

文章编号: 0253-9721(2009)06-0006-05

静电纺 PLA/丝素-明胶管状支架的结构与性能

王曙东^{1,2}, 张幼珠¹, 王红卫¹, 尹桂波¹, 董智慧³, 符伟国³, 施德兵³

(1. 苏州大学 纺织与服装工程学院, 江苏 苏州 215021; 2. 盐城纺织职业技术学院 纺织工程系, 江苏 盐城 224005; 3. 复旦大学 附属中山医院, 上海 200032)

摘要 为研制组织工程小口径血管, 以良好生物相容性和生物可降解性的聚乳酸(PLA)、丝素蛋白、明胶为原料, 通过静电纺丝法, 以高速旋转的滚轴为收集装置, 构建了外层为 PLA 纤维和内层为丝素-明胶纤维的 PLA/丝素-明胶复合管状支架(直径为4.5 mm)。采用扫描电镜观察该管状支架的形貌结构; 测定其孔隙率及生物力学性能, 并在该支架上进行人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养实验。结果表明: PLA/丝素-明胶复合管状支架具有较高的断裂强度和较好的柔软性, 爆破强度远高于人体的正常血压; 支架具有多孔结构, SEM 照片显示 HUVECs 在支架上分化、增殖、生长状态良好。

关键词 静电纺丝; 管状支架; 组织工程血管; PLA; 丝素蛋白; 明胶

中图分类号: TS 102.512 文献标志码: A

Structure and properties of electrospun polylactide/silk fibroin-gelatin tubular scaffold

WANG Shudong^{1,2}, ZHANG Youzhu¹, WANG Hongwei¹, YIN Guibo¹, DONG Zhihui³, FU Weigu³, SHI Debing³

(1. College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215021, China;

2. Department of Textile Engineering, Yancheng Vocational Technology College, Yancheng, Jiangsu 224005, China;

3. Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract To develop a small-diameter tissue engineering blood vessel, the biocompatible and biodegradable PLA, silk fibroin and gelatin were used as materials, polylactide/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffold with 4.5 mm diameter was fabricated via electrospinning, which was performed on a high speed rotating mandrel. The composite tubular scaffold was composed of a PLA fibrous outside layer and a silk fibroin-gelatin fibrous inside layer. The morphology of the scaffold was observed by SEM; porosity and biomechanical properties of the scaffold were characterized, HUVECs were cultured on the scaffold. The results indicate that PLA/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffold shows a high breaking tenacity and preferable pliability, the burst strength of the scaffold is higher than normal blood pressure in human body; the scaffold has a lacunaris structure, SEM image shows HUVECs could grow and proliferate on the scaffold.

Key words electrospinning; tubular scaffold; tissue engineering blood vessel; PLA; silk fibroin; gelatin

心血管疾病严重危害人类身体健康, 全球每年大约有 60 万人需做各种外科手术, 大多数需要合适的血管移植物^[1]。目前小口径血管(<5 mm)重建仍多采用自体或异体血管移植, 然而自体或异体血管因来源有限、免疫排斥反应、远期通畅率不佳等问题迫使人们努力寻找构建理想人工血管的新方

法^[2]。近来, 涤纶、聚四氟乙烯等人造血管被广泛用作血管替代物, 但这些材料不支持细胞的黏附、生长, 此外, 材料不降解对血管的长期适应性也造成障碍。随着组织工程学的发展, 组织工程血管为解决上述问题开辟了新的思路。它利用可降解材料构建供细胞黏附和生长的支架, 体外将细胞种植于支架,

收稿日期: 2008-07-11 修回日期: 2009-02-04

基金项目: 江苏省高校重点实验室开放研究课题(KJS0817)

作者简介: 王曙东(1983—), 男, 硕士生。主要研究方向为纳米纤维及生物医用材料。张幼珠 通讯作者, E-mail: zhangyouzhu@suda.edu.cn.

培养一段时间后植入体内,在体内支架材料不断降解并由宿主自身组织逐步替代,最终的结构和功能类似于自体血管,由此获得理想的中远期通畅率和抗感染性能,代替人工血管^[3]。静电纺丝技术能够形成纳米到微米级纤维,模仿细胞外基质的组成和结构,为细胞提供良好的生长环境,并且可以形成所需口径的管状结构,因此受到人们的高度重视^[4-5]。丝素蛋白具有良好的生物相容性和降解性,无毒,无刺激性,炎症反应极小,且其降解产物对组织无毒副作用^[6];明胶是胶原经温和断裂后的产物,与胶原具有相同的化学组成,保留了胶原大部分的优良理化性能,与生物组织具有良好亲和性和生物降解性^[7];PLA是一种合成聚合物,具有良好的生物性能和力学性能^[8]。本文通过静电纺丝法构建了 PLA/丝素-明胶复合管状支架,测试了它的生物力学性能及生物性能,为使其成为一种良好的组织工程血管支架提供了实验参考。

1 实验

1.1 PLA/丝素-明胶复合管状支架构建

将桑蚕废丝置于质量分数为 0.05% 的 Na_2CO_3 水溶液中煮沸并清洗脱除丝胶,将脱胶后的丝素用 $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 三元溶液(物质的量比为 1:2:8)于 $(78 \pm 2)^\circ\text{C}$ 溶解(浴比 1:10),溶液经透析、过滤后置于 ABS 盘内在室温下干燥成再生丝素膜。将该膜及明胶以 70:30 的质量比溶解于 98% 甲酸中制得质量分数为 13% 的纺丝液。将 PLA 溶于氯仿、丙酮(体积比为 2:1)的混合溶液中制得质量分数为 5% 的 PLA 纺丝液。

以旋转滚轴(外径 4.5 mm)为收集装置,在一定的电压、极距、流速和滚轴转速等工艺条件下通过静电纺丝制备丝素-明胶(内层)和 PLA(外层)双层复合管状支架,纺丝装置如图 1 所示。对照样为单一 PLA 及丝素-明胶管状支架。丝素-明胶的纺丝条件为:电压 30 kV,极距 13 cm,流速 0.2 mL/h,轴心转速 1 000 r/min;PLA 的纺丝条件为:电压 25 kV,极距 15 cm,流速 0.1 mL/h,轴心转速 2 000 r/min。

1.2 形态结构观察

用数码相机拍摄管状支架的外观照片;用日本日立公司的 S-4700 型扫描电子显微镜观察复合管状支架的形貌,PLA(外层)放大 1 000 倍观察,丝素-明胶(内层)放大 10 000 倍观察,用 Photoshop 7.0 将

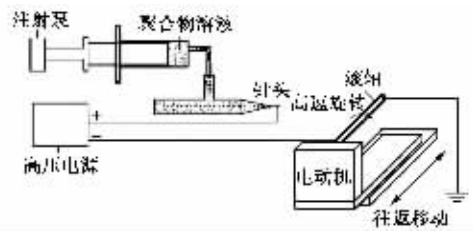


图 1 静电纺丝装置示意图

Fig.1 Schematic illustration of electrospinning setup

SEM 照片分成 9 部分,每部分取 15 根纤维,用度量工具测其直径,对比 SEM 照片标准尺度,即可得纤维的实际直径,根据所得数据计算纤维直径的平均值。

1.3 孔隙率和孔径测定

根据 Vaz 描述的方法^[9]计算 PLA/丝素-明胶管状支架的孔隙率。从该支架上切下矩形样本并精确测量其长、宽、厚,计算其体积 V ;用分析天平称其干重 m ,精确到 1×10^{-4} g。利用体积和干重计算出样本的密度 ρ 。将计算得到的密度 ρ 和 PLA/丝素-明胶的标准密度 ρ_0 (1.2 g/cm^3)代入式(1)计算出样本的孔隙率 ϵ ,测试 3 组试样,取其平均值。用 SEM 照片计算样本的孔隙面积,再把面积拟合成圆,求得孔径大小。

$$\epsilon = (1 - \rho/\rho_0) \times 100\% \quad (1)$$

1.4 生物力学性能测定

1.4.1 拉伸性能测定

利用美国 Instron3365 型强伸度测试仪测定静电纺 PLA/丝素-明胶管状支架的拉伸性能。从管状支架上切下 $40 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ 细条安放在测试仪上,夹持长度为 15 mm,以 10 mm/min 的速度拉伸,得到受力、伸长数据,测试 3 组试样,取其平均值,并获得相应的应力与应变曲线。

1.4.2 爆破强度测定

爆破压力泵(Merit USA)示意图如图 2 所示。采用爆破压力泵测定复合管状支架的爆破强度。当活塞逐渐加压时,记录被测管状支架破裂时压力表的读数,即为爆破强度。

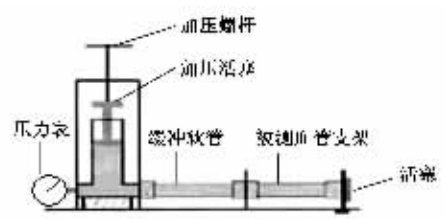


图 2 爆破压力泵示意图

Fig.2 Schematic illustration of pressure pump setup

1.5 生物性能评价

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)用含 10% 小牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 完全培养基培养,置于 5%CO₂、饱和湿度、37 °C 培养箱内,取对数生长期进行消化传代,连续培养备用。支架经 γ 射线照射灭菌,用 5 × 10³ 个细胞/mL DMEM 悬浮液接种在支架上。HUVECs 在支架上培养 21 d 后,用生理盐水多次冲洗,然后在 4 °C 下用 3% 的戊二醛固定,并经梯度乙醇脱水,乙腈置换,CO₂ 临界点干燥,金离子镀膜后在 Hitachi S-570 型扫描电镜下观察细胞生长情况。

2 结果与讨论

2.1 PLA/丝素-明胶复合管状支架的形貌

滚轴的转速对纤维取向有很大影响,而纤维取向又直接影响其力学性能^[10]。PLA 纤维层对提高管状支架力学性能作出最大贡献,因此,首先选定电压、极距和流速分别为 25 kV、15 cm 和 0.1 mL/h,并在滚轴转速分别为 1 000、2 000、3 000 r/min 时对 PLA

进行静电纺丝。由图 3 所示的 SEM 照片可见,当滚轴转速为 2 000 r/min 时,可获得取向较好的纤维,低于或高于 2 000 r/min 时,纤维取向均不如 2 000 r/min。当滚轴的表面线速度与射流沉积过程溶剂的挥发速度匹配时,纤维以圆周的方式紧紧地附着在滚轴表面,导致部分取向,该速度称为排列取向速度。若滚轴表面线速度小于或高于排列取向速度,则都不能收集到取向较好的纤维^[11],因此,本文将收集 PLA 纤维的滚轴速度定在 2 000 r/min。

图 4(a)、(b)为用数码相机拍摄的 PLA/丝素-明胶复合管状支架的外观形貌图(长 40 mm,内径 4.5 mm,管壁厚约 0.5 mm);图 4(c)为内层丝素-明胶纤维 SEM 照片,其由(143 ± 36)nm 的不规则取向的纳米纤维组成,纤维之间有大量孔隙存在,孔隙的平均直径为(161 ± 55)nm;图 4(d)所示的 SEM 照片显示,外层 PLA 由(1 337 ± 427)nm 的微米级纤维组成,纤维排列取向较好,平均孔径达(1 223 ± 374)nm。测得试样的密度 ρ 为 0.22 g/cm³,按式(1)计算得整个复合管状支架的孔隙率为(82 ± 2)%,有利于细胞的黏附和增殖^[13]。

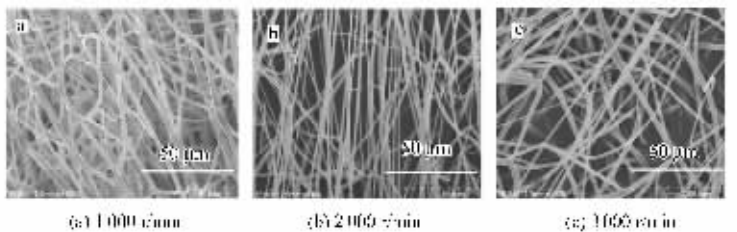


图 3 不同转速下 PLA 纤维的 SEM 照片

Fig.3 SEM images of PLA fibers (outside layer) gained at different mandrel rotating speed

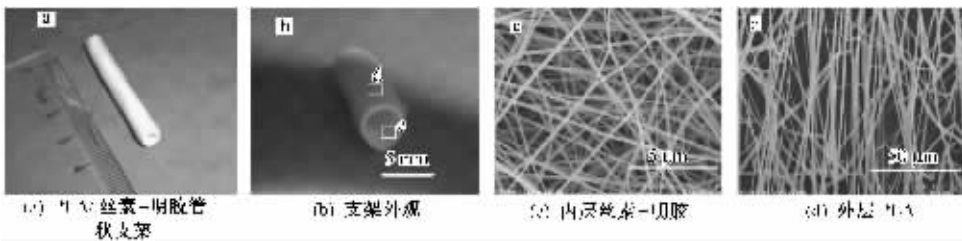


图 4 PLA/丝素-明胶管状支架的形貌

Fig.4 Macroscopic and microscopic views of PLA/SF-gelatin composite tubular scaffold.

(a)、(b) Whole body of composite scaffold; (c) SF-gelatin layer; (d) PLA layer

2.2 支架的生物力学性能

2.2.1 拉伸性能

图 5、表 1 显示 PLA/丝素-明胶管状支架及 PLA、丝素-明胶管状支架的拉伸性能。可见,PLA 管状支架的断裂强度较小,为(0.75 ± 0.04)MPa,伸长率最大,为(58.89 ± 3.36)%,柔软性较好;丝素-明

胶管状支架较 PLA 的断裂强度((1.12 ± 0.11)MPa)有所提高,但其伸长率仅为(30.55 ± 3.46)%,是一种刚性较大的支架;PLA/丝素-明胶管状支架的断裂强度为(1.28 ± 0.21)MPa,伸长率为(41.11 ± 2.17)%,其同时具有较高的强度和较好的柔软性。PLA/丝素-明胶复合管状支架具有良好的拉伸性能

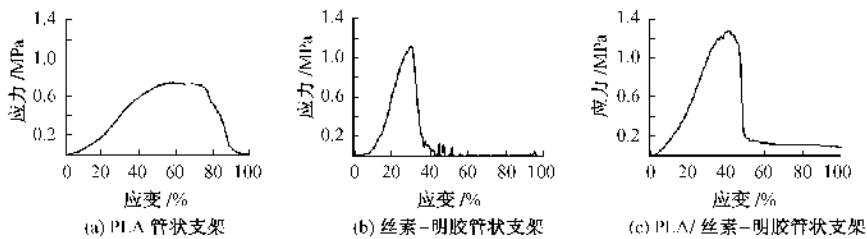


图 5 支架的应力与应变曲线

Fig.5 Stress-strain curves of tubular scaffolds. (a)PLA; (b)SF-gelatin; (c)PLA/SF-gelatin

以满足人体血管的生物力学性能^[12]。

表 1 不同管状支架的拉伸性能

Tab.1 Tensile properties of different tubular scaffolds

| 样品 | 断裂强度/ MPa | 伸长率/ % |
|-----------------|-----------------|------------------|
| PLA 管状支架 | 0.75 ± 0.04 | 58.89 ± 3.36 |
| 丝素-明胶管状支架 | 1.12 ± 0.11 | 30.55 ± 3.46 |
| PLA/丝素-明胶复合管状支架 | 1.28 ± 0.21 | 41.11 ± 2.17 |

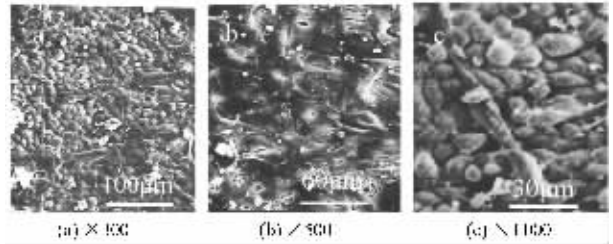


图 6 HUVECs 培养 21 d 后的 SEM 照片

Fig.6 SEM images of HUVECs after 21 days

2.2.2 爆破强度

爆破强度是考核血管支架生物力学性能最重要的指标之一。由于人体内血液正常的收缩压为 12.0~18.7 kPa,舒张压为 8.0~12.0 kPa,作为血管支架必须能承受足够的压力而不至破裂。人体内承受内压能力最强的是隐静脉,能承受的最大压力为 (223 ± 40.8) kPa^[13]。本文测定了不同厚度的 PLA/丝素-明胶复合管状支架的爆破强度,结果见表 2。可见,PLA/丝素-明胶复合管状支架具有非常好的抗内压能力,已经远高于人体的正常血压。随着支架管壁厚度的增大,爆破强度成倍地增加,并接近隐静脉的抗内压能力。

表 2 不同厚度 PLA/丝素-明胶复合管状支架的爆破强度

Tab.2 Burst pressure strength of PLA/SF-gelatin composite tubular scaffolds with different thicknesses

| 试样编号 | 管壁厚度/mm | 爆破强度/kPa |
|------|---------|-----------------|
| 1 | 0.3 | 60.8 ± 3.4 |
| 2 | 0.5 | 111.4 ± 2.6 |
| 3 | 0.8 | 172.2 ± 1.8 |

2.3 支架的生物性能评价

图 6 显示的是 HUVECs 在支架内层丝素-明胶层上培养 21 d 后的 SEM 照片。由于管状支架存在多孔结构且有良好的生物相容性,因此,支架成功地支持 HUVECs 生长,细胞的分化、增殖、生长状态良好,呈纺锤型并以单细胞层排列,相互间连成整体。

3 结 论

1)通过静电纺丝法,以高速旋转的滚轴为收集装置,成功地构建了 PLA/丝素-明胶复合管状支架,调节滚轴转速可以达到控制纤维层取向的目的。

2)复合管状支架丝素-明胶层由直径为 (143 ± 36) nm 的不规则取向的纳米纤维组成,纤维之间有大量孔隙存在,孔隙的平均直径为 (161 ± 55) nm; PLA 层由 (1337 ± 427) nm 的微米级纤维组成,纤维排列取向较好,平均孔径达 (1223 ± 374) nm,整个复合管状支架的孔隙率达 $(82 \pm 2)\%$ 。

3)复合管状支架具有较高的强度和较好的柔软性,其断裂强度和伸长率分别为 (1.28 ± 0.21) MPa 和 $(41.11 \pm 2.17)\%$,且具有非常好的抗内压能力,已远高于人体的正常血压,且随管壁厚度的增大,其爆破强度成倍地增加,并接近隐静脉的抗内压能力。

4)HUVECs 可在复合管状支架上黏附、增殖,培养 21 d 后连成整体,细胞呈纺锤型并以单细胞层排列在复合管状支架内层表面。

5)PLA/丝素-明胶复合管状支架具有良好的生物力学性能和生物性能,可作为组织工程小口径血管。

FZXB

(下转第 14 页)

- al. Time-resolved X-ray scattering studies of creep in oriented UHMWPE films[J]. *Polymer*, 2006, 47(15): 5623 – 5629.
- [3] ZHUANG Xingmin, YAN Xiong. Investigation of damage mechanisms in self-reinforced polyethylene composites by acoustic emission[J]. *Composites Science and Technology*, 2005, 66(3): 793 – 797.
- [4] COATES J, DEVRIES K L. Effects of stress and sulfur dioxide on Spectra[®][J]. *Polymer*, 2000, 41(12): 4661 – 4669.
- [5] 姜生, 晏雄, 蔡永东. 常压氩等离子体改善超高分子量聚乙烯纤维的界面性能[J]. *纺织学报*, 2006, 27(11): 36 – 40.
- JIANG Sheng, YAN Xiong, CAI Yongdong. Improvement of ultrahigh molecular weight polyethylene fibers' interface property by atmospheric argon plasma[J]. *Journal of Textile Research*, 2006, 27(11): 36 – 40.
- [6] WANG J L, LANG G Z, ZHAO W, et al. Studies on surface modification of UHMWPE fibers via UV initiated grafting[J]. *Applied Surface Science*, 2006(2): 668 – 673.
- [7] OOSTEROM R, AHMED T J, POULIS J A, et al. Adhesion performance of UHMWPE after different surface modification techniques[J]. *Medical Engineering Physics*, 2006, 28(4): 323 – 330.
- [8] 刘晓艳, 徐鹏, 张华鹏, 等. 超高分子量聚乙烯纤维热处理研究[J]. *合成纤维*, 2004, 33(1): 25 – 26.
- LIU Xiaoyan, XU Peng, ZHANG Huapeng, et al. Research of heat treatment on properties of UHMWPE fibers[J]. *Synthetic Fiber in China*, 2004, 33(1): 25 – 26.
- [9] HEARLE J W S. *High-performance Fibres* [M]. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2001: 69 – 70.
- [10] BERGER L, KAUSCH H H, PLUMMER C J G. Structure and deformation mechanisms in UHMWPE-fibres [J]. *Polymer*, 2003, 44(19): 5877 – 5884.
- [11] 何曼君, 陈维孝, 董西侠. *高分子物理*[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 224 – 228.
- HE Manjun, CHEN Weixiao, DONG Xixia. *Polymer Physics*[M]. Shanghai: Fudan Publishing House, 1990: 224 – 228.

(上接第 9 页)

参考文献:

- [1] MOTWANI J G, TOPOL E J. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention[J]. *Circulation*, 1998, 97(9): 916 – 931.
- [2] BUJAN J, GARCIA Honduvilla N, BELLON J M. Engineering conduits to resemble natural vascular tissue[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004, 39(1): 17 – 27.
- [3] NEREM R M, SELIKTAR D. Vascular tissue engineering[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2001, 3: 225 – 243.
- [4] LEE S J, YOO J J, LIM G J, et al. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83: 999 – 1008.
- [5] STITZEL J, LIU J, LEE S J, et al. Controlled fabrication of a biological vascular substitute[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(7): 1088 – 1094.
- [6] MIN Byung Moo, LEE Gene. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(7 – 8): 1289 – 1297.
- [7] KOBAYASHI, TAKASHI. The character and function of gelatin[J]. *Foods Food Ingredients Japan*, 1996, 170: 82 – 88.
- [8] YANG F, MURUGAN R, WANG S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2603 – 2610.
- [9] VAZ C M, TUIJL S Van, BOUTEN C V C. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique[J]. *Acta Biomaterialia*, 2005(5): 575 – 582.
- [10] PAN Huan, LI Luming, HU Long, et al. Continuous aligned polymer fibers produced by a modified electrospinning method[J]. *Polymer*, 2006, 47: 4901 – 4904.
- [11] HUANG Zhengming, ZHANG Y Z, KOTAKI M, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites[J]. *Composites Science and Technology*, 2003, 63: 2223 – 2253.
- [12] STITZEL Joel, LIU Jie, LEE Sang Jin, et al. Controlled fabrication of a biological vascular substitute [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(7): 1088 – 1094.
- [13] KIM H M, KOKUBO T, FUJIBAYASHI S, et al. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52: 553 – 557.