

## PLGA、PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维组织工程支架的制备，体外降解及细胞相容性研究

### 摘要

运用静电纺丝技术制备的组织工程支架，具有类似细胞外基质（ECM）的形态和结构，是组织工程领域的研究热点。静电纺丝支架的体外降解性能评价对于进一步的体内降解和长期成功移植都是不可或缺的步骤。本文研究了静电纺丝法制备的 PLGA、PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维支架的体外降解及细胞相容性。

首先，采用静电纺丝技术，以铜网（40 目）为接受装置，设计制备了表面具有巢形花纹结构的 PLGA（75/25）纳米纤维支架，并比较了巢形结构的三个典型区域（脊形区、无纺区、磁力线区）的微观拓扑学结构。结果表明，支架的表面由许多巢形结构单元（ $400 \times 300 \mu\text{m}$ ）彼此连接而成。尽管纤维直径在三个典型区域中无显著差异（ $849 \pm 118 \text{ nm}$ ），但纤维取向和孔径大小差异很大。

其次，在磷酸盐缓冲溶液（PBS，pH 7.4， $37^\circ\text{C}$ ）和加有溶菌酶（lysozyme）的 PBS（pH 7.4， $37^\circ\text{C}$ ）溶液中对 PLGA 纳米纤维支架分别进行体外水解和体外酶解。研究结果表明，PLGA 支架能够随降解的进行而维持最初的拓扑学结构，巢形结构的骨架的存在能够有效的防止纳米纤维支架变形。另一方面，PLGA 纳米纤维支架水解过程和酶解过程都分为两个阶段。在第一阶段，分子量随降解进行持续下降而重量损失很小；在

第二阶段,分子量下降到一个低值后随时间变化不大而重量损失很大。水解 20 周以后,纳米纤维内部呈现多孔结构,但纤维表面几乎完整无损。证明纳米纤维 (<900nm) 在水解过程中,自催化效应仍然存在。而酶解 16 周以后的纳米纤维,无论内部和表面都呈现多孔结构,溶菌酶的存在只能加速溶解低分子量的降解产物,对于聚合物链的断裂没有贡献。

第三,应用静电纺丝技术制备出具有巢形花纹结构的 PLGA/ $\beta$ -TCP ( $\beta$ -TCP 含量 10%wt 和 20%wt) 纳米纤维复合物支架,以纯 PLGA 纳米纤维支架为参照,在磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4, 37°C) 中进行体外降解实验。研究表明, $\beta$ -TCP 粒子被成功包裹在 PLGA 纳米纤维的内部形成 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架,其拉伸强度和弹性模量分别可以达到 5.02MPa 和 120MPa。三种支架的样品重量、PLGA 分子量、拉伸强度和模量都随着降解过程的进行而逐渐降低。但复合支架中  $\beta$ -TC 含量的增加有利于降低降解介质的酸度,减缓样品重量和 PLGA 分子量的下降速度,增加降解介质中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。采用 MTT 法检测了成骨肉瘤细胞 (MG-63) 在上述三种纳米纤维支架上的增殖,发现  $\beta$ -TCP 的引入及其含量的增加有利于提高材料的细胞相容性。

因此,具有巢形花纹结构的 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合纳米纤维膜具有适中的力学性能、可控的降解性能和良好的细胞相容性,有望作为骨组织工程支架材料。

**关键词:** 静电纺丝, 巢形花纹结构, 自催化, PLGA/ $\beta$ -TCP, 力学性能, 细胞相容性

## **Preparation, degradation and cytocompatibility of nest-like patterned electrospun PLGA and PLGA/ $\beta$ -TCP scaffolds**

### **ABSTRACT**

Scaffolds fabricated via electrospinning could mimick Extracellular matrix well and become study hotspots in tissue engineering. In vitro evaluation of degradation properties of electrospun scaffolds is an inevitable procedure before further biodegradations and long-term success in vivo. The preparation, degradation, and cytocompatibility of nest-like patterned electrospun PLGA and PLGA/  $\beta$ -TCP scaffolds were studied in this thesis.

Firstly, nest-like patterned electrospun PLGA (75/25) scaffold was fabricated by electrospinning using grid copper wires as collector. The as-electrospun nest-like patterned PLGA scaffolds were composed of numerous nest-like units ( $400 \times 300 \mu\text{m}$ ), which had three typical regions with different topography: ridge-like region, non-woven region and magnetic lines-like region. Fiber diameters in the three regions were almost the same ( $849 \pm 118 \text{ nm}$ ), but fiber orientation and pore size were significantly different from each other.

Secondly, in vitro hydrolytic and enzymatic degradation of nest-like patterned PLGA(75/25) scaffolds were carried out in phosphate buffer

solution (PBS, pH 7.4, 37°C) and PBS (7.4, 37°C) with lysozyme (20000U/ml) in it. Results indicated that the robust framework of nest-like units had prevented the scaffolds from shrinking drastically and contributed to the maintenance of mechanical properties with degradation. Both hydrolytic and enzymatic degradation of PLGA nanofibrous scaffolds could be divided into two stages. In the first stage, the molecular weight of the samples decreased continuously with degradation time, whereas little weight loss occurred at this stage. But in the second stage, the molecular weight decreased to a low value and changed little with time, while the samples experienced significant weight loss. After hydrolysis for 20 weeks, nanofibers with porous inner but intact surface were detected. All these results indicated that an autocatalytic effect still existed in the hydrolysis of PLGA nanofibers (~ 900 nm). The degradation of PLGA (75:25) nanofibers in the presence of lysozyme was primarily a hydrolysis process and lysozyme had no accelerating effect on the cleavage of ester bond.

The third, PLGA/  $\beta$ -TCP(90/10, 80/20) composite scaffolds were prepared by electrospinning. Results indicated that  $\beta$ -TCP particles were successfully enwrapped in PLGA nanofibers and formed composite scaffolds. The tensile strength and modulus of as-spun PLGA/  $\beta$ -TCP nanofibrous scaffolds reached 5.35MPa and 120MPa respectively and decreased with degradation within 8 weeks. Weight, molecular weight of PLGA, decreased continuously with degradation for the three kinds of scaffolds. However,

increased content of  $\beta$ -TCP in PLGA/ $\beta$ -TCP composite slowed down the degradation rate of PLGA component, decreased the acidity and increased concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in degradation medium. MTT results indicated that cytocompatibility were also improved with increased content of  $\beta$ -TCP. Therefore, PLGA/ $\beta$ -TCP composite scaffolds with appropriate mechanical properties, adjustable degradation rate and preferable cytocompatibility will be potential candidate for tissue engineering.

**KEY WORDS:** electrospinning, nest-like patterned scaffold, degradation, autocatalytic effect, PLGA/ $\beta$ -TCP, cytocompatibility

## 北京化工大学学位论文原创性声明

本人郑重声明： 所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 周学刚 日期： 2009.5.31

## 关于论文使用授权的说明

学位论文作者完全了解北京化工大学有关保留和使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属北京化工大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以允许采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

保密论文注释：本学位论文属于保密范围，在 2 年解密后适用本授权书。非保密论文注释：本学位论文不属于保密范围，适用本授权书。

作者签名： 周学刚 日期： 2009.5.31

导师签名： 王 日期： 2009.5.31

## 第一章 绪论

### 1.1 组织工程

人体组织和器官的衰竭、损伤是最主要的临床医学问题，对人体的健康和生命构成了严重的威胁。治疗组织、器官损伤的方法有以下几种：

一是自体器官移植，是以牺牲健康组织为代价的“以伤治伤”的方法，虽然临床效果不错，但是供区非常有限。二是同种异体器官移植，但是存在供体器官严重不足的问题。三是人工替代物，则存在生物相容性的问题。四是采用医疗器械，但是不能代替器官的所有功能，不能很好地修复组织或器官的损伤。为了解决人体组织和器官缺损的修复难题，不少临床医生和其他相关领域的专家合作，探索新的治疗途径。其中，美国麻省理工学院的化学工程师 R.Langer 和哈佛大学医学院的医生 J.P.Vacnati 在 80 年代中期提出了一种想法，即在支架材料上种植人体活细胞，在生长因子的作用下，生成组织，并提出了组织工程这一概念(Tissue engineering)。组织工程这一学科立刻引起了各个领域的专家学者们的关注，取得了许多突破性进展<sup>[1-5]</sup>。目前更是成为了继器官移植和外科重建手术这两大临床治疗手段后的第三大医学治疗技术<sup>[6]</sup>。

关于组织工程的定义，大部分文献都遵循了 R.Langer 和 J.P.Vacnati 于 1993 年发表在《科学》上的文章<sup>[7]</sup>中的表述，即：组织工程学是一门交叉学科，它利用工程学和生命科学的原理，来研究和发展具有生物活性的人工替代物，用以维持、恢复或提高人体受损组织的功能。这是一门新兴的交叉学科，高度依赖于材料学、化学、细胞生物学、分子生物学、基因工程、力学和医学等学科的发展，又独立于各个学科之外成为一门独特的技术。它的目的是：利用人体活细胞在适宜的支架材料上生长成天然的组织和器官以替代人体内受损和缺失的组织和器官。

在组织工程概念提出后的十几年中，组织工程学的内涵不断地丰富和发展<sup>[8-10]</sup>。其思路为将功能相关的活细胞接种于细胞外基质替代物上，这种替代物可为细胞提供一个空间结构，使细胞在上面生长，体外培养一定时期后形成细胞与替代物的复合物，再将所得复合物移植到体内受损组织处，以修复受损组织。组织工程的另一种方法是将扩增的细胞与支架前驱体混合后注射到体内，原位形成凝胶状支架，这类支架提供新组织形成的空间，控制工程化组织的结构与功能。组织工程中所用的替代物材料一般为可生物降解的人工合成的高分子支架材料或天然生物大分子支架材料，植入体内的支架材料经过一定时间后可完全降解并被人体所吸收，不会在体内留下异物。由此可见，细胞、支架及其组合方法是组织工程的三要素。临床医学，细胞(分子)生物

学和材料学是组织工程所涉及的三个最主要的学科领域。多年来组织工程的研究内容主要集中在生物材料的研制、种子细胞的培养、生长因子的使用以及细胞与支架材料的组合及塑形等方面。组织工程的发展很快,在皮肤、角膜、肝、胰、软骨、骨、血管、尿道、神经系统等领域均取得了一定成绩,目前组织工程开始向产业化发展。

## 1.2 组织工程用生物材料

组织工程材料按其来源可分为天然的生物大分子材料和人工合成的高分子材料,按其降解性能又可分为可生物降解的材料和不可生物降解的材料,按其形态可分为水凝胶类材料 and 多孔支架材料<sup>[11-12]</sup>。

### 1.2.1 天然类组织工程用生物材料

天然生物材料一般生物相容性良好,不易产生排异反应,已广泛应用于组织工程。但是天然生物材料因其来源不同,结构与性能存在批次间的差异,故有其局限性。

#### 1.2.1.1 胶原和明胶

胶原(Collagen)被广泛地应用于组织工程,它是细胞外基质(ECM)的主要成分。胶原是人体中含量最丰富的一种结构蛋白,约占机体总蛋白的 25 %。目前已发现的胶原蛋白类型不少于 19 种<sup>[13]</sup>,常用作组织工程材料的主要是 I, II 以及 III 型胶原,其中又以 I 型胶原应用最为广泛。胶原分子呈棒状,长约 280nm,分子量约为  $3.0 \times 10^5$ ,由三条多肽链组成。胶原吸水膨胀,但不溶于水。通过酶消化提取的胶原往往表现出温和的免疫原性<sup>[14]</sup>,而且胶原分子中包含有促进细胞粘附和生长的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽片段,表现出良好的细胞相容性<sup>[15,20]</sup>(具体优缺点见表 1-1)。因此,胶原是较早通过美国药品和食品管理委员会(FDA)批准的生物材料之一,被广泛地应用于创伤敷料,医疗器械以及药物释放等领域<sup>[16-19]</sup>。近年来,随着组织工程的发展,胶原在构建组织工程支架以及对其他组织工程材料的表面改性方面发挥了巨大的作用。



表 1-1 胶原作为支架材料的优点和缺点

Table 1-1 The advantages and disadvantages of collagen as a scaffold material

| 优点            | 缺点          |
|---------------|-------------|
| 来源广泛，容易获得     | 降解速率过快      |
| 免疫原性低         | 机械强度不足      |
| 生物安全性及生物相容性好  | 材料质量批次间差别较大 |
| 可降解吸收，且降解速率可控 | 获得高纯度的胶原费用高 |
| 带有较多功能基团，利于改性 |             |
| 便于加工成多种形状     |             |

胶原作为组织工程材料应用最早和最广泛的领域是皮肤组织工程。早在 1980 年，Burke 和 Yannas 就报道了胶原/6-硫酸软骨素在构建真皮替代物中的应用<sup>[21]</sup>。Boyce 等以胶原/6-硫酸软骨素凝胶作为基材，成功构建了种植有成纤维细胞和表皮细胞的全层皮肤替代物<sup>[22]</sup>。用于构建软骨组织工程支架的胶原主要为 I 型和 II 型胶原。近来，对于不同类型胶原对组织工程软骨的结构与功能的影响进行了深入的研究。Spector 等研究发现<sup>[23]</sup>，半月板软骨细胞在 I 型胶原/糖胺聚糖(GAG)支架中的增殖行为明显不如在 II 型胶原/GAG 支架中活跃，而且只有种植于 II 型胶原/GAG 支架中的半月板软骨细胞才能分泌 GAG。此外胶原类型还对支架体外培养过程中的支架收缩行为产生影响，II 型胶原/GAG 支架在整个培养过程中未见发生明显收缩，而 I 型胶原/GAG 支架则收缩了近 50%。杨志明等将人胚胎软骨细胞种植入胶原支架中，经植入裸鼠体内一段时间后形成透明的软骨组织<sup>[24]</sup>。

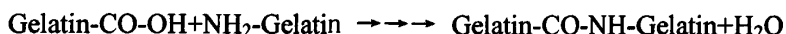
以胶原作为主要材料构建的支架还广泛地应用于组织工程骨、血管、角膜等多种组织或器官。Reddi 通过骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2)与胶原支架复合，构建有良好修复效果的组织工程骨<sup>[25]</sup>。Kuzuya 等采用 I 型胶原作为主要原料构建了组织工程化人工血管<sup>[26]</sup>。

明胶是胶原的部分变性衍生物，它由胶原的三重螺旋结构解体为单分子而形成，是天然多肽的聚合物。明胶中含量最多的氨基酸是脯氨酸、羟脯氨酸和甘氨酸，很少量的蛋氨酸，分子量为  $1.5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4$ 。明胶有两种类型，即明胶 A 和明胶 B。明胶 A 是在热变性前用酸预处理的明胶，而明胶 B 则是用碱预处理，使其谷氨酰胺与天冬酰胺的酰胺残基转变为谷氨酸和天冬氨酸，因此明胶 B 的氨基含量比明胶 A 的氨基含量至少高 25%。明胶水溶液的温度降至 35℃ 以下时形成热可逆性凝胶，此时大分子链从线团状构象转变成螺旋状，这个过程中它们容易恢复到胶原的三重螺旋结构。物理凝胶明胶的转化温度和凝胶浓度、陈化时间、pH 等参数有关<sup>[27]</sup>。明胶水溶液中分子存在两种可逆变化的构型:溶胶形式 A  $\longleftrightarrow$  凝胶形式 B

溶胶 A 存在于较高温度(35℃ 以上)，在 15~35℃，两种形式的明胶分子成平衡态

共存。明胶溶液形成凝胶的浓度最低极限值约为 0.5%，凝胶存在的最高温度为 35℃。

明胶凝胶的物理网络在较高温度下解体，不适于 37℃ 下长期使用。同时明胶水凝胶热稳定性和力学稳定性也不高，因此有待通过化学交联改善。明胶凝胶可用戊二醛化学交联，形成化学交联明胶凝胶。也可用 N,N-(3-二甲胺丙基)-N'-乙基碳二亚胺(EDC)和 N-羟基丁二胺(NHS)化学交联，形成交联凝胶。此时明胶上的羟基和氨基在 EDC 和 NHS 的存在下，相互反应形成肽胺交联键：



### 1.2.1.2 透明质酸

透明质酸(Hyaluronic acid)是 ECM 中 GAGs 的重要组成物，尤其在结缔组织中含丰富。透明质酸具有高度水化的性能，在对组织内部的水分平衡、关节的润滑以及稳定软骨基质等方面发挥了重要的作用<sup>[28]</sup>。其分子量为  $5.0 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^6$ 。它在创伤愈合中起着重要的作用。

高纯度的透明质酸免疫原性低，生物相容性好，而且透明质酸在体内可被血清中的透明质酸酶所降解，其降解物对创面愈合具有促进作用。目前，透明质酸在药物佐剂、骨固定物以及皮肤覆盖物等方面都已有应用，但由于透明质酸的力学强度不够，无法单独应用于构建组织工程支架，多数情况下需要与其他种类的组织工程支架复合使用。Lin-Shu Liu 等应用碘酸钠氧化法获得含醛基透明质酸，与胶原交联后，构建了胶原—透明质酸多孔支架。该支架在小鼠体内表现出良好的生物相容性，能够有效促进小鼠骨组织的再生<sup>[29]</sup>。近年来，意大利 Fidia 先进生物材料公司开发的透明质酸苯酯无纺布 Hyaff-II 被广泛地应用于骨和软组织工程的研究。通过调节酯化度的高低，可以获得一系列具有不同降解速率的 Hyaff-II<sup>[30]</sup>。Solchaga 等<sup>[31]</sup>的研究证明成骨细胞在 Hyaff-II 支架中的数量要远远高于磷酸钙陶瓷支架，其在骨组织工程中具有巨大的发展潜力。

### 1.2.1.3 血纤蛋白

血纤蛋白(Fibrin)通常用做外科密封胶和粘合剂，是实现创伤愈合的主要生物基质。血纤蛋白能够促进纤维细胞的渗透与增殖，从而加速创伤的修复过程。血纤蛋白凝胶可以用患者的自体血液制备，因此它是自体组织工程支架。血纤蛋白原在凝血酶的存在下于室温酶促聚合形成凝胶<sup>[32]</sup>。血纤蛋白是体内天然组成成分，具有很好的细胞相容性。血纤蛋白构建的组织工程支架能促进细胞的黏附，生长以及迁移，进而引导组织再生，而且血纤蛋白能促进移植支架的血管化。血纤蛋白的降解速率可由蛋白酶抑制剂(例如抑蛋白酶肽)调控<sup>[33]</sup>。

血纤蛋白凝胶负载的血小板衍生生长因子(PDGF)和转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )可促进细胞迁移、增殖和基质合成。分别将转谷氨酰胺糖因子VIIIa底物和含RGD序列的生物活性肽功能域引入到血纤蛋白凝胶中,制备出可望用于神经系统的生物材料。血纤蛋白凝胶还可种植骨骼肌肉细胞、平滑肌细胞和软骨细胞形成细胞/支架结构物并最终形成工程化组织,但血纤蛋白凝胶力学性能较差,影响了其应用。

Homminga 等将不同浓度的软骨细胞种植于血纤蛋白凝胶中,结果显示血纤蛋白对软骨细胞无细胞毒性,而且能保持软骨细胞的表型<sup>[34]</sup>。Sims 将种植了小牛软骨细胞的血纤蛋白凝胶植入裸鼠背部。种植 12 周后发现,所构建的组织在宏观形貌以及物理性能上都与软骨组织接近,组织学分析显示所构建组织中含有较多新生的软骨组织类细胞外基质,而且其 GAG 和 DNA 的量仅略低于天然小牛软骨<sup>[35]</sup>。

#### 1.2.1.4 壳聚糖

壳聚糖(Chitosan)是一种带有多氨基的多糖类物质,是甲壳素脱乙酰化的产物,其平均分子量一般在 30 万~100 万,脱乙酰化度通常大于 70%。甲壳素则是一种存在于节足动物的外壳以及真菌类细胞壁中的天然多糖类物质,其来源非常广泛。壳聚糖虽然不是人体中 ECMs 的构成物,但其结构和一些性质与细胞外基质的主要成分氨基葡聚糖非常类似<sup>[36]</sup>。壳聚糖具有良好的生物相容性和可降解性,无刺激性、无免疫原性、无热源反应,并具有促进创面愈合的功能,而且易于加工成多孔支架,管材,棒材以及微球等型材<sup>[37-41]</sup>。壳聚糖分子链上富含氨基与羟基,非常便于对壳聚糖进行改性,以改变其溶解性和加工性能<sup>[42]</sup>。早期,壳聚糖主要应用于医用缝合线、防粘连材料以及创面敷料等方面。近年来,壳聚糖作为一种新型的组织工程材料越来越得到人们的重视<sup>[38-43]</sup>。马建标<sup>[36]</sup>等,以壳聚糖为原料,构建了具有双层结构的壳聚糖多孔支架,体外培养结果证明,成纤维细胞在该支架中能获得良好的生长。姚康德等则实现了在具有双层结构的壳聚糖-明胶多孔支架中同时构建具有表皮和真皮结构的组织工程皮肤<sup>[44,45]</sup>。朱惠光和计剑等通过表面截留的方法,将氨基酸改性过的壳聚糖固定到聚乳酸的表面,获得了对软骨细胞具有良好相容性的杂化表面<sup>[46]</sup>。Lee 等采用三聚磷酸钠交联磷酸三钙增强的壳聚糖支架,体外培养的成骨细胞在支架中呈现多层结构,并且能表现出很高的碱性磷酸酶活性,说明这种壳聚糖支架能有效地促进成骨细胞的粘附与增殖,并保持细胞表型不变<sup>[47]</sup>。

#### 1.2.1.5 海藻酸盐

海藻酸(Alginate)是由褐藻提取的多糖,常用作止血材料和创伤敷料。其分子中的羧基能转变成钠盐和钙盐,从而变成很粘稠的溶液,可作为增稠剂、稳定剂和凝

胶剂使用。向海藻酸的酸性溶液中添加二价阳离子如  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ , 则它们与海藻酸的古洛糖醛酸上的羧基发生静电相互作用, 形成乳白色的凝胶。利用凝胶化特性, 可用海藻酸盐对细胞进行微包囊, 作为酸性粘多糖的海藻酸, 此时类似于细胞外基质的主要成分 GAGs。

由于海藻酸生物材料不能降解, 使其应用受到一定的限制。利用过碘酸钠可使海藻酸盐轻度氧化, 而氧化海藻酸盐可通过水解途径降解。氧化 5% 的海藻酸盐仍能由  $\text{Ca}^{2+}$  交联形成凝胶, 该交联凝胶在磷酸缓冲溶液中 9 天内基本降解完全。降解型海藻酸水凝胶与一般海藻酸水凝胶相比能明显的促进软骨组织在动物体内的形成<sup>[48]</sup>。海藻酸盐凝胶用于组织工程时的另一个问题是缺乏和细胞的结合位点。海藻酸盐有强亲水性妨碍蛋白质的吸附, 不能和哺乳动物的细胞相互作用<sup>[49]</sup>。用糖特异结合蛋白凝集素修饰海藻酸盐可增强与细胞的结合能力<sup>[50]</sup>。此外, 将 RGD 序列细胞粘连配体与海藻酸盐凝胶偶联可改善骨骼肌肉细胞的粘连、增殖、分化和细胞的原型表达<sup>[51]</sup>。

#### 1.2.1.6 琼脂糖

琼脂糖 (Agarose) 是另一种海藻多糖, 它是 1,4-键合 3,6- $\alpha$ -L-半乳糖和 1,3-键合  $\beta$ -D-半乳糖的交替共聚物。琼脂糖溶于 65°C 以上的热水中。根据其侧链上羟乙基取代度的不同, 可在 17-40°C 范围内形成凝胶。琼脂糖凝胶一旦形成, 其结构比较稳定, 温度恒定时并不溶胀, 当加热到 65°C 以上时再转变成溶胶。

软骨细胞种植于琼脂糖凝胶构筑的细胞/琼脂糖材料结构物可用来研究细胞代谢 (包括各种生长因子)、细胞形状、细胞外基质合成、细胞原型表达以及在动物关节缺损模型中关节软骨形成速率等的影响因素, 结果确认向软骨细胞/琼脂糖结构物施加压缩应变影响其糖氨多糖、DNA、和总蛋白的合成能力。用同种异体软骨细胞/琼脂糖凝胶结构物对兔关节软骨的全层缺损进行修复, 与对照组相比具有显著的差异, 形成新软骨下骨, 同时新合成组织和宿主关节软骨的整合性良好<sup>[52]</sup>。

#### 1.2.2 合成类组织工程生物材料

合成类组织工程材料的最大优点在于可以根据具体组织或器官的特点进行专门设计, 其表面性能以及生物降解速率都可进行调节, 而且合成组织工程材料的力学性能和加工性能都较天然组织工程材料优良, 产品的质量也易标准化, 有利于大规模生产。总体说来, 合成组织工程材料的种类多, 选择范围广, 是组织工程材料发展的重要方向。合成组织工程材料的最大缺点是材料表面缺乏细胞可以识别的位点, 不具备生物活性, 而且材料的降解产物可能存在一定的毒性<sup>[53]</sup>。

### 1.2.2.1 聚乙醇酸、聚乳酸及其共聚物

聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(PLA)及其共聚物(PLGA)在医学领域被广泛应用。该类聚合物通过酯键水解而发生降解,其降解产物无毒,最终能够被机体代谢排出体外<sup>[54,55]</sup>。因此,该类聚合物已经得到美国 FDA 的批准,广泛地应用于手术缝合线、骨钉等医疗领域<sup>[56]</sup>。

#### 一、聚乙醇酸(PGA)

聚乙醇酸又称作聚乙交酯(PGA),是最简单的线形脂肪族聚酯,它由乙交酯开环聚合而成。PGA 玻璃化转变温度  $T_g$  为  $35\sim 40^\circ\text{C}$ ,具有结晶度高(45%-55%),熔点高( $220\sim 225^\circ\text{C}$ )等特点,是最早应用于医用缝合线的合成材料。高度结晶的 PGA 不溶于大多数有机溶剂,只溶于高氟代的有机溶剂(六氟异丙醇)中。以 PGA 为原料的无纺网状支架主要应用于组织工程软骨、骨以及肌腱的构建。Vacanti 等将兔软骨细胞种植于厚约  $100\mu\text{m}$  的无纺 PGA 支架中体外培养一周后,移植于兔膝盖创面。7 周后,埋植了软骨细胞/PGA 复合物的创面都形成了新生软骨组织,而对照组只有少量纤维状软骨存在<sup>[57]</sup>。1995 年,曹雨林等取小牛肩部、膝部的肌腱细胞,接种于  $0.4\text{cm}\times 0.4\text{cm}$  无纺 PGA 网状支架上,体外培养 1 周植入裸鼠皮下,结果在第 6 周标本中发现,支架四周排列着拉长的肌腱细胞,中心部分则显示较多的随意排列的肌腱细胞和细胞外基质。在第 12 周标本中,支架四周和中心部分的细胞已完全和正常肌腱组织相同<sup>[58]</sup>。

#### 二、聚乳酸(PLA)

聚乳酸又称作聚丙交酯(PLA)是近来应用更为广泛的一种组织工程材料,由于其单体分子手性的不同,可以分为 L 型、D 型以及 DL 型 PLA,其中由于自然界中多为 L-乳酸,所以 L 型 PLLA 应用更为广泛。聚乳酸可以由丙交酯催化开环聚合而成,也可以由乳酸直接缩聚合成。PLLA 和 PDLLA 为结晶性聚合物,而 PDLLA 为无定型聚合物。

相对于 PGA 而言,由于 PLA 的疏水性提高,其降解时间大大延长。PLLA 完全降解至少需要 24 个月,而且其降解产物乳酸往往会导致局部组织 pH 值降低,进而诱发组织炎症反应<sup>[56]</sup>。以 PLLA 为支架材料已经有大量的报道。Chu 等将兔的肋部软骨细胞种植于圆柱状的 PLA 多孔支架中,体外培养结果证明软骨细胞在支架中具有较高的细胞活性<sup>[59]</sup>。将上述支架与兔软骨膜处细胞复合后,体内移植 6 周后所构建的组织中只含有 20%的 II 型胶原,另外 80%都为 I 型胶原,组成与正常软骨组织相差甚远,

但是非常接近软骨膜的组成。由此可见构建的组织工程化组织的组成更多的是取决于细胞的种类而不是支架的性能<sup>[60]</sup>。

### 三、聚乙丙交酯(PLGA)

通过不同比例 PLA 和 PGA 的共聚,可获得一系列具有不同降解速率(从几个星期到几年)的聚乙丙交酯(PLGA)。PLGA( 85/15)常用做手术缝合线,其他组成的 PLGA 则多用于控制释放载体。大孔 PLGA ( 75/25)海绵作为组织工程支架使用。蔡晴等比较了两种 PLA 与 PGA 比例分别为 50/50 和 70/30 的 PLGA 在体外的水解和酶解行为。实验结果显示 PLGA ( 50/50)的失重速率要快于 PLGA ( 70/30 ),而且发现胰酶对 PLGA 的降解作用是由表及里进行的,因此 PLGA 比表面积越大,降解速度越快<sup>[61]</sup>。Riley 等以氯化钠为致孔剂,采用盐溶沥出的方法构建了孔径为 150~300 $\mu\text{m}$  的 PLGA ( 75/25)多孔支架,体外种植小鼠成骨细胞于支架中 56 天后,成骨细胞已经侵入支架 200 $\mu\text{m}$  深处,并保持其碱性磷酸酶活性,此时 PLGA 支架已经发生了部分矿化<sup>[62]</sup>。

#### 1.2.2.2 聚己内酯

聚己内酯(PCL)是另一类具有良好生物安全性的聚酯类聚合物,聚己内酯的玻璃化温度和熔点都很低,在室温下呈橡胶态,适于构建软组织工程支架。聚己内酯的另一显著特点是降解速率缓慢,通常其完全降解时间以及强度保持时间都大于 24 个月,非常适于作为长期植入装置或再生速率缓慢的组织或器官的支架材料<sup>[63]</sup>。

#### 1.2.2.3 医用聚氨酯(PU)

PU 具有优异的力学强度、高弹性、耐磨性、润滑性、耐疲劳性、生物相容性、可加工性等性能,因此被广泛用于生物材料,尤其是血液接触材料以及组织工程中的支架材料,以促进细胞和组织的再生,如长期植入的医用装置及人工器官等。但是未经处理的 PU 表面往往不利于细胞的生长<sup>[64]</sup>。

#### 1.2.2.4 其它合成组织工程生物材料

其它用于组织工程的高分子材料有聚(3-羟基丁酸酯)、聚四氟乙烯、聚氨基酸、聚酞类、聚乙烯醇(PVA),聚膦腈类,聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA)、聚氧化乙烯—聚氧化丙烯—聚氧化乙烯(Pluronic)智能水凝胶等,因它们各自的特点被不同程度地用作生物材料<sup>[65-67]</sup>。

### 1.2.3 组织工程用无机材料

#### 1.2.3.1 羟基磷灰石

羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA 或 HAp)化学分子式为  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  或  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , 结构为六方晶系  $\text{P6}_3/\text{m}$  空间群, 是脊椎动物骨骼和牙齿中的主要无机成分<sup>[68]</sup>。在骨质中, 羟基磷灰石大约占 60%, 是一种长度为 200 — 400 埃, 厚度 15-30 埃的针状结晶, 其周围规则地排列着骨胶原纤维。齿骨的结构也类似于自然骨, 但齿骨中的羟基磷灰石的含量高达 97。因为具有同人体和动物骨骼、牙齿极为相似的孔结构和化学成分, 羟基磷灰石具有良好的生物相容性, 对人体安全、无毒, 又能够在植入人体后同骨表面形成很强的化学键结合, 很好的辅助骨的生长, 是很好的硬组织替代材料, 其抗压强度较高, 但抗拉强度、抗冲强度、断裂韧性较低, 在生理环境中抗疲劳强度差, 目前仅限于不承力的部位, 如牙科、整形外科和上颌面重建等领域<sup>[69]</sup>。随后人们合成出柱状和针状的纳米级 HA 粉体和微晶。这些纳米 HA 粉体不仅在制备 HA 陶瓷方面提供了优良的性能, 而且在功能方面表现出一些特异性能。研究表明, HA 的许多特性与其粒径大小密切相关。当粒径大小介于 1~100nm 时, HA 不仅是一种性能优良的无机陶瓷粉末, 而且具有独特的生物学活性<sup>[70]</sup>。比如纳米 HA 对癌细胞具有一定的抑制作用, 但对正常细胞却基本没有影响<sup>[71]</sup>。因此, 对纳米 HA 制备方法及其医学应用的研究已越来越受到国内外材料工作者的广泛关注。在骨科、整形外科等临床应用上取得了许多可喜的成果。但由于该类材料脆性大、强度低、力学性能差、降解产物难以代谢等缺点, 仅能应用于非承载的小型种植体, 如人工齿骨、耳骨、充填骨缺损等, 大大地限制了它作为人体种植体的广泛使用。其降解性能仍然是材料工作者和临床应用需要解决的问题。在应用时要和其它材料复合, 比如 HA 与天然生物材料的复合或与有机生物医用材料的复合。

#### 1.2.3.2 $\beta$ -磷酸钙 ( $\beta$ -TCP)

磷酸钙 (TCP) 的结构分为高温型  $\alpha$ -TCP 和低温型  $\beta$ -TCP。 $\alpha$  相和  $\beta$  相的转化温度是 1120~1180℃。 $\alpha$  相为单斜晶,  $\beta$  相为菱面晶。同  $\alpha$ -TCP 相比,  $\beta$ -TCP 的主要优点是有着更好的降解性能。 $\beta$ -TCP 材料的体外实验显示, 该材料具有良好的细胞相容性, 动物或人体细胞可以在材料上正常生长、分化及繁殖<sup>[72-74]</sup>。众多的动物体内实验和临床应用也表明:该材料无毒性、无局部刺激性、不致溶血或凝血、不致突变或癌变。由于其组织成分与骨组织无机成分相同, 故植入体内无明显异物反应, 局部无明显炎症反应。Driskell 最早(1973 年)观察到  $\beta$ -TCP 材料植入骨缺损后, 材料可以与

骨组织发生直接连接,其间无纤维结缔组织介入。将四种不同孔隙率和孔径的 $\beta$ -TCP材料植入兔胫骨内,发现上述几种材料均表现出良好的生物相容性,材料植入后局部发现巨噬细胞、多核巨细胞、成纤维细胞等参与材料的降解,但无炎性细胞浸润等炎症反应,而且新骨可以直接在材料表面形成。且 $\beta$ -磷酸钙( $\beta$ -TCP)具有良好的生物降解性,其钙、磷的质量比为1:5,与正常骨组织接近,而且多孔 $\beta$ -TCP还可以提供大的比表面积,有利于细胞的增殖、分化和代谢,将其植入生物机体中,降解下来的Ca、P进入活体循环系统,对形成新生骨有一定的促进作用。Boo<sup>[75]</sup>等采用组织工程的方法成功构建出骨组织,并认为 $\beta$ -TCP较HA更适于组织工程骨的构建。目前,国内外许多学者对 $\beta$ -TCP生物陶瓷多孔支架进行了相关方面的研究。鸟山等<sup>[76]</sup>以 $\beta$ -TCP为原料制备多孔支架,最高强度达到19.7 MPa,符合人致密骨强度的要求;Klein<sup>[77]</sup>对 $\beta$ -TCP多孔支架的降解吸收与孔隙率和孔径大小的关系以及降解机理进行了研究,结果发现,含空隙率60% (孔径 $d < 5\mu\text{m}$ )的 $\beta$ -TCP植入3-6个月有明显吸收,而孔径大小为200~500  $\mu\text{m}$ 的样品吸收不明显,反应滞后至少2个月。微孔陶瓷周围的髓腔中出现大量的巨噬细胞及多核破骨细胞,它们的吞噬作用导致陶瓷吸收。黄占杰等研究认为<sup>[78]</sup>,  $\beta$ -TCP在机体内降解有两条主要途径:1、物理化学溶解;2、吞噬细胞吞噬,降解初期以理化过程的溶解降解为主<sup>[79-81]</sup>。降解后释放出的钙和磷离子参与局部代谢或体液循环,以正常方式被利用或被排出体外,而不会引起机体病理改变

### 1.2.3.3 生物活性玻璃

作为无机生物材料重要组成部分的生物活性玻璃具有良好的生物相容性和可加工性,生物玻璃是表面活性材料,能与人体骨或软组织形成生理结合。材料的生物活性取决于组分。生物活性玻璃一般为 $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系统,有时也含有 $\text{MgO}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ , A 1203等,其组成、结构和相成分可在较大的范围内调节,赋予材料新的功能和优点。生物玻璃网络中非桥氧所连接的碱金属离子在水溶液中存在时,易溶解释放一价或二价金属离子,使生物玻璃表面具有溶解性,这是玻璃具有生物活性的基本原因,因此非桥氧所占比例越大,玻璃的生物活性越高。生物玻璃早期主要用于口腔方面,随着材料的改性,生物玻璃在骨组织工程以及药物控释中有了更广阔的应用。

### 1.2.4 组织工程复合材料

人体的组织或器官在其组成、结构以及功能方面都具有高度的复杂性。因此,对组织工程支架的性能的要求也是多方面的,材料既要有良好的生物相容性和生物活性,又要有一定的力学性能。单一材料构建的组织工程支架往往无法同时满足上述要



求。因此,通过合适的方法将几种材料组合,其性能上互相取长补短,形成复合材料可取得良好的效果。常见的组织工程复合材料主要包括:天然组织工程材料间的复合,合成材料与天然材料间的复合,以及组织工程有机材料与无机材料间的复合。

不同种类天然组织工程材料间的复合,主要是为了从组分上尽可能地获得与 ECM 相类似的组织工程支架。如已应用于临床的组织工程皮肤 Integra 和 Apligraf 都是以 I 型胶原与 GAG 形成的复合材料作为支架,从组分上模拟人体皮肤中的 ECM 构成,构建适于皮肤组织再生的三维微环境。Hafemann 和 Ghofrani 用弹性蛋白与胶原复合构建真皮支架,小鼠体内实验证明该真皮支架在 3 周内即可实现血管化,6 周后支架已完全被新生真皮组织所代替<sup>[82]</sup>。此外,采用壳聚糖-明胶<sup>[83]</sup>,胶原-透明质酸<sup>[84]</sup>等复合材料构建组织工程支架的研究都已有报道。

合成组织工程材料虽然具有良好的力学强度,可控的降解速率以及生物安全性。但是大部分合成材料都属于“生物惰性材料”,缺乏细胞识别的位点,不能支持细胞在材料表面的黏附、增殖、分化以及胞外基质的分泌。通过天然组织工程材料与合成组织工程材料复合,可以在保持支架材料的力学强度以及降解行为不变的前提下,获得具有生物活性的表面。材料与细胞间的相互作用涉及到细胞的黏附、铺展、分裂、分化、表达以及凋亡等一系列的细胞行为。在生物体中,细胞与其胞外基质的作用往往是通过细胞膜表面跨膜受体-整合素与胞外基质中的胶原、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白上的配体相互识别来实现的<sup>[85]</sup>。因此,在合成组织工程材料表面引入具有整合素识别配体的蛋白或多肽是构建生物相容性界面的关键。陈国平等报道了一系列通过胶原或硫酸软骨素等天然材料与 PLLA, PGA 以及 PLGA 复合构建组织工程支架的研究,实验结果显示以上各种组织工程复合材料对软骨细胞、成纤维细胞以及肝细胞等都有良好的细胞相容性。本课题组应用负压导入技术,将胶原成功地引入 PLLA 多孔支架中,体外软骨细胞培养结果证明,软骨细胞在该 PLLA-胶原复合支架中铺展良好,具有典型的软骨细胞形态汇<sup>[86]</sup>。

组织工程有机材料与无机材料间的复合,也为是为了取长补短。Agrawal 等将  $\beta$ -磷酸钙、羟基磷灰石引入聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物中以防止无菌性炎症的发生<sup>[87]</sup>。为了弥补聚乳酸、聚乙醇酸共聚物抗压强度不足的缺陷,将羟基磷灰石加入其中得以提高材料的抗压强度<sup>[88]</sup>。针对多孔  $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -TCP)陶瓷缺乏骨诱导能力,将其复合骨形成蛋白,使之具有骨诱导特性<sup>[89]</sup>。胶原与羟基磷灰石复合可改善胶原的机械性能<sup>[90]</sup>。

总之,复合材料在应用于组织工程支架材料方面显示出巨大潜力。

## 1.3 组织工程支架的设计和制备

### 1.3.1 组织工程对支架的要求

随着组织工程的不断发展,对理想的组织工程用支架有以下的基本要求<sup>[91]</sup>:

- (1)具有生物相容性和生物降解性能;
- (2)适当的亲水性能,以促进细胞黏附;
- (3)能促进细胞的生长;
- (4)在细胞的分化和增殖过程中能保持细胞的功能;
- (5)具有适当的孔径、高的孔隙率及大的比表面积,以便给细胞的种植、生长和 ECM 的产生提供足够的空间;
- (6)具有相互连通的孔结构,保证细胞能够布满整个支架中,这是形成组织的一个要素;
- (7)支架本身具有良好的力学性能,能维持组织器官的原有形态。

### 1.3.2 组织工程支架的制备方法

有许多方法可用来制备组织工程支架,本节重点介绍制备具有一定宏观外形以及微观结构的组织工程支架的技术,以满足不同组织或器官的要求。由于组织工程材料加工性能的差异,如天然组织工程材料不适宜于高温加工,不同合成材料具有不同溶解性等,一种制备方法往往只能适用于一种或几种材料。常见的组织工程支架的制备方法有以下几种:

#### 1.3.2.1 非编织纤维连接法

采用 PGA、PLA 以及 PLGA 纤维所构建的网状支架,其比表面积和连通性非常好,利于细胞的黏附和代谢。这类支架已经被广泛地应用于神经、皮肤、食道、肌腱、膀胱以及软骨的再生<sup>[91-94]</sup>。但是简单的纤维堆积形成的网状支架的力学稳定性非常差,无法最终应用于受力部位组织或器官的再生。非编织纤维连接法(Fiber bonding)是指通过聚合物纤维的溶解或熔融,实现纤维间的连接而形成具有不同孔结构的三维聚合物网状支架的方法。Mikos<sup>[95]</sup>等将无纺的 PGA 网架放入 PLLA 的溶液中,待其溶剂挥发后形成嵌入了 PGA 网架的 PLLA 基材,然后将该复合体于高于 PGA 熔点的温度下进行后处理,使 PGA 纤维间实现熔融粘接,最后再用 PGA 的非溶剂中将 PLLA 溶解,即可获得纤维间相互粘接的 PGA 网状支架。但是简单的纤维堆积形成的网状

支架的力学稳定性非常差，无法最终应用于受力部位组织或器官的再生。

### 1.3.2.2 致孔剂-溶剂溶出法

致孔剂-溶剂溶出法(Porogen – solvent leaching )是将一定直径的颗粒与聚合物溶液混合均匀，该复合物通过溶剂挥发或冷冻干燥的方法去除聚合物溶剂后，再应用水或者其他溶剂将颗粒溶去，即可获得具有一定孔径大小的多孔支架<sup>[96,97]</sup>。该方法最大的优点是可方便地通过调节致孔剂的尺寸以及含量，来控制支架的孔径和孔隙率，而且其结构不受致孔剂和溶剂种类的影响。其不足之处是无法保证致孔剂颗粒的良好分散，而且在去除致孔剂的过程中可能需要使用有机溶剂，会破坏支架的生物相容性。常用的致孔剂包括各类盐粒子、多糖粒子以及低分子量的有机化合物和水溶性聚合物等。计剑和朱惠光等以 100~150 $\mu\text{m}$  的 KCl 颗粒为致孔剂，经典型的干燥-沥出过程后，制备了具有三维多孔结构的 PLA 支架。Peter X.等采用悬浮分散法制备了不同直径的蜡球微粒，并以蜡球为致孔剂制备了孔径可控、孔间相互连通的 PLLA 多孔支架<sup>[98]</sup>。陈国平等最近报道了以冰晶颗粒为致孔剂制备 PLLA 多孔支架的研究，该方法最大的优点是只需要经过冷冻-干燥即可获得多孔支架，不需要经过溶剂沥出步骤，而且不会在支架内部残留致孔剂<sup>[99]</sup>。

### 1.3.2.3 膜迭片法

膜迭片法是通过将多孔膜按所要构建支架的三维外形叠加起来，形成一定几何外形的组织工程支架。这一技术的优点是能按预先设计好的三维外形构建支架，其缺点在于不能一次成形，且制备过程中确保原始膜片的孔隙结构不变、层与层间密不可分有较大难度<sup>[100]</sup>。

### 1.3.2.4 熔融模法

熔融模法类似溶剂浇铸-颗粒沥滤法，只不过它不是将聚合物溶解在溶剂中，而是将聚合物粉末预先与可沥去相混合，然后倒入模具中加热至聚合物玻璃化温度以上，成形后取出在水中浸泡除去可沥去相，即可得到多孔具有模具三维外形的支架。例如，采用凝胶作为沥去相制备 PLGA 多孔支架。这一技术可以根据需要制得具有特殊三维外形的支架。但由于制过程中需对材料进行加热，可能引起聚合物性质改变，如制备聚乳酸支架时，材料可能出现热降解。加热对可沥去相也有影响，如凝胶作为可沥去相时，加热可能导致凝胶溶解性变差，不能从支架中溶出<sup>[101]</sup>。

### 1.3.2.5 热致相分离法

热致相分离法(Thermal induced phase separation, TIPS)是指通过将高温(或低温)状态的均相聚合溶液冷却(或升温)至低温(或高温)状态而发生液-液或液-固相分离,即出现聚合物富相和聚合物贫相,然后再通过冷冻干燥等方法去除溶剂即可获得具有多孔结构的聚合物支架<sup>[102]</sup>。采用胶原等天然组织工程材料构建支架时,多采用基于热致相分离原理的冷冻-冻干法。该方法最大的优点是制备温度低,可以保证不破坏天然材料的生物活性。目前,冷冻-冻干法广泛应用于制备胶原、明胶、壳聚糖等为主要材料的组织工程支架。

### 1.3.3 静电纺丝技术法

#### 1.3.3.1 静电纺丝原理

静电纺丝是利用高压静电驱使聚合物溶液(或熔融体)喷射形成聚合物纤维的过程。静电纺丝过程如下:将一定浓度的聚合物溶液装入毛细管中,将该溶液和高压电源的正极相连,在毛细管的下方放置一块金属板,和高压电源的负极相连,然后开始升高电压。开始的时候,聚合物溶液由于表面张力和重力的作用在毛细管尖端形成一个半球形的小液滴,由于处在电场中,小液滴的表面会产生感应电荷,电荷间的相互排斥产生了一个与表面张力方向相反的力,随着电场强度的增加,小液滴会发生形变,变成一个锥形,通常称之为 Taylor 锥<sup>[103]</sup>,当电场强度达到一个临界值时,电场力就超过表面张力,于是从 Taylor 的顶端就喷射出一条带电的喷流。在喷流到达接收器之前,溶剂不断挥发,而喷流也在高度拉伸下不断伸长变细,从而能得到固态的超细纤维。在固化过程中,喷流会由于表面所带电荷而发生所谓的“弯曲不稳定”<sup>[104-106]</sup>。同时,如果电荷间的排斥力大于喷流内部的粘性力,那么单一的喷流就会分裂成数条直径更小的喷流<sup>[107-109]</sup>。由于喷流在空气中的混乱的运动方式,使得接收器上得到的纤维的形态与无纺布相似。

#### 1.3.3.2 静电纺丝的影响因素

在静电纺丝中影响纤维的形态、结构的因素有很多,主要包括系统参数和过程参数。系统参数主要包括聚合物的分子量、分子量的分布、分子链的结构(支链、直链等)以及聚合物溶液的粘度、电导率、表面张力、比热等体系本身的性质。过程参数主要包括电场强度(当纺丝机型固定时,它与施加的静电压成正比)、聚合物溶液的流动

速率(简称流速,当喷丝头孔径固定时,射流平均速度与之成正比)以及针头与接收装置的距离。同时,射流周围的环境也对纺丝过程有一定的影响,如真空、空气或其他气氛,温度、湿度、气体流通速率等外界因素。通过协调、控制各个影响因素可以使聚合物溶液(或熔体)更有利静电纺丝,并且可以改变纤维的尺寸、结构,从而得到我们所需要的形态。

目前可以被静电纺丝的聚合物大约有几十种,其中大部分是溶液的静电纺丝。只有少数的是高分子熔体的静电纺丝,得到的纤维直径也比较大,大约在几个微米范围。纺丝原料除了一些合成高分子,还有蚕丝、丝素蛋白、等天然聚合物等,也包括 DNA 重组等一些特殊的聚合物。共聚物纺丝、共混纺丝的研究也非常多,其中包括天然聚合物/合成聚合物,合成聚合物/合成聚合物等,也包括混合溶剂的纺丝。

### 1.3.3.3 静电纺丝技术用于制备组织工程支架的优势

在应用于组织工程支架制备时,相比以往的支架制备技术和以往所得支架,它具有以下一些优点:

- 1)对设备和环境条件要求不高,易于实现。
- 2)此法在常温下进行,可避免高温引起的聚合物降解、支架变形等情况,且温和的制备条件有利一些生物活性因子的复合。
- 3)溶剂在纺丝过程中挥发较为彻底,减小溶剂残留对细胞生长可能带来的影响
- 4)制备过程中不需使用致孔剂,不会出现致孔剂去除不全的问题,且孔隙间贯通性好。
- 5)比起纤维连接法中用传统熔融纺丝或溶液纺丝制得的纤维,此方法能得到更细的纤维,从几十纳米到几微米,因此所得支架具有更大的比表面积,能为细胞生长提供更多的表面。
- 6)从支架结构形貌上看,静电纺丝支架能更好地在形态上模拟细胞外基质。

## 1.4 本课题的提出和研究内容

### 1.4.1 本课题的提出

在组织工程中, 支架的降解行为极其重要, 体外降解性能的评价是人造支架得以进一步应用于体内的必经程序<sup>[109-113]</sup>。静电纺丝是一种简单通用的制备聚合物纳米纤维的技术, 纳米纤维可以接受为宏观上的无纺或平行结构<sup>[114-117]</sup>。可生物降解的静电纺丝支架广泛应用于组织工程中, 但其降解过程的剧烈收缩会极大地降低支架的孔隙率, 影响进一步的应用<sup>[118-122]</sup>。因此, 如何在降解过程中维持静电纺丝支架的拓扑学结构成为一个挑战。与无规或平行的支架相比, 具有花纹结构的支架提供了更加复杂有序的表面拓扑学和微米尺度的孔隙<sup>[123]</sup>, 而关于具有花纹结构的静电纺丝支架的降解行为研究报道几乎很少。

研究表明<sup>[124-126]</sup>, 在大尺寸 PLGA 材料的降解过程中存在不均匀的降解, 内部降解速率比表面打, 聚合物内部出现空洞。这是因为随着 PLGA 降解反应的进行, 产生的小分子来不及代谢而积累, 造成局部酸浓度过大, 它们又会加速催化材料的降解, 即发生自催化效应。在 100 $\mu\text{m}$  厚的 PLGA 致密膜的降解过程中仍然可以观察到自催化效应<sup>[127]</sup>。但在纳米纤维的降解过程中, 是否还存在自催化效应, 有待于进一步进行研究。

大多数学者认为, 酶对疏水性聚合物的降解是由表及里的, 因为亲水性的酶分子很难进入到聚合物的内部, 比表面积对聚合物的酶解的有重要影响<sup>[128-131]</sup>。因此, 比表面积高的纳米纤维支架更有利于酶解的进行<sup>[132-133]</sup>。另一方面, 在细胞培养和体内移植的过程中, 支架和酶的接触和相互作用是极其常见的。因此, 研究酶对静电纺丝支架的降解是十分必要的。

PLGA 由于具有良好的生物降解性能、力学性能和细胞相容性而被广泛地用作骨组织修复、骨和软骨组织工程材料。然而其降解后形成的局部酸性也会导致周围器官和组织产生炎症反应<sup>[124-126]</sup>。这也是人工合成的可降解聚酯类聚合物作为生物材料使用时所共有的缺陷<sup>[61-62]</sup>。 $\beta$ -TCP 是天然骨组织的无机成分, 具有良好的生物相容性<sup>[72-78]</sup>。将碱性的  $\beta$ -TCP 与 PLGA 复合后能有效中和 PLGA 降解后形成的局部酸性, 降低炎症反应<sup>[79-81]</sup>。对 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维支架进行体外降解和细胞相容性评价是其进一步应用的前提。

### 1.4.2 本课题的研究内容及创新点

本文应用静电纺丝技术，设计制备了具有巢形花纹结构的 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维复合支架，并对所得支架进行体外降解性能和细胞相容性评价。

本课题的研究内容包括以下几点：

1. 具有巢形花纹结构的 PLGA (75/25) 纳米纤维支架的制备及表征。

2. 具有巢形花纹结构的 PLGA 纳米纤维支架的体外水解和体外酶解，以及该支架的体外成骨肉瘤细胞共培养。

3. PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维复合支架的制备、体外水解和细胞相容性研究。

本课题的创新点包括以下几点：

1. 设计制备了具有巢形花纹结构的 PLGA (75/25) 纳米纤维支架。这种 PLGA 纳米纤维支架的表面由许多巢形结构单元，每个巢形结构单元具有三个拓扑学不同典型的区域：脊形区域，无纺区域和磁感线区域。纳米纤维支架能够随降解的进行而维持最初的拓扑学结构。尽管纳米纤维依旧收缩和粘连，但每个巢形结构的骨架能够有效的防止纳米纤维膜结构变形。同脊形区域和磁感线区域相比，成骨肉瘤细胞更倾向于栖息在无纺区域。

2. 在 PLGA 纳米纤维支架的体外水解和酶解过程中，首次观察到，即使纤维直径已经下降到了纳米尺度 ( $<900\text{nm}$ )，酸自催化降解效应仍然存在。溶菌酶的存在只能加速溶解低分子量的降解产物，而对于聚合物链的断裂没有贡献。

3. PLGA/TCP 复合物具有适中的力学性能、可控的降解性能和良好的细胞相容性，有希望成为组织工程中的支架材料。

## 第二章 具有巢形花纹结构的 PLGA 和 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维支架的制备

### 2.1 引言

在静电纺丝技术，不同的接收装置可以使得纳米纤维具有不同的宏观排布。采用平板或辊筒为接收，纳米纤维可以接受为宏观上的无纺或平行结构<sup>[114-116]</sup>。如果接收装置导体表面的电场呈现有规则的花纹分布，则纳米纤维可以接收为宏观上的规则的花纹结构<sup>[117, 123]</sup>。因为静电纺丝过程中，带正电荷的纳米纤维会优先选择落入导电性强的区域<sup>[123]</sup>。与无纺或平行的支架相比，具有花纹结构的支架能提供更加复杂有序的表面拓扑学和微米尺度的孔隙。

PLGA 由于具有良好的生物降解性能、力学性能和细胞相容性而被广泛地用作组织工程材料。然而其降解后形成的局部酸性也会导致周围器官和组织产生炎症反应<sup>[56-62]</sup>。 $\beta$ -TCP 是天然骨组织的无机成分，具有良好的生物相容性<sup>[72-78]</sup>。研究表明，将碱性的  $\beta$ -TCP 与 PLGA 复合后能有效中和 PLGA 降解后形成的局部酸性，降低炎症反应<sup>[79-81]</sup>。

本章利用静电纺丝技术，以铜网（40 目）为接受装置，制备了具有巢形结构的 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维复合支架。用扫描电镜（SEM）和透射电镜（TEM）对所得支架的微观形貌进行了表征。着重比较了巢形结构单元中三个典型区域（脊形区域，无纺区域，磁力线区域）在纤维取向和孔径大小方面的差异。同时对所得支架的拉伸力学性能进行了表征。

### 2.2 实验部分

#### 2.2.1 实验原料、试剂和仪器

##### 2.2.1.1 主要原料和试剂

表 2-1 实验药品

Table 2-1 Experimental Materials

| 名称                   | 级别  | 生产厂家      |
|----------------------|-----|-----------|
| PLGA(75/25), 10 万分子量 | 分析纯 | 山东医疗器械研究所 |



|              |                     |              |
|--------------|---------------------|--------------|
| 四氢呋喃         | 分析纯                 | 北京化工厂        |
| DMF          | 分析纯                 | 北京化工厂        |
| $\beta$ -TCP | 平均粒径 $1\mu\text{m}$ | 上海瑞邦生物材料有限公司 |

### 2.2.1.2 主要实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental Equipments

| 仪器名称    | 规格型号         | 生产厂家           |
|---------|--------------|----------------|
| 电子天平    | LP502A       | 常熟市百灵仪器有限公司    |
| 高倍显微镜   | MM6-LS22     | Olympus, Japan |
| 真空干燥箱   | XMTA-7000P 型 | 天津机械厂          |
| 循环水式真空泵 | SHZ-D (III)  | 巩义市玉华仪器有限责任公司  |
| 扫描电子显微镜 | S-4700       | Hitachi, Japan |
| 万能材料实验机 | INSTRON-3345 | 英国 LLYOD 公司制造  |
| 透射电镜    | JEM-3010     | JEOL Japan Inc |
| 磁力搅拌器   | HT-4A        | 常州国华电器有限公司     |
| 超声波清洗仪  | KQ-(001)B    | 昆山市超声仪器有限公司    |
| 酸度计     | PHS-3W 型酸度计  | 北京玉林科技有限公司     |

## 2.2.2 具有巢形花纹结构 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的制备

### 2.2.2.1 PLGA 纳米纤维支架的制备

经过不断改进溶液组成、电压、接收距离和流速等参数,得到了稳定的 PLGA 静电纺丝工艺如表 2.3 所示。根据配方称取 1.5 克 PLGA,用 5ml 混合溶剂(DMF/THF=1:1)溶解配成 PLGA 浓度为 30%(m/V)的溶液,搅拌一昼夜后作为纺丝液。在电压为 16KV,接收距离为 18cm,流速为 0.8ml/h 的参数下以 40 目铜网为接收装置进行静电纺丝,制备出表面具有巢形花纹结构的 PLGA 纳米纤维支架,保存于真空干燥箱中。

表 2-3 PLGA 静电纺丝工艺参数  
Table 2-3 Electrospinning parameters for PLGA

|               |       |                                                     |
|---------------|-------|-----------------------------------------------------|
| PLGA 静电纺丝工艺参数 | 纺丝液组成 | PLGA (75/25) , 10 万<br>DMF:THF=1:1 (v/v)<br>m/V=30% |
|               | 电压    | 16KV                                                |
|               | 距离    | 18cm                                                |
|               | 纺丝液流速 | 0.8ml/h                                             |
|               | 接收装置  | 40 目铜网                                              |
|               |       |                                                     |

#### 2.2.2.2 PLGA/β-TCP 复合支架的制备

在 50Hz 超声状态下, 按照 β-TCP/PLGA 重量比等于 10%wt 和 20%wt 的比例, 将 β-TCP 粒子加入到配制好的 PLGA 纺丝液中, 搅拌 24 小时。然后表 2-3 的纺丝工艺进行静电纺丝, 制备 PLGA/β-TCP 复合支架。

#### 2.2.3 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/β-TCP 复合支架的表征

##### 2.2.3.1 扫描电镜观察 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/β-TCP 复合支架的微观形貌

将 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/β-TCP 复合支架切成 1×1cm 小片, 喷金处理, 在扫描电子显微镜 (SEM) 下观察微观形貌。

##### 2.2.3.2 PLGA 支架纤维直径、纤维取向和孔径大小的测定

将所得的 PLGA 纳米纤维支架的 SEM 照片输入到软件 Image Pro Plus (ICube, Crofton, MD)中, 随机抽取 120 根纤维, 测定纳米纤维直径和纤维取向。通过分析计算 SEM 照片上纤维间距可以推算出 PLGA 纳米纤维支架的孔径大小。

##### 2.2.3.3 PLGA/β-TCP 复合支架的透射电镜表征

将纺成的 PLGA/β-TCP 杂化纳米纤维少量接收于透射电镜专用的铜网上, 在透射电镜 (TEM) 上观察 β-TCP 在 PLGA 纳米纤维中的分布状况。

### 2.2.3.4 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架拉伸力学性能测试

将制备的 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架剪成长为  $30\text{mm} \times 10\text{mm} \times 0.1\text{mm}$  的长方形试件。在 INSTRON-3345 型万能材料实验机上按照 GB 13022 — 91 测试支架的拉伸强度( $\sigma$ )和拉伸模量( $E_t$ ), 加载速度为  $10\text{mm/min}$ 。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 具有巢形花纹结构的 PLGA 支架扫描电镜 (SEM) 表征

如图 2-1 所示, PLGA 纳米纤维支架的表面由许多巢形结构单元组成(图 2-1a), 每个巢形结构单元的平均尺寸为  $400 \times 300\mu\text{m}$ (图 2-1b)。在同一巢形单元中具有三个典型的区域: 脊形区域(I), 无纺区域(II)和磁感线区域(III)(如图 2-1)。三个区域的拓扑学有显著不同, 脊形区域内的纤维呈平行状分布, 纤维密度大; 无纺区域内的纤维取向具有随机性, 纤维密度低; 而磁感线区域内的纤维则像磁感线一样排布。

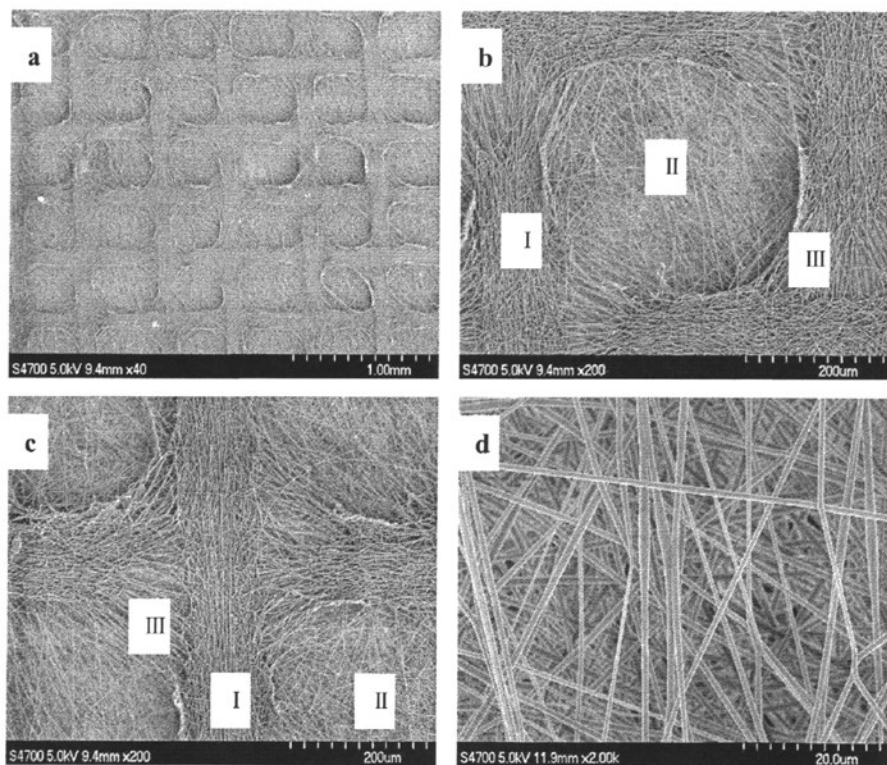


图 2-1 具有巢形花纹结构的 PLGA 纳米纤维支架 SEM 照片 (a-d)

Fig 2-1 SEM micrographs of electrospun nest-like patterned PLGA scaffold (a), enlarged figures of nest unit (b), cross-locked ridges (c) and non-woven region (d).

### 2.3.2 PLGA 支架纤维直径、纤维取向和孔径大小

如图 2-2(a)所示, PLGA 支架中纳米纤维的直径分布在 630~1210nm 之间, 三个典型区域内的纳米纤维直径无显著差异, 平均直径为  $849 \pm 118$  nm。

如图 2-3(b-d)所示, 在脊形区域(I)内, 平行纤维(纤维取向沿着巢形区域棱的方向)的所占的比例超过 50%; 在磁感线区域(III)内, 平行纤维的比例下降到 36%, 纳米纤维的取向集中于 $-45^\circ \sim 45^\circ$  之间; 在无纺区域(II)内, 纳米纤维的取向随机分布于 $-90^\circ \sim 90^\circ$  之间。正是由于纤维取向和排列方式的不同, 造成了三个区域内不同的纤维间距和孔径大小, 如表 2-4 所示。

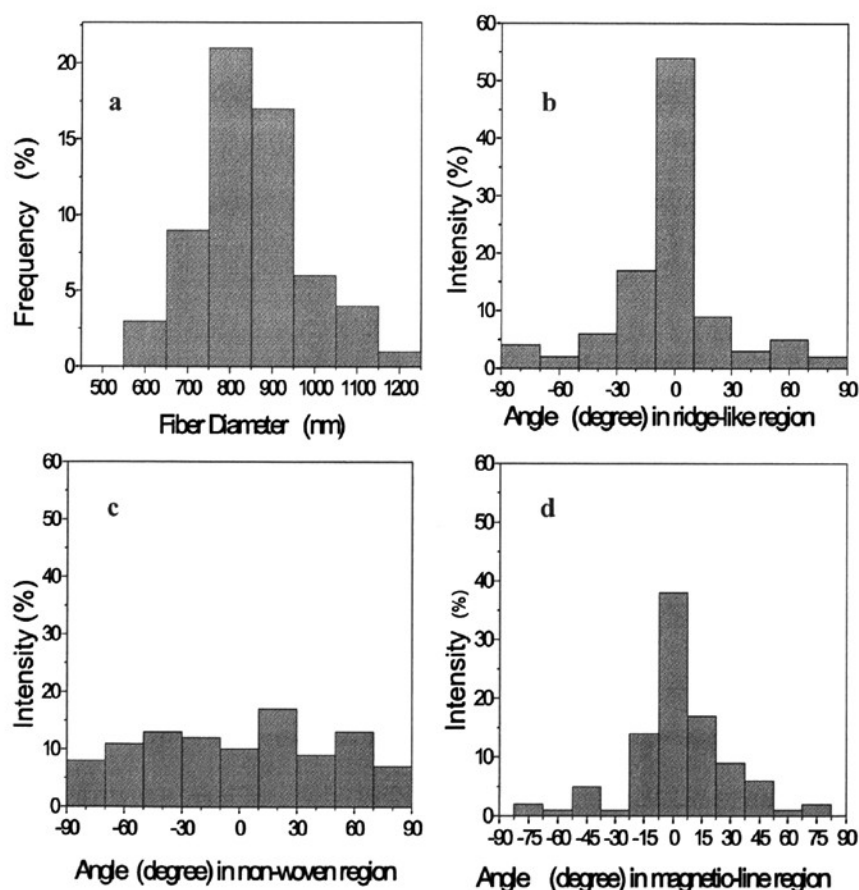


图 2-2 纤维直径和纤维取向的测定

**Fig2-2** Assessment of fiber diameter (a) and fiber orientation in different regions of the electrospun nest-like patterned PLGA scaffold: (b) Region I, (c) Region II, and (d) Region III.

表2-4 PLGA支架中三个典型区域孔径大小的测定

Table 2-4 Measurement of pore size in the three regions of PLGA scaffolds

| Region                         | ridge-like region( I ) | non-woven region( II ) | magnetic lines-like region(III) |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Pore size<br>( $\mu\text{m}$ ) | $1.78\pm0.21$          | $5.64\pm0.37$          | $4.32\pm0.35$                   |

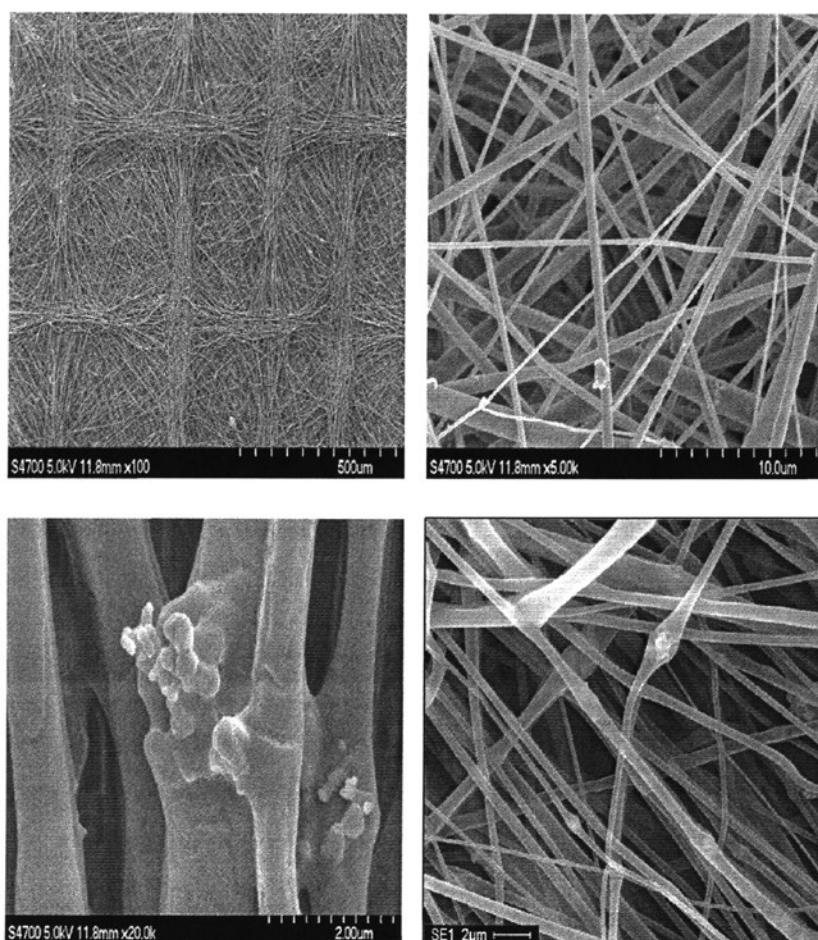
2.3.3 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架 SEM 和 TEM 表征图 2-3 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的 SEM 表征Fig 2-3 SEM observation of PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

表 2-5 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架中钙、磷含量  
Table 2-5 Content of Calcium and Phosphor for PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

| Element | Wt%  | At%  |
|---------|------|------|
| P       | 1.49 | 1.19 |
| Ca      | 2.62 | 1.71 |
| Ca/P    | 1.69 | 1.44 |

由图 2-3 可以看出,同 PLGA 纳米纤维支架相比,PLGA/ $\beta$ -TCP 复合膜的纤维直径变得不再均匀,串珠增多。纤维出现轴结状突起,对其进行元素分析表明,此处存在较多钙元素和磷元素,Ca/P 比显示其为  $\beta$ -TCP (表 2-5)。

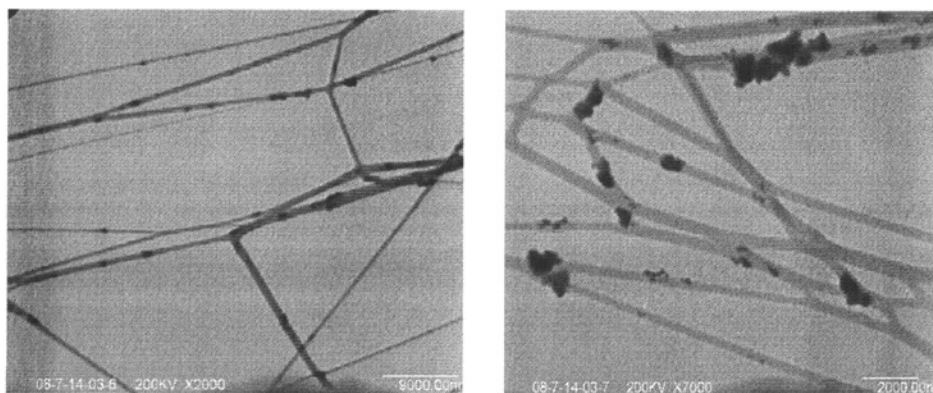


图 4-1PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的 TEM 表征

图 2-4 是 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的透射电镜 (TEM) 照片。从图中可以看出, $\beta$ -TCP 被成功的包裹在 PLGA 纳米纤维中,但是分散不是很理想。

### 2.3.4 PLGA 纳米纤维支架和 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的拉伸力学性能

如图 2-5 和表 2-5 所示,由于巢形花纹结构的存在,PLGA 纳米纤维支架的拉伸力学性能是各向异性的。如果沿着白色箭头所指的方向-棱方向(即沿着巢形结构棱的方向)进行拉伸测试,所得到的拉伸强度( $\sigma$ )和拉伸模量( $E_t$ )分别为 5.362MPa 和 95.637MPa。而如果沿着黑色箭头所指的方向-对角线方向(即沿着巢形结构的对角线方向)进行拉伸测试,所得到的拉伸强度( $\sigma$ )和拉伸模量( $E_t$ )分别为 4.581MPa

和 80.436MPa。沿着棱方向所测得的拉伸强度 ( $\sigma$ ) 和拉伸模量 ( $E_t$ ) 分别比沿着对角线方向所测得的拉伸强度 ( $\sigma$ ) 和拉伸模量 ( $E_t$ ) 高出 17.04% 和 19.44%。

如表沿着棱方向进行测试, PLGA/ $\beta$ -TCP 复合纤维支架的拉伸强度略有降低, 但弹性模量有所提高。

如图 2-6 所示为 PLGA 纳米纤维支架沿着棱方向 (平行于巢形区域棱的方向) 进行拉伸力学测试所得到得应力-应变曲线, 起始一段直线表示支架在这时期处于弹性形变阶段, 应力与应变成正比, 当应变达到 20% 左右时, 支架出现不典型的屈服, 图中 A 点为支架的不典型屈服点, 随后进入非弹性形变阶段, 应力继续以较慢的速度上升, 到达一定形变量后支架断裂, 图中 B 点为支架的断裂点。从图上可以得到支架的断裂强度为 5.36MPa, 断裂伸长为 96%。

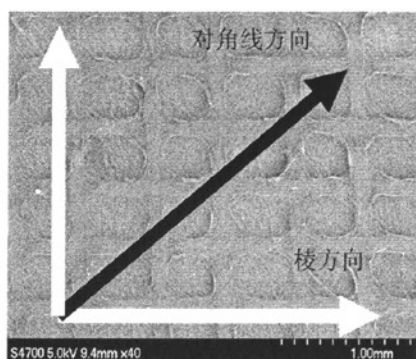


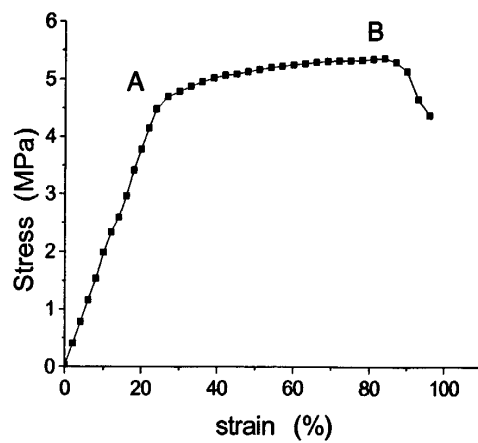
图 2-5 拉伸力学测试的方向示意图

Fig 2-5 Schematic graph of direction for tensile mechanical mesurements

表 2-5 具有巢形花纹结构的 PLGA 纳米纤维支架的拉伸强度和拉伸模量测定

Table 2-5 Measurements of tensile strength and modulus of nest-like patterned PLGA scaffolds

| PLGA 纳米纤维支架                  | 拉伸强度 $\sigma$ (MPa) | 拉伸模量 $E_t$ (MPa)    |
|------------------------------|---------------------|---------------------|
| 沿棱方向                         | $5.362 \pm 0.203$   | $95.637 \pm 3.547$  |
| 沿对角线方向                       | $4.581 \pm 0.187$   | $80.436 \pm 2.291$  |
| PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架 (棱向) | $5.021 \pm 0.149$   | $120.178 \pm 3.374$ |



**Fig 2-6** Stress-strain graph for PLGA nanofibrous scaffold

**图 2-6** PLGA 纳米纤维支架的应力-应变曲线



## 2.4 本章小结

1.经探索得出 PLGA (75/25,10 万分子量) 的稳定的静电纺丝工艺。采用混合溶剂(DMF:THF=1:1), PLGA 的浓度为 30% (m/V), 电压 16KV, 接受距离 18cm,流速 0.8ml/h.见表 2-3

2.利用静电纺丝技术, 以铜网为接受装置, 制备了表面具有巢形结构的 PLGA 纳米纤维支架, 纳米纤维的平均直径为  $849\pm118$  nm。该支架的表面由许多巢形结构单元组成, 每个巢形结构单元的平均尺寸为  $400\times300\mu\text{m}$ 。在同一巢形单元中具有三个典型的区域: 脊形区域(I), 无纺区域(II)和磁感线区域(III)。脊形区域内的纤维平行分布, 纤维密度大, 孔径小; 而无纺区域内纤维取向无规, 纤维密度小, 孔径大。

3.所得到的 PLGA 纳米纤维支架的拉伸力学性能具有各向异性。沿着巢形结构棱的方向进行拉伸测试所得拉伸强度( $\sigma$ )和拉伸模量( $E_t$ )分别为 5.362MPa 和 95.637MPa。分别比沿着巢形结构单元对角线方向所测得的拉伸强度( $\sigma$ )和拉伸模量( $E_t$ )高出 17.04%和 19.44%。

4. 将无机  $\beta$ -TCP 粒子分散到 PLGA 纺丝液中,通过静电纺丝可将  $\beta$ -TCP 粒子成功包裹在 PLGA 纳米纤维中, 形成 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合纤维支架。同 PLGA 纳米纤维支架相比, PLGA/ $\beta$ -TCP 复合纤维支架的拉伸强度略有降低, 但弹性模量有所提高。

### 第三章 具有巢形花纹结构的 PLGA 支架的体外降解性能和细胞亲和性研究

#### 3.1 引言

研究表明<sup>[118-122]</sup>，在体外降解过程中，无纺聚酯纳米纤维支架的会发生剧烈的收缩，导致支架空隙率下降，严重影响了这类支架进一步应用。而关于静电纺丝支架花纹结构的降解行为以及是否花纹结构的存在有利于降低支架的收缩率的研究几乎没有。

对 PLGA 水解机理研究的结果基本一致<sup>[124-126]</sup>，在大尺寸 PLGA 材料的降解过程中存在不均匀的降解，内部降解速率比表面大，聚合物内部会出现空洞。这是因为随着 PLGA 降解反应的进行，产生的小分子来不及代谢而积累，造成局部酸浓度过大，它们又会加速催化材料的降解，即发生自催化效应。在 100 $\mu\text{m}$  厚的 PLGA 致密膜的降解过程中仍然可以观察到自催化效应<sup>[127]</sup>。但在纳米纤维的降解过程中，是否还存在自催化效应，有待于进一步进行研究。

大多数学者认为，酶对疏水性聚合物的降解是由表及里的，因为亲水性的酶分子很难进入到聚合物的内部，比表面积对聚合物的酶解的有重要影响<sup>[128-131]</sup>。因此，比表面积高的纳米纤维支架更有利于酶解的进行<sup>[132-133]</sup>。另一方面，在细胞培养和体内移植的过程中，支架和酶的接触和相互作用是极其常见的。因此，研究酶对静电纺丝支架的降解是十分必要的。研究表明，细胞材料敏感于支架表面的拓扑学<sup>[134-136]</sup>。具有花纹结构的纳米纤维支架能够提供复杂多样的拓扑学结构，必定对细胞生长产生影响。

本章研究了具有巢形花纹的 PLGA 纳米纤维支架的体外降解性能。在磷酸盐缓冲溶液（PBS）和加有溶菌酶（lysozyme）的 PBS 中分别进行体外水解和体外酶解。对支架两种降解过程中的分子量变化，失重，力学性能进行对比研究。同时对支架进行了体外成骨肉瘤细胞（MG-63）培养，探讨支架的表面拓扑学对细胞生长的影响。

#### 3.2 实验部分

##### 3.2.1 主要原料和试剂

表 3-1 实验药品

Table 3-1 Experimental materials

| 名称        | 生产厂家  |
|-----------|-------|
| NaCl（分析纯） | 北京化工厂 |

|                                               |                                  |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|
| KCl (分析纯)                                     | 北京化工厂                            |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (分析纯)        | 北京化工厂                            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (分析纯)         | 北京化工厂                            |
| NaN <sub>3</sub>                              | 北京化学试剂公司                         |
| Lysozyme                                      | Sigma Chemical, USA              |
| MG-63 cells                                   | American Type Culture Collection |
| Fetal bovine serum                            | Sigma Chemical, USA              |
| Dulbecco's modified Eagle's<br>medium         | Sigma Chemical, USA              |
| Antibiotics (Penicillin,<br>Streptomycin P/S) | Sigma Chemical, USA              |

### 3.2.2 实验方法

#### 3.2.2.1 降解介质的配制

水解介质的配置: PBS 缓冲液按如下方法配制:称取分析纯 NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.9g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, 溶于 1000ml 三蒸水中, 调节 pH=7.40, 高压锅灭菌。

酶解介质的配置: 在 PBS 溶液加有溶菌酶 (lysozyme) 作为体外酶解的降解介质, PBS 中溶菌酶的浓度为 (20000U/ml)。

#### 3.2.2.2 PLGA 纳米纤维支架的体外水解和体外酶解

将制备的 PLGA 支架切成 60×40×0.1mm 小块, 每个样品的质量约为 200mg, 准确称取质量 ( $W_0$ )。然后将样品放入盛有 50ml pH 值为 7.4 的 PBS 的试管中, 抽真空 20 分钟, 以保证 PBS 浸入到 PLGA 支架的纤维孔径中。然后将试管放入恒温振荡器 (37±0.1℃, 50rpm) 中进行 20 周的体外水解实验。每 3 个样品为一组, 每周换一次液, 在规定的時間间隔取一组样品, 冷冻干燥, 然后进行测试表征。

PLGA 支架的体外酶解与体外水解的方法一致, 唯一不同的是采用加有溶菌酶的 PBS 作为降解介质。

#### 3.2.2.3 体外降解的表征方法

### 1. 支架失重率的测定:

在设定的降解时间 (t) 将 PLGA 支架样品从降解介质中取出, 用三蒸水洗涤, 冷冻干燥后称重得到  $W_t$ 。则失重率可由式子:  $(W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$  计算,  $W_0$  为样品初始重量。

### 2. 分子量和分子量分布的测定:

将不同降解时间的 PLGA 支架样品, 溶解在四氢呋喃(THF)中, 配成 5% (质量体积比) 的溶液。采用凝胶渗透色谱仪(GPC), 以 THF 为溶剂淋洗, 流速 1.0 mL/min, 温度 40°C, 以聚乙烯为标样计算聚乳酸的数均和重均分子量。

### 3. PLGA 支架降解后的 SEM 观察:

将不同水解时间的 PLGA 支架样品, 喷金处理, 在扫描电子显微镜 (SEM) 下观察微观形貌。

### 4. PLGA 支架降解后的拉伸力学性能测试:

将不同水解时间的 PLGA 支架样品, 剪成长为 30 mm × 10 mm × 0.1 mm 的长方形试件。在 INSTRON-3345 型万能材料实验机上按照 GB 13022 — 91 测试支架的拉伸强度 ( $\sigma$ ) 和拉伸模量 ( $E_t$ ), 加载速度为 10 mm/min。

#### 3.2.2.4 PLGA 纳米纤维支架的体外成骨肉瘤细胞 (MG-63) 培养

将 PLGA 纳米纤维支架剪成直径为 10 mm 的小块,  $^{60}\text{Co}$  (25 kGy) 照射 2 小时进行消毒, 然后将其固定到 24 孔培养板的底部, 倒入 DMEM 培养基浸泡 24 小时待用。

成骨肉瘤细胞 (MG-63 cells) 由美国 ATCC 细胞库提供。取第二代成骨肉瘤细胞, 按照  $10^4$  /孔的密度, 用 1 ml 的注射器接种到上述 PLGA 纳米纤维支架上, 加入 DMEM 培养基、10% 牛血清和 1% 抗生素, 然后放入  $\text{CO}_2$  培养箱进行培养。培养基每 3 天更换一次。

将培养了 3 天和 7 天的细胞支架样品, 在 2.5% 的戊二醛溶液中, 4°C 下固定一天。然后用 20%, 50%, 70%, 90%, 100% 的乙醇溶液逐步脱水, 其中 100% 的乙醇使用两次, 每一步 15~20 min。醋酸异戊二酯浸泡 30 min, 经冷冻干燥, 喷金, SEM 观察。

3.3 结果

3.3.1 分子量和分子量分布的变化

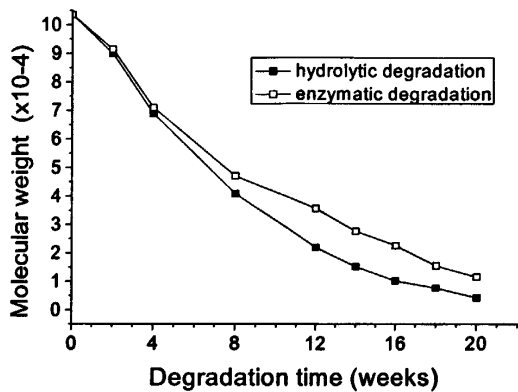


图 3-1 体外水解和酶解过程中 PLGA 分子量变化

Fig 3-1 Change of molecular weights for hydrolytic samples and enzymatic samples.

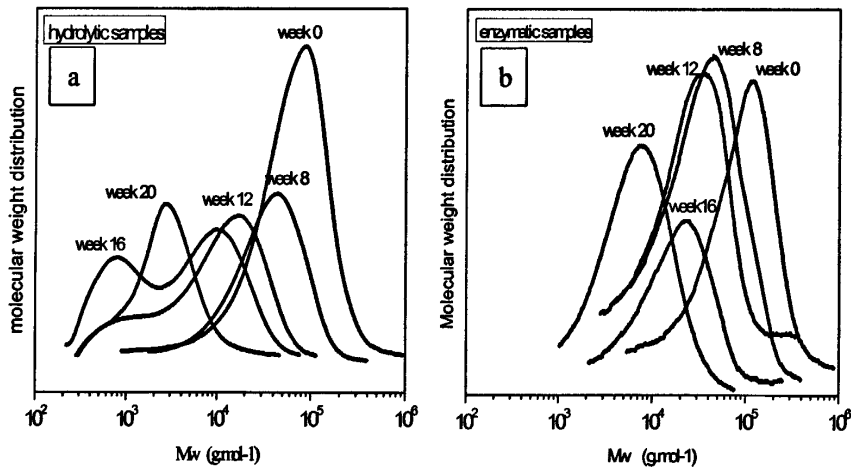


图 3-2 体外水解和体外酶解过程中 PLGA 分子量分布对比

Fig3-2 Comparision of molecular weight distribution for hydrolytic samples (a) and enzymatic samples (b).

采用 GPC 法对已降解支架的 PLGA 分子量及其分布进行测定。如图 3-1 所示，随着降解的进行，无论是体外水解还是体外酶解，PLGA 的分子量都是持续下降的。在 4 周以前，PLGA 分子量的下降趋势在水解和酶解过程中基本一致。然而，到了 8 周以后，经历水解的 PLGA 的分子量下降速度要快于酶解。在 16 周时，水解 PLGA

的分子量已经下降到 10000 左右，而酶解 PLGA 的分子量下降到同样数值要在 20 周以后。

如图 3-2 所示，随着降解的进行，无论是水解 PLGA 还是酶解 PLGA，其分子量分布都逐渐变宽。尤其引人注意的是，水解 PLGA 在 16 周时出现明显双峰，两个峰值分子量分别位于 1000 和 10000 附近。很显然，经历水解的 PLGA 样品中有较多的低分子量组分。而酶解 PLGA 样品在 20 周的降解时间内始终都是单峰，且在降解 20 周以后，其分子量峰值仍然在 10000 左右，说明经历酶解的 PLGA 样品中低分子量组分含量很少。

### 3.3.2 重量变化

在设定的时间 (t) 将 PLGA 支架样品从降解介质中取出，用三蒸水洗涤，冷冻干燥后称重得到  $W_t$ 。则重量保有率可由式子： $W_t/W_0 \times 100\%$  计算， $W_0$  为样品初始重量。

PLGA 支架在体外水解和酶解的过程中的失重如图 3-3 所示。在 8 周以前，水解样品和酶解样品的失重都很小。酶解样品在 8 周以后开始出现明显失重，而水解样品则要在 12 周以后才开始出现明显失重。酶解 PLGA 在 16 周以后失重可达 50%，而水解要在 20 周以后才能达到同样的失重。

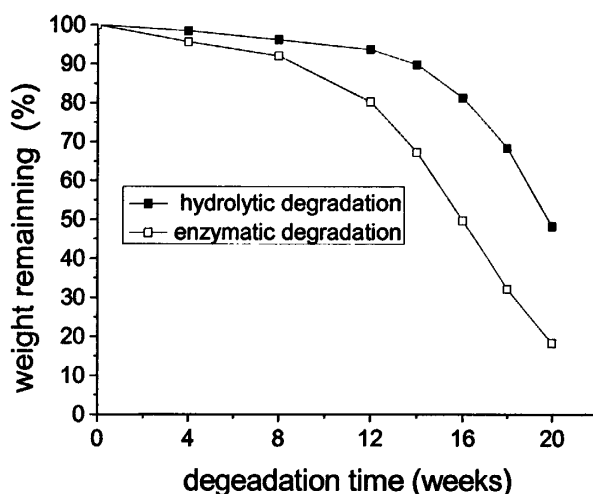


图 3-3 体外水解和酶解过程中 PLGA 支架的失重对比

Fig3-3 Comparison of the change in weights for hydrolytic samples and enzymatic samples.

### 3.3.3 体外水解和体外酶解过程中 PLGA 支架的微观形貌 (SEM)

图 3-4 为 PLGA 支架水解 4 周 (a-d), 8 周 (e-h), 16 周 (i-l) 和 20 周 (m-n) 以后的 SEM 照片。分别表征了随着水解进行, PLGA 纳米纤维支架 (a,e,i), 巢形结构单

元 (b,d,f), 脊形区域 (c,g,k), 无纺区域 (d,h,l) 及纳米纤维 (m,n) 的微观形貌。  
图3-5为PLGA纳米纤维支架在酶解12周 (a-b) 和16周 (c-d) 以后的电镜照片。

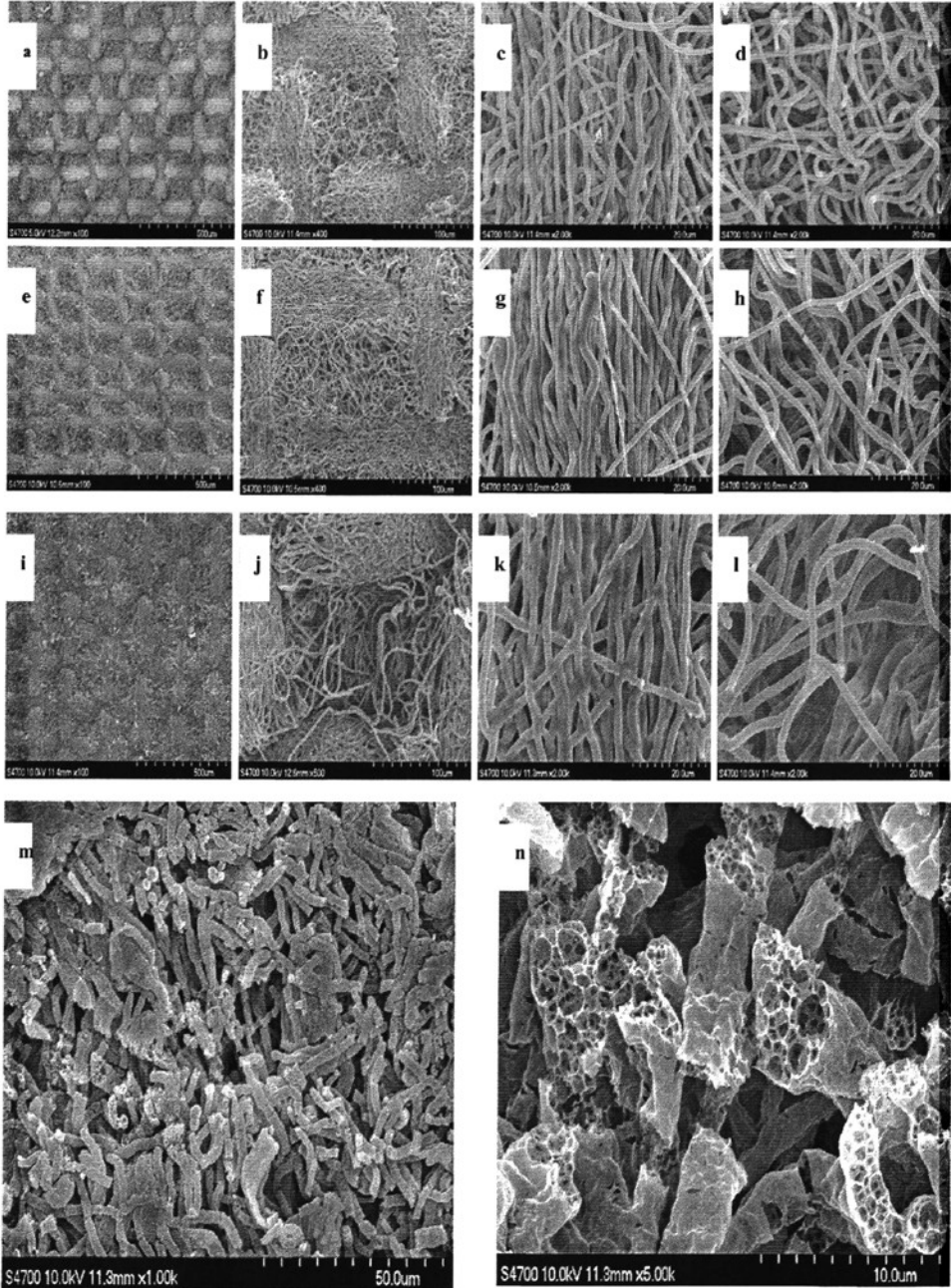


图3-4 PLGA纳米纤维支架水解4周 (a-d), 8周 (e-h), 16周(i-l)和20周 (m-n) 以后的SEM照片  
Fig 3-4 SEM micrographs of nest-like patterned PLGA nanofibrous scaffolds after hydrolytic degradation for 4 weeks (a-d), 8 weeks (e-h), 16 weeks (i-l) and 20 weeks (m-n); ; (a, e, i)  $\times 100$ , (b, f, j)  $\times 400$ , (c, g, k)  $\times 2000$ , (d, h, l)  $\times 2000$ , m $\times 1000$ , n $\times 5000$ .

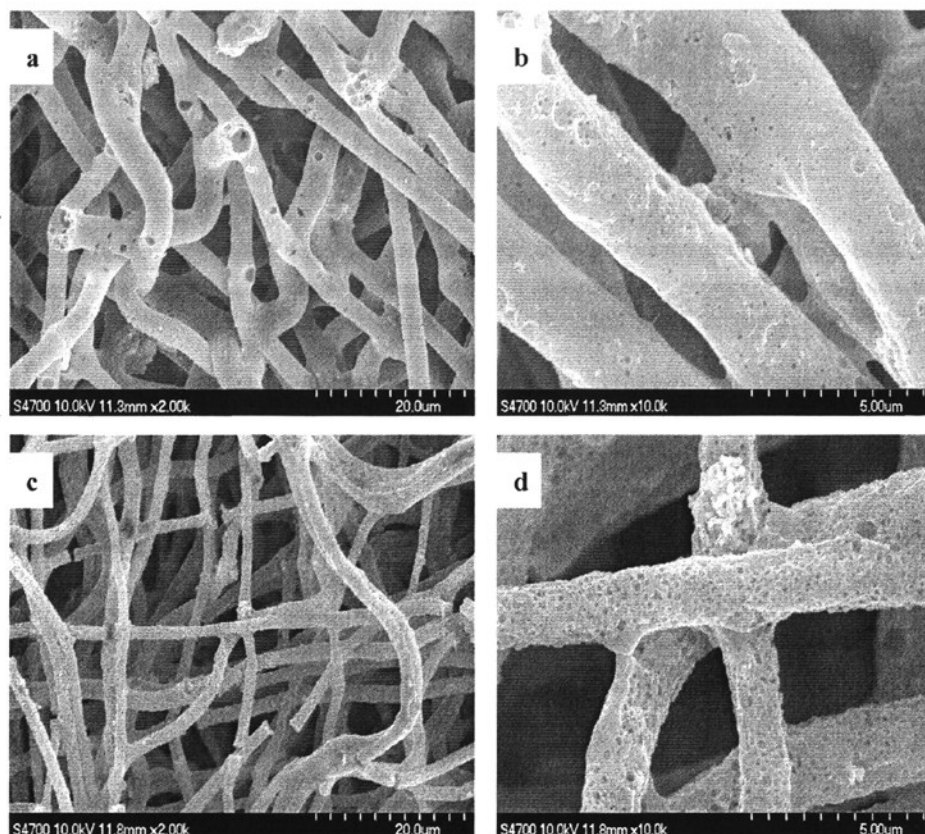


图 3-5 PLGA 纳米纤维支架在酶解 12 周 (a,b) 和 16 周 (c,d) 以后的电镜照片

Fig3-5 SEM micrographs of electrospun nest-like patterned PLGA scaffolds after enzymatic degradation for 12 weeks (a,b) and 16 weeks (c, d) (a, b)  $\times 2000$ , (c, d)  $\times 5000$ .

从图3-4可以清晰的看出, 在16周以内, PLGA支架的巢形结构单元可以保持最好的形状。尽管巢形结构单元的尺寸由于纳米纤维的缩水而在降解4周以后就降低到了 $200 \times 150 \mu\text{m}$ , 但此后稳定的尺寸一直维持到16周。在脊形区域内, 纳米纤维的彼此粘连和缠绕在一起, 到16周时, 脊形区域内的平行纤维几乎粘成一体。而在无纺区域内的情况确不同, 纤维间距变大, 随着降解的进行有大的孔洞出现。

到了20周以后, PLGA纳米纤维支架的巢形结构单元完全被破坏, 长的连续纤维变成短碎的纤维。纤维的内部呈现多孔结构, 而纤维表面几乎完整无损。

酶解PLGA纳米纤维支架与水解PLGA纳米纤维支架在8周以前的外观形貌基本一致。但在8周以后, 酶解PLGA纳米纤维的微观形貌与水解纳米纤维有显著的不同(图3-4和图3-5)。从12周开始, PLGA纳米纤维的表面和内部都开始出现多孔结构; 16周以后, 酶解PLGA纳米纤维的内部和表面布满了多孔结构。



### 3.3.4 体外水解和体外酶解过程中 PLGA 支架的拉伸力学性能

按照 2.2.4.4 所叙述方法, 对水解和酶解后的 PLGA 支架进行的拉伸强度 ( $\sigma$ ) 和拉伸模量 ( $E_t$ ) 进行测定。如图 3-6 所示, 水解 PLGA 样品和酶解 PLGA 样品的拉伸强度 ( $\sigma$ ) 和拉伸模量 ( $E_t$ ) 随降解时间的变化规律基本一致, 无显著差异, 都随着的降解的进行而逐渐减小, 8 周以后分别降到 0.5MPa 和 3MPa 一下。沿棱向和沿对角线方向上测得的拉伸强度和拉伸模量的差距随着降解的进行而逐渐减小。图 3-7 为水解 0 周, 4 周和 8 周以后的 PLGA 支架的应力应变曲线

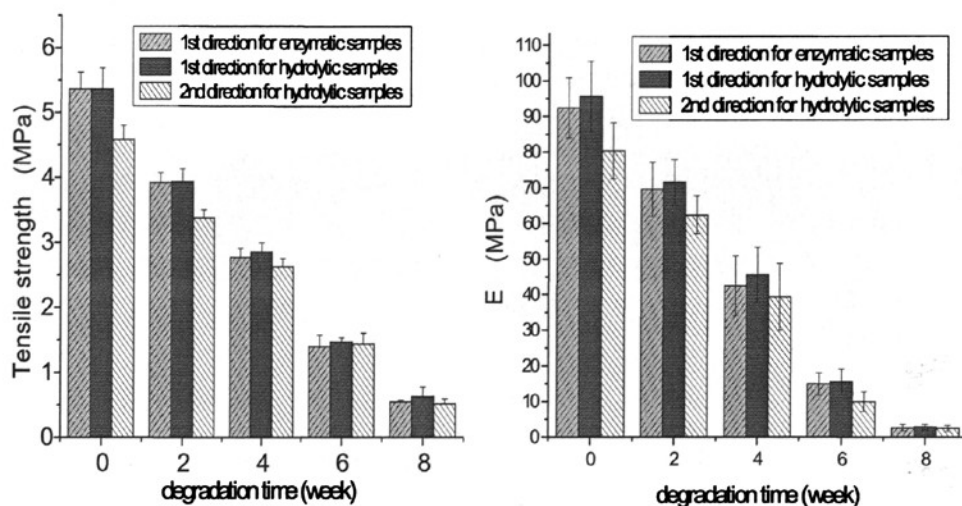


图 3-6 水解和酶解 PLGA 样品的拉伸强度 ( $\sigma$ ) 和拉伸模量 ( $E_t$ ) 随降解时间的变化

Fig3-6 Changes of tensile strength and modulus for hydrolytic samples and enzymatic samples

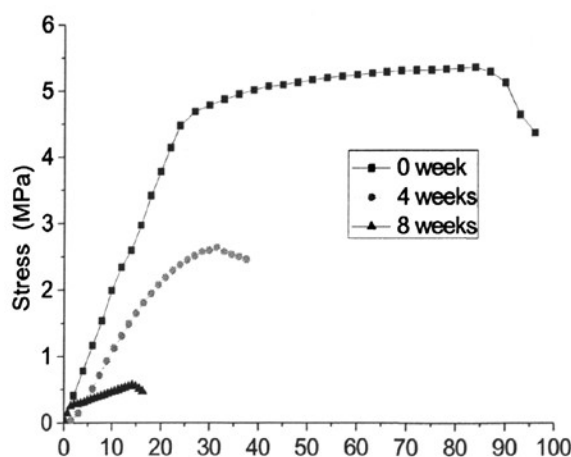


图 3-7 PLGA 样品水解 0 周, 4 周和 8 周的应力-应变曲线

Fig 3-7 Stress-strain graph for hydrolytic degraded PLGA scaffold

### 3.3.5 讨论

随着降解的进行,由于纳米纤维的收缩和粘连,会大大降低纳米纤维支架的孔径大小,成为阻碍纳米纤维支架得到进一步应用的主要缺点。从前面的降解结果可以看到,本论文设计制备的表面具有巢形花纹结构的 PLGA 纳米纤维支架,巢形结构单元中的脊形区域能够作为一个强健的框架,可以有效消减降解过程中的纳米纤维收缩和粘连的现象。主要原因是因为由相互垂直的平行纤维所形成的脊形区域起到了框架作用,维持了拓扑学结构的稳定性。也正是因为如此,PLGA 纳米纤维支架的力学性能才得以维持 8 周。尽管在降解初期,由于纳米纤维的收缩也会造成纤维间距和巢形单元尺寸的缩小,但由于整体结构稳定性的提高,随着降解程度的提高,交叉平行纤维构成的棱阻碍了棱间无纺区域的纳米纤维向中心收缩,从而无纺区域的纤维间距变大,直至形成大的孔洞。

当 PLGA 纳米纤维被浸入降解介质后,高分子链的断链反应就被加速了,从而表现出分子量下降(图 3-1)。一般来说,只有等降解产物的分子量下降到可以溶于水后,才会检测到明显的失重现象,因此在降解的第一阶段,通常分子量持续下降而失重不明显,相应的,聚合物的分子量分布逐渐变宽(图 3-2)。而一旦降解到有水溶性的产物生成后,降解开始进入第二阶段,开始出现明显的失重。这是和脂肪族聚酯的本体降解机理相吻合的。而这种降解机理的特性是,在降解过程中容易发生酸性降解产物在样品中的积累,造成样品内部局部 pH 下降,从而引起样品内部降解速度快于表面的现象,即酸自催化效应。文献报道的发现酸自催化效应的最小尺度为 100 $\mu\text{m}$ ,对于比表面积急剧增大的纳米纤维,从未有发现存在酸自催化降解的报道。但是从本论文的研究,SEM 观察发现 PLGA 纳米纤维随着降解逐渐形成内部多孔、表面相对致密的结构,就足以说明,即使样品尺度达到纳米级别,仍然不能完全消除酸自催化降解现象,样品的降解仍然存在内外差别,仍然会具有降解的体积效应。从本质上来说,PLGA 是非酶促降解型的高分子,也就是说一般的酶都不能促进酯键的断裂。本论文的研究结果也支持这一结论,在有无溶菌酶存在下,PLGA 纳米纤维在前 4 周的降解行为非常相似,说明在溶菌酶的存在下,PLGA 纳米纤维仍遵循水解降解机理。但继续延长降解时间后,在酶解样品中所检测到比较窄的分子量分布,较大的分子量残留、较快的失重以及纤维表面出现多孔结构等结果,可以清楚地说明,酶的存在可加速降解产物的溶解,而且由于亲水性的酶难以进入疏水性的 PLGA 纳米纤维内部,它对样品的作用是由表及里的。

### 3.3.6 MG-63 细胞与具有巢形结构的 PLGA 纳米纤维支架的共培养

图 3-8 是 PLGA 纳米纤维支架上培养 MG-63 细胞后的 SEM 观察情况。可以看出,培养 3 天以后, MG-63 细胞主要分布于 PLGA 支架的无纺区域内(a,b),而在纤维平

行排列的脊形区域内细胞分布很少 (b), 说明细胞对纳米纤维形态具有选择性, 更趋向于粘附在具有疏松多孔结构的区域。在无纺区域内, 可观察到细胞可长入到纤维膜深处并彼此连接。在培养 7 天以后, PLGA 纳米纤维支架的表面几乎完全被细胞所覆盖, 不仅表明该纳米支架具有良好的生物相容性, 同时也说明具有巢形结构设计的 PLGA 纳米纤维膜利于细胞粘附和增殖。

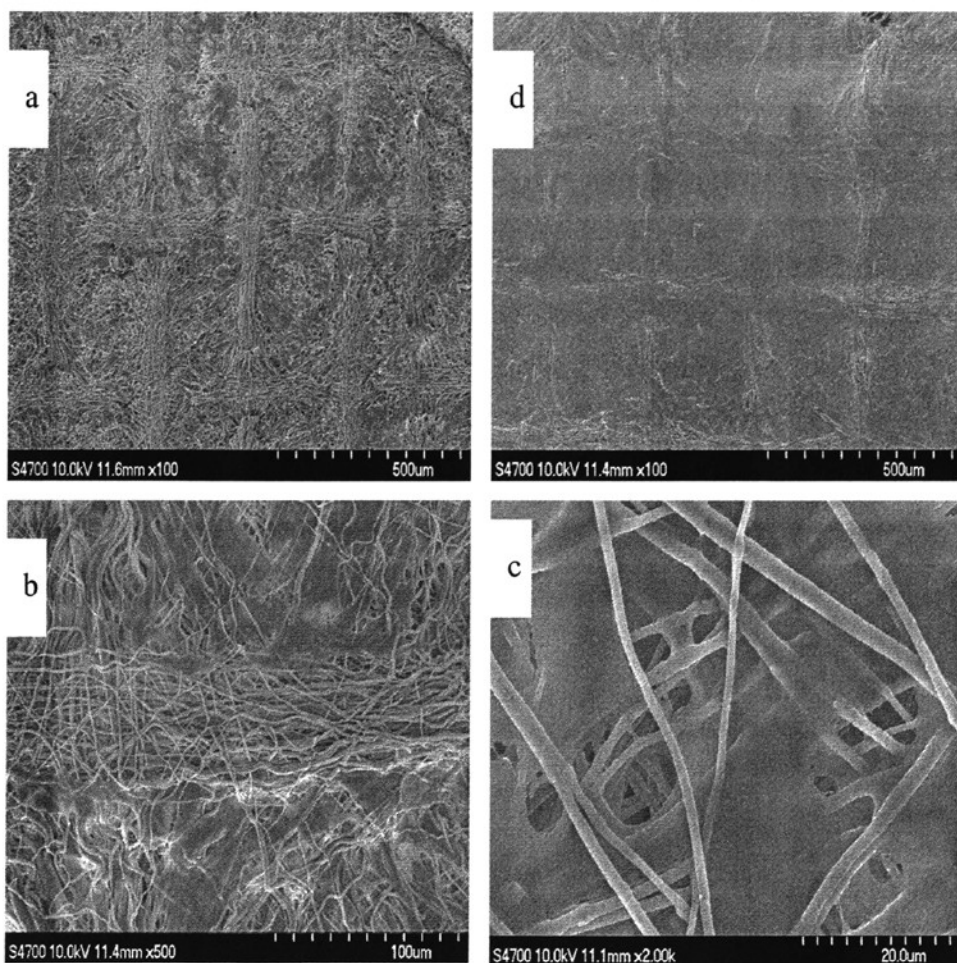


图 3-8 MG-63 细胞在具有巢形结构 PLGA 纳米纤维支架上培养 3 天(a-c)和 7 天(d)微观形貌观察

**Fig3-8** Morphology observations of MG-63 cells cultured on nest-like patterned PLGA nanofibrous scaffolds: (a) overall look after 3 days; (b) cells on ridge-like region; (c) cells on non-woven region and (d) overall look after 7 days;

### 3.4 本章小结

1. PLGA 支架的巢形结构能够随降解的进行而维持最初的拓扑学结构，脊形区域作为强健的骨架能够有效的防止变形，维持支架的力学性能

2. PLGA 纳米纤维支架的水解仍然遵循聚酯的自体降解机理，仍然存在酸自催化降解效应。

3. 溶菌酶对 PLGA 分子的主链断裂无催化作用，溶菌酶作为一种具有两亲性的蛋白质分子，能够起到类似表面活性剂的作用，促进降解产物的溶解，加速失重的进程。

4. MG-63 细胞在具有巢形结构的 PLGA 纳米纤维上的培养结果显示，细胞更喜欢栖息在能够提供更大纤维间距和孔径的无纺区域。

## 第四章 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架体外水解和细胞相容性研究

### 4.1 引言

关于 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的体外降解和的研究已经有大量报道, 但关于静电纺丝法制备的 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的降解性能的研究很少<sup>[136-138]</sup>。将  $\beta$ -TCP 与 PLGA 复合后能有效中和 PLGA 降解后形成的局部酸性<sup>[79-81]</sup>。对 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维支架进行体外细胞相容性评价是其进一步应用与体内的前提。

本章研究了 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架体外降解和细胞相容性等内容。

### 4.2 实验部分

#### 4.2.1 主要原料和试剂

$\beta$ -TCP (上海瑞邦, 1 $\mu$ m); 二甲亚砜(DMSO) (分析纯, 北京化学试剂公司)

PBS 缓冲液: 称取分析纯 NaCl 8g, KCl 0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g, 溶于 1000ml 三蒸水中, 调节 pH = 7.40, 高压锅灭菌。

MTT 溶液: 称取 25mg MTT (3-(4,5-二甲基噻唑))-2,5-一二苯基四氮唑溴盐, 噻唑蓝, Sigma 公司)溶于 5ml PBS, 配成浓度为 5mg/ml 的 MTT 溶液。用 0.22  $\mu$ m 多孔滤膜过滤灭菌, 用前现配。

其他原料和试剂同第 2 章和第 3 章中所叙述。

#### 4.2.2 实验方法

##### 4.2.2.1 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的体外水解

按照 3.2.3.2 所叙述的方法, 将制备的 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架在 PBS 中进行体外水解。对水解过程中复合支架的微观形貌, PLGA 的分子量变化, 支架的失重, 拉伸力学性能进行表征。

##### 4.2.2.2 细胞相容性评价

按照国标《GB/T-16175-1996》中的方法, 对 PLGA 纳米纤维支架、分别含 10%、20%  $\beta$ -TCP 的 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架进行 MTT 活性进行测定。

选用的细胞系: L-929

选用培养基: DMEM+10%牛血清

MTT 测定: 用于 MTT 测定的样品培养 72h 后, 弃掉培养液, 每孔加入 800  $\mu$ L, 浓

度为50 mg/mL的MTT，在37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中再孵育4h，然后吸去溶液，加入二甲亚砜(DMSO) 1mL，微量混合器充分振荡后吸入EP管中，10000rpm离心5min，取上清，570nm检测光密度OD值。每个样品三个平行样，所得结果取平均值。

4.3 结果与讨论

4.3.1 体外水解过程中 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架中 PLGA 的分子量和重量变化

如图 4-1 所示，在相同的水解条件下，复合纤维中 PLGA 的分子量下降速度要明显慢于单纯的 PLGA 纳米纤维。复合纤维支架的失重也慢于纯的 PLGA 纳米纤维支架（图 4-2）。由于碱性的  $\beta$ -TCP 的引入，能够在一定程度上中和 PLGA 降解产生的酸性产物，由此减弱了 PLGA 降解过程中的酸自催化降解效应，使 PLGA 的分子量下降速度减慢，因而复合纳米纤维支架的失重速度有所降低。受  $\beta$ -TCP 溶出速度的限制，10%wt 和 20%wt 的  $\beta$ -TCP 含量对复合纳米的降解引起的差异并不明显。

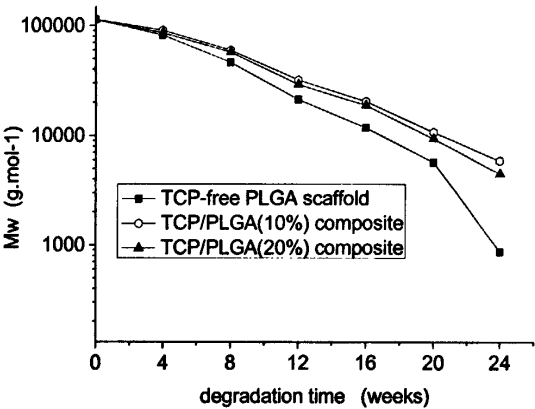


图 4-1 水解 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的 PLGA 的分子量变化  
Fig 4-1 Change of molecular weight for degraded PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

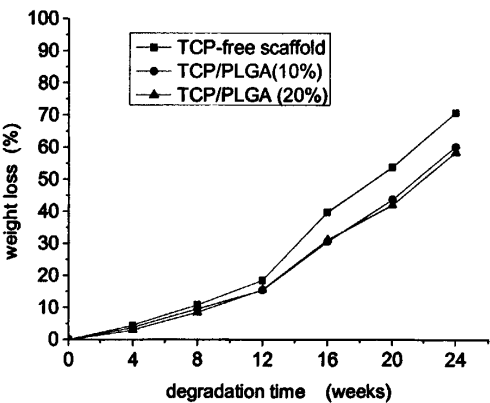


图 4-2 体外水解过程中 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的重量变化  
Fig 4-2 Change of weight loss for degraded PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

4.3.2 体外水

图 4-5 ；

可以看出, 经过 8 周以后, 包裹  $\beta$ -TCP 粒子的 PLGA 优先进行降解, 使  $\beta$ -TCP 粒子裸露在纤维的表面。经过 16 周以后, 不同于纯 PLGA 纳米纤维的降解, 源于  $\beta$ -TCP 粒子的溶解或脱落, 在复合纤维表面可见微孔的存在, 以及更多的  $\beta$ -TCP 颗粒被曝露出来。

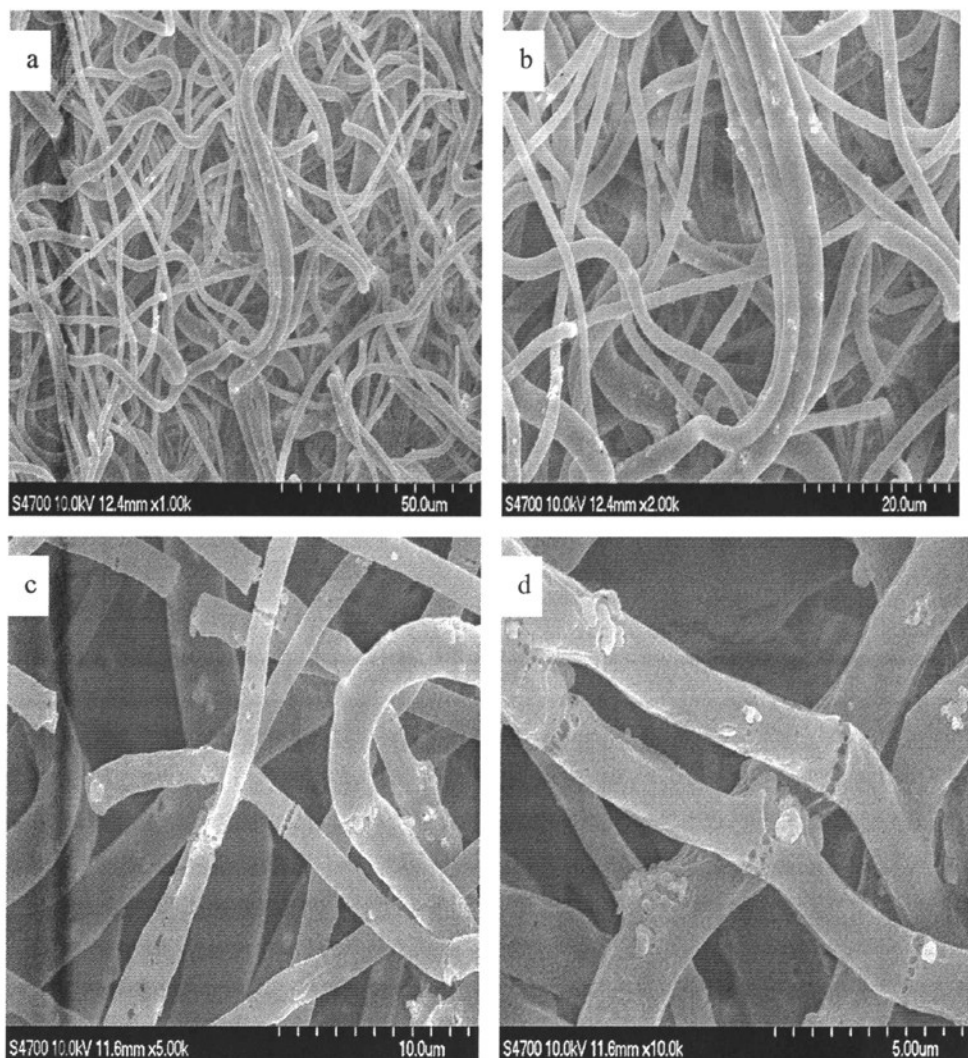


图4-3 PLGA/ $\beta$ -TCP复合支架水解8周 (a-b) 和16周 (c-d) 的SEM照片

Fig 4-3 SEM oservation of degraded PLGA/ $\beta$ -TCP scaffolds for 8 week (a-b) and 16 week (c-d)

#### 4.3.3 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架水解过程中 PBS 的 pH 和 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化

用 pH 计测定 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架水解以后 PBS 的酸度, 用 ICP 法测定 PBS 中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化。图 4-6 为降解介质(PBS)的 pH 值随降解时间的变化曲线, 由图可知,  $\beta$ -TCP 自身的降解和其对自催化效应的抑制能够提高降解介质的 pH 值。随着  $\beta$ -TCP

的不断降解, PBS 中的  $\text{Ca}^{2+}$  数量不断增加, 图 4-7 为钙离子浓度随降解时间的变化情况, 图中钙离子浓度是累加计算的。

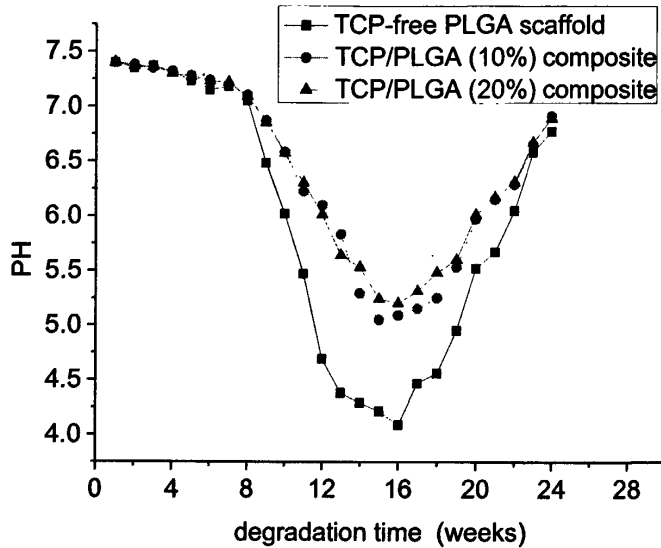


图 4-4 降解介质的 pH 值随降解时间的变化规律

Fig 4-4 Change of PH in degradation medium for degraded PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

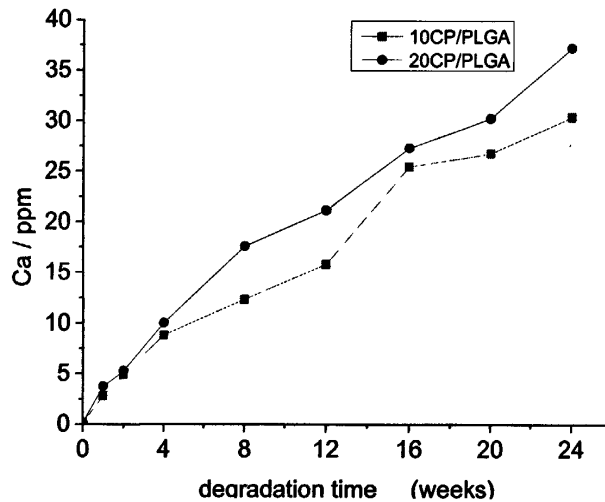


图 4-5 降解介质中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度随降解时间的变化规律

Fig 4-5 Change of  $\text{Ca}^{2+}$  in degradation medium for degraded PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

#### 4.3.4 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架水解过程中拉伸力学性能变化

拉伸强度 ( $\sigma$ ) 和拉伸模量 (Et) 的测定方法如 2.2.4.4 中所叙述。

如图 4-8 和图 4-9 所示, 同 PLGA 纳米纤维支架相比, PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的



拉伸强度略有降低,但仍然可以随着降解的进行维持一定得力学强度。而复合支架的弹性模量由于刚性  $\beta$ -TCP 粒子的引入而略有升高。

理论上来说,向聚合物纤维中引入无机刚性粒子应该可以起到增强的作用,但在本论文研究中,PLGA/ $\beta$ -TCP 复合纳米纤维支架的强度反倒弱于纯的 PLGA 纳米纤维支架,原因是  $\beta$ -TCP 粒子未能很好的均匀分散到 PLGA 基体中, $\beta$ -TCP 粒子团聚的地方即拉伸过程中优先断裂的地方。

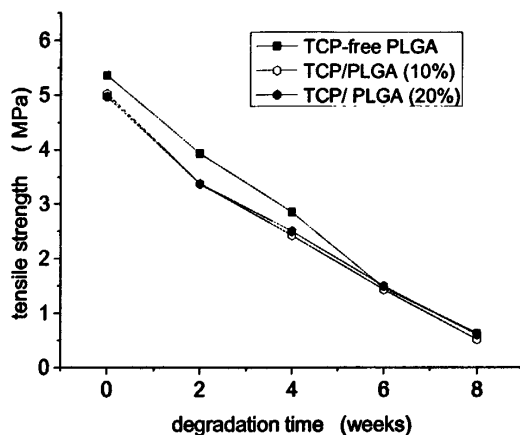


图 4-6 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合纳米纤维支架随水解进行的拉伸强度变化

Fig 4-6 Change of tensile strength for degraded PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

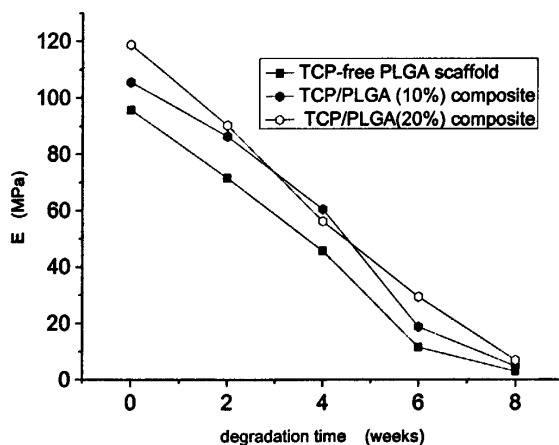


图 4-7 PLGA/ $\beta$ -TCP 复合纳米纤维支架随水解进行的弹性模量变化

Fig 4-7 Change of tensile strength for degraded PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold

#### 4.3.5 细胞相容性评价

MTT 是一种能接受氢原子的染料。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积于细胞中,而死细胞无此功能。加入二

甲亚砷(DMSO)将结晶物溶解,用酶标仪测定其吸光度,则可测定细胞的还原活性。线粒体为细胞有氧呼吸的场所,是细胞的能量工厂。细胞的 MTT 活性与细胞线粒体内的代谢能力直接相关。

图 4-10 为 PLGA 支架、含 10%  $\beta$ -TCP 复合支架和含 20%  $\beta$ -TCP 复合支架 MTT 活性测定,由图可知,同 PLGA 支架相比,PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架有更高的 MTT 生物活性,表明  $\beta$ -TCP 的加入提高了复合支架的细胞相容性,可促进细胞的增殖。

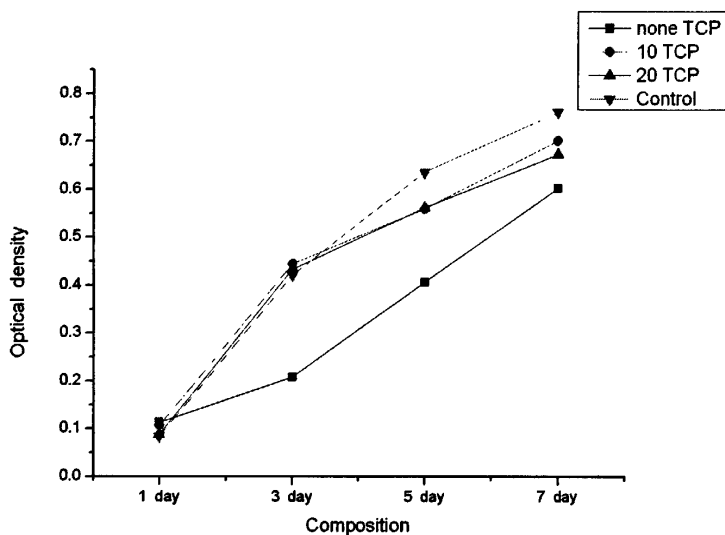


图 4-8 PLGA 和 PLGA/ $\beta$ -TCP 支架的细胞相容性评价 (MTT)

Fig 4-8 MTT evaluation of PLGA and PLGA/ $\beta$ -TCP scaffolds

## 4.4 本章小结

1. PLGA/ $\beta$ -TCP 复合支架的重量、PLGA 分子量、拉伸强度和模量都随着降解过程的进行而逐渐降低。但复合支架中  $\beta$ -TCP 含量的增加有利于降低降解介质的酸度，减缓样品重量和 PLGA 分子量的下降速度。

2. L929 在不同组成的纳米纤维支架上增殖的 MTT 测定结果表明： $\beta$ -TCP/PLGA 复合支架的细胞相容性优于 PLGA 纳米纤维支架。

## 第五章 结论

1. 利用静电纺丝技术,以一定目数的铜网为接收装置,制备了表面具有巢形结构的 PLGA(75/25)纳米纤维支架。该支架在同一巢形单元中具有三个典型的区域:纤维平行排列的脊形区域,纤维无规排布、疏松多孔的无纺区域,以及纤维呈磁力线发散的磁力线区域。
2. 具有巢形结构的 PLGA 纳米纤维支架的拉伸力学性能具有各向异性:沿纤维平行排列的巢形单元棱的方向进行拉伸,其拉伸强度(5.362MPa)和拉伸模量(95.637MPa)分别高出沿巢型单元对角线方向的拉伸强度和拉伸模量约 17%和 19%。
3. 随着降解的进行,PLGA 支架的巢形结构能够维持最初的拓扑学结构,脊形区域可作为强健的骨架有效地防止支架变形,维持支架的力学性能。但无纺区域随着降解的进行会逐渐形成更为疏松的大孔结构。
4. PLGA 和 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维的降解仍遵循聚酯的本体降解机理,但是碱性无机粒子的引入可中和 PLGA 降解所产生的酸性产物,从而使降解速度有所减慢。
5. 首次成功观察到,即使降解样品的尺度降至纳米级别,PLGA 的降解仍然存在酸自催化降解效应。
6. PLGA 纳米纤维在溶菌酶存在下的降解,本质上仍是水解降解,溶菌酶没有促进酯键断链的作用,但两亲性的酶分子可以加速降解产物的溶解,引起较大的失重和失重现象提前发生。亲水性的大分子酶对疏水性 PLGA 纤维的作用是由表及里的。
7. 细胞和具有巢形结构纳米纤维支架共培养的结果显示:细胞更喜欢栖息在具有大的纤维间距和孔径的无纺区域;PLGA 和 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维支架都具有良好的细胞相容性,但复合纤维在促进细胞增殖上效果更加明显。
8. 具有巢形结构的 PLGA 和 PLGA/ $\beta$ -TCP 纳米纤维材料,具有适中的力学性能、可控的降解性能和良好的细胞相容性,有望作为组织工程支架材料。

## 参 考 文 献

- [1] C.V. Vacanti, R. Langer, B. Schloo, J.P. Vacanti, Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation[J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 1991; 88: 753-759.
- [2] Yilin Cao, Joseph P. Vacanti, Keith T. Paige, Joseph Upton, Charles A. Vacanti, Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear[J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 1997; 100: 297-302.
- [3] Hench L L, Polak J M. Third-generation biomedical materials[J]. Science, 2002; 295:1014-1017.
- [4] L.E. Freed, J.C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanual, A.K. Mikos, R. Langer, Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers[J]. J. Biomed Mater Res. 1993; 27: 11-23.
- [5] W.S. Kim, J.P. Vacanti, L.Cima, D. Mooney, J. Upton, W.C. Puelacher, C.A. Vacanti, Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers[J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 1994; 94: 233-237.
- [6] Tabata Y. Recent progress in tissue engineering[J]. KKT vol 6, No 1, January 2001.
- [7] Robert Langer, J.P. Vacanti[J]. Tissue Engineering, Science, 1993; 260: 920-926.
- [8] Lysaght M T, Solliven K F, Tsui J H. An economic survey of the tissue engineering industry[J]. Proceed Inter Symp Control Rel Bioact Mater, 1998, 25: 107-108, Controlled Release Society Inc, Deerfield, IL, USA.
- [9] Tissue engineering, Nature Biotechnology Vol 18 Supplement 2000[J].
- [10] Linda G. Griffith, Gail Naughton[J]. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities Science, 2002; 295:1009-1013.
- [11] Kuen Yong Lee, David J. Mooney[J]. Hydrogels for Tissue Engineering, Chemical Review, 2001, 101 (7): 1869-1877.
- [12] Rount AM. Contemporary biomaterials[J]. Chem Eng News, 1999, 77(13): 51-59.
- [13] Chi H. Lee, Anuj Singla, Yugyung Lee. Biomedical applications of collagen[J]. International Journal of Pharmaceutics 2001, 221:1-22.
- [14] Furthmayr H, R. Timol. Immunochemistry of collagens and procollagens[J]. Int. Rev. Connect. Tiss. Res 1976, 7: 61-99.
- [15] Maeda M, Tan S, Sano A, Fujioka K. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen based drug delivery system for controlled release of protein drugs. J. Controlled[J]. Rel. 1999, 62: 313-324.
- [16] Wolfgang Friess. Collagen-biomaterial for drug delivery[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 1998; 45:113-36.
- [17] Peter Shakespeare. Burn wound healing and skin substitutes[J]. Burns 2001; 27: 517-22.
- [18] Nimni M.E., Cheung D, Strates B, Kodama M, Sgeikh K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement[J]. J. Biomed. Mat. Res 1987; 21:741-71.
- [19] Yannas IV, Regeneration templates, in The Biomedical Engineering Handbook, Ed[M]. By Bronzino JD, CRC press, 1619 (1995).
- [20] Fujioka K, Maeda M, Hojo T, Sano. Protein released from collagen matrices[J]. Adv. Drug. Del. Rev 1998, 31:247-266.

- [21] Yannas I V, Burke J F. Design of an artificial skin I. Basic design principles[J]. *J Biomed Mater Res*. 1980; 14(4): 65-81.
- [22] Bell E, Ehrlich H P, Battle D J, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness[J]. *Science* 1981; 211:1052-54.
- [23] Stefan MM, Sonya Shortkroff, Thomos O Schneider, et al. Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro[J]. *Biomaterials* 1999, 20: 701-709.
- [24] 杨志明.组织工程基础与临床[M].成都.四川科学技术出版社.2000: pp.3.
- [25] Reddi A.H. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials[J]. *Tissue Eng*. 2000, 6 (4): 351-359.
- [26] Kuzuya M, Kinsell J.L. Induction of endothelial cell differentiation in vitro by fibroblast-derived soluble factors[J]. *Exp. Cell Res*. 1994, 215: 310-318.
- [27] 姚康德, 尹玉姬.组织工程相关生物材料[M].北京.化学工业出版社.2003: pp54.
- [28] 劳为德.修复医学与组织工程[M].北京.化学工业出版社.2003: pp 61.
- [29] Lin-Shu Liu, Andrea Y Thompson, et al. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration[J]. *Biomaterials* 1999, 20: 1097-1108.
- [30] Campoccia Davide, Doherty Patric, et al. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification[J]. *Biomaterials* 1998, 19(23): 2101-2127.
- [31] Solchaga LA, Dennis JE, Golgberg VM, et al[J]. *J. Orthop. Res* 1999, 17: 205.
- [32] Perka, C.; Spitzer, R.-S.; Lindenhayn, K.; Sittinger, M.; Schultz, O. [J]. *Biomed. Mater. Res*. 2000, 49: 305.
- [33] Ye, Q.; Zund, G.; Benedikt, P.; Jockenhoevel, S.; Hoerstrup, S.P.; Sakyama, S.; Hubbell, J. A.; Turina, M. *Eur. J. Cardio-Thorac[J]. Surg*. 2000, 17: 587.
- [34] Homminga GN, P Buma, H. WJ Koot, et al[J]. *Acta Orthop.Scan* 1993, 64: 441.
- [35] Sims CD, Butler P E.M., Cao YL, et al[J]. *Plast. Reconstr. Surg* 1998, 101:1580.
- [36] Jianbiao Ma, Hongjun Wang, He Binglin, et al. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts [J]. *Biomaterials* 2001, 22(4): 331.
- [37] Kazuo Kojima, Yoshiharu Okamoto, Miyatake Katsuyuki, et al. Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan[J]. *Carbohydrate Polymers* 1998, 37(2): 109.
- [38] Sundararajan V Madihally, Howard W.T. Matthew. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering[J]. *Biomaterials* 1999, 20(12): 1133.
- [39] Shanmugasundaram.P, Ravichandran.P, Neelakanta Reddy P, et al. Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells[J]. *Biomaterials* 2001, 22(14):1943.
- [40] FwuLong Mi, Shin-Shing Shyu, Wu Yu-Bey, et al. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing[J]. *Biomaterials* 2001, 22(2): 165.
- [41] Hiroshi Ueno, Haruo Yamada, Tanaka Ichiro, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs[J]. *Biomaterials* 1999, 20(15): 1407.
- [42] Cai KY, Yao KD, Li Z, et al. Rat osteoblast functions on the o-carboxymethyl chitosan-modified poly (D, L-lactic acid) surface[J]. *J Biomat Sci-Polym E* 2001, 12 (12):1303-1315.
- [43] J.K Francis Suh, Howard W.T. Matthew. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review[J]. *Biomaterials* 2000, 21:2589-2598.
- [44] Jinshu Mao, Liguoz Zhao, Kang de Yao, et al. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in

- vitro[J]. J. Biomed. Mat. Res 2003, 301-308.
- [45] Mao JS, Zhao LCD Yin YJ, et al. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds[J]. Biomaterials 2003, 24 (6): 1067-1074.
- [46] Huiguang Zhu, Jian Ji, Rongyi Lin, Changyou Gao, Linxian Feng, Jiacong Shen. Surface engineering of poly (D,L-lactic acid) by entrapment of chitosan-based derivatives for the promotion of chondrogenesis[J]. J. Biomed. Mat. Res 2002, 64(4): 532-539.
- [47] Lee YM, Park YJ[J]. Journal of periodontal [in Japanese] 2000, 71:410-417.
- [48] Bouhadir K H, Lee K Y, Mooney D J, et al[J]. Degradation of partially oxidized alginate and potential application for tissue engineering[J]. Biotechnol Prog, 2001, 17: 945-950.
- [49] Smentana, K[J]. Biomaterials 1993, 14, 1046.
- [50] Sultzbaugh, K. J.; Speaker, T. J. J[J]. Microencapsulation 1996, 13, 363.
- [51] Rowley, J. A.; Madlambayan, G.; Mooney, D. J[J]. Biomaterials, 1999, 20, 45.
- [52] LeBaron R G, Athanasiou K A. Ex vivo synthesis of articular cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21:2575-2587.
- [53] 王身国.组织工程细胞支架及其相关技术研究[J].现代康复, 2001, 5(8): 16-18.
- [54] W.T. Godbey, A. Atala. In vitro systems for tissue engineering[J]. Acad. Sci. 2002, 961:10-26.
- [55] Gilding D.K. Biodegradable polymers. In Biocompatibility of Clinical Implant Materials[M]. D. F. Williams, Ed.: 209-232. 1981 CRC Press. Boca Raton, FL.
- [56] Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue or organ regeneration[J]. Materials Science and Engineering 2001, 34:147-230.
- [57] Vacanti CA, Kim W, School B, et al[J]. J. Sports Med 1994, 22: 485.
- [58] 商庆新, 曹谊林, 张涤生.生物工程领域的崭新前沿-组织工程[J].医学与哲学 2000, 21(2):5-7.
- [59] Chu Constance R., Monosov Anna Z, Amie David. In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices[J]. Biomaterials 1995, 16(18): 1381-1384.
- [60] Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, et al[J]. J. Biomed. Mater. Res. 1995, 29: 1147.
- [61] 蔡晴, 石桂欣, 贝建中, 王身国. 聚(丙交酯-乙交酯)共聚物细胞支架降解行为的研究.第三届全国组织工程学术会议论文集[C]. p 433-436.
- [62] Susan L. Ishaug-Riley, Genevieve M. Crane, Ali Gurlek, et al. Marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesenter[J]. J. Biomed. Mat. Res 1997, 36: 1-8.
- [63] Zhu YB, Gao CY, Liu XY, et al. Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells[J]. Biomacromolecules 2002, 3(6):1312-1319.
- [64] Guan JJ, Gao CY, Feng LX, Shen JC[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2000; 77: 2505.
- [65] Guan JJ, Gao CY, Feng LX, Shen JC[J]. J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 2000; 11(5):523.
- [66] Ma ZW, Gao CY, Yuan J, Ji J, Gong YH, Shen JC[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2002; 85(10): 2163.
- [67] Ma ZW, Gao CY, Shen JC[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edn, 2003; 14: 1.
- [68] Bagambisa F B, Joos U, Schilli W. Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1993, 27(8):1047-1055
- [69] Akao M, Aoki H, Kato K. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications [J]. Journal of materials research, 1981.16(3): 809-812

- [70] Martin RL, Brown P W. Mechanical properties of hydroxyapatite formed at physiological temperature [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1995, 6(3): 13& 143
- [71] 任卫, 曹献英等. 纳米羟基磷灰石合成及表面改性的途径和方法[J]. *硅酸盐通报*, 2002, 21(1): 38-43
- [72] Sous M, Bareilk R, Rouasis F, et al. Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous beta tricalcium phosphate ceramic[J]. *Biomaterials*, 1998, 19(23): 2147-2153
- [73] 王丹, 胡组玉, 郑昌琼等. 可降解多孔  $\beta$ -TCP/rhBMP-2 人工骨的骨诱导活性研究[J]. *中华骨科杂志*, 1998, 18(11): 689-691
- [74] 郑启新等. 磷酸三钙陶瓷人工骨的细胞相容性研究[J]. *武汉工业大学学报*, 1995, 17(4): 120-123
- [75] Boo J S, Yamada Y, Olcazaki Y, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and biodegradable scaffold [J]. *Joanna! Of Craniofacial Surgery*, 2002; 13(2): 231-239
- [76] DoiY, Iwanaga H, Shibutani T, et al. Osteoclastic responses to various calcium phosphate in cell culture [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 47(3): 424-433
- [77] Klein C, de Groot K, Chen WQ, et al. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues[J]. *Biomaterials*, 1994, 35(1): 31-34
- [78] 黄占杰. 磷酸钙陶瓷生物降解研究的进展[J]. *功能陶瓷*, 1997, 28(1): 1-4
- [79] Kotani S, Fujita Y, Kitsugi T et al. Bone bonding mechanism of  $\beta$ -tricalcium phosphate[J]. *Journal of Biomedical Materials Research* 1991, 25(10): 1303-1315
- [80] 闫玉华, 许原. 可降解  $\beta$  磷酸三钙陶瓷的理化性能与生物性能[J]. *武汉工业大学学报*, 1995, 17(4): 116-119
- [81] 郑启新等. 巨噬细胞对磷酸三钙陶瓷人工骨的降解-体外研究[J]. *武汉工业大学学报*, 1995, 17(4): 124-127
- [82] Hafemane B, Ensslen S, et al. Erdmann R, et al. Use of a collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis[J]. *Burns* 1999, 25: 373-384.
- [83] Jinshu Mao, Liguoz Zhao, Kang de Yao, et al. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro[J]. *J. Biomed. Mat. Res* 2003, 301-308.
- [84] Linshu Liu, Andrea Y Thompson, et al. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration[J]. *Biomaterials* 1999, 20: 1097-1108
- [85] Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and Integrin[J]. *Science* 1987, 238: 491.
- [86] Ma ZW, Gao CY, Gong YH, et al. Paraffin spheres as porogen to fabricate poly (L-lactic acid) scaffolds with improved cytocompatibility for cartilage tissue engineering[J]. *J. Biomed. Mater. Res B* 2003, 67B (1): 610-617.
- [87] Agrawal E, Achanasion KA. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA, PGA implants [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, 38(2): 105-114
- [88] Sims CD, Butler PE, Cao YL, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes [J]. *Plast Reconstr Swry*, 1998, 101(6): 1580-1585
- [89] 王士斌等. 骨形成发生蛋白/多孔  $\beta$ -磷酸三钙陶瓷复合人工骨[J]. *中国陶瓷*, 1999, 35(6): 5-7
- [90] Hirota K, Nishihara K, Tanaka N. Pressure sintering of apatite collagen composite [J]. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 1993, 33(3): 147-151
- [91] A. K. Saxena, J. Marler, M. Benvenuto, G. H. Willital, J. P. Vacanti[J], *Tissue Eng.* 1999, 5: 525.
- [92] A. N. Brown, B. S. Kim, E. Alsberg, D. J. Mooney[J], *Tissue Eng.* 2000, 6, 297.
- [93] Y. Cao, A. Rodriguez, M. Vacanti, C. Ibarra, C. Arevalo, C. A. Vacanti[J], *J. Biomater. Sci.*,



- Polym. Ed. 1998, 9: 475.
- [94] M. Sittinger, D. Reitzel, M. Dauner, H. Hierlemann, C. Hammer, E. Kastenbauer, H. Planck, G. R. Burmester, J. Bujia[J], J. Biomed. Mater. Res. 1996, 33: 57.
  - [95] A. G. Mikos, Y. Bao, L. G. Cima, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, R. Langer[J], J. Biomed. Mater. Res. 1993, 27: 183.
  - [96] Dagalakakis N, Flink J, Stasikelis P, Burke J. F, Yannas I. V. Design of an artificial skin III. Control of pore structure [J]. J Biomed Mater Res. 1980, 14(4): 511-528
  - [97] Gao CY, Hu XH, Guan JJ, et al. Factors controlling the preparation of porous polyurethane membranes via thermally induced phase separation [J]. ACTA POLYM SIN 2001, 3: 351-356.
  - [98] Gao CY, Li A, Feng LX, et al. Factors controlling surface morphology of porous polystyrene membranes prepared by thermally induced phase separation [J]. POLYM INT 2000, 49 (4): 323-328.
  - [99] Guoping Chen, Takashi Ushida, Tetsuya Tateishi. Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering[J]. Materials Science and Engineering C 2001, 17: 63-69.
  - [100] Mikos A G, Sanikinos G, Leite S M, et al. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering[J]. Biomaterials, 1993, 14(5): 323-330
  - [101] Thomson R C, Yaszemski M J, Powers J M, et al. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone[J]. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 1995 7(1):23-28
  - [102] Dagalakakis N, Flink J, Stasikelis P, Burke J. F, Yannas I. V. Design of an artificial skin III. Control of pore structure[J]. J Biomed Mater Res. 1980, 14(4): 511-528
  - [103] Yarin A L, Koombhongse S, Reneker D H. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers[J]. Journal of Applied Physics, 2001, 90(9): 4836-4846
  - [104] Spivak A F, Dzenis Y A, Reneker D H. A model of steady state jet in the electrospinning Process [J]. Mechanics Research Communications, 2000, 27(1): 37-42
  - [105] Yarin A L, Koombhongse S, Reneker D H. Bending instability in electrospinning of nanofibers[J]. Journal of Applied Physics, 2001, 89(5): 3018-3026
  - [106] Reneker D H, Yarin A L, HaoFong, et al. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning[J]. Journal of Applied Physics, 2000, 87(9):4531-4547
  - [107] Hohman M M, Shin M, Rutledge et al. Electrospinning and electrically forced jets: instability theory [J]. Physics of Fluids, 2001, 13(8): 2201-2220
  - [108] Spivok A F, Dzenis Y A. Asymptotic decay of radius of a weakly conductive viscous jet in an external electric field[J]. Applied Physics Letters, 1998, 73(21): 3067-3069
  - [109] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering[J]. Science 1993;260:920-6.
  - [110] Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV, Mikos AG. Host response to tissue engineered devices[J]. Adv Drug Deliver Rev 1998;33:111-39
  - [111] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol 1998; 16:224-30.
  - [112] Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering[J]. Macromol Biosci 2002; 2:67-77.
  - [113] Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices[J]. Biomaterials 2000; 21:2335-46.
  - [114] Bogwitzki M, Czado W, Frese T, Schaper A, Hellwig M, Steinhart M, et al. Nanostructured

- Fibers via Electrospinning[J]. *J Adv Mater* 2001;13:70–2.
- [115] Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Kol FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res* 2002;60:613–21.
- [116] Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering[J]. *Biomaterials* 2005;26:2603–10.
- [117] Li D, Gong OY, Jesse TM, Xia YN. Collecting Electrospun Nanofibers with patterned Electrodes[J]. *Nano Lett* 2005;5:913–16.
- [118] You Y, Min BM, Lee SJ, Lee TS, Park WH. In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly (lactide-co-glycolide) [J]. *J Appl Polym Sci* 2005;95:193–200.
- [119] Lee YH, Lee JH, An IG, Kim C, Lee DS, Lee YK, et al. Electrospun dual-porosity structure and biodegradation morphology of Montmorillonite reinforced PLLA nanocomposite scaffolds[J]. *Biomaterials* 2005;26:3165–72.
- [120] Kim K, Yu M, Zong X, Chiu J, Fang D, Seo YS, et al. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications[J]. *Biomaterials* 2003;24:4977–85.
- [121] Zong X, Ran S, Kim KS, Fang D, Hsiao BS, Chu B. Structure and morphology changes during in vitro degradation of electrospun poly (glycolide-co-lactide) nanofiber membrane[J]. *Biomacromolecules* 2003;4:416–23.
- [122] Cui W, Li X. Degradation patterns and surface wettability of electrospun fibrous mats[J]. *Polymer Degradation and Stability* 2008;93:731–38.
- [123] Zhang D, Chang J. Patterning of Electrospun Fibers Using Electroconductive Templates[J]. *J Adv Mater* 2007;19:3664–67.
- [124] Zhu K J, et al[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 1991, 1:123.
- [125] Li S M, Hendre R W, Jensen K, et al[J]. *Macromolecules*, 1991, 24(8): 1736.
- [126] Gogolewski S, Mainil-Varlet P, Dillon JG[J]. *J Biomed Mater Res*, 1996, 32, (2):227-235.
- [127] Lu L, Garcia CA, Mikos AG. In vitro degradation of thin poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) films[J]. *J Biomed Mater Res* 1999;46: 236–44.
- [128] Williams DF, Mort E. Enzyme-accelerated hydrolysis of polyglycolic acid[J]. *J Bioeng* 1977;1:231–8.
- [129] Schakenraad JM, Hardonk MJ, Feijen J, Molenaar I, Nieuwenhuis P. Enzymatic activity toward poly(l-lactic acid) implants[J]. *J Biomed Mater Res* 1990;24: 529–45.
- [130] Cai Q, Shi G, Bei J, Wang S. Enzymatic degradation behavior and mechanism of Poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin[J]. *Biomaterials* 2003;24:629–38.
- [131] Mochizuki M, Hirano M, Kanmuri Y, Kudo K, Tokiwa Y. Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: effects of draw ratio on enzymatic degradation[J]. *J Appl Polym Sci* 1995;55:289–96.
- [132] Zeng J, Chen XS, Liang QZ, Xu XL, Jing XB. Enzymatic degradation of poly (L-lactide) and poly(3-caprolactone) electrospun fiber[J]. *Macromol Biosci* 2004; 4:1118–25.
- [133] Ishii D, Lee WK, Kasuya KI, Iwata. Fine structure and enzymatic degradation of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] and stereocomplexed poly(lactide) nanofibers[J]. *J Biotechnol* 2007; 132:318–24.
- [134] Stevens MM, George JH. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface[J]. *Science*

- 2005;310:1135–8.
- [135] Laleh GM, Molamma PP, Mohammad M, Mohammad HNE, Seeram R. Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering[J]. *Biomaterials* 2008;29:4532–39.
- [136] Agrawal E, Achanasion KA. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA, PGA implants [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, 38(2): 105-114
- [137] Fei Yang, Wenjin Cui, Zhuo Xiong, Li Liu, Jianzhong Bei, Shenguo Wang[J]. PLGA/TCP composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Polymer Degradation and Stability* 91(2006)3065-3073.
- [138] In vitro degradation of porous poly(L-lactide-co-glycolide)/b-tricalcium phosphate (PLGA/b-TCP) scaffolds under dynamic and static conditions[J]. *Polymer Degradation and Stability* 103(2008)2341-2350.
- [139] Bashur CA, Dahlgren LA, Goldstein AS. Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes[J]. *Biomaterials* 2006;27:5681–88.
- [140] Huang ZM, Zhang YZ, Ramakrishna S, Lim CT. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers[J]. *Polymer* 2004;45:5361–68.

## 致谢

本论文的研究工作是在杨小平教授的悉心指导下完成的。本论文在选题、实验、发表论文等过程中，处处都凝结着杨小平教授的心血和汗水。

杨小平教授一丝不苟的治学态度、渊博的知识、敏捷的思维、诲人不倦的学者风范以及他工作中兢兢业业的敬业精神与勤奋的工作作风都给我留下了深刻的印象，并对我产生积极的影响，使作者终生受益，感谢导师杨小平教授的关心、指导和教诲。值此成文之际，学生谨向导师表示衷心的感谢和崇高的敬意！

在论文的撰写和发表过程中，得到了蔡晴老师的热心指导，在此向蔡老师表示衷心的感谢！

感谢 06 级全体硕士生同学在我研究生三年时间内给予我的帮助，在我实验和撰写论文的过程中遇到困难时，他们给了我很多鼓励和帮助。

感谢博士生张慎、07 级硕士生颜娜同学在我研究课题期间给予的帮助！

感谢自然科学基金（项目编号：50873012）和国家高新技术研究发展计划（项目编号：2007AA03Z328766），对本课题的资金支持。

## 研究成果及发表的学术论文

### 发表及已接受的论文

1. Xuegang Zhou, Qing Cai, Na Yan, Xuliang Deng, Xiaoping Yang. In vitro hydrolytic and enzymatic degradation of nest-like patterned electrospun PLGA scaffold. *Biomacromolecules*. (Revised)

## 作者及导师简介

论文作者：周学刚，2004 年 7 月毕业于北京化工大学材料科学与工程学院，获得工学学士学位。2006 年考取北京化工大学材料科学与工程学院研究生，随导师杨小平教授从事生物材料领域的研究。

导师： 杨小平，教授，博士生导师，复合材料领域专家。