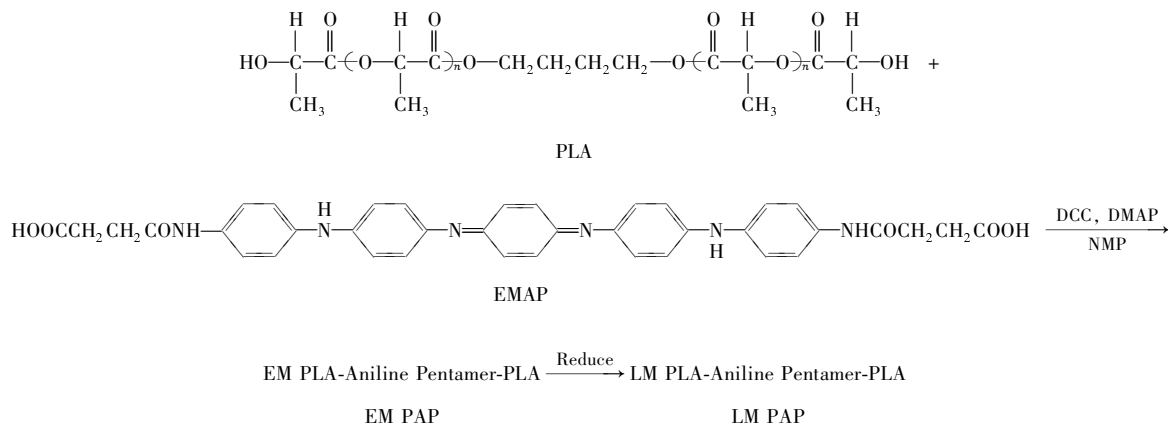
噻唑兰(MTT, Solarbio 公司); 异硫氰酸荧光素(FITC, Sigma 公司); RNA 提取试剂盒(Promega 公司); 逆转录试剂(Promega 公司); Real-time PCR 试剂(Stratagene 公司); *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF, 分析纯, 北京化工厂); 樟脑磺酸(CSA, 纯度 98%, Aldrich 公司).

场发射环境扫描电子显微镜(ESEM, XL30ESEM-FEG, FEL 公司); UV-2401 谱仪(日本岛津公司); CHI-630 电化学分析仪(美国 CHI 公司); 实时定量 PCR 仪(Real-time PCR, Stratagene 公司); 荧光倒置显微镜(Eclips TE2000-U, Nikon 公司); 数码摄像系统(DXM1200F, Nikon 公司); CO₂ 培养箱(Sanyo 公司); 全自动酶标仪(Thermo Multiskan MK3).

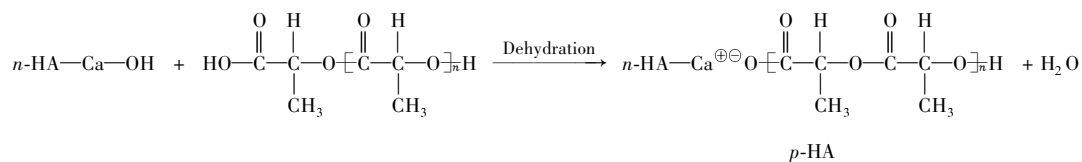
实验用乳兔为出生 24 h 内新西兰大白兔, 由吉林大学基础动物实验中心提供.

1.2 复合原料及 op-HA/PLGA 材料的制备

三嵌段共聚物 PAP 按文献[6,7]的方法制备. 其化学反应式如下:



op-HA 纳米粒子的合成与表面修饰参照文献[8,9]的方法进行. 其化学反应式如下:



PLGA(LA:GA 摩尔比为 8:2) 通过丙交酯(LA) 和乙交酯(GA) 在辛酸亚锡催化下开环聚合获得, 其黏均分子量为 85000.

op-HA/PLGA 纳米复合材料参照文献[8]的方法制备.

1.3 PAP/op-HA/PLGA 及其膜的制备

采用溶液法将 PAP 与 op-HA/PLGA 复合, 制备 PAP/op-HA/PLGA 电活性纳米复合材料. 首先将 PAP 和 op-HA/PLGA 分别溶于氯仿制成 0.06 g/mL 溶液; 然后将 PAP 按 0.1% 与 1% (质量分数) 分别加入 op-HA/PLGA 中, 磁力搅拌, 超声振荡, 使之充分混匀, 然后在无水乙醇中沉降, 得到固体复合材料. 将其置于通风橱中 24 h, 待溶剂挥发, 残余溶剂用真空泵抽提 48 h, 得到 PAP/op-HA/PLGA 纳米复合材料.

将不同 PAP 含量的 PAP/op-HA/PLGA 与 op-HA/PLGA 复合材料分别溶于氯仿中, 制成 1% 氯仿溶液, 一部分铺于硅化的方形盖玻片(2.4 cm × 2.4 cm) 上, 另一部分铺在玻璃平皿中, 自然干燥后揭膜. 将玻片材料和膜材料分别于真空干燥 48 h, 备用.

1.4 PAP/op-HA/PLGA 的表征

用紫外-可见分光光度计(UV-2401) 检测材料的紫外-可见(UV-Vis) 光谱; 用 CHI-630 电化学分析仪测定循环伏安(CV) 曲线, 扫描速率为 100 mV/s, 样品被涂在薄的 ITO 玻璃表面作为工作电极,

Ag/Ag⁺ 为参比电极; 电导率由标准四探针法测定, 记录电压随电流变化, 由 $\sigma = (2.44 \times 10/S) \times (I/E)$ 计算得到电导率(σ), 其中, I 为电流, E 为测得的电压值, S 为样品面积. 样品最终的电导率为 3 次所测电导率的平均值; 用场发射扫描电镜(ESEM)进行表面形貌分析; 用装有 CCD 相机的 DSA. 10 液滴形状分析仪(德国 Krüss 公司)测定水在玻片膜材料表面的接触角. 每次滴加的水滴体积为 2 μ L, 用相机捕捉液滴的瞬间形态, 接触角由分析软件读取.

1.5 兔成骨细胞在材料表面的生长形态及黏附性实验

采用改良的组织块原代培养法^[9]分离培养兔成骨细胞.

分别将涂有 op-HA/PLGA, 0.1% PAP/op-HA/PLGA 和 1% PAP/op-HA/PLGA 的方形盖玻片与对照组未硅化的玻片(Glass)放入 6 孔培养板中, 用紫外光照射灭菌 40 min, 在材料上接种兔成骨细胞, 密度为每孔 5×10^4 个细胞, 于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 条件下培养. 每 2 d 更换新鲜培养液. 分别培养 24 和 72 h 后, 取出玻片, 用 PBS 洗涤 3 次后用 FITC 进行荧光染色, 在荧光倒置显微镜下观察细胞荧光照片, 并进行细胞计数, 采用 NIH Image J 软件分析细胞面积比参数(即细胞着色面积占图片面积的百分数).

1.6 实时定量逆转录-聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测成骨细胞基因的表达

按上述方法在 3 种材料表面培养兔成骨细胞, 培养 7 d 后用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 再进行反转录得到 cDNA. 参考 Genbank 序列按照引物设计原则设计 4 种基因的引物, 其引物序列见表 1.

Table 1 Sequences of primers of the genes

Gene	Primer sequence	Gene	Primer sequence
GAPDH	F: 5'-GATGGTGAAGGTCGGACTG-3'	BMP-2	F: 5'-GAAGCAAGGTGTCTCCAAG-3'
	R: 5'-TGTAAGTGGAGGTCAATGAATGG-3'		R: 5'-TCCGCTGTTGTGTTTCG-3'
Collagen-I	F: 5'-CTCGCTCACCACCTTCTC-3'	Osteonectin	F: 5'-ACCGAAGAGGAAGTAGTGG-3'
	R: 5'-TAACCACTGCTCCACTCTG-3'		R: 5'-AAGAAGTGGCAGGAGGAG-3'

每个样品设 3 个平行样, 用 Real-time PCR 进行扩增反应. 反应条件: 预变性温度 95 $^{\circ}$ C, 2 min; 解链温度 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 退火温度 54 $^{\circ}$ C, 20 s; 延伸温度 72 $^{\circ}$ C, 10 s. 数据用 MxPro 软件进行分析, 以样品的目的基因浓度除以内参基因的浓度, 即为此样品基因的相对含量.

1.7 统计学分析

使用统计学软件 Origin 8.0 进行数据处理. 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示统计学差异显著.

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见光谱(UV-Vis)分析

图 1(A) 为 0.1% PAP/op-HA/PLGA 在 DMF 中不同氧化及掺杂态的紫外-可见光谱. 还原态(LM) PAP/op-HA/PLGA 只在 ~ 330 nm 处有 1 个峰, 对应的是 AP 嵌段中苯环的 $\pi-\pi^*$ 跃迁. 中间氧化态(EM) PAP/op-HA/PLGA 共聚物中, 除了在 ~ 330 nm 处的峰外, 在 ~ 601 nm 处还有 1 个峰, 对应的苯环向醌环转化过程中的 $\pi_b-\pi_q$ 跃迁. EM PAP/op-HA/PLGA + CSA 是 EM op-HA/PLGA 经 CSA 掺杂后

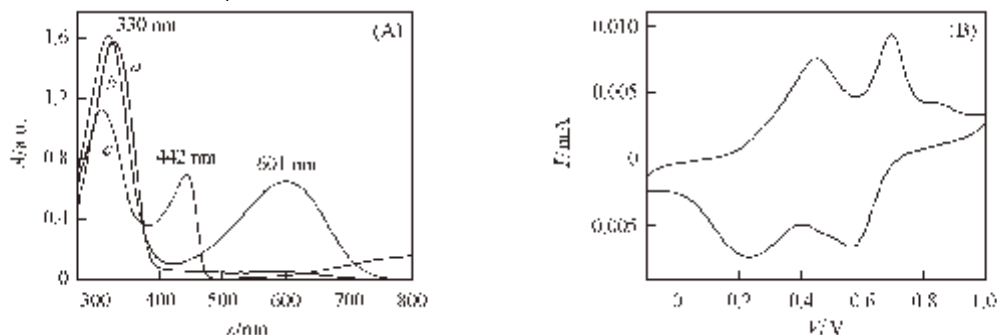


Fig. 1 UV-Visible absorption spectra (A) and cyclic voltamogram (B) of PAP/op-HA/PLGA (mass fraction, 0.1%)

a. LM PAP/op-HA/PLGA; b. EM PAP/op-HA/PLGA; c. EM PAP/op-HA/PLGA + CSA.

的特征吸收谱. 随着 CSA 掺杂量的增加, 共聚物溶液的颜色从深蓝色逐渐变为亮绿色, 谱图中也在 $\sim 442 \text{ nm}$ 处出现新峰, 说明 PAP 共聚物有一定的导电率.

2.2 循环伏安 (CV) 曲线

施加一定的电压或者用氧化还原剂处理后, 嵌段共聚物 PAP 具有 3 种不同的状态, 分别是还原态 (LM)、中间氧化态 (EM) 和高氧化态 (PN). 还原态 PAP (LM PAP) 中的 AP 嵌段有 5 个苯环. 中间氧化态 PAP (EM PAP) 的 AP 嵌段中的 1 个苯环被氧化成醌环, 因此有 4 个苯环和 1 个醌环. 而当共聚物 AP 嵌段中的 2 个苯环被氧化成醌环时, PAP 处于高氧化态, 简称为 PN PAP, 它的 AP 嵌段有 3 个苯环和 2 个醌环. 这 3 种氧化状态可以相互转化^[7]. 这种相互转化关系在 PAP/op-HA/PLGA 的循环伏安谱图中得以充分体现 [图 1(B)]. 图中第一对氧化还原峰对应的是 PAP/op-HA/PLGA 的 LM 和 EM 态的相互转化, 其氧化还原电位为 0.34 V; 第二对氧化还原峰对应的是 PAP/op-HA/PLGA 的 EM 和 PN 态的相互转化, 对应的氧化还原电位为 0.63 V. 这 3 种氧化状态可以相互转化证明了 PAP/op-HA/PLGA 具有良好的电活性.

2.3 电导率

PAP/op-HA/PLGA 经 CSA 掺杂后测得的电导率与 PAP 类似, 均为 $5 \times 10^{-6} \text{ S/cm}$, 处于半导体水平; 而纯的 AP 经 1 mol/L HCl 掺杂后测得的电导率约为 10^{-2} S/cm . PAP 中含有少量导电成分 AP, 使其具有导电性能; 由于含有大量非导电成分 PLA, 所以和纯 AP 的电导率相比, PAP 电导率下降很多. PAP 掺入至 op-HA/PLGA 后的复合材料, 其电导率没有发生明显改变.

2.4 膜形貌分析

图 2 为 op-HA/PLGA, 0.1% PAP/op-HA/PLGA 和 1% PAP/op-HA/PLGA 3 种膜材料表面的 ESEM 形貌. 由于掺入了 op-HA 纳米粒子, op-HA/PLGA 膜表面粗糙, 部分纳米粒子聚集形成大的颗粒物 ($1 \sim 2 \mu\text{m}$) [图 2(A)]; 加入 PAP 后, 膜表面的颗粒物明显减少, 呈现高低不平的皱褶样表面结构 [图 2(B)]. 随着 PAP 含量增加, 膜表面趋于平坦. PLA 的引入提高了 AP 段的溶解性, 使 PAP 溶解分散性能增强. 因此推测具有电活性 PAP 的加入可能改变了 op-HA 纳米粒子的表面电荷, 使其在聚合物溶液中的分散性增强, 导致材料表面更加平整 [图 2(C)].

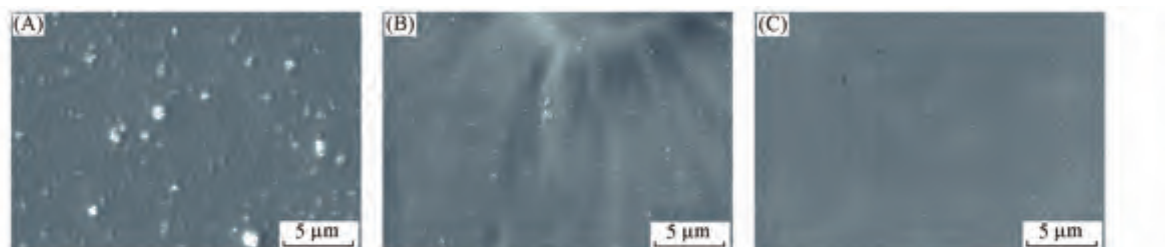


Fig. 2 ESEM images of op-HA/PLGA (A), 0.1% PAP/op-HA/PLGA (B) and 1% PAP/op-HA/PLGA (C)

2.5 接触角分析

op-HA/PLGA, 0.1% PAP/op-HA/PLGA 和 1% PAP/op-HA/PLGA 的膜表面接触角分别为 93° , 80° 和 91° (图 3). 0.1% PAP/op-HA/PLGA 与其它两种材料之间有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明 PAP 掺入量为 0.1% 时, 膜表面亲水性得到明显改善. 当 PAP 含量增加至 1% 时, 其亲水性明显下降, 但仍略低于 op-HA/PLGA ($P > 0.05$). 前期研究发现, EM PAP 的亲水性高于 LM PAP^[10], 虽然本文所用的是 EM PAP, 但由于 op-HA 释放的 OH^- 使其还原转变为 LM PAP, 所以随着 PAP 含量的增高, 材料的亲水性下降. 而 0.1% PAP/op-HA/PLGA 亲水性的增高可能还与膜表面形貌的改变有关.

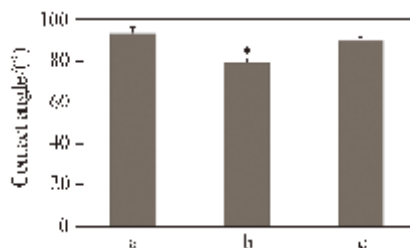


Fig. 3 Water contact angles on the films of op-HA/PLGA (a), 0.1% PAP/op-HA/PLGA (b) and 1% PAP/op-HA/PLGA (c)

* $P < 0.05$.

2.6 细胞形态及黏附能力

成骨细胞的 FITC 荧光染色图见图 4. 结果显示, 接种后 24 h 时, 各组材料表面均有大量细胞贴壁, 细胞略小呈圆形或多角形; 培养 72 h 时, 各组的贴壁细胞数量均明显增多, 胞体充分展开, 转变为多角形, 细胞呈集落性生长. 根据图 5 所示的培养 24 h 时细胞黏附数量分析, 材料组的细胞数明显多于 Glass 组 ($P < 0.05$); PAP/op-HA/PLGA 组 (0.1% PAP 和 1% PAP) 的细胞数明显多于 op-HA/PLGA 组, 且 0.1% PAP/op-HA/PLGA 与 op-HA/PLGA 相比有显著性差异 ($P < 0.05$). 与 0.1% PAP/op-HA/PLGA 相比, 1% PAP/op-HA/PLGA 组的细胞数略有下降, 但两组间无显著性差异 ($P > 0.05$).

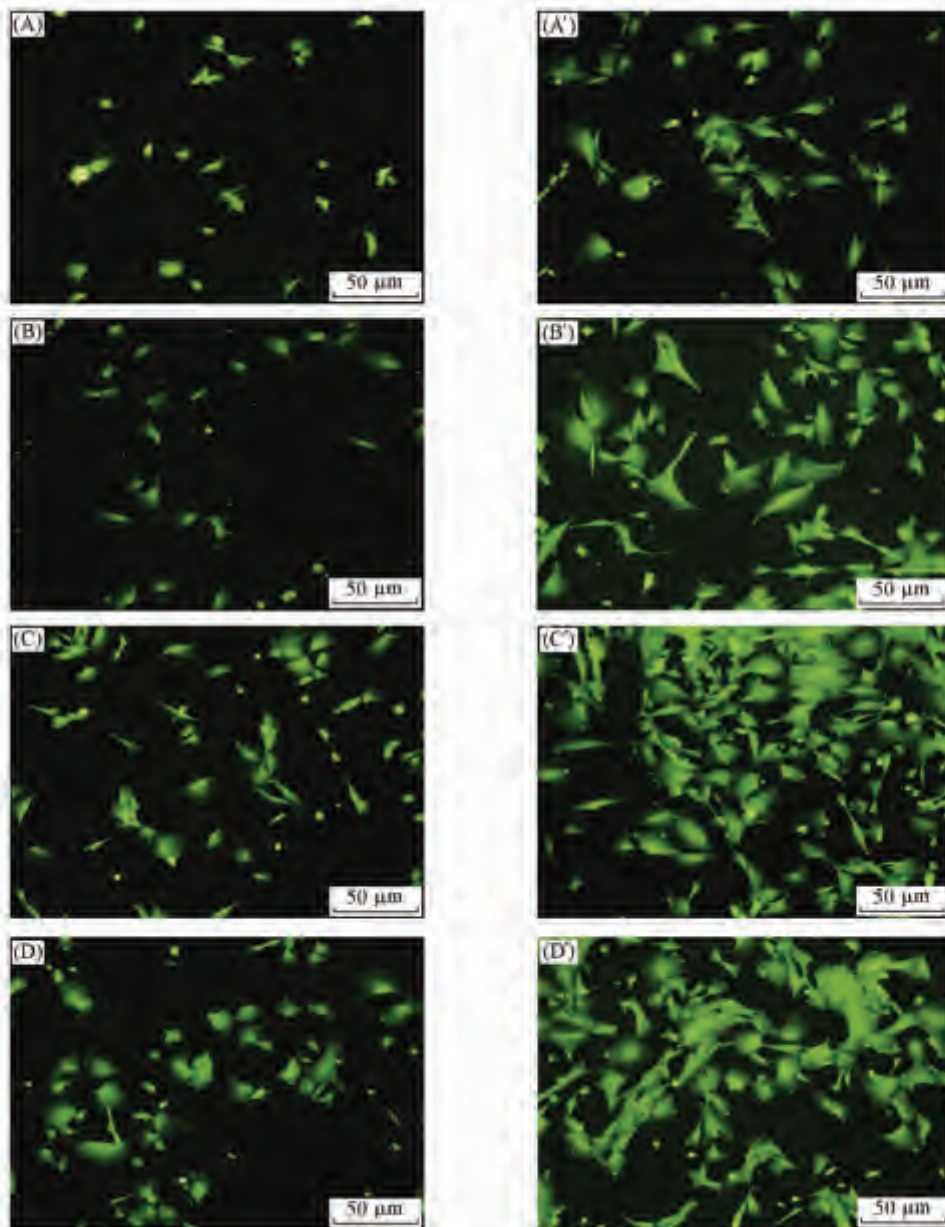


Fig. 4 FITC fluorescent micrographs of osteoblasts growing on the surfaces of Glass (A, A'), op-HA/PLGA (B, B'), 0.1% PAP/op-HA/PLGA (C, C') and 1% PAP/op-HA/PLGA (D, D') at 24 h (A—D) and 72 h (A'—D') after cell seeding

通过细胞面积比评价细胞在材料表面黏附和扩展. NIH Image J 图像分析(图 6)结果表明, 培养 24 h 时, 导电材料组的细胞面积百分比高于 op-HA/PLGA 和 Glass 组, 其中 0.1% PAP/op-HA/PLGA 组与 op-HA/PLGA 和 Glass 组之间有显著性差异 ($P < 0.05$). 培养 72 h 时, 各组的细胞面积百分比均明显增高, 其中 3 种材料组均高于 Glass 组 ($P < 0.05$), 而导电材料组虽然稍高于 op-HA/PLGA 组, 但结

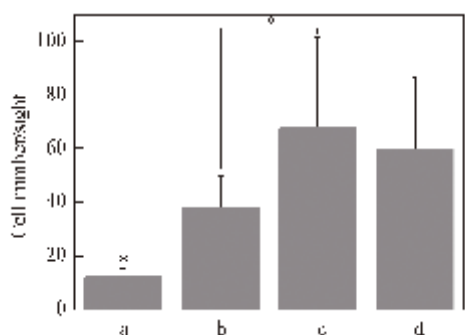


Fig. 5 Cell adhesion of osteoblasts on the surfaces of Glass (a), op-HA/PLGA (b), 0.1% PAP/op-HA/PLGA(c) and 1% PAP/op-HA/PLGA(d) after cultured for 24 h

* $P < 0.05$.

果没有显著性差异($P > 0.05$).

结果表明, 0.1% PAP/op-HA/PLGA 有利于成骨细胞的早期黏附和扩展, 其可能的机制是 PAP 的掺入改善了复合材料的表面形貌, 提高了材料的亲水性.

2.7 基因表达

骨形态蛋白(BMP-2)是诱导成骨活性最强的一种骨形态发生蛋白, 其生物学作用主要是促进成骨细胞的增殖, 诱导成骨^[11]. 骨连接蛋白(Osteonectin)可促进细胞外基质的合成, 增加骨基质沉积率, 在启动矿化过程中和促使矿物质在胶原成分上的沉积有重要的作用^[11]. 本实验结果表明, 成骨细胞在材料表面培养 7 d 后 PAP/op-HA/PLGA 的 BMP-2 和 Osteonectin 表达量高于 op-HA/PLGA, 有显著性差异($P < 0.05$), 结果如图 7 所示.

I 型胶原蛋白(Collagen-I)^[12]是钙盐沉着和细胞附着的支架, 胶原纤维约占骨基质有机物的 95%, 其中 Collagen-I 约占 90%. Collagen-I 从增殖期开始表达, 基质合成期达到高峰. 在成骨细胞增殖期, 成骨细胞数量增加, 形成多层细胞, 并合成、分泌 I 型胶原蛋白以便最终可以矿化形成骨结节. 本实验中, 成骨细胞在材料表面培养 7 d 后 PAP/op-HA/PLGA 的 Collagen-I 表达量高于 op-HA/PLGA, 但没有显著性差异($P > 0.05$).

PAP/op-HA/PLGA 复合材料由于掺入了具有电活性的 PAP, 通过增强细胞之间的信号传递, 在一定时期内提高了成骨细胞的相关基因表达水平. 由于成骨细胞在骨形成过程中与 BMP-2, Collagen-I 和 Osteonectin 等相关基因的表达和调控密切相关. 由此推测 PAP/op-HA/PLGA 具有良好的成骨活性.

综上所述, 新型电活性可降解纳米复合材料具有一定的电导率及良好的氧化还原性能, PAP 引入膜材料的表面形貌发生改变, 亲水性明显改善, 由细胞学实验可以看出, PAP/op-HA/PLGA 能够提高细胞黏附性和增殖能力, 并且上调骨形态发生蛋白-2、I 型胶原蛋白和骨连接蛋白的基因表达水平. 因此推测该类材料主要通过其独特的电学活性, 加强了成骨细胞之间的信号传递, 影响成骨基因的表达, 从而促进成骨细胞的生长、分化和骨基质形成.

参 考 文 献

[1] Guimard N., Gomez N., Schmidt C. Progress in Polymer Science[J], 2007, 32: 876—921

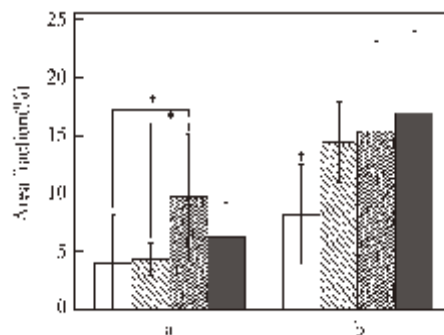


Fig. 6 Cell area fraction of osteoblasts on the surfaces of Glass, op-HA/PLGA and PAP/op-HA/PLGA after cultured for 24 h(a) and 72 h(b)

* $P < 0.05$. — Glass; ▨ op-HA/PLGA; ▩ 0.1% PAP/op-HA/PLGA; ■ 1% PAP/op-HA/PLGA.

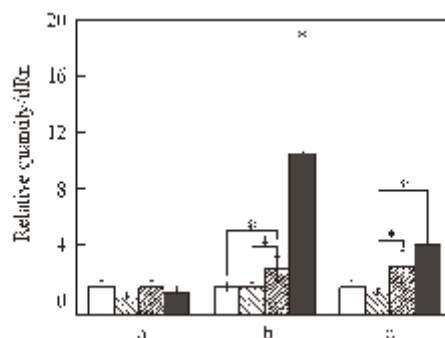


Fig. 7 Collagen-I (a), BMP-2(b) and osteonectin(c) gene expression of osteoblasts grown on different materials analyzed with quantitative Real-time PCR after cultured for 7 d

— Glass; ▨ op-HA; ▩ 0.1% PAP/op-HA/PLGA; ■ 1% PAP/op-HA/PLGA. * $P < 0.05$.

- [2] Richardson R. T., Thompson B., Moulton S., Newbold C., Lum M. G., Cameron A., Wallace G., Kapsa R., Clark G., O'Leary S. . *Biomaterials*[J], 2007, **28**(3): 513—523
- [3] Wong J. Y., Langer R., Ingber D. E. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*[J], 1994, **91**: 3201—3204
- [4] Li M. Y., Guo Y., Wei Y., MacDiarmid A. G., Lelkes P. I. . *Biomaterials*[J], 2006, **27**(13): 2705—2715
- [5] Guterman E., Cheng S., Palouian K., Bidez P., Lelkes P., Wei Y. . *Polym. Prepr. [J]*, 2002, **43**: 766—767
- [6] HUANG Li-Hong(黄利红), HU Jun(胡军), ZHUANG Xiu-Li(庄秀丽), MA Jia(马嘉), CHEN Xue-Si(陈学思), JING Xia-Bin(景遐斌), GUO Yi(郭毅), LI Meng-Yan(李梦燕), Lelkes P. I., WEI Yan(危岩). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2005, **26**(9): 1771—1773
- [7] Huang L., Hu J., Lang L., Wang X., Zhang P., Jing X., Wang X., Chen X., Lelkes P. I., MacDiarmid A. G., Wei Y. . *Biomaterials*[J], 2007, **28**: 1741—1751
- [8] YU Ting(于婷), LIU Ya(刘娅), WANG Yu(王宇), JING Xia-Bin(景遐斌), ZHANG Pei-Biao(章培标), CHEN Xue-Si(陈学思). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2009, **30**(7): 1439—1444
- [9] Cui Y., Liu Y., Cui Y., Jing X., Zhang P., Chen X. . *Acta Biomaterialia*[J], 2009, **5**: 2680—2692
- [10] Huang L., Zhuang X., Hu J., Lang L., Zhang P., Wang Y., Chen X., Wei Y., Jing X. . *Biomacromolecules*[J], 2008, **9**(3): 850—858
- [11] Takagi M., Kamiya N., Takahashi T., Ito S., Hasegawa M., Suzuki N., Nakanishi K. . *Journal of Molecular Histology*[J], 2004, **35**: 81—90
- [12] El-Amin S. F., Lu H. H., Khan Y., Burems J., Mitchell J., Tuan R. S., Laurencin C. T. . *Biomaterials*[J], 2003, **24**(7): 1213—1221

Preparation and Osteogenesis Activities of Electroactive Biodegradable Nanocomposites PAP/op-HA/PLGA

WU Hai-Tao^{1,2}, YU Ting³, ZHU Qing-San^{2*}, JIAO Zi-Xue¹,
WEI Yan⁴, ZHANG Pei-Biao^{1*}, CHEN Xue-Si¹

(1. *Key Laboratory of Polymer Ecobiomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China*; 2. *First Hospital*, 3. *Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China*;
4. *Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract The electroactive biodegradable nanocomposites PAP/op-HA/PLGA were prepared by blending a triblock copolymer PLA-b-AP-b-PLA (PAP) of polylactide (PLA) and aniline pentamer (AP) with oligomeric lactic acid-surface grafted hydroxyapatite (op-HA)/poly(lactide-co-glycolide) (PLGA). The electrochemical properties and conductivity were characterized using UV-Vis spectroscopy, cyclic voltammetry and standard four-probe method. The film's surface morphology was displayed by ESEM and the contact angle was measured to evaluate the film's hydrophilicity. Rabbit's osteoblasts were cultured *in vitro* on the film surface. For comprehensively evaluating surface properties and biological activity of the new electroactive nanocomposites PAP/op-HA/PLGA for bone repair, cell adhesion and cell spreading (cell area fraction) were determined using fluorescein isothiocyanate dyeing and NIH Image J software analysis, and gene expression levels were detected using real-time PCR. The results show that PAP/op-HA/PLGA composites have good electrochemical redox property and low conductivity ($\sim 5 \times 10^{-6}$ S/cm). With the mass fraction of 0.1% PAP, the hydrophilicity of composites was improved, the adhesion and expansion of osteoblasts were enhanced, and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and bone junction protein (osteonectin) gene expression levels were increased, significantly. In conclusion, PAP/op-HA/PLGA composites have good biocompatibility and osteogenic activity.

Keywords Aniline pentamer; Block copolymer; Nano-hydroxyapatite; Poly(lactide-co-glycolide); Conductive polymer; Osteogenic activity (Ed.: D, Z)