

静电纺聚乳酸-乙醇酸·蛋壳膜蛋白纤维膜 体外降解性能的研究

刘 更¹, 段媛媛¹, 贾 骏¹, 延 卫², 靳海立¹

(陕西 西安: 1. 第四军医大学口腔医院, 710032; 2. 西安交通大学能动学院, 710049)

[摘要] 目的: 观察静电纺聚乳酸-乙醇酸·蛋壳膜蛋白(PLGA·SEP)混合纤维膜在体外降解过程中结构、性能的变化。方法: 采用静电纺丝技术制备 PLGA·SEP 混合纤维膜和 PLGA 纤维膜(对照)。将两种纤维膜浸泡在 37℃ pH=7.4 的模拟体液(simulated body fluid solution, SBF)中进行降解实验,并分别于降解后 2、4、6 周检测两种电纺纤维膜降解前后的质量、断裂强度、表面形貌和热分解温度。结果: 两种电纺纤维膜的质量、断裂强度均随降解时间的延长而逐渐降低,在降解前 2 周,下降速度较快,从 2 周到 6 周速度减慢;在降解 2、4、6 周各时间点 PLGA·SEP 纤维膜的失重率、断裂强度降低率均高于 PLGA 纤维膜,两者有显著性差异($P < 0.05$)。两种纤维膜均在降解 6 周时,纤维吸水发生溶胀,纤维之间粘连,孔径变小,但是结构仍完整,没有出现纤维断裂现象。PLGA·SEP 和 PLGA 电纺纤维膜降解前后均有一个吸热峰,并且随着降解时间的延长,热分解温度逐渐降低,其中 PLGA 纤维膜在降解各时间点的热分解温度均高于 PLGA·SEP 纤维膜。结论: PLGA·SEP 纤维膜在 SBF 中降解 6 周时结构仍完整并保持一定力学强度,可作为一种具有发展潜力的可吸收性引导组织再生(guided tissue regeneration, GTR)膜。

[关键词] 静电纺丝; 聚乳酸-乙醇酸; 蛋壳膜蛋白; 体外降解; 模拟体液

[中图分类号] R783.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-2593(2011)11-0636-05

[牙体牙髓牙周病学杂志 2011 21(11):636]

The study on performance of electrospun polylactic-co-glycolic-acid/soluble eggshell membrane protein blend nanofibers film degradation *in vitro*

LIU Geng*, DUAN Yuan-yuan, JIA Jun, YAN Wei, JIN Hai-li

(* School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **AIM:** To study the structure and performance changes of electrospun polylactic-co-glycolic-acid (PLGA) /soluble eggshell (SEP) membrane protein nanofibers film degradation *in vitro*. **METHODS:** PLGA/SEP and PLGA nanofibers (control) membranes were prepared by electro spinning technology. The membranes were immersed in simulated body fluid solution (SBF) for degradation. Before and after degradation for 2, 4 and 6 weeks. The quality, fracture strength, surface morphology and thermal decomposition temperature of the two membranes were tested. **RESULTS:** The quality and fracture strength of the two membranes decreased with the extension of time and in the first two weeks decreased faster then slower in the following weeks. The weight loss and decreased percentage of fracture strength of PLGA/SEP membrane were significantly higher than those of PLGA membrane at all time points ($P < 0.05$). At the end of week 6 PLGA/SEP and PLGA nanofibers swelled and became adhesive, and the pore size was smaller. However, the structure of nanofibers was still complete and no breakage was identified. An endothermic peak was found in both membranes before and after degradation. The temperature of endothermic peak decreased with

收稿日期: 2011-06-13; 修回日期: 2011-08-10

基金项目: 国家自然科学基金(30800222)

作者简介: 刘更(1985-), 女, 汉族, 河北衡水人。硕士生(导师: 贾骏)

通讯作者: 贾骏, E-mail: jiajun@fmmu.edu.cn

the extension of degradation. **CONCLUSION:** The PLGA/SEP nanofiber membrane maintains certain mechanical strength and structure integrity after 6 weeks of degradation and can be used as a potential absorbable guided tissue re-generation membrane.

[Key words] electrospinning; poly-lactide-co-glycolide acid; soluble eggshell membrane protein; *in vitro* degradation; simulated body fluid solution

[Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2011, 21(11): 636]

牙周引导组织再生(guided tissue regeneration, GTR)是利用屏障膜材料的机械阻隔作用来隔绝牙龈上皮细胞及结缔组织长入缺损区,创造一个利于牙周韧带细胞迁移、分化、增殖的空间,重新形成牙骨质、牙槽骨的一种再生技术。在GTR术中膜材料最为关键,按其性质分为不可吸收性和可吸收性两种。不可吸收性膜需二次手术取出,会对牙龈组织造成损伤;而可吸收性膜由于能够自行降解,不需二次手术,是GTR膜开发、研究的方向。但可吸收性GTR膜在机体内由于发生水合作用、水解或酶解反应,使其形貌、结构、力学性能等发生改变,因此理想的可吸收性膜材料必须具备一定的空间维持能力,以及良好的生物相容性和合适的力学强度,而且降解速度应与组织愈合时间相平衡,降解产物在机体内无不良反应^[1]。

目前各种生物相容性良好的可降解高分子广泛应用于可吸收性GTR膜材料的研究,其中常用的聚乳酸-乙醇酸(poly-lactide-co-glycolide-acid, PLGA)虽然具有强度高^[2]、可降解、易加工成型、可纺性强等优点,但作为GTR膜材料,在生物相容性及生物活性方面同天然高分子还有一定差距,亲水性及对细胞的诱导性仍需进一步提高,而且容易在降解过程中引起局部pH值下降导致无菌性炎症^[3]。从鸡蛋壳膜中提取的可溶性蛋壳膜蛋白^[3](soluble eggshell membrane protein, SEP)虽然能够支持NIH3T3细胞的粘附、生长,且具有与I型胶原几乎相同的生物相容性^[4],但其可纺性差,无法单独电纺,而且纤维机械强度低,生物降解速度较快^[5]。鉴于以上原因,本研究采用静电纺丝技术将亲水性较好的SEP加入到机械性能较强的PLGA中共混电纺,制备PLGA·SEP纳米纤维膜,再根据可降解性GTR屏障膜必须在降解6周时保持有效性能^[6]的相关研究提示,观察其在模拟体液(SBF, pH=7.4)中降解6周时,其形貌、结构、力学强度变化是否在允许的范围内,为其作为GTR材料的后续应用研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

PLGA 相对分子量 1×10^5 , LA:GA = 80:20, 济南岱罡生物材料有限公司; SEP(按照文献^[3]从鸡蛋壳膜中提取); 六氟异丙醇(HFIP, Sigma公司, 美国); BGG40-2 高压直流电源(北京机电研究所 0~30 kV); 0.0001 精度电子天平(赛可隆公司, 中国); EZ Test 桌上型试验机(岛津公司, 日本); 扫描电镜(S-4800, 日立公司, 日本); DTA·TG 热重分析仪(STA 409, Netzsch公司, 德国)。

1.2 PLGA·SEP 纤维膜, PLGA 纤维膜的制备

根据对 PLGA 和 SEP 电纺实验的前期研究, 取 PLGA:SEP = 70:30(质量比)的共混物和纯 PLGA 分别溶于六氟异丙醇(HFIP)中, 形成质量分数为 12%(重量/v)的溶液作为电纺液, 在电压 17 kV, 接收距离 14 cm, 流速 0.4 mL/h 的工艺参数下电纺 5 h, 制备 PLGA-SEP 共混电纺纤维膜、PLGA 电纺纤维膜。

1.3 降解实验

将上述制备的 PLGA·SEP、PLGA 纤维膜真空干燥 24 h 后, 分别裁剪成 2 cm × 2 cm(用于质量测试、形貌观察和热重分析)、10 cm × 10 cm(用于断裂强度测试), 随机分为降解 0、2、4、6 周共 4 组, 每组 4 个样本。除 0 周组外, 其余各组均浸泡在 37 °C、pH = 7.4 的模拟体液中(simulated body fluid solution, SBF, 各种离子浓度见表 1), 并使纤维膜面积(cm^2): SBF 溶液体积(mL) = 1:2。每 3 d 换 1 次液, 以保证模拟体液的活性。

表 1 模拟体液与血浆中各种离子浓度比较 (mmol/L)

离子	血浆	模拟体液
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	103.0	147.8
HCO ₃ ⁻	27.0	4.2
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
pH	7.2~7.4	7.4

1.4 降解前后各指标测试

1.4.1 降解前后质量测量

用电子天平(1/10 000)分别测量降解前(0周组)和降解2、4、6周组各样本真空干燥后的质量,并按下列公式计算各组样本的失重率。

失重率 = $(m_0 - m_1) / m_0 \times 100\%$ (式中 m_0 为降解前的质量, m_1 为降解后的质量)

1.4.2 断裂强度测试

将降解前(0周组)和降解2、4、6周组各样本真空干燥后,裁剪成5 cm × 0.5 cm的标准试样,采用千分尺测量每个试样的厚度(每个试样随机测量20个点,取均值),然后将标准试样置EZ-test小型台式试验机的夹具上,试样两端用医用橡皮膏固定,保证夹距恒定为30 mm,以5 mm/min的速率测量各样本的断裂载荷(N),并用下列公式计算各组样本的断裂强度和断裂强度降低率。

断裂强度 = 断裂载荷(N) / 横截面积(mm²)

断裂强度降低率(%) = (降解前断裂强度 - 降解后断裂强度) / 降解前断裂强度 × 100%

1.4.3 纤维膜降解前后形貌

在质量测试后分别从降解0、2、4、6周各组中随机抽取2个样本,真空干燥后喷金,扫描电镜(SEM)观察各组降解前后PLGA·SEP和PLGA纤维膜的表面形貌。

1.4.4 降解前后DTA测试

取质量测量后各组剩余的2个样本,用DTA·TG热重分析仪在扫描范围10~500℃,升温速度20℃/min的条件下,测量各样本的热分解温度。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,两两比较用t检验,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 PLGA·SEP和PLGA电纺纤维膜降解前后质量变化(图1)

两种电纺纤维膜均随着降解时间的延长,失重率逐渐增加;降解两周时,失重最快,分别为13.84%和11.27%;而从2周到6周失重率增加的速度明显减慢;仅增加了9.3%和10.2%左右。在降解6周时PLGA·SEP、PLGA纤维膜仍保持降解前质量的76.86%、78.46%。在降解2、4、6周各时间点,PLGA·SEP纤维膜的失重率均高于PLGA纤维膜,差异有统计学意义(P<0.05)。

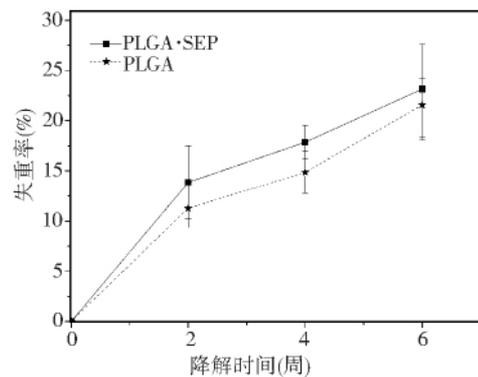


图1 PLGA·SEP和PLGA纤维膜失重率曲线

2.2 PLGA·SEP和PLGA电纺纤维膜降解前后断裂强度变化(表2)

两种纤维膜的断裂强度均随降解时间的延长而逐渐下降,降解两周时,下降较快,PLGA-SEP和PLGA纤维膜的断裂强度分别下降了38.79%和34.11%;两周后下降速度减慢,到6周时,两种纤维膜仍保持降解前断裂强度的46.48%、48.33%,分别为2.02 MPa、2.22 MPa。在降解2、4、6周时,PLGA-SEP纤维膜的断裂强度下降率均高于PLGA纤维膜,差异有统计学意义(P<0.05)。

表2 两种电纺纤维膜不同降解时间的断裂强度 (MPa $\bar{x} \pm s$)

降解时间 (周)	PLGA·SEP			PLGA		
	降解前	降解后	下降率(%)	降解前	降解后	下降率(%)
2	4.35 ± 1.12	2.61 ± 0.13	38.79 ± 2.93 ^A	4.32 ± 1.02	3.03 ± 0.14	34.11 ± 2.94 ^A
4	4.31 ± 1.07	2.40 ± 0.07	44.89 ± 1.76 ^B	4.30 ± 1.05	2.59 ± 0.17	43.64 ± 3.59 ^B
6	4.33 ± 1.10	2.02 ± 0.05	53.52 ± 1.20 ^C	4.29 ± 1.10	2.22 ± 0.08	51.67 ± 1.79 ^C

* 与PLGA相比P<0.05;不同字母为组内各时间点相比P<0.05

2.3 PLGA·SEP和PLGA电纺纤维膜降解前后形貌变化(图2)

扫描电镜观察可见:PLGA·SEP和PLGA两种电纺纤维膜在降解前均呈相互交联的多孔网状无

纺结构,纤维交错相叠、光滑均一,没有明显的珠状膨大结构或纤维粘连现象;降解2周时,纤维吸水溶胀,纤维直径变粗;降解6周时,纤维表面粗糙,纤维发生粘连,孔径变小,但没有出现断裂现象。

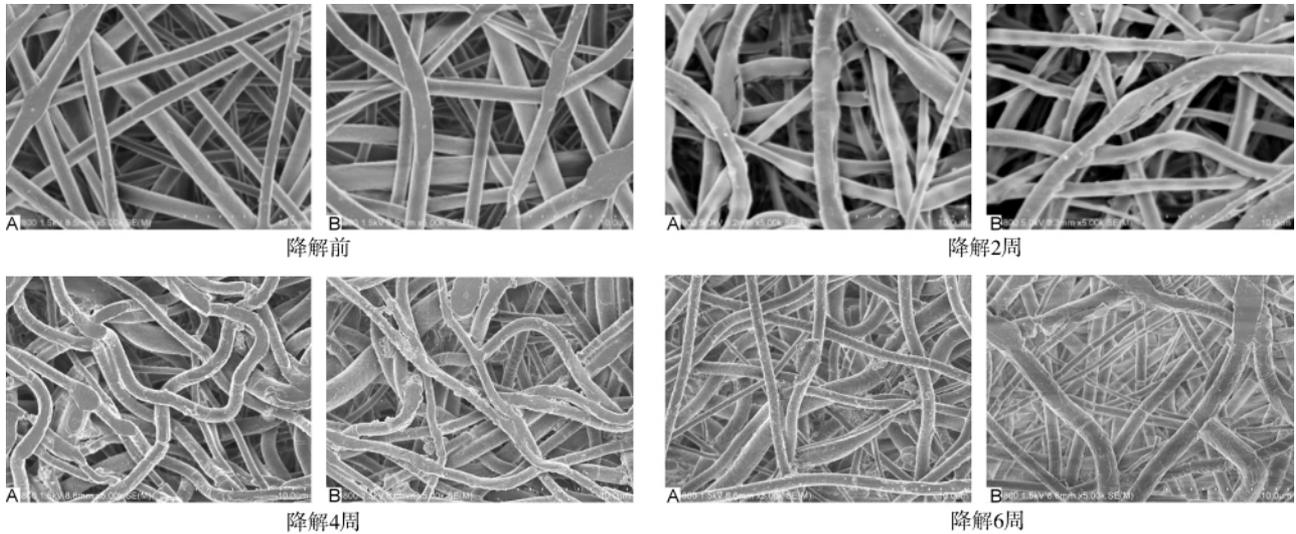


图2 PLGA·SEP和PLGA电纺纤维膜不同降解时期表面形貌($\times 5000$)(A为PLGA·SEP纤维膜,B为PLGA纤维膜)

2.4 PLGA·SEP和PLGA电纺纤维膜降解前后DTA分析(图3)

PLGA·SEP和PLGA纤维膜在降解前和降解不同时期都有一个吸热峰,这是纤维膜的分解吸热峰,并且随着降解时间的延长,纤维膜的热分解温度逐渐降低。无论在降解前(0周),还是降解2、4、6周,PLGA纤维膜的热分解温度均高于PLGA·SEP纤维膜,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

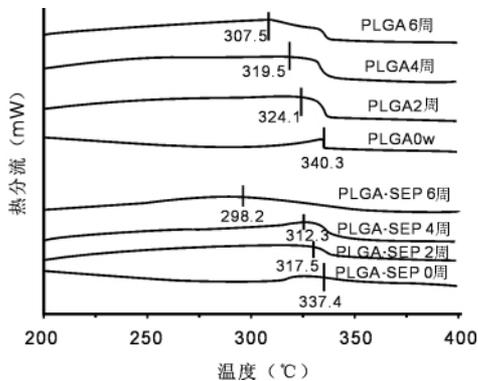


图3 PLGA·SEP和PLGA电纺纤维膜不同降解时期的DTA曲线

3 讨论

生物降解过程非常复杂,当水分进入聚合物本体后,可引起化学降解,产生齐聚物和小分子单体,同时聚合物本体形成孔洞,改变了聚合物的微观结构,最终由于齐聚物和单体的释放而使聚合物质量损失。另外,降解过程中还伴随着一些物理、化学变化,如分子量减小、机械强度下降等。

本研究中将电纺的PLGA·SEP混合纤维膜和

PLGA纤维膜(对照)浸泡于模拟体液(SBF)中,随着浸泡时间的延长,降解程度加深,部分降解产物溶于SBF中造成质量损失。在降解前2周,纤维膜质量损失最快,之后速度变慢。这是因为PLGA为聚酯高聚物,体外降解主要是通过酯键的水解进行的^[7-8],通过溶蚀作用,PLGA由不溶于水变成溶于水,整体结构逐渐被破坏,体积变小,最终降解生成二氧化碳和水。在降解过程中,分子链中酯键的水解、断裂是无规则的,每个酯键都可能被水解,在降解初期多为一些分子量较小的分子降解,产物的分子量较小使其易游离出聚合物基体,造成质量损失较快;随着降解的进行,分子量较大的分子缓慢降解,产物的分子量还未小到可以扩散到纤维外部,使得降解后期的失重率增加缓慢。在降解2、4、6周各周期,PLGA·SEP纤维膜的失重率、断裂强度降低率均高于PLGA纤维膜,说明纤维膜的降解速度与膜的亲水性有关,因为SEP为含有众多亲水基团的亲水性高分子,PLGA为不溶于水的高聚物,SEP的加入使得PLGA·SEP纤维膜的亲水性强于PLGA纤维膜,导致其降解速度快于PLGA纤维膜。PLGA·SEP和PLGA两种电纺纤维膜的分解热吸收峰值均呈降低趋势,这是因为在降解过程中,PLGA、SEP大分子链受到水分子作用被随机切断,分子链排列变得更加无序,分子间作用力减小,使其分解吸热温度逐渐降低。可降解材料随着降解时间的延长其力学性能必然下降,通过测量断裂强度可以掌握材料在一定时间内所保持的力学性能,以满足组织再生所需要的时间。在降解前2周,PLGA·SEP纤维膜和

PLGA 纤维膜断裂强度均快速下降,这是因为在降解初期水分进入纤维膜的孔隙使其吸水溶胀,破坏了纤维分子之间的作用力,导致断裂强度下降较快,但6周时,PLGA•SEP 纤维膜的断裂强度仍保持了46.48%,与PLGA 相近,且SEM 观察纤维膜结构仍保持完整。研究表明,牙周膜细胞(PDLs)在术后1~2周再生能力最强,第3周后再生能力减弱,而上皮组织增生发生在术后前2周,因此GTR 膜至少保持3~4周结构完整性^[9]。本研究制备的PLGA•SEP 电纺纳米纤维膜,在模拟体液中降解6周时仍保持结构完整和一定的力学强度,符合GTR 手术的要求,可作为一种可降解性GTR 膜材料。

本研究只是从失重率、力学性能、纤维形貌变化及DTA 测试观察了PLGA•SEP 纤维膜在体外降解过程中所发生的结构、性能变化,还不能完全说明其在体内的降解性以及对其组织愈合的影响,因此,PLGA•SEP 电纺纤维膜作为GTR 膜临床应用,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 周芝群. 可吸收性GTR 膜材料的研究现状与进展[J]. 中国口腔种植学杂志, 2002, 7(1): 42-45.
- [2] 李双燕. PLGA 组织工程支架材料的研究与展望[J]. 国外丝绸, 2009, 24(2): 29-31.
- [3] Yi F, Guo Z, Hu P, et al. Mimetics of eggshell membrane protein fibers by electrospinning [J]. *Macromol Rapid Comm*, 2004, 25(10): 1038-1043.
- [4] Lu J, Zhu Y, Guo Z, et al. Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide) [J]. *Polymer*, 2006, 47(23): 8026-8031.
- [5] Yi F, Guo ZX, Zhang LX, et al. Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility [J]. *Biomater*, 2004, 25(19): 4560-4591.
- [6] Christgau M, Schmalz G. Periodontal regeneration of intrabony defects with resorbable and non-resorbable membranes: 30-month results. [J]. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(1): 17-27.
- [7] Jong M, Kim K. Co-effect of aqueous solubility of drugs and glycolide monomer on *in vitro* release rates from poly(D,L-lactide-co-glycolide) discs and polymer degradation [J]. *Biomater Sci Pdy Ed*, 2005, 1(8): 87-102.
- [8] Duane T, Birnbaum L, Brannon P. Molecular weight distribution changes during degradation and release of PLGA nanoparticles containing epirubicin HCl. [J]. *J Biomater Sci Pdy Ed*, 2003, 14(1): 87-102.
- [9] Hosokawa R, Kikuzaki K, Kimoto T. Controlled local application of fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates the healing of GBR: an experimental study in beagle dogs. [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2000, 4(11): 345-353.

《牙体牙髓牙周病学杂志》征订

《牙体牙髓牙周病学杂志》(月刊)是国内唯一的口腔内科学专业杂志,由第四军医大学口腔医学院主办,为中国科技核心期刊,入选北京大学《中文核心期刊要目总览》。被美国化学文摘(CA)、美国《剑桥科学文摘(自然科学版)》(CSA)和波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、乌利希国际期刊指南(Ulrich's)等国际检索系统收录。

本刊设有口腔基础研究与临床研究论著、研究生学位论文、临床经验总结、短篇报道、病案报道、综述、讲座、医学与哲学、技术革新等栏目,内容包括龋病学、牙体修复学、牙髓病学、牙周病学以及儿童牙医学、老年牙医学、牙病预防学等许多领域。

订阅:全国各地邮局(所),邮发代号52-128(也可直接与本刊编辑部联系订阅,电话:029-84776082)

定价:每期8.00元,全年96.00元

欢迎投稿,欢迎垂询!

• 新书消息 •

《临床实用牙髓病学牙科最新进展》 主译:王英 主审:余擎,倪龙兴 86元/本
 《种植修复学临床操作指南》 主译:宋应亮,朱文忠 145元/本
 以上图书均为世界图书出版社出版

地址:陕西西安长乐西路145号第四军医大学口腔医学院《牙体牙髓牙周病学杂志》编辑部(710032)
 电话:029-84776082 传真:029-83224432