

PLLA 纳米纤维编织缝合线的制备及生物相容性研究*

胡 雯¹, 黄争鸣², 唐 亮³

(1. 同济大学 材料科学与工程学院, 上海 200092; 2. 同济大学 航空航天与力学学院, 上海 200092;
3. 同济大学 附属上海肺科医院中心实验室 上海 200433)

摘要: 以 PLLA 为原料, 采用静电纺丝和圆盘定向收集得到具有有序排列的纳米纤维束, 并将其编织成线, 得到 PLLA 纳米纤维缝合线。对新型可吸收 PLLA 缝线的微观形貌、血液相容性、细胞毒性进行了性能表征, 并测试了其力学性能。结果表明, 纳米纤维在一定的圆盘转速下表现出较好的定向性, 力学性能良好。缝线在溶血试验中溶血率 < 5%, 符合医用材料的溶血要求。MTT 实验结果表明缝线材料无细胞毒性, 且显示出较高的增殖率, 说明新型可吸收 PLLA 纳米纤维缝合线具有良好的生物相容性和安全性。

关键词: 聚乳酸; 静电纺丝; 定向排列; 生物相容性
中图分类号: TQ050.425; R318.08 **文献标识码:** A
文章编号: 1001-9731(2009)11-1888-04

1 引言

静电纺丝是一种能制备超细纤维的重要方法。早在 1934 年, Formhals 首次介绍了利用静电斥力获得聚合物纤丝的技术^[1]。由于纳米纤维具有尺度小、比表面积大和物理性能优异等特点, 在微电子、过滤材料、纺织、能源和生物医学等领域具有广阔的应用前景^[2]。

聚乳酸(PLLA)是 FDA(美国食品和药物管理局)认可的一种可完全生物降解, 对环境无污染的聚酯类高分子材料^[3,4], 具有适应的生物降解特性、良好的生物相容性和可加工性, 以及优良的力学强度。已广泛应用于可吸收缝合线、药物缓释材料、人工血管、止血剂、外科粘合剂^[5]和骨折内固定^[6]等领域, 近几年来引起人们广泛的关注^[7-9]。

目前, 由静电纺丝制得的纳米纤维大都是无纺布的形式, 很难获得理想的单向排列纤维结构。本研究基于静电纺丝技术, 通过尖角圆盘收集得到具有一定方向性排列的连续纳米纤维束, 再采用微型编织机将多股经后处理的纳米纤维束编织成线, 以期提高力学性能。本研究依据 ISO(国际标准化组织)生物相容性的要求, 即指生命体组织对非活性材料产生反应的一种性能, 一般是指材料和宿主之间的相容性, 包括组织相容性和血液相容性^[10], 对 PLLA 纳米纤维编织线的力学性能及其血液相容性和细胞毒性进行了研究, 本

人在前期的研究中曾对纳米纤维编织的工艺进行了探讨^[11], 本文在前期研究的基础上针对 PLLA 可吸收纳米纤维编织线的生物相容性的研究。为该材料的临床应用奠定了基础。

2 实验材料与方法

2.1 材料与仪器

聚乳酸(PLLA) $M_w = 100000 \text{ g/mol}$ 购自济南健宝开元生物材料有限公司, 溶剂三氟乙醇(TFE)购于上海达瑞精细化学品有限公司, 分子量 $M_n = 100.04$, 纯度 > 99.5%, MTT 购自 Solarbio 公司, DMEM 培养液(Invitrogen Corporation, 10% 小牛血清), 二甲亚砜(DMSO)购自国药集团上海分公司; 96 孔细胞培养板(Greinerbio-one, German), 756MC 型紫外分光光度仪(上海第三分析仪器厂), Wellscan MK3 型酶联免疫检测仪(Labsystems Dragon 公司), BX51 型光学显微镜(OL YMPUS, Japan), CKX41-A32PH 型荧光倒置显微镜(OL YMPUS, Japan), STS-2 型脱色摇床(上海琪特分析仪器有限公司), MCO-175 型 CO_2 培养箱(日本三洋)。

2.2 方法

2.2.1 电纺溶液配制

将一定质量的 PLLA 加入到 TFE 中, 超声波振荡 0.5 ~ 1.5 h, 获得透明、稳定的溶液。配置浓度为 8% (质量分数) 的纺丝液。

2.2.2 电纺纤维束的制备

电纺喷头采用 19G 注射针头(内径 0.65mm, 外径 1.1mm), 采用 BGG 直流电压发生器(北京市机电研究院)产生高压直流电, WZ-50C2 型微量注射泵(浙江大学医学仪器有限公司)供液, 喷丝系统自行研制。采用快速旋转的尖角圆盘(见图 1), 用于纤维的定向收集, 收集时间 $(4 \pm 0.5) \text{ min}$ 。装置离喷丝口距离为 13 ~ 15cm, 电纺的环境温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 环境湿度为 $60\% \pm 5\%$ 。

2.2.3 纤维束后处理

将收集下来的 PLLA 纳米纤维束置于 80°C 下进行热处理 30s 后在自制的拉伸装置上拉伸, 拉伸倍数设置为 70%, 将经拉伸处理后的纤维束在自制的加捻

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50773054)

收到初稿日期: 2009-03-23

收到修改稿日期: 2009-06-29

通讯作者: 黄争鸣

作者简介: 胡 雯 (1981 -), 女, 安徽铜陵人, 在读博士, 师承黄争鸣教授, 从事纳米纤维材料研究。

装置上加捻处理,随后保持张力紧张热定型,热定型温度为 80 ,热定型时间 2h。

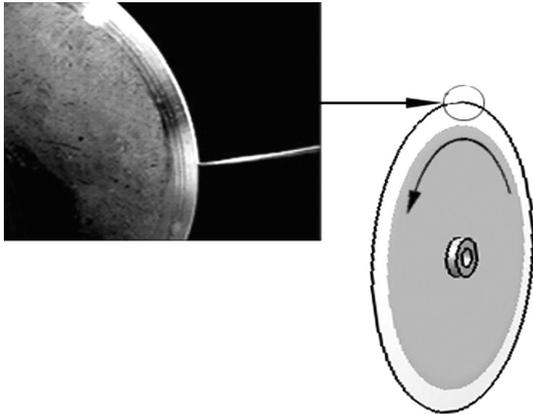


图 1 尖角圆盘装置示意图

Fig 1 Schematic drawing of rotating disc

2.2.4 编织

选取 8 锭经后处理的 PLLA 纳米纤维束,采用 X 系列编织机(购自上海香海织带机械有限公司)进行编织,得到结构紧凑、直径均一的编织线(图 2)。

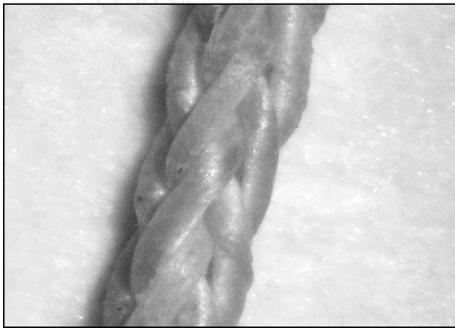


图 2 PLLA 编织线的形貌图

Fig 2 A braided PLLA wire

2.2.5 溶血试验

取 ACD 抗凝全血 8ml,加 10ml 生理盐水稀释备用。截取 PLLA 编织缝线 1g 放入小试管内,用蒸馏水冲洗 3 次,再用生理盐水冲洗 3 次。加入 0.2ml 的稀释血液和 10ml 生理盐水,在水浴中恒温 60min。其中阳性对照和阴性对照分别用 10ml 蒸馏水和 10ml 生理盐水各加 0.2ml 的稀释血,与样品同样操作。随即以 1000r/min 离心 5min,取上清液,用 721 型分光光度计在 545nm 处测吸光度。溶血率(HR)按下式计算:

$$HR = \frac{A_s - A_N}{A_P - A_N} \times 100\% \quad (1)$$

其中 A_s 为 ACD 全血与样品接触后与 545nm 处的相对吸光度; A_P 、 A_N 分别为阳性对照物、阴性对照物在 545nm 处的相对吸光度。评价标准:若溶血率 < 5%,则材料符合生物材料溶血实验要求;若溶血率 > 5%,可判断该材料具有溶血作用。

2.2.6 细胞毒性试验

采用 MTT 法测定材料浸提液的细胞毒性。

(1) 浸提液制备:将制成的缝线置蒸馏水中超声波清洗 5min;高压蒸汽灭菌(120 ±1),20min。分别

取 1g 试样,加入 5ml DMEM 培养液中,置 37 培养箱中 48h 即成材料浸提液。分别配制成 100%、75%、50%、25% 浓度的材料浸提液。

(2) MTT 法测定:将人脐静脉内皮细胞(HU-VEC)以 0.25% 胰酶消化,10% FCS-DMEM 培养基调整细胞密度为 5×10^4 /ml。以 5×10^3 /100μl/孔加入 96 孔平地细胞板,12h,在 5% CO₂ 浓度、37 的培养箱中,过夜贴壁。弃去上清液,每孔加入 100%、75%、50%、25% 的浸出液,每种浓度各 4 个重复,并设 0.1% 苯酚孔为全致死对照孔(阳性对照组)。96 孔板以 200μl/孔加入 5mg/ml 的 MTT 溶液,于 5% CO₂、37 继续培养 4h,弃上清后以 200μl 二甲亚砜(DMSO)溶解 30s 后在 570nm 酶标仪上比色。分别于 1、3、5、7d 后,取 96 孔板各一块采用 MTT 法,测定细胞活率;根据各组 A 值按照下述公式分别计算 MTT 吸光度均值,与阴性对照孔(生理盐水)比值为各实验组细胞相对增殖率(RGR):

$$RGR = \frac{\text{浸提液组平均 A 值}}{\text{阴性对照组平均 A 值}} \times 100\% \quad (2)$$

其中材料的毒性用 6 级毒性分级法来评价:

100% 为 0 级,75% ~ 99% 为 1 级,50% ~ 74% 为 2 级,30% ~ 49% 为 3 级,15% ~ 29% 为 4 级,0 ~ 14% 为 5 级。

2.2.7 细胞形态与生长情况

取上述经实验材料浸提液培养的人皮静脉内皮细胞,每隔 48h 用倒置显微镜(×200)观察细胞形态及生长情况。

2.2.8 性能表征

采用 HITACHI S-2360N 型扫描电镜(SEM)观察纳米纤维束的表面形貌,加速电压 20kV。应用图像分析软件 Image J 对 SEM 照片进行分析,随机抽取 50 根纤维的直径,根据所得数据计算纤维直径的平均值。

裁剪 1cm 的纳米纤维线,固定在光学显微镜(Union D23 高变焦比视频显微镜)下观察,放大 250 倍。用设备所带的 Avercap 图像处理软件捕捉图像,以标尺为参考。采用 Image J 软件确定直径。

力学性能表征参照 ASTM D2256-02 标准^[12],采用 CSS-44020 型(长春试验机厂)力学测试仪测试纳米纤维线的拉伸力学性能。试样长度取 130 ~ 150mm 的线段,试验时采用定制的 10N 微型加载池,横梁移动速度为 10mm/min。

3 结果与讨论

3.1 静电纺 PLLA 纳米纤维的微观形貌

本实验采用快速旋转的尖角圆盘收集装置,能得到一定方向性、一定长度和直径的线状纤维束。当圆盘转速为 1205r/min,纤维表现出较好的定向性^[11]。由图 3 可以看出 8% (质量分数) 浓度的 PLLA 电纺纳米纤维体现出较好的形貌,纤维光滑均一、没有珠状物

或纤维粘并现象出现。根据 Image J 图像分析软件测量出 PLLA 纳米纤维的直径分布在 238 ~ 965nm, 平均直径为 667nm。

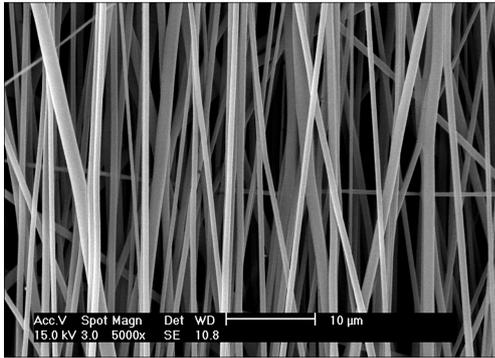


图3 定向排列的纳米纤维

Fig 3 Uniaxially aligned nanofibers

3.2 PLLA 编织缝线的形貌和力学性能测试

图2是 PLLA 纳米纤维束经编织后的形貌图, 由图2可以看出, 编织线结构紧密、表面平滑、均匀。拉伸力学强度和打结强度是缝合线的重要性能, 图4比较了 PLLA 纳米编织缝合线在直接拉伸和打结拉伸时的应力-应变曲线。可以看出, 曲线均可分为弹性段和塑性段两个部分, 缝线无论是直接拉伸还是打结拉伸体现出相近的力学性能, PLLA 缝线直接拉伸强度为 (89.5 ± 3.5) MPa, 而打结强度为 (86.7 ± 2.8) MPa, 断裂伸长率也不相上下, 分别为 (87.1 ± 4.6) % 和 (93.0 ± 5.2) %。说明 PLLA 纳米编织缝线直接拉伸和打结拉伸都体现出较好的力学性能。

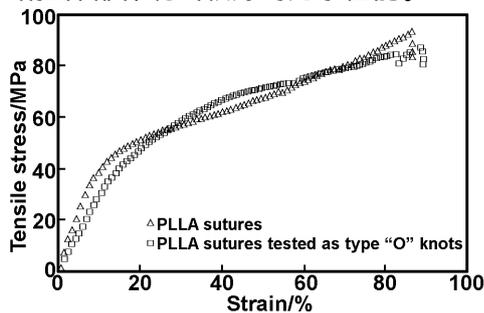


图4 PLLA 缝线及其打结缝线的拉伸应力-应变曲线
Fig 4 Tensile stress-strain curve of PLLA and its knot suture

3.3 材料溶血实验

根据国家 GB/T 16886.4-2003 标准, 缝合线属于植入性材料, ISO 要求应用于机体并与生物组织直接接触的生物医用材料都需要进行溶血测试^[13]。其原理是通过材料对红细胞在体外接触过程中所导致的红细胞溶解和血红蛋白游离程度的测定来评价材料的血液相容性。当溶血试验测得有溶血活动时, 则材料有毒性^[14]。该项试验能敏感的反应试样对红细胞的影响, 是一种特别有意义的材料筛选试验。本实验中 PLLA 缝线组和生理盐水阴性对照组均无溶血现象, 而阳性对照组全部溶血。计算结果见表1, 实验组的溶血率为 4.75%, 符合 ISO 规定的不大于 5% 的标

准, 满足医用生物材料的要求。

表1 OD 数值表 ($\bar{x} \pm S D$)

Table 1 OD measurement data

	PLLA 缝线组 (A _S)	阴性对照组 (A _N)	阳性对照组 (A _P)
OD 值	0.0420 ± 0.0056	0.0060 ± 0.0007	0.7640 ± 0.0352
溶血率 (%)	4.75	0	100

3.4 细胞毒性试验

四唑盐比色 MTT 法能非常灵敏的反映出受试材料对细胞造成的毒性损害。采用间接接触法, 将材料浸提液对细胞生长产生的影响经 MTT 法显色, 然后通过检测其 A 值差异来判定细胞的生长、增殖状况, 从而反映材料对细胞的毒性程度^[15]。该方法具有简便快捷、敏感直观、重复性好等优点^[16]。MTT 检测能快速对材料的细胞毒性做出可靠的定量评定, 细胞毒性通常随溶出物浓度的增高而增大, 本实验应用不同浓度 (100%、75%、50%、25%) 的浸提液对分别浸提 1、3、5、7d 以便使细胞毒性显现。实验结果表明 PLLA 缝线材料对 HUVEC 细胞的增殖没有影响, RGR > 85%, 细胞毒性 1 级, 表明受试材料无细胞毒性。各时间点细胞数实验组均高于阳性对照组, 细胞数量随培养时间的延长逐渐增多, 说明该缝线对 HUVEC 细胞的增殖有促进作用, 对细胞的生长增殖表现出良好的细胞相容性。

3.5 细胞形态及生长情况

实验组和阴、阳性对照组在 5% 浓度 CO₂ 培养箱中, 于 37 °C 培养 7d, 每 48h 用倒置显微镜观察细胞形态及生长情况并拍照。如图 5 所示 (a、b、c、d 分别为 PLLA 缝线组浸提液与细胞接触培养后 1、3、5、7d 的细胞形态 (×200), e 图为阳性对照组细胞形态 (×200))。显微镜下观察发现: 材料组浸提液与细胞接触培养 1d 后, 部分细胞呈圆形贴壁。3d 时, 细胞生长旺盛, 贴壁生长良好, 细胞形态呈梭形和不规则多角形, 未见明显圆缩, 部分细胞呈簇状分布, 中间出现小的细胞集落, 细胞界限不清, 多层堆积。5d 后细胞数量迅速增多, 细胞直径增大, 主要为梭形和多角形细胞, 突起于瓶壁上, 随时间延长细胞数量逐渐增多, 7d 时, 未见细胞形态发生改变, 呈梭形或多角形, 细胞生长旺盛, 排列紧密, 而阳性对照组的基本未见活细胞, 细胞变圆, 细胞核浓缩, 核仁圆, 镜下可见漂浮的死细胞, 基本不贴壁, 见表 2。

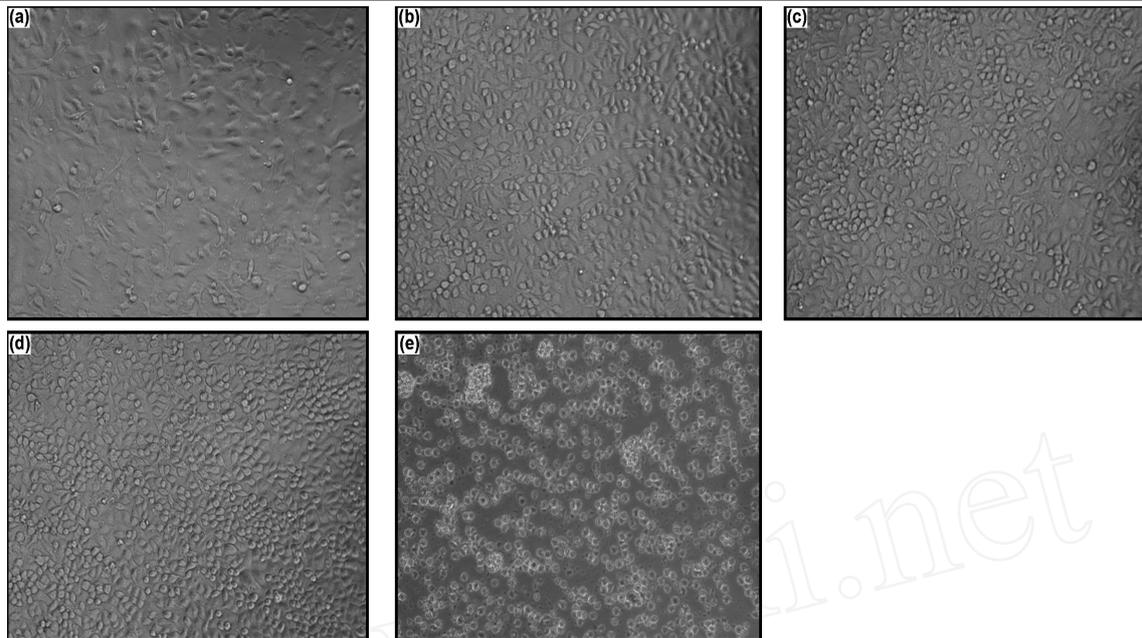


图5 倒置显微镜下细胞 HUVEC 细胞形态

Fig 5 Cellular morphology of HUVEC observed by inverted microscope

表2 细胞增殖率、细胞毒性实验结果

Table 2 Material toxicity assay (RGR/ toxicity level)

组别	浸提液浓度 (%)	细胞相对增殖率 (%)				细胞毒性级别			
		1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d
PLLA 缝线组	100	100.4 ±1.7	98.3 ±3.5	95.7 ±3.7	87.9 ±4.2	0	1	1	1
	75	101.6 ±4.3	95.5 ±4.9	98.3 ±3.2	92.1 ±4.6	0	1	1	1
	50	99.4 ±3.3	96.2 ±5.7	94.3 ±3.2	85.7 ±2.4	1	1	1	1
	25	102.8 ±5.1	101.4 ±4.1	98.6 ±2.9	96.3 ±3.7	0	0	1	1
阴性对照		100	100	100	100	0	0	0	0
阳性对照		11.37 ±1.3	4.6 ±1.1	2.8 ±0.5	0.0 ±0.0	4	4	4	5

4 结 论

采用静电纺丝技术和尖角圆盘装置制备了具有定向排列结构的 PLLA 纳米纤维束,采用微型编织机对经后处理的纳米纤维束编织,得到表面光滑,直径均一,具有良好力学强度的纳米纤维编织线。对这种新型 PLLA 纳米纤维编织缝合线进行了生物相容性评价,溶血实验和细胞毒性实验表明血液相容性良好,无细胞毒性,符合医用生物材料的标准。

参考文献:

- [1] Formhals A. Process and apparatus for preparing artificial threads[P]. US Patent :1975504, 1934.
- [2] Huang Z M, Zhang Y Z, Kotaki M, et al. [J]. Composites Science and Technology, 2003, 63:0003-0053.
- [3] Kulkarni R K, Pani K C, Neumanc, et al. [J]. Arch Surg, 1996, 93(5) :839.
- [4] Bostman O, Hirvensalo E, Makinen J, et al. [J]. J Bone Joint Surg, 1990, 72B(4) :592.
- [5] 卓仁禧,尹超,吴颖楠,等. [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 1997, 4:102.

- [6] Majola A, Vainiopaa S, Rokkanen P, et al. [J]. JMS Mater Med, 1993, 2:24.
- [7] Cai Qing, Wan Yuqing, Bei Jianzhong, et al. [J]. Biomaterials, 2003, 24(20) :3555.
- [8] Alexander R, Vaccaro, Kush Singb, et al. [J]. The Spine Journal, 2003, 3(3) :227.
- [9] Roether J A, Boccocchini A R, Hench L L, et al. [J]. Biomaterials, 2002, 23(18) :3871.
- [10] 杨晓芳,奚廷斐. [J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(1) :123-128.
- [11] 胡雯,黄争鸣,陈卢松. [J]. 塑料, 2008, 5(37) :4-7.
- [12] ASTM D 2256-02: Standard test methods for testing properties of yarns by the single-strand method.
- [13] Borsani E, Salgarello S, Mensi M, et al. [J]. Acta Histochem, 2005, 107(3) :231-240.
- [14] Koziara J M, Oh J J, Akers W S, et al. [J]. Pharm Res, 2005, 22(11) :1821-1828.
- [15] Mosmann T. [J]. Immual Methods, 1983, 65 :55-63.
- [16] Lu H H, Kofron M D, EF Amin S F, et al. [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305 :882-889.

(下转第 1899 页)

- 2005,36(5):272-274.
- [12] 冯长根,陈涛,曾庆轩.[J].功能材料,2007,38(4):535-539.
- [13] 冯长根,胡秀峰,曾庆轩,等.[J].化工学报,2005,56(3):555-559.
- [14] 黄阿根.红霉素膜技术提取精制工艺中试研究[D].上海:华东理工大学,1994.
- [15] 刘昌胜,邬行彦.[J].中国抗生素杂志,1995,20(1):17-19.

Adsorption properties of ion-exchange fiber for erythromycin

CHEN Tao,ZENG Qing-xuan,FENG Chang-gen,LI Ming-yu

(State Key Lab. of Explosion Science and Technology,Beijing Institute of Technology,Beijing 100081,China)

Abstract: The adsorption and desorption characteristics of self-prepared weak-acid type ion-exchange fiber (IEF) for erythromycin (EM) were studied. The effects of temperature, acidity and adsorption time were observed. The results show that the optimum pH is 7.0. The main exchange action of the fiber is the expansion of the liquid surface. The static saturated ion-exchange capacity of EM is 1.79×10^5 u/g dry fiber, and the adsorption behavior obeys the Langmuir isotherm and the Freundlich equation. When pH is 7.0, flow speed of EM solution is 5.0ml/min, the dynamic ion-exchange capacity is 4.54×10^5 u/g dry fiber, whose 92.5% can be eluted easily by 0.1mol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ solution as eluant at a flow rate 5.0ml/min and elution volume of 80ml. Compared with macroporous resins, IEF has more fast speed of adsorption, similar ion-exchange capacity and elution rate, and can be regenerated, so IEF is a good adsorbent for EM recovery process.

Key words: ion-exchange fiber; erythromycin; adsorption; elution

(上接第 1891 页)

Preparation biocompatibility evaluation on plla braided nanofibers suture

HU Wen¹, HUANG Zheng-ming², TANG Liang³

(1. School of Materials Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China;

2. School of Aerospace Engineering and Applied Mechanics, Tongji University, Shanghai 200092, China;

3. Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China)

Abstract: PLLA nanofibers was collected by electrospinning and directional collecting disc was used in this experiment, braided suture was fabricated by mini-knitting machine. Micromorphology, blood compatibility, cells toxicity test were characterized of this new type of absorbable PLLA suture. The results show that nanofibers show better directing property in a certain rotating speed and perform favorable mechanical properties. Hemolysis ratio is less than 5% in hemolysis experiment which reach the standard required. There is no cells toxicity of sutures materials and indicative of superior cells proliferation ratio which makes the explanation of PLLA nanofibers suture of favorable biocompatibility and safety.

Key words: PLLA; electrospinning; orientation arrangement; biocompatibility

(上接第 1894 页)

Properties and fabrication of biomedical porous Ti by spark plasma sintering

SHI Bo, LIU Ying, LIAN Li-xian, ZOU Hui, SUN Wen-ze, YU Zheng-wei, WANG Cheng

(College of Material Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Three-dimensional connective porous titanium was prepared by spark plasma sintering, using biomedical atomized spherical Ti powder as raw material and polyurethane foam as a template. Then the samples were tested by XRD, SEM, and compression experiments machine. The results showed that the porous samples were pure titanium and their pore sizes were in the range of 100-500 μm , with their porosities in the range of 72.5%-83%. The compressive strength and elastic modulus were in the range of 10.3-51.8MPa and 0.32-1.25GPa, respectively. These values were similar to reticular bone. The experiment of bone-phosphate deposition showed that the porous titanium was bioactive.

Key words: porous Ti; spark plasma sintering; polyurethane; three-dimensional connective; biomedical