分 类 号：E318.08　　单位代码：10183
研究生学号：2011731057　　密　　级：公开

吉林大学
博士学位论文

唐宇锋

2014年6月

熔融离心纺丝聚乳酸纤维复合明胶支架的制备及骨组织工程中的应用

A cotton-like nonwoven melt spinning PLA fiber/gelatin scafford for tissue engineering

作者姓名：唐宇锋

专业名称：外科学

指导教师：刘建国 教授

章培标 研究员

学位类别：医学博士

论文答辩日期：2014年 5月 30日

授予学位日期：　　年　　月　　日

答辩委员会主席：路来金

论 文 评 阅 人：吴松、朱悦、吕德成、白希壮、毕郑刚。

前　　言

利用骨组织工程技术治疗临床中经久不愈的大段骨缺损是临床医生和科研人员的一大愿景，长期以来受到广泛关注和深入研究。目前，骨组织工程的三个主要研究方面：种子细胞、生长因子以及组织工程支架材料，其中作为种子细胞和或生长因子的载体、提供足够力学强度以及支持组织长入的组织工程支架材料，其制备以及改性等构建方法是骨组织工程技术的核心。

生物可降解高分子因其具有良好的生物相容性、无致癌性和无变态反应、较好的机械性能和耐久性以及可降解性等多种优点，在组织工程中应用十分广泛，并被公认为是骨缺损修复良好的替代材料。但目前利用生物可降解高分子材料制备的骨组织工程三维支架仍然存在一定局限，主要在于难以很好的模拟或者再现细胞外基质（ECM）的结构和活性。

本研究首先通过一种新型的熔融离心纺丝方法，制备得到棉花样的聚乳酸纤维，然后采用有机溶剂气体表面粘连方法将该种纤维制备成为新型的纤维组织工程支架，并利用不同浓度明胶对支架进行表面涂覆修饰，以期获得新型的类细胞外基质支架。

首先，明确熔融离心纺丝方法制备聚乳酸无纺纤维所需的适宜条件即温度和转速，接下来对不同原材料和转速所制备的聚乳酸纤维进行扫描电镜、直径分布、力学强度、热力学性质、结晶度以及初步的体外生物相容性和功能分析；然后，明确三氯甲烷气体表面粘连方法制备单纯聚乳酸纤维支架的所需的适宜条件即粘联时间，接下来对不同密度纤维制备的支架进行力学强度、孔隙率、扫描电镜、初步的体外生物相容性和功能分析，并通过明胶表面涂覆方法对单纯聚乳酸纤维支架进行改性修饰，对改性修饰后支架进行扫描电镜和体外矿化能力研究；最后，利用制备所得的聚乳酸纤维/明胶复合支架进行兔桡骨缺损修复实验。通过上述研究，对新型的熔融离心纺丝方法制备聚乳酸无纺纤维及支架应用于临床提供依据，期望开发出结构和活性更加接近细胞外基质的骨组织工程材料。

中文摘要

熔融离心纺丝聚乳酸纤维复合明胶支架的制备及骨组织工程中的应用

长期以来，生物可降解高分子材料应用于骨组织工程一直是组织修复的热点，多种高分子材料组织工程支架材料被不断开发出来。在组织工程支架材料设计与制备中，良好的孔隙结构对骨修复效果十分重要，研究证明：一方面，在多孔材料中可见新生骨形成而在无孔粒子材料中未见骨形成[1]；一方面，当孔隙率和孔隙结构在一定范围内增加时对细胞增殖、粘附、长入以及支架血管化有着显著地促进作用[2-5]。目前，多孔的生物可降解高分子组织工程支架因其具有可控的孔隙率和孔径、良好的力学强度和加工性能等优点，已经成为组织工程支架研究的主流。但目前以传统粒子沥滤支架为代表的海绵状多孔支架仍存在一些缺点，如孔隙之间连通不佳，易于出现闭孔和微孔连接等，在一定程度上限制了组织长入和营养物质交换，不利于骨组织修复。而纤维性多孔支架虽然解决了海绵状多孔支架的孔隙间连通性问题，但却存在其他不足，具体来说：以静电纺丝纤维毡为代表的纳米级纤维支架，其具有良好的抗菌性、可控性和利于细胞增殖和分化等优点，但无法提供足够的厚度以及利于细胞长入的孔隙直径，难以满足治疗大段骨缺损的需求；以快速成型法为代表制备的微米级纤维支架，虽然解决了静电纺丝纤维毡的厚度和孔隙直径问题，但由于缺乏纳米级和亚纳米级纤维结构，对细胞功能的促进作用不甚理想。为此，本研究采用一种新型的熔融离心纺丝方法，制备得到棉花样、直径分布广泛（100nm-40μm）的聚乳酸无纺纤维，并采用有机溶剂气体表面粘连方法将该种纤维制备成为新型的纤维组织工程支架，以期克服传统海绵状多孔支架和纤维性支架的局限。然后利用明胶表面涂覆的方法对新型纤维支架进行修饰，使其从结构和生物活性上均更加接近天然细胞外基质，从而获得更加智能化的组织工程支架。

首先，明确熔融离心纺丝方法制备聚乳酸纤维所需的适宜条件即温度和转速，接下来对不同原材料和转速所制备的聚乳酸无纺纤维进行扫描电镜、直径分布、力学强度、热力学性质、结晶度以及初步的体外生物相容性和功能分析；然后，明确有机溶剂气体表面粘连方法制备聚乳酸纤维支架的所需的适宜条件即粘联作用时间和所需纤维的最佳密度，然后对不同密度纤维制备的单纯聚乳酸纤维组织工程支架进行力学性能、孔隙

率、扫描电镜、初步的体外生物相容性和功能分析，并通过表面明胶涂覆方法对聚乳酸纤维支架进行改性修饰，对改性修饰后支架进行了扫描电镜和体外矿化能力研究；最后，将制备所得的聚乳酸纤维复合明胶支架进行兔桡骨缺损修复实验，检验其骨缺损修复能力。通过上述研究，对新型的熔融离心纺丝方法制备聚乳酸纤维及支架应用于临床提供依据，期望开发出可应用于临床的骨组织工程材料。

第一部分：熔融离心纺丝聚乳酸纤维的制备、表征以及生物相容性研究。通过多次试验，得到聚乳酸（PLLA，粘均分子量：90595）进行熔融离心纺丝的适宜温度为：旋碟中心220℃、旋碟边缘180℃；能够得到成形纤维的最低转速和最高转速分别为300 rpm和 500 rpm，而制备纤维产量最大的转速为 900 rpm，得到初次纺丝纤维三种。以制备所得纤维分别作为原材料，按照各自的制备转速进行二次纺丝，得到二次纺丝纤维三种。利用扫描电镜、直径分布、力学强度、热力学性质、结晶度、热力学降解、X 线衍射和红外衍射等对所制备的六种不同聚乳酸纤维进行表征。将小鼠胚胎成骨细胞前体（MC3T3-E1）细胞种植于六种纤维和静电纺丝膜上，利用 MTT 法检测不同材料在 1d、3d 和 7d 对成骨增殖的影响，利用扫描电镜法观察不同材料在 1d、3d、7d 和 14d 对细胞形态和长入能力的影响，并利用六种纤维和静电纺丝纤维毡的 24h 材料浸提液，行 MTT 检测，检验材料的急性细胞毒性。结果显示：熔融离心纺丝所获得聚乳酸无纺纤维拥有棉花样、直径分布较宽的三维立体结构；其理化性质可根据不同的原材料和转速进行调整；相对于静电纺丝纤维毡，熔融离心纺丝纤维其细胞生物相容性更好。

第二部分：熔融离心纺丝聚乳酸纤维复合明胶支架的制备、表征以及体外相容性实验。采用三氯甲烷气体作为粘连剂，利用溶剂气体表面粘连法成功制备了聚乳酸纤维支架，其最佳粘连时间为 90min，并明确支架成形所需最低的纤维密度为 0.1g/cm^3，此外还制备了密度为 0.15g/cm^3 以及 0.2g/cm^3 的支架，利用力学强度、孔隙率、扫描电镜等对三种不同密度的纤维支架进行了表征，并将小鼠胚胎成骨细胞前体（MC3T3-E1）细胞种植于 0.15g/cm^3 纤维支架上，利用扫描电镜法观察密度为 0.15g/cm^3 纤维支架在 7d 时对细胞长入能力的影响。将密度为 0.15g/cm^3 的纤维支架进行明胶表面涂覆修饰，制备得到 0.1%、0.5%、1%和 10%浓度明胶表面涂覆修饰的复合支架。利用扫描电镜法观察改性后支架的表面形态和体外矿化后沉积物表面形态，利用矿化前后质量改变、沉积物 X 线衍射以及等离子体发射光谱等方法对复合支架进行表征。结果显示：采用三氯甲烷气体作为粘连剂，粘连作用 60-90min 后可成功制备出聚乳酸纤维支架；其力学强度及孔

隙率等性质可根据粘连时间和纤维密度等条件进行人为调节；密度为0.15g/cm^{3}的单纯聚乳酸纤维支架具有良好的力学强度和孔隙结构，并且利于细胞的长入；利用0.5%浓度明胶对支架进行表面修饰后可获得孔隙率和体外矿化能力良好的类细胞外基质支架。

第三部分：熔融离心纺丝聚乳酸纤维复合明胶支架的兔桡骨缺损修复实验。根据前期工作，选择力学强度、孔隙结构和矿化能力性能较好的聚乳酸/明胶复合支架进行兔桡骨缺损修复试验，分别于2week、4week、6week、9week和12week进行大体观察和X线观察。结果显示：兔桡骨缺损修复效果：聚乳酸纤维/明胶复合支架 >10%羟基磷灰石/聚乳酸粒子粒滤支架>单纯聚乳酸纤维支架>单纯聚乳酸粒子沥滤支架>商品化纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合支架>空白对照组。

关键词：

熔融纺丝,骨组织工程支架,纤维,复合材料,聚乳酸

Abstract

A cotton-like nonwoven melt spinning PLA fiber/gelatin scafford for tissue engineering

The tissue engineering is the interface of myriad research areas including polymer chemistry, materials science, cell and molecular biology, and clinical medicine. At the base lies three components, a scaffold, cells, and soluble factors, and each plays a pivotal part in the healing and regeneration process. The main role of the scaffold is to provide a structurally relevant 3D environment that defines the shape of the tissue and allows the cells to adhere. An ideal scaffold there is some characteristics that it must have. It must be highly porous to allow cell penetration. Cellular penetration is critical for tissue ingrowth to occur. On the other hand, the goals of creating a highly porous environment, and using a biocompatible and biodegradable material are just steps toward the ultimate goal of regenerating the function. Biomimetic scaffolds assist in this goal by reproducing the structure of the natural extracellular matrix (ECM).

The past decade has seen increasingly rapid advances in the field of biodegradable polymer fibers. Large surface area to volume ratio, flexibility, rate of bio-resorption and highly permeable properties are some of the advantages that make fibers potential in tissue engineering applications. The technique of electro-spinning has been extensively employed to generate scaffolds. The nano-scaled and nonwoven structures of electro-spinning fibers with their inherent porosity and random arrangement can mimic the extracellular matrix, which is highly critical for any in vivo tissue engineering applications. However, the average pore size obtained is less than 1 μm and is much smaller than the actual cell size (5–20 μm), thus, the lack of penetration of the cells into the nanofibrous scaffolds was inevitable. Moreover, the toxicity of the solvent used for electro-spinning scaffolds or mats restricted the application for many tissue-engineering applications.

Thus, in this study, we were motivated to attain higher pore sizes to facilitate infiltration and cellular in-growth, while keeping the solvent free. In this work, a cotton-like nonwoven

fibers of Poly (lactic acid) (PLA) were fabricated successfully using the centrifugal melt-spinning device. The effects of the centrifugal melt-spinning parameters on the fibers diameter distribution were investigated. The physical and mechanical properties, and the cell compatibility were then studied. Following，the Gelatin/ PLA fiber composite scaffolds were fabricated by using the centrifugal melt-spinning PLA fibers. The physical and mechanical properties, the cell compatibility and in vivo implantations were studied.

1、A cotton-like nonwoven PLA fiber was fabricated by melt spinning for tissue engineering. In this study, ultrafine and cotton-like PLA fibers were successfully fabricated by centrifugal melt-spinning which is a novel technology to produce nonwoven fiber and scaffold. The processing of centrifugal melt-spinning PLA fiber as well as centrifugal speeds were investigated to analyze the effect of process variables on the properties by the methods of differential scanning calorimetry (DSC)，Scanning electron microscopy (SEM)，Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In addition, the preliminary studies of fibers for cell compatibility were conducted. We found that the centrifugal speed range from 350 to 1500 rpm which were satisfied the need of melt spanning. The centrifugal melt spinning fibers was cotton-like, extensive diameters distribution and three-dimensional structure. The diameters and mechanical properties of the novel PLA fiber are subject to being manipulated by centrifugal speed and raw material properties. The fiber diameter distributions fall within the nanometer-to- micrometers range. The average diameter of the most finest ones in all samples was 3. 47±3. 48μm and the other extreme ones was 12. 98±16. 95μm. In addition, the fibers produced by our method has lower cytotoxicity and higher proliferation then the electro-spinning specimens，while there is no significant difference between the centrifugal melt spinning fibers.

2、The preparation and characterization of Gelatin/PLA fiber composite scaffolds fabricated by using the centrifugal melt-spinning PLA fibers. The preliminary studs provide the centrifugal melt-spinning PLA fibers，and then the Gelatin/PLA fiber composite scaffolds were prepared by solvent fumigation and surface coating method. The processing of PLA fiber composite scaffolds as well as fumigation time and density of PLA fiber were investigated to analyze the effect of process variables on the properties by the methods of

Scanning electron microscopy (SEM) and mechanical testing The porosity of scaffold were characterized by ethanol displacement method, and the preliminary studies of PLA fiber scaffolds for cell compatibility were conducted. In addition, The Gelatin/PLA fiber composite scaffolds was immersed into simulated body fluid for 3d, 5d and 7d, respectively.The surface morphology of samples were observation by ESEM, quality changes was measured by TGA, Ca and P content of samples were detected by ICP-OES, and evolution process of crystal structure was investigated by means of XRD method for different immers times. We found that the solvent fumigation time range from 60min to 90min which were satisfied the need of scaffold preparation. The minimum density of PLA fiber should be 0.15g/cm 3 which have the most advantage of cell permeability. In addition, the minimum concentration of gelatin should be 0.5%.

3. In vivo implantation of the Gelatin/PLA fiber composite scaffolds. The Gelatin/PLA fiber composite scaffolds were implanted into the bone defect space of rabbit to evaluate the capacity of bone repair materials. After the postoperative 0w, 2w, 4 w, 6w , 9w and 12w, X-ray detection of the amount of bone formation. For the animal test, there was rapid healing in the defects treated with Gelatin/PLA fiber scaffolds and pure PLA fiber scaffolds.

Key words:

melt-spinning, bone tissue engineering, fiber, composite scaffolds, PLA

目　录

第 1 章　绪　论 1
1.1　前　言 1
1.2　纤维性多孔骨组织工程支架材料 2
1.2.1　微米级纤维支架的制备方法及应用 3
1.2.2　纳米级纤维支架的制备方法及应用 4
1.3　多孔海绵状支架的制备方法及应用 6
1.3.1　溶液浇铸/粒子沥滤法 7
1.3.2　相分离法 7
1.3.3　气体发泡 8
1.3.4　快速成型技术 8
1.3.5　水凝胶法 8
1.4　本论文的研究目标、内容及创新 9
1.4.1　研究目标 9
1.4.2　研究内容 10
1.4.3　研究创新点 10
第 2 章　熔融离心聚乳酸纤维的制备、表征以及生物相容性研究 13
2.1　引　言 13
2.2　实验仪器和材料 13
2.2.1　主要仪器及试剂 13
2.2.2　实验细胞 14
2.2.3　主要溶液的配制 14
2.3　实验方法 14
2.3.1　熔融离心纺丝机的原理 14
2.3.2　聚乳酸纤维的制备 15
2.3.3　聚乳酸纤维的形态以及直径分布表征 16
2.3.4　力学测量 16
2.3.5　分子量测定 16

2.3.6 傅里叶转换红外光谱（FTIR） 16
2.3.7 差示扫描量热分析（DSC） 16
2.3.8 X 射线衍射（XRD） 17
2.3.9 细胞相容性 17
2.3.10 细胞形态观察 17
2.3.11 统计与分析 18
2.4 结 果 18
2.4.1 熔融离心纺丝纤维的形态与直径分布 18
2.4.2 力学性能 22
2.4.3 热力学降解 24
2.4.4 热力学性质及结晶度 25
2.4.5 急性细胞毒性实验 26
2.4.6 材料对细胞的增殖能力影响 27
2.4.7 材料对细胞形态的影响 27
2.5 讨 论 30
2.5.1 熔融离心纺丝聚乳酸纤维的形态 30
2.5.2 熔融离心纺丝聚乳酸纤维的直径分布 31
2.5.3 熔融离心纺丝聚乳酸纤维的力学性能 33
2.5.4 熔融离心纺丝聚乳酸纤维的热力学分解和稳定性 34
2.5.5 熔融离心纺丝聚乳酸纤维的生物相容性 34
2.5.6 熔融离心纺丝聚乳酸纤维的细胞形态学观察 35
2.6 小 结 36
第 3 章 熔融离心聚乳酸纤维/明胶复合支架的制备以及表征 37
3.1 引 言 37
3.2 材料与方法 37
3.2.1 主要药品和仪器 37
3.2.2 实验细胞 38
3.3 实验方法 38
3.3.1 熔融离心纺丝聚乳酸纤维支架的制备 38

3.3.2 单纯纤维支架的力学测试 38
3.3.3 单纯纤维支架的微观形态 38
3.3.4 单纯纤维支架的孔隙率测定 39
3.3.5 单纯纤维支架对细胞增殖的影响 39
3.3.6 单纯纤维支架的细胞渗透性 39
3.3.7 熔融离心纺丝聚乳酸纤维复合明胶支架的制备 40
3.3.8 复合支架的微观形态 40
3.3.9 复合支架的体外矿化 40
3.4 实验结果 40
3.4.1 单纯纤维支架的制备 40
3.4.2 单纯纤维支架的力学测试 41
3.4.3 单纯纤维支架的微观形态观察 42
3.4.4 单纯纤维支架的孔隙率测试 44
3.4.5 纤维支架对细胞增殖的影响 44
3.4.6 纤维支架的细胞渗透性 45
3.4.7 熔融离心纺丝聚乳酸纤维复合明胶支架的微观形态 46
3.4.8 复合支架的体外矿化能力 48
3.5 讨 论 51
3.5.1 单纯纤维支架的制备与筛选 51
3.5.2 MD 纤维支架的细胞渗透性 52
3.5.3 明胶与 MD 纤维支架的复合支架的制备与筛选 52
3.5.4 明胶与 MD 纤维支架的复合支架的矿化能力研究 52
3.6 小 结 53
第 4 章 聚乳酸纤维复合明胶支架的兔挠骨缺损修复实验 55
4.1 主要药品、仪器和实验动物 55
4.1.1 主要药品和仪器 55
4.1.2 实验动物 55
4.2 实验方法 55
4.2.1 骨修复支架材料的制备与消毒 55

4.2.2 兔桡骨缺损模型的建立及动物分组 55
4.2.3 术后护理及观察 56
4.3 结果 56
4.3.1 大体观察 56
4.3.2 大体标本观察结果 56
4.3.3 X 光片评价 57
4.4 讨论 65
4.4.1 空白组修复情况 65
4.4.2 单纯聚乳酸纤维支架与粒子沥滤支架骨修复效果比较 65
4.4.3 聚乳酸纤维/明胶复合支架、10%羟基磷灰石/聚乳酸粒子粒滤支架和商品化纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合支架骨修复效果比较 65
4.5 小 结 65
第 5 章 结 论 67
参考文献 69
在学期间所取得的科研成果 81
致 谢 83