

不同比例 PLGA / β -TCP 电纺纤维支架的制备与性能研究*

谢江徽¹, 贾 骏¹, 刘一涵¹, 延 卫², 张少锋^{1**}

(1. 第四军医大学口腔医学院修复科 陕西 西安 710032 ;

2. 西安交通大学能源与动力工程学院 陕西 西安 710049)

[摘要] 目的 通过静电纺丝法制备不同比例 PLGA / β -TCP 纳米纤维支架, 筛选出最合适比例, 以便为进一步的体内植入提供依据。方法 利用静电纺丝法制备比例为 10 : 0、9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5 的 PLGA / β -TCP 纳米纤维支架, 扫描电镜观察纤维支架的多孔结构, 液体置换法测量支架的孔隙率, 分别于 1% 胰酶 PBS 溶液中进行体外降解, 测定材料的降解性, 接触角仪测量材料的接触角, 评价其亲水性能。结果 电镜观察显示制备的不同比例的 PLGA / β -TCP 纤维中(除 6 : 4、5 : 5 组), 直径均一, 呈相互联通的三维多孔结构, 各组支架材料的孔隙率均 > 80%, 其中 6 : 4、5 : 5 组的孔隙率 > 85%, 电镜下观察纤维成分有限, 大部分为颗粒状, 不具有多孔支架的三维结构, 体外降解实验中 7 : 3、6 : 4、5 : 5 组均在第 7 周时完全降解。结论 通过静电纺丝法制备不同比例的 PLGA / TCP 支架材料, 9 : 1、8 : 2、7 : 3 组均符合骨组织工程要求, 体外降解实验中, 7 : 3 组的降解率较另两组材料为优, 具有用作体内骨修复材料的潜力。

[关键词] 静电纺丝法, 聚乳酸羟基乙酸, 磷酸三钙

[中图分类号] R318.08

[文献标识码] A

doi : 10.3969 / j.issn.1003-1634.2011.11.004

Preparation of different ratio of PLGA / β -tricalcium phosphate electrospun nanofibrous scaffolds and test.

XIE Jiang-hui¹, JIA Jun¹, LIU Yi-han¹, YAN Wei², ZHANG Shao-feng¹. 1. Department of Prosthodontics, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Shanxi Xi'an 710032, China; 2. School of Energy and Power Engineering Xi'an Jiaotong University, Shanxi Xi'an 710049, China.

[Abstract] **Objective** : To prepare the different ratio of PLGA / β -tricalcium phosphate electrospun nanofibrous scaffolds and select the more suitable ratio so as to provide a basis for further research of implant. **Method** : The nanofiber scaffolds of PLGA / β -TCP with different component ratio (10 : 0, 9 : 1, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5) were prefabricated by electrospinning technology. The porous structure of nanofiber was observed under scanning electron microscope (SEM) and the porosity was assayed with stereometry. The materials were placed into 1% pancreatin PBS, then degraded in vitro, measured the biodegradability of the materials. The hydrophilic of the materials was evaluated by the contact angle which measured by contact angle mater. **Result** : The SEM images showed that the different ratio of PLGA / β -TCP nanofibers (except 6 : 4 and 5 : 5) are smooth and uniform with the interwoven and porous morphology. The average porosity of the materials was over 80% and the porosity of the materials (6 : 4 and 5 : 5) was over 85%. But by SEM the fiber component of this two groups were so limited, most of them were granular and don't have the three-dimensional structure of porous scaffold. In the duration of in vitro degradation, at 7 weeks, the materials degraded completely in the material (7 : 3, 6 : 4, 5 : 5) groups. **Conclusion** : The different ratio of PLGA / β -tricalcium phosphate scaffold materials were prepared by electrospinning technology. The groups of 9 : 1, 8 : 2 and 7 : 3 meet the demands of bone tissue engineering. In the duration of in vitro degradation, the degradation rate of 7 : 3 was better than other two groups and hence it has potential prospect for bone implantation.

[Key words] electrospinning; PLGA; TCP

各种原因造成的骨缺损在临床治疗中至今仍然是一个热点及难点, 骨组织工程学的发展为其解决方法开辟了一条新的途径, 骨组织工程支架是引导骨细胞生长, 从而修复骨缺损的基础^[1]。

聚乳酸羟基乙酸 (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 和磷酸三钙 (tricalcium phosphate, TCP) 是组织工程常用的生物支架材料。PLGA 是由丙交酯 (LA) 和

乙交酯 (GA) 共聚得到的酯类高聚物。它具有良好的生物相容性、完全的生物降解性^[2] 和独特的压电性, 但是其材料本身也具有一定的缺陷, 例如机械强度低, 可塑性差, 骨结合力弱等。TCP 是一种组织工程常用的生物活性陶瓷材料, 具有较好的生物相容性^[3]、生物降解性及良好的骨结合力^[4], 实验证实能够引导骨细胞生长并促进其增殖。在聚乳酸羟基乙酸中加入磷酸三钙可以使两者的性能互补, 不仅为细胞提供良好的生长环境, 而且能使细胞更快、更好地生长。

* 基金项目: 军队医药卫生科研基金资助 [卫训 2008 (130)]

** 通讯作者: 张少锋 Tel: 35191587007

E-mail: jianghuix@gmail.com

结 果

1 PLGA / TCP 纤维表面形貌扫描电镜观察：

2000 倍扫描电镜下可见 PLGA / TCP 电纺纤维呈相互交联的多孔网状无纺结构, 纤维交错相叠、连接良好, 光滑均一, 随着 TCP 的加入及含量的增加, 纤维的表面粗糙度程度增加。当材料比例为 6:4 和 5:5 时, 所纺的产物纤维减少, 大部分成颗粒状。因为是在 PLGA / TCP 的复合物中, 其中 PLGA 为连续相, TCP 为分散相, 当 TCP 的含量增大到一定比例时, 就会破坏 PLGA 的连续性, 从而导致纤维成分减少, 而颗粒成分增多(图 1)。

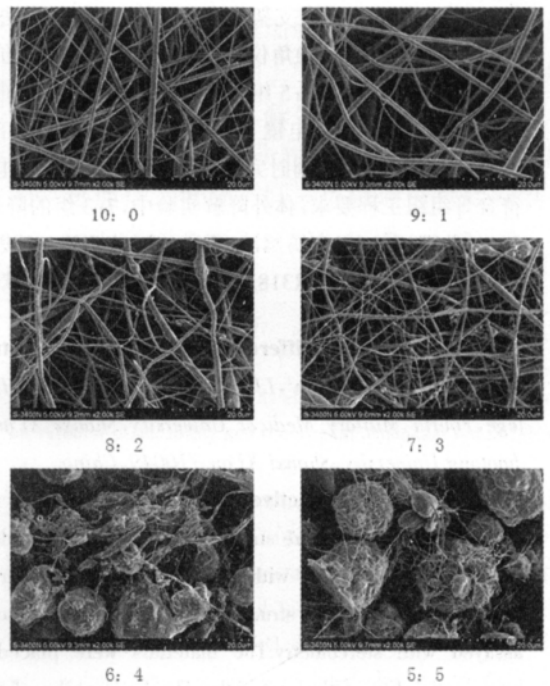


图 1 PLGA / TCP 电纺纤维的表面微观形貌 (SEM×2000)

2 材料孔隙率测定结果见表 1。

表 1 各组材料孔隙率测定结果

材料(PLGA :TCP)	样本数	孔隙率(%)
10:0	3	80.3
9:1	3	81.1
8:2	3	82.6
7:3	3	83.2
6:4	3	85.8
5:5	3	86.4

3 材料降解性测定结果见表 2。

表 2 各组材料各时间点降解性(平均重量损失)测定 (%)

材料(PLGA :TCP)	降解后观察时间点			
	1 周	3 周	5 周	7 周
10:0	32.4	66.3	90.7	97.3
9:1	35.3	67.1	92.4	98.6
8:2	39.8	69.7	93.8	99.1
7:3	40.5	73.1	97.5	100
6:4	41.1	77.4	98.2	100
5:5	43.5	82.3	100	100

成为有效的细胞支架, 仅有材料是不够的, 组织工程支架的关键技术之一在于将生物材料制成具有特定形状和多孔结构的三维支架。静电纺丝法是唯一能够直接制备直径低至几个纳米的连续纤维的方法, 且高效低能^[5]。它是利用聚合物溶液或熔体在电场作用下形成喷射流从而形成连续纤维的方法^[6]。所制得的纤维有纳米级的纤维细度、好的连续性、高的比表面积及良好的生物相容性^[7]。本实验首先采用静电纺丝技术制备不同比例 PLGA / TCP 纳米纤维支架, 探索不同比例的 PLGA / TCP 电纺支架的微观形貌与性能, 探讨其在骨组织工程支架材料领域应用的前景。

材料和方法

1 材料

聚乳酸羟基乙酸[PLGA, 相对分子量 10 万, 丙交酸 / 乙交酸(LA / GA)=75 / 25, 济南岱罡生物材料有限公司]; 磷酸三钙(TCP, 恩赛华垦科技有限公司), 氯仿、丙酮、无水乙醇, 均为分析纯。

2 静电纺丝 PLGA / TCP 支架的构建

将 PLGA 与 TCP 以 10:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5 的比例溶于氯仿、丙酮(体积比为 2:1)混合溶剂中制得质量分数为 12% 的纺丝液, 将纺丝液倒入已磨钝的 7 号不锈钢针头的注射器, 在电压 12 kv、极距 10 cm 的条件下进行静电纺丝, 将所得产物按 5 mm×5 mm 大小切割, 置于无水乙醇中处理 15 min, 室温干燥 24 h 备用。

3 PLGA / TCP 支架的结构及性能测试

3.1 形貌结构

样品经喷金处理后, 置于扫描电子显微镜下进行表面微观形貌观察。

3.2 孔隙率

采用液体置换法测定支架孔隙率^[8]: 在 50 mL 容量瓶内倒入无水乙醇, 其体积记为 V₀, 将支架浸入无水乙醇, 并无气泡, 此时体积记为 V₁, 然后将材料取出, 记录剩余乙醇体积为 V₂, 则孔隙率为:

$$P = [(V_0 - V_2) / (V_1 - V_2)] \times 100\%$$

3.3 降解性

将样品按 5 g / 100 mL 的比例浸入 1% 胰酶 PBS 缓冲液中浸泡 1、3 和 7 d, 置于 37 °C 无菌恒温孵箱中, 每隔 24 h 更换一次缓冲液。浸泡一定时间后取出样品, 双蒸水洗 2 次, 室温下干燥 24 h, 真空干燥至恒重, 称重。通过测量材料的失重率评价材料的降解性。

$$\text{生物降解率} = (\text{降解前重量} - \text{降解后重量}) / \text{降解前重量} \times 100\%$$

3.4 亲水性

通过测试不同电纺膜的接触角来反映材料表面的亲水性变化。测试采用座滴法在接触角测定仪上进行。

表 3 各组材料的接触角测定 (°)

材料分组(PLGA :TCP)	接触角(n=5)
10 :0	87.50±0.89
9 :1	89.87±0.64
8 :2	90.73±0.77
7 :3	92.12±0.85
6 :4	93.77±0.91
5 :5	96.10±0.83

4 材料的接触角测试结果见表 3。

在加入 β-磷酸三钙后 材料接触角变大。纳米级 β-磷酸三钙的加入使得材料的亲水性降低。

讨 论

诞生于 20 世纪 70 年代的静电纺丝技术,是一种利用高压强电场制备纳米级、微米级纤维的新型技术,这种技术制备的纳米纤维支架,具有极高的比表面积、高的孔隙率和相互连通的三维网络状结构,能够很好地模拟天然的细胞外基质结构^[9]。目前,多位学者已将静电纺丝技术应用于骨、软骨、血管、皮肤等组织工程支架的制备。

由于骨组织的特殊性,其所制备的骨组织工程支架材料也有其独特的一面。Burg 等^[10]认为理想的骨组织工程支架应具有以下特点:支架材料的吸收速率与骨生长速率相互匹配;可用于形状不规则的骨缺损部位;具有骨传导性或骨诱导性;良好的力学性能;促进骨质的沉积和生长,对周围组织无不良影响;降解产物无毒性等。

可用作骨组织工程支架材料的合成高分子材料 PLGA 具有良好的生物相容性、完全的生物降解性和独特的压电性,已被广泛应用于组织工程的各个领域。但是其缺点也是不容忽视的:细胞粘附力弱;易引起无菌性炎症^[11]及机械强度不足。TCP 是骨组织工程的主要生物活性陶瓷材料之一,它在组成、结构上与天然骨类似,有很好的生物相容性、骨传导性和骨结合力,无毒副作用,并且 TCP 的降解能够中和聚合物降解引起的局部弱酸性,有助于防止或减轻植入区域的无菌性炎症的发生,但是其易碎,且抗压及抗弯性能较差。由于各单一材料存在明显的缺点,因此,将 PLGA 易成型的特点与 TCP 的机械强度、细胞诱导性及骨传导性。按照一定的比例结合,构造出更符合临床应用的复合材料,便成为了目前静电纺丝技术研究的热点。本实验通过电纺不同比例的 PLGA / TCP 复合物,寻找合适的比例,使所得材料孔隙间相互交联,孔隙分布均匀,有利于成骨细胞的长入。

随着溶质中 PLGA 比例的下降,支架的孔隙率呈上升趋势。这是由于随着 PLGA 的减少,纺丝的黏度减小,纤维直径减小,使纤维间的排列更加疏松,孔隙率增大。当 PLGA / TCP 的比例为 6 :4 和 5 :5 时,材料孔隙率均>85%,且出现珠状物。

本实验通过模拟人体内体液的降解环境^[12]来研究不同比例电纺复合物的降解性能,体内环境下,PLGA 主要由于脂肪酶的作用而降解,而 TCP 的降解主要为水解。复合材料中 TCP 的降解速度影响着材料的整体结构的变化,特别是对 PLGA 的降解起到了加速的作用。因此,TCP 含量的不同,各比例复合材料的整体降解率也不同,即材料中 TCP 比例越高,复合材料整体降解速度越快。5 周时,5 :5 组最先完全溶解,7 周时,7 :3、6 :4 组也完全溶解。结果提示在体外降解条件下,5 :5 组的降解速度较其他组为优。

[参 考 文 献]

- [1] 朱洪光,徐欣.应用骨组织工程技术修复节段性骨缺损的研究进展[J].中国口腔种植学杂志,2009(4):139-142.
- [2] 刘竟龙,余斌,高成杰.骨组织工程材料修复骨缺损:大鼠成骨细胞与聚乳酸和聚乙醇酸共聚合物支架联合培养观察[J].中国临床康复,2002(16):2371-2372.
- [3] Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate[J]. Biomaterials, 2005, 26(17):3587-3596.
- [4] Lane JM, Bonstrom M P. Bone grafting and new composite biosynthetic graft materials[J]. Int Orthod, 1998, 47(5):525-534.
- [5] 迟蕾,姚永毅.静电纺丝制备纳米纤维的最新进展[J].纺织科技进展,2004(5):1-6.
- [6] Formhals A. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent No. 1934:1975.504.
- [7] Zheng-Ming Huang, Yi-Zhang, M Kotaki A. Review on polymer nanofiber electrospinning and their applications in nanocomposites Science and Technology, 2003, 63:2223-2253.
- [8] 张维茹.关于滤材孔隙率的探讨[J].天津造纸,1997(4):19-22.
- [9] Courtney T, Sacks MS, Stankus J et al. Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy [J]. Biomaterials, 2006, 27(19):3631-3638.
- [10] Karen JL, B Scott P, James FK. Biomaterial developments for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2000, 21(23):2347-2359.
- [11] Spector M. Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration [J]. Clin Plast Surg, 1994, 21(3):437-444.
- [12] 段友容,姚吉吉,王朝元,等.多孔磷酸钙陶瓷在动态 SBF 中类骨磷灰石形成的研究[J].生物医学工程学杂志,2002,19(3):365-369.

收稿日期 2011-07-15