

表面微图案化聚乳酸膜的制备及其细胞亲和性评价*

田 冶^{1,2} 王迎军^{1,2} 周长忍^{3**} 曾庆慧³ 谭帼馨⁴

(¹华南理工大学生物医学工程研究院 广州 510641) (²华南理工大学材料科学与工程学院 广州 510641)

(³暨南大学材料科学与工程系 广州 510632) (⁴广东工业大学轻工化工学院 广州 510006)

摘 要 利用溶剂-非溶剂法(SNS)制备表面具有微孔图案的聚乳酸(PLA)膜和聚苯乙烯(PS)膜,并以微孔 PS 膜为模板,构建表面具有微岛图案的 PLA 膜. 以此为基础,对所制备的微图案表面对 PLA 膜亲/疏水性及成骨细胞粘附与增殖性能的影响进行研究. 结果显示微图案的存在显著增强了 PLA 膜的表面疏水性(水接触角 $>90^\circ$);成骨细胞在微图案表面具有良好的铺展性,其黏附数量明显高于光滑 PLA 膜,但细胞的生长曲线相对较平缓,显示微图案表面虽有利于细胞在 PLA 膜表面的粘附与铺展,但对促进细胞的增殖无贡献.

关键词 溶剂-非溶剂, 模板, 聚乳酸膜, 微图案表面, 细胞亲和性

细胞在生物材料上的粘附、增殖、分化行为主要发生在材料的表面. 因此材料表面的各种理化性质对材料的细胞相容性有较大的影响. 研究显示,具有一定拓扑结构的表面不仅能够促进细胞在材料上的黏附^[1~3],而且对细胞生长的形态和取向也会造成影响^[4,5]. 随着光刻蚀(lithography)技术的成熟发展,研究者们能够按照设计要求在石英和金属材料上构建具有不同微图案的表面,因此目前关于材料表面形貌对细胞行为影响的研究仍主要集中于以石英和金属材料为主的基底材料上^[6,7]. 而由于技术条件的限制,对于聚合物材料,特别是在以聚乳酸(PLA)为代表的常用生物材料表面构建微拓扑形貌,以探讨其对细胞行为影响的研究则较少.

目前比较常用的构建聚合物表面微图案的方法主要有软接触式光刻蚀技术(soft lithography)、自组装技术(self-assembly)等^[8~11]. 这些方法均能制备具有规则微结构的聚合物表面,但它们又都存在着各自的缺陷,应用并不广泛,例如软接触式光刻技术需要昂贵的设备,而自组装技术对于大部分的聚合物不适用. 相分离是聚合物存在的一种常见现象,基于相分离原理,Yang 等利用“溶剂-非溶剂”法(SNS),成功制备了表面具有规则微孔结构的聚合物膜^[10]. 此技术的优点是表面形成的微孔结构规则且孔径、孔间距可调,另外这种

技术简单,不需要昂贵的设备,不会引入有毒物质,并且适用于大多数聚合物.

本研究利用 SNS 法,通过控制溶剂挥发速率制备表面具有不同直径微孔结构的 PLA 膜和 PS 膜,并以 PS 微孔膜为模板,构建表面具有微岛结构的 PLA 膜. 以此为基础,考察了不同表面形貌对成骨细胞在 PLA 膜上的黏附与增殖行为的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

PLA($M_w = 100000$),山东医疗器械研究所;PS($M_w = 320000$),美国 Greiner 公司;乙腈,AR,天津化学试剂厂;丙三醇和四氢呋喃,AR,广州化学试剂厂;成骨细胞,暨南大学生物材料研究室提供.

CAM-PLUS 接触角测定仪,德国 TanteC 公司;XL-30ESEM 扫描电子显微镜,荷兰 Philips 公司;MK3 酶标仪,芬兰 Labsystems Mdtiskan 公司.

1.2 表面具有微孔和微岛图案 PLA 膜的制备

SNS 法制备 PLA 微孔膜是以四氢呋喃为溶剂,配制 15% 的 PLA 溶液. 吸取 1 mL 溶液,快速滴加到装有丙三醇的烧杯中,将烧杯置于真空或半密闭环境中,室温下使 PLA 溶液在丙三醇液面上挥发成膜,将膜放入烘箱中 50°C 继续挥发 24 h 后用大量清水浸泡清洗,真空干燥后放入干燥器中备用. PS 微孔膜模板的制备方法与上同.

* 2009-10-26 收稿,2010-01-06 修稿;国家自然科学基金(基金号 50732003,50830101,50803018)、中国博士后科学基金(基金号 20090450872)、中央高校基本科研业务费专项资金(基金号 x2cld2104390)和华工青年基金(基金号 e5090640)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail:terz9@jnu.edu.cn

模板法制备 PLA 微岛膜是以乙腈为溶剂,配制 10% 的 PLA 溶液,将溶液滴加到 PS 微孔膜表面并使其均匀平铺,使 PLA 溶液在 PS 膜表面缓慢挥发成膜.将膜放入烘箱中 50℃ 继续挥发 24 h 后,放入环己烷中反复浸泡以溶解去除 PS 模板,最后剩下的 PLA 膜分别用乙醇和大量清水浸泡清洗,真空干燥后放入干燥器中备用.

1.3 表面形貌观察

材料的表面形态采用扫描电镜 (SEM) 观察,加速电压为 20 kV (部分为 15 kV). 样品用导电胶固定于铜台上,喷金后进行观察.

1.4 亲/疏水性测定

材料表面的亲/疏水性通过水接触角的测定进行表征,在保持环境温度为 28℃,湿度为 65% 的条件下,以去离子水为介质,测定不同微图案 PLA 膜的表面接触角,每片材料分别测定 5 个数据点并取其平均值作为接触角数据.

1.5 细胞相容性评价

将 PLA 膜切割成直径为 4 mm 的小圆片,置于 96 孔细胞培养板中,在培养板中分别加入含有细胞的培养液 200 μL ,接种密度为 1.0×10^5 个/ mL . 将培养板置于 37℃、5% CO_2 和 100% 湿度的培养箱中培养 9 天.

细胞形态 SEM 观察采取培养 1 天的成骨细胞,吸去培养板中的培养基,用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗 3 次后,加入 2.5% 的戊二醛溶液,4℃ 固定过夜. SEM 观察前,吸去固定液,用 PBS 清洗膜片 3 次,再依次通过 30%、50%、70%、80%、90%、95% 的乙醇溶液对细胞进行梯度脱水处理,各浓度乙醇通过 2 次,每次 5 min,膜片自然干燥后喷金处理.

细胞生长曲线采用 MTT 法对细胞的生长曲线进行测定. 于 1、3、5、7、9 日各取一块培养板,吸净孔内的培养液,每孔加入 MTT 溶液 20 μL ,37℃ 继续孵育 4 h,中止培养,吸净孔内的 MTT 溶液,每孔加入 150 μL 的 DMSO,震荡 10 min,使甲瓚充分溶解. 选择 492 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度值,记录结果. 以时间为横坐标,光吸收值 (OD) 为纵坐标绘制细胞生长曲线.

2 结果与讨论

2.1 表面形貌观察

利用 SNS 法,通过控制成膜条件 (溶液浓度、非溶剂组成、溶剂挥发速率),可获得表面具有微

米级尺寸微孔图案的聚合物膜. 图 1 显示的是在半密闭和真空条件下所形成的 PS 膜 (图 1a, 1b) 及 PLA 膜 (图 1c, 1d) 的表面形貌. 由图可见,无论是 PS 还是 PLA,在真空条件下所形成的膜的微孔孔径极小 (约 1 μm),微孔分布均匀且分布密度较大;而在半密闭体系中所形成的微孔直径较大,约为真空条件时直径的 20 倍,微孔结构规则,分布均匀且紧密. Yang 等认为,聚合物的溶剂 (四氢呋喃) 和非溶剂 (丙三醇) 之间的扩散作用是微孔形成的动力,进入到溶液中的非溶剂随着溶剂的挥发逐渐汇集成微小的液滴,占据聚合物膜的表面,待溶剂完全挥发后,被非溶剂液滴所占据的聚合物贫相处形成膜的孔隙^[12]. 由以上原理可知,溶剂挥发速率的快慢对膜表面微孔孔径大小有着重要的影响. 在半密闭体系中,溶剂挥发较慢,大量的非溶剂能够扩散进入溶液中,并有较充裕的时间汇聚成较大的液滴,从而使形成的微孔孔径较大;在真空条件下,挥发速度加快,由于聚合物膜的快速固化,进入溶液中的非溶剂量较少,且没有足够的时间汇聚成较大的液滴,仍处于小液滴的分散形态,因此所形成的微孔孔径较小.

利用模板法可以有效的构建表面具有微凸结构的聚合物膜^[11]. 本研究以 SNS 技术所获得的多孔 PS 膜作为模板,将 PLA 溶液浇铸在其表面,待溶液自然挥发成膜后,除去模板即可获得表面具有微岛结构的 PLA 膜 (图 2). 由于所选用的模板分别为直径约 1 μm 和 20 μm 的多孔 PS 膜 (图 1a ~ b),因此对应所获得的微岛的直径分别为约 1 μm 和 20 μm ,结构均为较规则的半球形且在膜表面分布均匀.

2.2 表面形貌对 PLA 膜亲/疏水性的影响

除表面化学组成,材料表面的物理形貌对其表面亲/疏水性也会造成影响^[14]. 本研究利用水接触角法,以表面光滑的 PLA (smooth-PLA) 膜为对照,对以上制备的 4 种微图案 PLA 膜:20 μm 微孔 (PLA-20 μm -pits)、1 μm 微孔 (PLA-1 μm -pits)、20 μm 微岛 (PLA-20 μm -islands) 和 1 μm 微岛 (PLA-1 μm -islands) PLA 膜的表面亲/疏水性进行研究. 由图 3 可见,与光滑的 PLA 膜相比,具有不同表面微图案的 PLA 膜的疏水性均得到增强. 对于同种微结构 (微孔或微岛) 的 PLA 膜,随着直径增加,水接触角增大 (以微孔结构为例,具有 20 μm 微孔的 PLA 膜的水接触角为 104°,而 1 μm 微孔的 PLA 膜接触角仅为 96°);对于相同尺寸

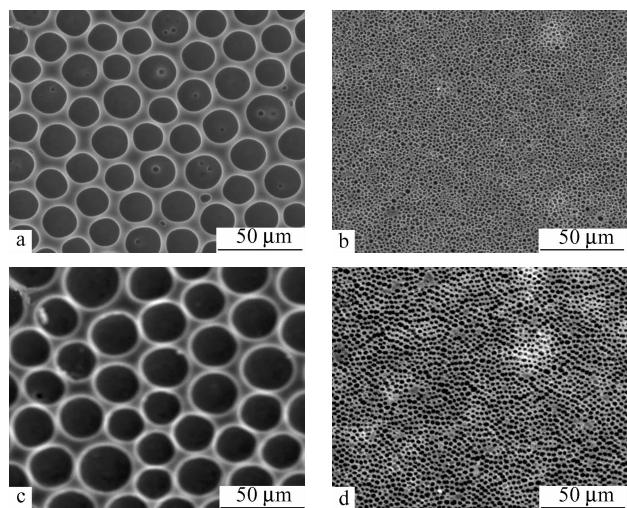


Fig. 1 SEM images of PS and PLA films with micro-pits patterned surfaces
PS: a) semi-closed condition; b) Vacuum condition; PLA: c) Semi-closed condition; d) Vacuum condition

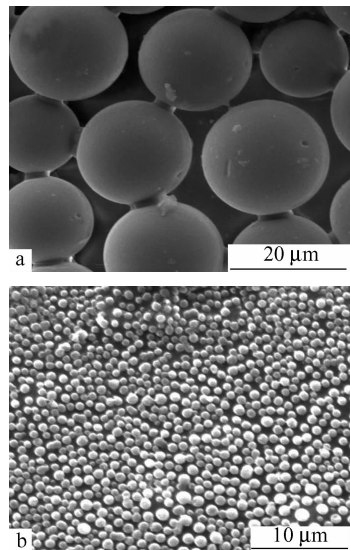


Fig. 2 Images of PLA film with micro-islands patterned surface
used 1 μm and 20 μm micro-pits PS films as templates

(1 μm 或 20 μm) 微结构, 具有微岛结构的 PLA 膜的疏水性要强于微孔结构的 PLA 膜. Cassie 认为对于粗糙的疏水表面, 液体实际只与表面局部接触, 液体与表面之间存在许多空气, 接触面实际是空气和固体物质组成的复合表面. 在本研究中, 当 PLA 膜为光滑表面时, 水滴与 PLA 膜完全接触; 而对于表面具有微图案的 PLA 膜, 水滴则由 PLA 和空隙间的空气所支撑. 接触角随着水滴与膜表面孔隙间空气的接触面积的增加而增大. 不论是微孔还是微岛结构, 直径越大, 单位面积所提供的水滴与空气相接触的区域也就越大; 同理, 对比相同直径不同形状的表面, 单位面积上微岛结构所提供的空气接触面要大于微孔结构, 因此其

水接触角较大.

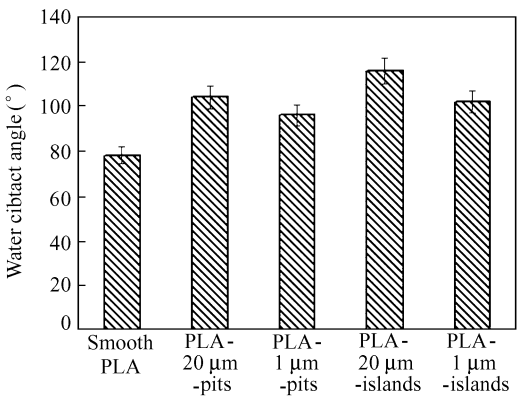


Fig. 3 The water contact angle on PLA film with different micro-patterned surfaces

2.3 细胞相容性评价

2.3.1 细胞形态的 SEM 观察 图 4 为成骨细胞在不同微图案 PLA 膜表面培养 1 天后的形态观察, 图右上角为细胞伪足的局部放大图. 由图可见, 在光滑 PLA 膜表面有梭形细胞黏附, 黏附的细胞有少量伪足伸出, 但细胞并未完全铺展开, 细胞为球形或半球形, 显示细胞在 PLA 上的铺展情况并不理想; 而在微图案表面有大量的细胞粘附, 细胞呈扁平状, 其铺展情况明显好于在光滑 PLA 膜上生长的细胞, 显示细胞在微孔及微岛结构表面均能够较充分的铺展, 虽然动物细胞都有贴壁的特性, 但对于不同尺寸(1 ~ 20 μm) 的微孔结构, 细胞均不会沿着孔壁长入孔内, 细胞的伪足伸出横跨越微孔, 使细胞沿着孔上方的表面生长; 同样的规律在不同尺寸(1 ~ 20 μm) 的微岛结构也

可见到. 细胞的伪足利用这些微孔或微岛作为固定点向四周伸展, 而光滑表面能够供细胞固定的

位点则较少, 因此具有微图案的表面有利于细胞的黏附与铺展.

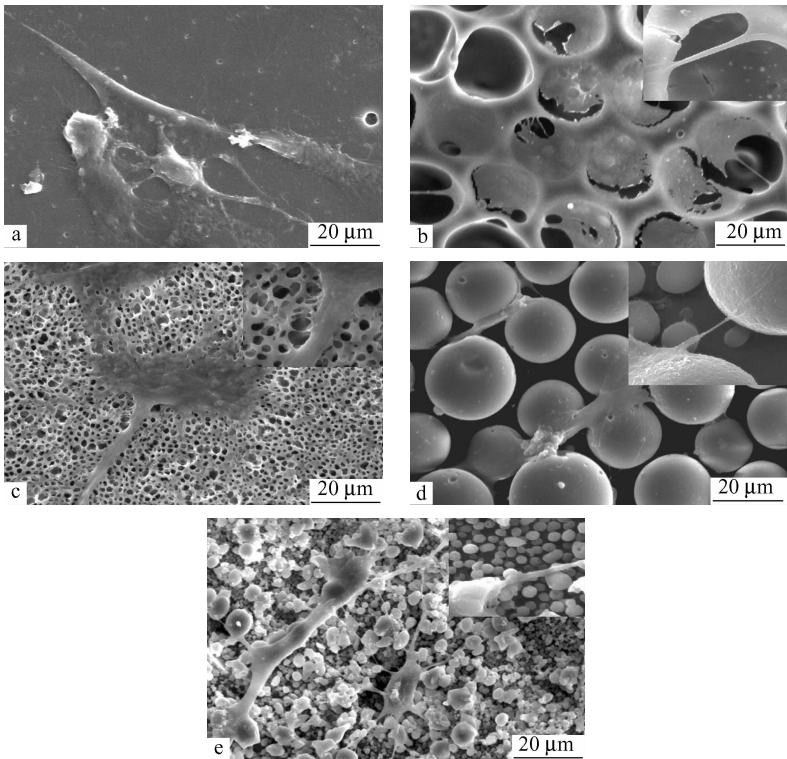


Fig. 4 Morphology of osteoblast cultured on different micro-patterned PLA film
a) Smooth PLA; b) PLA-20 μm -pits; c) PLA-1 μm -pits; d) PLA-20 μm -islands; e) PLA-1 μm -islands

2.3.2 细胞生长曲线的测定 图5显示的是成骨细胞在PLA膜上的生长曲线. 由图可见, 培养1天后, 在微图案PLA膜上生长的细胞数要明显多于在光滑PLA膜上生长的细胞数, 显示具有微形貌的表面有利于细胞的黏附, 这与图4的SEM观察结果相一致, 对于不同形貌的表面, 具有1 μm 微岛结构的表面最适于细胞伪足的固定, 因此细胞在此形态表面显示出最优异的黏附性能, 而20 μm 微孔图案的细胞黏附数量最少, 这可能与其在单位面积所能够提供的细胞固定位点较少有关; 培养5天后, 在各种形貌表面上细胞的生长速率开始变缓; 继续培养9天后, 以在具有1 μm 微岛结构PLA膜上的细胞数最多, 显示在此表面上的细胞生长状况最好. 对整条生长曲线的观察可见, 虽然具有微结构的表面能够促进细胞的黏附, 但细胞的生长趋势相对平缓, 尤其是表面具有20 μm 微孔结构的PLA膜, 显示具有微图案的表面对于PLA膜的细胞增殖性能改善的影响不大. 有研究认为, 微图案对细胞黏附与增殖的影响与细胞外基质蛋白的分泌有关, 在细胞生长初期, 微图案能够刺激细胞外基质蛋白的分泌, 但随

着培养时间的延长, 这种刺激作用会逐渐丧失^[15].

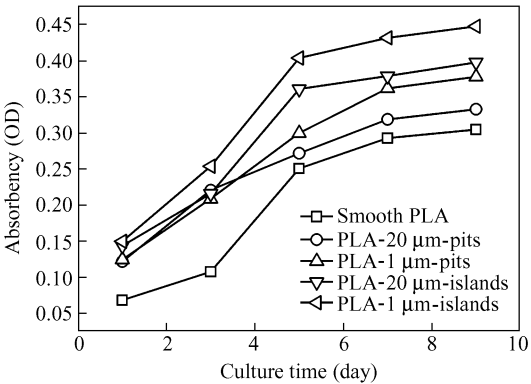


Fig. 5 Growth curve of osteoblast cultured on different micro-patterned PLA films

3 结论

利用SNS法构建的表面具有微图案的聚合物膜, 能够被有效的应用于图案化表面对细胞行为影响的研究中, 这对于制备具有良好生物相容性的生物材料表面, 构建理想结构的支架材料具

有重要的指导意义.但在目前研究中,利用 SNS 法所获得的微孔图案尺寸较大(微米级),分布较窄(几微米到几十微米).而目前,具有纳米尺度(小于 100 nm)图案化表面对细胞的影响是生物

材料领域研究的重点.本研究将进一步对 SNS 法制备微孔膜的成膜条件进行探讨,以期获得具有纳米尺寸微孔图案的聚合物膜,并对图案化表面对细胞行为影响的机理进行更深入的研究.

REFERENCES

- 1 Dalby M J, Childs S, Richle M O, Johnstone H J H, Affrossman S. *Biomaterials*, 2003, 24: 927 ~ 935
- 2 Liao H H, Anderson A S, Sutherland D, Petronis S, Kascemo B, Thomsen P. *Biomaterials*, 2003, 24: 649 ~ 654
- 3 Zhu X L, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorf J. *Biomaterials*, 2004, 25: 4087 ~ 4103
- 4 Sun J G, Tang J, Ding J D. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54: 3154 ~ 3159
- 5 Shen J Y, Chan-Park M B, Feng Z Q, Chan V, Feng Z W. *J Biomed Mater Res, Part B: Appl Biomater*, 2006, 77B: 423 ~ 430
- 6 Richter E, Fuhr G, Müller T, Shirley S, Rogaschewski S, Reimer K, Dell C. *J Mater Sci*, 1996, 7: 85 ~ 97
- 7 Chauvya P F, Hoffmann P, Landolt D. *Appl Surf Sci*, 2003, 211: 113 ~ 127
- 8 Vozzia G, Flaimb C, Ahluwalia A, Bhatia S. *Biomaterials*, 2003, 24: 2533 ~ 2540
- 9 Lee C J, Blumenkranz M S, Fishman H A, Bent S F. *Langmuir*, 2004, 20: 155 ~ 4161
- 10 Zhu H G, Ji J, Tan Q G, Barbosa M A, Shen J C. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 378 ~ 386
- 11 Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. *Curr Opin Colloid & Interface Sci*, 2001, 6: 3 ~ 10
- 12 Wang Y, Liu Z M, Han B X, Sun, Z Y, Zhang J L, Sun D H. *Adv Funct Mater*, 2005, 15: 655 ~ 663
- 13 Liu Bin(刘斌), Fu Yejing(傅叶勃), Ruan Weiqing(阮维青), He Yaning(和亚宁), Wang Xiaogong(王晓工). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2008, (2): 155 ~ 160
- 14 Nosonovsky M, Bhushan B. *Microsystem Technologies*, 2005, 11: 535 ~ 549
- 15 den Brader E T, de Ruijter J E, Simts H T J, Ginsel L A, von Recum A F, Jansen J A. *Biomaterials*, 1996, 17: 1093 ~ 1099

PREPARATION AND CELL AFFINITY EVALUATION OF POLYLACTIDE FILM WITH MICRO-PATTERNED SURFACE

TIAN Ye^{1,2}, WANG Yingjun^{1,2}, ZHOU Changren³, ZENG Qinghui³, TAN Guoxin⁴

(¹ Biomedical Engineering Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

(² School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

(³ Department of Materials Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)

(⁴ Institute of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract The polylactide (PLA) and polystyrene (PS) films with micro-patterned surfaces were prepared *via* solvent-non-solvent (SNS) method and mold method. Based on these prepared micro-patterned PLA films, the effect of surface structure on the wettability was evaluated by water contact angle measurement, and the cell's behaviors (including adhesion and proliferation) on PLA film were further discussed by scanning electron microscopy (SEM) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in this study. The results showed that a dense regular micro-pits structure with about 20 μm diameter could be got on the surface of PLA and PS films under semi-closed condition, and 1 μm under vacuum condition by SNS method. Using micro-pits patterned PS films as mold, the PLA films with about 20 μm and 1 μm micro-islands patterned surfaces could be achieved. The surface hydrophobicity of PLA films was enhanced because of the micro-patterned surface (water contact angle $> 90^\circ$). Osteoblast showed a better spread on the patterned surface and the amount of cells was higher than that on the smooth surface, but the cell growth curve was gently on the patterned surface, indicating that the micro-patterned surface benefited cell's adhesion, but contributed little for improving cell's proliferation.

Keywords Solvent-non-solvent, Mold, PLA film, Micro-patterned surface, Cell affinity