

杂化小直径血管组织工程支架基材的共混改性与相容性分析

赵富强¹ 陈俊英^{1*} 夏传俊² 李天聪² 黄霞^{2*}

(1. 郑州大学化工与能源学院, 郑州 450001; 2. 郑州大学材料科学与工程学院, 郑州 450001)

摘 要 在杂化基材的前驱体(PA)中分别引入低分子量的聚乙二醇(PEG)和多壁碳纳米管(MWCNT),通过溶胶-凝胶共混法制备了 2 组复合组织工程支架基材,有机改性体系 PEG/PA 和添加了 MWCNT 的无机改性体系 C/PA。并对改性体系的微观结构、热稳定性、溶胀性能以及引入组分与基材的相容性进行了研究,比较了改性体系对脐静脉内皮细胞(HUVEC)形态和粘附行为的影响。制得的 C/PA,在去离子水中的溶胀率为 15.1%;在 pH=7.4 的 PBS 溶液中的溶胀率为 16.8%,热稳定性较好,表面硬度适于细胞增殖分布,具有较好的应用前景。

关键词 血管组织工程支架,共混改性,溶胶-凝胶法,细胞相容性

Blend modification and compatibility analysis of hybrid matrix for small diameter vascular tissue engineering scaffold

Zhao Fuqiang¹ Chen Junying¹ Xia Chuanjun² Li Tiancong² Huang Xia²

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001;
2. School of Material Science and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

Abstract Low molecular weight polyethylene glycol (PEG) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) were introduced into the precursor of hybrid substrate (PA), and two sets of composite tissue engineering scaffolds, including the organic modified system PEG/PA and inorganic modified system C/PA added with MWCNT were prepared by sol-gel blending method. The microstructures, thermal stability, swelling properties, and the compatibility between the introduced components and matrix of modified system were studied. The effects of modified system on the morphology and adhesion behavior of umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were compared. C/PA prepared had the swelling rate of 15.1% in deionized water and 16.8% in PBS solution with pH=7.4. It had good thermal stability, and its surface hardness was suitable for cell proliferation and distribution, so it had a good application prospect.

Key words small diameter vascular tissue engineering scaffold, hybrid biomaterial, sol-gel method, cell compatibility

心血管疾病致死率高,并发症复杂,是困扰现代医学与相关学科的难题,手术治疗是最有效的途径^[1]。人工血管用于替换或修复发生病变的血管,解决了移植物来源不足以及异物排斥的问题^[2]。大口径人工血管在临床上已得到部分使用,采用涤纶、聚四氟乙烯和天然真丝等材料制备出的大口径人工血管,在植入 5 年内可以保证理想的通畅率(95%)。小口径人工血管(<6mm),由于其在体内的低顺应性以及长期通畅性不理想等问题,依旧是领域内研究的难点和重点^[3-6]。组织工程支架被认为是解决

小血管问题的理想方法。

小口径血管组织工程支架材料必须满足以下性能特点:厚度均匀的血管壁结构、优异的力学性能以及良好的生物相容性。厚度均匀的管壁结构是指,小口径血管组织工程支架应具备致密均匀分布的孔隙,保证其通透性,即在保证水分、营养物质及细胞可以穿过血管的条件下不会发生血液外流,植入前无需对血管进行预凝操作^[7-9];良好的生物相容性则要求所设计的人工血管的顺应性应与宿主自体血管相匹配,同时即便在血管服役后长时间内,承受血流

基金项目:国家自然科学基金(51202221)

作者简介:赵富强(1993-),男,硕士,从事有机-无机杂化心血管材料的研究。

联系人:黄霞(1978-),女,博士,副教授,从事生物医用高分子材料,心血管组织工程支架的研究。

陈俊英(1972-),女,博士,副教授,从事可再生能源的研究。

剪切作用和脉动循环压力后,管壁不发生破损且血管力学性能仍能满足使用要求。天然生物材料良好的生物相容性、生物降解性,使其能为细胞提供近似于人体真实环境的细胞外基质、调控组织结构。透明质酸(Hyaluronic acid, HA),可经过交联形成网状高分子,兼具优异生物相容性和良好稳定性。其本身可以主动刺激内皮细胞进行增殖和转移,诱导血管形成,此外 HA 降解后的低分子产物也对生成血管具备一定的促进作用^[10-11]。胶原蛋白是一种具有高抗张强度的硬质蛋白,在组织工程领域也备受关注,它的低免疫原性是其作为医用材料最大的优势,而这种优势使得在宿主体内不易发生排斥反应,并且这种构成人体组织的物质与细胞周围的基质表现出良好的相互协同作用^[12]。但天然材料的基材难以在小口径血管组织工程构建过程中要求的各向异性的智能响应,研究者试图引入合成材料可定制结构的优势来弥补天然血管的不足。

聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、聚氨酯(PU)等合成材料因其优秀的血液相容性和力学性能,长期以来一直被作为组织工程支架的理想基材,被许多研究者认为是理想的人工血管材料^[9]。但也有研究指出,在长期植入后,会发生老化降解和钙化现象,从而导致材料发生破裂。但对 PU 进行修饰或改性的同时,又会降低其力学性能和血液相容性。相比之下,一旦血管材料与血液接触,就会开始血栓的形成,这是研究者们所面临的巨大挑战。因此,理想血管支架材料的设计与合成仍是本领域研究的热点与难点。近年来,纳米材料因其独特的物理、化学以及机械性能使其在诸多领域得到科研人员的青睐,将纳米材料的结构设计引入生物医用材料,尤其是心血管领域有望解决此领域的关键问题。

本课题组多年来一直致力于小口径血管组织工程支架的研究^[12-15],设计合成的一种杂化纳米复合小口径血管组织工程支架基材,生物学评价及皮下植入均表现良好,但其脆性给植入及缝合带来了困难,同时近年来有报道显示,基材的表面力学性能对细胞的增殖分布有较为直接的影响。因此,笔者在硕士期间曾对本课题组制备的血管组织工程支架进行共混改性。研究了有机共混与无机共混 2 个共混体系,在引入增韧组分时需考虑亲水性、生物相容性和与血液成分低相互作用等因素^[15]。聚乙二醇(PEG)作为常用增韧组分,成为首先考虑的组分同时,考虑到碳材料的诸多优势,在实验中引入纳米碳管对体系进行无机增韧的改性,形成特殊的有机和

无机复合结果,达到增韧基材的目的。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

杂化血管基材前驱体(PA),实验室自制;PEG600(分析纯),天津科密欧试剂有限公司;磷酸盐(PBS)缓冲液(pH=7.4)、蒸馏水、无水乙醇(化学纯)、戊二醛,洛阳化学试剂厂;多壁碳纳米管(MWCNT),中国科学院成都有机化学有限公司;DMEM 培养基,国药集团化学试剂有限公司。

磁力加热搅拌器(79-1 型),江苏金坛市金城国际实验仪器厂;电子天平(AL104 型),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;超声振荡器(CQ250 型),上海科导超声仪器有限公司;恒温油水浴锅(XMTE-7000 型),上海申顺生物科技有限公司;真空干燥箱(YHG-9055A 型),郑州长城科工贸有限公司;细胞培养板孔(24/96 孔型),美国康宁公司;移液枪(Finnpipette F3 型,0.5~5mL),美国 Thermo 公司;台式冷冻离心机(HeraeusLabofuge 400R 型),美国 Thermo 公司;安全柜(HF safe—1200A2 型)、二氧化碳培养箱(Healforce HF90 型),力康生物医疗科技控股有限公司;热重分析仪(TG, NETZSCHSTA 449 F3 型),德国耐驰公司;扫描电子显微镜(SEM, QUNTA 650 型),美国 FEI 公司。

1.2 有机共混和无机共混体系的制备

称取本课题组制得的杂化血管基材前驱体 PA(实验室自制)^[15],加入不同体积配合比的 PEG,采用磁力加热搅拌器(79-1 型,江苏金坛市金城国际实验仪器厂)搅拌成均相溶液,浇筑成膜,即制得有机共混体系 PEG/PA,切成 2cm×1.5cm×0.30mm 的矩形试样待用。

在本课题组自制杂化基材前驱液中,加入不同组分的 MWCNT,采用磁力加热搅拌器(79-1 型,江苏金坛市金城国际实验仪器厂)搅拌成均相溶液,浇筑成膜,即制得无机共混体系 C/PA,切成 2cm×1.5cm×0.30mm 的矩形试样待用。

1.3 样品的测试

1.3.1 共混体系的微观结构测试

采用扫描电子显微镜(SEM, QUNTA 650 型,美国 FEI 公司)对样品进行观察,分析基材中引入共混相后微观结构的变化,将共混浇筑膜剪成小片,用导电胶黏贴于载物台上,表面进行真空喷金处理,喷金时间约 60s。

1.3.2 共混体系的热稳定性测试

采用热重分析仪(TG, NETZSCH STA 449 F3型, 德国耐驰公司)对样品的热稳定性变化进行测试与分析, 以此判定共混体系的相容性, 升温速率为 $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 温度范围 $30\sim 700^{\circ}\text{C}$, 高纯氮气流速设为 $30\text{mL}/\text{min}$ 。

1.3.3 溶胀性测试

将制得的样品, 切成 $2\text{cm}\times 1.5\text{cm}\times 0.30\text{mm}$ 的矩形小片, 采用电子天平[AL104型, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]称其干重。在室温条件下, 将样品完全浸泡于去离子水以及 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸缓冲液中, 进行溶胀性测试。在不同的时间将样品取出直至恒重, 用滤纸小心吸除样品表面多余的水, 称量得样品的湿重。每个试样取4个平行样品。样品的溶胀率计算见式(1)。

$$\text{溶胀率} = (W_t - W_d) \div W_d \times 100\% \quad (1)$$

式中, 溶胀率, %; W_t 为在平衡条件下样品的质量, g; W_d 为未溶胀的样品质量, g。

1.3.4 细胞形态分析

将冻存细胞从液氮中取出, 采用恒温油水浴锅(XMTE-7000型, 上海申顺生物科技有限公司) 37°C 水浴锅中解冻。待解冻后, 采用移液枪(Finnpipette F3型, $0.5\sim 5\text{mL}$, 美国 Thermo 公司)加入 3mL 培养基混合制成细胞悬液, 将细胞悬液转移至培养瓶(25mL)中后加入适量 DMEM 培养基, 采用二氧化碳培养箱(Healforce HF90型, 力康生物疗科技控股有限公司) $5\% \text{CO}_2$, 37°C 培养。将细胞悬液采用台式冷冻离心机(Heraeus Labofuge 400R型, 美国 Thermo 公司)进行离心, 5min , $1200\text{r}/\text{min}$, 加入 PBS 缓冲液采用移液枪反复吹打离心管底部细胞团后制备成细胞悬液, 以备细胞种植。采用细胞培养板孔($24/96$ 孔型, 美国康宁公司)在每孔材料上滴加被稀释后的细胞悬浮液, 加入 DEME 培养基后采用二氧化碳培养箱(Healforce HF90型, 力康生物疗科技控股有限公司)进行培养。采用 2.5% 的戊二醛将样品表面细胞固定, 固定处理时间约 $1\sim 2\text{h}$ 。弃去戊二醛后, 采用 PBS 缓冲液多次冲洗, 用乙醇梯度脱水后固定, 样品喷金后采用扫描电子显微镜(SEM, QUNTA 650型, 美国 FEI 公司)观察细胞的形态。

2 结果与讨论

2.1 微观结构分析

PEG/PA 和 C/PA 的 SEM 图见图 1。从图 1

(a)可以看出, 有垂直于表面方向的层状台阶, 台阶边缘呈放射状条纹, 台阶宽度均匀约 $20\mu\text{m}$ 。从图 1(b)可以看出, 添加 5% (体积分数, 下同)MWCNT 制得的 C/PA 共混体系的断面呈平行于膜表面的层错状结构, 层间无明显分离, 各层均能观察到微米级的孔结构, C/PA 共混体系保留了基材的多孔结构, 层状分布于表面结构平行, 共混后的体系相容性优于有机改性的 PEG/PA 体系。

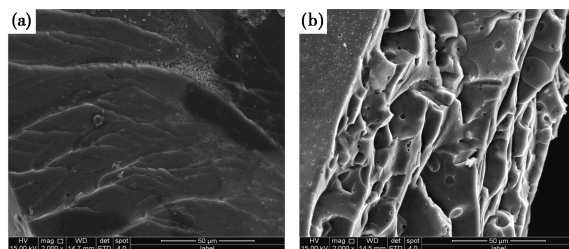


图 1 PEG/PA 和 C/PA 的 SEM 图

2.2 热性能分析

PEG/PA 和 C/PA 的热重曲线见图 2。从图 2(a)可以看出, 在 PA 体系中引入不同体积分数的 MWCNT 制得的 C/PA 共混体系中, 随着引入 MWCNT 用量的增加, C/PA 的热稳定性发生明显变化, 热分解的起始温度变化不大, 但出现最大失重的温度明显升高, 同时第一次失重率减少了约 30% , 这说明 MWCNT 与 PA 基材形成了良好的相间结合, 达到了热力学水平的相容。从图 2(b)可以看出, 在引入不同体积分数的 PEG 后, PEG/PA 的热分解初始温度与热失重比例均未观察到明显变化, 即共混体系的热稳定性不随 PEG 含量的变化而变化, 这表明有机共混体系 PEG/PA 未达到热力学水平的相容。

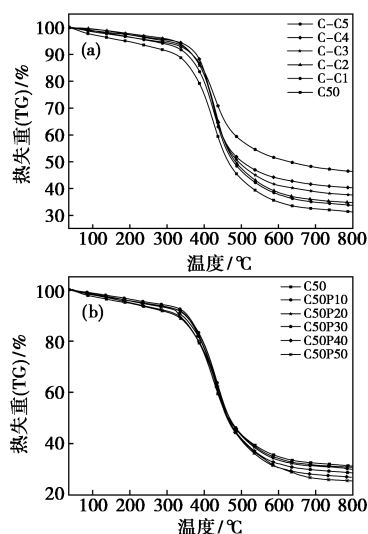


图 2 PEG/PA 和 C/PA 的热重曲线图

2.3 溶胀度分析

组织工程支架需模拟细胞外基质的结构及生物学环境,组织工程支架材料的溶胀性,即吸水性,对细胞的贴附和增殖十分重要,因为具有良好溶胀性的支架可以更好地吸收培养基或体液中的营养物质,以供细胞生长需要^[16]。

PA 和 C/PA 的溶胀率图见图 3。从图可以看出,在去离子水中,C/PA 的溶胀率为 15.1%,比 PA 的溶胀率 13.0%提高了 16.2%;在 pH=7.4 的 PBS 溶液中,C/PA 的溶胀率为 16.8%,比 PA 的溶胀率 10.8%提高了 55.6%。这是因为引入 MWCNT 后,碳管上的羧基和水之间形成氢键,有利于杂化体系在溶液中的水分子吸收,导致杂化材料的溶胀率得到提高。

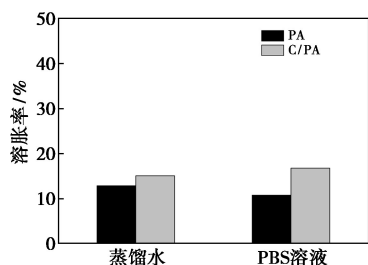


图 3 PA 和 C/PA 的溶胀率图

2.4 细胞形态分析

将脐静脉内皮细胞(HUVEC)在样品上的贴附生长 72h,对 PA 和 C/PA 与细胞的相容性进行测试和分析。PA 和 C/PA 细胞形态的 SEM 图见图 4。从图 4(a)可以看出,PA 基材表面的内皮细胞数量较多,细胞铺展较好,部分细胞已开始向 PA 内部迁移且长成了一片。从图 4(b)可以看出,在 C/PA 上的内皮细胞数量较多,但细胞只在表面生长,这可能是因为引入 MWCNT 后材料的孔隙率降低,不利于细胞的铺展和向内部生长,但表面细胞的密度明显增多,细胞活性增加,说明引入 MWCNT 未损失 PA 的细胞相容性,引起力学性能的变化,基材的表面硬度与细胞活性直接相关^[17],因而导致细胞的活性增强。

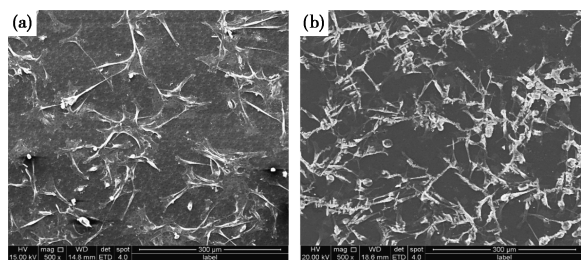


图 4 PA 和 C/PA 细胞形态的 SEM 图

[(a)PA;(b)C/PA]

3 结论

在杂化小血管组织工程支架基材的前驱溶液中分别引入了无机(碳纳米管)、有机(PEG)改性组分,通过改变引入组分的体积分数,制得一系列共混改性的血管组织工程支架基材 PEG/PA 和 C/PA。制得的 C/PA,在去离子水中的溶胀率为 15.1%;在 pH=7.4 的 PBS 溶液中的溶胀率为 16.8%,热稳定性较好,表面硬度适于细胞增殖分布,在医疗领域具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 陈福真,陈稼.丝绦交联人造血管的研究[J].中华实验外科杂志,1999,16(1):30-31.
- [2] 宋逢林,胡冬煦.人工血管的研究进展[J].中国现代医学杂志,2013,23(2):65-70.
- [3] 张纪蔚.人工血管性能要求和研究现状[J].中国实用外科杂志,2007,27(7):560-561.
- [4] 马海红,史铁钧,宋秋生.溶胶-凝胶法有机-无机杂化材料的制备及应用研究进展[J].化工新型材料,2008,36(12):1-3.
- [5] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260(5110):920-935.
- [6] Abbott W M, Callow A, Moore W, et al. Evaluation and performance standards for arterial prostheses[J]. Journal of Vascular Surgery, 1993, 17(4):746-748.
- [7] How T V, Guidoin R, Young S K. Engineering design of vascular prostheses[J]. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H Journal of Engineering in Medicine, 1992, 206(2):61-71.
- [8] Guidoin R, King M, Marceau D, et al. Textile arterial prostheses: is water permeability equivalent to porosity? [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 1987, 21(1):65-87.
- [9] 徐雅硕,钟银屏,付强,等.聚氨酯人工血管的研究进展[J].功能材料,2012,43(B8):6-9.
- [10] Zhu J, He P, Lin L, et al. Biomimetic poly(ethylene glycol)-based hydrogels as scaffolds for inducing endothelial adhesion and capillary-like network formation[J]. Biomacromolecules, 2012, 13(3):706-713.
- [11] Wang Y, Wang F, Guo X. Angiogenesis effects of low molecular weight hyaluronic acid[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2007, 42(9):664-666.
- [12] 崔新战,黄霞,关绍康,等.高分子材料涂覆生物镁合金心血管支架的研究与应用[J].中国组织工程研究,2012,16(51):9635-9639.
- [13] Xia H, Suo Z Y, Qiang G J, et al. Synthesis, characterization, and degradation of a novel L-tyrosine derived polycarbonate for potential biomaterial applications[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2008, 110(4):2168-2178.

(下转第 84 页)