

静电纺丝制备壳聚糖/聚己内酯血管支架及表征

杨文静¹, 付静², 何磊², 王婷¹, 王大新^{*3}, 何农跃^{*1}

(1. 东南大学 生物科学与医学工程学院, 南京 210096; 2. 东南大学 公共卫生学院, 南京 210096;

3. 扬州大学 临床医学院, 扬州 225001, China)

摘要: 结合壳聚糖(CS)和聚己内酯(PCL)二者的优点, 以静电纺丝的方法制备了 CS/PCL 血管支架。采用 SEM 和电子万能试验机检测了该支架的结构和力学性能, 将内皮祖细胞(EPCs)与该支架膜复合培养, 评估了该血管支架维持细胞黏附、繁殖和分化的能力。SEM 结果显示: 通过静电纺丝可以得到多孔、类似于天然细胞外基质的直径约 400 nm 的纤维微结构; 当 CS 与 PCL 质量比为 0.5 时, 静电纺丝所制备的 CS/PCL 血管支架弹性最大形变达到 31.64%, 应力-应变曲线显示其弹性变形能力较强; EPCs 在 CS/PCL 血管支架黏附率可达 95.1%, 荧光显微镜观察结果也显示了 CS/PCL 血管支架利于细胞黏附、生长。

关键词: 壳聚糖; 聚己内酯; 血管支架; 静电纺丝; 内皮祖细胞

中图分类号: R318.08 文献标志码: A

Preparation and characterization of chitosan/polycaprolactone vascular scaffolds by electrospinning

YANG Wenjing¹, FU Jing², HE Lei², WANG Ting¹, WANG Daxin^{*3}, HE Nongyue^{*1}

(1. School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China;

2. School of Public Health Southeast, Southeast University, Nanjing 210096, China;

3. Clinical Medical Colleges, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: The chitosan/polycaprolactone(CS/PCL) vascular scaffolds were prepared by electrospinning in order to combine the advantage of chitosan(CS) and polycaprolactone(PCL) into the vascular scaffolds. The obtained CS/PCL vascular scaffolds were characterized by SEM and electronic universal testing machine. The endothelial progenitor cells(EPCs) were implanted in the scaffolds with various mass ratios of CS to PCL. The vascular scaffolds were examined by adhesion rate in different culturing times and the cells breeding was observed. The obtained CS/PCL vascular scaffolds show porous, nano-structured surfaces, similar to the natural extracellular matrix. When the mass ratio of CS to PCL is 0.5, the breaking elongation of CS/PCL vascular scaffolds reaches 31.64%, and the curves of stress-strain indicate that the obtained vascular scaffolds possess good elastic deformation. The adhesion rate of EPCs on CS/PCL vascular scaffolds is 95.1%, the observation of EPCs labeled with CM-DiI (chloromethylbenzamide-1, 1 diocetadecyl-3, 3, 3'-tetramethylindocarbocyanine) after culturing 72 h by fluorescence microscopy also illustrates that CS/PCL vascular scaffolds are beneficial to cell growth and cell adhesion.

Keywords: chitosan; polycaprolactone; vascular scaffold; electrospinning; endothelial progenitor cells

自 1964 年 Dotter^[1] 首次提出血管支架(Endovascular stent, EVS)概念, 并于 1969 年成功地用金属环在动物体内制作血管支架以来, 人们陆续开发出各种材料、多种成型的血管支架^[2]。目前常用

于制作血管支架的材料有金属钽、医用不锈钢、镍钛合金、涤纶(Dacron)及聚四氟乙烯(PTFE)等。金属支架在进入临床治疗后取得了令人瞩目的疗效^[3], 但是经过 10 多年的应用也逐渐暴露出一些

收到初稿日期: 2010-01-28; 收到修改稿日期: 2010-05-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2007CB936104); 国家 863 计划(2007AA021905)

通讯作者: 何农跃, 教授, 博士生导师, 从事生物传感器和纳米材料方面的研究 E-mail: nyhe1958@163.com

王大新, 教授, 博士生导师, 从事新药与组织工程研究 E-mail: daxinwang1962@yahoo.com.cn

不足和弊病^[4], 金属支架易造成血管内膜损伤, 诱发血管内膜增生导致血管再狭窄。金属支架还存在血栓形成、出凝血并发症、屈曲性不匹配、金属物永久存留于体内增加支架内再狭窄发生率等缺陷^[5]。药物涂层支架可显著降低支架置入术后的再狭窄的发生率, 在一定程度上克服金属裸支架的缺点, 但是由于不能降解, 还是给药物涂层支架的长期应用带来了隐患。Dacron 和 PTFE 材料易于加工成独特的微孔结构并具有优异的力学性能而被认为是比较具有应用潜力的血管内支架材料。但它们疏水的表面易于诱导凝血, 形成血栓, 不能完全满足心血管疾病治疗的要求, 而且这些非降解材料不支持内皮细胞的黏附和生长, 血管难以充分内皮化。此外, 材料不降解, 对血管的长期适应性造成障碍^[6]。近年来, 生物可降解高分子医用材料由于其独特的成型性和良好的生物相容性引起了人们的广泛关注。

壳聚糖(CS)是天然生物大分子甲壳素通过脱乙酰而得到的衍生物。它不仅具有优良的生物可降解性、生物相容性^[7]和生物黏附性^[8], 而且易加工成为膜状物或多孔支架。但是壳聚糖的力学性能较弱, 可塑性差, 难以加工成特定的形状^[9], 因而限制了它的应用。聚己内酯(PCL)是一种由生物可降解聚合物构成的晶体材料, 具有极好的力学性能, 其特殊的碳链结构使其具有很好的柔韧性和可加工性^[10], 并且 PCL 在生物体内的降解速度较慢, 可作为血管支架材料避免血管再狭窄, 实现长期通畅。这 2 种材料的混合物具有良好的生物相容性和可调的力学性能。用超细纤维制备的组织工程支架具有多孔结构、比表面积大及适合于细胞迁移和增殖等特点^[11], 而且细胞在小于本身的直径(微米级)的纤维上具有更好的黏附特性^[12]。

静电纺丝技术具有实验条件简单, 易操作, 步骤少, 得到产物长径比大等优点^[13]。近年来, 静电纺纳米纤维在组织工程中的应用研究不断有所报道。静电纺纳米纤维不但能够形成所需口径的管状结构, 特别是能够制备 3~6 mm 口径的血管, 而且能够模仿细胞外基质的组成和结构, 为细胞提供良好的生长环境, 为自体血管的再生和重建提供重要前提。而采用电纺丝制备的多孔三维细胞支架能够更好地仿生天然细胞外基质的结构特点, 有望成为理想的组织工程支架。

本研究中综合 CS 和 PCL 二者的优点, 以静电

纺丝的方法制备了 CS/PCL 血管支架, 研究了该血管支架形貌结构、力学性能及在该支架上复合培养内皮祖细胞(EPCs), 评估该血管支架维持细胞黏附、繁殖和分化的能力。

1 实验方法

1.1 材料与制备

壳聚糖(CS, $M_w = 5.5 \times 10^5$), 脱乙酰度(DD)为 90%, 购自济南海得贝公司; 聚己内酯(PCL)购自山东岱罡生物科技有限公司, 平均分子量为 8×10^4 ; 聚乙二醇(PEO), $M_w = 1 \times 10^4$, 购于 Aldrich 试剂公司; 实验室自备冰醋酸、氯仿、乙醇等溶剂。

把 CS 和 PEO 的混合粉末(CS 和 PEO 的质量比为 4)溶于 90% 的冰醋酸水溶液中配置成 4% 的溶液。然后加入一定的 PCL, 磁力搅拌溶解, 配置成 CS 与 PCL 质量比分别为 0.5、1、2 的混合溶液。另分别配置不含 PCL 的 CS 溶液和以氯仿为溶剂配置 PCL 溶液作为对照。将配制好的混合溶液分别注入 5 mL 的注射器, 注射器固定于静电纺丝装置的微量注射泵上, 电源阳极输出端与针头相连, 阴极输出端与金属接收轴相接, 混合溶液在静电力的作用下从针尖喷出, 轴心旋转收集所纺纤维, 得到血管支架。静电纺丝条件: 电压, 15 kV; 推进速度, 5 mL/min; 距离, 15~20 cm; 温度, < 30 °C; 湿度, < 45%; 马达转速, 2000 r/min。常温下干燥制备 CS/PCL 普通膜。

1.2 测试方法

干燥的 PCL、CS/PCL(CS 与 PCL 的质量比为 2)静电纺丝血管支架喷金, 扫描电子显微镜(SEM, Hitachi2s100, 日本)观察其形貌和结构。

将血管支架材料剪成长 33 mm、宽 6 mm 的矩形, 浸入盐浴系统中, 而后在电子万能试验机(CMT8502, 深圳)上进行单向拉伸实验, 拉伸速度为 5 mm/min, 直至样本拉断, 测试温度为常温。以 CS/PCL 混合溶液常温下干燥制备普通膜。每组平行测试 5 个样品。

实验分 A、B、C、D 4 组, 分别为 CS/PCL(CS 与 PCL 的质量比为 2)、PCL、CS 静电纺丝膜和普通膜(CS 与 PCL 的质量比为 2)。将细胞密度为 1×10^5 cell/mL 的 EPCs 悬液取 3 mL 滴加到膜上。孵育箱静态复合培养 4、12 和 24 h 后, PBS 洗涤 3 次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞, 计数板计数,

计算细胞黏附率: 黏附率= 黏附细胞数/ 细胞接种数× 100%。将消毒后支架膜(24 mm × 24 mm × 1 mm) 置于超低吸附6 孔培养板, 调整CM-DiI 标记 EPCs 浓度为 1×10^5 cell/mL, 将细胞悬液 3 mL 滴加到材料上。置孵育箱中复合培养 72 h 后, PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜观察拍片。

2 结果与讨论

2.1 CS/PCL 血管支架的 SEM 观察

图 1 为 PCL 和 CS/PCL(CS 与 PCL 的质量比为 2) 静电纺丝血管支架的 SEM 图。可见, 静电纺丝法所得到的血管支架表面具有微/ 纳米的类似天然细胞外基质的微/ 纳米结构特点, 多孔而利于细胞的黏附生长。加入 CS 所得 CS/PCL 血管支架

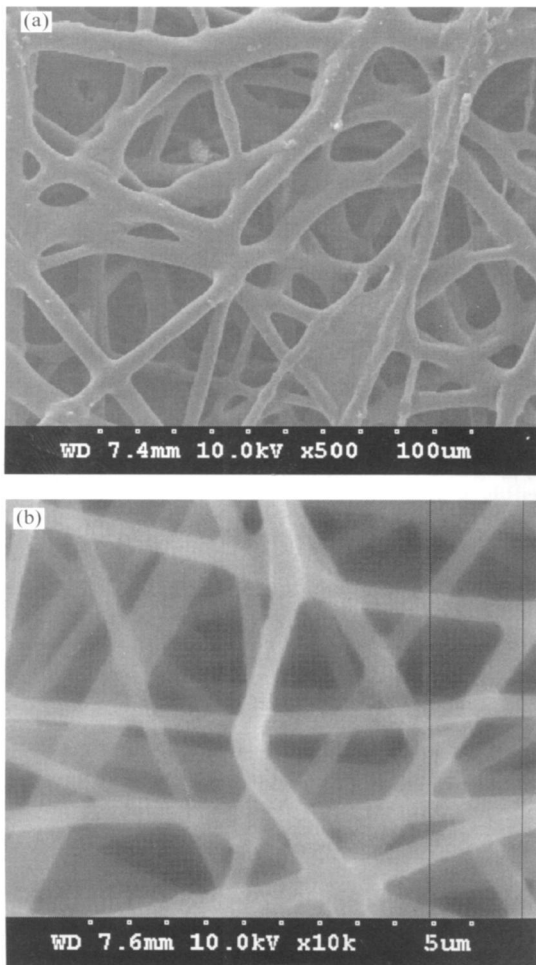


图 1 静电纺丝制备的 PCL (a) 和 CS/PCL (b) 血管支架的 SEM 图

Fig.1 SEM images of PCL (a) and CS/PCL (b) membrane prepared by electrospinning (Mass ratio of CS to PCL is 2)

的纤维相对 PCL 纳米纤维直径变小, 平均直径约为 400 nm, 纤维间的空隙变大, 更利于细胞的伸展和黏附。

2.2 血管支架的力学性能

CS/PCL 血管支架必须具有适当的力学特性, 才能保证植入宿主体内后能够提供暂时的机械支撑力。CS 与 PCL 不同质量比对 CS/PCL 血管支架性能的影响如表 1 所示。可以看出, 当 CS 与 PCL 质量比为 0.5 时, 材料的弹性模量最小, 为 3.45 MPa。随着 PCL 加入量的增加, 断裂强度逐渐降低, 断裂伸长率增大, 最大达 31.64%。图 2 为 CS/PCL 血管支架应力- 应变曲线。可见, 当 CS 与 PCL 的质量比为 2 时, 在弹性阶段与其它 2 种材料相比, 相同的外力作用下其弹性变形较大, 弹性变形能力较强, 韧性较好。

表 1 不同质量比 CS/PC 血管支架的力学性能

Table 1 Mechanical property of vascular scaffolds of CS/PCL with different mass ratios

Mass ratio of CS to PCL	Breaking strength/ M Pa	Breaking elongation/ %	Elastic modulus/ MPa
2.0	6.02±3.4	4.60±0.3	80.21±0.9
1.0	2.79±1.5	16.98±0.5	7.11±0.4
0.5	2.05±2.1	31.64±0.7	3.45±0.5

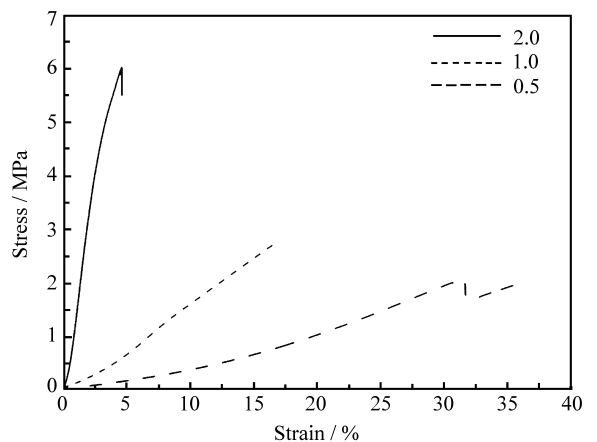


图 2 不同血管支架材料在室温下的应力- 应变曲线

Fig.2 Curves of stress- strain of various electrospun vascular scaffolds prepared with different mass ratios of CS to TPP

2.3 复合共培养 EPCs 在血管支架膜上的黏附

表 2 为 EPCs 在不同时间和不同 CS/PCL 血管支架材料上的黏附率。可以看出, 静电纺丝制备的 CS/PCL(CS 与 PCL 的质量比为 2)、PCL、CS

组膜上的黏附率值相对高于 CS/PCL (CS 与 PCL 的质量比为 2) 的普通膜; 静电纺丝 PCL 和 CS 膜的黏附率相差不大; 而综合了二者优点的静电纺丝 CS/PCL 膜的黏附率最高。这说明 CS/PCL 血管支架综合了 CS 优点, 具有良好的生物相容性, 并且静电纺丝技术得到的类似天然细胞外基质的微/纳米多孔结构更利于细胞黏附生长。荧光显微镜观察结果 (图 3) 与以上结果相符, EPCs 在静

电纺丝制备的 CS/PCL 血管支架上的细胞数量最多。因此静电纺丝制备的 CS/PCL 血管支架可为组织工程内皮种子细胞种植提供一种合适的支架。

3 结 论

(1) 采用静电纺丝成功制备了 CS/PCL 血管支架。SEM 表征和力学性能测试表明 CS/PCL 血管

表 2 EPCs 在不同时间和不同血管支架材料上的黏附率

Table 2 Adhesion rates at different culturing times on various vascular scaffolds

Culturing time	4 h	12 h	24 h	%
Electrospun CS/PCL (Mass ratio of CS to PCL is 2)	37.02 ± 3.62	88.33 ± 3.69	95.10 ± 3.33	
Electrospun PCL	34.87 ± 3.63	82.40 ± 5.03	88.17 ± 3.24	
Electrospun CS	30.44 ± 5.23	85.34 ± 6.21	89.02 ± 2.19	
General membrane CS/PCL (Mass ratio of CS to PCL is 2)	27.47 ± 4.21	62.82 ± 3.75	70.24 ± 4.42	

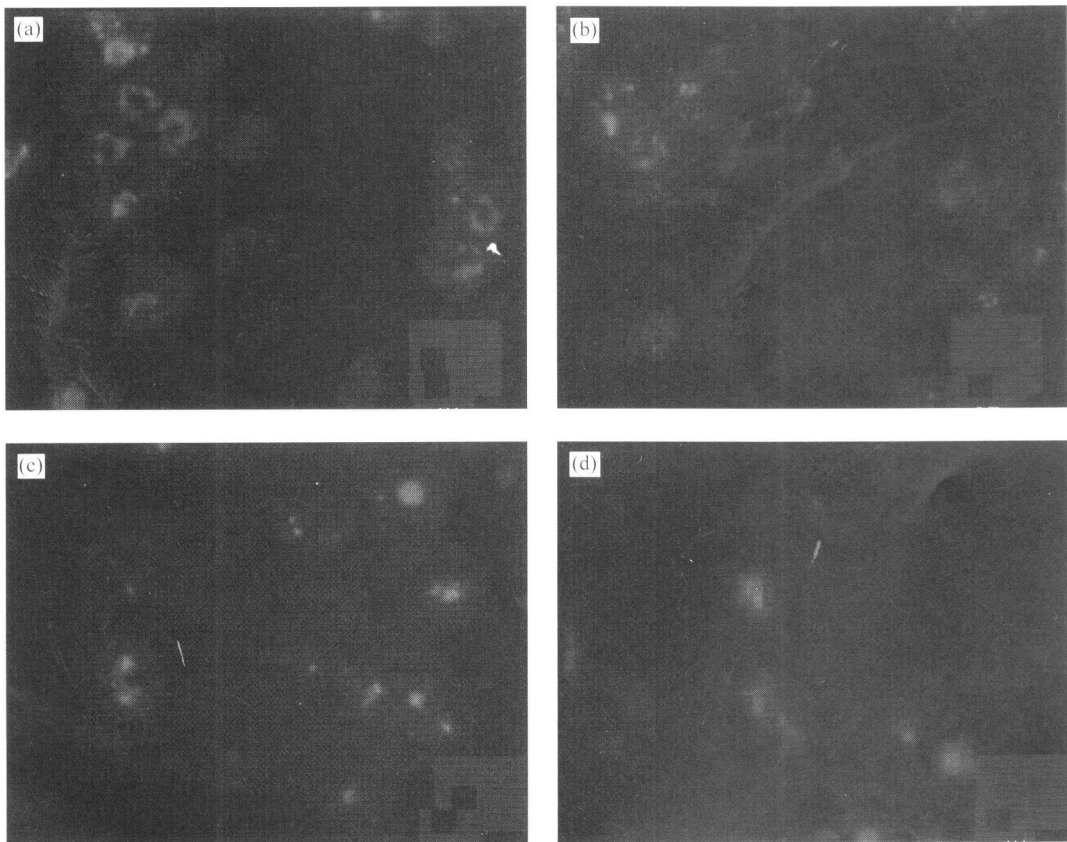


图 3 CM-DiI 标记的 EPCs 细胞复合培养 72 h 的荧光显微镜观察照片

Fig. 3 Observation EPCs labeled with CM-DiI on culturing time of 72 h by fluorescence microscopy

((a) Electrospun CS/PCL (Mass ratio of CS to PCL is 2); (b) Electrospun PCL; (c) Electrospun CS;

(d) General membrane CS/PCL (Mass ratio of CS to PCL is 2))

支架具有类似天然细胞外基质微/纳米结构的多孔结构,纤维平均直径在400nm左右。当CS与PCL的质量比为0.5时,静电纺丝所制备CS/PCL血管支架的弹性最大形变达到31.64%,应力-应变曲线显示其弹性变形能力较强。

(2) 复合共培养EPCs测定细胞在血管支架膜上的黏附率和荧光显微镜观察细胞在支架膜上的形态和分布结果表明,静电纺丝制备的CS/PCL血管支架综合了CS和PCL二者优点,具有良好的细胞相容性,表面多孔结构利于细胞黏附生长。因此静电纺丝制备的CS/PCL血管支架有可能为组织工程内皮种子细胞的种植提供一种合适的支架。

参考文献:

- [1] Dotter C T, Judkins M P. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction: A new technique and a preliminary report of its application [J]. *Circulation*, 1964, 30(5): 654- 670.
- [2] Dotter C T. Transluminally- placed coilspring endoarterial tube grafts, long- term patency in canine popliteal artery [J]. *Invest Radiol*, 1969, 4(5): 329- 332.
- [3] Beyar R. New devices in interventional cardiology: Present and future [J]. *Isr J Med Sci*, 1996, 32(7): 515- 525.
- [4] Svedman C, Tillman C, Gustavsson C G, et al. Contact allergy to gold in patients with gold- plated intracoronary stents [J]. *Contact Dermatitis*, 2005, 52(4): 192- 196.
- [5] Haase J, Hofmann M, Schopf J. Long- term outcome after implantation of bare metal stents for the treatment of coronary artery disease [J]. *Journal of Interventional Cardiology*, 2003, 16(6): 469- 473.
- [6] Roald H E, Barstad R M, Bakken I J, et al. Initial interactions of platelets and plasma proteins in flowing non- anticoagulated blood with the artificial surfaces Dacron and PTFE [J]. *Blood Coagulation Fibrinol*, 1994, 5(3): 355- 363.
- [7] 薛明, 周大利, 曹巨辉, 汪宏涛, 曹斌. 壳聚糖/磷灰石-硅灰石复合多孔支架材料的制备与性能 [J]. *复合材料学报*, 2009, 26(3): 127- 132.
- [8] 莫名月, 李国明, 方雷, 等. 壳聚糖载药微囊的制备及应用研究 [J]. *天津化工*, 2005, 19(6): 1- 3.
- [9] Mo Mingyue, Li Guoming, Fang Lei, et al. Preparation and application of drug- loaded chitosan microcapsules [J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2005, 19(6): 1- 3.
- [10] Sarasam A, Madhally S V. Characterization of chitosan- polycaprolactone blends for tissue engineering applications [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(27): 5500- 5508.
- [11] 黄琼瑜, 余厚德, 肖秀峰, 刘榕芳. 羟基磷灰石/聚己内酯-壳聚糖复合材料的制备与表征 [J]. *复合材料学报*, 2009, 26(1): 24- 30.
- [12] Huang Qiongyu, She Houde, Xiao Xiufeng, Liu Rongfang. Preparation and characterization of hydroxyapatite/ polycaprolacton- chitosan composites [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2009, 26(1): 24- 30.
- [13] Laurencin C T, Ambrosio A M A, Borden M D, et al. Tissue engineering: Orthopedic applications [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 1999, 1: 19- 46.
- [14] 何晨光, 高永娟, 赵莉, 等. 静电纺丝的主要参数对PLGA纤维支架形貌和纤维直径的影响 [J]. *组织工程与重建外科*, 2007, 3(1): 11- 14.
- [15] He Chenguang, Gao Yongjuan, Zhao Li, et al. The influence of several chief parameters in electrospinning on the morphology and the fiber diameter of PLGA fiber scaffolds [J]. *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*, 2007, 3(1): 11- 14.
- [16] 张双虎, 董相廷, 徐淑芝, 王进贤. 静电纺丝技术制备TiO₂/SiO₂复合中空纳米纤维与表征 [J]. *复合材料学报*, 2008, 25(3): 138- 143.
- [17] Zhang Shuanghu, Dong Xiangting, Xu Shuzhi, Wang Jinxian. Preparation and characterization of TiO₂/SiO₂ composite hollow nano fibres via an electrospinning technique [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2008, 25(3): 138- 143.