

一种新型可注射性组织工程水凝胶的双组分 引发体系细胞毒性的负协同效应

段世锋 朱文 俞麟 丁建东*

(复旦大学高分子科学系, 聚合物分子工程教育部重点实验室, 上海 200433. * 联系人, E-mail: jdding1@fudan.edu.cn)

摘要 化学交联水凝胶有望成为一类新型可注射性组织工程水凝胶, 但是合适的、低毒性的引发体系是其瓶颈。为了考察此类化学交联水凝胶的可行性, 本文对过硫酸铵(APS)/四甲基乙二胺(TEMED)氧化还原引发体系的体外细胞毒性进行了初步研究。首先考察了不同引发剂浓度对大单体自由基聚合反应速率的影响, 以保证所考察的引发体系的剂量足以导致在体温和水环境中迅速凝胶化。采用 MTT 定量检测和光学显微镜直接观察的方法研究了引发体系对 NIH/3T3 细胞的细胞毒性。发现上述两种化学物质的细胞毒性呈现负协同效应, 即 APS/TEMED 组在高剂量时的细胞毒性比单独使用 APS 或 TEMED 还要低。

关键词 组织工程 可注射性材料 水凝胶 引发剂 细胞毒性

细胞毒性和细胞响应特性是生物材料研究中的重要科学问题^[1]。生物材料在组织工程中有不可替代的作用^[2]。大部分组织工程材料采用多孔支架的方式^[3-7], 但是, 可注射性的高分子水凝胶也构成了独特的一大类组织工程材料。可注射性材料不需要致孔和动用手术刀, 可以适应被修复组织的复杂外形, 在对于材料力学强度要求不高的场合有十分独到的优点。虽然骨水泥等可注射性填充材料已经被临床应用^[8], 但是可注射性组织工程材料还处于研发阶段。现有的主流可注射性组织工程水凝胶为 Pluronic 嵌段共聚物和藻酸盐类^[9]。它们均为物理凝胶, 其稳定性尚存在不足, 并且我们已经难以获得自主知识产权。采用共价交联的化学凝胶尝试进行可注射性组织工程材料的研究有重要意义。

通过自由基聚合反应可以使多官能团大单体在生理条件下迅速转变成化学交联的水凝胶, 这样就可以用注射的方法将细胞/材料复合物注入体内后就地形成水凝胶, 从而有望应用于组织工程。我们关于利用可降解的智能型大单体制备可注射型水凝胶材料已经申报国家发明专利^[1]。目前, 合适的引发体系成为一个瓶颈。常见的体内就地聚合的医用水凝胶的自由基引发体系为光引发体系^[10,11]。但是, 就可注射性组织工程材料而言, 对于皮下较深部位的修复, 采用光引发交联水凝胶在操作上不方便, 且反应难

以做到均匀。当然, 需要升温或需要在有机溶剂环境中使用的引发体系显然也不适合用于可注射性组织工程水凝胶的制备。故有必要采用氧化还原引发体系, 在生理温度和水环境中原位聚合以包埋细胞。

水溶性的过硫酸铵(APS)/四甲基乙二胺(TEMED)双组分氧化还原体系是一种常见的聚合反应^[12]和化学交联水凝胶制备^[13]的自由基聚合引发体系。但是当作为可注射性组织工程材料使用时, 我们希望所选择的引发体系一方面容易引发自由基交联反应, 另一方面不会造成严重的细胞毒性。在交联反应中, 细胞与整个反应体系相接触, 每个化学组分的细胞毒性都要进行研究。本文首先考察上述引发体系引发聚乙二醇大单体的凝胶化时间, 包括引发剂浓度与凝胶化时间的关系。凝胶化过程中通过对单体、引发剂浓度的调节可以控制聚合反应在数分钟之内完成, 而将来进行动物实验时在数小时后由于反应消耗及体液交换, 引发剂浓度会大大降低。因此, 本文中, 我们选择在细胞与引发剂分别接触 10 min 和 2 h 之后考察体外细胞活性的变化。

1 材料与方法

() 试剂和仪器。聚乙二醇(PEG, 分子量 4000, 中国医药集团上海化学试剂公司), 过硫酸铵(APS, 牛血清(杭州四季青生物工程公司), 高糖 DMEM 培养基与胰蛋白酶/EDTA 购自美国 Invitrogen 公司,

1) 丁建东, 朱文, 张俊川. 一种可降解的化学交联水凝胶及其制备方法. 中国发明专利, 2002, CN 1332189A

3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, 上海华舜生物工程公司), BB16UV/BB5060UV 型二氧化碳培养箱(Heraeus), Multiskan-MK3 型酶连免疫仪(Labsystems), Axiovert-200 型倒置光学显微镜(Zeiss), DSC-S75 数码相机(Sony).

() 大单体合成与凝胶化. 大单体使用双丙烯酰化聚乙二醇, 其制备方法参照文献[14]. 简述如下: 聚乙二醇直接使用, 三乙胺用分子筛干燥后重蒸, 二氯甲烷使用前与五氧化二磷回流 48 h 以上. 在氩气氛下, 将聚乙二醇及三乙胺溶于二氯甲烷中, 冰浴中滴加丙烯酰氯, 继续搅拌 24 h. 过滤, 产物用乙醚沉淀析出, 乙醚淋洗, 干燥. 产物经 ^1H NMR 谱, IR 谱确证.

将装有 25%(质量分数)大单体 PBS 缓冲溶液的试管放置在 37 ± 0.5 的恒温水浴中, 此时溶液的流动性很好. 当加入计量的引发剂后开始计时; 一定时间后, 倒置试管, 管内溶液不流动时定义为凝胶化时间. 统计分析时, 数据以均值 \pm 标准差表示.

() 细胞毒性实验. APS, TEMED 分别溶于含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 配成 10 mmol/L 等不同浓度的 APS, TEMED 以及同时含有 APS 和 TEMED 的溶液. NIH/3T3 细胞经胰蛋白酶/EDTA 消化后, 加入 96 孔细胞培养板中, 种植密度为 2.5×10^4 细胞/平方厘米. 在二氧化碳培养箱中继续培养 18 h, 培养条件为 37°C , 95% 相对湿度, 5% CO_2 . 吸出培养基, 每孔加入 200 μL 过滤灭菌过的引发剂溶液; 培养 10 min 或 2 h 后, 再次吸出培养基; 加入新鲜培养基 200 μL 后, 采用 MTT 法 [15] 检测细胞活性. 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 的磷酸盐缓冲溶液 20 μL , 37°C 继续培养 4 h 后终止培养, 小心吸弃孔内培养液. 每孔加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO), 轻轻震荡, 使结晶物溶解, 选择 570 nm 波长在酶连免疫仪上测定各孔的光吸收值(A_{sample}). 同样培养条件下未添加引发剂的细胞实验作为对照, 并测定其光吸收值(A_{control}). 同样波长测定溶剂 DMSO 光吸收值(A_{blank}). 则相对细胞活性为

$$\text{相对细胞活性 (\%)} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

细胞形态于装有数码相机的倒置光学显微镜下观察并拍摄.

2 结果与讨论

2.1 凝胶化时间

细胞毒性的大小与物质的浓度密切相关. 我们所考察的引发体系的细胞毒性必须建立在其浓度足以导致大单体在所需要的时间内化学交联的前提下. 因此, 首先要通过凝胶化时间的测量来确定合适的引发剂浓度. 凝胶化时间的影响因素很多, 如大单体类别及其浓度、引发剂类别及其浓度、反应温度等. 在未来可能的应用中, 凝胶化时间过短, 会使医生操作很不方便. 凝胶化时间过长, 会在代谢过程中使所包裹组分流失. 有必要通过多种方式调控凝胶化过程, 使反应在所需要的时间内完成. 我们选择的引发剂浓度为: APS 和 TEMED 各自选取 10, 25, 50, 100 mmol/L, 凝胶化时间测量结果见表 1.

由表 1 可见, 单独使用加速剂 TEMED 并不能引发聚合反应, 单独使用 APS 虽然可以引发聚合, 但是凝胶化时间较长. 综合使用引发剂和加速剂是最佳选择, 但也需要达到一定的浓度.

表 1 APS/TEMED 引发体系的凝胶化时间^{a)}

| 引发剂 ^{b)} | 凝胶化时间 |
|-------------------|-----------------|
| TEMED 50 | - ^{c)} |
| TEMED 100 | - |
| APS 50 | 8 ± 2 h |
| APS 100 | 6 ± 2 h |
| APS 10/TEMED 10 | - |
| APS 25/TEMED 25 | 380 ± 48 s |
| APS 50/TEMED 50 | 34 ± 2 s |
| APS 100/TEMED 100 | 17 ± 2 s |

a) $n = 3$; b) 引发剂浓度单位为 mmol/L; c) “-”示在 12 h 内未发生凝胶化

2.2 细胞活性变化

APS/TEMED 组及其独立组分的相对细胞活性结果见图 1, 其中, 相对活性为 100% 的对照为不添加任何引发剂的细胞培养体系. 比较图 1(a) 与 (b) 可见, 2 h 的细胞活性要低于 10 min. 在接触时间为 10 min 时, APS/TEMED 组在各浓度时均有较高的相对细胞活性 (>80%). 考虑到体内存在着物质代谢, 且凝胶化可以在较短的时间完成, 我们考察的引发剂的含量也偏高, 总体上该引发体系在浓度较低时有可能用于组织工程材料的制备.

当同时加入 10 mmol/L 的 APS 和 10 mmol/L 的 TEMED 时, 细胞毒性会比单独加入 10 mmol/L 的 APS 和单独加入 10 mmol/L 的 TEMED 来得高; 而与

单独加入 25 mmol/L 的 APS 或 TEMED 比, 则无确定预测结果. 但是, 在较高浓度时, 不论图 1(a)还是图 1(b)都反映出一个十分有趣的现象: 综合使用 APS 和 TEMED 时, 细胞毒性反而可能降低. 以组分为 50 mmol·L⁻¹/50 mmol·L⁻¹ 的 APS/TEMED 体系(总浓度为 100 mmol/L)为例, 其细胞活力不仅要比单独使

用 100 mmol/L APS 或 TEMED 时高, 细胞毒性甚至比单独使用 50 mmol/L 的 APS 或 TEMED 时还要低. 更高浓度时也得到了类似结论. 我们称其为细胞毒性的“负协同效应”.

这样, 综合使用 APS 与 TEMED, 一方面可以显著加快聚合反应速率、缩短凝胶化时间, 这就意味着

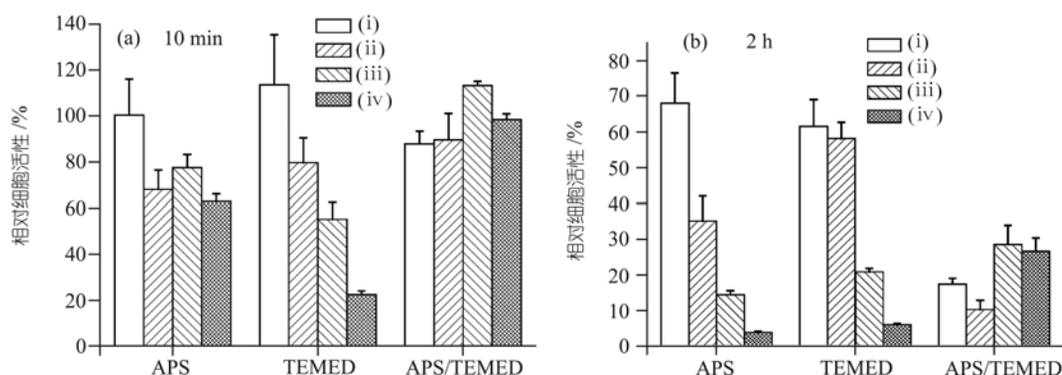


图 1 NIH/3T3 细胞和引发剂组分接触后的相对细胞活性

$n = 3$, APS/TEMED 浓度依次为() 10/0, 0/10, 10/10; () 25/0, 0/25, 25/25; () 50/0, 0/50, 50/50; () 100/0, 0/100, 100/100(单位为 mmol/L)

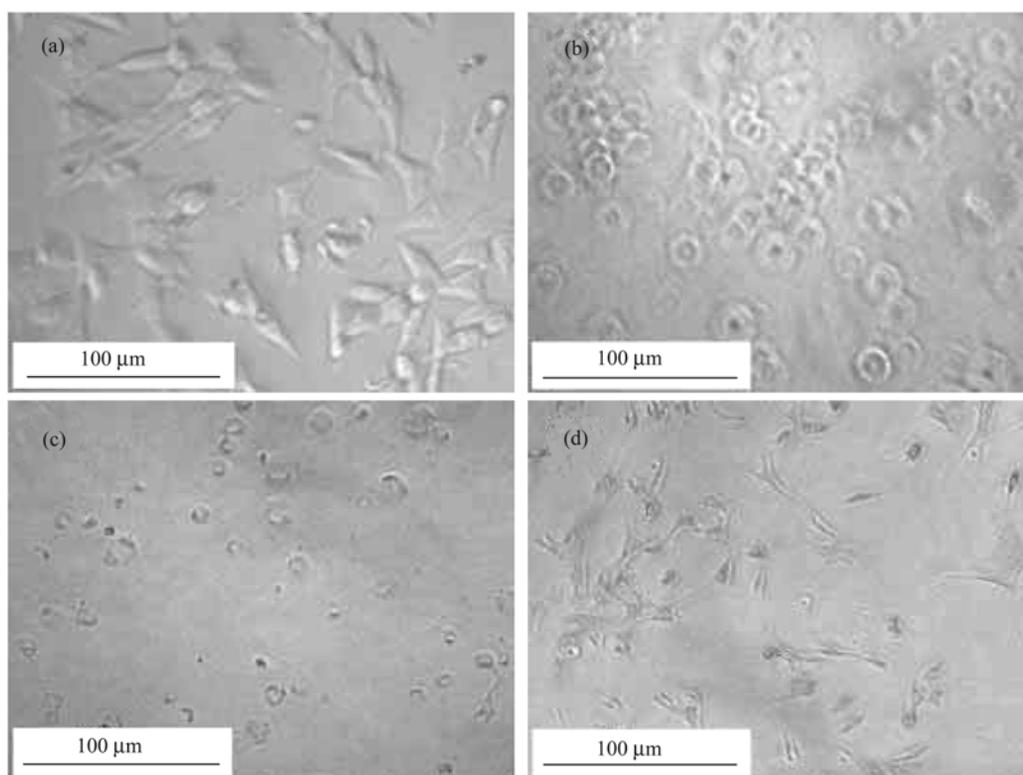


图 2 NIH/3T3 细胞和引发剂组分接触 2 h 后的细胞形态

(a) 对照; (b) APS 100 mmol/L; (c) TEMED 100 mmol/L; (d) APS 100 mmol·L⁻¹/TEMED 100 mmol·L⁻¹

可以适当降低使用剂量以降低毒性;另一方面,即使采用了较高的浓度,由于负协同效应,联合使用上述引发剂和加速剂也可以在高剂量时降低细胞毒性。

我们同时用光学显微镜对细胞进行了观察,尤其是引发剂与细胞接触较长时间后的细胞形态变化。图 2 是细胞与浓度均为 100 mmol/L 的引发剂各组分接触 2 h 后的细胞形态。在加入 100 mmol/L APS 之后,细胞呈球形(图 2(b)),一般认为细胞未能有效粘附于培养板表面,细胞活性较差。TEMED 组的细胞也呈球形(图 2(c)),且细胞表面较为粗糙,部分已破碎。而联合使用了 APS/TEMED 之后,成纤维细胞基本呈正常的梭形(图 2(d)),粘附于细胞培养板表面,只是尺寸比对照(图 2(a))小。可见,形态学直接观察也支持了前面的细胞活力测量。

TEMED 可以加速 APS 引发自由基聚合反应。冯新德等^[12]在十几年前就探讨了其加速的机理,并推测了两者的复合物的结构^[12]。本文发现,综合使用 TEMED 和 APS 可以适度降低细胞毒性,此推测基于以下原因: APS/TEMED 体系中由于两者的化学作用产生了细胞毒性相对较小的产物。化学物质的细胞响应是一个十分复杂的过程,确切机理尚需进一步研究。

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 20174006, 20221402, 30271293, 20374015)、教育部科学技术研究重大项目、高等学校青年教师教学和科研奖励基金、国家 973 计划(批准号: G1999054306-03)、国家 863 计划(批准号: 2004AA215170)、上海市科技发展基金(批准号: 02DJ14017)资助项目。

参 考 文 献

- 1 毛津淑, 王向辉, 崔元璐, 等. 透明质酸-壳聚糖-明胶复合体系对 L929 细胞凋亡和细胞周期的影响. 科学通报, 2003, 48(9): 917~920 [摘要] [PDF]
- 2 Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. Science, 1993, 260(5110): 920~926
- 3 Cai Q, Yang J, Bei J Z, et al. A novel porous cells scaffold made of polylactide-dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques. Biomaterials, 2002, 23(23): 4483~4492 [DOI]
- 4 Mao J S, Liu H F, Yin Y J, et al. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. Biomaterials, 2003, 24(9): 1621~1629 [DOI]
- 5 Ma Z W, Gao C Y, Gong Y H, et al. Paraffin spheres as porogen to fabricate poly(L-lactic acid) scaffolds with improved cytocompatibility for cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 2003, 67B(1): 610~617 [DOI]
- 6 吴林波, 丁建东. 组织工程三维多孔支架的制备方法和技术进展. 功能高分子学报, 2003, 16(1): 91~96
- 7 Wu L B, Ding J D. In vitro degradation of three dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. Biomaterials, 2004, 25(27): 5821~5830 [DOI]
- 8 Liu C S, Shen W, Gu Y F. Mechanism of hardening process for a hydroxyapatite cement. J Biomed Mater Res, 1997, 35(1): 75~80 [DOI]
- 9 Cao Y L, Rodriguez A, Vacanti C A, et al. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. J Biomater Sci Polymer Edn, 1998, 9(5): 475~487
- 10 Elisseeff J, Anseth K, Sims D, et al. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96: 3104~3107 [DOI]
- 11 Bryant S J, Nuttelman C R, Anseth K S. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. J Biomater Sci Polymer Edn, 2000, 11(5): 439~457 [DOI]
- 12 Feng X D, Guo X Q, Qiu K Y. Study of the initiation mechanism of the vinyl polymerization with the system persulfate/N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine. Makromol Chem, 1988, 189: 77~83 [DOI]
- 13 张先正, 卓仁禧. 快速温度敏感聚(N-异丙基丙烯酰胺-co-丙烯酰胺)水凝胶的制备及性能研究. 高等学校化学学报, 2000, 21(8): 1309~1311
- 14 Sawhney A S, Pathak P C, Hubbell J A. Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(acydrox acid) diacrylate macromers. Macromolecules, 1993, 26(4): 581~587 [DOI]
- 15 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983, 65: 55~63 [DOI]

(2004-10-13 收稿, 2004-11-04 收修改稿)