

· 实验研究论著 ·

一种新型光交联的聚酯弹性体的制备及其性能研究

彭松林 何同忠 陈欣 陈高扬 王尚 龙灿玲 谭宝玉

【摘要】 目的 制备一种生物相容性良好的光交联的聚酯弹性体材料,探究其力学性能以及细胞相容性。方法 通过熔融缩聚方法合成含有双键、可降解的亲疏水片段聚合物,并引入无机纳米颗粒制备有机-无机一体化的复合聚酯弹性体材料(聚辛二醇-柠檬酸-衣康酸)。利用核磁共振氢谱(Hydrogen-1 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, H^1 -NMR)、力学分析仪、流变仪研究聚酯弹性体的结构、抗压以及粘弹性能。研究该弹性体对特立帕肽(PTH)的包载和释放,并研究其药物释放特性和体外生物相容性。结果 H^1 -NMR 结果表明弹性体中含有双键,可以实现光交联固化,压缩模量约为 23 MPa,且具有稳定的粘弹性能,其储能模量约为 90 kPa。体外细胞实验表明,该材料具有良好的生物相容性,通过负载 PTH 药物,前期呈快速释放,随后减慢,总释放率达 60%。结论 本研究制备的有机-无机复合弹性体具有优良的力学性能和良好的生物相容性可实现细胞在其表面生长,同时可作为某些药物的载体,有望成为一种良好的骨缺损修复支架材料。

【关键词】 聚酯弹性体;力学性能;生物相容性;药物载体

Preparation and properties of a novel photo-crosslinked polyester elastomer. PENG Song-lin, HE Tong-zhong, CHEN Xin, CHEN Gao-yang, WANG Shang, LONG Can-ling, TAN Bao-yu. Department of Spine Surgery, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: TAN Bao-yu, E-mail: 984774258@qq.com

【Abstract】 Objective To prepare a polyester elastomer with good biocompatibility, and study the mechanical properties and cell affinity. **Methods** The organic-inorganic composite elastomer material scaffold was first synthesized by melting polycondensation to prepare the biodegradable hydrophobic segment which had double bond and inorganic nanoparticles. Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectrometry (H^1 -NMR), mechanical analyzer and rheometer were used to study the structure, compressive and viscoelastic properties of polyester elastomer. The inclusion and release of the elastomer to PTH, and its biocompatibility and drug release characteristics *in vitro* were studied. **Results** H^1 -NMR results showed that the elastomer contained double bonds, which endowed photo-crosslinking curing. The prepared polyester elastomer had a high compression modulus of about 23 MPa and stable viscoelastic energy as its energy storage modulus could reach about 90 kPa. *In vitro* cells experiment showed that the material had good biocompatibility. The PTH drug was loaded and released rapidly in the early stage, then slowed down, with a total release rate of 60%. **Conclusion** The organic-inorganic composite elastomer prepared in this study has excellent mechanical properties and good biocompatibility, which can realize the growth of cells on the surface, and can also be used as some drug carriers, and is expected to be a good scaffold material for bone defect repair.

【Key words】 Polyester elastomer; Mechanical property; Biocompatibility; Drug carriers

骨质疏松是 21 世纪面临的最严重的老龄问题之一^[1-4],骨质疏松病人骨量和骨密度持续降低,骨微观结构退化^[5]且很难愈合,是造成老年人生活质量下降的主要原因之一。长期不愈合的骨折还会导致畸形。部分病人长期卧床,会造成骨质疏松进一

步加剧,并出现褥疮等一系列并发症。严重的并发症如肺衰竭等甚至会导致死亡。因此,骨质疏松引起的骨折问题不容忽视。近些年来,骨组织工程学的迅速发展在骨再生领域得到广泛的研究和认同,开发新型骨修复材料成为骨组织工程中的研究重点,如何更好地建立生物材料和原生骨之间的联系,治疗骨质疏松骨折,是如今骨组织材料的重要研究方向。

局部注射骨水泥在一段时期内受到一定的关注,但由于骨水泥注射时流动性不佳,无法降解,不

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2020.05.016

基金项目:深圳市科创委项目(JCYJ20180305164659637, JCYJ20180305164544288, JSGG20180504170427135, SGLH20180625-141602256)

作者单位:深圳市人民医院脊柱外科,广东深圳 518020

通信作者:谭宝玉, E-mail: 984774258@qq.com

具备生物活性,因此仍未取得突破性进展^[6]。因此开发满足理想条件的骨修复材料具有重要的研究意义。聚酯弹性体由于其自身良好的生物降解性及可调控的力学性能被广泛应用于骨组织工程中^[7-9]。本研究制备了一种兼具优良力学性能和生物相容性的光交联聚酯弹性体,即聚辛二醇-柠檬酸-衣康酸,拟探究其力学性能以及细胞相容性。

材料与amp;方法

一、实验设备及试剂

主要设备:万能力学试验机(Shimadzu公司,日本),高速低温台式离心机(Beckman Coulter公司,美国),电子分析天平(Mettler Toledo公司,瑞士),恒温磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司,中国),电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司,中国),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,中国),细胞培养箱(ESCO公司,新加坡),荧光倒置显微镜(Leica公司,德国),全自动酶标仪(Biotek公司,美国),核磁共振谱仪(JNM ECS 300,Jeol公司,日本),流变仪(Discovery,DHR-2,TA仪器公司,美国)。

主要试剂:1,8-辛二醇、柠檬酸、衣康酸、铈-羟基磷灰石(Sigma试剂公司,美国);二氧六环、无水乙醇(阿拉丁试剂公司,中国)。

二、聚酯弹性体的制备

(一)通过高温缩聚反应制备亲疏水片段聚合物

将1,8-辛二醇和柠檬酸按照3:2的摩尔比例放入250 ml的三颈烧瓶中,将其放入油浴锅中,温度调至160~165℃,通入氮气,待物质完全熔解之后,将油浴锅的温度调至140℃,继续反应3 h。反应结束后加入100 ml无水乙醇使其完全溶解,再用超纯水按照1:1的比例使高分子预聚物沉淀下来,用10 000 rpm/min的离心速度离心10 min,保留沉淀。沉淀离心重复三次。放入40℃真空干燥箱中去除残留水分,得到纯化的亲疏水片段聚合物。

(二)亲疏水片段聚合物的双键化

将衣康酸加入制备得到的亲疏水片段聚合物中,N₂保护下,高温充分搅拌均匀。然后在140℃条件下反应3 h,得到双键化的亲疏水片段聚合物。衣康酸占亲疏水片段聚合物的质量分数为5%。

(三)聚辛二醇-柠檬酸-衣康酸的制备

将89%的双键化的亲疏水片段聚合物(亲水片段为衣康酸和柠檬酸,疏水片段为1,8-辛二醇),1%的光引发剂I2959,10%的铈-羟基磷灰石,超声90 s混匀,紫外灯下照射10 min(2焦耳)成型。

三、聚酯弹性体的性能测试

(一)聚酯弹性体分子量测试和结构分析

结构分析通过测试核磁共振图谱来表征。聚酯弹性体溶解在二甲基亚砜-d₆(DMSO-d₆)中,置于5 mm外径管中,使用250 MHz核磁共振谱仪进行¹H-NMR分析。¹H-NMR谱图的化学位移以百万分之一(ppm)记录,相对于四甲基硅烷(TMS,0.00 ppm)作为内部参考。

(二)聚酯弹性体的力学性能测试

利用模具将聚酯弹性体制成直径6 mm、高12 mm的圆柱。采用力学试验机装置进行聚酯弹性体的压缩试验,力学试验机用恒定十字头速率(20 mm/min)向下压缩试样,得到形变-负载曲线。当圆柱体破裂或已达上屈服点时停止。压缩模量为应力-应变曲线的斜率。

(三)聚酯弹性体的流变性能测试

流变性能通过流变仪进行测试。将制备好的聚酯弹性体片材置于台上,进行频率扫描时,其设置的参数为温度37℃,应变为1%,频率为0.1~100 Hz。进行温度扫描时,其设置的参数为应变1%,频率为10 Hz,温度范围0~100℃。

(四)聚酯弹性体负载特立帕肽(PTH)药物的研究

将制备好的聚酯弹性体圆柱(直径6 mm、高12 mm)浸泡于浓度为5 mg/ml的PTH溶液中24 h,随后取出聚酯弹性体,利用ELISA试剂盒检测溶液中PTH的浓度。通过浸泡前后的浓度变化来计算PTH的吸附量。其次,再将已吸附PTH的弹性体浸泡在5 ml的中性PBS中,37℃下在第1、2、3、4、5、6、7、11 d时分别取1 ml上清液并补给同等量的PBS,所取的上清液置于离心管中待测。包载量计算公式为:(测试浓度-5 mg/ml)/5 mg/ml×100%。

四、聚酯弹性体的生物相容性研究

将小鼠成肌细胞(C2C12细胞)复苏后更换DMEM培养基进行扩大培养,待细胞密度达90%时,将细胞从培养瓶壁消化至悬液中,用细胞计数板在显微镜下将细胞以1×10⁴个/cm²的浓度稀释在DMEM培养基(含10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素)中备用。将聚酯弹性体制成圆片状(直径为1 cm,厚度为5 mm),浸泡在75%乙醇2 h灭菌后,PBS洗涤3次,随后铺在12孔培养板底部,将细胞的培养基悬液加入培养板中,并置于5% CO₂、37℃饱和湿度的培养箱中进行培养。观察细胞在培养第1天和第3天时的生长情况,利用MTS增殖检测试剂盒及

Calcein-AM/PI/活死染色法探究聚酯弹性体对细胞的生长状况,其步骤主要参照产品说明书进行操作。

MTS 具体操作为:以正常的细胞培养板作为对照,以聚酯弹性体为实验组,培养 1、3 d 后检测细胞活力。将培养板从培养箱中取出,弃培养基后更换 200 μl 新培养基,并同时加入 40 μl celltiter 液体,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 2 h。将此时的培养基转移至 96 孔板中,每孔 100 μl ,整个过程需避光,尽量不产生气泡,将转移培养基后的培养板放入酶标仪,在 490 nm 吸光度处进行测量。

Calcein-AM/PI/活死染色法具体步骤为:在 5 ml 的 PBS 溶液中加入 10 μl Calcein-AM 储存液和 15 μl PI 储存液,混匀备用。将培养 1、3 d 后的细胞用 Trypsin-EDTA 消化,离心收集细胞,加入 PBS 制备细胞悬液。取 100 μl 染色工作液与 200 μl 细胞悬液混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15 min。在 (490 \pm 10) nm 激发波长下同时观察黄绿色荧光的活细胞和红色荧光的死细胞。

五、聚酯弹性体/PTH 对人骨髓间充质干细胞(hMSCs 细胞)生长状况的影响

首先将 PTH 溶于 PBS 中,配置成浓度为 4 mg/ml 的溶液,制备好的聚酯弹性体浸泡于 PTH 溶液中。浸泡 24 h 后,采用步骤 3 中的方法,先将聚酯弹性体在 12 孔培养板底部,随后将 hMSCs 细胞均匀铺种于上述培养板上并置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的培养箱中,细胞密度为 2×10^5 个/ cm^2 ,观察细胞的生长情况。采用 Calcein-AM/PI 法观察 hMSCs 的生长状况。其操作同上。

六、统计学分析

本文中实验所收集得到的原始数据运用美国 OriginLab 公司的 Origin 9 软件进行统计学分析处理并根据数据结果绘制图表。

结 果

一、聚酯弹性体的结构分析

从核磁共振图谱图 1 中,可知通过高温缩聚制备得到的聚合物含有碳碳双键(5.5~6.25 ppm),同时具有成骨活性的柠檬酸也成功地接枝在聚酯分子上了(2.5~2.8 ppm)。

二、聚酯弹性体的力学性能分析

由衣康酸($M_w=130$),1,8 辛二醇($M_w=146$)以及柠檬酸($M_w=192$)以 2:5:3 的比例制备的聚酯弹性体其抗压模量高达 23 MPa。其次通过流变分析来看,图 2 a 中,聚酯弹性体的 G' 和 G'' 随频率的增大而增

大,表明其具有很好的粘弹性,且在高温下变化不大(图 2 b),粘弹性能较稳定。

三、聚酯弹性体负载 PTH 药物的研究

通过测试吸附前后 PTH 的浓度差来确定 PTH 在弹性体中的包载量。根据计算公式得出 PTH 的包载量为 75%。随后通过 ELISA 试剂盒检测弹性体中 PTH 的累积释放量如图 3 所示。从图中可以看出,前 3 d PTH 释放比较快,累积释放率达到 50% 左右;在第 7 天到第 11 天之间变化不大,说明 PTH 在第 7 天时释放已达到饱和。

四、聚酯弹性体的生物相容性分析

图 2 c 为通过 MTS 测定 C2C12 细胞在聚酯弹性体环境下的细胞活性,可以看出,在培养第 1 天和第 3 天时,细胞存活率能达到 70% 以上,尤其是在第三天,细胞存活率接近 100%。表明所制备的聚酯弹性体具有良好的生物相容性。此外通过 Calcein-AM/PI/活死染色法进一步证明细胞在聚酯弹性体表面仍具有良好的细胞形态(图 4 b)。

五、聚酯弹性体对 hMSCs 细胞活性的影响

与对照组相比,聚酯弹性体/PTH 表面的 hMSCs 细胞状态更加良好,且形态更多的表现为梭形(图 4 d)。

讨 论

骨质疏松及其导致的骨折在我国已构成一个严重的公众健康问题。作为仅次于心血管疾病的人类第二大危害性疾病,如何防治骨质疏松已成为学术界关注的焦点,也是我国“人口与健康”研究领域的重要内容。然而当前临床上治疗骨质疏松的药物主要通过抑制骨吸或促进骨形成来增加骨量,但存在

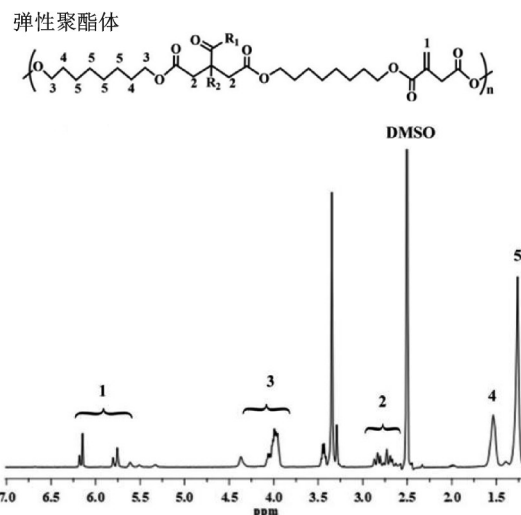


图 1 聚酯弹性体的核磁共振谱(R1、R2 代表烷基或聚合物链)

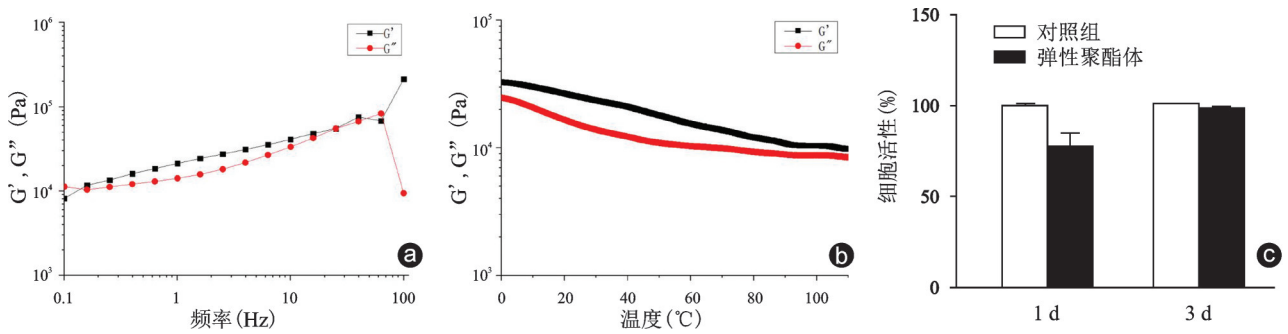


图2 聚酯弹性体的G'和G''随频率变化图谱(a),G'代表储能模量,G''代表损耗模量;聚酯弹性体的G'和G''随温度变化图谱(b);C2C12细胞在聚酯弹性体表面的活性分析(c)

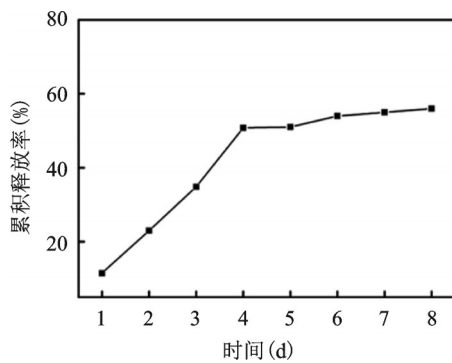


图3 PTH的累积释放曲线

价格昂贵、疗效不明确、长期使用有下颌骨坏死等并发症的弊端^[10-11]。近些年来,骨组织工程的兴起和发展为骨科相关疾病的预防和治疗带来希望。越来越多的研究学者致力于开发能够适应骨组织特性的生物材料^[12-13]。

理想的骨修复材料应该具备以下优点:①机械耐受性,以小梁骨为准,抗压强度应大于5 MPa,抗压模量在45~100 MPa之间;②良好的生物相容性,能够不影响细胞在其表面正常生长,且干扰周围骨细胞的自然再生过程^[14]。③成骨活性,材料本身或添加成骨诱导因子来诱导骨再生。

本研究中,由1,8-辛二醇、柠檬酸和衣康酸制备的弹性体兼具优良的力学性能、任意成型性和良好的生物相容性。其中的柠檬酸分子,已被证实在新骨组织形成与骨表面磷、钙离子矿化成骨的过程中发挥重要作用^[15],柠檬酸盐对骨结构的磷灰石晶体结构的形成及稳定也具有重要影响。研究学者提出成骨细胞“柠檬酸化”的新概念,既成骨细胞代谢过程中,细胞内进行三羧酸循环而产生多余的柠檬酸会被排到细胞外,在机体的自我调控下柠檬酸大量聚集于细胞外基质,并由此产生骨组织钙结节,

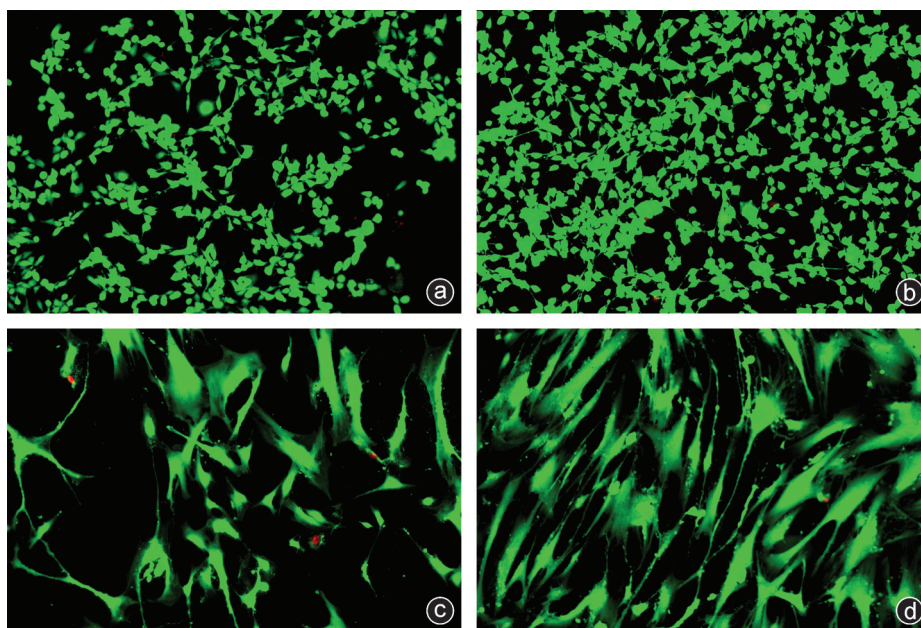


图4 细胞生长状况 a,b:C2C12细胞在对照组和聚酯弹性体表面的生长状况(a为对照组,b为聚酯弹性体组,10×);c,d:hM-SCs细胞在对照组和聚酯弹性体/PTH表面的生长状况(c为对照组,d为聚酯弹性体组,20×)

这个环节是 BMSCs 向成骨细胞分化并矿化形成新骨的重要部分,对于新生骨组织形成具有决定性作用^[16]。其次衣康酸含有可光交联的双键官能团,使得该聚酯弹性体具有良好可注射性、可任意成型。通过力学性能测试该聚酯弹性体的抗压强度大于 20 MPa,且具有很好的粘弹性能,不易发生形变,能够满足机械组织的耐受性。此外,通过体外细胞实验表明该弹性体可以维持 C2C12 细胞和 hMSCs 细胞的活性,生物相容性良好。为进一步丰富弹性体的功能,将其吸附药物分子 PTH,可实现对 PTH 的缓慢释放。

本研究制备的新型弹性体为骨质疏松骨折治疗提供新的治疗策略。本研究也存在不足之处,虽然 PTH 已经被证实具有促进骨修复的效果,但文中未对弹性体包载 PTH 复合体系的成骨特性进行详细研究,未来将重点研究其作为骨缺损修复材料的特性。

参 考 文 献

- [1] Ge M, Ge K, Gao F, et al. Biomimetic mineralized strontium-doped hydroxyapatite on porous poly(L-lactic acid) scaffolds for bone defect repair[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 1707-1721.
- [2] Guo C, Zheng X. Health challenges and opportunities for an aging China[J]. *Am J Public Health*, 2018, 108(7): 890-892.
- [3] Sun J, Guo Y, Wang X, et al. mHealth for aging china: opportunities and challenges[J]. *Aging Dis*, 2016, 7(1): 53-67.
- [4] Sun LD, Cheng H, Wang ZX, et al. Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(11): 1005-1009.
- [5] Harsløf T, Langdahl BL. New horizons in osteoporosis therapies[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 28: 38-42.
- [6] Mercado-Pagán AE, Kang Y, Ker DF, et al. Synthesis and characterization of novel elastomeric poly(D, L-lactide urethane) maleate composites for bone tissue engineering[J]. *Eur Polym J*, 2013, 49(10): 3337-3349.
- [7] Zaky SH, Hangadora CK, Tudares MA, et al. Poly (glycerol sebacate) elastomer supports osteogenic phenotype for bone engineering applications[J]. *Biomed Mater*, 2014, 9(2): 025003.
- [8] Tariq U, Hussain R, Tufail K, et al. Injectable dicalcium phosphate bone cement prepared from biphasic calcium phosphate extracted from lamb bone[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 103: 109863.
- [9] Xie M, Wang L, Ge J, et al. Strong electroactive biodegradable shape memory polymer networks based on star-shaped polylactide and aniline trimer for bone tissue engineering[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(12): 6772-6781.
- [10] Varshney S, Shankar K, Beg M, et al. Rohitukine inhibits *in vitro* adipogenesis arresting mitotic clonal expansion and improves dyslipidemia *in vivo*[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(6): 1019-1032.
- [11] Chen G, Wang Q, Yang Q, et al. Circular RNAs hsa_circ_0032462, hsa_circ_0028173, hsa_circ_0005909 are predicted to promote CADM1 expression by functioning as miRNAs sponge in human osteosarcoma[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202896.
- [12] Tatullo M. [Stem Cell Biology and Regenerative Medicine] MSCs and Innovative Biomaterials in Dentistry // Innovative Biomaterials in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine [M]. Cham: Humana Press, 2017.
- [13] Madani Z, Reisch A, Daniel R, et al. A magnetically responsive hydrogel system for controlling the timing of bone progenitor recruitment and differentiation factor deliveries[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(3):1522-1534.
- [14] Gerhart TN, Miller RL, Kleshinski SJ, et al. *In vitro* characterization and biomechanical optimization of a biodegradable particulate composite bone cement [J]. *J Biomed Mater Res*, 1988, 22(11): 1071-1082.
- [15] Baruah K, Pal AK, Sahu NP, et al. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles [J]. *Aquacult Res*, 2005, 36(8): 803-812.
- [16] Sarda S, Fernández E, Nilsson M, et al. Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent[J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61(4): 653-659.

(收稿日期: 2020-07-08)

(本文编辑: 龚哲妮)