

聚己二酸丁二酯纳米纤维构建的微球的制备*

伊小琳¹ 袁茵¹ 石旭东¹ 蒋妮^{1**} 甘志华^{1,2**}

(¹中国科学院工程塑料重点实验室 中国科学院化学研究所 北京 100190)

(²有机无机复合材料国家重点实验室 北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)

摘要 建立了采用异相成核和可控水解相结合的方法制备由纳米纤维构建的聚合物微球的新方法. 根据多取代卟啉山梨醇(TM6)对聚己二酸丁二酯(PBA)的异相成核作用以及结晶形态的影响,采用两种乳液溶剂挥发法,并在聚合物溶液中加入成核剂 TM6 制备了 PBA 微球,研究了成核剂含量对 PBA 微球在酶促降解之后形态变化的影响. 研究表明,二次乳液溶剂挥发法可以制备具有多孔结构的 PBA 微球,这种多孔结构有利于酶溶液进入到微球内部,促进 PBA 微球的均匀水解,最终获得由 PBA 纳米纤维构建的微球. 当 TM6 的含量为 3 wt% 时,采用二次乳液溶剂挥发法制备的 PBA 微球,经过 5 h 酶促降解处理,可以得到表面和内部由 PBA 纳米纤维均匀组成的微球. 进一步的细胞实验表明,微球的纳米纤维结构,有利于 MG-63 细胞在聚合物微球上的黏附、铺展和向内生长.

关键词 聚合物微球, 纳米纤维, 异相成核, 酶促水解

自从 1993 年组织工程的概念提出以来^[1], 由于其能采用工程原理从细胞出发构建新的组织和器官,因而在再生医学领域中显示出重要的应用前景,近 30 年来这一领域的研究得到迅猛的发展. 组织工程的核心是特定细胞在基质材料上的黏附、生长与扩增. 因此,细胞外基质材料的设计与制备,对于调控细胞的生长行为、并引导细胞在基质材料上形成新的组织或器官至关重要^[2,3]. 理想的组织工程支架材料一般应具有良好的生物相容性、与细胞良好的相互作用、良好的生物降解性、良好的可塑性和一定的力学强度以及三维立体多孔结构^[4,5]. 从拓扑结构来看,高孔隙率和大比表面积是理想基质材料的基本要求,可以提供较大的表面积和空间,有利于细胞黏附生长、营养物质的输送、代谢产物排出以及新组织形成.

多孔支架材料和纳米纤维基质是两类典型的细胞外基质材料. 例如,采用盐析法^[6]或相分离法^[7]可以制备多孔支架材料,采用静电纺丝法^[8]可以制备纳米纤维基质. 研究表明,这两种基质材料提供的大比表面积有利于细胞的黏附与生长. 另一方面,聚合物微球与生物反应器结合,可以模

仿体内的微环境,有利于贴壁细胞的大量扩增和营养物质的传导,是目前受到广泛重视的一种细胞生长基质^[9]. 目前大量的研究集中在微球的表面修饰^[10]、拓扑结构的调控^[11]以及与细胞和药物复合功能化^[12]等方面. 我们的前期工作表明,从高分子链的化学结构出发,可以实现微球表面的生物功能化,并明显促进细胞的黏附与生长^[13,14]. 采用二次乳液溶剂挥发法制备的聚乳酸微球,进一步水解处理,可以得到不同多孔尺寸的聚乳酸微球,对生物矿化和细胞生长有很大影响^[15]. 考虑到聚合物微球和纳米纤维在细胞扩增和大比表面积方面各自的优点,本文提出制备由聚合物纳米纤维构建的微球,有望在大比表面积和营养物质输送方面显示出独特的优点.

通常人们首先制备聚合物纳米纤维,然后将这些纳米纤维整合成微球. 虽然制备聚合物纳米纤维已有静电纺丝的成熟方法,但如何将这些纳米纤维整理成数十到数百微米尺寸的微球形状,目前尚鲜见文献报道,因此,必须寻找其他方法. 我们在前期工作中发现^[16],具有多晶结构的生物降解聚己二酸丁酯(PBA)通过均相成核和异相成

* 庆祝王佛松院士 80 华诞专稿; 2013-01-22 收稿,2013-02-04 修稿;国家自然科学基金(基金号 51025314,50573085)、国家重点基础研究发展计划(973 计划,项目号 2012CB933800)和中国科学院战略性先导科技专项(项目号 XDA01030301)资助.

** 通讯联系人, E-mail: jiangni@iccas. ac. cn; zhgan@iccas. ac. cn

doi:10. 3724/SP. J. 1105. 2013. 13043

核方式结晶后表相出完全不同的结晶形貌. 通过均相成核方式结晶的 PBA, 尽管其晶体结构依赖于结晶温度, 但结晶形态均为球形形态. 而以多取代卞叉山梨 (TM6) 为异相成核剂, 当其含量超过 0.2 wt% 时, PBA 等温结晶不再形成球形形态, 偏光显微镜下显示出织状结构的形态, 进一步酶促降解后通过扫描电镜观察发现, PBA 为纳米纤维结构. 这是由于 TM6 的诱导成核作用, 导致 PBA 形成纳米纤维形态的晶体, 当酶促降解除去非晶相的 PBA 后, PBA 膜表现出纳米纤维结构的形貌. 这一结果给了我们一个启示, 可以通过控制聚合物晶体形态的方法, 并进一步通过可控水解, 就能得到特定形态结构的高分子材料.

因此, 本文报道了一个新方法, 采用异相成核控制聚合物结晶形态, 并结合可控水解的方法, 来制备聚合物纳米纤维微球.

1 实验部分

1.1 原料

聚己二酸丁酯 (PBA) 由北京化工研究院提供, 采用溶解沉淀法提纯, 先将 PBA 溶于氯仿, 然后在过量甲醇中沉淀, 真空干燥后使用. 采用凝胶渗透色谱仪 (GPC, Waters 公司) 表征其分子量, 以四氢呋喃为溶剂, 窄分布聚苯乙烯为标样, 测得 PBA 数均分子量及其分布分别为 80000 和 1.7. 成核剂多取代卞叉山梨醇 (TM6) 由中国科学院化学研究所李林课题组提供. 来自假单胞菌的脂肪酶 *Pseudomonas* sp. XIII 从 Sigma-Aldrich 购买, 直接使用.

1.2 聚合物微球的制备

采用一次乳液溶剂挥发法 (O/W) 和双乳液溶剂挥发法 ($W_1/O/W_2$) 制备聚合物微球. 一次乳液溶剂挥发法是配制含有成核剂 TM6 (含量分别为 0 wt%, 0.1 wt%, 1 wt%, 3 wt%) 的 PBA 氯仿溶液 (31.25 mg/mL) 作为油相 (O), 缓慢滴加到含有 0.25% PVA 水溶液 (W) 中形成 O/W 乳液. 室温下以 400 r/min 搅拌速率机械搅拌 4 h, 洗涤微球, 冷冻干燥.

双乳液溶剂挥发法是将配制的 PBA 氯仿溶液 (31.25 mg/mL) (油相 O) 置于细胞超声波粉碎机 (JY92-2D, 宁波新芝生物科技股份有限公司) 中进行超声分散, 超声过程中向其中加入内水相, 即含有碳酸氢铵的 0.1% PVA 水溶液, 形成 W_1/O 初乳液. 将其逐渐滴加至含有 0.25% PVA 水溶

液 (W_2) 中再次乳化, 形成 $W_1/O/W_2$ 复乳液. 室温下以 400 r/min 搅拌速率机械搅拌 4 h, 之后洗涤微球, 并冷冻干燥.

1.3 聚合物微球的酶促水解

取一定量上述微球, 置于 850 μ L 磷酸缓冲溶液中, 注入 150 μ L 浓度为 1 mg/mL 的脂肪酶磷酸缓冲溶液, 进行酶促降解实验. 每 3 h 更换脂肪酶和缓冲溶液. 一定时间后, 移去缓冲溶液, 将降解后的微球用二次蒸馏水清洗数次, 真空冷冻干燥.

1.4 聚合物微球形貌观察

降解前后的聚合物微球的表面形貌采用扫描电镜 (SEM, 型号为 HITACHI S-530 型) 来观察. 将冷冻干燥之后的聚合物微球用双面胶固定在样品台上, 喷金后观察. 为观察聚合物微球的内部形貌, 将聚合物微球在液氮中淬冷后, 用刀片将微球剖开, 之后将微球剖面朝上固定在样品台上, 喷金后观察断面形貌.

1.5 聚合物微球的细胞培养实验

将聚合物微球置于玻璃瓶中, 以钴 60 为辐射源, 室温下 24 kGy 消毒 8 h. 实验所用的细胞为人成骨肉瘤细胞 (MG-63, 由中国科学院大学丁文军课题组提供). 首先将细胞在二氧化碳培养箱中于 75 cm^2 的培养瓶中培养 2~3 天, 当细胞扩增至培养瓶面积的 95% 时, 将培养瓶从培养箱中取出, 弃去培养液, 用磷酸盐缓冲溶液冲洗除去残存培养液, 以 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 溶液将细胞消化下来, 然后重新用培养液分散得到细胞悬液. 将一定量消毒后的聚合物微球置于 24 孔板, 向每一个培养孔内加入 2 mL 细胞浓度为 $3 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 在 37 $^\circ\text{C}$ 和 5% CO_2 气氛中进行培养. 每 12 h 更换一次培养液. 当细胞在聚合物微球上培养一定时间后, 用移液枪取出少量微球, 用磷酸盐缓冲溶液冲洗 2 次后, 用 2% 戊二醛固定细胞 30 min, 之后梯度酒精脱水, 最后冷冻干燥. 将这些聚合物微球固定在样品台上喷金, 用扫描电镜观察细胞的形貌.

1.6 聚合物膜的制备及酶促降解实验

PBA 膜样品通过熔融压膜法制备, 以厚度为 0.15 mm 的聚四氟乙烯膜为模具, 置于另外 2 片聚四氟乙烯膜之间, 将 PBA 均匀置于模具孔之中, 在 80 $^\circ\text{C}$ 的压片机上, 以 200 kg/cm^2 压力熔融压膜, 保压 4 min 后分别于 25, 29 和 35 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴中等温结晶. 将等温结晶后的薄膜分割为

10 mm × 10 mm × 0.15 mm 小片,用于酶促降解实验.

将 PBA 薄膜置于 1 mL 的磷酸缓冲溶液中 (0.1 mol/L, pH = 7.4), 注入 30 μ L 脂肪酶的磷酸缓冲溶液 (浓度为 1 mg/mL), 开始酶促降解实验. 每 3 h 更换酶溶液. 降解一定时间后的 PBA 膜用二次蒸馏水清洗 3 次, 真空冷冻干燥后, 用于扫描电镜观测.

2 结果与讨论

2.1 异相成核对 PBA 膜结晶形态的影响

图 1 为加入不同含量异相成核剂 TM6 的 PBA 在不同温度下等温结晶之后的形态. 可以发现, 当未加入 TM6 时, PBA 均形成球晶形态. 在

25 $^{\circ}$ C 等温结晶时 PBA 形成 β 晶型的球晶, 由于较高过冷度和较快成核速率导致球晶尺寸较小; 在 35 $^{\circ}$ C 等温结晶时形成 α 晶型, 但因其过冷度小难成核所以球晶尺寸较大; 而在中间温度 31 $^{\circ}$ C 等温结晶时形成 α 与 β 晶型的混合体^[14].

当加入成核剂 TM6 后, PBA 的结晶形貌不再取决于结晶温度. 我们发现, 当 TM6 含量较少时 (如 0.1 wt%), PBA 依然形成球晶, 但受到成核剂的影响, 球晶尺寸均比相应温度下均相成核形成的球晶的尺寸小. 当 TM6 含量增大至 1 wt% 时, PBA 不再形成球晶, 而是形成织状结构的形态, 且这种织状结构的形态与结晶温度无关, 说明当成核剂含量达到一定程度后, 成核剂是决定 PBA 晶体形貌的唯一因素.

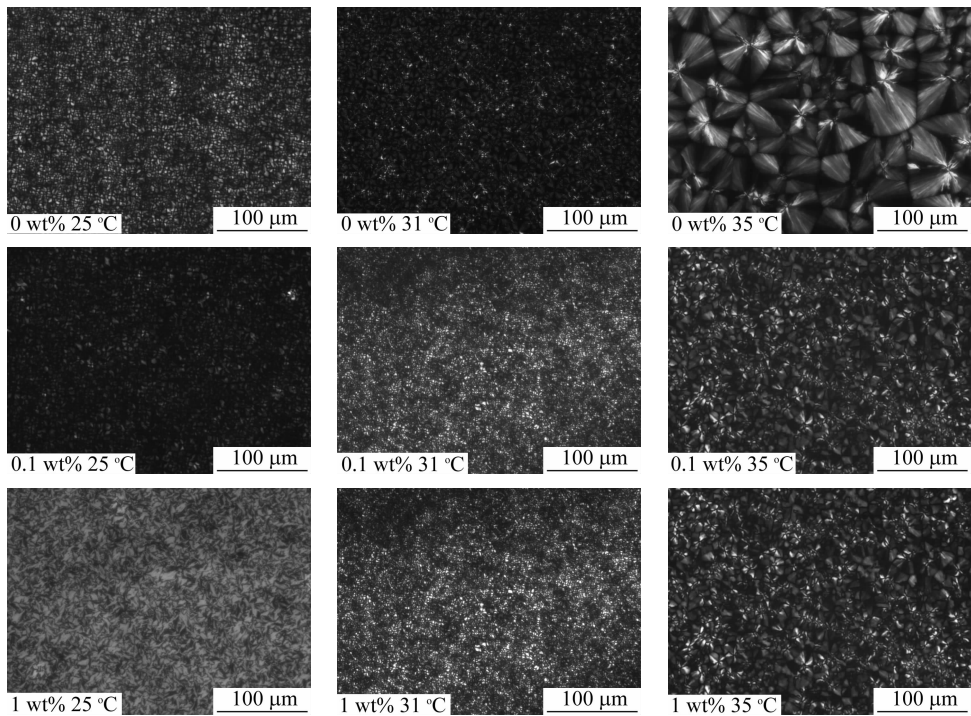


Fig. 1 Polarized optical micrographs of PBA films containing different TM6 amounts after melt-crystallization at different temperatures

图 2 为不同成核剂含量的 PBA 膜在酶溶液中降解 3 h 后的 SEM 结果. 由于聚合物在晶区的降解速率低于在非晶区的降解速率, 因此未添加成核剂的纯 PBA 膜在降解后表现出明显的球晶形貌. 当含有 0.1 wt% TM6 的 PBA 膜虽然存在异相成核作用, 但降解之后依然表现出球晶的形貌, 只是球晶尺寸明显低于相应的纯 PBA 的球晶尺寸. 当成核剂含量达到 1 wt% 时, PBA 在不同温度下等温结晶后再降解已不再呈现球晶形貌, 而是相互贯穿的纳米纤维状的网络结构. 因此, 异相成

核对 PBA 结晶形貌的影响远大于结晶温度, 这也给了我们一个启示, 可以通过异相成核并结合可控水解来制备纳米纤维状的网络结构.

2.2 纳米纤维结构的 PBA 微球的制备

图 3 为采用一次乳液溶剂挥发法制备、未加入成核剂的 PBA 微球经过酶促降解处理之后表面形貌的变化. 结果表明, 虽然不同的酶浓度会导致降解速度的差异, 但酶促降解对于微球的晶区和非晶区的降解作用均很明显, 可以清楚地观察到捆束状、以及通过均相成核机理形成的球晶形貌.

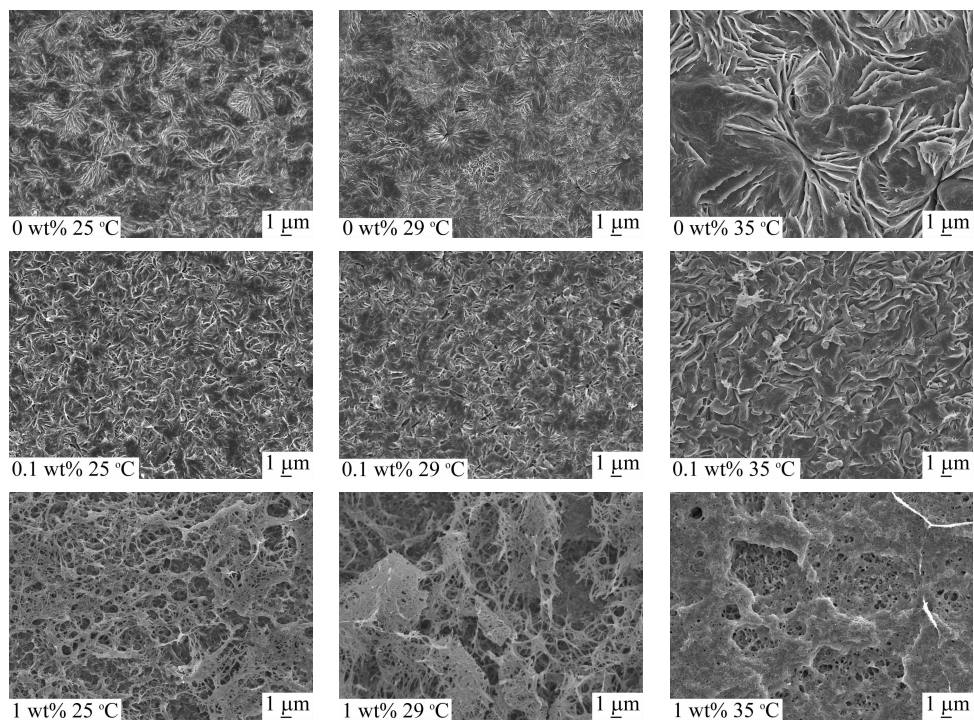


Fig. 2 SEM images of PBA films containing different TM6 amounts after enzymatic degradation for 3 h

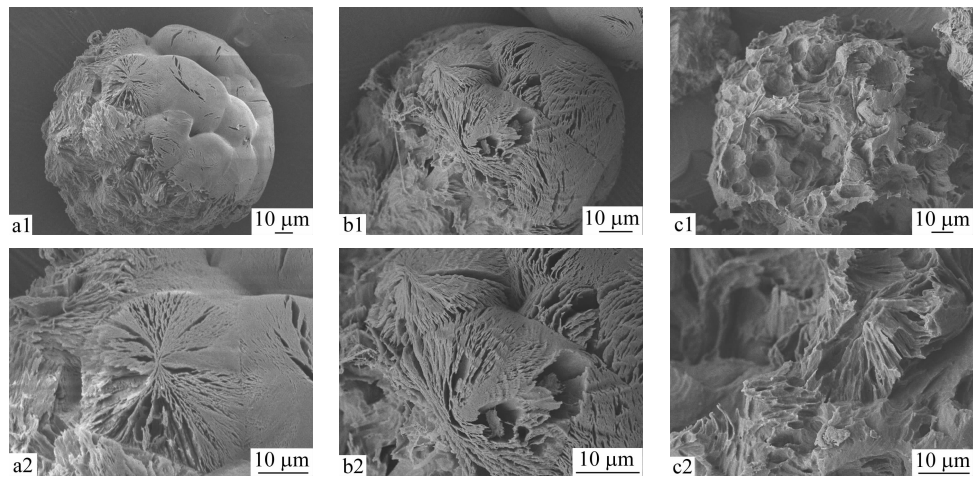


Fig. 3 SEM images of PBA microspheres after 6h enzymatic degradation in buffer solution with different lipase concentrations: (a) 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (b) 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and (c) 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (The images of a2, b2 and c2 are the enlarged images of a1, b1 and c1, respectively.)

图 4 为为采用一次乳液溶剂挥发法制备、加入不同含量成核剂的 PBA 微球经过酶促降解处理之后表面形貌的变化. 当 TM6 含量较小时 (0.1 wt%), 在微球中仍可看到明显的球晶形貌, 但此时的球晶不再是捆束状球晶, 而是由以成核剂为中心生长的片晶构成的球晶形貌. 当 TM6 含量增大至 1 wt% 或者更高时, PBA 微球酶促降解之后不再呈现出球晶形貌, 而是形成网络状结构. 但是

这样的网络状结构并没有显示出明显分离的纳米纤维结构. 这可能是由于采用一次乳液溶剂挥发法制备的 PBA 微球具有较为致密的结构, 酶溶液比较难以进入到微球的内部, 从而不能从外到内充分降解 PBA 微球. 为解决这一问题, 我们采用二次乳液溶剂挥发法制备 PBA 微球, 在复乳液中的第一水相中加入发泡剂碳酸氢铵, 以期获得具有孔洞结构的微球.

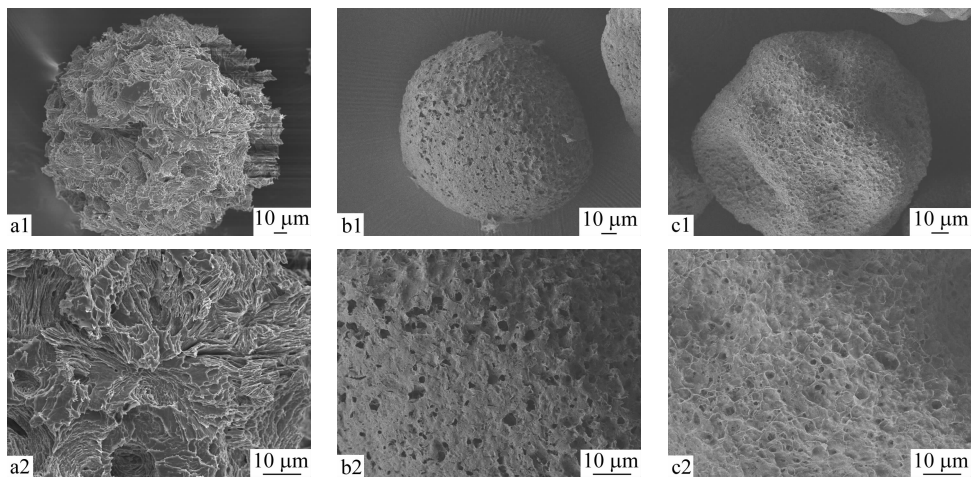


Fig. 4 SEM images of PBA microspheres containing different TM6 amounts after enzymatic degradation in lipase buffer solution (0.15 mg/mL) for 3 h: (a) TM6 content 0.1 wt% , (b) TM6 content 1 wt% and (c) TM6 content 3 wt% (The images of a2, b2 and c2 are the enlarged images of a1, b1 and c1, respectively.)

图 5 为采用不同方法制备的含有 3 wt% 成核剂的 PBA 微球的表面形貌. 我们发现,由一次乳液溶剂挥发法制备的 PBA 微球的结构较为致密,而采用二次乳液溶剂挥发法可以有效改善这一情

况,得到表面具有明显孔洞状结构的微球. 这样的孔洞结构有利于脂肪酶溶液进入到微球的内部,有利于 PBA 微球的均匀降解,从而最终得到 PBA 纳米纤维构建的网络状结构的微球.

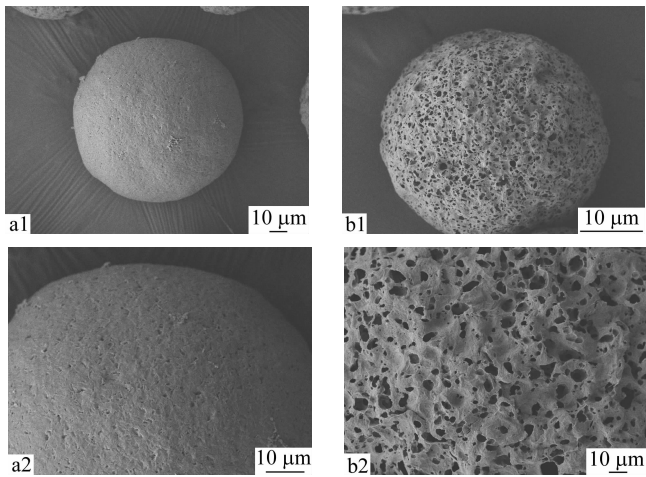


Fig. 5 SEM images of PBA microspheres fabricated by different methods: (a) single emulsion solvent evaporation method and (b) double emulsion solvent evaporation method (The content of TM6 is 3 wt% ; The images of a2 and b2 are the enlarged images of a1 and b1, respectively.)

图 6 为采用二次乳液溶剂挥发法制备、加入 3 wt% 成核剂的 PBA 微球经过酶促降解处理之后的表面和内部形貌. 结果表明,经过 5 h 的酶促降解处理,PBA 微球依然很好地保持了微球的形状(图 6(a1)),放大的图像表明,PBA 微球表面是由尺寸均匀的纳米纤维组成的. 更重要的是,微球的内部剖面也是纳米纤维结构(见图 6(b2)). 这一结果表明,当成核剂 TM6 含量足够高诱导 PBA 异相成核结晶后,PBA 微球不再是球晶结构,而

是由纤维状的晶体结构组成的. 当采用二次乳液溶剂挥发法来制备微球时,酶溶液可以进入到多孔的 PBA 微球内部,促进了 PBA 链在微球表面和内部的非晶区部分的快速水解,从而得到由 PBA 纳米纤维均匀组成的微球.

2.3 细胞在纳米纤维微球上的生长行为

图 7 为 MG-63 细胞在 PBA 纳米纤维的微球上培养 1 h 后的生长形态图. 可以发现,微球中的纳米纤维表现出很好的界面性质,细胞紧密贴附

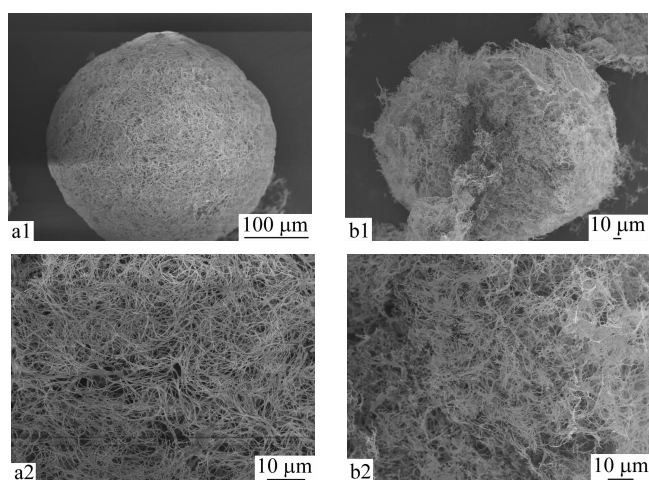


Fig. 6 SEM images of the surface (a) and cross-section (b) of PBA microspheres fabricated by W/O/W method after enzymatic degradation for 5 h (The content of TM6 is 1 wt%. The concentration of lipase in buffer solution is 0.15 mg/mL. The images of a2 and b2 are the enlarged images of a1 and b1, respectively.)

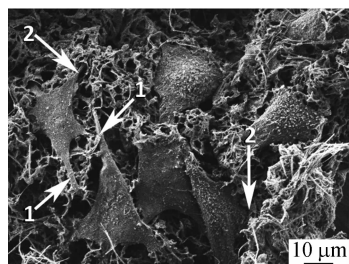


Fig. 7 SEM images of MG-63 cells on PBA nanofibrous microspheres

在纳米纤维表面,并向四周铺展.细胞向外铺展的伪足(如图中箭头1所示)进一步说明了这种纳米纤维结构有利于细胞的黏附与生长.进一步的观察还可以发现,细胞还向微球的内部生长(如图中箭头2所示),说明这种微球中的纳米纤维结构,有利于营养物质的输送,并促进细胞在微球表面和内部的三维生长,这一点对于细胞的大规

模扩增和细胞活性的保持是非常重要的.

上述研究结果也从另一个侧面说明微球中的成核剂 TM6 没有影响细胞的相容性,但它通过改变 PBA 微球的拓扑结构可以促进细胞在微球中纳米纤维表面上的生长行为.

3 结论

采用异相成核和可控水解相结合的方法可以制备由 PBA 纳米纤维构建的微球.采用二次乳液溶剂挥发法,并在聚合物溶液中加入成核剂 TM6 制备的 PBA 微球,具有多孔结构的特征,有利于酶溶液进入到微球内部,促进 PBA 微球的均匀水解,从而获得由 PBA 纳米纤维构建的微球.聚合物微球的纳米纤维结构,有助于 MG-63 细胞的黏附、铺展和向内生长,在细胞的大规模扩增方面显示了重要的应用前景.

REFERENCES

- 1 Langer R, Vacanti J P. Science, 1993, 260: 920 ~ 926
- 2 Tian Zhi(田治), Wang Yingjun(王迎军), Zhou Changren(周长忍), Zeng Qinghui(曾庆慧), Tan Guoxin(谭帼馨). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2010, (10): 1170 ~ 1174
- 3 Chen Da(陈达), Chen Jian(计剑), Shen Jiacong(沈家骢). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2004, (6): 826 ~ 830
- 4 Pachence J M, Kohn J. In Principles of Tissue Engineering. San Diego: Academic Press, 1997. 273 ~ 293
- 5 Liu X H, Holzwarth J M, Ma P X. Macromol Bios, 2012, 12: 911 ~ 919
- 6 Finne-Wistrand A, Albertsson A C, Kwon O H, Kawazoe N, Chen G, Kang I K, Hasuda H, Gong J, Ito Y. Macromol Bios, 2008, 8: 951 ~ 959
- 7 Bailey B M, Fei R C, Munoz-Pinto Dany, Hahn M S, Grunlan M A. Acta Biomater, 2012, 8: 4324 ~ 4333
- 8 Chen J L, Chu B, Hsiao B S. J Biomed Mater Res Part A, 2006, 79A: 307 ~ 317
- 9 Malda J, Frondoza C G. Trends in Biotechnology, 2006, 24: 299 ~ 304
- 10 Shi Xudong(石旭东), Zhang Yu(张玉), Yu Guoqiang(于国强), Gan Zhihua(甘志华). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2012,

(10);1157 ~ 1163

11 Shi X D, Jiang J, Zhang X, Ding W J, Gan Z H. *Macromol Bios*, 2009, 9:1211 ~ 1218

12 Zhang Y, Sun L, Jiang J, Zhang X, Ding W J, Gan Z H. *Polym Degrad Stab*, 2010, 95:1356 ~ 1364

13 Yu G, Zhang Y, Shi X, Li Z, Gan Z. *J Biomed Mater Res Part A*, 2008, 84A:926 ~ 939

14 Yu Guoqiang(于国强), Shi Xudong(石旭东), Gan Zhihua(甘志华). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2006, (5):740 ~ 744

15 Shi X D, Jiang J, Sun L, Gan Z H. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 85:73 ~ 80

16 Jiang N, Zhao L F, Gan Z H. *Polym Degrad Stab*, 2010, 95:1045 ~ 1053

17 Gan Z H, Abe H, Doi Y. *Macromol Chem Phys*, 2002, 203:2369 ~ 2674

FABRICATION OF POLY(BUTYLENE ADIPATE)
NANOFIBEROUS MICROSPHERES

Xiao-lin Yi¹, Yin Yuan¹, Xu-dong Shi¹, Ni Jiang¹, Zhi-hua Gan^{1,2}
(¹ CAS Key Laboratory of Engineering Plastics, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)
(² State Key Laboratory of Organic-Inorganic Composites, College of Life Science and Technology,
Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract A new method was developed to fabricate polymeric microspheres which were composed of homogeneous nanofibers by means of the combination of heterogeneous nucleation and controlled hydrolysis. According to the role of heterogeneous nucleation of multimethyl-benzilidene sorbitol (TM6) and its influences on the crystalline morphology of poly(butylene adipate) (PBA), the PBA microspheres were first fabricated by means of single emulsion solvent evaporation (O/W) or double emulsion solvent evaporation (W/O/W), and then the influences of the nucleating agent TM6 on the morphological change of microspheres in the course of enzymatic degradation were studied. The results indicated that the PBA microspheres with porous structure were fabricated *via* the W/O/W method. The porous structure of microspheres is favorable for the diffusion of lipase buffer solution into the porous inner of microspheres, leading to the homogenous hydrolysis of PBA chains in microspheres, and finally resulting in the microspheres with nanofibrous structures. By means of W/O/W method, the PBA microspheres with homogeneous nanofibers in whole microspheres were fabricated when 3 wt% TM6 was added in PBA solution and the microspheres were degraded in lipase buffer solution for 5 h. The cell experiments revealed that the nanofibrous structure can greatly improve the adhesion, spread and in-growth of MG-63 cells on microspheres. These microspheres composed of nanofibers show great potentials for large-scaled cell proliferation in bioreactors.

Keywords Polymeric microspheres, Nanofibers, Heterogeneous nucleation, Enzymatic degradation